



PONTIFICIA UNIVERSIDAD  
**CATOLICA**  
DE VALPARAISO



UNIVERSIDAD TECNICA  
FEDERICO SANTA MARIA

**PONTIFICIA UNIVERSIDAD CATOLICA DE VALPARAISO**  
**UNIVERSIDAD TECNICA FEDERICO SANTA MARIA**  
**DOCTORADO EN BIOTECNOLOGIA**



**CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE COMPUESTOS**  
**HERBICIDAS DEL TIPO S-TRIAZINAS Y ESTUDIOS DE SU**  
**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO**

Tesis presentada para la obtención del Grado Académico  
**DOCTOR EN BIOTECNOLOGIA**

**PATRICIO VILLALOBOS BIAGGINI**

Director de tesis: Dr. Michael Seeger Pfeiffer

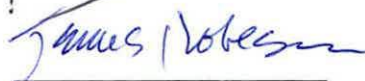
Junio, 2008

**COMISIÓN EVALUADORA INTEGRADA POR**

**Dr. FERNANDO ACEVEDO B. (EIB-PUCV)**



**Dr. JAMES ROBESON C. (IB-PUCV)**



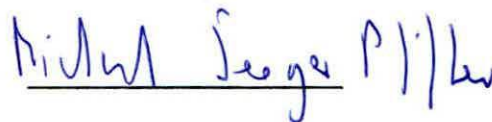
**Dr. BERNARDO GONZÁLEZ O. (FCB-PUC)**



**Dr. HOMERO URRUTIA B. (FCB-UCO)**

**Director de tesis:**

**Dr. MICHAEL SEEGER P. (UTFSM)**



*"Que el conocimiento y la verdad lleguen a todos  
y estén por encima de las creencias difundidas  
por intereses políticos y económicos"*

A Susana

*... mi esposa de corazón inmenso, a la cual presentí de poca paciencia,  
y me ha demostrado estos años, que la posee sin límites...*

A Dios

*...esa fuerza necesaria, oportuna, inequívoca e inexplicable.*

## Agradecimientos

1. A MECESUB por el financiamiento recibido a través de la Beca PUCV-0206, apoyo económico por 2 años y por el financiamiento para la estancia intencional, clave en el desarrollo de esta tesis.
2. A mi familia, Susana, Tomás, Bastián y Fernanda, y también a "la Tilita", quienes debieron compartir su tiempo con libros y cuadernos, soportar minutos hurraños, pues fueron mis motores cuando no había combustible.
3. Al Dr. Michael Seeger, por el espacio en su laboratorio. Por la crítica, por su simpleza, y apoyo.
4. A la Señora Ingeniera Myriam González, por su apoyo experimental y técnico en el HPLC, pero por sobre todo por su calidad humana y sabios consejos.
5. Al Dr. Eduardo Santero, y su grupo de CABD, UPO, Sevilla, España. Fernando, Vicente, Belén, Inés, Maribel y, en especial a Francisca, quienes me recibieron y me hicieron sentir como en casa.
6. A Don Sergio Marshall, por moldear mi ADN para esto. Por sus consejos, fuerza y pasión puesta en lo que hace.
7. Al Dr. Jorge Escobar y Dr. James Robeson, principalmente por expresar la palabra "philosophical"...Mis especiales gracias por la amistad.
8. A mis profesores del Programa, por la entrega en la enseñanza, más allá de su competencia. En especial a Don Manuel Young por su apoyo y nobleza.
9. A mis compañeros del doctorado. Por las reuniones de toda índole. Por el tiempo compartido dentro y fuera de las aulas.
10. Al personal de la PUCV y de la USM, los que no están directamente involucrados, pero que con su valioso trabajo, permiten que día a día, personajes como el mío lleven a cabo sus logros.
11. Finalmente, deseo ofrecer mis más expresivas y humildes disculpas, a quienes, por momentos, no dediqué tiempo y altura en el trato. En esos momentos debí estar en lo profundo de mi pasión. . . **la ciencia.**

| Índice  | Página |
|---|--------|
| <b>Resumen</b>  | 1      |
| <b>Abstracts</b>  | 3      |
| <b>1. Introducción</b>  | 5      |
| <b>1.1 Bacterias y contaminación ambiental</b>                                  | 6      |
| <b>1.2 Herbicidas s-triazinas</b>   |        |
| 1.2.1 atrazina y Simazina   | 7      |
| 1.2.2 Efectos tóxicos de s-triazinas  | 8      |
| 1.2.3 Efectos sobre los vegetales   | 9      |
| <b>1.3 Degradación de s-triazinas</b>   |        |
| 1.3.1 Degradación biótica   | 9      |
| 1.3.2 Degradación por microorganismos   | 10     |
| 1.3.3 La ruta de degradación de atrazina  | 11     |
| 1.3.4 Genes que codifican enzimas del catabolismo de s-triazinas                | 13     |
| <b>1.4 Regulación génica en bacterias</b>                                       | 16     |
| 1.4.1 Operones catabólicos  | 17     |
| 1.4.2 Regulación de genes <i>atz</i> en la degradación de atrazina              | 17     |
| <b>1.5 Procesos de biorremediación de s-triazinas</b>                           | 18     |
| <b>Hipótesis</b>  | 21     |
| <b>Objetivo general</b>   | 21     |
| <b>Objetivos específicos</b>  | 21     |
| <b>2. Materiales y métodos.</b>   | 22     |
| <b>2.1 Estructura general del estudio de bacterias degradadoras de simazina</b> | 23     |
| <b>2.2 Técnicas y materiales</b>  |        |
| 2.2.1 Herbicidas s-triazinas  | 24     |
| 2.2.2 Bacterias y condiciones de cultivo  | 24     |
| 2.2.3 Descripción e identificación de los aislados bacterianos                  | 25     |
| 2.2.4 Crecimiento bacteriano en ensayos de degradación                          | 27     |
| 2.2.5 Formación de halos de degradación   | 28     |
| 2.2.6 Ensayos en microcosmos  | 29     |

|   |    |
|---|----|
| <b>2.3 Métodos analíticos</b>   |    |
| 2.3.1 Detección de simazina   | 30 |
| 2.3.2 Transformación de células bacterianas   | 30 |
| 2.3.3 Transferencia de plásmidos a <i>Pseudomonas</i>   | 31 |
| 2.3.4 Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa  | 31 |
| <b>2.4 Técnicas de biología molecular</b>   |    |
| 2.4.1 Secuenciación del que codifica para el RNAr 16S   | 32 |
| 2.4.2 Preparación de DNA  | 33 |
| 2.4.3 Electroforesis en gel de agarosa  | 34 |
| 2.4.4 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa  | 34 |
| 2.4.5 Detección de los genes catabólicos <i>atz</i>   | 34 |
| 2.4.6 Ensayos de retrotranscripción   | 36 |
| 2.4.7 Ensayos transcripcionales en <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41   | 37 |
| <b>3. Resultados</b>  | 39 |
| <b>3.1 Caracterización e identificación de cepas bacterianas degradadoras de s-triazinas</b>                              |    |
| 3.1.1 Efecto de la simazina sobre las bacterias heterótrofas cultivables  | 40 |
| 3.1.2 Caracterización e identificación de bacterias que degradan s-triazinas  | 41 |
| <b>3.2 Estudio del Catabolismo de s-triazinas por las cepas bacterianas</b>   |    |
| 3.2.1 Genes catabólicos <i>atz</i>  | 45 |
| 3.2.2 Formación de halos de degradación y selección de cepas  | 48 |
| 3.2.3 Estabilidad de genes catabólicos <i>atz</i> en las cepas de <i>Pseudomonas</i>                                      | 50 |
| 3.2.4 Curvas de crecimiento de las cepas de <i>Pseudomonas</i> seleccionadas  | 51 |
| <b>3.3. Estudios de regulación</b>  |    |
| 3.3.1 Ensayos de degradación de simazina con células en reposo  | 55 |
| 3.3.2 Ensayos de retrotranscripción   | 59 |
| 3.3.3 Expresión de genes <i>atz</i> en genes reporteros   | 62 |
| 3.3.4 Ensayos transcripcionales en <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 de genes <i>atz</i> de <i>Pseudomonas</i> sp. ADP | 63 |
| 3.3.5 Regulación del gen <i>atzD</i> nativo   | 65 |
| 3.3.6 Secuenciación de la región <i>atzDR</i> de <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41                                     | 67 |

|   |     |
|---|-----|
| <b>3.4 Ensayos de degradación en microcosmos</b>  |     |
| 3.4.1 Biorremediación   | 68  |
| 3.4.2 Ensayos de bioestimulación  | 74  |
| <b>4. Discusión</b>   | 78  |
| 4.1 Caracterización de cepas bacterianas desde suelos agrícolas                         | 79  |
| 4.2 Degradación de s-triazinas por bacterias de suelo                                   | 82  |
| 4.3 Regulación de la degradación de s-triazinas en <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 | 85  |
| 4.4 Biorremediación de simazina en microcosmos  | 90  |
| <b>5. Conclusiones</b>  | 93  |
| <b>6. Referencias</b>   | 96  |
| <b>Anexos</b>   | 104 |
| Presentaciones a Congresos Nacionales   | 105 |
| Presentaciones a Congresos Internacionales  | 105 |
| Solicitud de Patente  | 106 |
| Publicaciones   | 106 |

| Índice de Tablas  | Página |
|---|--------|
| <b>Tabla 1.</b> Plásmidos y cepas bacterianas utilizados en este trabajo  | 26     |
| <b>Tabla 2.</b> Secuencias de oligonucleótidos empleados para la búsqueda de genes <i>atz</i>   | 35     |
| <b>Tabla 3.</b> Ciclos empleados en la PCR para la amplificación de genes catabólicos <i>atz</i>  | 36     |
| <b>Tabla 4.</b> Caracterización fenotípica e identificación de las cepas bacterianas provenientes de suelos agrícolas del Valle de Aconcagua  | 42     |
| <b>Tabla 5.</b> Perfil de pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana empleando el sistema Biolog   | 44     |
| <b>Tabla 6</b> Detección de genes catabólicos <i>atz</i> en las cepas bacterianas   | 47     |
| <b>Tabla 7.</b> Frecuencia de conjugación de <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 con plasmidios de diferentes grupos de incompatibilidad.  | 63     |
| <b>Tabla 8.</b> Valores de conjugación en <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 con vectores <i>atzD-lacZ</i> y <i>atzR-lacZ</i> creadas con los genes <i>atzR</i> y <i>atzD</i> de <i>Pseudomonas</i> sp cepa ADP | 64     |
| <b>Tabla 9.</b> Alineamientos de secuencias <i>atzD</i> y <i>atzR</i> de <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 con la base de datos genbank.   | 67     |

| Índice de Figuras   | Página |
|---|--------|
| <b>Figura 1.</b> Estructura química de los herbicidas s-triazinas atrazina y simazina   | 8      |
| <b>Figura 2.</b> Ruta de degradación de atrazina de <i>Pseudomonas</i> sp.  | 12     |
| <b>Figura 3.</b> Representación del plásmido pADP-1 de <i>Pseudomonas</i> sp. cepa ADP.   | 14     |
| <b>Figura 4.</b> Diagrama del plan estratégico para la caracterización de cepas bacterianas degradadoras de s-triazinas aisladas de suelos agrícolas  | 23     |
| <b>Figura 5.</b> Dispensador de simazina en medio mínimo  | 28     |
| <b>Figura 6.</b> Efecto de la simazina sobre las cepas bacterianas heterótrofas cultivables   | 40     |
| <b>Figura 7.</b> Detección de genes catabólicos <i>atz</i> para la degradación de simazina en <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41  | 46     |
| <b>Figura 8.</b> Formación de halos de degradación por las cepas bacterianas  | 49     |
| <b>Figura 9.</b> Formación de halo de degradación por colonias y presencia de genes <i>atz</i>  | 51     |
| <b>Figura 10.</b> Crecimiento de <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 con diferentes fuentes de nitrógeno   | 52     |
| <b>Figura 11.</b> Degradación de simazina durante el crecimiento de <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 en medio mínimo  | 53     |
| <b>Figura 12.</b> Crecimiento de <i>Pseudomonas citronellosis</i> con diferentes fuentes de nitrógeno   | 54     |
| <b>Figura 13.</b> Ensayos de degradación de simazina con células en reposo de <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41  | 56     |
| <b>Figura 14.</b> Ensayos de degradación de simazina con células en reposo de <i>Pseudomonas citronellosis</i> P21.   | 58     |
| <b>Figura 15.</b> Expresión de genes <i>atz</i> en <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 crecida en diferentes fuentes de nitrógeno  | 61     |
| <b>Figura 16.</b> Fusiones <i>atz-lac Z</i> conteniendo las secuencias de genes <i>atzR</i> y <i>atzD</i> de <i>Pseudomonas</i> sp cepa ADP ensayadas en <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 | 64     |
| <b>Figura 17.</b> Actividad $\beta$ -galactosidasa del vector <i>atzD-lac Z</i> en <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41   | 66     |
| <b>Figura 18.</b> Secuencia parcial de la región génica <i>atzD</i> y <i>atzR</i> en <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41   | 68     |
| <b>Figura 19.</b> Recuento de cepas bacterianas heterótrofas y degradadoras de simazina   | 69     |
| <b>Figura 20.</b> Recuento de cepas bacterianas degradadoras en ensayos de biorremediación.   | 71     |
| <b>Figura 21.</b> Recuento de heterótrofos, de <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 y <i>Pseudomonas citronellosis</i> P21 en ensayos de microcosmos  | 72     |
| <b>Figura 22.</b> Remoción de simazina desde microcosmos bioaugmentados con cepas de <i>Pseudomonas</i> .   | 73     |
| <b>Figura 23.</b> Ensayos de bioestimulación  | 76     |
| <b>Figura 24.</b> Degradación de simazina en suelos bioestimulados y bioaugmentados con <i>Pseudomonas citronellosis</i> P21  | 77     |
| <b>Figura 25.</b> Modelo propuesto para la regulación del gen <i>atzD</i> en <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41.  | 88     |

## Resumen

Los plaguicidas representan un instrumento imprescindible en la agricultura para el control de plagas. Sin embargo, estos compuestos xenobióticos poseen un gran potencial contaminante. Las s-triazinas (atrazina y simazina) son herbicidas de amplio uso nacional e internacional en suelos agrícolas. La lenta degradación y los efectos de lixiviación han llevado a que estos compuestos sean detectados como contaminantes en aguas subterráneas y superficiales, por lo que se han convertido en un grave problema ambiental. El metabolismo microbiano es el principal mecanismo para degradar compuestos orgánicos xenobióticos. En Chile no existen estudios sobre la degradación de s-triazinas, y descontaminación de los campos agrícolas contaminados con este herbicida.

Se postula que cepas bacterianas nativas aisladas desde suelos agrícolas del valle de Aconcagua tienen la capacidad de degradar simazina y son eficientes en procesos de biorremediación de suelos contaminados con este herbicida. Los objetivos de este estudio fueron caracterizar cepas bacterianas aisladas desde suelos agrícolas, capaces de degradar s-triazinas y establecer condiciones para emplear estos microorganismos en procesos de biorremediación de suelos contaminados con estos herbicidas.

Se caracterizaron 32 cepas bacterianas aisladas desde suelos agrícolas. Basado en la tinción Gram y descripción de las características fenotípicas de la colonia (tamaño, bordes, olor, color) las cepas fueron clasificadas en 8 grupos. Se identificaron empleando el sistema de identificación Biolog y mediante secuenciación del gen que codifica el RNA ribosomal 16S. Las cepas bacterianas identificadas correspondieron a *Achromobacter xylosoxidans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter chlorophenolicus*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus pumilus*, *Brevundimonas vesicularis*, *Pseudomonas synthaxa*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas citronellosis*, *Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus erythropolis*, *Stenotrophomonas sp.* y *Stenotrophomonas maltophilia*.

Se determinó la presencia de los genes catabólicos de s-triazinas mediante PCR. En 9 cepas bacterianas se detectaron todos los genes de la ruta superior (*atzA*, *atzB*, *atzC*) e inferior (*atzD*, *atzE*, *atzF*) de la degradación de simazina. En el resto de las cepas sólo se detectó la presencia de algunos de los genes de estas rutas.

*Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 fueron capaces de degradar la simazina en forma eficiente. Ambas cepas crecen en simazina y ácido cianúrico como única fuente de nitrógeno. Estas cepas poseen los seis genes *atz* de la ruta de degradación de simazina. Las cepas degradan más de un 60% de simazina en ensayos con células en reposo.

Se evaluó el efecto de algunas fuentes N, presentes en suelos agrícolas, sobre la expresión de genes de la ruta de degradación de simazina empleando *Pseudomonas nitroreducens* P41 como modelo de estudio. A diferencia de otras cepas degradadoras de *s*-triazinas descritas, *Pseudomonas nitroreducens* P41 se puede modificar genéticamente con facilidad, mediante conjugación con plásmidos de distinto grupo de incompatibilidad. La actividad de degradación de simazina en esta bacteria está controlada por la disponibilidad de fuentes de nitrógeno. *Pseudomonas nitroreducens* P41 mostró significativa actividad metabólica en presencia de nitrato, un compuesto común en los suelos agrícolas. En presencia de amonio, se observó una baja degradación de simazina. En condiciones de nitrógeno limitante la utilización del herbicida aumentó. Mediante experimentos de expresión de genes y ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa, se observó que los genes *atz* de vía superior son constitutivamente expresados y que el gen *atzD* es regulado por la disponibilidad de nitrógeno, simazina y ácido cianúrico.

Se evaluó la capacidad degradativa de simazina de *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 en microcosmos de suelos agrícolas tratados con simazina (20 ppm). La viabilidad de ambas cepas de *Pseudomonas* en estos suelos, se mantuvo por dos semanas. La simazina es degradada en menos de 5 días en los suelos. Ensayos adicionales con *Pseudomonas citronellosis* P21, indican que la adición de succinato como fuente de carbono no incrementó la degradación de simazina.

*Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 son promisorias candidatas para ser empleadas en procesos de biorremediación de suelos contaminados con simazina.

## ABSTRACT

Pesticides are essential in agriculture to control organisms that are detrimental for the massive production on fields. However, these xenobiotic compounds have a great pollution potential. *s*-Triazines (atrazine, simazine) are herbicides widely used in Chile and other countries. These herbicides show slow degradation in soil and leaching to ground water. Microbial metabolism is the main mechanism for removal *s*-triazines from environment. In Chile, studies about *s*-triazine degradation have not been reported.

The hypothesis of this thesis is that bacterial strains isolated from native agricultural soils of Aconcagua valley are able to degrade simazine and could be used efficiently in bioremediation of herbicide-contaminated soils. The aims of this study were to characterize bacteria isolated from agricultural soils capable to degrade simazine and to establish the conditions to use these microorganisms in bioremediation processes.

32 bacterial strains isolated from agricultural soils were characterized. Strains were classified into eight groups based on Gram staining and the phenotypic characteristics of the colonies (size, border and odor). Strains were identified using a Biolog system and the sequencing of 16S RNAr. Strains of *Achromobacter xylosoxidans*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Alcaligenes faecalis*, *Arthrobacter chlorophenolicus*, *Arthrobacter globiformis*, *Bacillus pumilus*, *Brevundimonas vesicularis*, *Pseudomonas synthaxa*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Pseudomonas citronellois*, *Rhodococcus sp.*, *Rhodococcus erythropolis*, *Stenotrophomonas sp.* y *Stenotrophomonas maltophilia* were identified.

Detection of catabolic *atz* genes for the degradation of *s*-triazines was carried out by PCR. Nine species contained all *atz* genes of the upper pathway (*atzA*, *atzB*, *atzC*) and the lower pathway (*atzD*, *atzE*, *atzF*) of simazine degradation. In other bacterial strains only some the metabolic *atz* genes were detected. *Pseudomonas nitroreducens* P41 and *Pseudomonas citronellois* P21 contained all *atz* genes and were able to efficiently degrade simazine. Both strains were capable to grow using simazine and cyanuric acid as sole nitrogen source. Simazine degradation over 60% in 20 min was observed using resting cells of *Pseudomonas nitroreducens* P41 and *Pseudomonas citronellois* P21.

The effect of different nitrogen sources on simazine degradation by the model bacterium *Pseudomonas nitroreducens* P41 was investigated. The simazine degradation in *Pseudomonas nitroreducens* depends on the nitrogen sources available. Interestingly, *Pseudomonas nitroreducens* P41 exhibited significant metabolic activity in the presence of nitrate. After growth using ammonium as nitrogen source, low degradation was observed. Under nitrogen limitation, the

degradation of the herbicide increased. In contrast to other s-triazine-degrading bacterial strains, *Pseudomonas nitroreducens* P41 can be genetically modified through conjugation with plasmids from different incompatibility groups. Regulation of *atz* genes were studied by gene expression experiments and  $\beta$ -galactosidase activity assays. The *atz* genes of the upper pathway were constitutively expressed, while *atzD* gene was regulated by the nitrogen source, simazine and cyanuric acid.

Simazine degradation by *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 was evaluated in agricultural soils microcosms treated with simazine (20 ppm). Both strains were viable for two weeks. The simazine was degraded within five days. Assays using *Pseudomonas citronellosis* P21 indicated that the addition of succinate as carbon source not increased simazine degradation.

*Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 are promissory candidates to be used in bioremediation processes of simazine-contaminated soils.



## 1.

**Introducción**

## 1.1

**Bacterias y contaminación ambiental**

Las bacterias regulan su metabolismo en respuesta a cambios en el ambiente en función de una gran variedad de estímulos en su entorno como lo son la temperatura, osmolaridad, pH, presencia de agentes que dañen su ADN. Las bacterias ajustan su metabolismo en función de la disponibilidad de nutrientes, fuentes de energía y aceptores de electrones (Ninfa *et al.*, 1995). Un principio fundamental de la fisiología bacteriana, y con ello, de la regulación de genes, es que ellas perciben una gran variedad de compuestos metabolizables que hay en su entorno y, en función de sus preferencias, activan el metabolismo para usar aquellos más favorables dejando inactivo el del resto. Por esta razón, en general, las bacterias utilizan preferentemente compuestos de fácil metabolización, que se incorporan en pocos pasos en el metabolismo central y con un mínimo consumo energético. Por la complejidad y estabilidad de su estructura química, los compuestos xenobióticos suelen ocupar las últimas posiciones en la lista de preferencias de las bacterias. No obstante, debido a la enorme versatilidad del metabolismo bacteriano, es probable que no exista nicho ecológico en la tierra en el que las bacterias no hayan evolucionado hasta degradar cualquier compuesto disponible para el desarrollo de la vida.

El interés en la biodegradación y las tasas de degradación ambiental de compuestos recalcitrantes se deben a la distribución ubicua y a su potencial toxicidad para la salud humana (Kanaly & Harayama, 2000). En Chile, los accidentes, los procesos industriales y una legislación permisiva han favorecido la presencia de compuestos xenobióticos en el ambiente.

Los plaguicidas representan un instrumento imprescindible en la agricultura. Sin embargo, el uso excesivo de los pesticidas en la agricultura, derrames accidentales, lavado inadecuado de tanques contenedores, filtraciones en los depósitos de almacenamiento y residuos descargados en el suelo (Sanborn *et al.*, 2002) han provocado contaminación del medio ambiente constituyendo un grave problema ambiental. Esta contaminación representa un riesgo para los sistemas biótico y abiótico, amenazando su estabilidad y representando un peligro para la salud pública (Ortiz-Hernández *et al.*, 1997). Los pesticidas son compuestos xenobióticos liberados por el hombre al ambiente, que tienen un mayor potencial contaminante, por aplicarse de forma regular en los campos de cultivo. Estos son compuestos

químicos tóxicos que actúan interfiriendo en las reacciones bioquímicas de los organismos blancos. Sin embargo, la insuficiente especificidad ha provocado que organismos no blancos también puedan ser afectados (Ortiz-Hernández *et al.*, 1997).

En Europa, los herbicidas detectados con mayor frecuencia en suelos agrícolas son los del tipo *s*-triazinas (66%), seguidos de organofosforados (56%) y de los organoclorados (38%) (Garrido *et al.*, 1998). La familia de herbicidas *s*-triazinas, incluye varios miembros que incluyen atrazina, simazina, dietilatrazina y deisopropilatrazina.

## 1.2

## Herbicidas *s*-triazinas

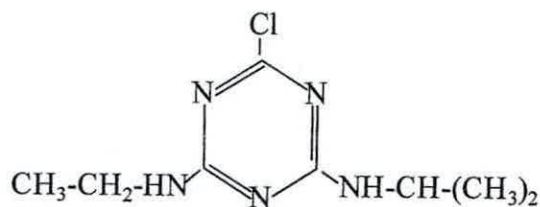
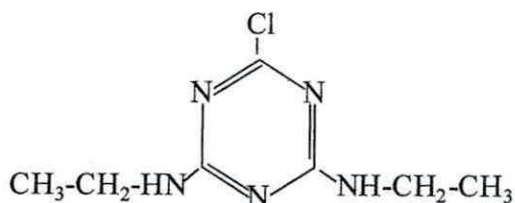
### 1.2.1 Atrazina y Simazina

La familia de herbicidas *s*-triazinas fue sintetizada en la década de 1950 (Ralebitso *et al.*, 2002). Estos compuestos basan su estructura química en un anillo de *s*-triazinas, anillo que contiene tres moléculas de nitrógeno. Las *s*-triazinas difieren entre sí por la sustitución y posición de los radicales alrededor de un anillo triazínico (Seffernick *et al.*, 2000). El anillo de *s*-triazina es además la base de otros herbicidas, resinas, desinfectantes e incluso fertilizantes de liberación lenta (Mandelbaum *et al.*, 1995).

La atrazina (2-cloro-4-(*N*-etilamino)-6-(*N*-isopropilamino)-1,3,5-*s*-triazina) (Figura 1) es un herbicida empleado por más de cuatro décadas. Se emplea como herbicida en los campos de cultivo de maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum* spp.) y caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) (Ralebitso, 2002) para eliminar selectivamente malezas de hoja ancha y algunas gramíneas dicotiledóneas. Este herbicida actúa a nivel de transporte de electrones a nivel del fotosistema II durante la fotosíntesis, produciendo clorosis foliar, necrosis y muerte de la planta (Sundby *et al.*, 1993).

Debido a su bajo costo para el agricultor y a su eficacia como herbicida en la reducción de pérdidas por el crecimiento de malezas, la atrazina ha llegado a ser uno de los 10 herbicidas más utilizados en Estados Unidos (Informe US-EPA, 1991; Seffernick *et al.*, 2000, Rousseaux *et al.*, 2001). En Estados Unidos entre 1980 y 1990 se aplicaron 363 millones de kg de atrazina (Yanze-Kontchou & Gschwind, 1994).

La simazina (2-cloro-4,6-di(*N*-etilamino)-1,3,5-*s*-triazina) (Figura 1), otra *s*-triazina, es un compuesto ampliamente empleado en Chile en los predios agrícolas como herbicida pre-emergente (Narvárez, 1999). A pesar de su extensivo empleo en la agricultura, en el cultivo de palto y caqui, no se registran estudios en Chile sobre la degradación de simazina por microorganismos en suelos agrícolas.

**Atrazina****Simazina**

**Figura 1: Estructura química de los herbicidas *s*-triazinas atrazina y simazina.** Herbicidas de la familia *s*-triazinas empleados en este estudio. La letras indican (N) átomos de N, (Cl) átomos de cloro, (C) átomos de carbono y átomos de hidrógeno (H).

### 1.2.2 Efectos tóxicos de *s*-triazinas

Los efectos tóxicos de las *s*-triazinas fueron descubiertos en los años 1960 (Garrido *et al.*, 1998). La atrazina afecta los ecosistemas, causando alteraciones hormonales en los anfibios, y un descenso en las poblaciones acuáticas de peces, invertebrados y macrófitas, lo que repercute en toda la estructura de la comunidad (EPA, 2003; Hayes *et al.*, 2002; Hayes, 2005). La EPA (2003) ha clasificado la atrazina un carcinógeno humano tipo C, basada en estudios de daños cromosomales en ovarios de hámster (Biradar & Rayburn, 1995) y a disrupciones hormonales provocadas en el hombre (Hayes, 2005). Asimismo, algunos metabolitos producidos durante la degradación de atrazina son potencialmente riesgosos para la salud humana (Ralebitso *et al.*, 2002).

La Organización Mundial de la Salud definió un valor de 2 µg/L de atrazina como concentración máxima permitida en el agua. En Estados Unidos el nivel máximo permitido es de 3 µg/L. La Unión Europea establece un nivel máximo de 0,1 µg/L para cualquier plaguicida (EPA, 2003). Aunque en Europa fue prohibido la aplicación de la *s*-triazinas, tiempo después se registró su empleo en algunas zonas específicas (Tappe *et al.*, 2002).

La atrazina, posee una vida media que oscila entre las 4 y 57 semanas en el ambiente (Cohen *et al.*, 1984; Struthers *et al.*, 1998). La lixiviación de herbicidas en el suelo, así como su lenta degradación en el ambiente han contribuido a la contaminación de aguas superficiales y subterráneas (Mandelbaum *et al.*, 1995; Garrido *et al.*, 1998), registrándose niveles que han sobrepasado ampliamente los límites establecidos por la EPA (Struthers *et al.*, 1998).

### 1.2.3 Efecto sobre los vegetales

Los herbicidas *s*-triazinas se absorben en vegetales a través de la raíz y actúan en la fotosíntesis a nivel de transporte de electrones en el fotosistema II. La absorción de un fotón por el fotosistema P680, produce la reducción de una molécula de quinona asociada al fotosistema (la quinona  $Q_A$ ), que seguidamente transfiere un electrón a una segunda quinona ( $Q_B$ ), y desde ahí al conjunto de plastoquinonas. Los herbicidas triazínicos bloquean la transferencia de electrones desde  $Q_A$  hasta  $Q_B$ , uniéndose a la proteína D1 del fotosistema II, lo que conlleva a una disminución en la cantidad de  $NADP^+$  reducido, necesario para la fijación de  $CO_2$ , y la formación de radicales libres, que provocan la foto-oxidación de clorofilas y otras moléculas del cloroplasto. Se produce clorosis foliar, necrosis y, finalmente, la muerte de la planta (Sundby *et al.*, 1993).

## 1.3

## Degradación de *s*-triazinas

### 1.3.1 Degradación biótica

Los herbicidas *s*-triazinas son persistentes en el ambiente. La atrazina puede ser transformada por fotólisis y por procesos microbianos (Ralebitso *et al.*, 2002; Seffernick *et al.*, 2000). Su degradación química depende de múltiples factores, entre los que destacan la presencia de arcillas y materia húmica, el pH y la exposición a la luz del sol (Burrows *et al.*, 2002; Ralebitso *et al.*, 2002). Existen tratamientos fisicoquímicos para remover la atrazina desde suelos contaminados, entre los que se cuenta la ozonización (Ma & Graham, 2000), la degradación fotoquímica (Konstantinou *et al.*, 2001) y la adsorción a carbón activo (Yue *et al.*, 2006). Sin embargo, la biorremediación se considera el tratamiento de preferencia debido a su bajo costo y mínimo impacto ambiental.

### 1.3.2 Degradación por microorganismos

El metabolismo microbiano es el principal mecanismo para degradar contaminantes orgánicos (Margesin & Schinner, 2001; Navia y Seeger, 2006), entre los que se incluye la atrazina. Los anillos de s-triazina son frecuentes en la naturaleza formando parte de moléculas esenciales para la vida como lo son el ADN, el ATP o el NADH (Wackett & Hershberger, 2001).

Los aislamientos de bacterias y hongos que degradan atrazina se han realizado usando el herbicida como única fuente de nitrógeno (Mandelbaum *et al.*, 1993; Alvey & Crowley, 1995) o fuente de carbono (Yanse-Kontchou & Gschwind, 1994). La influencia de la fuente de carbono puede ser importante en mejorar el uso de la atrazina y sus metabolitos como fuentes de nitrógeno. Algunos estudios han empleado como fuente de carbono citrato para aumentar las propiedades degradativas de los microorganismos aislados (Topp *et al.*, 2000b; Rousseaux *et al.*, 2002), mientras que otros estimulan la degradación con el empleo de glucosa como fuente de carbono (Alvey & Crowley, 1995; De Souza *et al.*, 1998b).

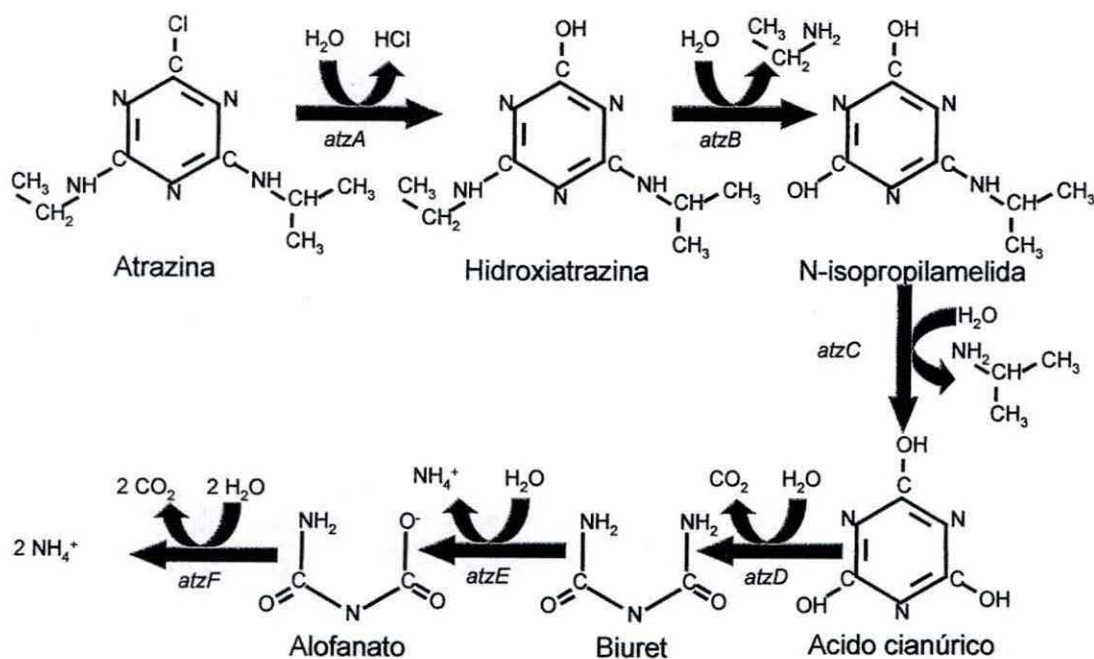
Existen escasos antecedentes sobre la influencia de factores físicos y biológicos en la biodegradación de s-triazinas. Algunos factores abióticos descritos que influyen en la degradación de s-triazinas por parte de los microorganismos, son el pH y la temperatura. A temperaturas bajo 7°C, existe una muy baja tasa de degradación. La degradación mejora significativamente a 30°C (Mandelbaum *et al.*, 1993; Ralebitso *et al.*, 2002). Sin embargo, no existen diferencias significativas de degradación entre 15 y 30°C. Cambios de pH, entre 5,5 y 8,5, no tienen efectos significativos sobre la degradación de triazinas, a temperaturas sobre los 25°C (Mandelbaum *et al.*, 1993).

Se han descrito una gran variedad de géneros bacterianos capaces de degradar atrazina: *Agrobacterium* (Struthers *et al.*, 1998); *Rhodococcus* (Shao & Behki., 1995); *Pseudomonas* (Mandelbaum *et al.*, 1995; Martínez *et al.*, 2001), *Pseudoaminobacter* (Topp *et al.*, 2000a), *Rhizobium* (Bouquard *et al.*, 1997), *Clavibacter* (De Souza *et al.*, 1998a), *Ralstonia* (Radosevich *et al.*, 1995) y *Nocardiodes* (Topp *et al.*, 2000b). Sin embargo, sólo unas pocas cepas son capaces de mineralizar atrazina hasta CO<sub>2</sub> y agua.

### 1.3.3 La ruta de degradación de atrazina

El inicio de la reacción para degradar *s*-triazinas puede ser llevado a cabo por enzimas específicas presentes en sólo unas pocas cepas bacterianas. En la bacteria *Rhodococcus* *sp.* cepa TE1, la primera reacción ocurre por N-desalquilación del anillo aromático (Shao & Behki, 1995). En *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444R (Mulbry *et al.*, 1994) la enzima triazina clorohidrolasa, codificada por el gen *trzA*, puede realizar reacciones de desaminación y descloración de compuestos *s*-triazinas etilsimazina y disetilatrazina (Shao & Behki, 1995). Sin embargo, las reacciones de desalquilación, desaminación o descloración no ocurren sobre un mismo sustrato. La enzima triazina clorohidrolasa cataliza la desaminación de diaminoatrazinas y pirimidinas. Las descloraciones ocurren en triazinas sustituidas con un grupo alquilo simple en sólo uno de sus nitrógenos sustituyentes como ocurre con melamina y dietilsimazina (Nagy *et al.*, 1995; De Souza *et al.*, 1996). Estas enzimas favorecen las reacciones de desaminación sobre las descloraciones al emplear compuestos desalquilados, y no en sustratos de *s*-triazinas cloradas como la atrazina (Seffernick *et al.*, 2000).

La ruta de degradación de atrazina por *Pseudomonas* *sp.* cepa ADP se ilustra en la Figura 2. La ruta de degradación que comprende estos tres pasos enzimáticos iniciales, metaboliza la atrazina hasta ácido cianúrico y se ha denominado la vía superior de degradación de herbicidas *s*-triazinas. Esta vía estaría restringida sólo a unas pocas cepas bacterianas, y a genes altamente conservados (De Souza *et al.*, 1995; 1998a). La enzima



**Figura 2.** Ruta de degradación de atrazina en *Pseudomonas* sp. Se indica en cada paso el gen que codifica la enzima que lo cataliza.

atrazina clorhidrolasa, codificada por el *atzA*, convierte atrazina en hidroxiatrazina. Reacciones sucesivas catalizadas por la enzima hidroxiatrazina hidrolasa, codificada por el gen *atzB* (Boundy-Mills *et al.*, 1997) e isopropilamelida-isopropilaminohidrolasa, codificada por el gen *atzC* (Sadowsky *et al.*, 1998), transforman la hidroxiatrazina en ácido cianúrico. La enzima AtzC tiene una actividad *N*-isopropilamelida-isopropilamino-hidrolasa, que actúa sobre el producto de *atzB* hidroxiatrazina, generando *N*-isopropilamina y ácido cianúrico (Sadowsky *et al.*, 1998). La enzima atrazina clorhidrolasa es un polipéptido de 403 aminoácidos que también pertenece a la superfamilia amidohidrolasa, y forma homotetrámeros con un átomo de Zn (II) en el sitio activo. La mayor identidad de secuencia la presenta con la citosina desaminasa de *Escherichia coli* (29%). La actividad de la enzima puede eliminar las cadenas *N*-etil, *N*-terciaributil y *N*-ciclopropil de los herbicidas simazina, terbutilazina y ciromazina, pero no muestra reacción con pirimidinas estructuralmente análogas ni con otros compuestos que no sean intermediarios de herbicidas (Shapir *et al.*, 2002). También puede hidrolizar *N*-etilamida (De Souza *et al.*, 1998b).

El ácido cianúrico es mineralizado mediante las enzimas codificadas por los genes *atzD*, *atzE* y *atzF* (Cook *et al.*, 1985; Fruchey *et al.*, 2003) y es denominada la vía inferior de degradación. Esta ruta se encuentra presente en diversas cepas bacterianas.

En *Pseudomonas* sp. ADP el ácido cianúrico se hidroliza por la acción de la enzima ácido cianúrico amidohidrolasa, codificada por el gen *atzD*, liberando amonio y biuret. La enzima codificada por el gen *atzD* es isofuncional con la enzima codificada por el gen *trzD* de *Pseudomonas* sp. NRRL B-12227, y posee un 57% de identidad (Fruchey, 2003).

Las enzimas codificadas por los genes *atzE* y *atzF* son miembros de la familia de las amidasas. *AtzE* tiene un 37% de homología con nicotinamidasas/pirazinamidasas de *Mycobacterium smegmatis* y codifica una biuret hidrolasa que genera alofanato (Cheng *et al.*, 2005; Shapir *et al.*, 2002). En todos los organismos degradadores de ácido cianúrico que se han analizado, el alofanato es el intermediario de la ruta. *AtzF* es 44% idéntico al dominio alofanato hidrolasa de la urea amidoliasa de *Saccharomyces cerevisiae* y tiene una identidad de secuencia del 68% con *TrzF* de *Enterobacter cloacae* 99 (Shapir *et al.*, 2002). *AtzF* sólo puede utilizar como sustrato malonato y alofanato, y no es activa con urea y biuret. *AtzF* cataliza la reacción terminal de la ruta, rompiendo simultáneamente tres enlaces C-N y convirtiendo así el producto de *AtzE* en dos moléculas de amonio y otras dos moléculas de dióxido de carbono.

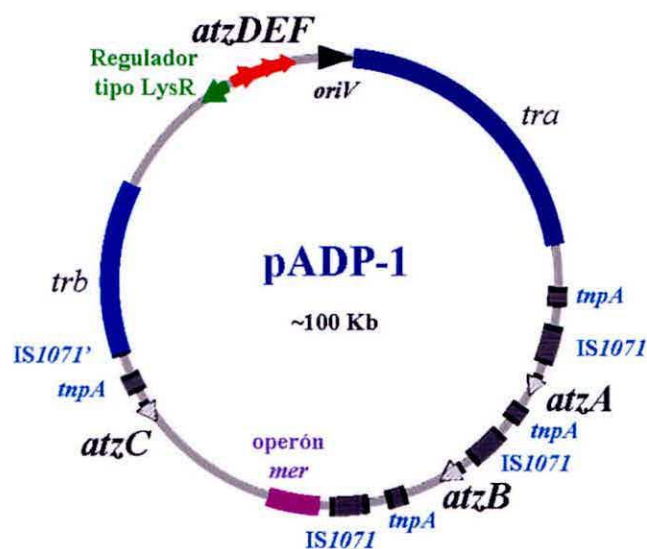
#### 1.3.4 Genes que codifican enzimas del catabolismo de s-triazinas

Los microorganismos se adaptan a diferentes condiciones de estrés, biótico y abiótico, mediante numerosos eventos génicos y bioquímicos como son el reclutamiento, reordenamiento y transferencia horizontal de genes, los cuales son esenciales para adquirir resistencia a antibióticos, a metales pesados y para degradar compuestos xenobióticos (Rousseaux *et al.*, 2002).

Las síntesis química de las s-triazinas en los años 1950, y la similitud de ruta de degradación del ácido cianúrico con las rutas de degradación de ácidos nucleicos en animales, y la organización de los genes *atzA*, *atzB* y *atzC* en diferentes bacterias, sugieren que los genes *atz* de la vía superior han surgido recientemente y se han distribuido globalmente (De Souza *et al.*, 1998b). Se han aislado bacterias capaces de degradar atrazina y que contienen genes homólogos a los genes *atzA*, *atzB* y *atzC* de *Pseudomonas* sp. cepa ADP en distintas regiones del mundo. *Pseudomonas* sp. cepa ADP es uno de los microorganismos mejor ca-

racterizados y capaces de mineralizar la atrazina. Sus genes catabólicos *atz* se localizan en un plásmido conjugativo de 108.845 pb denominado ADP-1 (Figura 3) (De Souza *et al.*, 1998b; Peel & Wynham, 1999; Newby *et al.*, 2000; Martínez *et al.*, 2001; Siddavattam *et al.*, 2003), el cual ha sido completamente secuenciado (Martínez *et al.*, 2001).

La movilización de genes en células y entre células en ambientes contaminados es un mecanismo importante para la adaptación de los microorganismos que degradan compuestos contaminantes. El conocimiento de la distribución de microorganismos que catabolizan contaminantes, sus genes y enzimas, es de vital importancia en la predicción del potencial biodegradable en un sistema (Ralebitso *et al.*, 2002).



**Figura 3. Representación del plásmido pADP-1 de *Pseudomonas* sp. cepa ADP.** Se muestra la localización relativa de los seis genes *atz* (negrita), así como de los operones de transferencia (*tra* y *trb*), de resistencia a mercurio (*mer*), las transposasas (*tnpA*) y las secuencias de inserción (IS). Adaptado desde Martínez *et al.*, (2001).

AtzA posee un grado significativo de similitud con TrzA y catalizan reacciones hidrolíticas con sustratos estructuralmente similares. Sin embargo, hay grandes diferencias. AtzA muestra mayor preferencia por triazinas di-alquiladas más que triazinas mono-alquiladas (Mulbry, 1994). La enzima hidroxiatrazina hidrolasa, codificada por el gen *atzB*, cataliza la transformación de la hidroxiatrazina, hasta *N*-isopropilamelida. La secuencia génica de este gen, presenta la mayor identidad de secuencia (un 25%) con *trzA* de *R. corallinus* NRRL B-15544R, y no presenta identidad significativa con *atzA*. Las secuencias hasta más de 7 kb río arriba de *atzA* y *atzB* son completamente idénticas hasta el sitio propuesto para la unión del ribosoma (Martínez *et al.*, 2001). También en *Pseudomonas* sp. NRRL B-12227 se observan regiones génicas duplicadas flanqueando los genes de degradación de *s*-triazinas. Mientras que *atzA* y *atzB* tienen un contenido en G+C de 58,3% y 64,1% respectivamente, dentro del rango habitual de las *Pseudomonas* (del 58% al 70%), *atzC* tiene un contenido G+C del 39,5%, claramente más bajo que el normal en este género.

El ácido cianúrico se emplea como fertilizante de liberación lenta y como agente desinfectante en piscinas en su forma de ácido tricloroisocianúrico (Fruchey *et al.*, 2003). Según estos autores, este ácido cianúrico se originaría de forma natural, puesto que existen antecedentes de su detección en suelos en 1917, mucho antes de que se desarrollaran los primeros herbicidas *s*-triazínicos. El mecanismo exacto de su síntesis es incierto, pero parece provenir de la descomposición natural de purinas y pirimidinas, y de la oxidación del ácido úrico. El ácido cianúrico es intermediario común en la degradación de otras *s*-triazinas (Cook *et al.*, 1985). Los genes contenidos en las especies capaces de metabolizar ácido cianúrico contienen genes homólogos a *atzD* o *trzD*. La presencia de *atzD* anticipa siempre la presencia de *atzE* y *atzF*, pero éstos últimos no se han detectado en cepas bacterianas que contienen los genes *trzD* (Cheng *et al.*, 2005).

En experimentos realizados en suelos, se ha detectado la transferencia del plásmido pADP-1 a la microflora autóctona con una frecuencia de  $10^{-4}$  por donador (Devers *et al.*, 2004). Los genes *atz* de la vía superior de *s*-triazinas, se localizan en plásmidos de distinto tamaño en los diferentes microorganismos (Sajjaphan *et al.*, 2004). En consorcios degradadores de atrazina cada microorganismo individual tiene un juego incompleto de genes *atz*, lo que indica que pueden reclutarse y perderse independientemente (De Souza *et al.*, 1998b). La transferencia del plásmido pADP-1 no es la única vía de diseminación de estos genes. En la actualidad, se emplean partidores generados a partir de la secuencia de los genes *atzA*, *atzB* y *atzC* de *Pseudomonas* sp. cepa ADP para predecir el potencial biodegradador de un

sitio contaminado con atrazina (Shapir *et al.*, 2002). Estos genes codifican enzimas catabólicas para diversas *s*-triazinas (Seffernick *et al.*, 2000). Los genes *atz* están ampliamente distribuidos y han sido aislados desde diferentes microorganismos que habitan suelos agrícolas (Boundy-Mills *et al.*, 1997; Sadowsky *et al.*, 1998). Los análisis de comparación de secuencias de genes que participan en la degradación de atrazina, indican que ellos contienen homologías de hasta un 45% en sus secuencias completas, y 99 % cuando se comparan fragmentos más conservados (De Souza *et al.*, 1995; 1996; 1998a; Topp *et al.*, 2000a).

La mayoría de estos genes catabólicos están flanqueados por secuencias de inserción que permiten la transposición del gen de una bacteria a otra. Esta condición, ha permitido monitorear genes catabólicos en diferentes sistemas bacterianos (Peel & Wynham, 1999; Rousseaux *et al.*, 2002). Generalmente, la tasa de mineralización y la proliferación de organismos degradadores se correlaciona con la presencia y número de copias de genes catabólicos de atrazina (Ralebitso *et al.*, 2002).

#### 1.4

#### Regulación génica en bacterias

La expresión de un determinado gen se integra en capas sucesivas de regulación que garantizan la mayor eficacia de la bacteria en un ambiente cambiante, procesando varias señales físico-químicas y metabólicas para dar una respuesta unificada. Sólo de esta forma pueden sobrevivir en nichos extremadamente competitivos. Por eso, los promotores deben ser capaces de integrar señales específicas con otras señales más generales, y la evolución selecciona la mejor integración de las nuevas señales en las redes de regulación preexistentes (Cases & De Lorenzo, 2005).

El éxito de un proceso catabólico depende de la capacidad de las enzimas para metabolizar un compuesto particular y los intermediarios subsecuentes, pero también depende de un eficiente sistema regulador. Proteínas reguladoras y los promotores regulados son los elementos dominantes que controlan la expresión de operones catabólicos para asegurar que las enzimas sean producidas solamente bajo condiciones ambientales apropiadas.

### 1.4.1 Operones catabólicos

En ambientes oligotróficos, y en otras condiciones de estrés, las comunidades de bacterias del suelo han desarrollado la capacidad de crecer utilizando una amplia gama de sustratos poco habituales, entre los que se encuentran numerosos compuestos orgánicos contaminantes. Sin embargo, la biodegradación bacteriana suele estar limitada por la presencia de una fuerte regulación de los genes de degradación, que hace que las rutas estén inactivas en la mayor parte de las condiciones ambientales (Martínez-Pérez *et al*, 2004). La expresión de la mayoría de los operones catabólicos es regulada por sistemas de inducción específicos de control, que permiten activar o inactivar la síntesis de las enzimas necesarias, solamente cuando el sustrato, o el intermediario metabólico, están disponibles. Bajo condiciones de exceso nutricional, la expresión de operones catabólicos, frecuentemente, está sujeta a una superposición de controles regulatorios globales, los cuales evitan la transcripción de genes catabólicos, permitiendo de esta forma, optimizar la expresión de genes mediante una conexión de éstos al estado metabólico y energético celular (Cases & De Lorenzo, 1998). Para ello, cada especie en particular, posee promotores y factores propios de acuerdo a su metabolismo.

### 1.4.2 Regulación de genes *atz* en la degradación de atrazina

Estudios acerca de la regulación de genes *atz* han sido descritos sólo recientemente. Dada la disponibilidad de la secuencia completa del plásmido ADP-1 de *Pseudomonas* sp. ADP, García-González *et al.* (2005) emplearon fusiones *lac* para describir un modelo de regulación ensayado en forma heteróloga en *Pseudomonas putida*. En *Pseudomonas* sp. cepa ADP, la ruta de degradación de atrazina está regulada a nivel del operón *atzDEF*. La expresión de este operón es inducida por ácido cianúrico, y por una señal fisiológica global de limitación por nitrógeno. El modelo propuesto para *Pseudomonas* sp. ADP involucra la expresión de dos proteínas regulatorias *atzR* y *ntrC*, y factores alternativos sigma. El producto del gen *atzR* activa la expresión divergente del operón *atzDEF* en respuesta a la limitación por nitrógeno y al metabolito intermediario ácido cianúrico. La expresión del gen regulador *atzR* estaría modulada por un complejo circuito regulatorio en el que participan los genes *ntrC*, una proteína reguladora que participa en los sistemas generales de control global de regulación del nitrógeno de muchas bacterias Gram negativas. La secuencia del producto del

gen *atzR* es homóloga a una familia de proteínas regulatorias tipo Lys R (LTTRs) cuya característica principal es la inducir la expresión de genes adyacentes y la de reprimir su propia síntesis. Además los autores identificaron la secuencia de reconocimiento consenso T-N<sub>11</sub>-A en la región intergénica *atzD-atzR* que corresponde al elemento de reconocimiento *atzR*. Esta secuencia sugiere la intervención de factores  $\sigma^{54}$  para su transcripción. NtrC no es necesario para la activación de la expresión de *atzR* en condiciones de limitación de nitrógeno, pero sí puede activar directamente la expresión del operón *atzDEF*; en respuesta a la carencia de nitrógeno. De este modo la degradación de simazina en *Pseudomonas* sp. ADP está sujeta a una regulación dual por un metabolito de la ruta (ácido cianúrico) y por la limitación de nitrógeno.

## 1.5

### Procesos de biorremediación de s-triazinas

En los estudios de biorremediación, los datos con que se dispone son incompletos y muchas veces contradictorios (Radosevich *et al.*, 1995; Alvey & Crowley, 1995; Ralebitso *et al.*, 2002). La adición de nitrato al suelo (2,5 mg N/g, equivalente a una fertilización) inhibe el metabolismo de atrazina por la microflora autóctona (Alvey & Crowley, 1995). La adición de amonio (0,1 mg/g) a suelos no tuvo efecto sobre la tasa de mineralización de atrazina (Alvey & Crowley, 1995). En otro estudio, se observó que la adición de nitrato o amonio a los microcosmos sin inoculación de bacterias degradadoras tuvo efecto inhibitorio sobre la mineralización de atrazina (Rhine *et al.*, 2003). Este efecto no se observó cuando el suelo se inoculó con un cultivo de *Pseudomonas* sp. ADP crecido en atrazina (Bichat *et al.*, 1999). Por otro lado, la rizósfera no afectó la mineralización de la atrazina (Kruger *et al.*, 1997).

Las técnicas que emplean microorganismos para degradar contaminantes en el suelo incluyen la bioestimulación y la bioaugmentación (Liu & Suflita, 1993; Parales *et al.*, 2002). La bioestimulación involucra suplementar suelos contaminados con aditivos, como nitrógeno, fósforo, potasio o fertilizantes oleofílicos para permitir la biodegradación (Atlas & Barth, 1992). La bioaugmentación consiste en la adición al suelo de microorganismos capaces de metabolizar el contaminante (Brodkorb & Legge, 1992). La bioaugmentación es una técnica eficiente, económica y versátil (Norris, 1994) y ha dado buenos resultados en descontaminar hidrocarburos (Margesin & Schinner, 2001). Sin embargo, el éxito de la aplicación dependerá de las condiciones del suelo y del microorganismo incorporado al suelo, puesto que algunas bacterias no son capaces de sobrevivir (Kanaly & Harayama, 2000). Además existen eviden-

cias de que los microorganismos están sometidos a estrés en su interacción con contaminantes dado a que se generan compuestos intermediarios tóxicos (Cámara *et al.*, 2004; Agulló *et al.*, 2007).

Numerosos estudios han aislado bacterias nativas capaces de mineralizar (Yanase-Konchou & Gschwind, 1994) o degradar parcialmente atrazina (Alvey & Crowley, 1995; Boquart *et al.*, 1997; De Souza *et al.*, 1995; 1998; Struthers *et al.*, 1998). Sin embargo, existen pocos estudios de aplicación de bacterias en el campo. El rol de los aislados bacterianos en el ambiente ha sido descrito sólo en pocos artículos (Sorensen *et al.*, 2002). No todas las cepas que degradan s-triazinas, metabolizan completamente el herbicida. Algunos estudios de campo han aplicado grupos bacterianos para biorremediar el suelo. Un metabolismo incompleto de una cepa genera un producto que es transformado por otras cepas bacterianas, permitiendo así, la asimilación de nitrógeno y carbono por diferentes miembros del consorcio (De Souza *et al.*, 1998a) y favoreciendo la mineralización del herbicida (Mandelbaum *et al.*, 1993).

Mediante la técnica de electroforesis en gel con gradiente de desnaturalización (DGGE), Bending *et al.* (2003) relacionaron la degradación del herbicida isoproturon en el suelo con la presencia de *Sphingomonas* sp. Se observó que microcosmos de suelos estériles eran más lentos en biotransformar el herbicida isoproturon, que microcosmos no esterilizados. Estos autores propusieron que la flora acompañante sería beneficiosa aportando nutrientes para microorganismos degradadores (bioestimulación natural) (Parales *et al.*, 2002; Bending *et al.*, 2003).

Mandelbaum *et al.* (1995) y Radosevich *et al.* (1995), observaron una baja transformación de C<sup>14</sup> atrazina por bacterias nativas del suelo contaminado. Para detectar el potencial degradativo de atrazina por bioaugmentación, Newcombe & Crowley (1999) realizaron ensayos en mesocosmos, empleando un sistema de riego unido a un fermentador de campo y compararon inoculaciones aisladas, con inoculaciones consecutivas de *Pseudomonas* sp. ADP, y con inoculaciones de un sistema compuesto de 3 géneros bacterianos: *Clavibacter micchiganensis* ATZ1 (De Souza *et al.*, 1998a); *Pseudomonas* sp. CN1 (Alvey & Crowley, 1995) y *Cytophaga* sp. (De Souza *et al.*, 1998a). Inóculos bacterianos aplicados cada 3 días, pudieron degradar un 50% más atrazina que aplicaciones de un solo inóculo inicial. Sin embargo, la degradación con el sistema bacteriano compuesto fue de un 36% menor que las degradaciones obtenidas con aplicaciones con la cepa modelo *Pseudomonas* sp. ADP.

*Rhizobium* cepa PATR (Boquart *et al.*, 1997), *Agrobacterium radiobacter* J14a (Struthers *et al.*, 1998) y *Ralstonia picketti* (Seffernick *et al.*, 2000) se han empleado en estudios de biorremediación. Ninguna de estas bacterias superó la mitad de la actividad de *Pseudomonas* sp. cepa ADP (Seffernick *et al.*, 2000). Mezclas de microorganismos, con sus respectivas enzimas, parecen ser una alternativa promisoría para la biorremediación (Sorensen *et al.*, 2002).

Los plaguicidas representan un instrumento imprescindible en las actividades agrícolas. Se requieren estudios que ayuden a detener, aminorar o remediar la grave contaminación producida por estos compuestos. Este estudio propone caracterizar cepas bacterianas previamente aisladas desde suelos contaminados, capaces de degradar rápidamente compuestos s-triazinas y desarrollar una estrategia para la biorremediación de suelos tratados con estos compuestos.

## **HIPOTESIS**

Cepas bacterianas nativas aisladas desde suelos agrícolas del valle de Aconcagua tienen la capacidad de degradar simazina y son eficientes en procesos de biorremediación de suelos contaminados con este herbicida.

## **Objetivo general**

Caracterizar cepas bacterianas nativas aisladas desde suelos agrícolas del valle de Aconcagua y capaces de degradar s-triazinas, y establecer el potencial de degradación de cepas seleccionadas para procesos de biorremediación de estos herbicidas.

## **Objetivos Específicos**

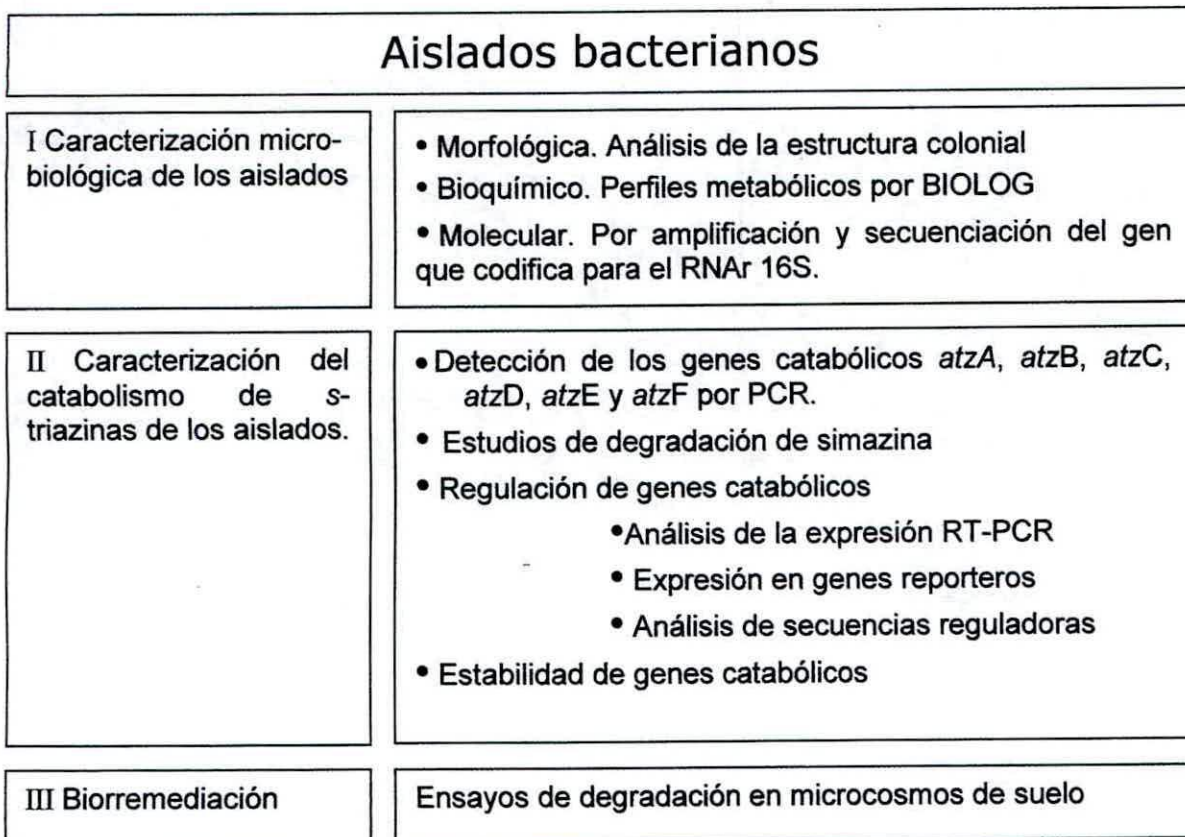
1. Caracterizar cepas bacterianas aisladas desde suelos agrícolas tratados con s-triazinas.
2. Estudiar el catabolismo de s-triazinas en cepas bacterianas aisladas y determinar sus genes catabólicos.
3. Diseñar un mecanismo de selección de las cepas más promisorias en la degradación de herbicidas s-triazinas para estudios de biorremediación.
4. Determinar la influencia de fuentes de nitrógeno sobre la degradación de s-triazinas en cepas seleccionadas.
5. Evaluar el potencial de cepas bacterianas para la biorremediación de compuestos s-triazinas en microcosmos.



## 2.

**Material y métodos****2.1 Estructura general del estudio de bacterias degradadoras de simazina**

El plan estratégico para la caracterización de las cepas bacterianas degradadoras de simazina se resume en el diagrama de la Figura 4. Las cepas bacterianas aisladas desde suelos agrícolas se caracterizaron por tinción Gram, morfología de la colonia y ensayos bioquímicos. La identificación se realizó mediante el sistema Biolog y por secuenciación del gen que codifica para el RNAr 16S. Las cepas de cultivo, se sometieron a estudios moleculares y fisiológicos, conducentes a determinar las capacidades de degradación de simazina. Las cepas más eficientes se emplearon en ensayos de biorremediación.



**Figura 4.** Diagrama del plan estratégico para la caracterización de cepas bacterianas degradadoras de s-triazinas aisladas de suelos agrícolas. Los cuadros de la izquierda muestran las etapas, y las actividades se indican en los cuadros de la derecha.

## 2.2

## Técnicas y Materiales

## 2.2.1 Herbicidas s-triazinas

Los herbicidas atrazina (99% pureza) y simazina (99%) fueron obtenidos comercialmente desde Movi-Agro S.A. (Biesterfield, NY, EEUU). Los compuestos estándares atrazina y simazina (>99% pureza) se compraron en Accu standard (New Haven, EEUU). El ácido cianúrico fue obtenido desde Sigma-Aldrich (Inc, St. Louis, EEUU).

## 2.2.2 Bacterias y condiciones de cultivo

Para el crecimiento bacteriano se utilizó el medio basal AM modificado (Topp *et al.*, 2000a; 2000b; Rousseaux *et al.*, 2002). Se prepararon soluciones madres de los componentes que a continuación se describen. Tampón fosfato 10x (g/l):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 7,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 2,8; NaCl, 0,5. Vitaminas 100 x (mg/l): tiamina-HCl, 0,1; ácido fólico, 0,04; nicotinamida, 0,2; piridoxina-HCl, 0,2. Sales minerales 500x (g/l)  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,1;  $\text{FeCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,01;  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,005;  $\text{ZnCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,0064;  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,00066;  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,00036;  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 0,0003;  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 0,0065; EDTA, 0,01 y 0,146 ml de HCl al 37% g/l. Como fuentes de carbono se empleó glucosa (1 g/l) y succinato 25 mM. Para 100 ml se combinaron 10 ml de tampón fosfato 10 x, 2,5 ml de succinato sódico 1 M, 1 ml de solución de vitaminas y 200  $\mu\text{l}$  de solución de minerales. El medio sólido fue preparado complementando este medio con 2% de agar microbiológico, agregado estéril a los componentes filtrados (0,22  $\mu\text{m}$ ). En la preparación de los medios se empleó amonio, nitrato y serina como fuentes de nitrógeno (10 mg/l), los que fueron reemplazados por simazina o ácido cianúrico (100 mM) en los ensayos con células en reposo. Las sales descritas fueron adquiridas desde Merck (Merck & Co. Inc NJ, EEUU). El sistema Biolog fue adquirido desde Biolog (Hayward, Calif, EEUU).

Los aislamientos de bacterias degradadoras simazina fueron realizados por Hernández (2004). La denominación con la letra P, C o K de las 32 cepas bacterianas corresponde a su procedencia según el suelo de origen: Palto, Caqui o suelos controles, respectivamente. El aislamiento se realizó por enriquecimientos en medio mínimo empleando simazina como única fuente de nitrógeno. Las muestras correspondieron a suelos de predios agrícolas ubicados en el Valle de Aconcagua.

*Pseudomonas sp.* ADP silvestre (Mandelbaum *et al.*, 1995) se empleó en estudios de detección de genes catabólicos. La cepa de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Hanahan, 1983) se

empleó para obtener vectores recombinantes.

Para los cultivos bacterianos se emplearon tres medios de crecimiento: Luria-Bertani (LB, Sambrook & Russel, 2001), tripticasa de soya (BD, Detroit, EEUU) y el medio mínimo AM, al cual se le agregó diferencialmente una fuente de nitrógeno. Las bacterias ambientales se cultivaron a 30°C y *E. coli* a 37°C. Para mantener las cepas bacterianas por largos períodos de tiempo, éstas fueron sembradas asépticamente en criotubos (Nunc, NY, EEUU) conteniendo caldo AM suplementado glicerol al 15% y se conservaron a -40°C. La mantención por períodos cortos de tiempo se realizó en los mismos medios de crecimiento sólido. Para la selección bacteriana, se emplearon diferentes antibióticos en los medios de cultivo y en las concentraciones que se indican (mg/l): ampicilina (Amp) 100, carbenicilina (Cb) 500, rifampicina (Rf) 20, gentamicina (Gm) 20 y Kanamicina (Km) 20. Se emplearon diferentes plásmidos detallados en la Tabla 1.

### 2.2.3 Descripción e identificación de los aislados bacterianos

Las cepas bacterianas aisladas fueron agrupadas de acuerdo a la tinción Gram (Kruczak-Filipov & Shively, 1992) y a características fenotípicas de la colonia. Las cepas bacterianas fueron crecidas en medio sólido TSA y se evaluó el diámetro de la colonia, color, olor, tamaño y tipo de bordes. La caracterización de las cepas bacterianas fue realizada en colaboración con M. Hernández.

Para la identificación por el sistema Biolog, las cepas bacterianas fueron cultivadas por 24 h a 30°C en caldo tripticasa de soya, para luego ser cosechadas, lavadas y suspendidas en tampón fosfato. Un volumen de 125 µl con una turbidez a 600 nm de 0,2 fueron transferidas con pipeta multicanal a cada uno de los pocillos de una microplaca Biolog GN2 (sistema para bacterias Gram negativas). Los resultados fueron evaluados después de 24 h de incubación a 30°C y se compararon con la base de datos en el programa provisto por el fabricante. Las cepas bacterianas evaluadas por Biolog fueron algunas cepas de crecimiento rápido: *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Stenotrophomonas maltophilia* P43, K46, P51, C53 y C54.

Complementario al sistema Biolog, se realizó la identificación de las cepas por secuenciación del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S (Giovanonni *et al.*, 1988) empleando oligonucleótidos universales 27f y 1492r (Lane *et al.*, 1985). La secuenciación e identificación fue realizada en colaboración con el Dr. Edward Moore, CCGU, Göteborgs University, Suecia.

Tabla 1: Plásmidos y cepas bacterianas utilizados en este trabajo.

| Nombre               | Descripción  | Origen / Referencia                  |
|----------------------|--|--------------------------------------|
| pBluescript KS II(+) | Vector de clonación. ColE1, <i>lacZ</i> <sup>r</sup> Ap <sup>r</sup> .   | Stratagene                           |
| pJB3Km1              | Vector de expresión de amplio rango de hospedador. Suministra el promotor inducible Pm y su regulador. Mob <sup>+</sup> . IncP. Tc <sup>r</sup> . Empleado en las conjugaciones con <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41.  | Blatny, 1997                         |
| pLAFR3               | Cósmido de amplio rango de hospedador. IncP1. Bajo número de copia Tc <sup>r</sup> .   | Staskawicz <i>et al.</i> , 1987      |
| pKT210               | Plásmido de amplio rango de hospedador. IncQ. Bajo número de copia Cm <sup>r</sup> , Sm <sup>r</sup> . Empleado en las conjugaciones con <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41.   | Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981     |
| pKT230               | Plásmido de amplio rango de hospedador. IncQ. Bajo número de copia Sm <sup>r</sup> Km <sup>r</sup> . Empleado en las conjugaciones con <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41.   | Bagdasarian <i>et al.</i> , 1981     |
| pBBR1MCS-2           | Vector de amplio espectro. Tra <sup>-</sup> Mob <sup>+</sup> . Km <sup>r</sup> /Cb <sup>r</sup> . Críptico. Empleado en las conjugaciones con <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41.  | Kovach <i>et al.</i> , 1994          |
| pMPO104              | Fusión traduccional de <i>atzR</i> y <i>lacZ</i> . Contiene la región comprendida entre las dianas BamHI, aproximadamente 150 pb antes del inicio de la traducción de <i>atzR</i> y PvuII, unas 140 pb después de dicho comienzo. Se clonó en pMPO200 cortado con SmaI. Amp <sup>r</sup> | García-González <i>et al.</i> 2005   |
| pMPO202              | Fusión traduccional de <i>atzD</i> y <i>lacZ</i> con <i>atzR</i> truncado. Fragmento de 630 pb procedente de pMPO103 clonado en pMPO200. Ap <sup>r</sup> .   | García-González <i>et al.</i> , 2005 |
| pMPO204              | Fusión traduccional de <i>atzD</i> a <i>lacZ</i> con <i>atzR</i> completo. Amp <sup>r</sup> .  | García-González <i>et al.</i> , 2005 |
| pHRP309              | Vector de amplio espectro usado para la creación del vector pHRP309P41D-R. Está descrito preferencialmente para hacer ensayos de actividad β-galactosidasa en <i>Pseudomonas</i> . Posee 3 codones de términos luego de la zona poli uniones. Gm <sup>r</sup> .                          | Este trabajo                         |
| pHRP309P41D-R        | Fusión transcripcional conteniendo un inserto <i>atzR-atzD</i> potencial proveniente de <i>Pseudomonas nitroreducens</i> P41 y clonado en el vector pHRP-309. Pertenecce al grupo de incompatibilidad IncQ. Gm <sup>r</sup> .  | Este trabajo                         |

## 2.2.4 Crecimiento bacteriano en ensayos de degradación

En algunos ensayos de degradación, la simazina fue agregada en concentraciones de 10 mg/l. La concentración de simazina en el medio se cuantificó por HPLC. Como fuentes de carbono se emplearon inicialmente glucosa, citrato y succinato en concentraciones de 1 g/l (Ralebitso *et al.*, 2002) para los crecimientos de los diversos géneros bacterianos. Posteriormente se empleó citrato para el crecimiento de las bacterias de género *Pseudomonas*. Todas estas bacterias se crecieron a 30°C, con agitación de 180 rpm para mantener la aireación en los cultivos líquidos.

Para los ensayos con células en reposo, se tomaron desde placas de agar con medio mínimo colonias que mostraron halos de degradación. Las cepas bacterianas se crecieron en medio mínimo líquido (MM) hasta fase estacionaria en volúmenes de 3 ml a 30°C empleando amonio como única fuente de nitrógeno. Las células se cosecharon por centrifugación a 9800xg, 1 min a 4°C, y lavadas tres veces con una solución de tampón salino fosfato (60 mM fosfato de sodio pH 7,0; 0,5 g/l de NaCl) para descartar restos de amonio.

Un inóculo fue agregado a matraces conteniendo medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno a una concentración final de 4 mM final, exceptuando la simazina, la cual se dispuso desde la tapa de un tubo Eppendorf. Se prepararon soluciones de simazina (10 mg/l) o atrazina (20 mg/l) en metanol y fueron depositados en un dispositivo sellado, preparado con la cabeza de un tubo Eppendorff previamente cortado de manera de dejar el cuello del tubo enganchando un trozo de membrana de diálisis como sello (Sigma-Aldrich Chemie, Steinheim, Alemania) (Figura 5). El dispositivo fue puesto dentro de matraces conteniendo medio mínimo sin fuente de nitrógeno. El método permite un suministro continuo de s-triazinas y evita los problemas de cuantificación del crecimiento bacteriano por turbidez en el espectrofotómetro, derivados de la opacidad que se produce por la baja solubilidad de estos compuestos en agua. Las condiciones y fuentes de nitrógeno empleadas fueron amonio, amonio/simazina, nitrato, nitrato/simazina, ácido cianúrico y simazina.



**Figura 5: Dispensador de simazina en medio mínimo.** Una cabeza de tubo Eppendorf se selló con una membrana de diálisis.

Los cultivos fueron incubados con rotación a 30°C por 16 a 20 horas hasta su fase exponencial (turbidez a 600 nm:~0.3). Las células se cosecharon por centrifugación, se lavaron tres veces en tampón U (10 mM fosfato de sodio pH 7,0; MgSO<sub>4</sub> 0,1 mM), y se resuspendieron en el mismo tampón hasta obtener una turbidez a 600 nm de 0,25 (García-González *et al.*, 2003). Para el ensayo, se tomaron alícuotas de 5 ml en tubos de vidrio, las que fueron incubadas 2 min en un baño termostático mantenido a 30°C. A cada tubo se agregaron 50 µl de simazina 6 mM diluida en metanol y se homogenizó. Se tomaron muestras de 0,5 ml en intervalos de 10 min, se centrifugaron inmediatamente por 3 min a 18000xg. Se midió la concentración de simazina en el sobrenadante en un espectrofotómetro a una absorbancia de 225 nm (García-González *et al.*, 2003). Se realizó una curva de calibración de simazina.

### 2.2.5 Formación de halos de degradación

Se evaluó la formación de halos de degradación de simazina por las diferentes cepas crecidas en medio basal AM con un 2% de agar microbiológico, o en TSA preparado a un 25% y empleando simazina 500 mg/l o atrazina (1g/l) como única fuente de nitrógeno. Las placas se incubaron por 2 a 8 días. Se evaluó el crecimiento y la formación de zonas claras alrededor de las estrías de siembra. De preferencia se empleó atrazina, dado que posee menor solubilidad en soluciones acuosas que la simazina, lo que permite la obtención de una solución de aspecto lechoso que facilita la visualización de halos. Las solubilidades en agua de la atrazina y la simazina son 0,04 y 0,06, respectivamente.

## 2.2.6 Ensayos en Microcosmos

Se emplearon suelos provenientes desde terrenos agrícolas sin historial de aplicación de simazina. Estos suelos se tamizaron y caracterizaron (humedad, pH, temperatura, contenido de carbono y de nitrógeno en sus formas de nitrato y amonio) siguiendo metodologías descritas (Cereceda-Balic *et al.*, 2006). El herbicida en su versión comercial Gesatop, fue preparado con agua, de acuerdo a especificaciones comerciales, y adicionado a una concentración final de 13 ppm y 20 ppm, como de aplica en las prácticas agrícolas rutinarias. La tasa de remoción de simazina fue calculada por extracción con solventes desde 1 g de suelo.

Los inóculos de *Pseudomonas* empleadas en los microcosmos, se prepararon desde una colonia recién crecida con formación de halo de degradación en medio sólido con atrazina. Esta colonia se inoculó en 3 ml de medio mínimo y se cultivó hasta su fase exponencial tardía (Turbidez a 600 nm ~0.84). Luego se crecieron escalando los cultivos a 500 ml. Se empleó ácido cianúrico como fuente de nitrógeno (0,4 mM). Las células crecidas se cosecharon por centrifugación a 2000xg 5 min, y se lavaron tres veces con tampón fosfato 1x. Los cultivos bacterianos se resuspendieron en el mismo tampón y se agregaron a los microcosmos. Las cepas bacterianas fueron inoculadas para obtener una concentración final entre  $10^6$  y  $10^7$  células por gramo de suelo. En microcosmos bioestimulados se adicionó succinato en una concentración final de 25 mM. Los microcosmos consistieron de 20 g de suelo contenidos en tubos de polipropileno de 50 ml (Corning, Costar, EEUU). Para alcanzar una humedad final entre 15 y 20%, los suelos fueron humedecidos con tampón fosfato. Los suelos se mantuvieron en una humedad del 15% con riego diario.

La viabilidad de las bacterias inoculadas y de las bacterias heterótrofas presentes en la flora nativa (Narváez, 1999) se determinaron mediante la técnica de recuento en placa. Los medios sólidos contenían atrazina como única fuente de nitrógeno. En una misma placa fue posible diferenciar cepas degradadoras de atrazina y cepas bacterianas heterótrofas. Las bacterias degradadoras presentan un halo alrededor de la colonia, producto de la degradación del compuesto en la placa de cultivo. Para confirmar la viabilidad de *Pseudomonas citronellosis* P21, se realizaron experimentos en microcosmos adicionales, empleando una mutante espontánea a rifampicina (*rif<sup>r</sup>*). Los recuentos fueron realizados en placas con el antibiótico a una concentración final de 50 µg/ml. Todos los estudios en microcosmos fueron realizados por triplicado y se calculó la desviación estándar.

## 2.3

## Métodos analíticos

### 2.3.1 Detección de simazina

El análisis de simazina se realizó mediante HPLC en un equipo Beckman modelo Gold System (Beckman Coulter Inc. NJ EEUU con arreglo de diodo. La detección se realizó a una longitud de onda UV de 215 a 230 nm, luego de la separación de fases por cromatografía reversa empleando una columna C<sub>18</sub> (NovaPak). Se tomaron 10 g de suelo, y se mezclaron con 30 ml de una solución de extracción metanol:H<sub>2</sub>O:H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (pH 2) en las proporciones 80:19:1, respectivamente. Luego de 2 horas de extracción con el solvente y ayudado por rotación a 90xg, la mezcla se dejó en reposo para la separación de fases. 2 ml del sobrenadante se centrifugaron a 18000xg por 5 min a 4°C. El sobrenadante fue analizado empleando una fase móvil consistente en 67% acetonitrilo, 0,5% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 32,5% H<sub>2</sub>O Milli-Q (Boundy-Mills *et al.*, 1997) con un flujo de 0,5 ml/min. El tiempo de curso de la elución para simazina fue de 4,5 min. aproximadamente.

La concentración de simazina en los ensayos con células en reposo se determinó por espectrofotometría a una longitud de 215 nm. En la determinación se empleó el sobrenadante de los cultivos bacterianos centrifugados.

### 2.3.2 Transformación de células bacterianas

Para preparar células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  se siguió el método descrito por Inoue (Sambrook & Russel, 2001).

Para la transformación de células bacterianas con los vectores se mezclaron 100  $\mu$ l de células competentes con cada mezcla de ligación y se incubó 30 min en hielo. Posteriormente se aplicó un choque térmico de 42°C durante 45 segundos y la mezcla se dejó en reposo por 1 min a temperatura ambiente. Se añadió 1 ml de SOC (medio SOB suplementado con 7,2 ml de glucosa al 50% por cada litro) a cada muestra y se incubó durante 1 hora a 37°C. Finalmente se sembraron en placas de LB con los antibióticos adecuados.

### 2.3.3 Transferencia de plásmidos a *Pseudomonas*

Se llevó a cabo mediante conjugación triparental empleando como bacteria ayudante (helper) la cepa de *E. coli* conteniendo el vector pRK2013 y siguiendo el protocolo descrito por Espinosa-Urgel (2000) con ciertas modificaciones. Se partió de cultivos crecidos de la cepa donadora, la receptora y la ayudante y se lavaron en tampón fosfato. Se preparó la mezcla de conjugación en un tubo Eppendorf con 200  $\mu$ l de donador, 100  $\mu$ l de bacteria ayudante y 700  $\mu$ l de receptor. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 9800xg durante 1 min. Se eliminó la mayor parte del sobrenadante y se resuspendieron en el volumen residual, el que fue sembrado en una placa de LB e incubado durante 8 horas a 30°C. Finalmente las células se resuspendieron en 1 ml de LB, y se sembraron diluciones de  $10^{-1}$  hasta  $10^{-6}$  en placas de LB sólido conteniendo los antibióticos adecuados.

### 2.3.4 Ensayo de actividad $\beta$ -galactosidasa

Para ensayos de regulación, se utilizó serina (1g/l), como fuente de nitrógeno limitante (bajo aporte de nitrógeno) (García-González *et al*, 2005) o amonio (1g/l) como fuente de nitrógeno preferencial. La temperatura de cultivo fue de 30°C para bacterias ambientales y 37°C para *E. coli*.

La expresión de vectores en *Pseudomonas nitroreducens* P41 se cuantificó mediante ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa de acuerdo al protocolo descrito por Miller (1992), con modificaciones. *Pseudomonas nitroreducens* P41 fue crecida en medio mínimo con amonio como única fuente de nitrógeno. Cuando el cultivo estuvo crecido hasta fase estacionaria, las células fueron lavadas en tampón fosfato dos veces, resuspendidas en el mismo y diluidas en los medios correspondientes a una turbidez a 600 nm de 0,001 unidades. Estas diluciones fueron incubadas entre 8 y 12 horas a 30°C con agitación hasta obtener una turbidez a 600 nm de 0,2-0,3 unidades. 100  $\mu$ L de cada cultivo fueron mezclados en un tubo Eppendorf con 650  $\mu$ l de tampón Z +  $\beta$  ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  8,54 g/l,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$  5,5 g/l, KCl 0,75 g/l,  $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$  0,25 g/l y  $\beta$ -mercaptoetanol 0,27 % v/v), 20  $\mu$ l de SDS 0,1% y 30  $\mu$ l de cloroformo. La mezcla homogenizada se incubó a 30°C por 30 min. Se añadió a cada tubo 200  $\mu$ l de o-nitrofenil galactopiranosido 4 mg/l en tampón Z (ONPG) y se incubaron a 30°C, hasta el desarrollo de una coloración amarilla. La reacción

fue detenida añadiendo a cada tubo 500  $\mu$ l de  $\text{NaCO}_3$  1 M en hielo. Las muestras se homogenizaron y se centrifugaron a 18000xg durante 15 min y el sobrenadante se empleó para medir la absorbancia a 420 nm. La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue calculada en unidades Miller a partir de la siguiente expresión:

$$\text{Actividad } \beta\text{-galactosidasa (en unidades Miller)} = 1000 \cdot \frac{A_{420}}{V \cdot \text{DO}_{600} \cdot t}$$

$A_{420}$  = Absorbancia a 420 nm

V = Volumen del cultivo añadido a la mezcla de reacción (ml)

$\text{DO}_{600}$  = Turbidez del cultivo a 600 nm.

T = Tiempo de la reacción en min.

## 2.4

## Técnicas de Biología Molecular

### 2.4.1 Secuenciación del gen que codifica para el RNAr 16S

Las secuenciación de los genes y la identificación de las cepas bacterianas fueron realizadas en colaboración con el Dr. Edward Moore (Departamento de Bacteriología Clínica, Göteborg University, Suecia). Para el aislamiento y purificación del DNA genómico bacteriano se utilizó el sistema de extracción de DNA QIAamp (Qiamp EEUU). Los partidores para la amplificación de RNAr 16S, correspondieron a oligonucleótidos universales (27f 5'-agagttttgatcmtggctcag-3' y 1492r 5'-tacggtacctgttacgactt-3') complementarios a secuencias conservadas para eubacterias (Lane *et al.*, 1985). La mezcla de reacción de PCR contuvo los siguientes reactivos: 2.5  $\mu$ l de tampón Taq polimerasa 10x (Invitrogen), 2,5  $\mu$ l de dNTPs, 1,0  $\mu$ l  $\text{MgCl}_2$ , 2,5  $\mu$ l de cada oligonucleótido, 0,2  $\mu$ l de Taq DNA polimerasa (Invitrogen), 2,0  $\mu$ l DNA templado. La mezcla de reacción fue ajustada a un volumen total de 25  $\mu$ l con agua milli-Q estéril e irradiada (UV 254 nm). La PCR se realizó en un termociclador (Mastercycler personal, Eppendorf, Alemania) con los siguientes pasos: Un ciclo de denaturación inicial de 3 min a 95°C. Luego varios ciclos de denaturación y amplificación iniciales no restrictivos de 56°C por 6 min, 72°C por 90 seg, 95°C por 90 seg, 58°C por 3 min, 72°C por 90 seg.

Posteriormente 27 ciclos más restrictivos de 95°C por 90 seg, 58°C por 90 seg y 72°C por 90 seg. Finalmente 95°C por 90 seg, 58°C por 90 seg, y una extensión final a 72°C por 10 min. Los productos de PCR fueron corridos en geles de agarosa, y analizados en un equipo DiGidoc-I System (UVP Co. EEUU). Los productos fueron purificados mediante columnas de purificación (Invitrogen, EEUU). Las secuencias de los amplificados fueron sometidas a comparaciones empleando el programa BLASTn, disponible en línea desde el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI). Se realizaron alineamientos de secuencias múltiples contra el banco de datos de la NCBI utilizando para ello CLUSTALW (Thompson *et al.*, 1994).



#### **2.4.2 Preparación de DNA**

La extracción de DNA plasmidial se realizó siguiendo el protocolo de lisis alcalina (Sambrook & Russel, 2001). En la preparación de DNA plasmídico de mayor pureza se empleó el kit NucleoSpin Plasmid de Mahery-Nagel (Düren, Alemania), o bien el kit de purificación de DNA de Invitrogen.

La preparación del DNA genómico se realizó por extracción enzimática y fenol cloroformo de acuerdo a protocolos estándares (Sambrook & Russel, 2001). El DNA extraído se cuantificó en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 260 nm.

Para la digestión del DNA se emplearon enzimas de restricción con su tampón siguiendo las instrucciones del fabricante. Cuando fue necesario se modificaron los extremos asimétricos mediante reacción con la ADN polimerasa Klenow, si se precisaba regenerar los extremos 5'. Se empleó ADN polimerasa de T4, si se requería eliminar los extremos 5' cohesivos. La reacción se realizó diluyendo el templado en tampón Klenow (Promega) a concentración final 1x (Sambrook & Russel, 2001).

Para ligar fragmentos de DNA, se añadieron las cantidades de vector e inserto en relación 1:6 (Sambrook & Russel, 2001), en tampón kinasa a una concentración final de ATP de 1 mM, para extremos cohesivos, ó 0,1 mM, cuando al menos uno de los extremos era romo, con 1 unidad de enzima ligasa por reacción. La mezcla se incubó toda la noche a 16°C.

### 2.4.3 Electroforesis en gel de agarosa

Los geles se prepararon en agarosa 0,8 al 1,5 % en tampón TAE 1x (Tris- ácido acético 40 mM, 10 mM EDTA, pH 7,7). Las muestras se cargaron en geles de agarosa con 1/6 del volumen final de tampón de carga (Tris 10 mM, pH 8,0; EDTA 1 mM; glicerol al 30 % y azul de bromofenol, 2,5 g/l) y se corrieron con una diferencia de potencial de 120 Volt. Como patrón de peso molecular se emplearon los marcadores comerciales GeneRuler Mix de Fermentas y X de Roche. Para visualizar el DNA los geles se sometieron a tinción en una solución de bromuro de etidio 5 mg/l durante 15 min. Los geles teñidos se analizaron en un transiluminador de radiación ultravioleta y se fotografiaron con un sistema de documentación GelDoc system II (Biorad).

### 2.4.4 Purificación de fragmentos de DNA desde geles de agarosa

Los fragmentos de ADN necesarios para realizar clonaciones se purificaron desde geles de agarosa. Los cortes se recuperaron por difusión en un tampón de elución empleando el kit de Invitrogen y siguiendo las instrucciones del fabricante. La difusión de las bandas se realizó a 37°C por 20 min, con agitación. Los tubos se centrifugaron a 9800xg durante 5 min para separar la agarosa de la solución. El DNA fue recuperado por elución con tampón TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) desde una columna cargada provista por el fabricante. Los fragmentos aislados a partir de geles de agarosa fueron purificados utilizando un kit comercial (GFX, Amersham o CleanAmp de Invitrogen).

### 2.4.5 Detección de los genes catabólicos *atz*

En los ensayos de detección de genes se emplearon cebadores específicos de los genes *atz* (*atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* y *atzF*) descritos para *Pseudomonas* sp. cepa ADP (De Souza *et al.*, 1995; 1996; 1998b). La detección de genes en las cepas bacterianas fue realizada en colaboración con M. Hernández.

La amplificación de las secuencias de interés se realizaron mediante reacción *in vitro* con la enzima Tap Platinum DNA polimerasa (Promega, EEUU) siguiendo procedimientos estándares (Sambrook & Russel, 2001). La mezcla de reacción de la PCR se preparó con el volumen de DNA molde equivalente a 50 ng en una reacción conteniendo los cebadores a una concentración final de 1  $\mu$ M, nucleótidos a una concentración final de 50  $\mu$ M y 0,5 a 1  $\mu$ l de enzima con el volumen adecuado de tampón.

Las reacciones de PCR se realizaron con 50 ng de concentración del DNA total. El DNA empleado como templado correspondió a DNA extraído y puro y también a DNA no purificado proveniente de la ebullición de colonias bacterianas. Para esto, se resuspendió cada colonia en 100  $\mu$ l de agua bidestilada estéril, se añadieron 10  $\mu$ l de lisozima (Promega, Madison, Wi, EEUU) y se incubaron en un baño a 37°C durante 20 min. A continuación, se hirvieron las muestras durante 10 min en un baño a 100°C, se centrifugaron a 18000xg durante 5 min. Se recuperaron 70  $\mu$ l desde el sobrenadante desde los cuales se tomaron alícuotas para la PCR.

Tabla 2: Secuencias de oligonucleótidos empleados para la búsqueda de genes *atz*.

| Gen                          | Secuencia Oligonucleótido                                    | Referencia                              | Tamaño  |
|------------------------------|--|---|---------|
| <i>atzA</i>                  | 5'-atgtgaaccagatcct-3'<br>5'-gaagcgtccacattacc-3'            | De souza <i>et al.</i> , 1998           | 527 pb  |
| <i>atzB</i>                  | 5'-tcaccgggggatgtcgcgggc-3'<br>5'-ctctcccgcacatggcatcggg-3'  | De Souza <i>et al.</i> , 1998           | 523 pb  |
| <i>atzC</i>                  | 5'-gctcacatgcaggtactcca-3'<br>5'-gtaccatcaccgtttgcca-3'      | De Souza <i>et al.</i> , 1998           | 632 pb  |
| <i>atzD</i>                  | 5'-catcgacgtttccgaatc-3'<br>5'-gaatagcccatcgattcat-3'        | Martínez <i>et al.</i> , 2001           | 572 pb  |
| <i>atzE</i>                  | 5'-cttcgagcctctgtccgta-3'<br>5'-accggctgagtgagaagt-3'        | Martínez <i>et al</i> 2001              | 245 pb  |
| <i>atz F</i>                 | 5'-aaaagcttctgtggagcac-3'<br>5'-cttacaacgcaccgaacc-3'        | Martínez <i>et al.</i> , 2001           | 302 pb  |
| <i>atzD1</i><br><i>atzD2</i> | 5'-gagcagggtgagacagggcgtgc-3'<br>5'-cgatggatcccagggtgtggc-3' | García-González <i>et al.</i> ,<br>2005 | 1500 pb |

Las condiciones en que se realizó la PCR para cada par de oligonucleótidos correspondieron a aquellas indicadas en la Tabla 4.

Tabla 3: Ciclos empleados en la PCR para la amplificación de genes catabólicos *atz*

| <i>Gen</i>   | <i>Desnaturalización</i> | <i>Hibridización</i>         | <i>Amplificación</i> |
|--------------|--------------------------|------------------------------|----------------------|
| <i>atzA</i>  | 45 seg a 94 °C           | 45 seg. a 58°C               | 30 seg a 72 °C       |
| <i>atzB</i>  | 45 seg a 94-95 °C        | 45 seg. a 58°C               | 30 seg a 72°C        |
| <i>atzC</i>  | 45 seg a 94-95 °C        | 45 seg. a 58°C               | 30 seg a 72 °C       |
| <i>atzD</i>  | 45 seg a 95 °C           | 45 seg. a 55°C               | 30 seg a 72 °C       |
| <i>atzE</i>  | 45 seg a 94-95 °C        | 30 seg. a 55°C               | 30 seg a 72 °C       |
| <i>atzF</i>  | 45 seg a 94-95 °C        | 30 seg. a 55°C               | 30 seg a 72 °C       |
| <i>atzDR</i> | 45 seg a 94-95 °C        | 45 seg. a 58 <sup>a</sup> °C | 1 min a 72 °C        |

#### 2.4.6 Ensayos de retrotranscripción

Se crecieron preinóculos hasta fase estacionaria en volúmenes de 3 ml a 30°C en medio mínimo con amonio como única fuente de nitrógeno. Se traspasaron inóculos a tubos con medio AM fresco conteniendo diferentes fuentes nitrógeno: amonio, amonio/simazina, nitrato, nitrato/simazina, ácido cianúrico y simazina. Los cultivos se incubaron a 30°C por aproximadamente 16 a 20 h hasta fase exponencial temprana (Turbidez a 600 nm~0.3). Las células se cosecharon por centrifugación a 18000xg x 1 min a 4°C. El sobrenadante se desechó y las células se sumergieron inmediatamente en nitrógeno líquido. Las células se almacenaron a -80°C, o se procesaron para la extracción de RNA.

En la extracción de ARN se empleó agua pretratada con DEPC (Sigma) y guantes durante el procedimiento. Se utilizó solución Tri-Reagent (Promega) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las proporciones de volúmenes usados fueron 3:1 para Tri-Reagent/ muestra, respectivamente. La mezcla se homogenizó cuidadosamente por rotación y se dejó decantar el lisado por 5 min a temperatura ambiente, para permitir la completa disociación de los complejos nucleoproteicos. Se adicionó cloroformo en un 20% del volumen total. Las muestras fueron homogenizadas vigorosamente por 15-20 seg. Después de dejar reposar la muestra a temperatura ambiente por 15 min, éstas fueron centrifugadas a 18000xg por 15 min a 4°C. Se recuperó la fase acuosa superior que contiene el RNA.

En la precipitación del RNA se empleó medio volumen de isopropanol (Merck). Las muestras se incubaron por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugaron a 18000xg por 10 min a 4°C. Se eliminó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 1 ml de etanol al 75%. El ARN fue disuelto cuidadosamente en agua tratada con DEPC (Sigma).

Para eliminar el DNA contaminante, las muestras se alicuotaron en volúmenes de 50  $\mu$ l y se trataron con 0,1 volumen de tampón DNasa I y 1  $\mu$ l (2U) de la enzima DNasa I. Se mezclaron suavemente y se incubaron a 37°C por 30 min a 1 h. La reacción fue detenida agregando 0,1 volumen de reactivo de inactivación provisto por el fabricante (Invitrogen). La mezcla fue centrifugada brevemente a 18000xg por 1,5 min a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un tubo. El RNA resultante fue purificado mediante columnas de retención por carga (Promega). Los RNA resultantes se cuantificaron y emplearon para la reacción de retrotranscripción. Se evaluó la contaminación de DNA por PCR con partidores dirigidos contra el RNA ribosomal que codifica para la subunidad 16S y contra los genes *atz*.

Para la amplificación del cDNA se siguieron las condiciones recomendadas por el fabricante (Invitrogen). Se empleó transcriptasa reversa Superscript en una reacción llevada a cabo a 42°C por 90 min. La purificación del cDNA del RNA restante, se realizó mediante hidrólisis con NaOH (Sambrook, & Russel, 2001). El DNA fue resuspendido en 20  $\mu$ l de dH<sub>2</sub>O DEPC. Las reacciones de PCR se realizaron empleando como templado 4  $\mu$ l de muestras de cDNA directas, y de diluciones seriadas. La reacción de PCR en cada tubo fue la siguiente: 95°C 5 min, 94°C 30 seg, 58°C 30 seg, 72°C 30 seg. Se realizó una extensión final de 72°C por 4 min. Se emplearon 20 ciclos para obtener una PCR no saturada y observar una amplificación diferencial dependiente de las concentraciones de genes expresados. Como controles internos de amplificación se usaron partidores universales dirigidos contra el RNA ribosomal 16S.

#### 2.4.7 Ensayos transcripcionales en *Pseudomonas nitroreducens* P41

Se realizaron ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa con vectores conteniendo la región reguladora de *Pseudomonas nitroreducens* P41. Se empleó como DNA templado el fragmento *atzR* de *Pseudomonas* sp. cepa ADP (García-González *et al.*, 2005). En la reacción se emplearon los oligonucleotidos *atzD1* y *atzD2*, los cuales incluyeron el sitio BamHI para su unión al vector Bluescript II KS+. Como *Pseudomonas nitroreducens* P41 no está secuenciada, se realizó una PCR en gradiente empleando un termociclador ad hoc (Per-

kin Elmer). El producto con la señal más intensa en el gel fue reamplificado con la reacción y su banda luego fue extraída y purificada mediante procedimientos estándares. El producto de 1,5 kb amplificado, fue digerido con las enzimas *PvuII* y *BamHI* y clonado dentro del sitio *EcoRV* en el vector Bluescript II KS+. La dirección y secuencia correcta de la inserción amplificada por PCR fue verificada por secuenciación de los productos obtenidos.

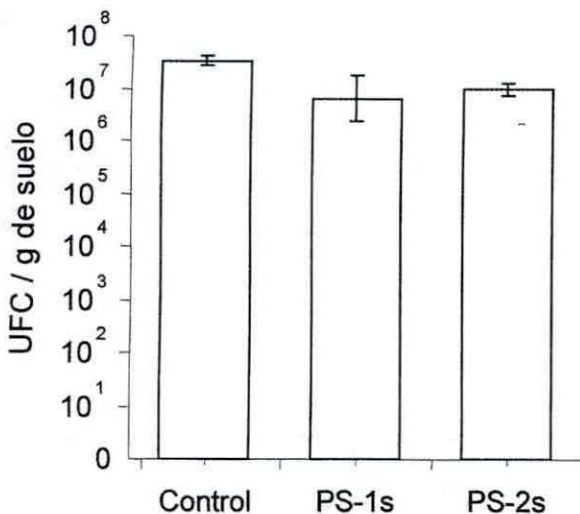
Para la selección del fragmento a clonar en el vector Bluescript II KS+, el producto de 1,5 kb se digirió con enzimas de restricción *BamHI* y *PvuII* para obtener la región correspondiente a los primeros 48 pb del gen *atzD*, la región intergénica *atzD-atzR* y 310 pb del gen regulador *atzR*. Este fragmento fue subclonado en el sitio *Sall* y *BamHI* del vector pHRP309 generando el vector pHRP309P41D-R en marco de una fusión transcripcional. Este vector incorporado a células de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y posteriormente transferido a *Pseudomonas nitroreducens* P41 para la evaluación de la expresión de los genes clonados por ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa.



## 3.

**Resultados**3.1 **Caracterización de cepas bacterianas que degradan simazina**3.1.1 **Efecto de la simazina sobre las cepas bacterianas heterótrofas cultivables**

La atrazina actúa inhibiendo la fotosíntesis, a nivel de transporte de electrones en el fotosistema II de los vegetales de hoja ancha y crecimiento rápido. Debido a que las bacterias provienen de suelos contaminados con el herbicida, se evaluó si la presencia de simazina en el suelo tiene efectos sobre los microorganismos heterótrofos cultivables. Para ello, se aplicó simazina (13 ppm) en un sector de campo agrícola sin registros de aplicación del herbicida. La Figura 6 muestra los resultados de los recuentos de la recuperación de heterótrofos. El número de bacterias heterótrofos cultivables en el suelo control fue de  $7,5 \times 10^6$  UFC/g, mientras que los microorganismos recuperados desde suelos tratados con simazina fueron de  $6,8 \times 10^6$  y  $7,0 \times 10^6$  UFC/g de suelo, una y dos semanas posterior a la aplicación del herbicida, respectivamente. El herbicida simazina no afectó significativamente el número de bacterias heterótrofas cultivables ( $p > 0,05$ ; ANOVA).



**Figura 6. Efecto de la simazina sobre las cepas bacterianas heterótrofas cultivables.** Las muestras se obtuvieron desde suelos agrícolas antes de la aplicación de simazina (control), una semana (PS-1s) y dos semanas (PS-2s) después de la aplicación de simazina (13 ppm). Los valores representan los promedios de resultados de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios.

### 3.1.2 Caracterización e identificación de cepas bacterianas degradadoras de s-triazinas

Las cepas bacterianas degradadoras de s-triazinas se aislaron desde suelos tratados y no tratados con el herbicida simazina (Hernández, 2004; Hernández *et al.*, 2008). El estudio incluyó 13 cepas bacterianas provenientes de suelos utilizados para el cultivo de Caqui, 14 desde suelos para Palto y 5 desde suelos controles. Las cepas se caracterizaron por tinción Gram y descripción de las características fenotípicas de la colonia (tamaño, bordes, olor, color) que se resumen en la Tabla 4. Esto permitió clasificarlas en 8 grupos. El grupo 1 estuvo conformado por 14 de las 32 cepas caracterizadas, las cuales corresponden a cepas Gram negativas que forman colonias de 3 mm diámetro, bordes regulares, crecimiento aéreo convexo, y de color blanco. Los grupos 2, 3 y 4 fueron conformados por 3 a 4 aislados de diferente tamaño y tipo de borde de la colonia. Los grupos 1 al 4 fueron conformados por bacterias Gram negativas. Desde el grupo 5 al 8 se agruparon las cepas Gram positivas y de acuerdo al tamaño y borde de la colonia se dispusieron en grupos diferentes constituidos por 1 o 2 cepas. La cepa K55 del grupo 7, mostró colonias de bordes irregulares o con ornamentaciones aéreas. Las cepas del grupo 8 mostraron colonias de 2 mm de diámetro, pero en diversas ocasiones, estas cepas mostraron colonias con crecimiento expandido por toda la placa de agar dificultando su manipulación. Un 22 % de las cepas fueron Gram positivo y 78% fueron Gram negativo. En 10 de las cepas fue posible reconocer olor, lo que permitió en ocasiones discriminar entre colonias similares para su diferenciación como sucedió con las cepas P16, P21, P41, C31. 28 de las cepas forman colonias color blanco, 2 cepas forman colonias de color crema, y 2 cepas forman colonias de color amarillo pálido. Los tamaños de las colonias bacterianas oscilaron entre 2 y 4 mm de diámetro en agar TSA. La mayoría de las cepas forman colonias circulares, a excepción de las cepas C32, C34, C45, P52 y K55. La cepa P52 formó la colonia de mayor tamaño, apariencia rugosa formando estrías internas en la colonia y bordes irregulares. Colonias de la cepa C34 mostraron una viscosidad diluida al tacto con el asa y de crecimiento expansivo. La cepa C45 mostró una colonia pequeña de 2 mm de diámetro, de color blanco, bordes regulares y de consistencia pegajosa. K55 mostró una colonia de bordes irregulares, apariencia rugosa y de consistencia rígida al tacto con el asa de cultivo. Estas cepas fueron de difícil manejo para obtener colonias discretas y crecimientos regulares, por lo que no se emplearon en ensayos de degradación. Después de esta clasificación inicial, se procedió a la identificación bacteriana, y posteriormente a determinar las características degradativas para seleccionar las cepas bacterianas.

Tabla 4: Caracterización fenotípica e identificación de las cepas bacterianas provenientes de suelos agrícolas del Valle de Aconcagua.

| Cepa | Origen Suelo | Gram  | Características fenotípicas de las colonias en agar TSA |        |      |       | Grupo | Identificación                       | Identidad                         |
|------|--------------|-------|---|--------|------|-------|-------|--------------------------------------|-----------------------------------|
|      |              |       | Ø mm  | Bordes | Olor | Color |       |                                      |                                   |
| C14  | Caqui        | -     | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas</i> sp.          | 94,3                              |
| C15  |              | -     | 2   | R      | -    | B     | 2     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 96,3                              |
| C16  |              | -     | 2   | R      | +    | B     | 3     | <i>Pseudomonas synthaxa</i>          | 98,4                              |
| C24  |              | -     | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 99                                |
| C25  |              | -     | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 99,4                              |
| C26  |              | -     | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas</i> sp.          | 95                                |
| C34  |              | +     | 2   | R      | -    | B     | 8     | <i>Bacillus pumilus</i>              | 99                                |
| C35  |              | -     | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 99                                |
| C36  |              | -     | 3   | I      | +    | A     | 4     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 94,8                              |
| C44  |              | +     | 3   | R      | -    | B     | 6     | <i>Arthrobacter globiformis</i>      | 96,9                              |
| C45  |              | +     | 2   | R      | +    | B     | 5     | <i>Rhodococcus</i> sp.               | 98,3                              |
| C53  |              | -     | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 99,4                              |
| C54  |              | -     | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 99                                |
| P11  |              | Palto | -   | 2      | R    | -     | B     | 2                                    | <i>Achromobacter xylosoxidans</i> |
| P12  | -            |       | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 99                                |
| P13  | -            |       | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 97,6                              |
| P21  | -            |       | 3   | R      | +    | C     | 3     | <i>Pseudomonas citronellois</i>      | 99                                |
| P22  | -            |       | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 99                                |
| P23  | +            |       | 2   | R      | +    | B     | 5     | <i>Rhodococcus erythropolis</i>      | 98,9                              |
| P31  | -            |       | 3   | I      | +    | B     | 4     | <i>Alcaligenes faecalis</i>          | 98,6                              |
| P32  | +            |       | 2   | R      | -    | B     | 8     | <i>Bacillus pumilus</i>              | 99                                |
| P33  | -            |       | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 99,4                              |
| P41  | -            |       | 3   | R      | +    | C     | 3     | <i>Pseudomonas nitroreducens</i>     | 98,6                              |
| P42  | -            |       | 2   | R      | -    | B     | 2     | NI*                                  | --                                |
| P43  | -            |       | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 98,4                              |
| P51  | -            |       | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 98,4                              |
| P52  | +            |       | 4   | I      | -    | B     | 6     | <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> | 97,8                              |
| K17  | Control      | -     | 3   | I      | +    | B     | 4     | <i>Brevundimonas vesicularis</i>     | **                                |
| K27  |              | -     | 2   | R      | -    | B     | 2     | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>     | 98                                |
| K37  |              | -     | 3   | R      | -    | B     | 1     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 94,2                              |
| K46  |              | -     | 3   | I      | +    | A     | 4     | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | 99,3                              |
| K55  |              | +     | 3   | I      | +    | B     | 7     | NI*                                  | --                                |

R: Regulares; I: Irregulares; B: Blanco; A: Amarillo; C: Crema. +: Expele olor; -: No expele olor.

\*: NI. No identificada.

\*\* : Identificación preliminar mediante sistema Biolog.

La identificación inicial de algunas cepas bacterianas se realizó mediante el sistema Biolog (versión 3.01A) empleando la placa GN2. La utilización de 95 fuentes de carbono que se evaluaron se detalla en la Tabla 5. La cepa P41 mostró alta similitud con *Pseudomonas nitroreducens*/*Pseudomonas azelaica* (Prob=99%; SIM=0,914). 42 fuentes de carbono fueron metabolizados por esta cepa bacteriana, 7 fueron metabolizados parcialmente y 46 no fueron metabolizados. Para las cepas P43, K46, P51, C53 y C54 se obtuvieron similitudes variables con la especie *Stenotrophomonas maltophilia*, que oscilan entre 0,85 hasta 0,978: P43 (Prob=99%; SIM= 0,908), K46 (Prob=99%; SIM=0,894), P51 (Prob=98%; SIM=0,85), C53 (Prob=100%; SIM=0,98) y C54 (Prob=100%; SIM=0,956). Los aislados de *Stenotrophomonas* mostraron similar patrón de utilización de los sustratos. Se observaron 5 diferencias en la cepa P51 en relación a las cepas P43, K46, C53 y C54. A su vez, la cepa P53 metabolizó ácido  $\alpha$ -ceto valérico, mono-metil succinato, ácido urocánico y no metabolizó ácido  $\alpha$ -hidroxibutírico. Como grupo, este género no utilizó oxidativamente 43 fuentes de carbono, aunque en algunas de ellas se observó un metabolismo parcial de estas fuentes (glicerol, ácido *p*-hidroxi fenilacetico). El 48% de sustratos fue metabolizado por las cuatro cepas identificadas como *Stenotrophomonas*.

La identificación de todas las cepas bacterianas se llevó a cabo mediante secuenciación del gen que codifica para el RNAr 16S utilizando oligonucleótidos f27 y r1406. 17 de las 32 cepas bacterianas se identificaron como *Stenotrophomonas maltophilia*. Las otras cepas bacterianas identificadas correspondieron a: *Pseudomonas synthaxa*, *Bacillus pumilus*, *Arthrobacter globiformis*, *Rhodococcus sp.*, *Achromobacter xyloisidans*, *Pseudomonas citronellois*, *Rhodococcus erythropolis*, *Alcaligenes faecalis*, *Bacillus pumilus*, *Pseudomonas nitroreducens*, *Arthrobacter chlorophenolicus*, *Brevundimonas vesicularis*, *Agrobacterium tumefaciens*. La cepa K17 se identificó como *Brevundimonas vesicularis*, empleando el sistema Biolog. Las cepas P42 y K55, no fueron identificadas. Ambas cepas bacterianas mostraron pobres crecimientos en medio TSA y en medio mínimo empleando simazina como fuente de nitrógeno, lo que no permitió un manejo adecuado para su identificación. Estas dificultades para cultivar las cepas bacterianas fueron consideradas en la selección posterior de cepas para los estudios de biorremediación.

Tabla 5. Perfil de pruebas bioquímicas para la identificación bacteriana empleando el sistema Biolog.

| Sustrato | Cepa bacteriana                |     |     |     |     |     | Sustrato | Cepa bacteriana              |     |     |     |     |     |     |
|----------|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|----------|------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|          | P41                            | P43 | K46 | P51 | C53 | C54 |          | P41                          | P43 | K46 | P51 | C53 | C54 |     |
| A1       | Agua                           | -   | -   | -   | -   | -   | E1       | Ácido p-Hidroxi Fenilacético | -   | -   | +/- | +/- | +/- | -   |
| A2       | α-Ciclodextrina                | -   | -   | -   | -   | -   | E2       | Ácido Itacónico              | +   | -   | -   | +/- | -   | -   |
| A3       | Dextrina                       | +/- | +   | +   | +   | +   | E3       | Ácido α-Ceto Butírico        | +   | +   | +   | +   | +   | +/- |
| A4       | Glicogeno                      | +   | +/- | +/- | +/- | +/- | E4       | Ácido α-Ceto Glutámico       | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| A5       | Tween 40                       | +   | +/- | +/- | +/- | +/- | E5       | Ácido α-Ceto Valérico        | +   | -   | -   | +   | -   | -   |
| A6       | Tween 80                       | +   | +/- | +/- | +/- | +/- | E6       | Ácido D,L-Láctico            | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| A7       | N-Acetil-D-galactosamina       | +/- | +   | +   | +   | +   | E7       | Ácido Malónico               | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| A8       | N-Acetil-D-glucosamina         | +   | +   | +   | +   | +   | E8       | Ácido Propiónico             | +   | +   | +   | +   | +/- | +   |
| A9       | Adonitol                       | -   | -   | -   | -   | -   | E9       | Ácido Quínico                | +   | -   | -   | -   | -   | -   |
| A10      | L-Arabinosa                    | -   | -   | -   | -   | -   | E10      | Ácido D-Sacárico             | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| A11      | D-Arabitól                     | -   | -   | -   | -   | -   | E11      | Ácido Sebácico               | +   | -   | -   | -   | -   | -   |
| A12      | D-Celobiosa                    | -   | +   | +   | +   | +   | E12      | Ácido Succínico              | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| B1       | i-Eritritol                    | -   | -   | -   | +/- | +/- | F1       | Ácido Bromo Succínico        | +   | +   | +   | +   | +   | +/- |
| B2       | D-Fructosa                     | +/- | +   | +   | +   | +   | F2       | Ácido Succinámico            | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| B3       | L-Fucosa                       | -   | -   | -   | -   | -   | F3       | Glucuronamida                | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| B4       | D-Galactosa                    | -   | +/- | -   | -   | +/- | F4       | L-Alaninamida                | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| B5       | Gentiobiosa                    | -   | +   | +   | +   | +   | F5       | D-Alanina                    | +   | +   | +   | +   | +   | +/- |
| B6       | α-D-Glucosa                    | +   | +   | +   | +   | +   | F6       | L-Alanina                    | +   | +   | +   | +   | +   | +/- |
| B7       | m-Inositol                     | -   | -   | -   | -   | -   | F7       | L-Alanil glicina             | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| B8       | α-D-Lactosa                    | -   | +   | +   | +   | +/- | F8       | L-Asparagina                 | +   | +/- | +/- | +   | +/- | +   |
| B9       | Lactulosa                      | -   | +   | +   | +   | +   | F9       | Ácido L-Aspártico            | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| B10      | Maltosa                        | -   | +   | +   | +   | +   | F10      | Ácido L-Glutámico            | +   | +   | +/- | +   | +/- | +   |
| B11      | D-Manitol                      | -   | -   | -   | -   | -   | F11      | Ácido Glicil-L-Aspártico     | +/- | +   | +   | +   | +   | +   |
| B12      | D-Manosa                       | -   | +   | +   | +   | +   | F12      | Ácido Glicil-L-Glutámico     | +/- | +   | +   | +   | +   | +   |
| C1       | D-Melibiosa                    | -   | +   | +   | +   | +   | G1       | L-Histidina                  | -   | -   | -   | +/- | -   | -   |
| C2       | α-Metil-D-Glucósido            | -   | +   | +   | +   | +   | G2       | Hidroxi-L Prolina            | +   | -   | -   | -   | -   | -   |
| C3       | D-Psicosa                      | +/- | -   | -   | -   | -   | G3       | L-Leucina                    | +   | +/- | +/- | +   | +   | +   |
| C4       | D-Rafinosa                     | -   | +   | +   | +/- | +/- | G4       | L-Omitina                    | +   | -   | -   | -   | -   | -   |
| C5       | L-Ramnosa                      | -   | -   | -   | -   | -   | G5       | L-Fenilalanina               | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| C6       | D-Sorbitol                     | -   | -   | -   | -   | -   | G6       | L-Prolina                    | +   | +/- | +/- | +   | +   | +/- |
| C7       | Sacarosa                       | -   | +   | +   | +   | +   | G7       | L-Ácido Piroglutámico        | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| C8       | D-Trehalosa                    | -   | +   | +   | +   | +   | G8       | D-Serina                     | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| C9       | Turanosa                       | -   | +   | +   | +   | +   | G9       | L-Serina                     | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| C10      | Xylitol                        | -   | -   | -   | -   | -   | G10      | L-Treonina                   | +   | +   | +   | +   | +/- | +   |
| C11      | Ácido Pirúvico metil éster     | +   | +   | +   | +   | +   | G11      | D, L-Carnitina               | +   | -   | -   | -   | -   | -   |
| C12      | Ác. Succínico mono metil éster | +   | -   | -   | +   | -   | G12      | Ácido α-Amino Butírico       | +   | -   | -   | -   | -   | -   |
| D1       | Ácido Acético                  | +   | +   | +   | +/- | +   | H1       | Ácido Urocánico              | +   | -   | -   | +   | -   | -   |
| D2       | Ácido cis Aconítico            | +   | +   | +   | +   | +   | H2       | Inosina                      | -   | +   | +   | +   | +   | +   |
| D3       | Ácido Cítrico                  | +   | +   | +   | +   | +   | H3       | Uridina                      | -   | +   | +   | +   | +   | +   |
| D4       | Ácido Fórmico                  | +   | -   | -   | -   | -   | H4       | Timidina                     | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| D5       | Ácido D-Galactónico Lactona    | -   | -   | -   | -   | -   | H5       | Fenil etil amina             | +/- | -   | -   | -   | -   | -   |
| D6       | Ácido D-Galacturónico          | -   | -   | -   | -   | -   | H6       | Putrescina                   | +   | -   | -   | -   | -   | -   |
| D7       | Ácido D-Glucónico              | +   | -   | -   | -   | -   | H7       | 2-Aminoetanol                | +   | -   | -   | -   | -   | -   |
| D8       | Ácido D-Glucosamínico          | -   | -   | -   | -   | -   | H8       | 2,3-Butanodiol               | -   | -   | -   | +/- | -   | -   |
| D9       | D- Ácido Glucurónico           | -   | -   | -   | -   | -   | H9       | Glicerol                     | -   | +/- | -   | -   | -   | +/- |
| D10      | Ácido α-Hidroxi Butírico       | +   | +   | +   | -   | +/- | H10      | D,L-α-Glicerol Fosfato       | -   | -   | -   | -   | -   | -   |
| D11      | Ácido β-Hidroxi Butírico       | +   | +   | +   | +   | +   | H11      | Glucosa-1-Fosfato            | -   | -   | -   | +/- | -   | -   |
| D12      | Ácido γ-Hidroxi Butírico       | -   | -   | -   | -   | -   | H12      | Glucosa-6-Fsfato             | -   | -   | -   | -   | -   | -   |

+: Si emplea el sustrato; -: no emplea el sustrato; +/-: emplea el sustrato en forma parcial.

## 3.2 Estudio del catabolismo de s-triazinas por las cepas bacterianas

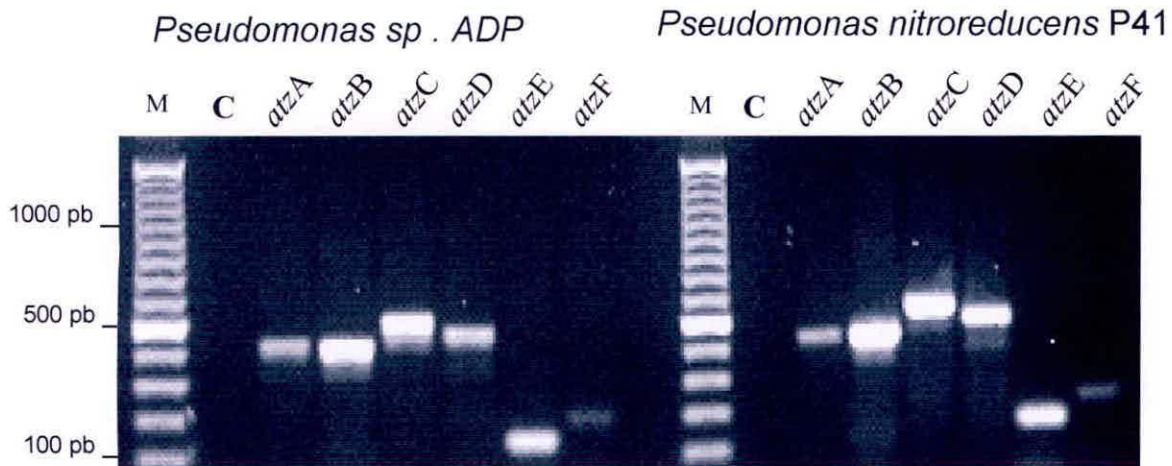
### 3.2.1 Genes catabólicos *atz*

El estudio del catabolismo de simazina por las cepas bacterianas aisladas fue abordado por dos estrategias. Se estudió el crecimiento de las cepas empleando los compuestos s-triazinas simazina y ácido cianúrico como fuentes de nitrógeno y la degradación de simazina cuando se crecen las bacterias con diferentes fuentes de nitrógeno. Asimismo, se investigó en las cepas bacterianas la presencia de los genes catabólicos involucrados en la ruta de degradación de simazina. El proceso de selección de cepas con potencial para ser empleadas en procesos de biorremediación se basó en la facilidad de crecimiento en condiciones de laboratorio, la formación de halos de degradación de s-triazinas en placas de agar, la degradación de simazina y la detección de genes catabólicos.

Para la detección de los genes catabólicos, involucrados en la ruta de degradación de simazina, se emplearon los oligonucleótidos específicos para genes catabólicos *atz*.

En la Figura 7 se observan los productos de los genes *atz* amplificados por PCR en *Pseudomonas nitroreducens* P41. En la figura se observan también los productos amplificados de los genes *atz* de *Pseudomonas* sp. ADP. *Pseudomonas nitroreducens* P41 contiene los seis genes *atz* descritos para la degradación de atrazina y simazina. El reconocimiento de las regiones conservadas identificadas por los partidores sugiere que las enzimas en ambas cepas bacterianas serían similares.

La Tabla 6 resume los resultados de las amplificaciones para la detección de genes *atz* en todas las cepas bacterianas aisladas desde los suelos agrícolas. En los 32 aislados se detectaron al menos uno de los genes *atz* de la ruta de degradación de s-triazinas. En 9 de las 32 cepas se detectaron todos los genes *atz* para degradar s-triazinas. Estas cepas corresponden a *Arthrobacter globiformis* C44, *Stenotrophomonas maltophilia* P13, *Stenotrophomonas maltophilia* P33, *Stenotrophomonas maltophilia* P43, *Stenotrophomonas maltophilia* C53, *Stenotrophomonas maltophilia* C54, *Pseudomonas citronellosis* P21, *Pseudomonas nitroreducens* P41 y la cepa K55.



**Figura 7. Detección de genes catabólicos *atz* para la degradación de simazina en *Pseudomonas nitroreducens* P41.** (A) *Pseudomonas* sp. ADP (De Souza *et al.*, 1995). (B) *Pseudomonas nitroreducens* P41. Las amplificaciones se realizaron desde fracciones de DNA plasmidial. (M) Marcador de peso molecular X (Roche), (C) control negativo.

En la cepa *Bacillus pumillus* C34 se detectaron 5 de los 6 genes *atz* de las rutas de degradación de simazina, no detectándose el gen *atzD* de la ruta inferior de degradación. En la cepa *Rhodococcus erythropolis* P23 se detectaron los tres genes de la vía superior *atzA*, *atzB*, *atzC* y el gen *atzD* sugiriendo que esta especie es capaz de transformar simazina en ácido cianúrico, pero no es capaz de mineralizar el compuesto. En *Alcaligenes faecalis* P31 y *Brevundimonas vesicularis* K17 se detectaron los genes *atzD*, *atzE* y *atzF* de la ruta inferior de degradación, y sólo el gen *atzA* de la ruta superior. En la cepa bacteriana P42 se detectaron solo 2 de los genes catabólicos. En K55 se detectaron todos los genes de ruta superior e inferior.

Algunas cepas bacterianas no formaron halos y no crecieron empleando simazina como única fuente de nitrógeno. En algunas de estas cepas se observaron leves crecimientos iniciales, pero éstos no se mantuvieron en el tiempo (datos no mostrados). Esta incapacidad de crecer en simazina, como fuente de nitrógeno, fue un criterio básico para descartar cepas para ensayos de degradación de simazina en suelo.

Tabla 6: Detección de genes catabólicos *atz* en las cepas bacterianas.

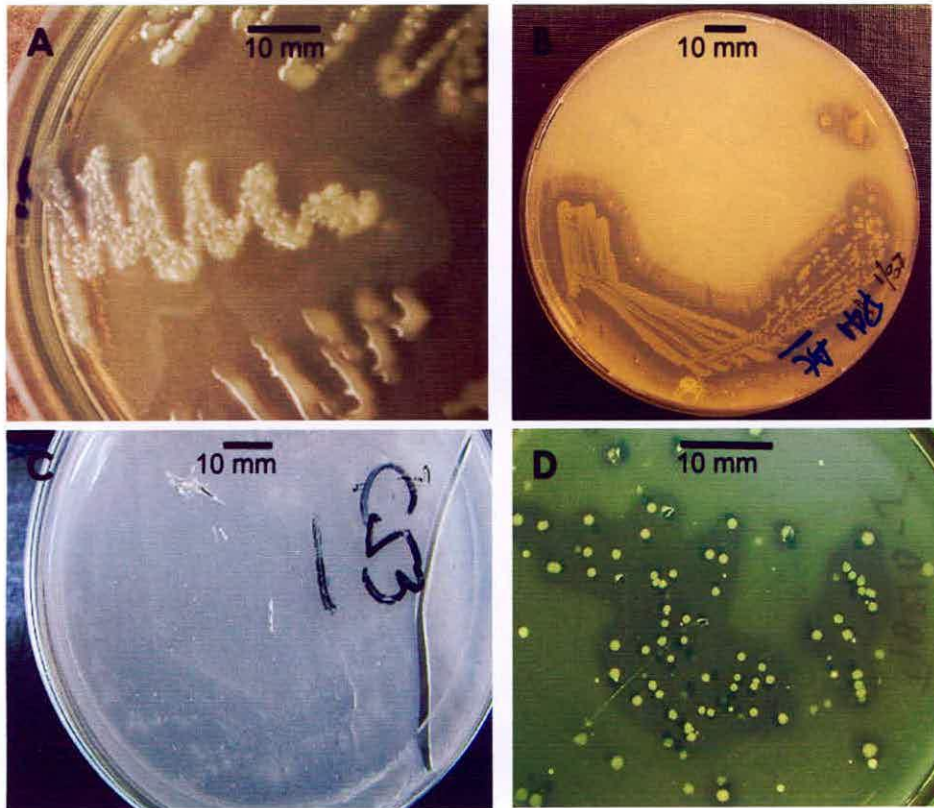
| Cepa | Identificación                       | Genes Catabólicos <i>atz</i> |   |   |   |   |   |
|------|--------------------------------------|------------------------------|---|---|---|---|---|
|      |                                      | A                            | B | C | D | E | F |
| C14  | <i>Stenotrophomonas</i> sp.          | -                            | + | - | - | - | - |
| C15  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | -                            | + | - | - | + | - |
| C16  | <i>Pseudomonas synthaxa</i>          | +                            | + | + | - | + | + |
| C24  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | -                            | + | - | - | - | - |
| C25  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | -                            | + | - | - | + | + |
| C26  | <i>Stenotrophomonas</i> sp.          | -                            | + | - | + | + | + |
| C34  | <i>Bacillus pumilus</i>              | +                            | - | - | + | - | - |
| C35  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | -                            | + | - | - | - | - |
| C36  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | -                            | + | - | - | + | + |
| C44  | <i>Arthrobacter globiformis</i>      | +                            | + | + | + | + | + |
| C45  | <i>Rhodococcus</i> sp.               | -                            | + | + | - | - | - |
| C53  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | +                            | + | + | + | + | + |
| C54  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | +                            | + | + | + | + | + |
| P11  | <i>Achromobacter xylosoxidans</i>    | -                            | + | - | + | - | + |
| P12  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | -                            | + | - | - | - | - |
| P13  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | +                            | + | + | + | + | + |
| P21  | <i>Pseudomonas citronellosis</i>     | +                            | + | + | + | + | + |
| P22  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | -                            | + | + | - | + | + |
| P23  | <i>Rhodococcus erythropolis</i>      | +                            | + | + | + | - | - |
| P31  | <i>Alcaligenes faecalis</i>          | +                            | - | - | + | + | + |
| P32  | <i>Bacillus pumilus</i>              | +                            | + | + | - | + | + |
| P33  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | +                            | + | + | + | + | + |
| P41  | <i>Pseudomonas nitroreducens</i>     | +                            | + | + | + | + | + |
| P42  | NI*                                  | -                            | + | - | + | - | - |
| P43  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | +                            | + | + | + | + | + |
| P51  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | +                            | + | - | + | - | + |
| P52  | <i>Arthrobacter chlorophenolicus</i> | -                            | + | + | - | - | - |
| K17  | <i>Brevundimonas vesicularis</i>     | +                            | - | - | + | + | + |
| K27  | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>     | +                            | - | + | + | - | + |
| K37  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | -                            | - | + | + | + | - |
| K46  | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>  | -                            | + | - | - | - | + |
| K55  | NI*                                  | +                            | + | + | + | + | + |

\*: NI. No identificada.

### 3.2.2 Formación de halos de degradación y selección de cepas

La formación de halos de degradación en placa permite visualizar la actividad catabólica de s-triazinas del microorganismo. Los halos de degradación se observaron en placas de agar con atrazina, debido a que con simazina la formación de halos de degradación fue débil y de difícil visualización. La menor solubilidad de atrazina que simazina (0,04 y 0,06 mg/ml respectivamente) a temperaturas de 50°C la hace precipitar al estar en contacto con el agar formando una solución de aspecto lechoso, que facilita la visualización de halos cuando el microorganismo que crece está degradando el compuesto (E. Santero, comunicación personal). Sólo en 5 de las cepas bacterianas que poseen todos los genes *atz* se observó presencia de un halo de degradación alrededor de las colonias en crecimiento: *Pseudomonas nitroreducens* P41, *Pseudomonas citronellosis* P21 y en las cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* P13, C53, C54 (Figura 8). *Pseudomonas nitroreducens* P41 mostró un halo difuso en agar con simazina (figura 8A) y un halo de degradación de 3 a 5 mm al crecerla sobre atrazina (figura 8B). En las figuras 8C y 8D, se observan halos producidos por las cepas *Stenotrophomonas maltophilia* C53 y *Pseudomonas citronellosis* P21, respectivamente. Los halos producidos por *Stenotrophomonas maltophilia* no fueron notorios, siendo su formación lenta (8 días). Esto se correlaciona con la lentitud de crecimiento observada en estas cepas en medios líquidos. El pobre crecimiento de las cepas de *Stenotrophomonas* (turbidez de 0,17 a 600 nm) fueron un criterio para no seleccionar estos microorganismos en estudios de biorremediación. Además *Stenotrophomonas maltophilia* es considerado un patógeno oportunista con capacidad de multi resistencia a antibióticos. Esto descarta la aplicación de estas cepas en potenciales procesos de descontaminación de suelos.

*Pseudomonas citronellosis* P21 mostró halos luego de 24 horas. Los halos se hicieron más notorios a las 72 horas de incubación. Es interesante notar de ambas colonias de *Pseudomonas* que con frecuencia se observaban colonias con la misma morfología pero sin la capacidad de formar estos halos. Este fenómeno fue evaluado en conjunto con la detección de genes catabólicos.



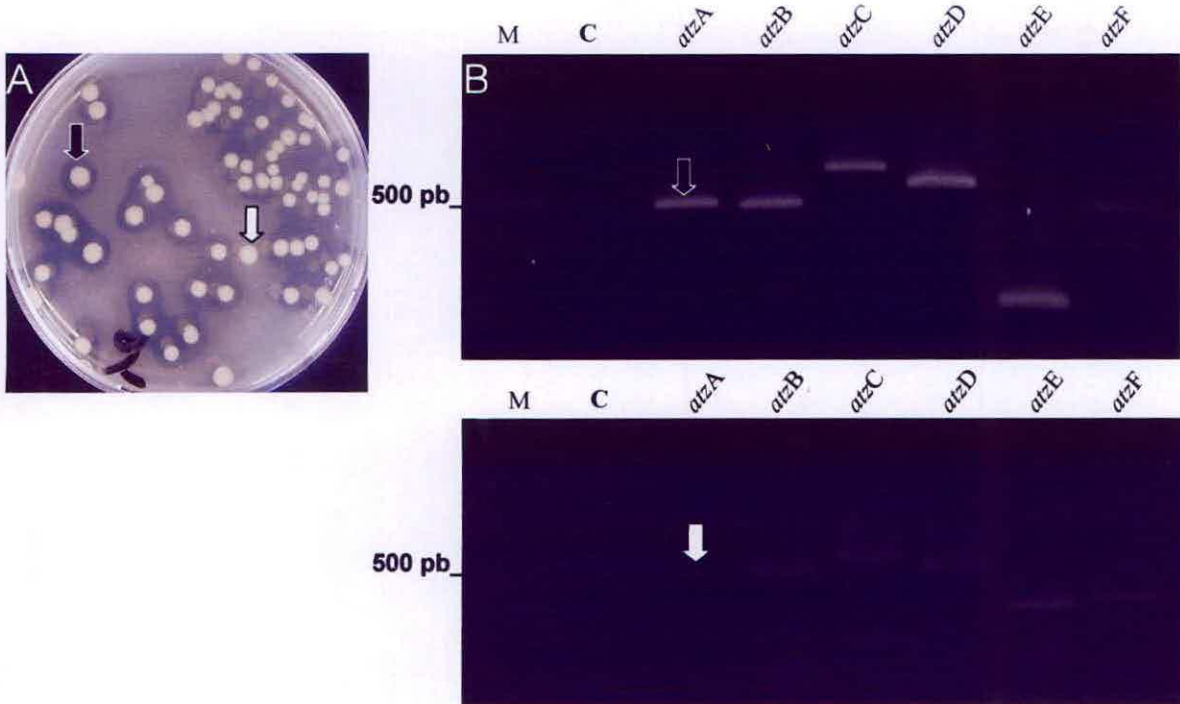
**Figura 8. Formación de halos de degradación por las cepas bacterianas.** *Pseudomonas nitroreducens* P41 crecida en medio mínimo empleando simazina (A) y atrazina (B) como única fuente de nitrógeno. (C) *Stenotrophomonas maltophilia* C53, y (D) *Pseudomonas citronellosis* P21.

Las cepas de *Arthrobacter globiformis* C34, *Stenotrophomonas maltophilia* P33, *Stenotrophomonas maltophilia* P43 y cepa K55 no desarrollaron halo de degradación, a pesar de que en ellas fueron detectados los seis genes catabólicos para la degradación de simazina. *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 mostraron una eficiente capacidad para formar y degradar s-triazinas en medios líquidos y sólidos. Ambas cepas mostraron presencia de genes catabólicos, formación de halos de degradación y facilidad de cultivo con obtención de alta biomasa. Estos antecedentes y su rol en diversos nichos ecológicos, permitieron seleccionar cepas de *Pseudomonas* para ensayos de remediación de suelos contaminados con simazina.

### 3.2.3 Estabilidad de genes catabólicos *atz* en las cepas de *Pseudomonas*

La inestabilidad de genes de resistencia a antibióticos y genes catabólicos de bacterias en condiciones selectivas es conocida. En condiciones no selectivas, las bacterias pueden perder genes que no son necesarios para el metabolismo bacteriano. La propia naturaleza génica de los plásmidos, de estar flanqueados por secuencias génicas repetitivas, permite que estos genes se mantengan y se transfieran en condiciones restrictivas, pero en condiciones permisivas promueven su pérdida (Cases & De Lorenzo, 2005).

Durante los diferentes recuentos bacterianos realizados en los ensayos de microcosmos, fue posible observar y familiarizarse con la morfología colonial típica de las *Pseudomonas* en estudio. Esta observación facilitó los recuentos bacterianos en placas diferenciados por la formación de halos de degradación alrededor de las colonias. Sin embargo, durante los recuentos de cepas bacterianas viables en los microcosmos, se observaron colonias bacterianas de tamaño y características fenotípicas similares, pero que no formaron halos de degradación. Para estudiar este fenómeno se prepararon cultivos de *Pseudomonas* y se sembraron en placas de agar nutritivo conteniendo atrazina. Cada cultivo fue originado a partir de una colonia que había desarrollado halo. Luego de 4 días de incubación se observó el crecimiento de algunas colonias bacterianas carentes de halo. La morfología se observó mejor cuando las colonias se mantuvieron en incubación por 5 a 6 días (colonias de 3-4 mm de diámetro). En análisis de 12 colonias sin halo, para la detección de los genes catabólicos de degradación de simazina por PCR, indicó que *Pseudomonas nitroreducens* P41 pierde el gen *atzA* (Figura 9). Los resultados sugieren que existe una relación directa entre la pérdida del halo de degradación y la pérdida del gen inicial de ruta de degradación de simazina y demuestran la inestabilidad de este gen en *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21. Los genes *atzB*, *atzC* y *atzD* permanecieron estables. Los recuentos de colonias de bacterias sin formación de halo y colonias de bacterias con halo, y la detección de genes catabólicos *atz* en estas cepas indicó una frecuencia de pérdida del gen *atzA* de  $9,8 \times 10^2$  UFC/ml para *Pseudomonas nitroreducens* P41 y de  $7,6 \times 10^2$  UFC/ml para *Pseudomonas citronellosis* P21.

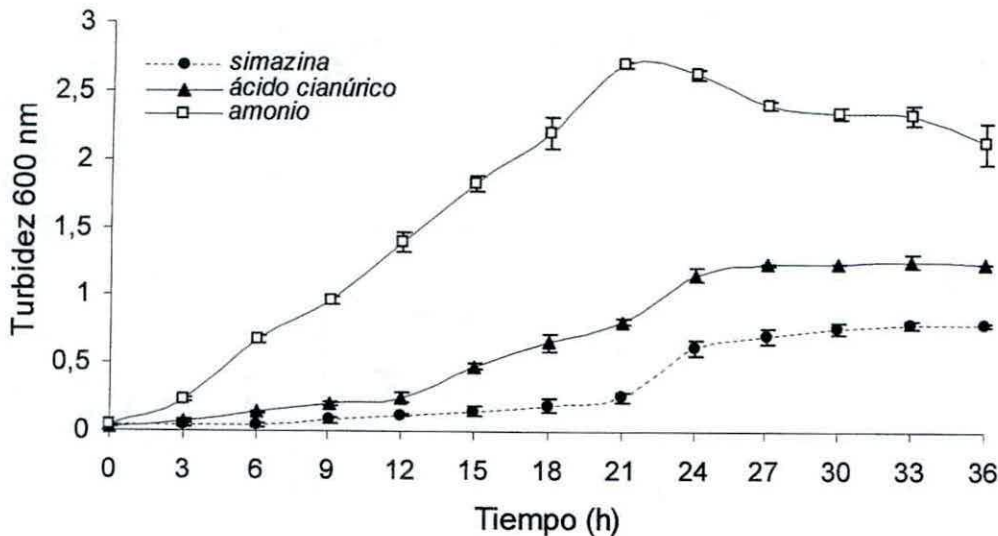


**Figura 9: Formación de halo de degradación por colonias y presencia de genes atz.** A: colonias de *Pseudomonas nitroreducens* P41 en medio mínimo con atrazina, provenientes de medio TSA. ↓, muestra una colonia formando halo de degradación. ↯ muestra una colonia que perdió la capacidad de formar halo. Los geles muestran los productos de PCR de los genes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* y *atzF* amplificados desde la colonia de *Pseudomonas nitroreducens* P41 formando halo (B) y sin halo de degradación (C). Las flechas en los geles indican el producto del gen *atzA* esperado. M: Marcador de peso molecular, C: control.

### 3.2.4 Curvas de crecimiento de las cepas de *Pseudomonas* seleccionadas

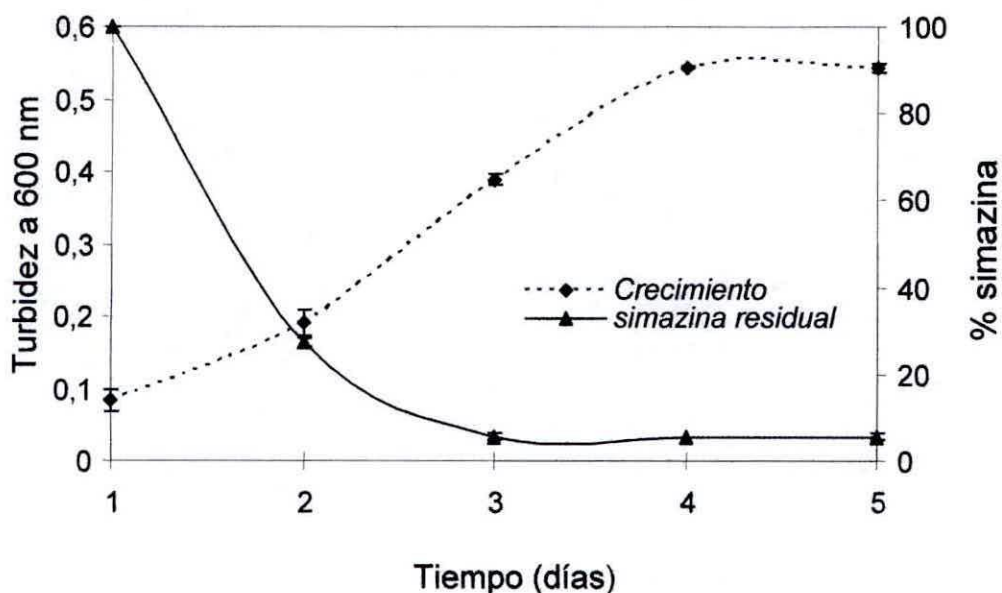
Para determinar las capacidades de estas bacterias para emplear simazina como fuente de carbono y/o nitrógeno, se realizaron diferentes ensayos de crecimiento en medio mínimo con *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21. Se evaluó el empleo de simazina, ácido cianúrico y amonio como fuentes de nitrógeno. Succinato se empleó como fuente de carbono. Amonio fue utilizado como fuente de nitrógeno preferencial. Se seleccionó simazina como herbicida y ácido cianúrico porque es un metabolito intermediario de la ruta de degradación de s-triazinas. En los ensayos de crecimiento en ácido cianúrico o simazina como fuentes de nitrógeno, *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 fueron capaces de crecer eficientemente

máximo de turbidez de 0,76 (600 nm) a las 30 horas. El crecimiento máximo alcanzado en simazina fue de un 37% respecto de aquella observada en amonio y un 67% respecto de la observada en ácido cianúrico. Empleando simazina, se observó que el comienzo de la fase estacionaria ocurrió a las 24 horas. Al emplear ácido cianúrico como única fuente de nitrógeno, *Pseudomonas nitroreducens* P41 mostró un comportamiento similar al observado en simazina, pero los valores de crecimiento fueron de un 36% mayor en fase estacionaria. Con ácido cianúrico se registró una turbidez máxima de 1,23 (Figura 10). Cuando se ensayó amonio como única fuente de nitrógeno, *Pseudomonas nitroreducens* P41 alcanzó una turbidez máxima de 2,69 (600 nm) a las 18 horas de incubación.



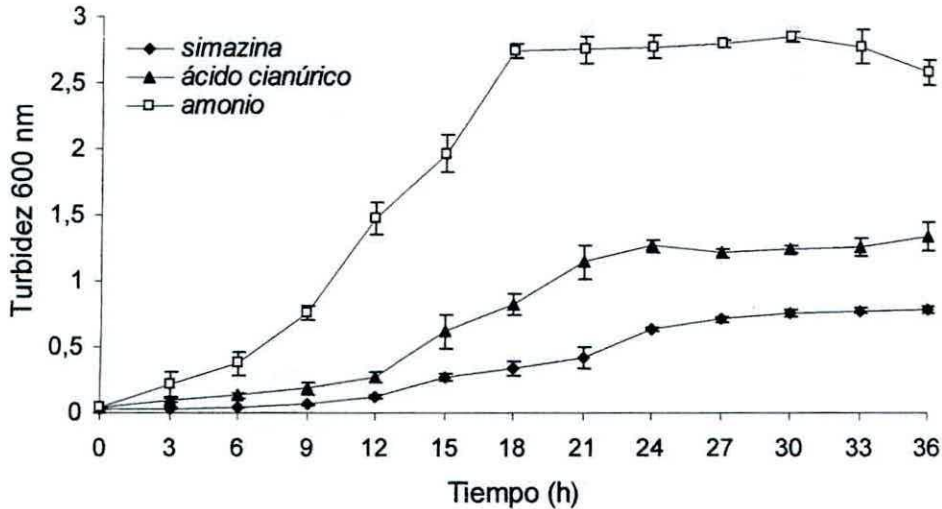
**Figura 10: Crecimiento de *Pseudomonas nitroreducens* P41 con diferentes fuentes de nitrógeno.** Se empleó simazina, ácido cianúrico y amonio como fuentes de nitrógeno y succinato como fuente de carbono. Los valores representan el promedio de ensayos en triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios.

Se estudió la degradación de simazina durante el crecimiento de *Pseudomonas nitroreducens* P41 en medio mínimo con simazina como única fuente de nitrógeno (Figura 12). A las 48 horas, la simazina fue removida en un 80% desde el medio de cultivo. Al tercer día de ensayo desapareció completamente. En esta condición el crecimiento de la cepa alcanzó una turbidez de 0,54 (600 nm) al final de la fase exponencial.



**Figura 11: Degradación de simazina durante el crecimiento de *Pseudomonas nitroreducens* P41 en medio mínimo.** Los valores representan el promedio de ensayos en triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios.

*Pseudomonas citronellosis* P21 mostró curvas de crecimiento similares. En simazina como única fuente de nitrógeno *Pseudomonas citronellosis* P21 muestra un crecimiento que alcanza una turbidez máxima de 0,79 a las 24 horas (600 nm). La turbidez alcanzada, creciendo en simazina, fue de un 40% menor a aquel alcanzado en los cultivos con amonio y un 28% de los crecimientos observados con ácido cianúrico. Cuando se empleó ácido cianúrico como única fuente de nitrógeno, *Pseudomonas citronellosis* P21 alcanzó una turbidez cercana a los 1,34 (600 nm). Este valor corresponde a la mitad del crecimiento alcanzado empleando amonio como fuente de nitrógeno. Al emplear este compuesto como fuente de nitrógeno, la turbidez máxima alcanzada fue de 1,34 (Figura 12). Ambas cepas de *Pseudomonas* mostraron una tasa de crecimiento máximo en medio mínimo cuando amonio es provisto como fuente de nitrógeno y succinato como fuente de carbono.



**Figura 12: Crecimiento de *Pseudomonas citronellosis* P21 con diferentes fuentes de nitrógeno.** Se empleó simazina, ácido cianúrico y amonio como fuentes de nitrógeno y succinato como fuente de carbono. Los valores representan el promedio de ensayos en triplicado. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios.

Al emplear simazina como fuente de carbono no se observó crecimiento en *Pseudomonas nitroreducens* P41 y en *Pseudomonas citronellosis* P21. Por consiguiente, ambas cepas no emplean el herbicida como fuente de carbono.

Ambas cepas de *Pseudomonas* crecieron hasta una mayor turbidez empleando como fuente de nitrógeno ácido cianúrico que simazina. Las cepas bacterianas mostraron un comportamiento similar en las 36 horas de análisis en las que alcanzan la transición entre la fase exponencial tardía y la fase estacionaria. *Pseudomonas nitroreducens* P41 muestra al inicio de la fase exponencial una menor velocidad de crecimiento que *Pseudomonas citronellosis* P21. No obstante, la turbidez máxima observada para ambas fue similar.

## 3.3

## Estudios de Regulación

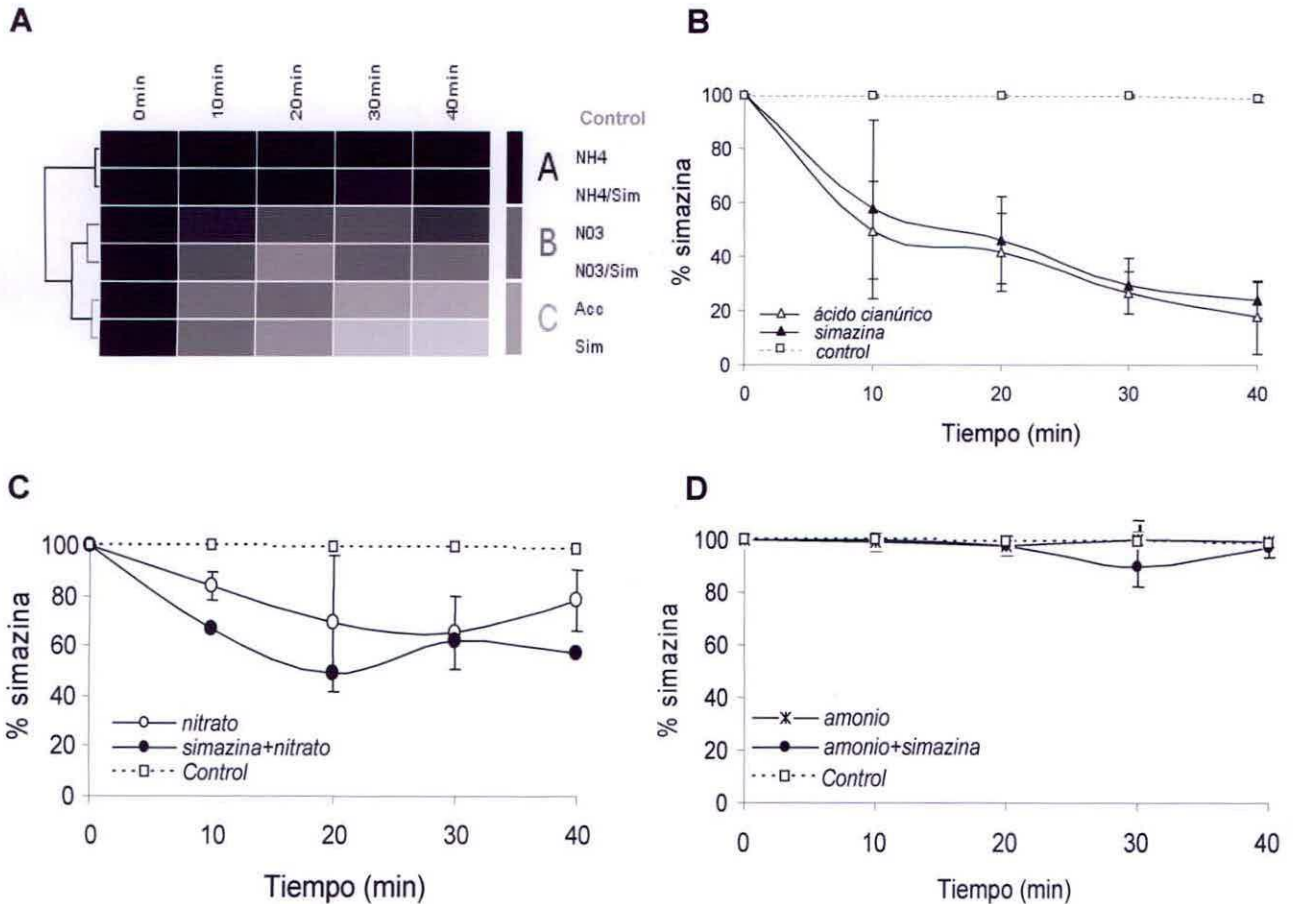
## 3.3.1 Ensayos de degradación de simazina con células en reposo

Estudios de regulación de la degradación de simazina por fuentes de nitrógeno es de enorme interés para proyectar su aplicación en procesos de biorremediación. Si las cepas bacterianas ven reprimida su capacidad de degradar simazina por la presencia de compuestos nitrogenados preferenciales como el amonio, se vería afectada la utilización de estos microorganismos en procesos de biorremediación que buscan la eliminación de los contaminantes.

Los ensayos se realizaron con *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21. Resultados preliminares indicaron que *Pseudomonas nitroreducens* P41 crecida en medio Luria–Bertani hasta fase exponencial temprana y tardía, no fue capaz de crecer empleando simazina como única fuente de nitrógeno.

Se evaluaron 6 condiciones en las que se emplearon 3 fuentes de nitrógeno que se encuentran disponibles en los suelos agrícolas: amonio, amonio y simazina, nitrato, nitrato y simazina, ácido cianúrico y simazina. Los resultados mostraron tres niveles de respuesta de degradación de simazina por la cepa *Pseudomonas nitroreducens* P41, los que fueron determinados por análisis de cluster jerárquico con distancia Euclidiana (Figura 13A). En los cultivos crecidos con simazina y ácido cianúrico como fuente de nitrógeno se registraron las mayores degradaciones del herbicida. Con simazina como fuente de nitrógeno, las células de la cepa P41 degradaron cerca de un 76% de simazina en 20 min, y un 40% de ésta fue degradada en 10 minutos. Similar comportamiento fue observado en ácido cianúrico. *Pseudomonas nitroreducens* P41 crecida en esta condición, degradó simazina en un 82% en 20 min, y un 50% se registró a los 10 min (Figura 13B). Ambas condiciones estimulan el metabolismo del herbicida por la cepa bacteriana.

Al emplear nitrato y nitrato/simazina como fuentes de nitrógeno en los crecimientos de *Pseudomonas nitroreducens* P41, los valores de degradación fueron intermedios entre los obtenidos en los crecimientos con amonio y con simazina y ácido cianúrico. La degradación observada en nitrato fue de un 29% menor que en ácido cianúrico. La degradación de los cultivos provenientes de los crecimientos en nitrato fue un 10% menor a los observados en nitrato/simazina al tiempo 10 y 40 min, sugiriendo que la simazina estimuló la degradación del herbicida (Figura 13C).



**Figura 13: Ensayos de degradación de simazina con células en reposo de *Pseudomonas nitroreducens* P41.** (A) Análisis estadístico multivariante de cluster jerárquico con distancia Euclidiana y enlace promedio. Negro indica 100% de degradación de simazina y blanco indica 0% de degradación de simazina. El análisis agrupó las cinéticas en tres bloques (A, B y C). Las gráficas muestran la degradación de simazina después del crecimiento de la cepa bacteriana en diferentes fuentes de nitrógeno: (B) ácido cianúrico y simazina, (C) nitrato, (D) amonio. Los valores representan los promedios de resultados de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios.

En los ensayos provenientes del crecimiento en amonio y amonio/simazina simultáneamente, no se observó degradación del herbicida por *Pseudomonas nitroreducens* P41 (Figura 13B).

Para esta bacteria, las fuentes de nitrógenos que le permitieron más rápido crecimiento y mejor biomasa (amonio) no favorecieron la degradación de simazina. Mientras

que aquellas fuentes de nitrógeno en que la bacteria obtuvo poco crecimiento (simazina y ácido cianúrico) la degradación de simazina se vio favorecida. Juntos estos resultados están indicando que los crecimientos de *Pseudomonas nitroreducens* P41 en medio mínimo conteniendo amonio, nitrato, LB y urea (no mostrado) fueron condiciones inhibitorias para el metabolismo de *Pseudomonas nitroreducens* P41, mientras que la simazina y el metabolito ácido cianúrico fueron condiciones inductoras de la degradación de s-triazinas.

Los ensayos de degradación de simazina, con células en reposo de *Pseudomonas citronellosis* P21, crecida bajo los diferentes regímenes de fuentes de nitrógeno, mostraron una respuesta a un sólo nivel (Figura 14A). En este microorganismo se observó degradación de simazina bajo las diferentes fuentes de nitrógeno.

Los cultivos de *Pseudomonas citronellosis* P21 crecidos con simazina y ácido cianúrico muestran una tendencia similar. En ambos casos se observó una degradación de simazina cercana al 20% a los 10 min, siendo la degradación un 12% más alta de células crecidas en ácido cianúrico que en simazina. Al final del ensayo, la degradación de simazina de células crecidas en ácido cianúrico fue un 5% más alta respecto a las células provenientes de los cultivos en simazina. Para ambos compuestos, los resultados mostraron una degradación de 42% en ácido cianúrico y 37% en simazina a los 40 min (Figura 14B).

Empleando nitrato y nitrato/simazina, los valores de degradación de simazina fueron de alrededor de un 60% en 30 min. La degradación del compuesto no mejoró al mezclar simazina con nitrato y en las curvas se observa un valor de degradación que se mantuvo hasta el final del ensayo (Figura 14C).

En los cultivos de *Pseudomonas citronellosis* P21, crecidos en amonio y amonio con simazina, se observa un 6% menor degradación del herbicida respecto a los otros tratamientos. La degradación registrada en amonio y/o simazina fue de un 54%. En esta cepa el amonio no inhibió la degradación de simazina, pero degradó un 10% menos simazina que *Pseudomonas nitroreducens* P41.

El análisis estadístico multivariante de cluster jerárquico para *Pseudomonas citronellosis* P21 mostró la formación de sólo un bloque de respuestas en el cluster, indicando que hubo degradación de simazina a un sólo nivel con las diferentes fuentes de nitrógeno. Estos resultados indican que en *Pseudomonas citronellosis* P21 no existen fuentes preferenciales de utilización de nitrógeno como ocurrió con *Pseudomonas nitroreducens* P41. Dado que el crecimiento en amonio y nitrato no afectan la capacidad de degradación de simazina en *Pseudomonas citronellosis* P21, esta cepa fue considerada un buen candidato para su empleo en ensayos de biorremediación.

### 3.3.2. Ensayos de Retrotranscripción

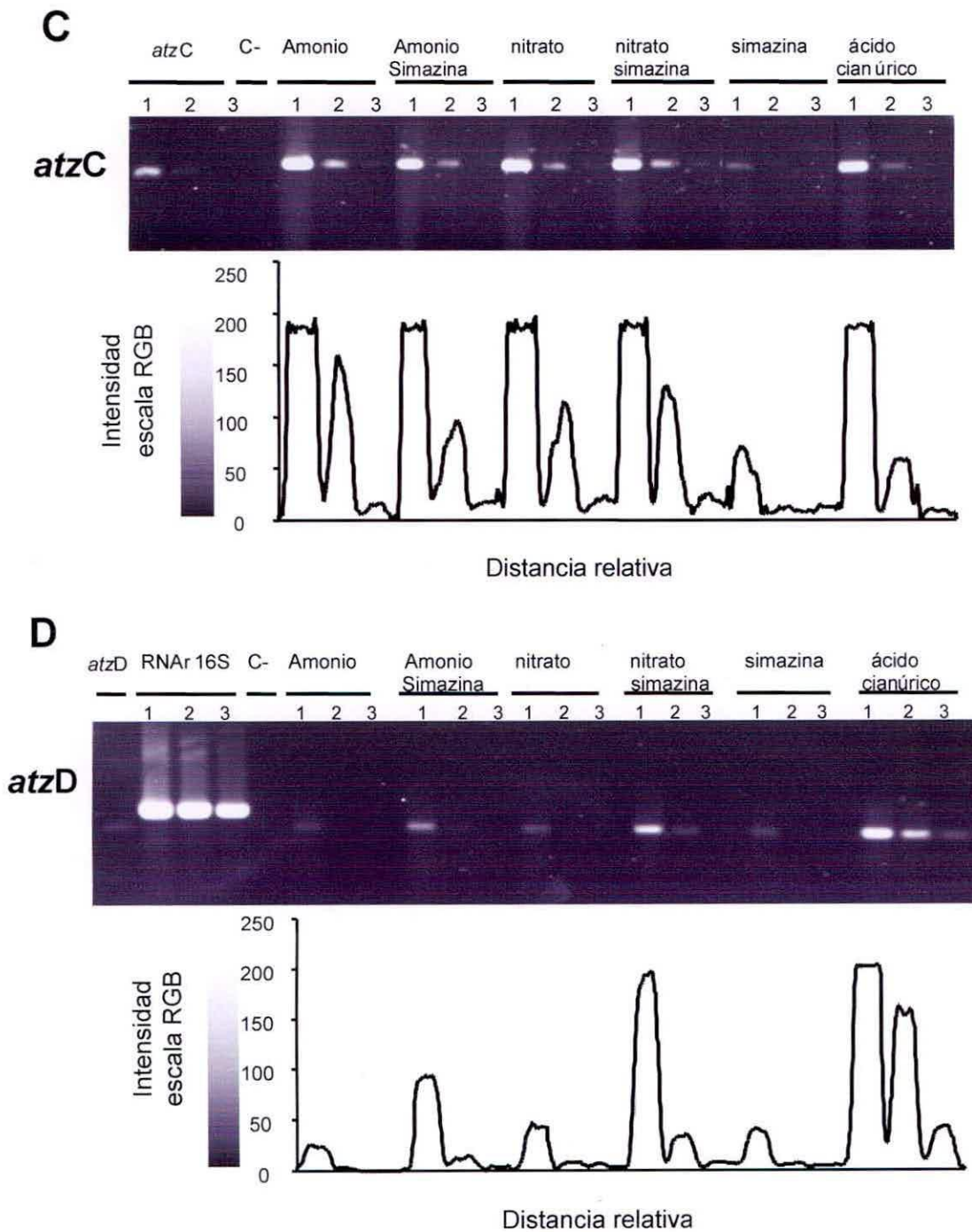
Para complementar los resultados fisiológicos de actividad metabólica observados en los ensayos con células en reposo, se realizaron ensayos de expresión de genes en *Pseudomonas nitroreducens* P41. El microorganismo fue crecido en diferentes fuentes de nitrógeno: amonio, amonio/simazina; nitrato, nitrato/simazina, ácido cianúrico y simazina.

En la Figura 15 se muestra la expresión de los genes *atzA*, *atzB*, *atzC* y *atzD* durante el crecimiento en diferentes fuentes de nitrógeno. La expresión de los genes *atzA*, *atzB*, *atzC* es similar en las diferentes fuentes de nitrógeno. El análisis comparativo de las señales de expresión obtenidas con las diferentes fuentes de nitrógeno indica que los genes de la ruta superior de degradación de simazina se expresan constitutivamente (ver histogramas de frecuencia para cada gel. Figuras 15, A, B y C).

A diferencia de los resultados observados para los genes *atzA*, *atzB* y *atzC*, se observó una expresión diferencial para el gen *atzD* con los cultivos crecidos en diferentes fuentes de nitrógeno (Figuras 15D).

La expresión del gen *atzD* en *Pseudomonas nitroreducens* P41 crecida en amonio fue mínima. Esta expresión aumentó levemente al cultivar la cepa empleando amonio junto a simazina como fuentes de nitrógeno. Se observó una mayor expresión de transcritos al emplear nitrato como fuente de nitrógeno. Al emplear nitrato más simazina durante el crecimiento, la expresión fue mayor que al emplear sólo nitrato como fuente de nitrógeno. *Pseudomonas nitroreducens* P41 expresó el gen *atzD* en mayor cantidad cuando la cepa bacteriana fue crecida en simazina y ácido cianúrico como únicas fuentes de nitrógeno.

Estos resultados indican que en *Pseudomonas nitroreducens* P41 la ruta inferior de degradación de simazina en *Pseudomonas nitroreducens* P41 está regulada a nivel del gen *atzD*. Esta expresión es inducida en presencia de los metabolitos ácido cianúrico y simazina. Mientras que los genes de la ruta superior de la degradación de simazina son expresados en forma constitutiva.



**Figura 15: Expresión de genes *atz* en *Pseudomonas nitroreducens* P41 crecida en diferentes fuentes de nitrógeno.** La cepa fue crecida en diferentes fuentes de nitrógeno. El RNA fue extraído en fase exponencial media. Para un análisis semi cuantitativo se emplearon 20 ciclos de PCR. 50 ng de DNA de *Pseudomonas* sp. ADP se empleó como control positivo de la PCR. RNAr 16S: 500 ng empleado como control positivo de la RT-PCR. C-: (agua) control negativo. 1, 2 y 3: dilución 1,1/10,1/100. Los histogramas indican la densidad relativa de la señal observada en los geles de agarosa. Para simazina se cargó un 25% de RNA respecto a los otros tratamientos.

### 3.3.3. Expresión de genes *atz* en genes reporteros

Para estudiar la regulación por fuente de nitrógeno del gen *atzD* en *Pseudomonas nitroreducens* P41 se llevaron a cabo ensayos con vectores transcripcionales ensayados en *Pseudomonas* sp. cepa ADP (García-González *et al.*, 2005). El plásmido contiene río arriba del gen *atzD* un marco de lectura abierto (*atzR*) que codifica un regulador del tipo LysR, que regula la expresión del gen *atzD*. Dada la homología existente entre las rutas metabólicas de *Pseudomonas* sp. ADP y *Pseudomonas nitroreducens* P41 se estudió si la cepa P41 presenta el gen regulador *atzR*.

Para cumplir con este objetivo se evaluó si *Pseudomonas nitroreducens* P41 puede ser empleada en ensayos transcripcionales. Se determinó el perfil de resistencia a antibióticos y se realizaron ensayos de conjugación. *Pseudomonas nitroreducens* P41 posee resistencia a los antibióticos cloranfenicol y ampicilina, y muestra sensibilidad a los antibióticos rifampicina (Rf), kanamicina (Km), carbenicilina (Cb), tetraciclina (Tc) y estreptomina (Sm).

Para determinar la frecuencia de conjugación de *Pseudomonas nitroreducens* P41, se utilizaron plásmidos de distintos grupos de incompatibilidad: IncP, IncQ y Crípticos. Los vectores fueron incorporados en la bacteria mediante conjugación triparental. La frecuencia de conjugación se muestra en la Tabla 7. *Pseudomonas nitroreducens* P41 mostró ser apta para estudios genéticos. La bacteria aceptó con alta frecuencia plásmidos de las diferentes series de incompatibilidad mostrando preferencia por los del tipo IncQ y por los del IncP de bajo peso molecular. En este grupo, se observó una frecuencia de conjugación diferente para vectores de distinto tamaño. Con el vector pJB3Km1 (Blatny *et al.*, 1997) de bajo peso molecular (6,1 Kb), la frecuencia de conjugación fue de  $8,3 \times 10^{-1}$ , que es similar a la frecuencia más alta registrada con el vector pKT230. Con el vector de mayor peso molecular, pLAFR3 (22 Kb; Staskawics *et al.*, 1987) la frecuencia de conjugación fue de  $3,52 \times 10^{-11}$ , la más baja frecuencia de conjugación observada en *Pseudomonas nitroreducens* P41. La frecuencia de conjugación observada con el vector críptico pBBR1MCS fue intermedia a los otros grupos. Estos resultados indican que esta cepa es susceptible a la conjugación con vectores de bajo peso molecular. Por consiguiente, esta cepa se puede modificar genéticamente y puede ser empleada en estudios genéticos. Las conjugaciones realizadas, indican también que el empleo de el vector pK2013, "ayudante de conjugación" (Bagdasarian *et al.*, 1981) es apropiado para la transformación natural de *Pseudomonas nitroreducens* P41 mediante la técnica de conjugación triparental.

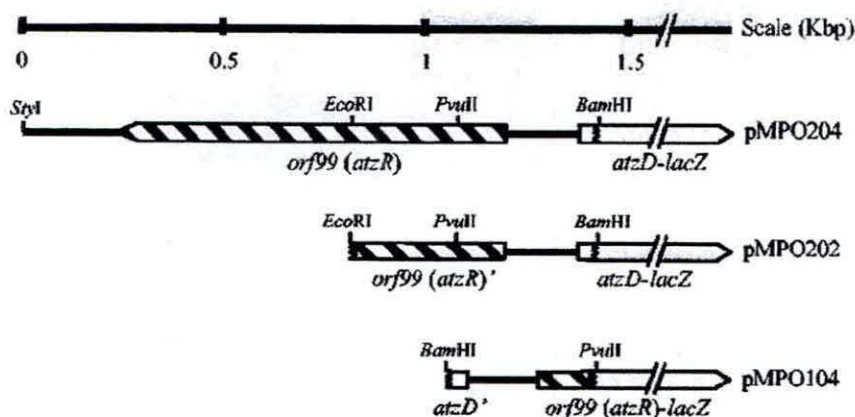
Tabla 7: Frecuencia de conjugación de *Pseudomonas nitroreducens* P41 con plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad.

| Donador/<br>plásmido | Tamaño<br>(kb) | Grupo de<br>Incompatibilidad | Selección | Frecuencia de<br>Conjugación |
|----------------------|----------------|------------------------------|-----------|------------------------------|
| pJB3Km1              | 6,1            | IncP                         | Cb, Amp   | $8,3 \times 10^{-1}$         |
| pLAFR3               | 22,0           | IncP                         | Tc        | $<3,5 \times 10^{-11}$       |
| pKT230               | 11,9           | IncQ                         | Sm, Km    | $5,1 \times 10^{-1}$         |
| pKT210               | 11,8           | IncQ                         | Cm, Sm    | $9,1 \times 10^{-2}$         |
| pBBR1MCS-2           | 5,1            | Críptico                     | Km        | $1,4 \times 10^{-6}$         |

### 3.3.4 Ensayos transcripcionales en *Pseudomonas nitroreducens* P41 de genes *atz* de *Pseudomonas* sp. ADP

Se realizaron en *Pseudomonas nitroreducens* P41 ensayos de actividad  $\beta$ -galactosidasa con fusiones transcripcionales pMPO104, pMPO202 y pMPO204 (Figura 16) (García-González *et al.*, 2005). Con estos vectores se investigó separadamente la actividad del regulador *atzR* y del gen *atzD* de la ruta de degradación de atrazina en *Pseudomonas nitroreducens* P41, en respuesta a las fuentes de nitrógeno disponibles. Dado que estos vectores codifican resistencia para ampicilina, y el género *Pseudomonas* es resistente a este antibiótico, se empleó carbenicilina en su reemplazo. Las fuentes de nitrógeno empleadas fueron amonio, amonio/simazina, nitrato, nitrato/simazina, ácido cianúrico y simazina. Se ensayó también la mezcla simazina/ácido cianúrico.

La frecuencia de conjugación observada en *Pseudomonas nitroreducens* P41, para cada uno de estos vectores, se resume en la Tabla 8. *Pseudomonas nitroreducens* P41 mostró una frecuencia de conjugación de  $10^{-6}$  con los tres vectores. Estos valores confirman los valores de conjugación obtenidos con el vector del grupo críptico. Los vectores pMPO104, pMPO202 y pMPO204 derivan del plásmido pBBR1MCS-2 (García-González, Comunicación personal).



**Figura 16. Fusiones *atz-lac Z* conteniendo las secuencias de genes *atzR* y *atzD* de *Pseudomonas* sp. ADP ensayadas en *Pseudomonas nitroreducens* P41. pMPO104: la fuente de N induce el gen *atzR* (*lac*) y el gen *atzD* está truncado, pMPO202: la fuente de N induce la expresión del gen *atzD* (*lac*) y el gen *atzR* está truncado, pMPO204: la fuente de N induce la expresión del gen *atzR*, y éste induciría la expresión gen *atzD* fusionado al gen *lac*.**

Los crecimientos de la bacteria, conteniendo cada uno de los vectores, en medios de cultivo mínimo alcanzaron la fase estacionaria en 48 horas. Cultivos de la bacteria sin vector alcanzaron la fase estacionaria en 36 h antes. Los cultivos crecidos con el antibiótico se desarrollaron formando agregados en el caldo de cultivo.

**Tabla 8: Valores de conjugación en *Pseudomonas nitroreducens* P41 con los vectores *atzD-lac Z* y *atzR-lac Z*.**

| Plásmido | Tamaño (Kb) | Selección | Frecuencia Conjugación |
|----------|-------------|-----------|------------------------|
| pMPO104  | 8,21        | Amp       | $1,33 \times 10^{-6}$  |
| pMPO202  | 8,43        | Amp       | $2,03 \times 10^{-6}$  |
| pMPO204  | 9,25        | Amp       | $1,20 \times 10^{-6}$  |

La actividad  $\beta$ -galactosidasa de estos ensayos mostraron una gran variabilidad. No obstante, la tendencia mostrada por los resultados indica similares observaciones obtenidas en los ensayos con células en reposo (Figura 10) y de expresión de transcritos (Figura 15). Al emplear amonio como fuente de nitrógeno no se estimula la degradación de simazina ni se induce la expresión del gen *atzD* en ninguno de los vectores. Con el vector pMPO104 se observó inducción de la actividad  $\beta$ -galactosidasa en condiciones de nitrógeno limitante (serina) y en nitrato/simazina. Con el vector pMPO202 la actividad  $\beta$ -galactosidasa mostró gran variabilidad entre sí. La tendencia observada indicó una inducción moderada de la actividad  $\beta$ -galactosidasa al crecer la bacteria con serina o nitrato como fuentes de nitrógeno. La actividad  $\beta$ -galactosidasa derivada de las células crecidas en ácido cianúrico fueron un 60% más alto que empleando nitrato como fuente de nitrógeno (datos no mostrados).

### 3.3.5 Regulación del gen *atzD* nativo

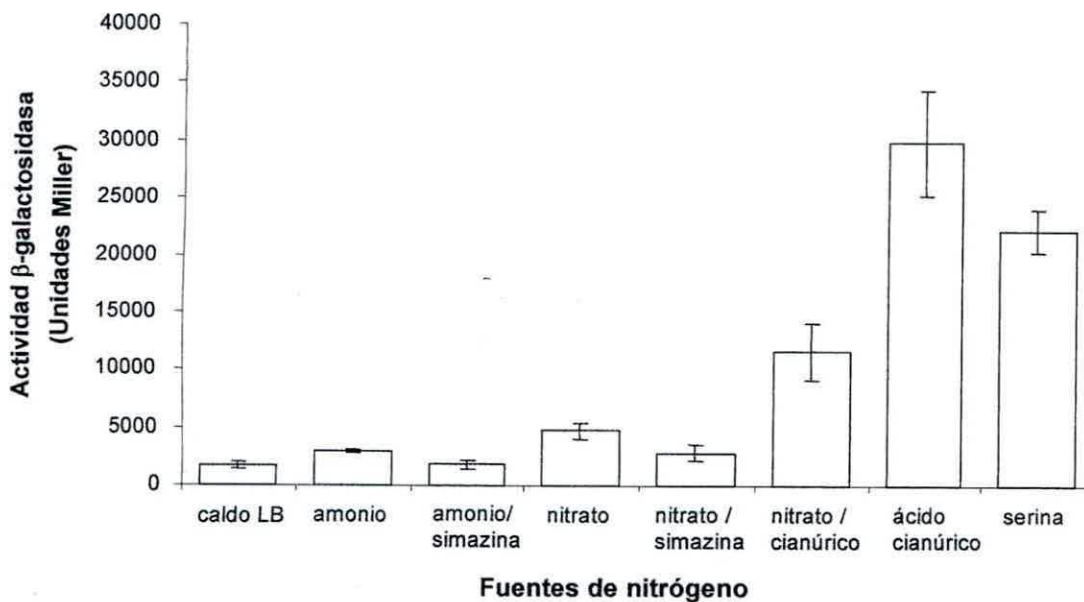
En vista de que no fue posible obtener resultados reproducibles con los vectores pMPO104, pMPO202 y pMPO204, y a la necesidad de despejar variables tanto por la posible interferencia debido al mal crecimiento de la *Pseudomonas nitroreducens* P41, provocados posiblemente por incompatibilidad plasmidial de los vectores, o por el empleo de carbenicilina como presión selectiva, se creó un vector de fusión con una resistencia diferente. El nuevo vector se creó clonando la región del gen *atzD* de *Pseudomonas nitroreducens* P41. Se obtuvo el plásmido pHRP309P41D-R que contiene el gen *atzR* truncado, toda la región intergénica y hasta la posición +152 del gen *atzD* fusionado al gen reportero lac. La actividad  $\beta$ -galactosidasa sería la resultante de la inducción del gen *atzD* por la inducción de un *atzR* nativo de la cepa bacteriana.

La expresión de la fusión con el fragmento silvestre de *atzD* (pHRP309P41D-R) mostró un patrón similar al que se observa con los ensayos de células en reposo. Los resultados pueden ser separados en tres niveles de respuesta: Al crecer la bacteria en una condición de fuente rica en nitrógeno se observó una baja inducción de la expresión (Figura 17). La adición de simazina al medio de cultivo (condición amonio/simazina) no mejoró significativamente la actividad  $\beta$ -galactosidasa. La expresión se estimuló al emplear nitrato como fuente de nitrógeno y se observó un segundo nivel de respuestas. La actividad  $\beta$ -galactosidasa en esta condición aumentó un 60% respecto a la actividad registrada en amonio. Cuando *Pseudomonas nitroreducens* P41 fue crecida con ácido cianúrico

co como única fuente de nitrógeno, se observó una expresión 300% mayor que nitrato y 750% mayor que en amonio. En condiciones de simulación de limitación de nitrógeno (serina) la actividad  $\beta$ -galactosidasa subió 470%. El análisis de las condiciones ensayadas con las diferentes fuentes de nitrógeno indica que la mayor actividad  $\beta$ -galactosidasa proviene de los cultivos crecidos con serina y ácido cianúrico como fuentes de nitrógeno.

La expresión de la fusión transcripcional sin inserto (pHRP309) fue constitutivo e inferior a 800 unidades Miller en todas las condiciones (datos no graficados).

Estos resultados confirman que la regulación del gen *atzD* ocurre a nivel transcripcional, deducido por los altos niveles de actividad  $\beta$ -galactosidasa cuando los clones de *Pseudomonas nitroreducens* P41 fueron crecidos con serina y ácido cianúrico. En conclusión, el patrón de expresión de genes obtenido en estos ensayos de inducción indican que el gen *atzD*, responsable de degradar ácido cianúrico, responde a dos señales: inducción por limitación de nitrógeno aún en ausencia de ácido cianúrico (como se observa en serina), y una inducción por ácido cianúrico aún en presencia de fuentes preferenciales de nitrógeno, como se observó al cultivar a *Pseudomonas nitroreducens* P41 en medio con amonio y ácido cianúrico. La expresión del gen *atzD* es máxima cuando el ácido cianúrico es la única fuente de nitrógeno.



**Figura 17: Actividad  $\beta$ -galactosidasa del vector *atzD-lac Z* en *Pseudomonas nitroreducens* P41.** La actividad  $\beta$ -galactosidasa fue registrada en *Pseudomonas nitroreducens* P41 conteniendo el vector pHRP309P41D-R al ser crecida en medio mínimo con las fuentes de nitrógeno indicadas. Los valores representan los promedios de resultados de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios. ( $P < 0,01$ ; ANOVA).

### 3.3.6 Secuenciación de la región *atzDR* de *Pseudomonas nitroreducens* P41

Los resultados recientemente descritos indican que existe una alta homología funcional entre la ruta de degradación de simazina por *Pseudomonas nitroreducens* P41 y la ruta de degradación de atrazina por *Pseudomonas* sp. ADP. Se analizó si esta homología es también a nivel de secuencias de genes. Se amplificó la zona intergénica *atzD-atzR* en *Pseudomonas nitroreducens* P41. El fragmento fue obtenido empleando la técnica de PCR en gradiente con oligonucleótidos *atzD1* y *atzD2* descritos para *Pseudomonas* sp. ADP (García-González *et al.*, 2005). Las secuencias fueron analizadas con la base de datos de National Center Biotechnology Information (NCBI) empleando el programa Blast. La Figura 18 muestra la secuenciación de 600 pb desde cada extremo de la región intergénica *atzD-atzR* de 1,5 Kb.

La secuencia de las regiones *atzD* y *atzR* de la cepa P41 mostró una homología del 99% y 100% con secuencias de *Pseudomonas* sp. ADP. La secuencia parcial del gen *atzD* mostró, en segunda instancia, una homología del 96% con el gen *atzD* de *Arthrobacter* sp. MCMB-436. Por el tamaño de la secuencia en análisis, la diferencia de 4% corresponde a sólo 2 nucleótidos. En *Pseudomonas nitroreducens* P41 se identificó una región palíndrome para el reconocimiento y unión del regulador *atzR* (Tabla 9).

La Tabla 10 resume los resultados del alineamiento de las secuencias parciales *atzD* y *atzR* con secuencias descritas.

Tabla 9: Alineamientos de secuencias *atzD* y *atzR* de *Pseudomonas nitroreducens* P41 con la base de datos genbank.

| Consulta            | Acceso Genbank | Descripción   | Valor E    | Identidad % |
|---------------------|----------------|---|------------|-------------|
| Extremo <i>atzD</i> | U66917         | plásmido catabólico pADP-1 de <i>Pseudomonas</i> sp. ADP para la degradación de atrazina. Secuencia completa. | 0.0        | 99          |
|                     | AY594331       | <i>atzD</i> de <i>Arthrobacter</i> sp. MCMB-436. Gen completo.  | $2e^{-15}$ | 96          |
| Extremo <i>atzR</i> | U66917         | plásmido catabólico pADP-1 de <i>Pseudomonas</i> sp. ADP para la degradación de atrazina. Secuencia completa. | 0.0        | 100         |

**atzD**

GCTGGTACCGGGCCCCCCTCGAGGTCGACGGTATCGATAAGCTTGATCGATGGATCCCAGGGCTGTG  
 GCAAGGGATTTCGAAAACGTCGATGTGATACATGATCTGGCAATTCTCAAAAAGGTTAATAGGACGGATG  
 GCTGTTCCCTGTACATGCACCGAGCGACGTCACTACACGGCCTGGCGCAACTGCGCCCAGGCAGAACAT  
 TTCGTTCAAGCTTAACGCCGCCCTGCGCACTTGACTGCCGCCTTTTTCCGACCTAACTGGTGCCGATCGG  
**GCACCGATCTTGCTTTGACTCGCATGCGGGCACAGCGGCCGTCAGCGATACAGGCCATCTCTATTCCAT**  
 CCTTTTTACTTCGACCACCTATGCAACATTTACGCTTTCTTCATTACATCGATGCCGTGGCTCGCTGCGGC  
 TCCATTCGGGCGGCCGAGAACAGCTGCACGTGCGCCGATCAGCGGTAATCGCCGCGTCCAGGATCT  
 GGAATACGAGTTAGGTACGCCGATTTTCGAGCGTCTGCCGCGTGGTGTACGCTGACTGCGGCAGGCCA  
 ACTGTTTCGTTGCCTACGCTCGTCGCCCGCAATGCCGATCTGGAACAAGTCCAGT

En negritas y subrayado se indica la secuencia consenso de unión de factores (N de acuerdo a Schell, 1993, para promotores de tipo LTTR (familia LysR)

**atzR**

TGGAGCTCCACCGCGGTGGCGGCCGCTCTAGAACTAGTGGATCCCCGGGCTGCAGGAATTCGATGAG  
 CAGGGTGAGACAGGCGGTGCGGACGGTCTGTTGGACTTCATGCGGGTTCCTTGGCTTATCGTTATGAA  
 AGGCACTGCGTTGAGATTGACGCCAAGGCGGGGCGATCGGATGCAATCTTTAAATGCCTTGTTAGCA  
 AAGAGCGGGCCAGCCTCAACAAAGCCGATAAGCGAAGCAATAGAACCTGTTGACCGAACACATAAAAAAG  
 GTTTTTGAATCACACCGGTGCCGAAACGGCACCGGATCTCAAAATGGTGCAGGGAAATGCCACACGCAC  
 CTTACTGGTGATGTCACGTTGCATTGTGGGTGATCAGCGAGCTTGCCGGCGACGAATTCGCAAATGC  
 CGCCGATGCCACAGGCAGCACCCCTCTCACGCAATGCGACCAGTACGACGCGTCCGGAAGCCAGGCTGC  
 GCTCGTCGATTGGAATTGCAACCTCACCTCCGTGGAACCAGCACCGATCTCGATCTGAAAGCTCACCCC  
 ACCGGTTTCGCGGGCAAACCGCGCATATTTCTAGGAATTCGAGACCAGTTGAGGCCGCGGTGCGAGC  
 TGATGATTTGTGAATAACTCGTCCAACACGTTGCGCCCGG

**Figura 18: Secuencia parcial de la región génica atzD y atzR en *Pseudomonas nitroreducens* P41.** Secuencias de 600 pb obtenidas desde cada extremo del fragmento de 1,5 Kb amplificado (A) Desde la región correspondiente al gen catabólico atzD. (B) Desde la región correspondiente al gen regulador atzR.

### 3.4 Ensayos de degradación en microcosmos

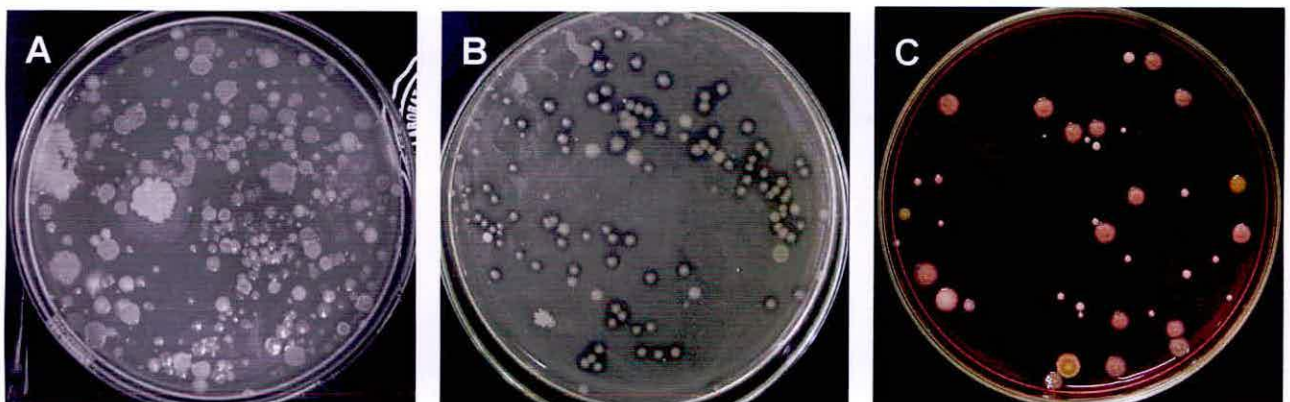
#### 3.4.1 Biorremediación

En esta parte de este estudio se evaluó la capacidad de *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 para remover la simazina desde suelos agrícolas. Para estudiar si estas cepas bacterianas mantienen sus cualidades degradativas en suelo se realizaron ensayos de degradación de simazina en microcosmos con suelos agrícolas tratados con el herbicida.

Es importante considerar que las cepas de *Pseudomonas* estudiadas fueron aisladas desde los mismos suelos agrícolas de este ensayo y que la presencia del género *Pseudomonas* en ambientes naturales es común, de modo que es posible argumentar que esta cepa bacteriana es parte de la microbiota nativa.

El análisis de los resultados previos indica que para aplicar la bacteria en procesos de biorremediación de suelos contaminados con el herbicida simazina, se requiere crecer *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 con una fuente de nitrógeno que induce los genes *atz*. Las cepas se cultivaron en medio de cultivo mínimo empleando ácido cianúrico como única fuente de nitrógeno. Esta fue la condición en la cual se observó la más rápida degradación de simazina, y con la que se alcanzó la mayor inducción de la expresión de los genes degradadores.

Cuando se realizan ensayos en condiciones ambientales, es adecuado utilizar un método para detectar la cepa que se desea evaluar. Considerando que se disponía de suelos agrícolas sin historial de aplicación de simazina, se empleó el halo de degradación como diferenciador de cepas degradadoras de cepas no degradadoras. Inicialmente, se comprobó en las cepas bacterianas heterótrofas sembradas en medio sólido, la incapacidad de formar halo de degradación (Figura 19A). La formación de halos de degradación permitió realizar los recuentos puesto que fue posible diferenciar colonias metabolitamente activas para degradar simazina (Figura 19B), de aquellas no activas, de una manera simple. Alternativamente, para ambas cepas de *Pseudomonas*, se seleccionaron mutantes de resistencia espontánea a rifampicina (figura 19C), las que se aplicaron a microcosmos para evaluar la capacidad de las cepas de *Pseudomonas* para degradar simazina.



**Figura 19. Recuento de cepas bacterianas heterótrofas y degradadoras de simazina.** Siembra en placa de una muestra sin historial de aplicación de simazina proveniente de los suelos agrícolas empleados en los ensayos en microcosmos. Un inóculo fue sembrado en medio mínimo con atrazina como única fuente de nitrógeno antes (A) y luego de la adición de *Pseudomonas nitroreducens* P41 (B). (C) Siembra de *Pseudomonas nitroreducens* P41 rifampicina resistente (*rif<sup>r</sup>*).

Las evaluaciones de los recuentos se realizaron a las 72 horas de incubación de las placas. A tiempos más largos los halos de degradación se hacen mayores y tienden a envolver colonias formadas por microorganismos no degradadores. La Figura 20 ilustra crecimientos de las cepas *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 en diferentes días. Para cada bacteria, fue posible discriminar claramente su presencia durante todo el ensayo.

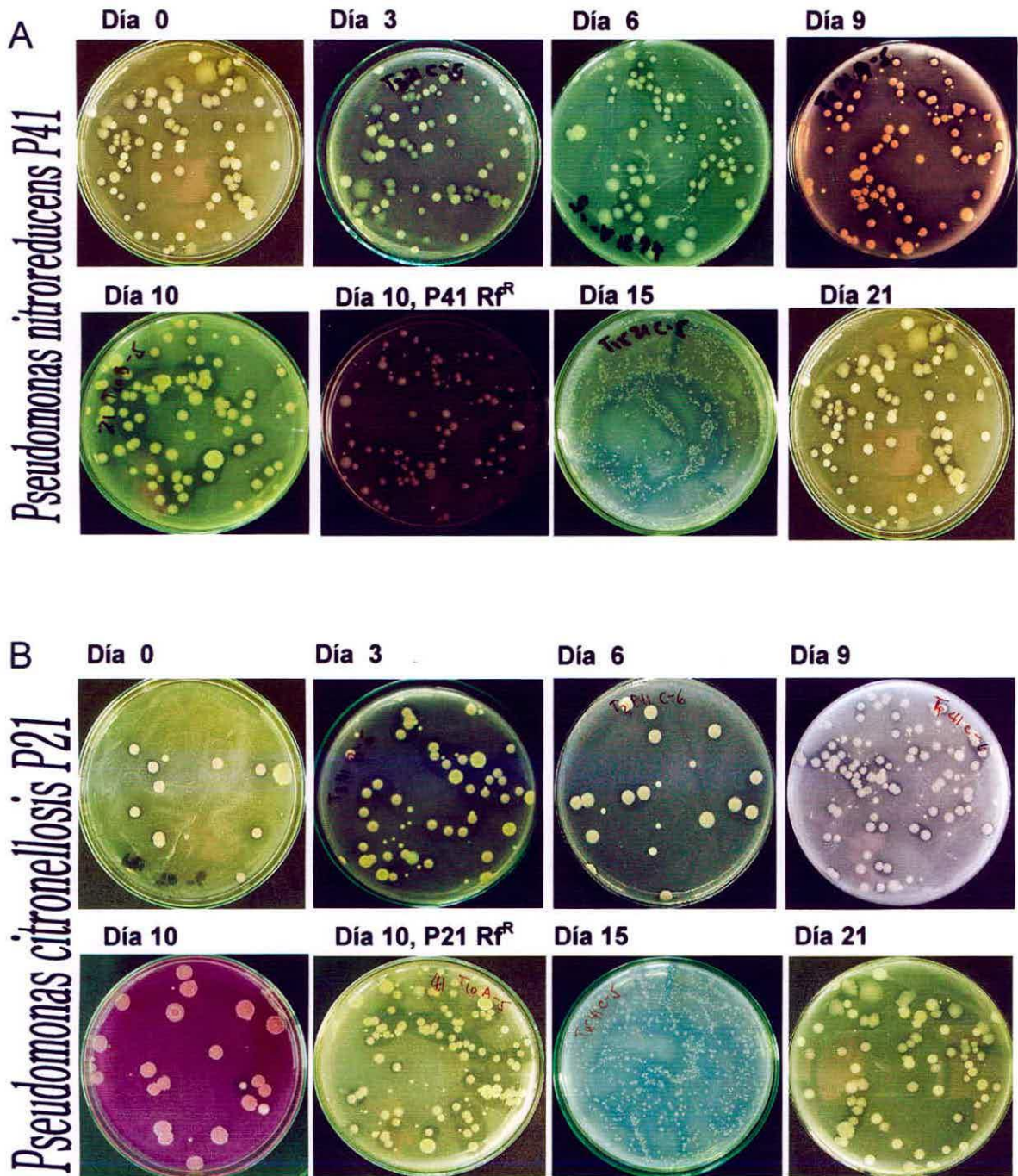
En la Figura 21 se observa que el número de heterótrofos no cambió significativamente cuando los microcosmos fueron tratados con simazina ( $p > 0,05$ ; t-test para muestras pareadas). Se observó una leve variación desde  $5,3 \times 10^7$  UFC/g hasta  $2,7 \times 10^7$  UFC/g durante los 21 días de experimento.

Al inocular *Pseudomonas nitroreducens* P41 en el suelo, se observó un decaimiento en el recuento de alrededor de dos órdenes de magnitud durante los tres primeros días. Luego se observó un incremento paulatino de *Pseudomonas nitroreducens* P41 en un orden de magnitud desde el día 3 hasta el día 13 (Figura 21A). El día 21 la viabilidad de este microorganismo decayó nuevamente en más de un orden de magnitud.

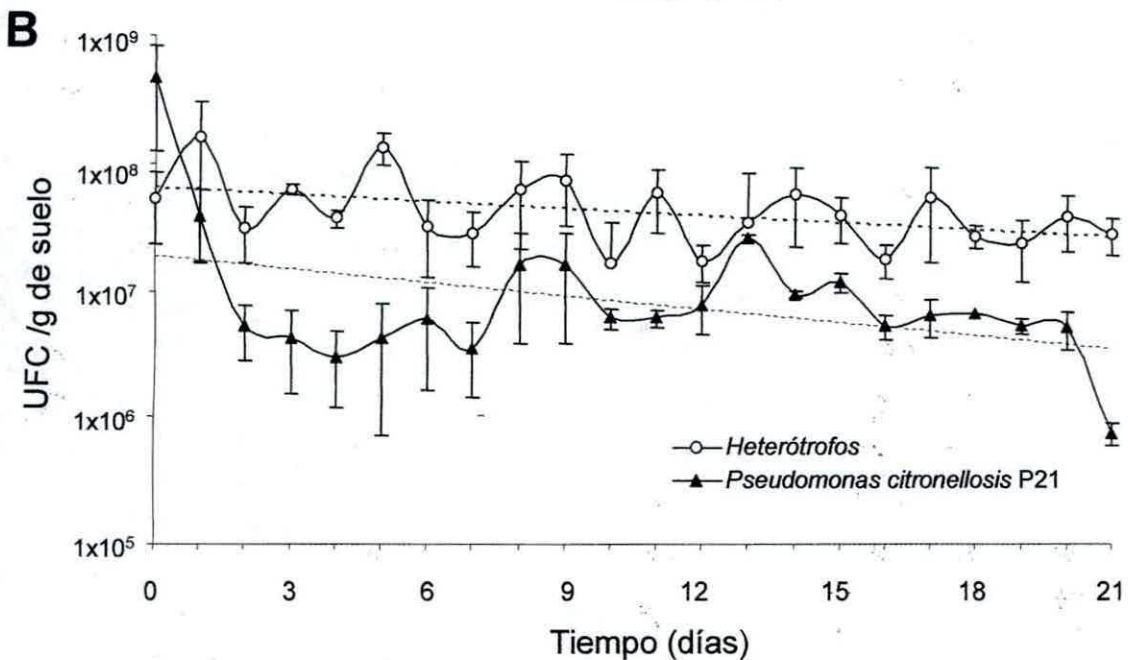
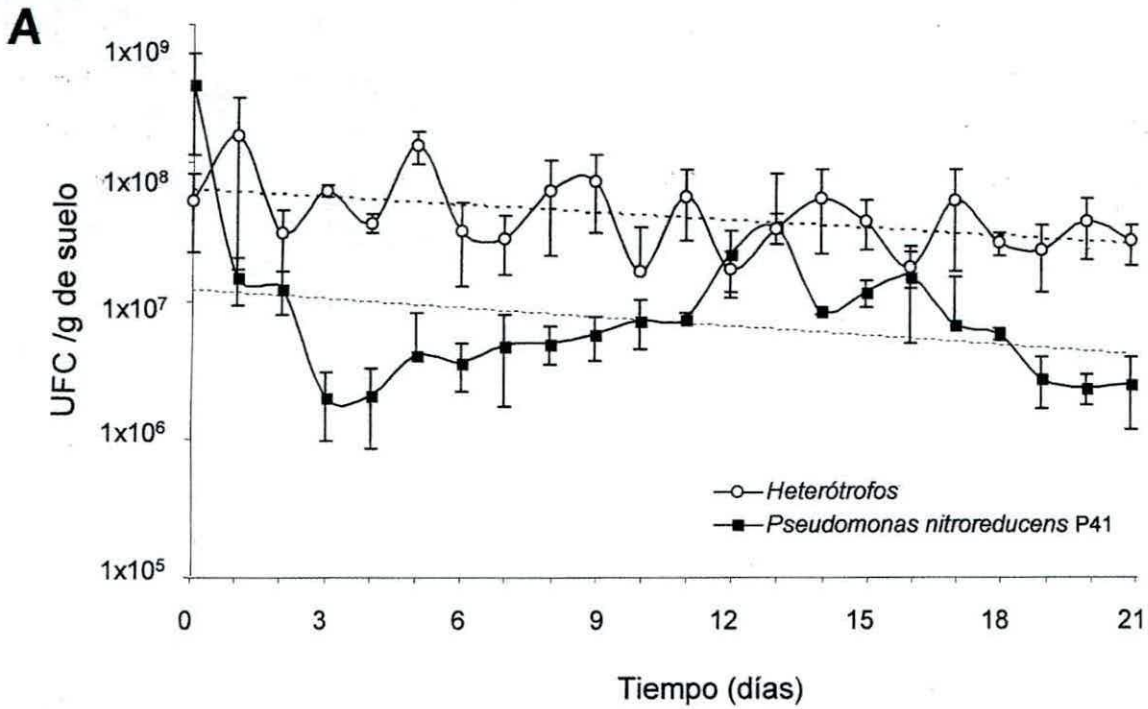
En los microcosmos realizados con *Pseudomonas citronellosis* P21, se observa un decaimiento inicial en el recuento de esta cepas desde  $10^8$  UFC/g hasta  $6,2 \times 10^6$  UFC/g aproximadamente (Figura 21B). Desde el día 4 hasta el día 7, se observó un aumento leve, que varió desde  $1,6 \times 10^6$  UFC/g hasta  $2,3 \times 10^7$  UFC/g. En los tiempos finales, se observó un fuerte decaimiento de la viabilidad bacteriana en suelo hasta el día 21. Al comparar las viabilidades en ambas cepas bacterianas, no se observaron diferencias significativas entre los recuentos de viabilidad ( $p > 0,05$ ; t-test para muestras pareadas).

La remoción de simazina desde los microcosmos se ilustra en la Figura 22. En suelos inoculados con las cepas se registró una remoción de simazina de más de un 60% después del primer día. Para *Pseudomonas nitroreducens* P41 se observó un 95% de degradación de simazina en los microcosmos al día 2 de ensayo (Figura 22A). Con este microorganismo no se detectó simazina al cuarto día ( $p < 0,05$ ; t-test), cuando la viabilidad tenía un recuento de  $2,0 \times 10^7$  UFC/g de suelo.

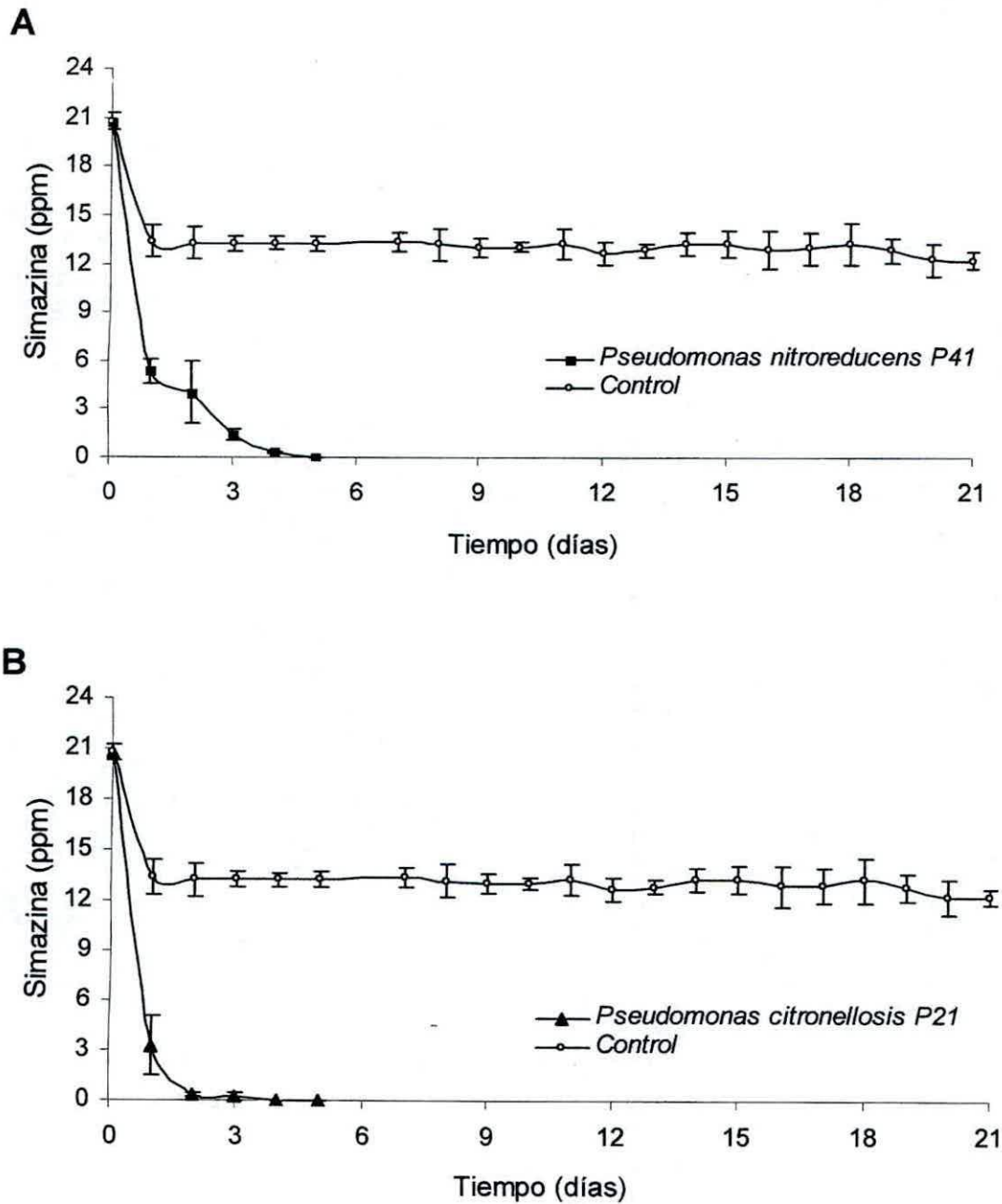
Para *Pseudomonas citronellosis* P21 la remoción de simazina desde el suelo alcanzó un 99% al día 2 y de un 100% al tercer día de tratamiento ( $p > 0,05$ ; t-test) (Figura 22B). Al comparar la degradación de los microcosmos de ambas cepas bacterianas se puede observar que *Pseudomonas citronellosis* P21 fue más eficiente en descontaminar los suelos ensayados. En los suelos controles los valores de simazina permanecieron cercanos al valor inicial de 20 ppm hasta el final de la evaluación.



**Figura 20: Recuento de cepas bacterianas degradadoras en ensayos de biorremediación.** Recuentos bacterianos de (A) *Pseudomonas nitroreducens* P41 y (B) *Pseudomonas citronellosis* P21 sembradas en placas de medio mínimo con atrazina y en medio tripticasa de soya. La zona clara alrededor de una colonia corresponde a un halo de degradación.



**Figura 21:** Recuento de heterótrofos, de *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 en ensayos con microcosmos. El suelo sin historial de simazina fue inoculado con 20 ppm de simazina y el ensayo fue realizado durante 3 semanas. Se realizaron recuentos de degradadores y de heterótrofos. Los valores representan los promedios de resultados de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios.



**Figura 22** Remoción de simazina desde microcosmos bioaugmentados con cepas de *Pseudomonas*. (A) *Pseudomonas nitroreducens* P41 y (B) *Pseudomonas citronellosis* P21. Los valores representan los promedios de resultados de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios.

Las tendencias observadas en las curvas de sobrevivencia y de degradación de simazina en *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 fueron similares. La capacidad de *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 para mantenerse viables en los suelos por períodos largos de tiempo responde una exigencia inicial básica en todo proceso de biorremediación. Esto indica que *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 poseen un metabolismo eficiente para degradar simazina, mantiene su viabilidad por largos períodos de tiempo. Por lo tanto, se sugiere a estas cepas bacterianas para su utilización en procesos de remoción de simazina desde campos agrícolas contaminados.

### 3.4.2 Ensayos de bioestimulación

En los procesos de biorremediación, las capacidades degradativas bacterianas se ven limitadas principalmente por tres factores: (i) por la limitación de un componente fisiológico básico para el crecimiento del microorganismo, (ii) por la baja viabilidad bacteriana en el nuevo ambiente afectada por la no adaptación a las condiciones *in situ* y (iii) y por los efectos de represión de genes debido a la presencia de componentes inhibidores de la expresión génica (Fernando Rojo, comunicación personal). La adición de componentes que equilibren los balances de fuentes de C, H, O, N, P y otros elementos muchas veces favorecen la descontaminación de ambientes, en una dinámica que involucra diversos procesos de regulación de genes (Cases & De Lorenzo, 2005)

Los campos agrícolas están siendo continuamente enriquecidos con nitrógeno por la fertilización de los suelos con salitre (nitrato), de modo que el carbono se encontraría en desbalance en la relación de equilibrio de C y N, y podría llegar a ser un elemento limitante en la descontaminación del herbicida. Para favorecer la degradación de simazina en microcosmos, se evaluó el efecto de adicionar una fuente de carbono al suelo a modo bioestimulación. Se realizaron ensayos en microcosmos enriquecidos con succinato e inóculos con *Pseudomonas citronellosis* P21. En *Pseudomonas citronellosis* P21 la presencia de fuentes de nitrógeno como amonio y nitrato no afectaron la degradación de simazina en los ensayos de células en reposo. El microorganismo fue cultivado empleando ácido cianúrico como única fuente de nitrógeno.

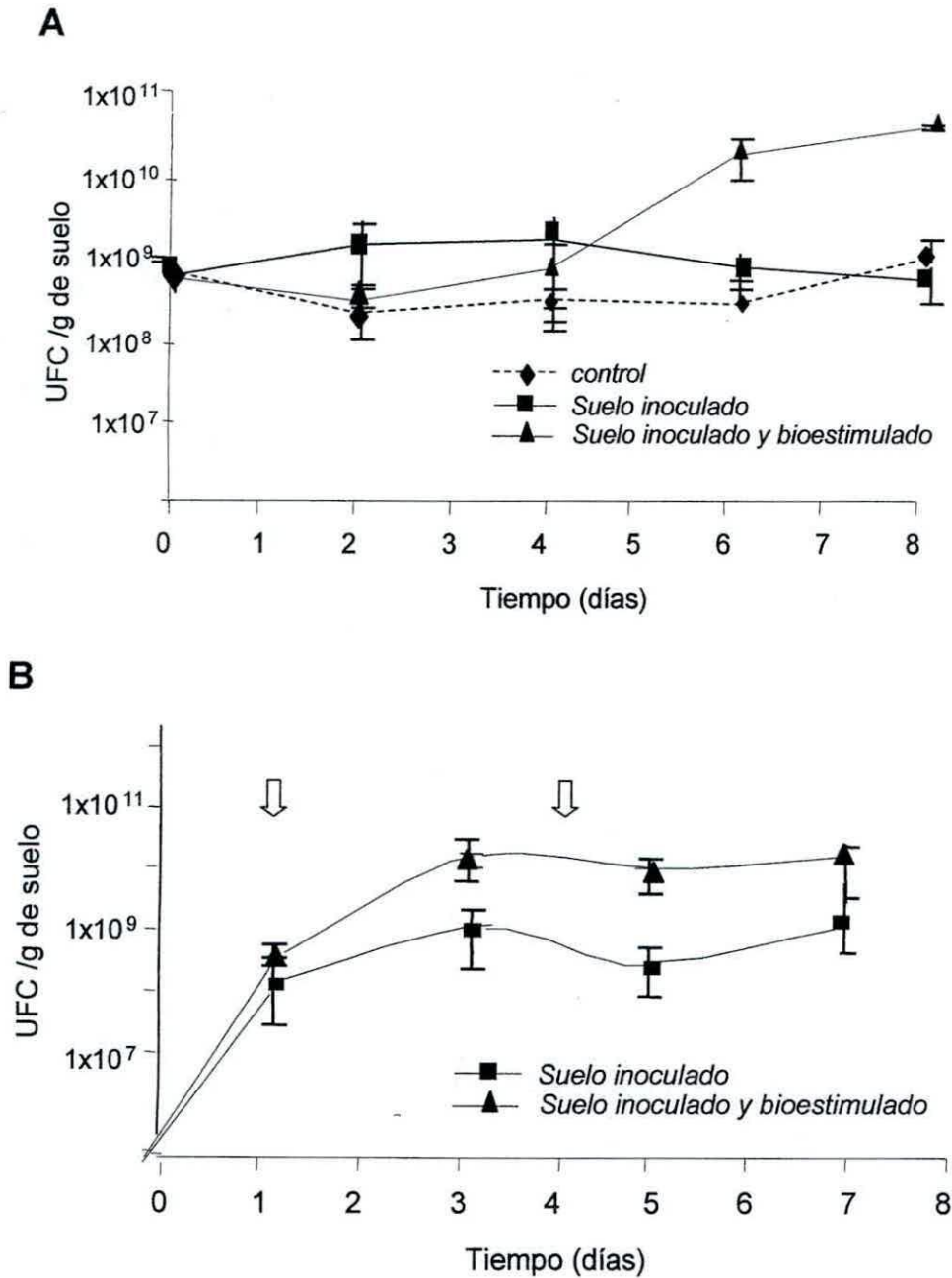
El recuento de heterótrofos se muestra en la Figura 23A. El número de heterótrofos se mantuvo en valores cercanos a los  $10^7$  UFC/g de suelo y sin grandes variaciones en cada tiempo muestreado. Esto indica que el número de heterótrofos cultivables no son

afectados por la presencia del herbicida, ni tampoco por la presencia del microorganismo degradador.

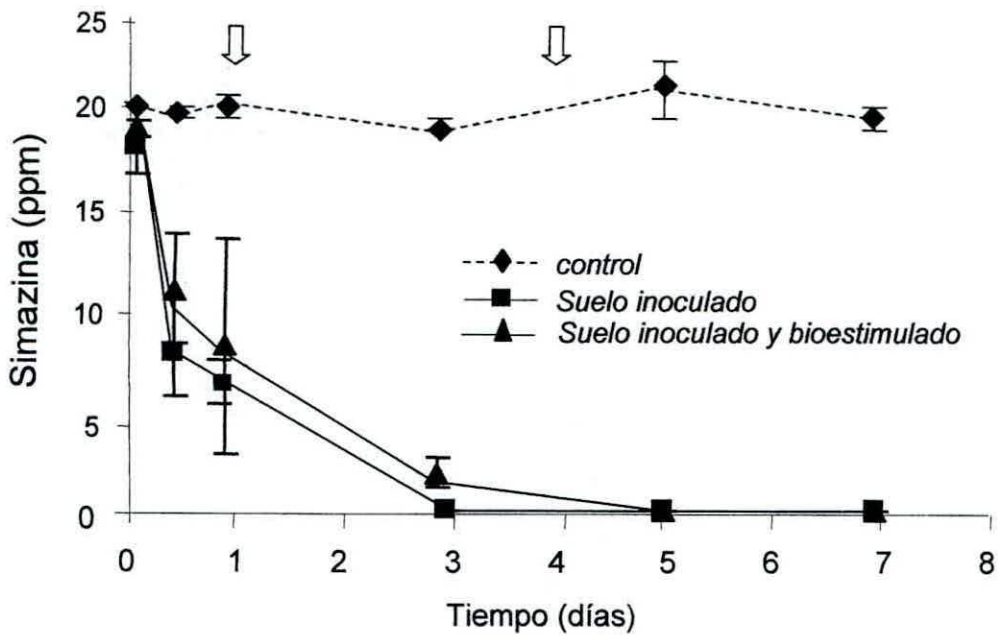
La adición de ácido succínico aumentó el recuento de heterótrofos. El número de heterótrofos detectados incrementó casi dos logaritmos de magnitud en suelos tratados con la fuente de carbono. Para este tratamiento, los recuentos llegaron a niveles de  $3,3 \times 10^9$  UFC/g al día 7.

Los recuentos de *Pseudomonas citronellosis* P21, luego de la inoculación, registraron valores de  $7,6 \times 10^6$  UFC/g en suelos no bioestimulados. En suelos enriquecidos con succinato los recuentos fueron de  $2,1 \times 10^8$  UFC/g de suelo. Los recuentos de *Pseudomonas citronellosis* P21 aumentaron en un orden de magnitud a los 3 días registrándose valores de  $2,9 \times 10^{10}$  UFC/g y  $1,2 \times 10^{10}$  UFC/g de suelo para el microcosmo A y B, respectivamente. La adición del segundo inóculo bacteriano en el día 4, no aumentó los recuentos al día 5. El aumento observado en los recuentos la cepa P21 en todos los tiempos, a favor de suelos bioestimulados (microcosmo A) por sobre suelos no bioestimulados (microcosmo B), se correlaciona con el aumento en los recuentos de microorganismos heterótrofos (Figura 23B).

En la Figura 24 se muestra los niveles de simazina contenida en el suelo durante los ensayos de bioestimulación. Tanto la inoculación con la cepa *Pseudomonas citronellosis* P21 como la inoculación y la bioestimulación con succinato provocaron la degradación de simazina eficientemente. El herbicida fue degradado completamente en 3 días para suelos no bioestimulados y 5 días para suelos bioestimulados. En el suelo control, la concentración de simazina se mantuvo alrededor de los 17 ppm. Los valores muestran un leve retardo en la degradación de simazina al agregar succinato al suelo. Estos resultados indican que la fuente de carbono agregada no mejoró la degradación de simazina por *Pseudomonas citronellosis* P21, pero aumentó los recuentos de microorganismos heterótrofos y de las bacterias degradadoras.



**Figura 23: Ensayos de bioestimulación.** Recuento de heterótrofos no degradadores (A) y de *Pseudomonas citronellosis* P21 (B) en microcosmos preparados con suelos agrícolas. Las flechas indican la inoculación de *Pseudomonas* en los microcosmos en concentraciones de  $1,3 \times 10^9$  células/g de suelo. Los suelos tratados con 20 ppm de simazina fueron inoculados y bioestimulados con succinato (1 mM). Los valores representan los promedios de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios.



**Figura 24: Degradación de simazina en suelos bioestimulados y bioaumentados con *Pseudomonas citronellosis* P21.** Las condiciones de evaluación corresponden a suelo contaminado sin inoculación bacteriana, suelo contaminado e inoculado con la bacteria y suelo contaminado, inoculado con la bacteria y bioestimulado con ácido succínico (1 mM). Los valores representan los promedios de resultados de tres experimentos independientes. Las barras de error representan la desviación estándar de los promedios.



## 4.

**Discusión**

Es probable que en todos los nichos ecológicos disponibles en nuestro planeta, las bacterias hayan evolucionado hasta consumir cualquier nutriente disponible para el desarrollo de la vida. La enorme versatilidad del metabolismo bacteriano hace que mediante cambios fisiológicos y génicos, las bacterias ajusten su metabolismo en función de la disponibilidad de nutrientes. De esta manera, las bacterias han sido capaces de obtener fuentes de energía y aceptores de electrones desde diversos compuestos, muchos de ellos complejos y de difícil degradación (Ninfa *et al.*, 1995).

Diversos grupos de investigación científica han dedicado sus esfuerzos para establecer procesos que reviertan el daño ambiental causado por el empleo y derrames de compuestos recalcitrantes en diferentes actividades. Los pesticidas, o plaguicidas son compuestos xenobióticos liberados por el hombre al ambiente, de mayor distribución, por aplicarse de forma regular en los campos de cultivo (Ortiz-Hernández *et al.*, 1997). Desde el descubrimiento de los herbicidas s-triazinas, éstos han sido ampliamente utilizados en el mundo, en especial en Estados Unidos y Europa. Se ha detectado la concomitante acumulación de s-triazinas en el ambiente.

**4.1. Caracterización de cepas bacterianas aisladas desde suelos agrícolas**

En este estudio se caracterizaron 32 cepas bacterianas provenientes de suelos agrícolas en que se emplea simazina como herbicida y desde suelos sin historial de aplicación de simazina. El objetivo fue obtener cepas bacterianas capaces de degradar el herbicida simazina en suelos agrícolas tratados con este herbicida. Se consideró desde la caracterización de las cepas bacterianas aisladas hasta ensayos de biorremediación en microcosmos.

Las cepas en estudio fueron aisladas por enriquecimiento en un medio mínimo conteniendo simazina como única fuente de nitrógeno (Hernández, 2004). El empleo de medios mínimos en el que se incluye un compuesto como nutriente esencial limitante es una de las técnicas más utilizadas para seleccionar microorganismos degradadores (Mandelbaum *et al.*, 1995). De las 32 cepas caracterizadas se seleccionaron 2 para ser empleadas en estudios de biorremediación de suelos contaminados. Las cepas bacterianas fueron clasificadas en 8 grupos de acuerdo a características fenotípicas. Un 22% de ellas fueron Gram positivas, y un 78% Gram negativas. Las proporciones de bacterias Gram positivas/Gram negativas son similares con aislamientos bacterianos en

otros suelos agrícolas (Russeaux *et al.*, 2000; 2002). Mediante secuenciación del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S, y en algunos casos mediante el perfil bioquímico determinado por el sistema de identificación Biolog, las cepas bacterianas fueron identificadas a nivel de especie. La cepa P41 fue identificada por Biolog como *Pseudomonas nitroreducens*/ *Pseudomonas azelaica* y por secuenciación del gen que codifica para el RNAr 16S fue identificada como *Pseudomonas nitroreducens*. Las cepas P43, K46, P51, C53 y P54 fueron identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* tanto por el sistema Biolog como por secuenciación del RNAr 16S.

La mayoría de las cepas clasificadas en el grupo 1, fueron identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* a excepción de la cepa C26. Las cepas bacterianas cuyas características dificultaron la obtención de colonias discretas, y por lo tanto su manejo y cultivo no se seleccionaron para su empleo en ensayos de biorremediación. Los géneros bacterianos identificados en este estudio como *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Rhodococcus*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Arthrobacter* y *Agrobacterium* son cepas que han sido descritas por su capacidad de degradar compuestos recalcitrantes, en los que se incluyen compuestos del tipo s-triazinas. Por ejemplo, *Arthrobacter* D47 es capaz de degradar diuron, iso proturon, linuron, monolinuron y monuron (Turnbull *et al.*, 2001) mediante la actividad de hidrolasas que están, codificadas por los genes plasmidiales *puhA*. *Arthrobacter* sp. SB8 degrada 4-clorobenzoatos en altas concentraciones (Shimao *et al.*, 1989) y *A. chlorophenolicus* A6 degrada 4-clorofenoles y otros clorofenoles sustituidos en la posición *para* (Nordin *et al.*, 2005).

En estudios de bacterias degradadoras de atrazina realizados en suelos franceses (Russeaux *et al.*, 2000) una de 25 bacterias aisladas correspondió a la especie *Stenotrophomonas maltophilia*. Esto indica una proporción mucho menor al 44 % detectado en este estudio. *Stenotrophomonas maltophilia* es una bacteria de gran versatilidad, posee alta resistencia a diversos antibióticos (Waters *et al.*, 2007) y está asociada a patologías humanas (Zhang *et al.*, 2000). La alta frecuencia de aparición en muestras provenientes de suelos agrícolas del valle de Aconcagua, son de gran interés científico.

En muchas ocasiones las especies tienen que competir entre ellas para ocupar un lugar en el ecosistema. Las diferentes especies han ido adquiriendo, a lo largo de su evolución, una serie de características que les facilitan la competencia. La alta proporción de *Stenotrophomonas maltophilia* identificadas podría ser explicada desde un punto de

vista ambiental, considerando las estrategias k y r. *Stenotrophomonas maltophilia* utiliza los nutrientes rápidamente para un crecimiento rápido. En la estrategia r, las especies suelen mantener un crecimiento exponencial hasta desaparecer bruscamente cuando las condiciones cambian. En las especies con estrategia k, la población se mantiene con densidades altamente variables, pero cerca de la densidad máxima que puede soportar el sistema (Freedan, 1989). *Stenotrophomonas maltophilia* como especie oportunista, debe ser considerada que su estrategia ambiental es de tipo r, dado su rápido crecimiento en medios de cultivo y a su carácter cosmopolita y de patógeno oportunista. La especie corresponde a un patógeno oportunista, presente en altas concentraciones a los suelos agrícolas. A pesar de la alta frecuencia de *Stenotrophomonas*, y algunas de ellas conteniendo todos los genes catabólicos *atz* para degradar triazinas, ninguna de estas cepas bacterianas fueron consideradas para ensayos de biorremediación, por considerarse que podrían significar un riesgo ambiental el agregar cultivos enriquecidos de esta especie, potencialmente patógena, a campos agrícolas.

La caracterización de las cepas presentadas en este estudio permitió la selección de cepas para ser empleadas en la biorremediación de suelos contaminados con simazina. La biorremediación de estos suelos puede ser relevante con fines de recambio de siembra o para el uso de actividades alternativas al cultivo agrícola comercial. Por lo tanto, en la selección de cepas bacterianas se consideraron factores como presencia de genes de la ruta catabólica para degradar simazina, crecimiento rápido, antecedentes del género bacteriano en suelos, y capacidad de degradación *in situ*.

*Pseudomonas sp.* cepa ADP, la cepa referencial para la degradación de la atrazina y simazina, fue aislada desde un suelo que sufrió un derrame de atrazina en Minnesota, Estados Unidos en 1995 (De Souza *et al.*, 1995). Desde entonces, se han descrito diversos aislados bacterianos capaces de degradar s-triazinas y otros compuestos como hidrocarburos (Kästner *et al.*, 1998; Johnsen, *et al.*, 2007), estirenos (O'Leary *et al.*, 2001), clorobifenilos (Bedard *et al.*, 1986; Bopp, 1986) y dinamita (Spiker *et al.*, 1992; Suresh *et al.*, 2007). Los antecedentes presentados en este estudio, demuestran que en los suelos agrícolas chilenos, tratados durante más de 10 años con simazina, se encuentran bacterias con capacidad para degradar el herbicida. Este estudio determinó las condiciones para estimular la degradación de simazina por cepas bacterianas nativas inoculadas en suelos contaminados.

## 4.2 Degradación de s-triazinas por bacterias de suelo

Se han descrito dos rutas alternativas para la degradación de herbicidas del tipo s-triazinas presentes en cepas bacterianas (Estudios de Wackett y colaboradores, Universidad de Minnesota). La búsqueda de genes catabólicos se acotó a los genes *atz*, cuya primera enzima de la vía, la atrazina clorohidrolasa, es codificada por el gen *atzA*.

La diferencia más relevante entre ambas rutas metabólicas, es la primera enzima de la ruta responsable de deshalogenar por hidroxilación las s-triazinas. La enzima atrazina clorohidrolasa se ha descrito en su mayoría para algunas bacterias Gram negativas, y está codificada por el gen *atzA*. La enzima triazina clorohidrolasa, codificada por el gen *trzA*, se ha descrito en bacterias Gram positivas (Shao & Behki, 1995). El presente estudio consideró la detección de los genes *atz* en las 32 cepas provenientes desde suelos agrícolas. También se evaluó el crecimiento en placas con medio mínimo con atrazina para poder observar la formación de halos de degradación. Las cepas *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 evidenciaron rápidamente la formación de halos de degradación. En la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* C53 la formación de halo no fue nítido. El resto de las cepas no formó halo de degradación. Las cepas *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21, *Stenotrophomonas maltophilia* P13, *Stenotrophomonas maltophilia* P33, *Stenotrophomonas maltophilia* C53, *Stenotrophomonas maltophilia* C43, *Stenotrophomonas maltophilia* C54, y *Arthrobacter globiformis* C44 y la cepa bacteriana K55 poseen los 6 genes catabólicos *atz* descritos para la degradación de s-triazinas. En *Bacillus pumillus* C34 fueron detectados 5 de los 6 genes *atz*, faltando el gen *atzD*. No se tienen antecedentes que puedan explicar la pérdida del gen *atzD*, puesto que la ruta inferior de degradación del compuesto la componen los genes *atzD*, *atzE* y *atzF* y están descritos como operón (Martínez *et al.*, 2001; García-González *et al.*, 2005). No obstante, esta cepa no fue seleccionada dada la complejidad que mostró para ser cultivada.

Las 23 cepas bacterianas restantes, sólo presentaron parte del grupo de genes de la ruta para mineralizar el compuesto. Muchos genes catabólicos de simazina y de resistencia están flanqueados por secuencias repetitivas que les dan movilidad a estos genes. Las secuencias de inserción *IS1071* se han descrito como responsables de la movilidad de los genes *atz* en *Pseudomonas* (Martínez *et al.*, 2001). Aunque este trabajo no consideró el estudio de secuencias de inserción repetitivas asociadas a los genes

degradadores, es probable que la heterogeneidad de genes detectados en las cepas bacterianas se deba a esta condición. Existen diferentes antecedentes de transferencia de genes por microorganismos degradadores. Por ejemplo, los operones *clc*, *cba*, y *fcf* no son homólogos, y se han descrito para la degradación de clorobenzoatos. Estos genes han sido encontrados en diferentes loci del cromosoma, plásmidos y transposones en bacterias (Ogawa & Miyashita, 1995; Di Gioia *et al.*, 1998). Los operones *clc* y *cba* se encuentran flanqueados por secuencias de inserción altamente repetitivas. Mientras que las secuencias transposónicas Tn5271 flanquean los genes *cba*, las secuencias IS1071 han sido detectadas vecinas a los genes *clc* y *fcf*, y flanqueando al operón *clcABD* y los genes *bph* para la degradación de clorobifenilos en una comunidad bacteriana de suelos en Niagara (Peel & Wyndham, 1999). La presencia de secuencias IS1071 asociado a muchos genes catabólicos, sugiere ser el modo de diseminación primaria de estos genes en el ambiente.

La presencia de los 6 genes catabólicos *atz* detectados en 9 aislados bacterianos descritos en este estudio, sugiere que la degradación de simazina ocurre mediante las enzimas clorhidrolasa y alquilo-amidohidrolasa. Las enzimas de ruta superior transforman simazina hasta ácido cianúrico, y mediante las enzimas hidrolasas de la ruta inferior, codificadas por los genes *atzDEF*, transforman ácido cianúrico a biuret y alofanato y luego hasta dióxido de carbono y amonio (De Souza *et al.*, 1998). La detección de genes *atz* empleando simazina como fuente de nitrógeno para el aislamiento de microorganismos pone en evidencia la funcionalidad de estos genes frente a diferentes triazinas y sugiere que estos genes derivaron de un ancestro común, y que se han extendido de manera limitada a algunos géneros bacterianos (De Souza *et al.*, 1998).

Atrazina y simazina presentan una estructura molecular con cadenas laterales abundantes en nitrógeno que podrían permitir el crecimiento de algunas cepas bacterianas incapaces de deshalogenar el compuesto o abrir la cadena heterocíclica (Seffernick *et al.*, 2000). Esto podría explicar el aislamiento en medios conteniendo simazina como única fuente de nitrógeno, de cepas bacterianas que no poseen todos los genes *atz*. El metabolismo incompleto para degradar simazina, podría ser también atribuible a procesos de pérdida de genes. En las cepas bacterianas que no fueron detectados todos los genes *atz* es probable que posean funciones como degradadores secundarios, incapaces de iniciar reacciones de inicio, pero que se acoplan en etapas secundarias del catabolismo. Un ejemplo de ello, es *Pseudomonas nitroreducens* CN1 (De Souza *et al.*, 1998), la cual no es capaz de realizar la descloración de atrazina, pues

carece de hidrolasas funcionales codificadas por los genes *atzB* y *atzC*. Los autores propusieron emplear un consorcio con *Clavibacter michiganense* ATZ1, el cual es capaz de realizar las dos reacciones iniciales descritas de dehalogenación y de obtención del dietilo lateral, con la consecuente acumulación de *N*-etilammelida. *Pseudomonas* CN1, convierte *N*-etilammelida en ácido cianúrico, que es aprovechado para su crecimiento por ambas cepas.

Es necesario realizar estudios funcionales para afirmar que estas cepas caracterizadas en este trabajo poseen capacidades incompletas de degradación. La aparición de bacterias con metabolismo incompleto podría deberse también a reacciones de desalquilación que liberan radicales desde la simazina, conteniendo moléculas de carbono y nitrógeno que son aprovechables por otros géneros bacterianos (Mandelbaum *et al.*, 1993).

Este estudio ha descrito las características degradativas de dos cepas del género *Pseudomonas*. Estas cepas fueron seleccionadas por sus capacidades para degradar simazina, la presencia de todos los genes catabólicos, la facilidad de manejo en condiciones de laboratorio, la alta biomasa alcanzada en los cultivos, la formación de halos de degradación y la función del género en el medio ambiente. *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 mostraron halos de degradación al crecerlas en medios sólidos conteniendo simazina o atrazina. En estas cepas se detectaron todos los genes catabólicos de las rutas superior (*atzA*, *atzB*, *atzC*) e inferior (*atzD*, *atzE*, *atzF*) de degradación de simazina. Los ensayos con células en reposo permitieron demostrar las capacidades degradativas de simazina. Los estudios de biorremediación demostraron la capacidad de sobrevivencia en el medio natural y la mantención de las capacidades degradativas, lo cual permitió proponer a estas bacterias para su aplicación en estudios de biorremediación en suelos.

El género *Pseudomonas* se caracteriza por ser un grupo de bacterias ubicuas, capaces de desenvolverse en una amplia variedad de estilos de vida. Son bacterias Gram negativas, catalasa positivo, reducen nitrato, y no fermentan la glucosa. Crecen en suelos, pantanos, hábitat marino y acuícola y en tejidos animales y vegetales. Son capaces de crecer hasta 42°C. Utilizan glucosa como fuente de carbono, pero no fructosa, sacarosa, galactosa, lactosa, ni maltosa (De Souza *et al.*, 1995). La versatilidad de la especie y la multiplicidad de mecanismos moleculares involucrados en la adaptación y colonización de variados nichos ecológicos, la convierten en un modelo para el estudio de degradación de s-triazinas.

La versatilidad metabólica del género *Pseudomonas* para degradar compuestos persistentes ha sido ampliamente descrita. *Pseudomonas aeruginosa* ITRC-5 es capaz de degradar hexaclorociclohexano y sus isómeros (Chaudhary *et al.*, 2005). *Pseudomonas* sp. cepa JS1 posee la capacidad de degradar un amplio rango de compuestos aromáticos como fenol, etilbenceno, tolueno, benceno, naftaleno, benzoato, p-hidroxibenzoato, salicilato y clorobeneno (Haigler *et al.*, 1992; Whyte *et al.*, 1997). *Pseudomonas putida* CA-3, es capaz de crecer en derivados de alcanos y estireno (O'leary *et al.*, 2001).

Existen pocos estudios que describen *Stenotrophomonas maltophilia* participando en la degradación de compuestos persistentes. Rouseaux *et al.*, (2002) detectaron los genes *atz* en la especie. Sin embargo, no evaluaron sus capacidades degradativas. Bink *et al.*, (1995) describió las capacidades de degradación del explosivo ciclo-tetrametil-n-tetranitramina (HMX) por la bacteria *S. maltophilia* PB1. La bacteria fue capaz de metabolizar el compuesto hexahidro-1,3,5-trinitro-1,3,5-triazina (RDX) hasta metileno-N-(hidroximetil)-hidroxilamina-N9-(hidroximetil) nitroamina, pero no fue capaz de degradar ácido cianúrico o melanina como fuente de nitrógeno.

#### 4.3. Regulación de la degradación de s-triazinas en *Pseudomonas nitroreducens* P41

Dado que el presente estudio está dirigido a la caracterización de bacterias degradadoras para ser potencialmente empleadas en procesos de biorremediación, las fuentes de nitrógeno ensayadas fueron aquellas presentes en suelos agrícolas. *Pseudomonas nitroreducens* P41 se seleccionó para realizar estudios de regulación de genes catabólicos basado en sus capacidades catabólicas y en la facilidad de manejo en cultivos. Se observó que al crecer la bacteria en medio rico LB, ésta no fue capaz de degradar simazina en ensayos con células en reposo. Tanto por el análisis de expresión de transcritos, después de crecer el microorganismo en medio mínimo con diferentes fuentes de nitrógeno, así como por la determinación de la actividad  $\beta$ -galactosidasa obtenida desde una fusión gen *atzD-lac* creada con genes de *Pseudomonas nitroreducens* P41 y ensayados en la misma bacteria, se demostró que la ruta inferior de degradación de simazina en *Pseudomonas nitroreducens* P41 está regulada por la disponibilidad de fuentes de nitrógeno. Esta regulación se observó sólo a nivel de la ruta inferior de degradación de simazina y no a nivel de la ruta superior. Al emplear la fuente de nitrógeno ácido cianúrico o simazina, se observó una eficiente degradación de

simazina. Este estudio indicó que la degradación de simazina disminuyó al cultivar *Pseudomonas nitroreducens* P41 en LB y en fuentes de nitrógeno como amonio, nitrato y urea. Por el contrario, la degradación del compuesto fue mayor al cultivar la bacteria con simazina, ácido cianúrico y serina (condiciones de baja disponibilidad de nitrógeno) como única fuente de nitrógeno. Esto indicaría que la ruta de degradación del herbicida simazina estaba sujeta a control por nitrógeno. En presencia de fuentes preferenciales de nitrógeno la expresión de genes *atz* se reprimiría y se induciría en respuesta a limitación del mismo. Las fuentes de nitrógeno empleadas se encuentran presentes en suelos agrícolas. El amonio es considerado una fuente de nitrógeno de alta y rápida disponibilidad para diversas especies (Bichat *et al.*, 1999). El amonio es asimilado por el ácido secundario  $\alpha$ -cetoglutarato para la síntesis de aminoácidos. El amonio inhibió fuertemente la degradación de simazina por *Pseudomonas nitroreducens* P41. El nitrato tuvo un efecto moderado en la degradación de simazina. En forma natural, el nitrato es convertido en parte a amonio por la enzima glutamina sintetasa (Merrick & Edward, 1995). En *Pseudomonas nitroreducens* P41 no se sabe si la acumulación de  $\alpha$ -cetoglutarato es un indicador para inhibir la ruta de degradación de simazina o ocurre por otra vía metabólica que incluye las reacciones realizadas por las enzimas uridilil uridililtransferasa y las quinasas NtrC y NtrB en el control global de regulación por nitrógeno, descritas en enterobacterias (Merrick & Edward, 1995).

Los análisis de expresión de genes mostraron que al crecer *Pseudomonas nitroreducens* P41 en las diferentes fuentes de nitrógeno los genes *atzA*, *atzB* y *atzC* se expresan en forma constitutiva. El gen *atzD* mostró una expresión diferencial en diferentes condiciones de cultivo, y el comportamiento observado se correlacionan a aquellos resultados derivados de los ensayos de células en reposo. Cuando los cultivos fueron crecidos en amonio, en ausencia o presencia de simazina, la expresión del gen *atzD* se vió reprimida. Se observó una inducción moderada o intermedia en la expresión del gen *atzD* durante los crecimientos en nitrato y en nitrato/simazina. Sin embargo, la expresión del gen *atzD* fue mayor en los crecimientos con simazina, serina y ácido cianúrico. En ácido cianúrico la expresión del gen *atzD* es 10 veces mayor que en amonio. En ácido cianúrico el gen *atzD* se expresó un 25% más que en serina. Estos resultados, sugieren que la regulación es mediada por dos mecanismos. Por un lado, la expresión de *atzD* se induce en condiciones de nitrógeno limitante. Por otro lado, la presencia del intermediario metabólico ácido cianúrico o simazina, induce la expresión del gen *atzD*. No obstante, es

posible que la inducción observada en simazina pueda ser mediada por ácido cianúrico, producto de una rápida transformación de simazina a ácido cianúrico.

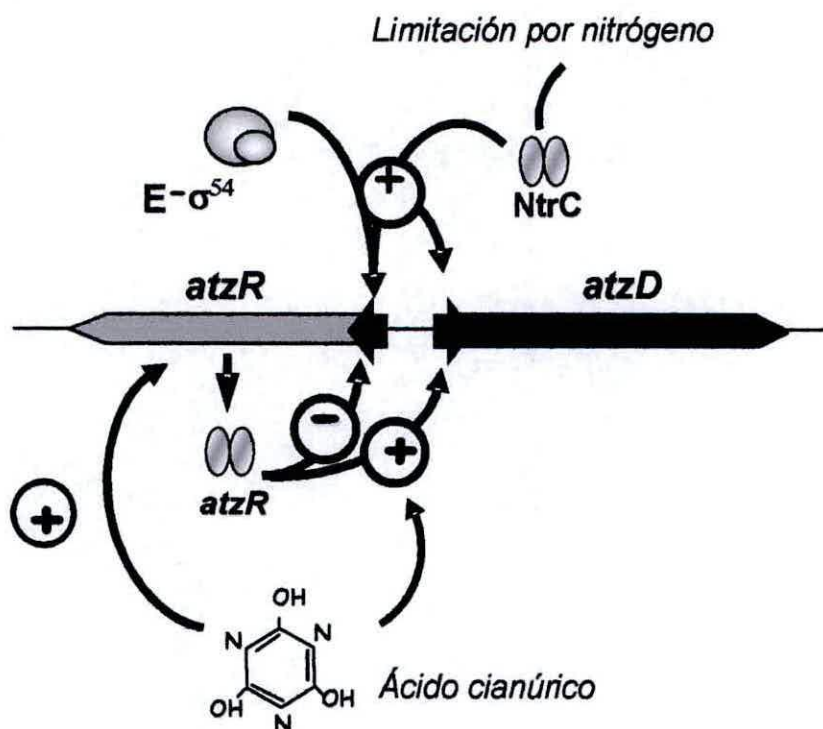
Los experimentos de células en reposo realizados en *Pseudomonas citronellosis* P21 indicaron que en esta cepa la degradación de simazina no es disminuida al crecer la bacteria con amonio como única fuente de nitrógeno. El nitrato no produjo efectos sobre la degradación de simazina y los crecimientos con simazina y ácido cianúrico, favorecen la degradación de simazina. El comportamiento observado en *Pseudomonas citronellosis* P21 respecto al nitrato, sugiere que esta bacteria posee un metabolismo diferente de *Pseudomonas nitroreducens* P41.

Los efectos de las fuentes de nitrógeno sobre la regulación de genes para metabolizar simazina en *Pseudomonas nitroreducens* P41 muestran un comportamiento similar al descrito para la degradación de atrazina por *Pseudomonas sp.* cepa ADP (García-González et al., 2003; 2005). Los estudios de regulación génica presentados en este trabajo fueron realizados en la propia bacteria *Pseudomonas nitroreducens* P41. En *Pseudomonas sp.* cepa ADP los ensayos con genes *atz* clonados se realizaron en *Pseudomonas putida* KT-2440. Los ensayos de conjugación determinaron que *Pseudomonas nitroreducens* P41 incorpora plásmidos de diferentes grupos de incompatibilidad. Esto permitió su transformación por métodos tradicionales, y el posterior monitoreo por análisis de expresión en la propia cepa bacteriana. En *Pseudomonas sp.* cepa ADP no describe un mecanismo de inducción o represión intermedia por nitrato como ocurre en *Pseudomonas nitroreducens* P41. Por consiguiente se postula que *Pseudomonas nitroreducens* P41 es un buen modelo para ser empleada en estudios de regulación génica de herbicidas s-triazinas.

En este estudio se logró identificar, clonar y secuenciar la región intergénica correspondiente a la zona reguladora que antecede al gen *atzD* en *Pseudomonas nitroreducens* P41. En ella se reconocieron regiones de consenso para la unión de factores  $\sigma_N$ , descritos para promotores de tipo LysR (Schell, 1993). El análisis de secuencia mostró una alta similitud de la región intergénica *atzD* y *atzR* correspondiente a las zonas promotoras para la regulación de genes descritos en *Pseudomonas sp.* cepa ADP (García-González et al., 2005).

A excepción de la inhibición parcial con nitrato en *Pseudomonas nitroreducens* P41, el modelo regulatorio en esta bacteria, podría ser similar a aquel descrito por García-González et al. (2005) para *Pseudomonas sp.* cepa ADP (Figura 25). La proteína codificada por el gen *atzR* (Martínez et al., 2001) es un regulador de la

expresión de los genes catabólicos *atzDEF* en *Pseudomonas* sp. cepa ADP (García-González *et al.*, 2005). La proximidad del gen regulador con el operón, la localización divergente entre región conteniendo los genes del regulador (*atzR*) y la del gen catabólico regulado (*atzD*), y la presencia de las secuencias consenso de unión de los factores  $\sigma^{70}$  y  $\sigma^N$  a regiones de ensamblaje escritas por Schell (1993), definen a este regulador dentro de la familia de reguladores tipo LysR o LTTR. Estos genes mantienen roles implicados en una red de regulación global frente a estímulos ambientales (Cases & De Lorenzo, 1998), cuya característica principal es que son autorregulables por su producto. En este modelo, la activación de la expresión requiere la presencia de dos proteínas reguladoras: NtrC y AtzR. AtzR, activa la expresión de *atzDEF*, siendo clave en condiciones de nitrógeno limitante y en presencia de ácido cianúrico. La presencia de ácido cianúrico, induce la expresión del regulador *atzR*, el que a su vez, induce la expresión del operón *atzDEF* en respuesta a este metabolito.



**Figura 25:** Modelo propuesto para la regulación del gen *atzD* en *Pseudomonas nitroreducens* P41. El diagrama muestra las regiones regulatorias *atzR* y *atzD* y las señales regulatorias propuestas para *Pseudomonas* sp. cepa ADP (García-González *et al.*, 2005). Las estructuras diméricas de *atzR* y NtrC son tentativas.

Por otro lado, la limitación por nitrógeno, es mediada por proteínas de control global de regulación de nitrógeno, la cual involucra la participación de factores sigma. Se sabe que en condiciones de limitación de nitrógeno, NtrC regula positivamente la actividad de *atzR* a través de la participación de factores sigma, pero el mecanismo exacto aún no está determinado.

Los reguladores de la familia LysR se caracterizan por controlar la expresión del gen adyacente y divergente a ellos mismos, y funcionan como activadores o como represores en una gran diversidad de procesos en el metabolismo de xenobióticos. La secuencia de reconocimiento para los factores es parcialmente palíndromo y presenta la secuencia conservada T-N<sub>11</sub>-A. Los resultados recientemente descritos indican que existe una alta homología funcional entre de la ruta de degradación de simazina por *Pseudomonas nitroreducens* P41 y la ruta de degradación de atrazina por *Pseudomonas* sp. ADP.

En *Pseudomonas* sp. cepa ADP la regulación de genes involucra una sobreimposición de un mecanismo global de control biológico. Este modelo de regulación está descrito para la degradación de otros compuestos como alcanos y tetralina (Martínez-Pérez *et al.*, 2004). Este mecanismo de regulación también fue descrito para el metabolismo de compuestos nitrogenados. El control global de utilización de nitrógeno en bacterias está dispuesto como una red regulatoria que opera para prevenir la utilización de fuentes alternativas de nitrógeno cuando están presentes otras fuentes de nitrógeno preferenciales, como amonio y nitrógeno (Merrick & Edward, 1995). *Stenotrophomonas maltophilia* PB1 fue incapaz de degradar HMX, cuando fue crecida empleando nitrato de amonio como única fuente de nitrógeno. Aunque en esta cepa no se estudiaron los genes catabólicos involucrados (Bink *et al.*, 1995), el esquema parece indicar una sobreimposición de un control global de utilización del nitrógeno donde el amonio y nitrato inhiben la degradación de compuestos de difícil degradación.

Se han descrito diversos factores sigma involucrados en la expresión de genes de *Sphingomonas* (Martínez-Pérez *et al.*, 2005) y *Pseudomonas putida* OCT, (Dinamarca *et al.*, 2003). Las rutas catabólicas poseen mecanismos de regulación involucrados en el metabolismo de compuestos aromáticos. En general, la expresión de operones catabólicos parece estar frecuentemente sujeta a una sobreimposición de un control global de genes regulatorios, los cuales previenen la transcripción de genes catabólicos bajo condiciones de exceso nutricional. Así, se optimiza la expresión de genes mediante su conexión al estado metabólico y energético de la célula (Cases & De Lorenzo, 2005).

#### 4.4 Biorremediación de simazina en microcosmos

En los procesos de biorremediación, las potencialidades de degradación que se descubren en un microorganismo serán aprovechables en la medida que existan las condiciones óptimas para que el microorganismo incorpore el compuesto contaminante en su metabolismo, y adicionalmente, y quizás más importante, que el microorganismo se mantenga viable en el medio contaminado para llevar a cabo la descontaminación. En la naturaleza, las cepas bacterianas degradadoras se someten a la competencia con la microbiota autóctona y a la influencia de factores físicos y químicos que impactan negativamente en la actividad de degradación de los contaminantes. Este trabajo logró determinar que el empleo de ácido cianúrico como fuente de nitrógeno permite inducir metabólicamente la cepa *Pseudomonas nitroreducens* P41 para degradar simazina. Se observó que es importante mantener las cepas bacterianas en condiciones selectivas para disminuir eventos de pérdida de capacidades degradativas a través de la pérdida de genes catabólicos.

Para emplear una bacteria en procesos de biorremediación de suelos, además de demostrar que la cepa posee los genes metabólicos, es necesario comprobar que la cepa posee capacidad de sobrevivencia en el suelo y que los componentes del medio en que la bacteria será inoculada, no inhiben las enzimas de la ruta de degradación del contaminante a degradar (Cases y De Lorenzo, 2005).

Para los ensayos de biorremediación con *Pseudomonas nitroreducens* P41, se emplearon microcosmos de suelos agrícolas, los cuales contienen amonio (6,0 ppm) y nitrato (6,2 ppm). El contenido de nitrato y amonio presentes en suelos agrícolas chilenos no afectó la capacidad de degradación de simazina de *Pseudomonas nitroreducens* P41 en el suelo. El herbicida fue degradado completamente en los microcosmos dentro de 4 días. *Pseudomonas nitroreducens* P41 mantuvo una viabilidad de 60% durante todo el ensayo. Los ensayos de biorremediación con *Pseudomonas citronellosis* P21 mostraron que este microorganismo fue capaz de degradar la simazina en el suelo en más de un 80% en 24 horas. En 3 días esta cepa bacteriana degradó 20 ppm de simazina desde microcosmos de suelo. Esta cepa de *Pseudomonas* mantuvo su viabilidad por sobre un 60% en 21 días de ensayo.

En los ensayos de degradación de atrazina realizados con *Pseudomonas* sp. cepa ADP se evaluó el efecto de la presencia de nitrato sobre la degradación de atrazina (García-González *et al.*, 2005). En condiciones normales de nitrato (0,016 ppm de suelo)

la bacteria mineralizó un 50% de atrazina (ppm) en 48 horas. La tasa de mineralización disminuyó hasta un 1,5% cuando el suelo se abonó con 2000 ppm de nitrato. Cuando *Pseudomonas* sp. cepa ADP fue aclimatada durante seis días en suelos con alto contenido de amonio, no se observó inhibición del amonio sobre la degradación de atrazina. En este estudio, los microcosmos inoculados con *Pseudomonas nitroreducens* P41 y aquellos inoculados con *Pseudomonas citronellosis* P21, contenían amonio, pero ambas cepas mantuvieron sus cualidades degradadoras de simazina. Probablemente en suelos agrícolas, el amonio podría no estar bio-disponible, debido a la acidificación del suelo, su alto contenido en humus, o al rápido consumo de éste por la microbiota autóctona. De esta manera *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 no se encontrarían en exceso de amonio.

Los estudios la bioestimulación de la degradación de simazina mostraron que una fuente de carbono adicional al suelo, ácido succínico retarda levemente la degradación de simazina por *Pseudomonas citronellosis* P21. En los microcosmos conteniendo succinato, hubo una remoción de 70% de simazina dentro de 24 horas. Mientras que microcosmos no tratados con succinato, la degradación fue de un 85%. Sin embargo, en ambos microcosmos la simazina desapareció completamente luego de 5 y 7 días, respectivamente. Resultados similares fueron observados por Struthers *et al.*, (1998) con *Agrobacterium radiobacter* J14a al utilizar glucosa como fuente de carbono en suelos contaminados con atrazina. Es evidente, que suplementar el medio con fuentes de carbono alteran las comunidades microbianas (Ralebitso *et al.*, 2003). En estudios con suelos agrícolas noruegos, Ralebitso *et al.* (2003) observaron que la aplicación de nitrógeno en forma de  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  (1000 ppm) no afectó la degradación de atrazina en suelos sin historial de contaminación por el herbicida, pero sí afectó la degradación del compuesto en suelos tratados con el herbicida. La adición de amonio disminuyó la capacidad de degradación del compuesto desde un 40% hasta un 10% en suelos contaminados con 5 ppm de atrazina. También observaron que la estructura de las comunidades microbianas se ven alteradas en suelos con concentraciones de amonio diferentes. Suelos contaminados con 10 ppm de suelo de atrazina e inoculados con *Pseudomonas* cepa ADP resultaron en un 60% de mineralización del herbicida en 49 días de experimentación con una vida media del compuesto de 1 día. Sin embargo, la adición de la misma cepa a suelos con un pH bajo y con alto contenido de materia orgánica, la degradación de atrazina fue menor, con una vida media de 19 y 22 días, respectivamente (Yanze-Kontchou & Gschwind, 1994).

En *Pseudomonas nitroreducens* P41 y en *Pseudomonas citronellosis* P21, el ácido cianúrico fue un buen inductor de la ruta de degradación de simazina. La adición de ácido cianúrico en los microcosmos tratados (Ralebitso et al., 2003) produjo una disminución de la mineralización de atrazina desde los suelos. Las condiciones de exceso para un microorganismo pueden ser las condiciones limitantes para otro (Alvey & Crowley, (1995).

Los resultados ponen claramente de manifiesto las diferencias que pueden existir entre los ensayos con medios definidos y los ensayos en entornos más naturales. Se denota la importancia de los experimentos en microcosmos a la hora de planear estrategias eficientes de remediación de suelos contaminados.

En este trabajo se caracterizaron en mayor profundidad, dos cepas bacterianas: *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21. Además de la capacidad que demostró *Pseudomonas nitroreducens* P41 para ser usada como modelo de estudios genéticos, ambas cepas poseen cualidades fundamentales para ser empleadas en descontaminación de suelos: la gran capacidad de degradación del herbicida simazina en diferentes condiciones y la viabilidad demostrada en condiciones de campo. Se ha descrito que bacterias nativas de sitios contaminados, han demostrado ser más resistentes a las variaciones de los ambientes naturales (Ralebitso et al., 2003).

Las aplicaciones de inóculos de *Pseudomonas nitroreducens* P41 y de *Pseudomonas citronellosis* P21 en concentraciones de  $10^8$  UFC/gr de suelo, fueron suficientes para mineralizar 20 ppm de simazina en suelos. Si consideramos que las aplicaciones en Chile son de 3,6 ppm de simazina (Narváez, 1999), existen grandes posibilidades de una descontaminación eficiente en los suelos tratados.

*Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 no sólo constituyen modelos para estudios genéticos, sino también interesantes biocatabolizadores para la descontaminación de suelos contaminados con herbicidas s-triazinas.

**Conclusiones**

---

## 5.

## Conclusiones

- En este estudio se caracterizaron 32 cepas bacterianas. El 78% de las cepas fueron Gram negativo y un 22% Gram positivo. En base a la tinción Gram y al fenotipo de las colonias, fueron clasificadas en 8 grupos. 15 de estas cepas fueron identificadas como *Stenotrophomonas maltophilia* mediante secuenciación del gen que codifica el rRNA 16S.
- Se detectaron los genes *atzA*, *atzB*, *atzC*, *atzD*, *atzE* y *atzF* en 9 cepas bacterianas para la degradación de s-triazinas. En 23 de las cepas se detectaron solo algunos de los genes *atz*
- Se seleccionaron *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 para ensayos de biorremediación de simazina en base a los siguientes criterios: presencia de genes catabólicos, formación de halos de degradación, facilidad de cultivo, obtención de alta biomasa durante el crecimiento, antecedentes del rol ecológico del microorganismo y degradación de simazina.
- Los experimentos de degradación con células en reposo indicaron que *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 poseen mecanismos de regulación de las enzimas catabólicas de s-triazinas. Al crecer *Pseudomonas nitroreducens* P41 empleando amonio como fuente de nitrógeno, la degradación de simazina se inhibió. Al emplear nitrato como fuente de nitrógeno, la degradación de simazina se inhibió parcialmente. En *Pseudomonas citronellosis* P21 la degradación se mantuvo independiente de la fuente de nitrógeno que se emplea en el crecimiento.
- Los genes *atzA*, *atzB* y *atzC* de *Pseudomonas nitroreducens* P41 se expresaron constitutivamente. La regulación de la ruta de degradación de simazina ocurrió a nivel de la ruta inferior en el gen *atzD*.
- La degradación de s-triazinas en *Pseudomonas nitroreducens* P41 está sujeta a regulación por fuentes de nitrógeno y por un control global de regulación del

nitrógeno. Durante el crecimiento en un medio rico como LB y con fuentes de nitrógeno como amonio y nitrato se observó una menor expresión del gen *atzD*. Simazina, ácido cianúrico y condiciones de nitrógeno limitante inducen la expresión de *atzD*.

- La secuencia de la región reguladora *atzD-atzR* en *Pseudomonas nitroreducens* P41 es similar al descrito para *Pseudomonas* sp. ADP. Sin embargo, en *Pseudomonas nitroreducens* P41 el nitrato reprimió la degradación de simazina sólo parcialmente.
- *Pseudomonas* sp. P21 y *Pseudomonas* sp. P41 pierden la capacidad de formar halo de degradación al crecerlas en medios ricos. Se observó que esta condición está relacionada con la pérdida del gen *atzA* de la ruta de degradación de simazina.
- *Pseudomonas nitroreducens* P41 es un modelo para estudios génicos de degradación de s-triazinas.
- *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 fueron eficientes en degradar simazina en microcosmos de suelos conteniendo amonio y nitrato. Ambas cepas mantuvieron su viabilidad y su potencial degradativo en el suelo por períodos largos de tiempo. *Pseudomonas nitroreducens* P41 y *Pseudomonas citronellosis* P21 podrían ser empleadas en ensayos de biorremediación de simazina.
- La bioestimulación de suelos con succinato favoreció el crecimiento de bacterias heterótrofas, pero no mejoró la degradación de simazina por *Pseudomonas citronellosis* P21.



## 6.

## Referencias

1. Agulló, L., Cámara, B., Martínez, P., Latorre-Reyes, V. and Seeger, M. 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.
2. Alvey S.A. and D.E. Crowley. 1995. Survival and activity of an atrazine mineralizing bacterial consortium of atrazine as a nitrogen-source. *J. Environ Qual.* **24**: 1156-1162.
3. Atlas, R.M. and R. Barth. 1992. Hydrocarbon biodegradation and oil spill bioremediation. *Adv. Microb. Ecol.* **12**: 287-338.
4. Bagdasarian, M., Lurz, R., Reuckert, B., Franklin, F.C.H., Bagdasarian, M.M., Frey, J., Timmis, K.N., 1981. Specific-purpose plasmid cloning vectors, II. Broad-host-range, high-copy-number, RSF1010-derived vectors, and a host-vector system for gene cloning in *Pseudomonas*. *Gene* **16**: 237-247.
5. Bedard, D. L., R. Unterman, L. H. Bopp, M. J. Brennan, M. L. Haberl, and C. Johnson. 1986. Rapid assay for screening and characterizing microorganisms for the ability to degrade polychlorinated biphenyls. *Appl. Environ. Microbiol.* **4**: 761-768.
6. Bending, G., Lincoln, S., Sorensen, S., Morgan, J.A., Aamand, J. and A. Walker. 2003. In-field spatial variability in the degradation of the phenyl-urea herbicide isoproturon is the result of interactions between degradative *Sphingomonas* spp. and soil pH. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 827-834.
7. Bichat, F., G. K. Sims, and R. L. Mulvaney. 1999. Microbial utilization of heterocyclic nitrogen from atrazine. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **63**: 100-110.
8. Binks, P., Nicklin, S. and N.C. Bruce. 1995. Degradation of Hexahydro-1,3,5-Trinitro-1,3,5-Triazine (RDX) By *Stenotrophomonas maltophilia* PB1. *Applied and Environ. Microbiol.* **61**: 1318-1322.
9. Biradar, D.P. and A.L. Rayburn. 1995. Chromosomal damage induced by herbicide contamination at concentrations observed in public water supplies. *J. Environ. Qual.* **24**: 1222-1225.
10. Blatny, T. Brautaset, H.C. Winther-Larsen, K. Haugan and S. Valla. 1997. Construction and use of a versatile set of broad-host-range cloning and expression vectors based on the RK2 replicon. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 370-379.
11. Bopp, L. H. 1986. Degradation of highly chlorinated PCBs by *Pseudomonas* strain LB400. *J. Ind. Microbiol.* **1**: 23-29.
12. Boundy-Mills, K., De Souza, M., Mandelbaum, R., Wackett, L.P. and M.J. Sadowsky. 1997. The *atzB* gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel triazine degradation pathway. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 916-923.
13. Bouquard, C., J. Ouazzani, J.-C. Prome, Y. Michel-Briand, and P. Plesiat. 1997. Dechlorination of atrazine by a *Rhizobium* sp. isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 862-866.
14. Brodkorb, T.S. and R.L. Legge. 1992. Enhanced biodegradation of phenanthrene in oil tar-contaminated soils supplemented with *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3117-3121.
15. Burrows, H.D., Canle M.L., Santaballa, J.A. and S. Steenken. 2002 Reaction pathways and mechanisms of photodegradation of pesticides. *J Photochem Photobiol B: Biol.* **67**: 71-108.

16. Cámara, B., Herrera, C., Gonzales, M. Couve, E., Hofer, B. and M. Seeger. 2004. From PCBs to highly toxic metabolites by the biphenyl pathway. *Env. Microbiol.* **6**: 842-850.
17. Cases, I. and V. De Lorenzo. 1998. Expression systems and physiological control of promoter activity in bacteria. *Curr. Opin. Microbiol.* **1**: 303-310.
18. Cases, I. and V. De Lorenzo. 2005. Promoters in the environment: Transcriptional regulation in its natural context. *Nature Rev. Microbiol.* **3**: 105-118.
19. Cereceda-Balic, F., Fadic-Ruiz, X., Llanos, A. L. y M. Seeger. 2006. Degradación y movilidad del herbicida simazina en suelo: estudio en un huerto de paltos en Chile. En: "Medioambiente en Iberoamérica: Visión desde la Física y la Química en los albores del siglo XXI" (Gallardo, J. F., ed.), **2**: 173-180. Gráficas Diputación de Badajoz, Badajoz, España.
20. Chaudhary, P., Kumar, M., Khangarot, B.M. and A. Kumar. 2005. Degradation and Detoxification of hexachlorocyclohexane isomers by *Pseudomonas aeruginosa* ITRC-5 Intern. *Biodeterioration & Biodegradation*, **57**: 107-113.
21. Cohen, S., S. Creager, R. Carsel, and C. Enfield. 1984. Potential pesticide contamination of groundwater from agricultural uses. In Mandelbaum *et al.*, 1995.
22. Cook, A. M., Beilstein, P., Grossenbacher, H. and R. Hutter. 1985. Ring cleavage and degradative pathway of cyanuric acid in bacteria. *Biochem. J.* **231**: 25-30.
23. Cheng, G., Shapir, N., Sadowsky, M. and L. Wackett. 2005. Allophanate hydrolase, not urease, functions in bacterial cyanuric acid metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4437-4445.
24. De Souza, M., Wackett, L.P. Boundy-Mills, K., Mandelbaum, R.T. and M. Sadowsky. 1995. Cloning, characterization, and expression of a gene region from *pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3373-3378.
25. De Souza, M., Sadowsky, M. and L. Wackett. 1996. Atrazine Chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: Gene Sequence, Enzyme Purification, and Protein Characterization. *J. Bacteriol.* **16**: 4894-4900.
26. De Souza, M., Newcombe, D., Alvey, S., Crowley, D.E., Hay, A., Sadowsky, M.J., and L.P. Wackett. 1998 (a). Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 178-184.
27. De Souza, M., Seffernick, J., Martinez, B. and M. Sadowsky. 1998 (b). The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *J. Bacteriol.* **180**: 1951-1954.
28. Devers, M., Soulas, G. and F. Martin-Laurent. 2004. Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *J. Microbiol. Meth.* **56**: 3-15.
29. Dinamarca, A., Aranda-Olmedo, I., Puyet, A. and F. Rojo. 2003. Expression of the *Pseudomonas putida* OCT plasmid alkane degradation pathway is modulated by two different global control signals: Evidence from continuous cultures. *J. Bacteriol.* **185**: 4772-4778.
30. Di gioia, D., Peel, M., Fava, F. and R.C. Wyndham. 1998. Structures of homologous composite transposons carrying *cbaabc* genes from Europe and North America. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1940-1946.
31. EPA. 2003. Executive Summary. Registration Eligibility Decision (IREL). January 31, 2003, Atrazine IRED.
32. Espinosa-Urgel, M., A. Salido, and J. L. Ramos. 2000. Genetic analysis of functions involved in adhesion of *Pseudomonas putida* 1 to seeds. *J. Bacteriol.* **182**: 2363-2369.

33. Freedman, B. 1989. Environmental ecology. The impacts of pollution and other stresses on California: Academic Press.
34. Fruchey, I., Shapir, N., Sadowsky, M. and L. Wackett. 2003. On the origins of cyanuric acid hydrolase: purification, substrates, and prevalence of *atzD* from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 3633-3657.
35. García-González, V., Govantes, F., Porrúa, O. and E. Santero. 2005. Regulation of the *Pseudomonas* sp. Strain ADP Cyanuric Acid. *J. Bacteriol.* **6187**: 155-167.
36. García-González, V., Govantes, F., Shaw, L.J., Burns, R.G. and E. Santero. 2003. Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6987-6993.
37. Garrido, T., Costa, C., Fraile, J., Orejudo, E., Niñerola, J., Ginebreda, A. Olivella, L. y M. Figueras. 1998. Análisis de la presencia de plaguicidas en diversos acuíferos de cataluña. Jornadas sobre la contaminación de las aguas subterráneas: un problema pendiente. Encuentro Valencia. AIH-GE.
38. Giovannoni, S.J., DeLong, E.F., Olsen, G.J. and N.R. Pace. 1988. Phylogenetic group-specific oligodeoxynucleotide probes for identification of single microbial cells. *J. Bacteriol.* **170**: 720-726.
39. Hanahan D. 1983. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
40. Haigler, B.E., Pettigrew, T.C.A. and J.C. Spain. 1992. Biodegradation of mixtures of substituted benzenes by *Pseudomonas* sp. strain JS 150. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2237-2244.
41. Hayes, T., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. and A. Vonk. 2002. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **99**: 5476-5480.
42. Hayes, T. 2005. Welcome to the revolution: Integrative biology and assessing the impact of endocrine disruptors on environmental and public health. *Integr. Comp. Biol.* **45**: 321-329.
43. Hernández, M. 2004. Aislamiento y caracterización de cepas bacterianas del valle de Aconcagua capaces de degradar herbicidas del tipo s-triazinas. Tesis para optar al grado de Licenciado en Ciencias del Mar y título de Biólogo Marino. Universidad Católica de la Santísima Concepción. Facultad de Ciencias. Concepción, Chile.
44. Hernández, M., Morgante, V., Flores, C., Villalobos, P., González, M., Miralles, P., Dinamarca, A. and M. Seeger. 2008. Modern approaches for the study of bioremediation of s-triazine herbicides in agricultural soils. *J. Soil Sci. & Plant Nutrition*. In press.
45. Johnsen, A., Schmidt, S., Hybholt, T.K., S., Carsten, H., Jacobsen, S. and O. Andersen. 2007. Strong impact on the polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH)-Degrading community of a PAH-polluted soil but marginal effect on PAH degradation when priming with bioremediated Soil dominated by *Mycobacteria*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1474-1480.
46. Kanaly, R. and Harayama, S. 2000. Biodegradation of High-Molecular-Weight Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Bacteria. *J. Bacteriol.* **182**: 2059-2067.
47. Kästner, M., Breuer-Jammali, M. and B. Mahro. 1998. Impact of inoculation protocols, salinity, and pH on the degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHS) and survival of PAH-degrading bacteria introduced into soil. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 359-362.
48. Konstantinou, I.K., Sakellarines, T.M., Sakkas, V.A. and T.A. Albanis. 2001. Photocatalytic degradation of selected s-triazine herbicides and organophosphorus insecticides over aqueous TiO<sub>2</sub> suspensions. *Environ. Sci. Technol.* **35**: 398-405.

49. Kovach, R.W. Phillips, P.H. Elzer, R.M. Roop and K.M. Peterson. 1994. pBBR1MCS: broad host range cloning vector. *Biotechniques*. **16**: 800-802.
50. Kruczak-Filipov, P. and R.G. Shively. 1992. Aerobic bacteriology: Gram strain procedure. In: *Microbiology Procedures Handbook*. Ed. M. Pezzlo. ASM press. Washington, USA.
51. Kruger, E.L., P.J. Rice, J.C. Anhalt, T.A. Anderson, and J.R. Coats. 1997. Comparative fates of atrazine and deethylatrazine in sterile and nonsterile soils. *J. Environ. Qual.* **26**: 95-101.
52. Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **82**: 6955-6959.
53. Liu, S. and J.M. Suflita, 1993. Ecology and evolution of microbial populations for bioremediation. *Trends Biotechnol.* **11**: 344-352.
54. Mandelbaum, R.T., Wackett. L.P. and D.L. Allan. 1993. Mineralization of the s-triazines ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 1695-1701.
55. Mandelbaum, R.T., Allan, D.L., and L.P. Wackett. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 1451-1457.
56. Ma, J. and N.J.D. Graham. 2000. Degradation of atrazine by manganese-catalysed ozonation. Influence of radical scavengers. *Water Res.* **34**: 3822-3828.
57. Margesin, R. and F. Schinner. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 3127-3133.
58. Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L.P., Wing, R. and M.J. Sadowsky. 2001. Complete Nucleotide Sequence and Organization of the Atrazine Catabolic plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. strain ADP. 2001. *J. Bacteriol.* **183**: 5684-5697.
59. Martínez-Pérez, O., Moreno-Ruiz, E. Floriano, B. and E. Santero. 2004. Regulation of tetralin biodegradation and identification of genes essential for expression of *thn* operons. *J. Bacteriol.* **186**: 6101-6109.
60. Merrick, M. J., and R. A. Edwards. 1995. Nitrogen control in bacteria. *Microbiol. Rev.* **59**: 604-622.
61. Miller, J. H. 1992. A short course in bacterial genetics: a laboratory manual, p. 72-74. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA
62. Mulbry, W.W. 1994. Purification and characterization of an inducible s-triazine hidrolase from *Rhodococcus corllinus* NRRL B-15444R. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 613-618.
63. Nagy, I., Compennolle, F., Ghys, K., Vanderleyden, J. and R. De Mot. 1995. A single cytochrome P-450 system is involved in degradation of the herbicides ETPC (s-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine by *Rhodococcus* sp. strain ni86/21. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2056-2060.
64. Navia, R. y M. Seeger. 2006. Biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes (COPs), Vol. 1, 225 pp., Editorial Universidad de La Frontera, Temuco.
65. Narvárez, M. 1999. Enfermedades foliares en *Pinus ponderosa*: Momento de decisiones. *Chile Forestal.* **275**: 28-29.
66. Newby, D.T., Gentry, T.J. and I.L. Pepper. 2000. Comparison of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid degradation and plasmid transfer in soil resulting from bioaugmentation with two different pJP4 donors. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3399-3407.

67. Newcombe, D.A. and D.E. Crowley. 1999. Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**: 877-872.
68. Ninfa, A.J., Atkinson, M.R., Kamberov, E.S., Feng, J. and E.G. Ninfa. 1995. Control of nitrogen assimilation by the NRI-NRII two-component system of enteric bacteria, p. 67-88. In J. A. Hoch and T. J. Silhavy (ed.). Two component signal transduction. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington, D.C.
69. Nordin, K., Unell, M. and J.K. Jansson. 2005. Novel 4-Chlorophenol degradation gene cluster and degradation route via hydroxyquinol in *Arthrobacter chlorophenolicus* A6. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6538-6544.
70. Norris, R. D. 1994. Handbook of bioremediation. In Tirola, M.A., Männisto, M., Puhakka, J.A. and M. Kulomaa. Isolation and characterization of *Novosphingobium* sp. strain MT1, a dominant polychlorophenol-degrading strain in a groundwater bioremediation system. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 173-180.
71. O'leary, D., O'Connor, K., Duetz, W., and A.D.W. Dobson. 2001. Transcriptional regulation of styrene degradation in *Pseudomonas putida* ca-3. *Microbiology.* **147**: 973-979.
72. Ogawa, N., and K. Miyashita. 1995. A transposon-like structure carrying genes for the catabolism of 3-chlorobenzoate on a plasmid from *Alcaligenes eutrophus* strain NH9. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 3788-3795.
73. Ortiz-Hernández, M., Sánchez-Salinas, E., Vázquez-Duhalt, R. y Quintero-Ramírez, R. 1997. Plaguicidas organofosforados y ambiente. *Biotecnol.* **3**: 129-151. México.
74. Parales, R.E., Bruce, N.C., Schmid, A. and L.P. Wackett. 2002. Biodegradation, biotransformation, and biocatalysis (B<sub>3</sub>). *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 4699-4709.
75. Peel, M. & C. Wynham, 1999. Selection of *clc*, *cba*, and *fc*b chlorobenzoate-catabolic genotypes from groundwater and surface water adjacent to the Hyde park, Niagara falls, chemical landfill. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 1627-1635.
76. Radosevich, M., S. J. Traina, Y. Hao, and O. H. Tuovinen. 1995. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 297-302.
77. Ralebitso, T.K., Senior, E., and H.W. van Verseveld. 2002. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegrad.* **13**: 11-19.
78. Rhine, J.J. Fuhrmann and M. Radosevich. 2003. Microbial community response to atrazine exposure and nutrient availability: linking degradation capacity to community structure. *Microb. Ecol.* **46**: 145-160.
79. Rousseaux, S., Hartmann, A. and 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.
80. Rousseaux, S., Soulas, G. and A. Hartmann. 2002. Plasmid localization of atrazine-degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strain. *FEMS Microbiol. Ecol.* **41**: 69-85.
81. Sajjaphan, A., Shapir, N., Wackett, L., Palmer, M., Blackmon, B., Tomkins, J. and M. Sadowsky. 2004. *Arthrobacter aurescens* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 4402-4407.
82. Sadowsky, M. J., Z. Tong, M. L. de Souza, and 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.
83. Sambrook, J. and D.S. Russel. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. USA.

84. Sanborn, M.D., Cole, D., Abelsohn, A. and E. Weir. 2002. Pesticides identifying and managing adverse environmental health effects. *Can. Med. Assoc. J.* **166**: 1431-1435.
85. Schell, M. A. 1993. Molecular biology of the LysR family of transcriptional regulators. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 597-626.
86. Seffernick, J., Johnson, G., Sadowsky, M.J. and L.P. Wackett. 2000. substrate specificity of atrazine chlorohydrolase and atrazine-catabolizing bacteria *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 4247-4252. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3614-3621.
87. Shao, Z. Q., and R. Behki. 1995. Cloning of the genes for degradation of the herbicides EPTC (s-ethyl dipropylthiocarbamate) and atrazine from *Rhodococcus Yanze-Kontchou*, sp. strain TE1. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 2061-2065.
88. Shapir, N., Osborne, J., Johnson, G., Sadowsky, M. and L. Wackett. 2002. Purification, substrate range, and metal center of *atzC*: the *N*-Isopropylammelide aminohydrolase involved in bacterial atrazine metabolism. *J. Bacteriol.* **184**: 5376-5384.
89. Shimao, M., Onishi, S., Mizumori, S., Kato, N. and C. Sakazawa 1989. Degradation of 4-chlorobenzoate by facultatively alkalophilic *Arthrobacter* sp. strain SB8. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 478-482.
90. Siddavattam, D., Khajamohiddin, S., Manavathi, B., Pakala, S.B. and M. Merrick. 2003. Transposon-like organization of the plasmid-borne organophosphate degradation (*opd*) gene cluster found in *flavobacterium* sp. *Appl. Envir. Microbiol.* **69**: 2533-2539.
91. Sorensen, S., Ronen, Z. and J. Aamand. 2002. Growth in coculture stimulates metabolism of the phenylurea herbicide isoproturon by *Sphingomonas* sp. strain SRS2. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 3478-3485.
92. Spiker, J., Crawford, D. and R.L. Crawford. 1992. Influence of 2,4,6-Trinitrotoluene (TNT) concentration on the degradation of TNT in explosive-contaminated soils by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3199-3202.
93. Staskawicz, B., Dahlbeck, D., Keen, K. and C. Napoli. 1987. Molecular characterization of cloned avirulence genes from race 0 and race 1 of *Pseudomonas syringae* PV. *glycinea*, *J. Bacteriol.* **169**: 5789-5794.
94. Struthers, J. K., Jayachandran, K. and 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.
95. Sundby C., Chow, W.S., Anderson, J.M. 1993. Effects on photosystem II function, photoinhibition, and plant performance of the spontaneous mutation of serine-264 in the photosystem II reaction center D1 protein in triazine-resistant *Brassica napus* L. *Plant Physiol.* **103**: 105-113.
96. Suresh, K., Prakash, D., Rastogi, N. and R. K. Jain. 2007. *Clostridium nitrophenolicum* sp. nov., a novel anaerobic *p*-nitrophenol-degrading bacterium, isolated from a subsurface soil sample. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 1886-1890.
97. Tappe, W., J. Groeneweg, and B. Jantsch. 2002. Diffuse atrazine pollution in German aquifers. *Biodegrad.* **13**: 3-10.
98. Thompson, J. D., Higgins, D.G. and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
99. Topp, E., Zhu, H., Nour, S., Houot, S., Lewis, M. and D. Cuppels. 2000a. Characterization of an atrazine-degrading *Pseudaminobacter* sp. isolated from Canadian and French agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 2773-2782.

100. Topp, E., Mulbry, W.M., Zhu H., Nour, S.M. and D. Cuppels. 2000b. Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 3134-3141.
101. Turnbull, G. A., Ousley, M., Walker, A., Shaw, E. and J.A. Morgan. 2001. Degradation of substituted phenylurea herbicides by *Arthrobacter globiformis* strain D47 and characterization of a plasmid-associated hydrolase gene, *puhA*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2270-2275.
102. Wackett, L. and C.D. Hershberger. 2001. Biocatalysis and biodegradation. AMS Press. 228 pp. Washington, USA.
103. Waters, V.J., Gómez, M., Soong, G., Amin, S. Ernst, R.K. and A. Prince. 2007. Immuno-stimulatory properties of the emerging pathogen *Stenotrophomonas maltophilia*. *Infect. Immun.* **75**: 1698-1703.
104. Whyte, L.G., Bourbonnie, L., and C.W. Greer. 1997. Biodegradation of petroleum hydrocarbons by psychrotrophic *Pseudomonas* strains possessing both alkane (*alk*) and naphthalene (*nah*) catabolic pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3719-3723.
105. Yanze-Kontchou and N. Gschwind. 1994. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:4297-4302.
106. Yue, Z, Economy, J., Rajagopalan, K., Bordson, G., Piwoni, M., Ding, Li., Snoeyink, V.L. and B. Mariñas. 2006. Chemically activated carbon on a fiberglass substrate for removal of trace atrazine from water *J. Mater. Chem.* **16**: 3375-3380.
107. Zhang, L., Li., X-Z, and K. Poole. 2000. Multiple antibiotics resistance in *Stenotrophomonas maltophilia*: involvement of a multidrug efflux system. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**: 287-293.



## Anexos

### Presentaciones a Congresos Nacionales

- Villalobos P., García-González V., Govantes F., Santero E., González, M. y Seeger M. Reunión anual de la Sociedad de Microbiología de Chile. Regulation of simazine degradation by *Pseudomonas* sp. strain P41 isolated from agriculture soils contaminated with herbicides. *Biological Research*, 38 (2-3) R-59. Pucón, Chile. Octubre, 13-16 2005.
- Hernández, M., Villalobos P., González M., y M. Seeger. Análisis de bacterias para la biorremediación de agroquímicos en suelos agrícolas. Reunión anual de la Sociedad de Microbiología de Chile. *Biological Research*, 38 (2-3) R-140. Pucón, Chile. Octubre, 13-16 2005.
- Villalobos P., González M. y M. Seeger. Degradation of simazine using *Pseudomonas* sp. P41 isolated from soils treated with simazine. XXVI Congreso Chileno de Microbiología. Diciembre, 2004. Valparaíso, Chile.
- Villalobos, P., Hernández, M., Ávila M., González, M. y Seeger, M. Metabolism of s-triazines by bacteria isolated from agriculture soils contaminated with herbicides. 2003. XXV Congreso Chileno de Microbiología. Dr. Juan Noé. Antofagasta, Chile. Acta Microbiológica, Vol. 9, p. 124, Noviembre, 2003.
- Hernández, M., Cámara, B., Villalobos, P., González, M., and Seeger, M. 2003. Isolation and characterization of herbicide-degrading bacteria from Aconcagua valley. XXV Chilean Congress of Microbiology. Antofagasta, Chile; Acta Microbiológica, Vol. 9, p. 122, November 2003.
- Ávila, M., Hernández, M., Villalobos, P., González, B. y M. Seeger, M. 2003. Identificación de bacterias degradadoras de simazina y caracterización de sus genes catabólicos. XXV Congreso Chileno de Microbiología. Antofagasta, Chile; Acta Microbiológica, Vol. 9, p. 121, Noviembre 2003.

### Presentaciones a Congresos Internacionales

- Seeger, M, Acevedo F, Saavedra, M, Agulló L, González M, Morgante V., Villalobos, P., Hernández, M. and C. Flores. 2006. Bioaugmentation strategies for recovery of soils polluted with POPs XVIII Congreso Latinoamericano de Microbiología, Pucón, Chile. 2006. Octubre 2006.
- Villalobos P., García-González V., Govantes F., Santero E. and M. Seeger. 2005. Simazine degradation by *Pseudomonas* sp. strain P41 isolated from herbicide-treated agricultural soils in Chile. 10th International Congress on *Pseudomonas*. Marseille, Francia. Abstract Book. P-124. Agosto, 2005.
- Dinamarca, A., Cereceda, F., Villalobos, P., González, M., Fadic, X. and M. Seeger. 2004. Molecular and physiological approaches for the evaluation of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) and s-triazines microbial catabolic activities in herbicides impacted soils. XII Global Biotechnology Forum. Octubre, 2004. Santiago, Chile.

## Solicitud de Patente

- Hernández, M., Morgante, V., Villalobos, P., Flores, C., González, M. y Seeger, M. 2007. Bacteria degradadora de herbicidas del tipo s-triazinas, un producto de biorremediación y un método de biorremediación. Patente de invención 1982/2007. Presentada en DPI, Ministerio de Economía, Chile, Julio 2007.

## Publicaciones

- Hernández, M, Morgante, V., Flores, C., Villalobos, P., González, M., Miralles, P., Dinamarca, A. and Seeger, M. 2008. Modern approaches for the study of bioremediation of s-triazine herbicides in agricultural soils. *J. Soil Sci. & Plant Nutrition*. In press.
- Hernández, M, Villalobos, P., Morgante, V., González, M., Reiff, C., Moore E. and Seeger, M. 2008. Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from Chilean agricultural soils, *Pseudomonas* sp. MHP41. Submitted.
- Villalobos P., García-González V., Santero E., González, M. and M. Seeger. 2008. Regulation of simazine degradation by *Pseudomonas nitroreducens* strain MHP41. *In preparation*.