

75660

**BACHETTI, ROMINA A.**

Investigadora de desarrollo de un espacio: abuelos y constructor de lecturas

2016

75660



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y NATURALES

Tesis para acceder al título de  
Doctora en Ciencias Biológicas

**BIODEGRADACIÓN DE PLAGUICIDAS DE USO AGRÍCOLA:  
AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS  
DEGRADADORAS PARA SU APLICACIÓN EN PROCESOS DE  
BIORREMEDIACIÓN**

**Mic. Romina A. Bachetti**

DIRECTORA: Dra. Carolina Morgante

CODIRECTORA: Dra. Elizabeth Agostini

Río Cuarto, Noviembre de 2016

085 1

Classif:
T. 1081

73660

**COMISIÓN ASESORA Y JURADO**

Dra. Susana Vázquez

Univ. de Buenos Aires

Firma.....Aclaración .....

Dra. María Julia Amoroso

Univ. Nacional de Tucumán

Firma.....Aclaración .....

Dra. Tania Taurian

Univ. Nacional de Río Cuarto

Firma.....Aclaración .....

hag Dra heiliana Odeino (UNRC)

**DEFENSA ORAL Y PÚBLICA**

Universidad Nacional de Río Cuarto, 2 de Noviembre de 2016

Calificación .....

*A Raquel y Víctor*

## AGRADECIMIENTOS

*A la Dra. Carolina Morgante, mi directora de Tesis, por haber confiado en mí desde el principio aun sin conocerme, por guiarme en este camino y por contagiarme su pasión por la ciencia.*

*A la Dra. Elizabeth Agostini, por sus aportes y sugerencias, por abrirme las puertas de su laboratorio y por su constante apoyo.*

*A las Dras. Tania Taurian, Susana Vázquez y María Julia Amoroso, miembros de la Comisión Asesora y Jurados de Tesis, por su dedicación en la lectura de cada informe y por sus incontables aportes y sugerencias que enriquecieron este trabajo.*

*A los directivos del IAP de Cs. Básicas de la Univ. Nac. de Villa María, por permitirme realizar este trabajo en la institución.*

*A CONICET, por el otorgamiento de las becas que han permitido la realización de este doctorado.*

*A las Dras. Marcela Ferrero y Cristina Estévez por recibirme en PROIMI, aceptar ayudarme y brindarme una grata estadía.*

*A mis compañeros del laboratorio de la UNVM, al principio unos pocos y hoy ya una gran familia. Gracias porque cada uno fue de gran ayuda en este recorrido, aportando conocimientos o brindando contención y apoyo. Es hermoso contar con ustedes!*

*Agradezco especialmente a quienes colaboraron directamente en los experimentos de esta tesis: Nati, Noe y Flor. Porque además de trabajar con dedicación y esmero son excelentes personas, sin su ayuda este trabajo hubiese sido mucho más difícil.*

*A mis microbios del alma, siempre presentes en mi vida aunque la distancia nos separe. Gracias por brindarme alojamiento en los numerosos cursos de postgrado en Río Cuarto, por escucharme siempre, responder a mis consultas laborales y por compartir esta hermosa profesión. Gracias por su amistad!*

*A las amigas que me crucé en este camino, Laura y Nadia. Empezamos siendo compañeras de trabajo y terminamos siendo compañeras de aventuras. Gracias por sus palabras justas y por todo el cariño brindado.*

*A mi mamá Raquel y mi papá Víctor, por enseñarme el valor del esfuerzo y la responsabilidad, por confiar siempre en mí, apoyarme en todas mis decisiones y sobre todas las cosas por brindarme su amor incondicional.*

*A mi hermano Leandro, mi primer amigo, mi compañero de vida, gracias por estar siempre en cada momento.*

*A Fede, por brindarme su amor, por tantas horas y planes postergados.*

*A mi abuela Nelly, por acompañarme en el camino de la vida y por darme su cariño. Y a quienes me acompañan desde el cielo: mis abuelos Orlando y Silvio, mi nona Irene y mi tía Haydeé.*

## ÍNDICE

---

Índice de tablas .....	ix
Índice de figuras .....	xi
Resumen en español e inglés .....	xiv
Abreviaturas .....	xvi

### CAPÍTULO 1 INTRODUCCIÓN GENERAL

1. La agricultura moderna y el uso de plaguicidas .....	1
1.1. Clasificación de plaguicidas .....	2
2. Las <i>s</i> -triazinas: un caso especial de herbicidas clorados.....	3
2.1. Procesos que condicionan el comportamiento de los herbicidas <i>s</i> -triazinas en el ambiente .....	5
2.1.1. Procesos de retención de <i>s</i> -triazinas en el suelo .....	7
2.1.2. Transporte de agua y herbicidas <i>s</i> -triazinas en el suelo .....	8
2.1.3. Procesos de transformación .....	10
2.1.3.1 Persistencia de los herbicidas <i>s</i> -triazinas en el ambiente .....	10
2.1.3.2. Degradación química.....	13
2.1.3.3. Degradación biológica o biodegradación .....	13
2.2. Los herbicidas <i>s</i> -triazinas como contaminantes frecuentes en los cuerpos de agua ....	15
2.2.1. El agua como recurso .....	15
2.2.2. Contaminación de ambientes acuáticos por <i>s</i> -triazinas.....	16
2.2.3. Toxicidad de los herbicidas <i>s</i> -triazinas.....	19
3. La biorremediación como tecnología para la recuperación de ambientes contaminados con herbicidas <i>s</i> -triazinas .....	21
3.1. Ventajas y desventajas de la biorremediación .....	23
3.2. Estrategias de biorremediación utilizadas en el tratamiento de ambientes contaminados .....	24
3.3. Inmovilización de bacterias en matrices poliméricas como alternativa biotecnológica actual en estrategias de bioaumentación.....	25
4. Métodos analíticos para la determinación de <i>s</i> -triazinas en muestras ambientales .....	27
4.1. Electroforesis Capilar .....	28
4.2. Inmunoensayos enzimáticos .....	30
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	31

### OBJETIVOS

Objetivos generales.....	33
Objetivos específicos .....	33

### CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS

1. Reactivos .....	35
1.1. Herbicidas.....	35
1.2. Quitosano.....	35
1.3. Cloruro de 2,3,5- trifenil -2H tetrazolio .....	36

1.4. Cicloheximida .....	36
2. Medios de cultivo .....	36
2.1. Medio Tripticasa Soya Agar (TSA) .....	36
2.2. Medio Mínimo Mineral M9 .....	36
2.3. Medio para motilidad .....	38
3. Soluciones .....	38
3.1. Buffer U .....	38
3.2. Buffer fosfato salino .....	38
3.3. Solución de PBS (10X) .....	39
3.4. Buffer TAE (50X) .....	39
3.5. Soluciones para DGGE .....	39
3.5.1. Solución de Acrilamida/Bis 40% (37:5:1) .....	39
3.5.2. Soluciones desnaturalizantes de Urea/ Formamida .....	40
3.5.3. Solución de persulfato de amonio .....	40
4. Monitoreo de atrazina en aguas superficiales de Córdoba .....	40
4.1. Sitios de monitoreo .....	40
4.2. Técnicas de recolección de muestras .....	42
5. Cepas bacterianas de referencia .....	42
6. Métodos de preservación de los microorganismos .....	43
7. Aislamiento de bacterias nativas potencialmente degradadoras de herbicidas <i>s</i> -triazinas .....	43
7.1. Caracterización morfológica y bioquímica de los aislamientos bacterianos .....	44
8. Estudios de cinética de crecimiento bacteriano .....	44
8.1. Preparación de preinóculos .....	44
8.2. Curvas de crecimiento .....	44
8.3. Estudios de la cinética de biodegradación de atrazina .....	45
8.3.1. Evaluación de la capacidad biodegradadora de atrazina de los aislamientos nativos .....	45
8.3.2. Ensayos de resting-cell .....	46
9. Detección y cuantificación de atrazina .....	46
9.1. Técnicas analíticas empleadas para muestras de aguas ambientales .....	46
9.1.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) .....	46
9.1.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA) .....	47
9.2. Técnicas analíticas empleadas en ensayos de biodegradación .....	48
9.2.1. Espectrofotometría UV-vis .....	48
9.2.2. Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC) .....	48
10. Estudio del impacto de atrazina sobre las comunidades microbianas nativas en ecosistemas acuáticos .....	49
10.1. Ensayos en microcosmos .....	49
10.2. Métodos microbiológicos convencionales para el recuento de bacterias .....	49
10.2.1. Recuento de microorganismos heterótrofos cultivables .....	49
10.2.2. Recuento de microorganismos degradadores de atrazina .....	50
11. Métodos de biología molecular .....	50
11.1. Extracción de ADN total .....	50
11.2. Extracción de ADN plasmídico .....	51
11.3. Extracción de ADN de las comunidades microbianas de los microcosmos .....	51
11.4. Reacción en cadena de la polimerasa .....	52
11.4.1. Amplificación del gen ARNr 16S para la identificación de cultivos puros .....	52
11.4.2. Amplificación del gen ARNr 16S de ADN de las comunidades bacterianas de los microcosmos .....	53



11.4.3. Amplificación de genes catabólicos de degradación de atrazina.....	53
11.5. Análisis de la estructura de las comunidades bacterianas mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE).....	55
11.5.1 Análisis de los geles .....	55
11.5.2. Escisión de las bandas .....	56
11.6. Visualización del ADN y de los productos de amplificación.....	56
11.7. Purificación y secuenciación de los productos de amplificación.....	57
11.8. Cuantificación del ADN .....	57
11.9. Análisis de las secuencias nucleotídicas de los productos de amplificación.....	57
12. Optimización de las condiciones de inmovilización de <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 en matriz polimérica de quitosano.....	58
12.1. Encapsulación de AAC22 en perlas de quitosano nativo .....	58
12.1.1. Evaluación del aspecto interno de las perlas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM).....	59
12.2. Adherencia de AAC22 en perlas de quitosano nativo.....	59
12.3. Encapsulación de AAC22 en perlas de quitosano derivatizado .....	60
12.3.1. Derivatización de quitosano con glucosa .....	60
12.3.2. Caracterización de quitosano derivatizado con glucosa .....	60
12.3.2.1. Determinación del grado de deacetilación por titulación potenciométrica.....	60
12.3.2.2. Determinación de masa molar de quitosano derivatizado por viscosímetro capilar .....	61
12.3.2.3. Análisis estructural de quitosano nativo y derivatizado por espectroscopía IR.....	62
12.3.3. Formación de perlas de quitosano derivatizado .....	62
13. Biodegradación de atrazina por <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 inmovilizadas en matriz de quitosano .....	63
14. Bioaumentación con <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 inmovilizadas en perlas de quitosano derivatizado para la remediación de atrazina .....	64
15. Estudios de toxicidad de la solución de remoción de atrazina en los ensayos de bioaumentación con <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22.....	64
16. Análisis estadístico.....	65

### **CAPÍTULO 3: DETECCIÓN DE ATRAZINA EN AGUAS SUPERFICIALES DE LA REGIÓN CENTRO-SUR DE CÓRDOBA**

1. Características hidroclimáticas de la provincia de Córdoba .....	67
1.1. Marco geomorfológico regional: la planicie fluvioeólica central.....	68
1.1.1. Paleoabánico aluvial y faja fluvial del río Citalamochita .....	68
2. Actividades productivas y aplicación de herbicidas en la provincia de Córdoba.....	71
3. Marco legal del uso de atrazina .....	72
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	75
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	76
Objetivos específicos .....	76
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
1. Contaminación con atrazina en aguas superficiales de la región centro-sur de Córdoba.....	77
<b>CONCLUSIONES</b> .....	93

## **CAPÍTULO 4: IMPACTO DE HERBICIDAS S-TRIAZINAS SOBRE COMUNIDADES BACTERIANAS NATIVAS DE AMBIENTES ACUÁTICOS**

1. Efecto de los herbicidas sobre las comunidades microbianas acuáticas .....	95
2. Técnicas de estudio en ecología microbiana .....	97
2.1. Electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) .....	100
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	102
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	103
Objetivos específicos .....	103
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
1. Impacto de atrazina sobre las comunidades microbianas nativas en ecosistemas acuáticos.....	104
1.1. Atenuación natural de atrazina en ambientes acuáticos de Córdoba .....	106
1.2. Efecto de atrazina sobre microorganismos heterótrofos cultivables y degradadores.....	112
1.3. Efecto de atrazina sobre la estructura de las comunidades microbianas Nativas.....	115
1.3.1. Presencia de genes catabólicos de degradación de atrazina .....	115
1.3.2. Análisis de las comunidades bacterianas nativas mediante DGGE .....	117
<b>CONCLUSIONES</b> .....	123

## **CAPÍTULO 5: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE ATRAZINA**

1. Mecanismos enzimáticos de degradación de atrazina.....	125
2. Especies bacterianas degradadoras de atrazina.....	128
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	132
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	133
Objetivos específicos .....	133
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
1. Aislamientos nativos de agua superficial potencialmente degradadores de s-triazinas.....	134
1.1. Identificación taxonómica de los aislamientos nativos tolerantes a atrazina .....	135
2. Características fenotípicas del aislamiento nativo <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22.....	138
2.1. Tolerancia a altas concentraciones de atrazina .....	138
2.2. Características morfológicas y fisiológicas .....	139
2.3. Efecto de diferentes condiciones de cultivo sobre el crecimiento de AAC22.....	141
2.4. Eficiencia del aislamiento AAC22 en la biodegradación de atrazina .....	144
2.4.1. Ensayos de resting-cell .....	144
2.4.2. Cinética de degradación de atrazina en cultivos líquidos.....	148
3. Genes catabólicos de degradación de atrazina en el aislamiento AAC22.....	148
4. Estudios de toxicidad de la solución de remoción de atrazina en ensayos de bioaumentación con <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22.....	152
<b>CONCLUSIONES</b> .....	155

## **CAPÍTULO 6: INMOVILIZACIÓN DE *Arthrobacter* sp. AAC<sub>22</sub> EN MATRIZ DE QUITOSANO: OPTIMIZACIÓN Y ENSAYOS DE BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS**

1. Biotecnologías que permiten la eliminación de herbicidas en ambientes contaminados: la biorremediación .....	157
1.1. El bioaumentación como estrategia de remediación: requisitos para	

su implementación .....	158
1.1.1. Rol del bioaumentación en la remediación de ambientes contaminados con atrazina ..	160
2. Inmovilización de microorganismos en matrices poliméricas: el polisacárido quitosano .....	161
2.1. Características generales del quitosano .....	161
2.2. Inmovilización de bacterias en matriz de quitosano: su aplicación en tecnología ambiental .....	163
2.3. Modificaciones de las propiedades de quitosano mediante reacciones de derivatización.....	164
<b>HIPÓTESIS DE TRABAJO</b> .....	166
<b>OBJETIVO GENERAL</b> .....	167
Objetivos específicos .....	167
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	
1. Inmovilización de <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 en matrices poliméricas de quitosano y eficiencia de biodegradación .....	168
1.1. Encapsulación de AAC22 en perlas de quitosano nativo .....	168
1.2. Adherencia de AAC22 en perlas de quitosano nativo.....	170
1.2.1. Biodegradación de atrazina con <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 adheridas a perlas de quitosano nativo .....	171
1.3. Encapsulación de AAC22 en perlas de quitosano derivatizado .....	172
1.3.1. Derivatización de Q con glucosa.....	172
1.3.2. Caracterización de Q derivatizado .....	172
1.3.3. Capacidad antimicrobiana y encapsulación de AAC22 en perlas de Q derivatizado.....	174
1.3.4. Biodegradación con <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 encapsuladas en perlas de Q derivatizado .....	179
2. Biorremediación de atrazina en agua mediante estrategias de bioaumentación .....	182
2.2. Bioaumentación con AAC22 encapsuladas en perlas de Q derivatizado .....	182
<b>CONCLUSIONES</b> .....	187
<b>CONSIDERACIONES FINALES</b> .....	189
<b>PROYECCIONES</b> .....	195
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	197

## ÍNDICE DE TABLAS

---

<b>Tabla 1.</b> Clasificación de los plaguicidas según su estructura química.....	2
<b>Tabla 2.</b> Propiedades fisicoquímicas de atrazina .....	4
<b>Tabla 3.</b> Antecedentes de detección de atrazina en sistemas hídricos superficiales y subterráneos .....	18
<b>Tabla 4.</b> Preparación de soluciones para la obtención de diferentes gradientes de urea/formamida .....	40
<b>Tabla 5.</b> Estaciones de monitoreo de aguas superficiales de la región centro-sur de la provincia de Córdoba .....	41
<b>Tabla 6.</b> Condiciones de amplificación del gen ARNr 16S.....	52
<b>Tabla 7.</b> Condiciones de amplificación del gen ARNr 16S.....	53
<b>Tabla 8.</b> Descripción de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes de la vía catabólica de degradación de atrazina .....	54
<b>Tabla 9.</b> Condiciones de amplificación del gen <i>trzN</i> .....	54
<b>Tabla 10.</b> Condiciones de amplificación de los genes <i>atzABCDEF</i> .....	55
<b>Tabla 11.</b> Tratamiento y controles empleados en el ensayo de toxicidad con algas .....	65
<b>Tabla 12.</b> Límites permisibles de atrazina en agua .....	73
<b>Tabla 13.</b> Concentración de atrazina en aguas superficiales de la región centro-sur de Córdoba (monitoreos 2011-2015).....	78
<b>Tabla 14.</b> Características físico-químicas de las aguas superficiales empleadas en los ensayos en microcosmos .....	105
<b>Tabla 15.</b> Principales aislamientos bacterianos degradadores de atrazina descriptos hasta la actualidad .....	130
<b>Tabla 16.</b> Identificación taxonómica de aislamientos bacterianos tolerantes a atrazina.....	136
<b>Tabla 17.</b> Caracterización bioquímica del aislamiento AAC22 (Sistema API 20NE) 140	
<b>Tabla 18.</b> Constantes de velocidad de crecimiento de <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 en diferentes condiciones de cultivo .....	142
<b>Tabla 19.</b> Constantes de velocidad de crecimiento de <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 a diferentes valores de pH .....	144
<b>Tabla 20.</b> Porcentajes de identidad de las secuencias de los genes <i>trzN</i> , <i>atzB</i> y <i>atzC</i> de <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 con secuencias disponibles en la base de datos.....	150
<b>Tabla 21.</b> Principales parámetros de toxicidad de atrazina contra el alga <i>P. subcapitata</i> .....	154
<b>Tabla 22.</b> Toxicidad de atrazina contra el alga <i>P. subcapitata</i> en ensayos de bioaumentación con AAC22 .....	154
<b>Tabla 23.</b> Conservación de <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 en perlas de Q <sub>M</sub> a 4 °C .....	169
<b>Tabla 24.</b> Adherencia de <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 a perlas de Q <sub>M</sub> 1% .....	170
<b>Tabla 25.</b> Valores de %GDA y M <sub>V</sub> para muestras de Q nativo y Q derivatizado.....	172
<b>Tabla 26.</b> Características de las perlas de QD.....	175

<b>Tabla 27.</b> Conservación de <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 a 4 °C en perlas de QD.....	176
<b>Tabla 28.</b> Biodegradación de atrazina por <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 inmovilizadas en perlas de QD 1% .....	180
<b>Tabla 29.</b> Vida media de atrazina en las sucesivas reinoculaciones de perlas de QD+AAC22 .....	184

## ÍNDICE DE FIGURAS

---

<b>Figura 1.</b> Estructura química de <i>s</i> -triazinas y miembros de la familia diferenciados por los grupos R1 y R2 unidos al anillo .....	4
<b>Figura 2.</b> Procesos que determinan la dinámica de los herbicidas en el ambiente .....	6
<b>Figura 3.</b> Inmovilización de bacterias utilizando la técnica de encapsulación .....	26
<b>Figura 4.</b> Esquema general de un equipo de electroforesis capilar .....	28
<b>Figura 5.</b> Representación de las interacciones que ocurren en el interior del capilar .....	29
<b>Figura 6.</b> Estaciones de monitoreo de aguas superficiales en la región centro-sur de Córdoba .....	41
<b>Figura 7.</b> Modelo digital del terreno de la provincia de Córdoba .....	69
<b>Figura 8.</b> Concentración media de atrazina en agua superficial (2011-2015) en otoño y primavera .....	79
<b>Figura 9.</b> Análisis descriptivo de la distribución de las concentraciones de atrazina .....	80
<b>Figura 10.</b> Análisis descriptivo del comportamiento de las concentraciones de atrazina vs. sitio de monitoreo .....	81
<b>Figura 11.</b> Análisis descriptivo de las variables concentración de atrazina vs. ubicación de los sitios de monitoreo .....	82
<b>Figura 12.</b> Análisis descriptivo de las variables concentración de atrazina vs. año de monitoreo .....	83
<b>Figura 13.</b> Análisis descriptivo de las variables concentración de atrazina vs. año agronómico .....	84
<b>Figura 14.</b> Análisis descriptivo de las variables concentración de atrazina vs. estación del año (primavera/ otoño) .....	85
<b>Figura 15.</b> Modelo de regresión lineal entre la concentración de atrazina y el volumen de lluvia .....	86
<b>Figura 16.</b> Relación entre la concentración de atrazina y la lluvia caída (por categorías) .....	87
<b>Figura 17.</b> Estudio de comunidades microbianas mediante métodos dependientes e independientes de cultivo .....	98
<b>Figura 18.</b> Representación esquemática de la técnica de DGGE .....	100
<b>Figura 19.</b> Cursos de agua dulce (ACR y RTP) a partir de los cuales se llevaron a cabo los ensayos de microcosmos .....	105
<b>Figura 20.</b> Concentración residual de atrazina en microcosmos de de los ecosistemas ACR y RTP (n=4) .....	106
<b>Figura 21.</b> Atenuación natural de atrazina en microcosmos de ACR. La concentración de atrazina residual se cuantificó mediante MEKC (n=3) .....	107
<b>Figura 22.</b> Espectros de absorbancia de los picos obtenidos en los electroferogramas .....	108
<b>Figura 23.</b> Electroferogramas correspondientes a la determinación de atrazina y sus metabolitos en ensayos de microcosmos (MEKC) .....	109

<b>Figura 24.</b> Electroferogramas correspondientes a la determinación de atrazina y sus metabolitos en ensayos de microcosmos (MEKC). .....	110
<b>Figura 25.</b> Impacto de atrazina sobre la microbiota acuática nativa. Recuento de MHC (UFC.mL <sup>-1</sup> ) y recuento de microorganismos degradadores de atrazina (MDA) .....	113
<b>Figura 26.</b> Estimación de la capacidad catabólica de degradación de atrazina en ambientes acuáticos de Córdoba. ....	113
<b>Figura 27.</b> Detección de genes de degradación de <i>s</i> -triazinas a partir de ADN comunitario de microcosmos de ACR. ....	116
<b>Figura 28.</b> Gel de DGGE y análisis de conglomerados de microcosmos impactados con atrazina. ....	118
<b>Figura 29.</b> Rango ponderado de la riqueza en los microcosmos impactados con atrazina .....	119
<b>Figura 30.</b> Mapa físico del plásmido pADP-1 que contiene a los genes <i>atz</i> responsables de la degradación de atrazina. ....	125
<b>Figura 31.</b> Vía enzimática de degradación de atrazina (Adaptado Udiković-Kolić y col., 2012). ....	127
<b>Figura 32.</b> Cursos de agua dulce a partir de los cuales se llevó a cabo el aislamiento de bacterias nativas potencialmente degradadoras de atrazina. ....	134
<b>Figura 33.</b> Halos de degradación de atrazina por el aislamiento AAC22 en medio mínimo M9 sólido .....	138
<b>Figura 34.</b> Morfología de las colonias de AAC22 visualizadas bajo lupa (x2) .....	139
<b>Figura 35.</b> Curvas de crecimiento del aislamiento <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 con diferentes fuentes de N .....	141
<b>Figura 36.</b> Curvas de crecimiento del aislamiento <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 en diferentes condiciones de cultivo .....	143
<b>Figura 37.</b> Eficiencia de degradación de atrazina por <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 en ensayos de resting-cell. ....	145
<b>Figura 38.</b> Análisis de la degradación de atrazina por <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 en ensayos de resting-cell. ....	147
<b>Figura 39.</b> Degradación de atrazina por <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 crecida en medio mínimo M9. ....	148
<b>Figura 40.</b> Amplificación por PCR de los genes de degradación de <i>s</i> -triazinas en <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22. ....	149
<b>Figura 41.</b> Amplificación por PCR de los genes de degradación de <i>s</i> -triazinas a partir de ADN plasmídico. ....	151
<b>Figura 42.</b> Microfotografía de <i>Pseudokirchnerella subcapitata</i> . ....	153
<b>Figura 43.</b> Estrategias de biorremediación de contaminantes y factores condicionantes. ....	157
<b>Figura 44.</b> Obtención de Q mediante deacetilación de quitina. Equilibrio ácido-base del quitosano. ....	162
<b>Figura 45.</b> Grupos funcionales presentes en el monómero de la molécula de Q .....	164
<b>Figura 46.</b> A. N-alquilación reductora de la molécula de Q con glucosa.	

<b>B. Representación del proceso de derivatización de Q con carbohidratos .....</b>	<b>165</b>
<b>Figura 47. Espectros de absorbancia en el IR. a) Q nativo; b) Q derivatizado.....</b>	<b>173</b>
<b>Figura 48. Apariencia macroscópica de perlas de QD 1%. .....</b>	<b>175</b>
<b>Figura 49. Microfotografía (SEM) de la superficie una perla de QD con <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 encapsuladas. ....</b>	<b>177</b>
<b>Figura 50. Microfotografías (SEM) de corte transversal de una perla de QD 1% con <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 encapsuladas. ....</b>	<b>178</b>
<b>Figura 51. Degradación de atrazina (24 h) vs. número de perlas inoculadas para la biodegradación por <i>Arthrobacter</i> sp. AAC22 inmovilizadas en perlas de QD 1%. .....</b>	<b>180</b>
<b>Figura 52. Cinética de degradación de atrazina en ensayos de biodegradación con AAC22 vs. número de perlas. ....</b>	<b>181</b>
<b>Figura 53. Cinética de degradación de atrazina en ensayos de bioaumentación con AAC22 .....</b>	<b>183</b>
<b>Figura 54. Esquemas generales de métodos de biorremediación de aguas contaminadas con plaguicidas dentro del sistema de extracción .....</b>	<b>193</b>
<b>Figura 55. Algunos biorreactores empleados en la biorremediación de contaminantes con bacterias inmovilizadas. ....</b>	<b>194</b>



## RESUMEN

La provincia de Córdoba concentra actividades productivas dependientes del uso de herbicidas. Entre los diversos tipos, la atrazina (*s*-triazina) es altamente aplicada por la agricultura regional. Mediante diversos mecanismos de transporte ambiental este herbicida puede alcanzar los cuerpos de agua superficiales alterando la calidad de este recurso. Los sistemas de agua dulce revisten de vital importancia no sólo por sus beneficios para la vida del hombre sino también como hábitat natural de la diversidad biológica. Dependiendo de las condiciones del ambiente y del potencial genético, la microbiota nativa puede participar en la biodegradación de contaminantes como atrazina, aunque su presencia puede promover cambios en la estructura y función de dichas comunidades. En aquellos ecosistemas en los que no ocurre la atenuación natural del herbicida, es necesario recurrir a estrategias de biorremediación. El presente trabajo de tesis propone: a) estudiar el impacto ambiental que generan los sistemas de producción agrícola sobre cuerpos de agua dulce de Córdoba y b) seleccionar especies bacterianas nativas de aguas superficiales, eficientes en la degradación de atrazina, para su futura aplicación en procesos de biorremediación de ecosistemas acuáticos contaminados. Se establecieron 10 puntos de monitoreo (ríos, arroyos, canales y lagunas) sobre un sector de la cuenca del río Tercero, seleccionado por sus características geomorfológicas, hidrológicas y de uso del territorio. Los muestreos (2011-2015) realizados en dos estaciones diferentes (primavera y otoño) revelaron una alta frecuencia de detección de atrazina mayor al 80% en todos los sitios monitoreados, superando en algunos puntos los niveles admitidos por normativas internacionales. La concentración media en sitios de zonas rurales ( $0,939 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) fue significativamente mayor a zonas urbanas ( $0,201 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). En primavera, época de aplicación y de lluvias frecuentes, las concentraciones medias de atrazina fueron más altas ( $0,916 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) que en otoño ( $0,497 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Se demuestra que atrazina es sistemáticamente detectada en cuerpos de agua de la región constituyendo un peligro potencial para todas las formas de vida. En ensayos en microcosmos con agua de los ecosistemas ACR o RTP, se evaluó el efecto del herbicida sobre las comunidades bacterianas nativas. En ACR, se observó un 100% de degradación de atrazina, un aumento de microorganismos degradadores (MDA) y presencia de los genes catabólicos *trzN* y *atzBC*. Por el contrario, en RTP este herbicida permanece como contaminante, relacionado a bajos recuentos de MDA y a la ausencia de genes de degradación. El análisis por PCR-DGGE de ADN comunitario de los microcosmos mostró variaciones en las comunidades bacterianas según el ambiente y las condiciones de enriquecimiento e incrementos en la riqueza de taxones bacterianos. Se obtuvo un aislamiento bacteriano, *Arthrobacter* sp. AAC22, cuyo potencial catabólico se debe a que posee los genes *trzN* y *atzBC*. Esta bacteria presenta una velocidad de crecimiento rápida ( $\mu=0,08 \text{ h}^{-1}$ ) y alcanza una alta biomasa ( $7 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) en medio mínimo con  $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$  de atrazina como única fuente de N. Mediante ensayos de *resting cell* se comprobó que AAC22 es capaz de degradar el 100% de atrazina ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) en 80 min. Su versatilidad metabólica lo convierte en un potencial candidato para la biorremediación de aguas contaminadas con atrazina. El aislamiento AAC22 fue inmovilizado en perlas de quitosano derivatizado con glucosa (QD) como estrategia biotecnológica que asegura su adecuada supervivencia en el tiempo y garantiza la eficiente remoción del herbicida en agua. Los resultados obtenidos presentan una evaluación de riesgo basada en la concentración real de este compuesto en aguas superficiales y contribuyen al desarrollo de tecnologías sustentables que integren criterios ambientales y permitan la mejora del recurso cuando es perturbado.

## ABSTRACT

In Cordoba, agriculture practices relied heavily on herbicides to control weeds. Among them, atrazine (*s*-triazine) is the most commonly used. Its motility and recalcitrant nature makes it frequently detected in water streams. Freshwater systems are very important as biodiversity habitats. The persistence of herbicide in aquatic environments depends on environmental conditions and the genetic potential of microorganisms. In those systems in which natural attenuation is absent, it is necessary to apply bioremediation strategies. The overall objectives of this research were: a) to study the impact of agricultural production systems on environmental surface waters samples of the south-central region of Cordoba, Argentina; b) to isolate native bacteria able to degrade atrazine for bioremediation processes of contaminated aquatic ecosystems. A monitoring study was performed on surface water of Tercero river watershed during 2011-2015. The area of study was selected based on its geomorphological, hydrological and land use characteristics. For atrazine detection, water samples were collected from 10 different sites (rivers, streams, canals and lakes) and in two different seasons (spring and fall). In the present study, a high frequency of 80% of atrazine detection was detected and concentration exceeded the limit established by international guidelines. The average concentration in rural sites ( $0.939 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) was significantly higher than urban areas ( $0.201 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). In spring, (period coinciding with agriculture application and frequently rainfalls) the atrazine concentration was higher ( $0.916 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) than autumn ( $0.497 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). It is shown that atrazine is systematically detected in water bodies of the region constituting a potential danger to all forms of life. The effect of atrazine ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) on native bacterial communities was also evaluated in microcosms containing water samples of arroyo Cabral (ACR) or Tercero river-Pampayasta (RTP). In ACR, microbial communities were able to degrade atrazine (100%) related to an increased degraders counts (MDA) and to the presence of catabolic genes *trzN* and *atzBC*. In contrast, in RTP natural attenuation did not occur and atrazine remained as persistent pollutant. The PCR-DGGE analysis of community DNA showed variations in bacterial communities and increases in specific richness depending on the environment (ACR or RTP) or on the enrichment conditions. A native bacterial strain, *Arthrobacter* sp. AAC22, was isolated from water samples of ACR capable of metabolizing atrazine at high concentrations ( $>300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) as a sole N sources. In M9 minimal medium, the bacterium exhibited a growth rate of  $\mu = 0.08 \text{ h}^{-1}$  yielding a high biomass ( $7 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ). Resting cells assays showed that AAC22 degrade 100% of available atrazine in 80 min. The *trzN* and *atzBC* encoding the enzymes of the atrazine upper pathways were detected by PCR in this bacterium. Its metabolic versatility makes it a potential biocatalyst for the remediation of *s*-triazine contaminated environments. Experiments were also conducted to immobilize AAC22 on chitosan glucose derivatized (QD) beads, as strategy that ensures bacterial survival and metabolic activity leading to an efficient removal of the herbicide in water assays. The results obtained present a risk assessment based on the actual atrazine concentration in surface waters of agricultural area of Cordoba. It also promotes the development of sustainable biotechnologies that integrate environmental criteria to solve pollution problems with *s*-triazines when the resource is disturbed.

## ABREVIATURAS

---

% p/p	Porcentaje peso en peso
% p/v	Porcentaje peso en volume
% v/v	Porcentaje volumen en volume
° C	Grados centígrados
µg	Microgramos
µL	Microlitros
µm	Micrómetros
µM	Micromolar
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
2,4-DB	Ácido 2,4-diclorofenoxi butírico
Abs	Absorbancia
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANMAT	Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología Médica
ARN	Ácido ribonucleico
ARNr	ARN ribosomal
C	Carbono
c.s.p.	Cantidad suficiente para
CAA	Código Alimentario Argentino
CCME	Canadian Council of Ministers of the Environment
CE	Comunidad Europea
CG	Cromatografía Gaseosa
CI50	Concentración Inhibitoria 50
cm	Centímetro
CONAMA	Conselho Nacional do Meio Ambiente
DAD	Detector de Arreglo de Diodos
DDT	Dicloro Difenil Tricloroetano
DEA	Deetilatrazina.
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante
DIA	Deisopropilatrazina
dNTP	Desoxirribonucleótidos trifosfato
DO	Densidad Óptica
E	Este
EC	Electroforesis Capilar
ECD	Electronic Capture Detector
ELISA	Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay:
EOF	Flujo electroosmótico
FAO	Organización de la agricultura y la alimentación
FID	Detector de ionización de llama
g	Gramos
GDA	Grado de deacetilación
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
GPS	Sistema de posicionamiento global
h	Hora (s)
H	Constante de la Ley de Henry
HA	Hidroxiatrazina

ha	Hectárea (s)
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
IC	Intervalo de Confianza
IR	Infrarrojo
$K_d$	Coefficiente de distribución de sorción
$K_g$	Kilogramo
KHz	Kilo hertz
$Km^2$	Kilómetros cuadrados
$K_{oc}$	Coefficiente de C orgánico
$K_{ow}$	Coefficiente de partición octanol/agua
KV	Kilovolt
L	Litro
LD	Límite de detección
M	Molar
m	Metro(s)
m s.n.m.	Metros sobre el nivel del mar
$m^3$	Metros cuadrados
mbar	Milibar
MDA	Microorganismos degradadores de atrazina
MEKC	Cromatografía capilar electrocinética micelar
mg	Miligramos
MHC	Microorganismos Heterótrofos Cultivables
min	Minuto(s)
mL	Mililitros
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MS	Masa
$M_v$	Peso molecular viscosimétrico
N	Nitrógeno
ng	Nanogramos
nm	Nanometros
NMP	Número Más Probable
NPD	Detector de nitrógeno y fósforo
O	Oeste
OC	Organoclorado
OMS	Organización Mundial de la Salud
ONU	Organización de las Naciones Unidas
OPP	Comité de examen del programa de pesticidas
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pM	Picomolar
PM	Peso molecular
Q	Qitosano
QD	Qitosano Derivatizado
$Q_L$	Qitosano de bajo peso molecular
$Q_M$	Qitosano de peso molecular medio
rpm	Revoluciones por minuto

Rr	Rango ponderado de la riqueza
S	Sur
seg	Segundos
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SF	Solución Fisiológica
SsRH	Subsecretaría de Recursos Hídricos
STD	Sólidos Totales Disueltos
T <sub>0,5</sub>	Tiempo de vida media
tn	Tonelada(s)
TPP	Tripolifosfato
TSA	Tripticasa Soya Agar
TTC	2,3,5-trifenil-2H-cloruro de tetrazolio
UE	Unión Europea
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UNESCO	United Nations Educational, Scientific and Cultural Organization
US EPA	United States Environmental Protection Agency
UV-vis	Ultravioleta- visible
V	Volt
Vol	Volumen
W	Watt
y col.	y colaboradores

# *Capítulo* **1**

INTRODUCCIÓN GENERAL

---

---

## **INTRODUCCIÓN GENERAL**

### **1. La agricultura moderna y el uso de plaguicidas**

La actividad productiva agrícola-ganadera en Argentina se ha incrementado y transformado notablemente en los últimos treinta años, favorecida por la expansión de la frontera agropecuaria y el aumento significativo de nuevas prácticas como la siembra directa. A su vez, la incorporación de biotecnologías (que permitieron la difusión de nuevas variedades de cultivos), el desarrollo de nuevas maquinarias, conjuntamente con la mayor aplicación de fertilizantes y plaguicidas, posibilitaron mayores rendimientos de las cosechas por hectárea cultivada y un aumento en la calidad de los alimentos.

En particular, los plaguicidas se han convertido en una de las herramientas más utilizadas para contrarrestar el ataque de plagas y consecuentemente, las enfermedades en cultivos (Oesterheld, 2005; Hernández Borges, 2005). La denominación de plaguicidas incluye una amplia variedad de productos de diferente composición y propiedades. Según la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, 2006) los plaguicidas se definen como “cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinada a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo los vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causan perjuicio o que interfieren de cualquier forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, maderas y sus productos o alimentos para animales, o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos”.

Según un informe publicado por el Banco Mundial (2007), entre los países agrícolas del mundo, Argentina ocupa el undécimo lugar (considerando su superficie cultivada) detrás de Estados Unidos, India, Rusia, China, Brasil y Australia. Posee 29 millones de ha dedicadas a la agricultura y representa el 2,2% de la superficie total mundial de cultivo (De Gerónimo y col., 2014). El mercado de plaguicidas en este país se ha expandido fuertemente, con un aumento del consumo de 73 a 236 millones de kg por año, durante los últimos 10 años. Esto representa una facturación total de U\$S 2.381.160.000 en 2012 correspondiendo un 64% a herbicidas, un 16% a insecticidas y un 20% a fungicidas, acaricidas y curasemillas.

### 1.1. Clasificación de plaguicidas

Los plaguicidas pueden ser clasificados considerando sus características principales. En 1978, la Organización Mundial de la Salud (OMS) estableció una clasificación basada en su peligrosidad o grado de toxicidad aguda, la cual se define como la capacidad del compuesto de producir un daño agudo a la salud humana a través de una o múltiples exposiciones, en un período de tiempo relativamente corto. Según esta clasificación se establecen cuatro categorías o clases en orden decreciente de peligrosidad, considerando a los compuestos de clase IA como extremadamente peligrosos; clase IB, altamente peligrosos; clase II, moderadamente peligrosos y clase III, ligeramente peligrosos. En función de su vida media en el ambiente, se clasifican en permanentes, persistentes, moderadamente persistentes y no persistentes. Por otra parte, dependiendo de su estructura química pueden clasificarse en inorgánicos y orgánicos, agrupándose estos últimos en diversas familias según se detalla en la **Tabla 1** (Ramírez y Lacasaña, 2001). De acuerdo a su blanco de acción son bactericidas, defoliantes, disecantes, fungicidas, herbicidas, insecticidas, acaricidas, reguladores del crecimiento vegetal, etc. Por último, según su modo y/o período de acción en los que actúan por contacto, erradicantes, fumigantes, post-emergentes o pre-emergentes, protectores, selectivos o no selectivos, esterilizantes de suelos, sistémicos, etc. (Arias-Estévez y col., 2008).

**Tabla 1.** Clasificación de los plaguicidas según su estructura química.

Familia química	Ejemplos
<b>Compuestos clorados</b>	
Organoclorados	DDT, aldrín, endosulfán, endrín
Derivados del ácido fenoxiacético	Ácido 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D), Dicloroprop, piclram, silvex
Derivados de s-triazinas	Atrazina, ametrina, desmetrina, simazina
<b>Organofosforados</b>	Bromofos, diclorvos, malatión
Carbamatos	Carbaril, metomil, propoxur
Tiocarbamatos	Ditiocarbamato, mancozeb, maneb
Piretroides	Cipermetrina, fenvalerato, permetrina
Derivados bipyridilos	Cloromequat, diquat, paraquat
Derivados cloronitrofenólicos	DNOC, dinoterb, dinocap
Compuestos inorgánicos	Pentóxido de arsénico, fosfito de magnesio, arsenato de plomo, bromuro de metilo, antimonio, mercurio, selenio, talio, fósforo
Compuestos de origen botánico	Rotenona, nicotina, aceite de canola

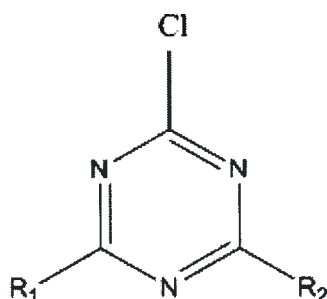


## 2. Las *s*-triazinas: un caso especial de herbicidas clorados

Entre los diferentes tipos de plaguicidas, la aplicación de herbicidas domina el mercado mundial y se constituye como la práctica más relevante para la eliminación de malezas. En América del Sur, la aplicación anual de herbicidas es de alrededor de 75.000 tn, siendo los principales consumidores Brasil (38%), Argentina (28%), Colombia (18%) y Chile (7%) (FAO 2009). En nuestro país, los herbicidas representan el 72% de la facturación total de plaguicidas, siendo los de mayor comercialización. Si bien el glifosato (compuesto organofosforado) es el herbicida más utilizado, la atrazina ocupa el tercer lugar dentro de este grupo y es el segundo herbicida clorado de mayor comercialización luego del 2,4-D (CASAFE, 2013).

Los herbicidas clorados son compuestos orgánicos que poseen en su molécula uno o más átomos de cloro. Su estructura química corresponde a la de derivados halogenados de hidrocarburos cíclicos, lo que les confiere una alta estabilidad física y química, siendo insolubles en agua, no volátiles y altamente solubles en disolventes orgánicos. Estas características favorecen su amplia distribución en el ambiente, su persistencia y su lenta biodegradabilidad (Calva y Torres, 1998). Conjuntamente, son compuestos altamente lipofílicos, por lo que tienden a acumularse principalmente en el tejido adiposo, en el componente graso de la leche materna y de la sangre (Ramírez y Lacasaña, 2001). Algunos compuestos representativos de este grupo son el dicloro difenil tricloroetano (DDT), que se encuentra prohibido en Argentina desde 1992 (Decreto 2121/90 SENASA), y su uso se restringió a nivel mundial en 2001 (Convenio de Estocolmo); el endosulfán cuya elaboración, formulación, comercialización y uso se encuentra prohibido en Argentina desde julio de 2013 (Resolución N° 511/11 de SENASA, artículo 2°); los compuestos derivados del ácido fenoxiacético, como el ácido 2,4- diclorofenoxicético (2,4-D) y ácido 2,4-diclorofenoxy butírico (2,4-DB), entre otros.

Durante la década del '50 se introdujeron los herbicidas del tipo *s*-triazina adquiriendo una amplia aceptación en el mercado mundial. Éstos constituyen una familia de compuestos clorados cuya estructura química consta de un anillo aromático hexamérico y simétrico formado por tres átomos de carbono y tres de nitrógeno en posiciones alternadas (**Figura 1**). Los miembros de la familia difieren entre sí por la sustitución y posición de los radicales alrededor del anillo *s*-triazina.



<i>s</i> -triazina	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Atrazina	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Cianazina	NHC(CN)(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Propazina	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	NHCH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Simazina	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	NHCH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>

**Figura 1.** Estructura química de *s*-triazinas y miembros de la familia diferenciados por los grupos R<sub>1</sub> y R<sub>2</sub> unidos al anillo (Adaptado de Seeger y col., 2010).

Estos herbicidas son utilizados para el control de malezas de hoja ancha y gramíneas en suelos de cultivos agrícolas y forestales y en suelos no cultivables en muchas regiones del mundo (Wackett y col., 2002; Dinamarca y col., 2007; Hernández y col., 2008). Se aplican como herbicidas de pre y post emergencia en cultivos como maíz, sorgo, alfalfa, caña de azúcar, cítricos, etc. Son absorbidos a través de las raíces de las plantas actuando como inhibidores de la fotosíntesis en las plantas susceptibles, dado que interfieren en la cadena transportadora de electrones en el fotosistema II (Strong y col., 2002)

Dentro de esta familia de compuestos, la atrazina (2-cloro-4-etilamino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina) es el de mayor volumen de aplicación en Argentina. Su fórmula molecular es C<sub>8</sub>H<sub>14</sub>ClN<sub>5</sub>. Sus propiedades fisicoquímicas se detallan en la **Tabla 2**.

**Tabla 2.** Propiedades fisicoquímicas de atrazina (OMS, 2010).

Propiedad	Valor
Peso molecular	215,7 g.mol <sup>-1</sup>
Punto de fusión	175–177 °C
Densidad	0,363 g.mL <sup>-1</sup> (20 °C)
Solubilidad en agua	33 mg.L <sup>-1</sup> (20 °C)
Presión de vapor	40 × 10 <sup>-6</sup> Pa (20 °C)
pKa	1,68
K <sub>oc</sub>	100 mL.g <sup>-1</sup>
K <sub>d</sub>	3,7 L.kg <sup>-1</sup>

Se considera un compuesto persistente debido a su alto peso molecular, su moderada solubilidad en agua ( $33 \text{ mg.L}^{-1}$  a  $20 \text{ }^\circ\text{C}$ ) y a su bajo coeficiente de distribución de sorción en suelo ( $K_d = 3,7 \text{ L.kg}^{-1}$ ) ya que su tendencia a formar iones y la presencia de grupos químicos incrementan la afinidad de la molécula por la superficie del suelo (Curran, 1998). Si bien la persistencia de atrazina varía en los diferentes ambientes, su vida media en suelo se estima entre 16 a 100 días, mientras que en agua puede permanecer desde menos de un día a varios años dependiendo del cuerpo de agua, de las características específicas del lugar y de las condiciones ambientales (Chung y col., 2003).

## 2.1. Procesos que condicionan el comportamiento de los herbicidas s-triazinas en el ambiente

El destino final de los herbicidas en el ambiente está gobernado por procesos de retención, transformación y transporte, así como por la interacción entre ellos (Bedmar, 2006). Estos compuestos pueden moverse e interactuar con los diferentes compartimentos ambientales, pudiendo estar presentes en el suelo, agua, aire y en los tejidos de los organismos (**Figura 2**). Estas interacciones son complejas, siendo controladas simultáneamente por reacciones biológicas, físicas y químicas.

Luego de ser aplicado y antes que alcance el suelo, el herbicida puede sufrir fotólisis, volatilización y/o puede ser adsorbido o absorbido por las hojas del organismo blanco (plantas) o por el rastrojo en superficie. Una vez en el suelo, el compuesto se reparte en las fases sólida, gaseosa y líquida; en esta última ocurre la degradación química y microbiana siendo estos procesos los más importantes para la disipación de la mayoría de los herbicidas. La retención, también descripta como adsorción o sorción, es la consecuencia de la interacción entre el herbicida y la superficie de las partículas del suelo. En la fase sólida se adsorben con diferente fuerza a los coloides orgánicos e inorgánicos del suelo (materia orgánica y arcillas). Puede ser reversible, cuando se retarda el movimiento del compuesto, o irreversible si la movilidad es completamente impedida, afectando también de esta manera la biodisponibilidad, ya sea para la absorción por las plantas o para la transformación abiótica o biótica (Koskinen y Harper, 1990).

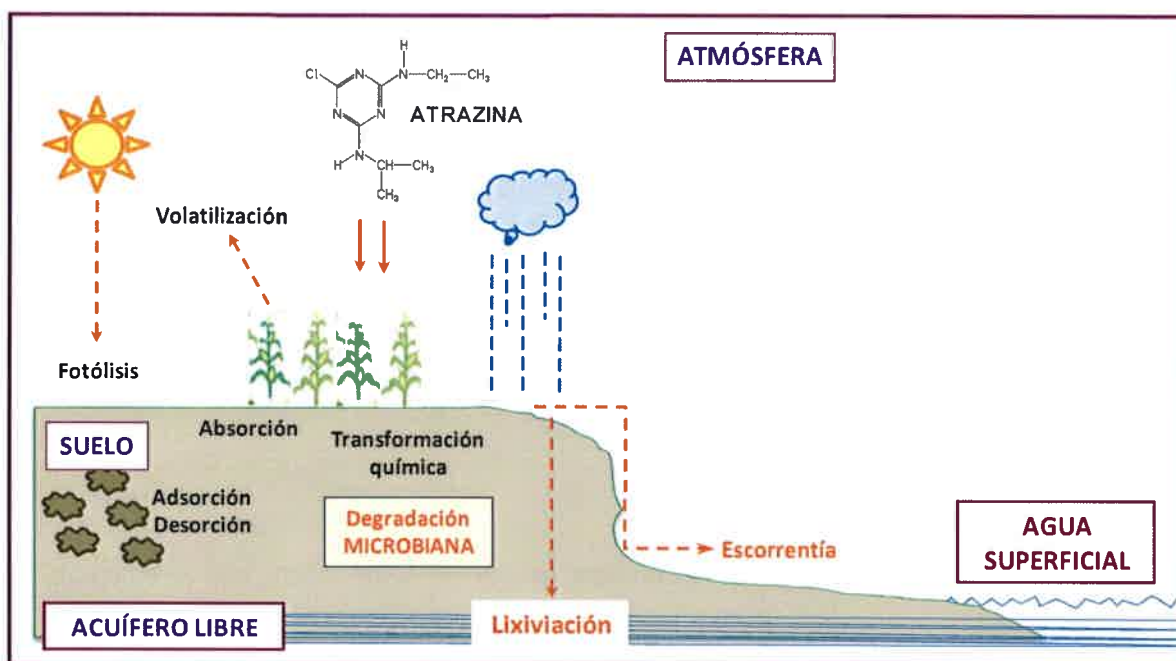


Figura 2. Procesos que determinan la dinámica de los herbicidas en el ambiente (Adaptado de Seeger y col., 2010).

Otro proceso es la transformación, que a diferencia de la retención produce cambios en la naturaleza química de los compuestos. La transformación del herbicida puede ser inducida fotoquímicamente o mediante procesos bioquímicos catalizados por los microorganismos del suelo, produciéndose moléculas más simples que pueden presentar diferente toxicidad que la del compuesto original (Bedmar, 2006).

Finalmente, los procesos de transporte determinan la localización de los herbicidas en el ambiente. El transporte de solutos a través del suelo se produce por medio del flujo del agua y está fuertemente influenciado por la adsorción, alcanzando aguas superficiales mediante escorrentía y produciéndose la lixiviación hacia las aguas subterráneas (Cheng, 1990). Por último, el herbicida llega a la atmósfera por volatilización. Todos los procesos se encuentran interrelacionados, por lo que el conocimiento global de los mismos resulta de gran importancia para predecir el comportamiento del herbicida en el ambiente, identificar ambientes más vulnerables e implementar estrategias adecuadas de gestión ambiental y lograr así un mínimo impacto ambiental.

### 2.1.1. Procesos de retención de *s*-triazinas en el suelo

La retención o sorción (adsorción/desorción) en las partículas del suelo es el principal mecanismo por el cual las *s*-triazinas son retenidas, siendo el proceso con mayor influencia en su comportamiento y destino final en el ambiente. Ocurre como resultado de interacciones reversibles o irreversibles entre las moléculas del herbicida y los coloides del suelo (Green y Karickhoff, 1990; Gerstl, 2000), como consecuencia de las propiedades de este compartimento y la naturaleza del compuesto (Foght, 2001; Gavrilescu, 2005). La tendencia de un compuesto a ser adsorbido en el suelo se expresa por su coeficiente de distribución de sorción ( $K_d$ ) que es la relación entre la concentración de herbicida que se encuentra en estado adsorbido y la que se encuentra en solución acuosa. El  $K_d$  presenta gran variación con el tipo de suelo, razón por la cual se lo normaliza por el contenido de carbono orgánico del suelo ( $K_{oc}$ ). Otro coeficiente ampliamente utilizado es el coeficiente de partición octanol/agua ( $K_{ow}$ ), que resulta del cociente entre las concentraciones de un compuesto en una mezcla bifásica de dos solventes inmiscibles en equilibrio, *n*-octanol y agua (Mackay y Fraser, 2000).

El agua generalmente compite con las *s*-triazinas por los sitios iónicos y polares de la superficie del suelo, mientras que los sitios no polares tienen una baja afinidad por el agua y por lo tanto interactúan con porciones no polares de las moléculas de *s*-triazinas (Laird y Koskinen, 2008). La principal propiedad que afecta la adsorción de herbicidas y su movilidad en el suelo es el contenido de C orgánico del suelo, en especial la fracción de ácido húmico-fúlvico (Fenoll y col., 2014). Los suelos con bajo contenido de C orgánico tienen una baja capacidad para retardar la movilidad de los herbicidas, ya que la materia orgánica del suelo es el adsorbente primario para estos compuestos (Cox y col., 2000). Los herbicidas por lo general se adsorben con más fuerza a las capas superficiales del suelo, que es donde se encuentra el mayor contenido de materia orgánica. Los horizontes del suelo más profundos contienen menos materia orgánica y menor número de microorganismos, lo que disminuye la adsorción y la biodegradación (Comfort, 1994; Skipper y col., 1996; Jenks y col., 1998). La retención y degradación de un herbicida en el suelo son fenómenos relacionados que condicionan su biodisponibilidad y su potencial de contaminar el agua subterránea.

Otras propiedades que influyen en el proceso de sorción son la capacidad de intercambio catiónico y el pKa de los herbicidas (Alister y col., 2011). La disociación de compuestos ionizables en respuesta al pH del suelo afecta la adsorción y por lo tanto la movilidad en el suelo. La atrazina es un herbicida no iónico débilmente básico, por lo que dependiendo del pH puede actuar como ion o molécula neutra y puede ser adsorbida a la materia orgánica y las arcillas (Weber y col., 2000).

Bedmar y col. (2011) observaron que la sorción de atrazina en dos tipos de suelos de la pampa húmeda Argentina se relacionó con la hidrofobicidad del compuesto ( $K_{OW}$ ) y con el C orgánico del suelo. La fuerza de sorción disminuyó con la profundidad, siendo mayor en los horizontes superficiales, lo cual podría permitir el posterior transporte del herbicida hacia el subsuelo y la contaminación del agua subterránea. La adición de sustratos orgánicos al suelo tales como lodos, compost de residuos urbanos, paja compostada, desechos de molinos de aceite de oliva o de madera, aumenta la sorción de *s*-triazinas en comparación con suelos sin modificaciones (Cox y col., 1997; Celis y col., 1998; Houot y col., 1998; Majumdar y Singh, 2007; Cabrera y col., 2008; Delgado-Moreno y Peña, 2009; Jiang y col., 2011; Grenni y col., 2012.; Gámiz y col., 2012). Este aumento de la sorción puede producir dos efectos: promover la degradación del herbicida en el suelo mediante la estimulación de la actividad microbiana, o reducir la mineralización después de la adición del sustrato debido a la reducción de la biodisponibilidad del herbicida (Albarrán y col., 2004).

### **2.1.2. Transporte de agua y herbicidas *s*-triazinas en el suelo**

El movimiento del agua en el suelo es el principal mecanismo para la transferencia de contaminantes desde este medio a los cuerpos de agua superficial y subterránea. Es conocido que los herbicidas pueden alcanzar los cuerpos de agua transportados por el agua de lluvia. Mediante procesos de escorrentía pueden alcanzar los cursos de aguas superficiales y simultáneamente, la infiltración del agua de lluvia a través del suelo puede transportarlos hacia los acuíferos por lixiviación (Fenoll y col., 2014). El suelo es un material poroso compuesto por partículas sólidas de tamaño variable (1-200  $\mu\text{m}$ ) organizadas en diversos estados de estructuración, dependiendo de su forma y del esfuerzo

mecánico al cual se someta al suelo. Estos dos factores, textura y estructura, son importantes para el movimiento del agua y de los solutos debido a que determinan la distribución del tamaño de los poros en el suelo, condicionando la velocidad de flujo de agua (permeabilidad del suelo), y desempeñan un rol fundamental en los procesos de transporte de herbicidas (Leeds-Harrison, 1995).

La lixiviación produce el movimiento de los herbicidas a través de los poros del suelo. Diferentes factores como las propiedades fisicoquímicas, el método y velocidad de aplicación de los compuestos, las propiedades del suelo, la adsorción a las partículas y los procesos hidrológicos en el suelo (el flujo a través de los poros, la infiltración y evaporación del agua) juegan un rol decisivo en este fenómeno (Navarro y col., 2007). Los mecanismos que dominan la lixiviación son: a) el flujo preferencial, en el que el agua junto con las moléculas del herbicida se mueven rápidamente a través de grietas en el perfil del suelo, reduciendo la retención y degradación del compuesto; y b) el flujo de matriz, que es el resultado de una migración más lenta del agua y los herbicidas a través de la estructura del suelo, dentro de poros, lo que aumenta el tiempo de contacto con las partículas del suelo (Gavrilescu, 2005). En los suelos arenosos el agua se mueve a través de sus partículas rápidamente, generalmente no contienen una gran cantidad de microorganismos y, por lo tanto, los herbicidas no son degradados fácilmente. Por el contrario, en suelos con alta concentración de arcilla y materia orgánica, el movimiento del agua es lento y generalmente tienen una alta diversidad de microorganismos capaces de metabolizarlos, por lo que muchos herbicidas son degradados fácilmente (Suthersan, 2001; Fishel, 2005; Gavrilescu, 2005). La profundidad influye en la magnitud y el tiempo de contacto entre el contaminante y las partículas del suelo, y la pendiente determina la cantidad de agua que se infiltrará en el mismo. Las pendientes poco pronunciadas tienden a aumentar la infiltración del agua y de los contaminantes que ésta transporta, y por lo tanto, el potencial de recarga y de contaminación del acuífero.

El proceso de escorrentía está dado por el movimiento del agua sobre una superficie en pendiente, y ocurre cuando el agua llega al suelo de manera muy rápida, superando la capacidad del mismo de absorberla. Una proporción significativa de los herbicidas que llegan a los cuerpos de agua superficiales son transportados mediante la escorrentía superficial de áreas agrícolas, como consecuencia de la pendiente del terreno, la textura, la humedad y erosionabilidad del suelo, la frecuencia y cantidad de lluvias y/o riego, la

presencia de vegetación y residuos de cosecha, las propiedades fisicoquímicas de los compuestos, y de la hidrodinámica del sistema (Cohen y col., 1995; Herrero-Hernández y col., 2013). Las moléculas de herbicida pueden encontrarse disueltas, siendo su transporte gobernado principalmente por el flujo de agua; o pueden estar asociadas a partículas o coloides, dependiendo su transporte del comportamiento de este sustrato (Arias-Estévez y col., 2008). Una vez que se encuentran en los cuerpos de agua superficiales los herbicidas son relativamente móviles, por lo que pueden ser transportados corriente abajo y de esta manera dispersarse, llegando a contaminar reservas hídricas distantes del sitio de contaminación. Numerosos trabajos documentan la llegada de atrazina a los cuerpos de agua superficiales y subterráneas (Barbash y col., 2001; Du Preez y col., 2005; Bonansea y col., 2013; Poulter y col., 2014; De Gerónimo y col., 2014). Como consecuencia, la contaminación de los recursos hídricos con herbicidas *s*-triazinas puede conllevar efectos nocivos sobre estos ambientes y los organismos que los habitan en un área relativamente amplia (Allen-King y col., 2000).

### **2.1.3. Procesos de transformación**

#### **2.1.3.1. Persistencia de los herbicidas *s*-triazinas en el ambiente**

La persistencia hace referencia al período durante el cual un herbicida permanece sin modificarse y biológicamente activo. Se expresa a través de la vida media ( $t_{0,5}$ ), que representa el tiempo requerido para que el 50% del herbicida aplicado se descomponga en otros productos (Comfort y col., 1994). La persistencia determina el período de tiempo durante el cual pueden esperarse efectos fitotóxicos y, junto con la movilidad, determinan en gran parte el comportamiento ambiental de un herbicida, influyendo en el riesgo de movimiento de estos compuestos hacia el agua superficial y subterránea y su potencial contaminación (Barriuso, 2000).

La persistencia química indica el período de tiempo durante el cual un herbicida puede detectarse mediante metodologías analíticas, mientras que la biopersistencia o residualidad comprende el período de tiempo en el que el herbicida produce cambios apreciables en el crecimiento, desarrollo o metabolismo de las plantas u otros organismos. La residualidad



es por lo tanto un valor variable según el organismo o especie que se tenga en cuenta, lo cual es producto de la distinta selectividad que posee cada especie respecto de un herbicida determinado.

Entre los numerosos factores que interactúan entre sí e inciden en el tiempo que persisten los herbicidas, los principales son las características del suelo, las condiciones climáticas y las propiedades del herbicida:

- Factores físicos, químicos y microbiológicos del suelo. Entre éstos se encuentran la composición del suelo, dada por las cantidades relativas de arena, limo y arcilla, así como por el contenido de materia orgánica, que determinan la textura del suelo. Estas características afectan la actividad y persistencia del herbicida, ya que condicionan la adsorción, lixiviación y volatilización. Como se describió previamente, los suelos con mayor contenido de arcillas y/o materia orgánica poseen mayor potencial para adsorber herbicidas, lo cual disminuye su biodisponibilidad. Las propiedades químicas del suelo incluyen el pH, la capacidad de intercambio catiónico y el contenido de nutrientes. El pH del suelo condiciona la persistencia de los herbicidas, especialmente de las *s*-triazinas, ya que influye en la solubilidad de los compuestos y en la velocidad de los procesos de degradación. En general, la degradación química y microbiana de los herbicidas es más lenta a pH elevado. Por ejemplo, cuando el pH aumenta por encima de 7, la velocidad de degradación química de las triazinas disminuye y se adsorben menores concentraciones de estos herbicidas a las partículas del suelo, lo que aumenta su persistencia y biodisponibilidad para las plantas. Por el contrario, a valores de pH inferiores a 6 los herbicidas como atrazina se adsorben a las partículas del suelo, lo que disminuye su biodisponibilidad para el control de malezas, pero aumenta su velocidad de degradación química. Las características microbiológicas del ambiente edáfico están dadas por la diversidad y el número de microorganismos presentes. Los procesos de degradación microbiana son los más importantes en la disipación de herbicidas, y la diversidad microbiana y la abundancia relativa determinan la velocidad y eficiencia de degradación. Al mismo tiempo, los microorganismos requieren de condiciones ambientales adecuadas (humedad, temperatura, pH, disponibilidad de O<sub>2</sub> y/o nutrientes) para alcanzar un crecimiento óptimo y degradar los contaminantes.

- Variables climáticas que influyen en la degradación de herbicidas son la humedad, la temperatura y la luz solar. La degradación, por lo general, es favorecida por incrementos

en la temperatura y la humedad. La fotólisis ha sido reportada para varios herbicidas, principalmente cuando se encuentran disueltos en agua o sobre la superficie de las hojas.

- Propiedades del herbicida que influyen sobre su persistencia son la solubilidad en agua, la capacidad de adsorción al suelo, la presión de vapor y la susceptibilidad de la molécula a la degradación química o microbiana. La solubilidad en agua de un herbicida es indicador de su potencialidad para lixiviar. En general, los herbicidas que poseen menor solubilidad en agua y se adsorben fuertemente a las partículas del suelo poseen menor potencial de lixiviación (Bedmar, 2006). Por otra parte, la presión de vapor de un herbicida determina su volatilidad. La volatilización es el proceso de conversión de un herbicida en estado líquido o sólido a su forma gaseosa, y determina su desplazamiento a lugares alejados del sitio de aplicación a través de las corrientes de aire (Frazar, 2000). La velocidad de volatilización depende de la temperatura, la humedad, el movimiento de aire, las características del suelo y el modo de aplicación del herbicida (Gavrilescu, 2005). La mayoría de los herbicidas son relativamente no volátiles bajo condiciones normales a campo, sin embargo, el viento puede movilizarlos a través de largas distancias durante la aplicación, ya sea en forma libre o sobre partículas en suspensión. La deposición de estos compuestos puede suceder cuando el viento disminuye su velocidad, o por arrastre desde la atmósfera a través de la lluvia. El potencial de volatilización de un herbicida es expresado por la constante de la Ley de Henry (H), que es el cociente entre la presión de vapor y la solubilidad del compuesto. La estructura química del herbicida determinará su potencial de degradación. Algunos herbicidas son rápidamente transformados por los microorganismos si se encuentran en el ambiente las especies y cantidades adecuadas y si las condiciones ambientales son favorables para su crecimiento. En el caso particular de atrazina, su estructura compleja es difícil de atacar por los microorganismos y por lo tanto su degradación es más lenta, aunque en las últimas décadas numerosos autores han reportado la degradación de este compuesto en suelos con historia previa de aplicación de atrazina (Rousseaux y col., 2001; Rhine y col., 2003; Fang y col., 2015). Otros factores que influyen en el comportamiento de los herbicidas son los componentes presentes en las formulaciones, dado que además de los compuestos activos éstas incluyen aditivos tales como humectantes, diluyentes o solventes, conservantes, emulsionantes, etc. (FAO, 1997).

### 2.1.3.2. Degradación química

Los herbicidas pueden ser degradados a través de procesos químicos que involucran reacciones como hidrólisis, reducción y oxidación y fotólisis. La hidrólisis consiste en la ruptura de los enlaces de una molécula debido a su reacción con moléculas de agua, donde alguno de los grupos químicos es reemplazado por un grupo hidroxilo, lo cual modifica la estructura y las propiedades de la molécula. En el caso de las *s*-triazinas, la velocidad de hidrólisis química es altamente dependiente del pH del suelo, y las tasas más altas de hidrólisis se producen en valores extremos de pH (Erickson y col., 1989). Blumhorst y Weber (1994) informaron la degradación de atrazina mediante hidrólisis química en suelos de pH moderadamente ácido o neutro, proceso que se acelera en presencia de materiales húmicos. Las reacciones de oxidación-reducción implican la transferencia de electrones de una especie reducida a otra oxidada. Las condiciones redox influyen en los aceptores de electrones de las actividades microbianas y en la biotransformación y biodegradación de los compuestos químicos. La fototransformación o fotólisis implica la ruptura de los herbicidas por la luz solar y ocurre cuando la energía radiante en forma de fotones rompe las uniones químicas de una molécula. Todos los herbicidas, en distinto grado, son susceptibles a la fototransformación, aunque existen numerosos factores que afectan la fotólisis de estos compuestos tales como: la intensidad de la luz solar, el tiempo de exposición, las características ambientales, etc. (Gavrilescu, 2005). Para la mayoría de los herbicidas más persistentes, las pérdidas por fotólisis en el suelo son pequeñas. Por el contrario, en masas de agua relativamente poco profundas iluminadas por la luz solar las reacciones fotoquímicas desempeñan un importante rol en la degradación de atrazina (Marchetti y col., 2013)

### 2.1.3.3. Degradación biológica o biodegradación

La degradación microbiana, denominada también biodegradación, es el resultado de la transformación de los herbicidas en compuestos más simples por acción del metabolismo microbiano. Actualmente se la reconoce como el principal mecanismo de disipación de herbicidas en el medio ambiente (Monard y col., 2011). Este proceso ocurre cuando las

bacterias, los hongos u otros microorganismos utilizan a los herbicidas como fuentes de C, N y energía o los asimilan junto con otras fuentes de nutrientes. Tales transformaciones biológicas, que involucran enzimas como catalizadores, producen modificaciones en la estructura y propiedades toxicológicas de los contaminantes (Boettcher y Nyer, 2001; Suthersan, 2001).

La degradación de compuestos orgánicos puede darse de tres formas diferentes: a) la biodegradación comienza inmediatamente y los compuestos son utilizados como fuente de energía y nutrientes para el crecimiento; b) la biodegradación comienza lentamente y los microorganismos requieren un período de adaptación antes de comenzar a degradar; c) los compuestos son persistentes y la biodegradación es lenta o directamente no ocurre (Boettcher y Nyer, 2001).

El tamaño y la actividad de las poblaciones microbianas degradadoras de herbicidas son los principales factores que controlan la persistencia de atrazina en el ambiente. Diversos autores han demostrado la presencia de microorganismos degradadores de atrazina en suelos agrícolas (Jayachandran y col., 1998; Rousseaux y col., 2001; Briceño y col., 2010; Fernández y col., 2013) y la dinámica de las comunidades microbianas en suelos contaminados con *s*-triazinas (Rhine y col., 2003; Martin-Laurent y col., 2004; Vryzas y col., 2012). Sin embargo, existen escasos estudios que evalúen la biodegradación de *s*-triazinas en ambientes acuáticos.

Es conocido que la degradación de estos xenobióticos en el ambiente es habitualmente realizada por comunidades microbianas mixtas (Yang y col., 2010). Se ha estudiado la degradación de atrazina por consorcios bacterianos y la contribución de sus integrantes al metabolismo del compuesto (Mandelbaum y col., 1993; Assaf y Turco, 1994; De Souza y col., 1998a; Smith y col., 2005; Yang y col., 2010). Además, numerosos aislamientos bacterianos son capaces de utilizar atrazina como única fuente de C y/o N y mineralizarla eficientemente a CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub> (Mandelbaum y col., 1995; Topp y col., 2000a, 2000b; Rousseaux y col., 2001; Cheng y col., 2005). Es bien conocido que la mineralización de atrazina ocurre por enzimas codificadas por los genes *atzABC* y *trzN* de la vía superior (De Souza y col., 1996; 1998b; Boundy-Mills y col., 1997; Sadowsky y col., 1998; Topp y col., 2000a; Piutti y col., 2003; Sajjaphan y col., 2004; Smith y col., 2005) y *atzDEF* y *trzD* de la vía inferior (Karns y col., 1999; Rousseaux y col., 2001; Martínez y col., 2001; Strong y col., 2002; Fruchey y col., 2003; Cheng y col., 2005)



No obstante, la habilidad de los microorganismos para modificar o degradar compuestos no sólo depende de su capacidad para producir las enzimas degradadoras apropiadas, sino también de la existencia de condiciones ambientales óptimas para que estas reacciones ocurran (Helbling, 2015). Un factor crítico que determina el alcance de la biodegradación de un compuesto es la interacción entre los microorganismos degradadores y otros miembros de las comunidades nativas debido a la competencia por los sustratos orgánicos, pudiéndose dar dos situaciones. En el primer escenario las tasas de crecimiento de los microorganismos degradadores son relativamente altas a expensas del xenobiótico, lo cual suele suceder cuando la concentración del mismo es alta o cuando la afinidad de las enzimas catabólicas es mayor que por otros sustratos. En estos casos las interacciones entre los degradadores con la comunidad microbiana nativa no poseen un efecto significativo sobre la biodegradación del herbicida. El segundo escenario se caracteriza por altas tasas de crecimiento de los degradadores de herbicidas y de otros microorganismos autóctonos a expensas de sustratos que pueden estar presentes en altas concentraciones, y en general la afinidad de las enzimas por el xenobiótico de interés es relativamente baja. En estas condiciones limitantes, el ambiente selecciona a favor de los microorganismos que crecen sobre los sustratos abundantes y los herbicidas son típicamente recalcitrantes (Koeck-Schulmeyer y col., 2013).

Considerando estos aspectos, en algunos casos la microbiota nativa no es eficaz en la eliminación del compuesto o bien este proceso ocurre de manera extremadamente lenta, por lo que resulta necesario recurrir al empleo de estrategias de biorremediación.

## **2.2. Los herbicidas s-triazinas como contaminantes frecuentes en los cuerpos de agua**

### **2.2.1. El agua como recurso**

El agua dulce es un recurso no renovable, indispensable para la existencia de toda forma de vida. Además de sus funciones naturales, es necesaria para las actividades humanas, ya que suministra bienes y servicios fundamentales para el desarrollo y bienestar de la población como la producción de alimentos, el saneamiento, la recreación, la energía hidroeléctrica, el mantenimiento de la biodiversidad y la integridad de los ecosistemas

(FAO, 2006). El agua es un recurso limitado en nuestro planeta debido a que más del 97% del agua disponible es salada y se concentra en mares y océanos. Del 3% restante, alrededor del 2% constituye los casquetes polares en forma de hielo. Le sigue en magnitud el agua subterránea, cuya reserva de hasta 1000 m de profundidad se estima en el 0,5% del total, mientras que el volumen de agua superficial llega a sólo el 0,02% y el agua del suelo y la atmósfera, componen sólo algo más del 0,01% del total (Auge, 2007; González Estévez, 2008).

En la naturaleza el agua cumple un circuito permanente conocido como ciclo hidrológico, en el cual la cantidad de la misma es invariable pero su estado, composición y disponibilidad en los distintos ambientes varía ampliamente (UNU, 2006). En la superficie de la tierra el agua que precipita en forma de lluvia o nieve puede incorporarse a lagos, ríos, arroyos y océanos o ser absorbida por la vegetación, la cual transpira el agua nuevamente hacia la atmósfera. El agua que no se evapora directamente de los lagos y ríos o es transpirada por las plantas, fluye a través de los subsuelos y llega hasta el nivel freático. Por lo tanto, el ciclo del agua resulta un proceso complejo impulsado por la energía solar y la fuerza de la gravedad (Barba Ho, 2002).

### **2.2.2. Contaminación de ambientes acuáticos por s-triazinas**

El vertiginoso crecimiento de la población y el consecuente aumento en la demanda de alimentos ha ocasionado una fuerte presión sobre los recursos hídricos del planeta incrementando la demanda de agua y alterando, a la vez, sus características físicas, químicas y biológicas (Kijne, 2003; Palanaippan y col., 2010). La modificación de las características del agua por la actividad antrópica se conoce como contaminación, y se entiende como cualquier acción o efecto de introducir algún material o inducir condiciones que, de manera directa o indirecta, impliquen una alteración perjudicial de su calidad, de modo que no reúna las condiciones necesarias para ser utilizada beneficiosamente en el consumo del hombre y de los animales. Así, la calidad del agua puede verse afectada por cambios de temperatura, pH, concentración de nutrientes, sedimentos, minerales inorgánicos, presencia de metales pesados, compuestos orgánicos persistentes y plaguicidas, organismos patógenos, sustancias radiactivas, etc. (Carr y Neary, 2008).

La contaminación de los cuerpos de agua puede proceder de fuentes localizadas o puntuales, asociadas a las actividades en las que el agua residual se vierte directamente a las masas de agua receptoras (por ejemplo, mediante cañerías de descarga) y por lo tanto se pueden controlar y cuantificar fácilmente. Por el contrario, las fuentes de contaminación no localizadas o difusas son el resultado de diversas actividades humanas en las que los contaminantes no tienen un punto claro de ingreso en los cursos de agua que los reciben, por lo que es mucho más difícil de identificar, medir y controlar (FAO, 1997).

Según la Organización de las Naciones Unidas (ONU), la actividad agrícola es el mayor consumidor de agua dulce y uno de los principales factores de degradación de los recursos hídricos del planeta (ONU, 2006). La introducción de la siembra directa (reemplazando al sistema de labranza tradicional) altamente demandante de productos químicos y la ganadería intensiva contribuyen como fuentes de contaminación difusa del agua superficial y subterránea. Diferentes trabajos vinculan cada vez más estas actividades con la salinización, el incremento en el contenidos de nitratos y de microorganismos contaminantes, la eutrofización, la alteración de la erosión y los patrones de sedimentación, etc. (Blarasín y col., 2008; 2014; Urseler y col., 2014). A esta problemática se suma la aplicación de plaguicidas como las *s*-triazinas que pueden distribuirse directa o indirectamente entre los distintos compartimientos ambientales (Arias-Estévez y col., 2008). En este sentido, el uso inadecuado y/o excesivo de estos compuestos para el control de plagas y malezas, la falta de controles apropiados, además de los vertidos procedentes de establecimientos de fabricación, los derrames accidentales, y los procesos naturales tales como la dilución, la escorrentía superficial y la lixiviación, conjuntamente con las características de persistencia y movilidad de estos compuestos, han provocado un importante deterioro de la calidad de aguas superficiales y subterráneas (Andrade y col., 2005; Hayes y col., 2006).

Desde hace varias décadas, los herbicidas del tipo *s*-triazinas, como la atrazina, han sido objeto de estudio en diversas partes del mundo debido a su uso generalizado, su elevada toxicidad, y a la amplia distribución y persistencia en el ambiente (Martínez-Iñigo y col., 2010). Numerosos estudios documentan la presencia de este compuesto en cuerpos de aguas superficiales y subterráneas de todo el mundo (**Tabla 3**).

**Tabla 3.** Antecedentes de detección de atrazina en sistemas hídricos superficiales y subterráneos.

Continentes	País	Recurso hídrico	Concentraciones detectadas ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Referencia
Europa	Grecia	Aguas superficiales: ríos y lagos	<LD - 5,9	Konstantinou y col., 2006
	Grecia	Aguas superficiales: ríos Evros y Ardas	<LD - 0,6	Vryzas y col., 2009
	Alemania, Grecia, Italia	Aguas costeras	<LD - 0,041	Nödler y col., 2013
	Portugal	Aguas subterráneas: acuífero Tagus-Sado	0,05 - 1,53	Silva y col., 2012
	Alemania	Aguas subterráneas: acuífero Zwischenscholle	0,01 - 1,2	Vonberg y col., 2014
	Italia	Aguas superficiales: lagunas	<LD - 0,03	Carafa y col., 2006
	España	Aguas superficiales y subterráneas	0,04 - 25,3 0,04 - 3,45	Sánchez-Camazano y col., 2005
	Bulgaria	Aguas superficiales: río Danubio	0,39 - 0,67	Vitanov y col., 2003
	Francia	Aguas superficiales: río Auvézère, río Amac	<LD - 0,02	Poulier y col., 2014
	España	Aguas superficiales y subterráneas	<LD - 0,33	Herrero-Hernández y col., 2013
África	Sudáfrica	Aguas superficiales: lagunas	0,39 - 9,3	Du Preez y col., 2005
	EE.UU.	Aguas subterráneas	<LD - 1,0	Barbash y col., 2001
	EE.UU.	Aguas superficiales	0,03 - 0,87	Benotti y col., 2008
	EE.UU.	Aguas de bebida	<LD - 1,9	Hladik y col., 2008
	EE.UU.	Aguas superficiales	0,024 - 1,29	McConnell y col., 2004
América	México	Aguas superficiales	<LD - 4,62	Hernández-Antonio y Hansen, 2011
	Brasil	Agua superficial	0,02 - 0,09	Cerdeira y col., 2004
	Argentina	Aguas superficiales: río Negro	<LD	Gil y col., 2005
	Argentina	Aguas superficiales: río Suquía	<LD - 0,4	Bonansea y col., 2013
	Argentina	Aguas superficiales	0,025 - 1,4	De Gerónimo y col., 2014
	Argentina	Aguas superficiales y subterráneas	<LD - 0,4	Portocarrero y col., 2016

Referencias. <LD: concentración menor al límite de detección de la técnica



Así, las concentraciones de atrazina detectadas en aguas superficiales se encontraron en un rango de <LD a 25,3  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , mientras que en aguas subterráneas fueron de <LD a 3,45  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Nödler y col. (2013) destacan que a pesar de que la aplicación de atrazina se encuentra prohibida por la Unión Europea desde 2004 (CE, 2004), este herbicida continua siendo detectado en concentraciones significativas en aguas costeras de Alemania, Grecia e Italia, demostrando su alta persistencia en estos ambientes. Por otra parte, muchos metabolitos de degradación, tales como dietilatrazina (DEA) y deisopropilatrazina (DIA) se han detectado en aguas subterráneas (Strong y col., 2002; McConnell y col., 2004). Estos antecedentes demuestran la capacidad de alcanzar los recursos hídricos, siendo un contaminante de gran importancia ambiental.

A pesar de los elevados volúmenes de aplicación de atrazina, en Argentina existen escasos antecedentes de detección de este herbicida en cuerpos de agua. Estudios recientes revelaron la presencia del compuesto en cuencas hídricas de la provincia de Buenos Aires y Tucumán (De Gerónimo y col., 2014) y en el río Suquía de la provincia de Córdoba (Bonansea y col., 2013) siendo este último el único antecedente de detección de atrazina en esta provincia. Por lo tanto, resulta relevante monitorear la presencia de atrazina en cuerpos de agua de la provincia de Córdoba, ya que su aplicación en los cultivos agrícolas de la provincia, principalmente maíz, se encuentra ampliamente difundida.

### **2.2.3. Toxicidad de los herbicidas s-triazinas**

Debido a su aplicación intensiva, se ha evidenciado una acumulación de residuos de s-triazinas en el ambiente con consecuentes efectos negativos sobre la biota, siendo especialmente significativo en sistemas acuáticos dado que éstos se caracterizan por una respuesta lenta a los disturbios ambientales (Malato y col. 2001; Nwani y col., 2011). El impacto de un herbicida en los ambientes acuáticos depende principalmente de su toxicidad, de su modo de dispersión y de su concentración. Cuando alcanzan estos ecosistemas, en general, pueden causar efectos tóxicos directos (letales o subletales) sobre los organismos que los habitan produciendo una disminución en la biodiversidad, modificaciones en las cadenas tróficas y afectando indirectamente a especies tolerantes. Los contaminantes que llegan a un cuerpo de agua pueden inducir además cambios en la

dinámica de nutrientes y oxígeno alterando la función del ecosistema, y ocasionar, directa o indirectamente, severos impactos sobre la salud humana (Kortekamp, 2011; Bottoni y col., 2013).

La atrazina se considera ligeramente tóxica para la vida acuática (Graymore y col., 2001), sin embargo, existen escasos estudios que evalúan los efectos de este herbicida sobre las comunidades microbianas en los ecosistemas acuáticos naturales (Dorigo y col., 2002, 2004). Atrazina resulta especialmente tóxica para los organismos fotosintéticos como las algas, debido a que actúa interfiriendo en el proceso de fotosíntesis (DeLorenzo y col., 2001).

La velocidad de acumulación de los herbicidas en los tejidos de los organismos depende del comportamiento en la cadena alimentaria y de sus características fisicoquímicas (estabilidad química, solubilidad, fotodescomposición, adsorción en el suelo, etc.) (Grillo y col., 2012). Debido a que los animales son organismos no fotosintéticos el efecto tóxico es menor respecto de las plantas acuáticas y las algas. En particular, numerosos trabajos han demostrado el efecto de la exposición a atrazina en diferentes organismos superiores (Fazlurrahman y col., 2009; Shenoy, 2012). Las *s*-triazinas son potentes disruptores endocrinos y provocan trastornos reproductivos en mamíferos (Fan y col., 2007; Lasserre y col., 2009). Laws y col. (2000) observaron un retraso en la maduración sexual de ratas hembras expuestas a atrazina, efectos que fueron atribuidos a la inhibición de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina hipotalámica (GnRH). Este herbicida tiene efectos a largo plazo sobre la reproducción, relacionado con niveles bajos de esperma y problemas menstruales, y podría asociarse a tumores reproductivos y pérdida de peso tanto en anfibios como en humanos (Ackerman, 2007; Duhigg, 2009). Hayes y col. (2002) demostraron su acción como disruptor endócrino en el desarrollo sexual de la rana africana *Xenopus laevis* con disminución en los niveles de testosterona, inducción de hermafroditismo y demasculinización en los machos expuestos. Por otra parte, existe evidencia experimental que demuestra daños en los sistemas reproductivo, nervioso e inmunológico en diversas especies de peces (Xu y col., 2011). También se ha propuesto una posible asociación entre la contaminación con atrazina y una mayor incidencia en varios tipos de cáncer en humanos (mama, ovario y tumores uterinos), leucemia y linfoma (Kettles y col., 1997; Singh y col., 2004) y riesgo de desarrollar cáncer de próstata (Marin-Morales y col., 2013). Se ha detectado un aumento de aparición de neoplasia de glándula

mamaria en ratas (Bimbaum y Fenton, 2003). En consecuencia, el Comité de Examen del Programa de Pesticidas (OPP) de la EPA considera a la atrazina como un compuesto posiblemente carcinógenos para humanos (USEPA, 1999).

El beneficio que supone la eliminación de malezas en los cultivos es contrarrestado por el impacto negativo que genera la aplicación de herbicidas en el ambiente y en los seres vivos. La presencia de atrazina en suelo o agua es considerada un grave riesgo para el medio ambiente y la salud pública (Nguyen y col., 2014). La detección de atrazina y otros herbicidas *s*-triazinas en los cursos de aguas superficiales, en concentraciones que con frecuencia superan los niveles máximos aceptables para agua potable, resulta preocupante ya que representa un riesgo directo para la salud humana a través del consumo de agua potable. Para reducir al mínimo los daños producidos por estos herbicidas, resulta necesaria la aplicación de procesos que permitan la remoción de *s*-triazinas de los sitios contaminados.

Debido a su toxicidad y su amplia aplicación, las concentraciones ambientales de *s*-triazinas han sido reguladas en muchos países. El máximo nivel aceptable de atrazina en el agua potable es de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  en Europa y de  $3,0 \mu\text{g.L}^{-1}$  en EE.UU. (CE, 1998; US EPA, 2009). En 2001, la Unión Europea incluyó a atrazina y simazina en una lista de sustancias peligrosas prioritarias. En 2004, las *s*-triazinas fueron prohibidas en numerosos países europeos (CE, 2004). Sin embargo, en América del Norte y América Latina aún no existen restricciones en su uso (Hansen y col., 2013).

### **3. La biorremediación como tecnología para la recuperación de ambientes contaminados con herbicidas *s*-triazinas**

En general, los procesos tradicionales de potabilización de agua no eliminan xenobióticos, como los herbicidas, de manera efectiva. En el caso particular de la atrazina existen diversos métodos para la eliminación de atrazina en aguas contaminadas (fotocatálisis, carbón activado) éstos resultan muy costosos y a la vez existen problemas de rendimiento, formación de intermediarios tóxicos y/o no se produce la mineralización del herbicida (Baghapour y col., 2013; Benner y col., 2013). Por ello existe la necesidad de desarrollar estrategias alternativas para eliminar eficazmente los xenobióticos de los cursos

de agua y limitar así el daño en los ecosistemas, los organismos que los habitan y la salud humana.

La biorremediación es una tecnología que utiliza microorganismos para la degradación o transformación de contaminantes orgánicos presentes en diversos ambientes aprovechando el potencial metabólico de los mismos para degradar dichos compuestos. Constituye un medio rentable y se encuentra cada vez más difundido como tecnología limpia para restablecer la calidad del ambiente (Lyon y Vogel, 2013; Scragg, 2015). En este proceso, los microorganismos utilizan los contaminantes como fuente de nutrientes o energía para su crecimiento (Benimeli y col., 2008). No obstante, a la hora de su aplicación se deben considerar tres principios básicos: la susceptibilidad del contaminante a la transformación biológica, la accesibilidad de los contaminantes para los microorganismos (biodisponibilidad) y la optimización de la actividad biológica (bioactividad) para favorecer el crecimiento y la actividad microbiana (Niti y col., 2013).

El proceso de biorremediación se puede llevar a cabo en diferentes medios como suelos, sedimentos, aguas superficiales y subterráneas y lodos biológicos (Pathak y Dikshit, 2011; Evy y col., 2012). La biorremediación ha sido propuesta como una alternativa ambientalmente adecuada para el saneamiento de los recursos hídricos contaminados con herbicidas, aunque la implementación a gran escala ha sido hasta la actualidad limitada. Un desafío importante que ha dificultado el progreso de la biorremediación en ambientes acuáticos es que los herbicidas se encuentran en el agua en concentraciones traza, y por lo tanto la biorremediación de cursos de agua contaminados con herbicidas debe dirigirse a los residuos solubles que son transportados en la fase acuosa en bajas concentraciones. Además, como se describió previamente, estos compuestos se encuentran en el agua junto con otras fuentes de C o N que están presentes en concentraciones similares o mayores; por lo que los microorganismos degradadores deben competir con las comunidades microbianas autóctonas por estos sustratos mientras mantienen la actividad de biodegradación del herbicida.

### 3.1. Ventajas y desventajas de la biorremediación

La biorremediación microbiana presenta múltiples ventajas sobre otros procedimientos de remediación (Demnerová y col., 2005; Perelo, 2010; Niti y col., 2013), dado que:

- Utiliza los recursos disponibles en la naturaleza para eliminar la contaminación, y por ser un proceso natural tiene amplia aceptación pública.
- Es útil para la eliminación de una amplia variedad de contaminantes, ya que puede conducir a la completa mineralización del compuesto; sustancias que son consideradas como peligrosas pueden ser transformadas en productos inocuos.
- Es en general menos costosa que las tecnologías convencionales que se utilizan para la eliminación de desechos peligrosos.
- Puede ser aplicada a sitios con bajas concentraciones de contaminantes donde la limpieza por métodos físicos o químicos no sería factible

Desafortunadamente, la biorremediación presenta algunos inconvenientes importantes, que actualmente aún limitan la aplicación de estas técnicas (Rockne y Reddy, 2003; Niti y col., 2013):

- Los procesos pueden tardar más tiempo y los resultados son menos predecibles que los métodos convencionales.
- Se limita sólo a compuestos biodegradables y en muchos casos puede conducir a la degradación parcial del contaminante, generando productos de degradación más persistentes y/o tóxicos que el compuesto original.
- Se requiere de un seguimiento durante todo el proceso, lo que en general es muy costoso y resulta difícil extrapolar desde estudios a escala de laboratorio a operaciones a campo.

No obstante, la biorremediación constituye una herramienta biotecnológica que se encuentra en continuo estudio y desarrollo, y que resulta prometedora para su aplicación en la eliminación de contaminantes del ambiente.

### 3.2. Estrategias de biorremediación utilizadas en el tratamiento de ambientes contaminados

Los procesos de biorremediación se pueden clasificar en dos grandes categorías: *in situ* y *ex situ* (Aggarwal y col., 1990). En la biorremediación *in situ* el tratamiento se realiza en el sitio donde se encuentra el material contaminado. La biorremediación *ex situ* implica la remoción física del material contaminado para su posterior tratamiento en otro sitio.

Aunque tanto los métodos de remediación *in situ* como *ex situ* dependen esencialmente del metabolismo microbiano, la biorremediación *in situ* es, en general, la metodología elegida para la recuperación de suelos y aguas contaminadas (Jorgensen, 2007). Ésta incluye técnicas poco invasivas, que ocasionan escasos disturbios en los ecosistemas. Además, no resulta necesario el transporte de los residuos fuera del sitio y las potenciales amenazas para la salud humana y el ambiente que pueden surgir durante el transporte. Dentro de las metodologías *in situ*, existen varias tecnologías disponibles, siendo las principales la atenuación natural monitoreada, la bioestimulación, y el bioaumentación.

- La atenuación natural hace referencia a la capacidad intrínseca del ambiente para degradar o transformar un contaminante dentro de un plazo de tiempo razonable.
- La bioestimulación es el siguiente paso después de la atenuación natural, en el que tratamientos físicos y/o químicos refuerzan la biodegradación natural, e implica la adición de nutrientes, minerales traza, receptores o dadores de electrones para mejorar la eficacia y estimular la capacidad degradativa de la microbiota nativa, incrementando así la velocidad de degradación. Esta estrategia requiere un amplio conocimiento del sitio contaminado para elegir el estímulo adecuado para los microorganismos que ya existen en el lugar.
- En otros casos, los organismos con capacidad para degradar un determinado contaminante pueden no estar presentes en el sitio contaminado o bien encontrarse en bajo número para un tratamiento adecuado. En estos casos, el bioaumentación podría proporcionar una ventaja sobre las otras estrategias de biorremediación, dado que consiste en la adición de biocatalizadores (como bacterias, hongos o enzimas) con capacidad de degradar o transformar los contaminantes químicos, al sitio contaminado (Madsen, 1991).

La estrategia de biorremediación a aplicar en un sitio determinado depende de diversos factores como la naturaleza del contaminante a remediar, las condiciones del lugar, la población de microorganismos nativos, el nivel de recuperación requerido y el costo del

tratamiento, que suele ser mucho más elevado en la biorremediación *ex situ* que en los procedimientos *in situ* (Megharaj y col., 2011).

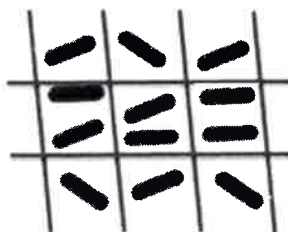
### **3.3. Inmovilización de bacterias en matrices poliméricas como alternativa biotecnológica actual en estrategias de bioaumentación**

La utilización de bacterias en procesos de biorremediación constituye una metodología atractiva para la recuperación de ambientes contaminados. Un factor importante a considerar en un proceso de bioaumentación es el sistema de inoculación, y si la adaptación exitosa de las bacterias inoculadas resulta poco probable, una alternativa a las estrategias de bioaumentación convencionales consiste en introducir las bacterias degradadoras de herbicidas inmovilizadas en soportes poliméricos.

Esta metodología ofrece múltiples ventajas que sustentan la aplicación de células inmovilizadas en la biorremediación de contaminantes: a) protege a los microorganismos ante las condiciones ambientales adversas o los depredadores (protozoos, parásitos, etc.) que amenazan la supervivencia microbiana; b) evita el estrés nutricional ya que permite el intercambio de nutrientes y productos de desecho; c) permite la introducción de una mayor densidad de bacterias degradadoras al ambiente y evita la filtración de células aumentando la velocidad de conversión del sustrato; d) mejora la estabilidad de los microorganismos en altas concentraciones de contaminantes; e) preserva la viabilidad celular a largo plazo ofreciendo la posibilidad de hacer aplicaciones repetidas de las células; f) permite que el metabolismo microbiano permanezca relativamente constante en el tiempo y g) simplifica la recuperación de la solución ya decontaminada (Hsieh y col., 2008; Khondee y col., 2012; Angelim y col., 2013). Además, las células inmovilizadas son más fáciles de manipular, lo que permite minimizar los riesgos de contaminación durante el transporte, aplicación y almacenamiento (Park y Chang, 2000).

Las estrategias de inmovilización se han desarrollado principalmente para enzimas, describiéndose diversas tecnologías entre las que se destacan adsorción física, atrampamiento y encapsulación, entre otras (Elnashar, 2011). Para la inmovilización de bacterias se utiliza principalmente el atrapamiento (**Figura 3**) o encapsulación, estrategias en las cuales los microorganismos están libres en solución, pero su movimiento se

encuentra limitado por la red estructural de un gel (atrapamiento) o se encuentran envueltos dentro de diversas formas de membranas semipermeables (encapsulación). El tamaño de la red del gel se controla para asegurar que la estructura sea lo suficientemente cerrada para impedir fugas de células permitiendo, al mismo tiempo, la libre circulación de nutrientes y desechos.



**Figura 3.** Esquema representativo de células bacterianas encapsuladas en una matriz polimérica.

En la bibliografía se documenta el empleo de una amplia gama de polímeros como matrices de inmovilización de células. Entre éstos se citan polímeros sintéticos como poliacrilamida (Manohar y Karegoudar, 1998), polietilenglicol, alcohol polivinílico (Chitiva-Urbina y Dussan, 2003; Cunningham y col., 2004; Zhang y col., 2007; Tong y col., 2014) y poliuretano (Oh y col., 2000; Al-Zuhair y El-Naas, 2011; Wang y col., 2012) o naturales como carbón activado, que es el método más frecuentemente utilizado, aunque resulta costoso (Ehrhardt y Rehm, 1989; Abu-Salah y col., 1996), alginato, carragenina, agar, colágeno, quitina y quitosano (Morgante y col., 2010; Banerjee y Ghoshal, 2011; Lu y col., 2012). Los soportes de inmovilización pueden ser clasificados en función a su forma, que puede ser regular o irregular, encontrándose como de perlas, fibras, esferas huecas, películas delgadas, discos o membranas. La selección de la forma adecuada depende de la aplicación para la cual se diseñe la inmovilización (Elnashar 2011). Las perlas son ampliamente utilizadas, ya que tienen mayor relación superficie/volumen y pueden ser formadas por diversos métodos tales como la técnica de interfase, métodos de gelificación iónica o método de goteo (Danial y col., 2010; Elnashar y col., 2009). Esta última metodología fue la seleccionada en este trabajo de tesis.



#### **4. Métodos analíticos para la determinación de *s*-triazinas en muestras ambientales**

La mayoría de los plaguicidas son compuestos que no se encuentran naturalmente en el ambiente, y por lo tanto, concentraciones apenas detectables de los mismos indican contaminación antropogénica. Las técnicas más comúnmente empleadas para la determinación de *s*-triazinas en muestras ambientales complejas son la cromatografía gaseosa (CG) y la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

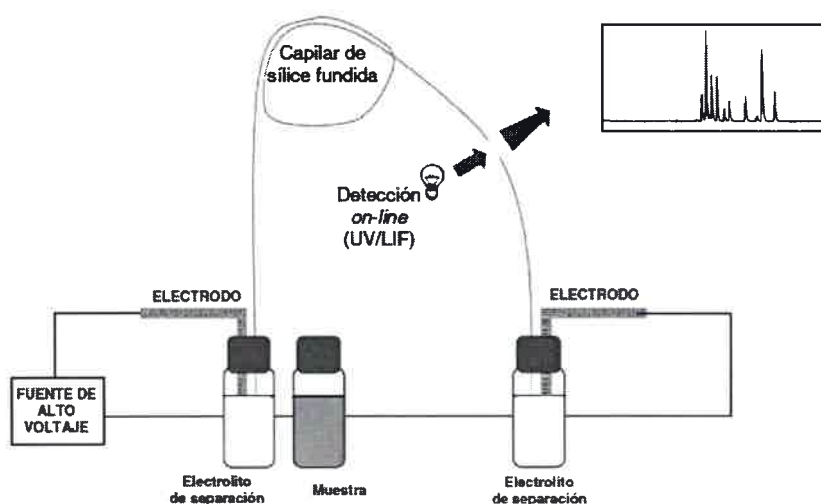
La CG es una de las técnicas más ampliamente utilizada para el análisis de plaguicidas dado que, en general, se consiguen límites de detección bajos (en el rango de los  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  o  $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Muchos métodos oficiales de análisis están basados en esta técnica y utilizan diferentes detectores como los de nitrógeno y fósforo (NPD), captura electrónica (ECD), ionización de llama (FID) o espectrometría de masas (MS), siendo este último el más utilizado ya que posee mayor sensibilidad (Andreu y Picó, 2004). El análisis de triazinas mediante CG fue realizado a partir de muestras de aguas superficiales y subterráneas (Vassilakis y col., 1998), suelo (Funari y col., 1998) y vegetales (Tadeo y col., 2000). Sin embargo, el análisis de compuestos de elevado peso molecular, altamente polares o térmicamente lábiles mediante CG presenta grandes dificultades o es prácticamente imposible. Ello ha favorecido que la HPLC y posteriormente su acoplamiento a MS haya adquirido mayor relevancia en la detección de plaguicidas. Un amplio espectro de detectores se encuentran disponibles para la instrumentación de HPLC y técnicas innovadoras de preparación de muestras permiten el análisis de *s*-triazinas a bajas concentraciones en matrices ambientales complejas (Singh y col., 2004; Borba da Cunha y col., 2004; Ribeiro y col., 2005).

Existen nuevas metodologías empleadas en el análisis de triazinas como la electroforesis capilar (EC), que es una alternativa a las técnicas de HPLC y CG convencionales y los inmunoensayos enzimáticos, que permiten el análisis de triazinas en condiciones de campo.

#### 4.1. Electroforesis Capilar

La EC es una familia de nanotécnicas relacionadas que emplean capilares de muy pequeño diámetro interno para llevar a cabo separaciones altamente eficientes de moléculas tanto de pequeño como de gran tamaño. Es una técnica de separación basada en la migración diferencial de especies cargadas (iones) o neutras, por acción de un campo eléctrico o gradiente de potencial establecido para tal fin. Las partículas mencionadas pueden ser: cationes, aniones, macromoléculas, coloides, células vivas como bacterias o materia inerte como arcilla.

El equipo consta de un tubo capilar, dos depósitos que contienen el electrolito o buffer de separación, un detector y una fuente de alto voltaje que suministra potenciales eléctricos entre 0 y 50 kV y que permite invertir la polaridad (**Figura 4**).

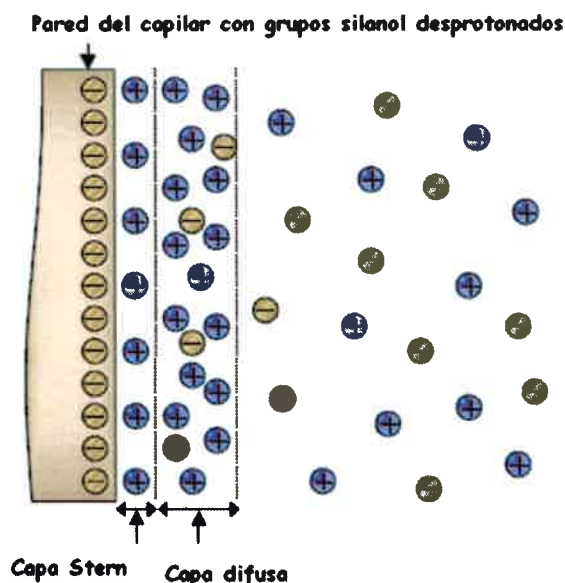


**Figura 4.** Esquema general de un equipo de electroforesis capilar (Tomado de Hernández Borges, 2005).

La EC utiliza capilares de sílice fundida (de entre 25-100  $\mu\text{m}$  de diámetro interno y 20-80 cm de longitud) junto con altos campos eléctricos (normalmente hasta  $1000 \text{ V}\cdot\text{cm}^{-1}$ ). Los capilares se encuentran recubiertos exteriormente con poliimida, que aporta la flexibilidad y la resistencia de la que carecen, dado que son extremadamente frágiles. Su baja absorción de la radiación en la zona del espectro UV-VIS, hace que este tipo de detección sea factible y, además, su elevada relación superficie externa/volumen interno favorece la disipación del calor generado por efecto Joule durante la aplicación de voltaje,

aunque, en este sentido, los capilares se encuentran dentro de un sistema de termostatación que permite mantener la temperatura constante de un análisis a otro, dentro de límites conocidos. Los extremos de los capilares de sílice fundida se colocan en el interior de los depósitos que contienen el electrolito de separación, al igual que los electrodos. La muestra es colocada en el interior del capilar reemplazando uno de los depósitos, por otro que la contenga, aplicando bien sea un campo eléctrico (inyección electrocinética) o presión externa (inyección hidrodinámica).

La pared interna del capilar tiene grupos silanoles que en contacto con el electrolito de separación se ionizan. El grado de ionización se controla principalmente mediante la activación previa del capilar con una solución de NaOH y con el pH del buffer de separación (aparecen cargas negativas con disoluciones acuosas de pH superior a 2,5-3). De este modo, la pared cargada negativamente atrae a los iones con carga positiva del electrolito creando una doble capa eléctrica (**Figura 5**).



**Figura 5.** Representación de las interacciones que ocurren en el interior del capilar.

Esta doble capa tiene dos zonas: una compacta, próxima a la pared del capilar y en la cual las interacciones que se dan entre los grupos cargados negativamente de la sílice y los contraiones del buffer son tan grandes que compensan la agitación térmica, y otra zona más alejada de la pared, denominada difusa, con interacciones más débiles con los silanoles cargados, pudiéndose producir agitación térmica. Bajo la acción del campo eléctrico, las cargas positivas de la zona difusa se desplazan hacia el cátodo y arrastran con

ellas el agua de solvatación que llevan asociada. Es lo que se conoce como flujo electroosmótico (EOF, de sus siglas en inglés) que influirá de igual forma en todas aquellas sustancias que se encuentren en el interior del capilar.

La EC ha cobrado relevancia en la determinación de compuestos xenobióticos. Presenta como ventajas la alta eficacia en las separaciones, elevada rapidez de análisis, facilidad de automatización, es aplicable a una amplia gama de compuestos, requiere de volúmenes de muestra pequeños y un mínimo consumo de reactivos, favoreciendo el bajo costo del análisis y un mínimo impacto al medio ambiente debido a los bajos requerimientos de muestra y de disolventes orgánicos (Barchańska y Baranowska, 2009). Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones: es menos sensible que el HPLC (del orden de 100 y 1000 veces inferior) y no es adecuada para la determinación de compuestos volátiles y polímeros no iónicos de elevada masa molecular (Albillos García, 2003).

La EC ha crecido en importancia como método para el análisis de triazinas en muestras ambientales (Carabias-Martínez y col., 2006; Turiel y col., 2000; Picó y Mañes, 2003). Fue utilizada para la determinación de atrazina, simazina, prometrina, propazina y sus metabolitos en aguas subterráneas y superficiales (Carabias- Martínez y col., 2006). Por los motivos antes expuestos, esta técnica ha sido empleada en este estudio para la detección y cuantificación de atrazina en los ensayos de biodegradación.

#### **4.2. Inmunoensayos enzimáticos**

Los inmunoensayos se han ido perfeccionando durante años y actualmente son una alternativa a los análisis convencionales de residuos de plaguicidas. Desde hace algunas décadas se encuentra disponible en el mercado un método de inmunoensayo enzimático (ELISA) para la detección de atrazina en muestras ambientales (suelo, agua, material biológico), el cual se encuentra aprobado por US EPA (2004). La técnica de ELISA es una metodología sensible, ya que posee un límite de detección de  $0,04 \mu\text{g.L}^{-1}$ , comparable al límite de detección de atrazina por HPLC ( $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Presenta como ventajas que es un método rápido, no requiere laboriosos pretratamientos de las muestras, no hay interferencias de la matriz y puede llevarse a cabo en condiciones de campo.

Aunque este método es más simple y rápido que CG, HPLC o EC, posee como desventaja que los anticuerpos adheridos al fondo de los pocillos pueden reaccionar de forma cruzada con otros herbicidas de la familia *s*-triazina como propazina (96% de reactividad cruzada), simazina (14,3%), ametrina (1,5%) y terbutilazina (0,33%) (Abraxis LLC, USA) dando lugar a una sobreestimación de las concentraciones del herbicida en dichas muestras (Gruessner y col., 1995.; US EPA 2004). Sin embargo, estos compuestos no son comúnmente aplicados en los cultivos de la región centro-sur de Córdoba y sólo se documenta la aplicación de simazina en pasturas de alfalfa (Rainero, 2014). El método de ELISA es utilizado con éxito desde la década del 90' por diferentes investigadores para la determinación y cuantificación de atrazina en aguas superficiales y subterráneas (Thurman y col., 1990; Mallat y col., 2001; Close y Flintoft, 2004; Abuknesha y Griffith 2004; Byer y col., 2011; Sherchan y Bachoon 2011), plantas de tratamiento para aguas de bebida (Graziano y col., 2006); suelo (Xiong y col., 1998) y leche (Franck y col., 1995).

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

En ambientes acuáticos de agroecosistemas de la región centro-sur de Córdoba se produce la llegada de atrazina en concentraciones que podrían alterar el funcionamiento de los mismos, provocando modificaciones en las comunidades microbianas nativas. Simultáneamente, en estos ambientes existen especies bacterianas adaptadas a las condiciones ambientales y a la presencia del herbicida que juegan un rol esencial en la atenuación natural del mismo. Sin embargo, existen ambientes en los cuales no ocurre la atenuación natural, en los cuales el empleo de estrategias de bioaumentación mediante utilización de bacterias degradadoras inmovilizadas en matrices poliméricas, como quitosano, garantizan un proceso de remoción eficiente dado que preservan la actividad metabólica y viabilidad de las células en el tiempo.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivos Generales**

1. Estudiar el impacto ambiental que generan los sistemas de producción agrícola sobre recursos de agua dulce de la provincia de Córdoba.
2. Seleccionar especies bacterianas nativas de aguas superficiales, eficientes en la degradación de herbicidas, para su futura aplicación en procesos de biorremediación de ecosistemas acuáticos.

### **Objetivos específicos**

1. Detectar la presencia de atrazina en aguas ambientales de la región centro-sur de la provincia de Córdoba.
2. Evaluar el impacto de herbicidas clorados sobre la microbiota acuática nativa.
3. Aislar y caracterizar especies bacterianas degradadoras de herbicidas clorados a partir de muestras de aguas superficiales de la región.
4. Estudiar la eficiencia de los aislamientos nativos para biodegradar y/o biotransformar los herbicidas en estudio, a escala de laboratorio.
5. Optimizar las condiciones para la inmovilización de aislamientos bacterianos nativos degradadores de atrazina en matriz de quitosano.
6. Estudiar la eficiencia de biodegradación de los aislamientos microbianos inmovilizados en matriz de quitosano, como sistema de tratamiento de aguas contaminadas con herbicidas en microcosmos.

# *Capítulo 2*

**MATERIALES Y MÉTODOS**

---

---

---

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Reactivos

#### 1.1. Herbicidas

Para suplementar los medios de cultivo y para los ensayos de microcosmos se emplearon atrazina (99% de pureza) gentilmente cedido por Atanor (Buenos Aires, Argentina) y ácido cianúrico (Sigma Aldrich).

La atrazina se solubilizó con metanol a una concentración de  $12 \text{ mg.mL}^{-1}$  (solución stock) y no fue esterilizada (García-Gonzales, 2003). El patrón de ácido cianúrico se solubilizó en agua destilada a una concentración de  $1,5 \text{ mg.mL}^{-1}$  y se esterilizó mediante filtración utilizando filtros Biopore de  $0,22 \mu\text{m}$  de tamaño de poro. Ambas soluciones fueron conservadas a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ .

#### 1.2. Quitosano

En los ensayos de inmovilización de *Arthrobacter* sp. AAC22 se utilizó quitosano de bajo peso molecular ( $Q_L$ ) y de peso molecular medio ( $Q_M$ ) de alta pureza (Sigma Aldrich).

Las concentraciones empleadas difieren según el experimento de inmovilización:

a) para la encapsulación de bacterias en matriz de quitosano (Q) nativo se utilizaron soluciones de  $Q_M$  y  $Q_L$  a una concentración de 1% (p/v) disuelto en una mezcla de ácido acético 1% (v/v): buffer acetato (pH 4,8) en una relación 1:3.

b) para evaluar la adherencia bacteriana a perlas se prepararon soluciones de  $Q_M$  a una concentración de 1,5% (p/v) disuelto en ácido acético 1,5% (v/v).

c) para las reacciones de derivatización se se prepararon soluciones de  $Q_M$  al 2% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v).

Las soluciones se sonicaron durante 2 h (potencia: 70 W, frecuencia: 40 KHz) y luego se colocaron en un agitador orbital a 110 rpm durante 12 h.



### 1.3. Cloruro de 2,3,5-trifenil -2H de tetrazolio

Se disolvió 0,1 g de cloruro de 2,3,5-trifenil -2H de tetrazolio (TTC) (Merck) en 10 mL de agua bidestilada (solución 1% p/v). Se fraccionó en tubos de 1,5 mL y se conservó a -20 °C.

### 1.4. Cicloheximida

Se disolvió 1 g de cicloheximida (Merck) en 10 mL de etanol 50% (v/v). La concentración final de la solución fue de 100 mg.mL<sup>-1</sup>. Se fraccionó en tubos de 1,5 mL y se conservó a -20 °C.

## 2. Medios de cultivo

### 2.1. Medio Trypticosa Soya Agar (TSA)

El medio TSA fue utilizado para la enumeración de bacterias mediante recuentos en placa en superficie en los ensayos en microcosmos, de inmovilización de bacterias y de biorremediación.

#### Componentes

Trypticosa soya	30	g
Extracto de levadura	6	g
Agar bacteriológico	18	g
Agua bidestilada c.s.p.	1000	mL

### 2.2. Medio Mínimo Mineral M9

El medio mínimo M9 (Arie Geerlof- Helmholtz Center Munich) fue utilizado para el aislamiento de microorganismos degradadores de atrazina y en el crecimiento y mantenimiento de las cepas seleccionadas.

Componentes

Solución de sales M9 (10X)	100	mL
Fuente de Carbono* (0,022 M)	20	mL
MgSO <sub>4</sub> 1 M	1	mL
CaCl <sub>2</sub> 1 M	0,3	mL
Tiamina (1 mg.mL <sup>-1</sup> )	1	mL
Solución de elementos traza (100X)	10	mL
Agua bidestilada c.s.p.	1000	mL

(\*)Fuente de Carbono: glucosa, sacarosa o manitol  
pH 7,2

• *Solución de sales M9 (10X)*

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> •2H <sub>2</sub> O	75,2	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	30	g
NaCl	5	g
NH <sub>4</sub> Cl*	5	g
Agua bidestilada c.s.p.	1000	mL

(\*) Sólo se agregó NH<sub>4</sub>Cl cuando no se utilizó atrazina como fuente de N.

• *Solución de elementos traza (100X)*

EDTA	5	g
FeCl <sub>3</sub> •6H <sub>2</sub> O	0,8	g
ZnCl <sub>2</sub>	84	mg
CuCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	13	mg
CoCl <sub>2</sub> •2H <sub>2</sub> O	10	mg
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	10	mg
MnCl <sub>2</sub> •4H <sub>2</sub> O	1,6	mg
Agua bidestilada c.s.p.	1000	mL

Cuando fue necesario, para la preparación de medio Mínimo Mineral M9 sólido, se adicionó agar bacteriológico (Britania, Argentina) a una concentración de 18 g.L<sup>-1</sup>.

Los medios de cultivo fueron esterilizados en autoclave a 121 °C y 1 atm de presión durante 15 min.

### 2.3. Medio para motilidad (Edwards y Ewing)

#### Componentes

Extracto de carne vacuna	3	g
Peptona	10	g
NaCl	5	g
Agar bacteriológico	4	g
Agua bidestilada c.s.p.	1000	mL
pH 7,3		

### 3. Soluciones

#### 3.1. Buffer U

#### Componentes

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,4196	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,1998	g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	0,02465	g
Agua bidestilada c.s.p	1000	mL
pH 7		

#### 3.2. Buffer fosfato salino

#### Componentes

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,5176	g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	7,1988	g
NaCl	0,5	g
Agua bidestilada c.s.p.	1000	mL
pH 7		

### 3.3. Solución de PBS (10X)

El PBS fue empleado en el lavado de células y de perlas en el proceso de inmovilización de bacterias.

#### Componentes

NaCl	80	g
KCl	2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	14,4	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2,4	g
Agua bidestilada c.s.p.	1000	mL
pH 7,4		

### 3.4. Buffer TAE (50X)

#### Componentes

Tris	242	g
Solución EDTA 0,5 M	100	mL
Ácido acético glacial	57,1	mL
Agua bidestilada c.s.p.	1000	mL
pH 8,0		

### 3.5. Soluciones para DGGE

#### 3.5.1. Solución de Acrilamida/Bis 40% (37:5:1)

#### Componentes

Acrilamida	38,93	g
Bis-acrilamida	1,07	g
Agua destilada c.s.p.	100	mL

Se esterilizó por filtración (Millipore 0,45 µm) y se almacenó a 4 °C.

### 3.5.2. Soluciones desnaturalizantes de Urea/ Formamida

**Tabla 4.** Soluciones para la obtención de diferentes gradientes de urea/ formamida.

<i>Componentes</i>	<b>20%</b>	<b>30%</b>	<b>40%</b>	<b>50%</b>	<b>60%</b>	<b>70%</b>
40% Acrilamida/Bis (37:5:1)	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL	20 mL
50x TAE buffer	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL	2 mL
Formamida	8 mL	12 mL	16 mL	20 mL	24 mL	28 mL
Urea	8,4 g	12,6 g	16,8 g	21 g	25,2 g	29,4 g
Agua destilada	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL	100 mL

### 3.5.3. Solución de persulfato de amonio

Se disolvió 0,1 g de persulfato de amonio en 1 mL de agua destilada (solución 10% p/v). Se fraccionó y se conservó a -20 °C.

## 4. Monitoreo de atrazina en aguas superficiales de la provincia de Córdoba

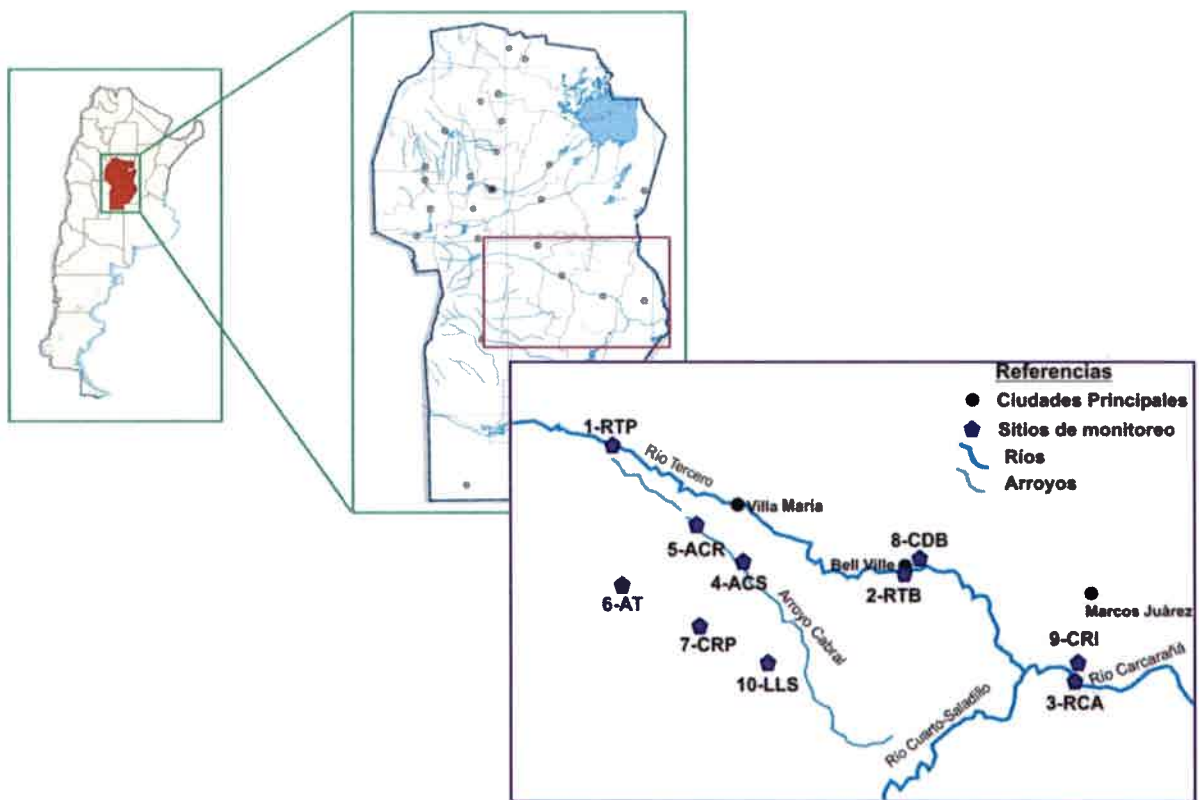
### 4.1. Sitios de monitoreo

En el presente trabajo se establecieron 10 estaciones de monitoreo localizadas sobre diferentes cursos de agua dulce (río, canales, arroyos, lagunas) de la región centro-sur de la provincia de Córdoba (**Tabla 5** y **Figura 6**). Los sitios fueron identificados con coordenadas del sistema de posicionamiento global (GPS) y representadas gráficamente utilizando el programa CoreDRAW11.

**Tabla 5.** Estaciones de monitoreo de aguas superficiales de la región centro-sur de la provincia de Córdoba.

Referencia	Estación de muestreo	Localidad	Latitud (S)	Longitud (O)
1-RTP	Río Tercero (Ctalamochita)	Pampayasta	32° 14' 40''	63° 38' 54''
2-RTB	Río Tercero (Ctalamochita)	Bell Ville	32° 37' 36.38''	62° 41' 29.20''
3-RCA	Río Carcarañá	Inriville	32° 55' 52.9''	62° 10' 04.6''
4-ACS	Arroyo Cabral Cruce RP4	Sanabria	32° 34' 51.10"	63° 14' 48.06"
5-ACR	Arroyo Cabral (Cruce RN 158)	Arroyo Cabral	32° 28' 47.11"	63° 23' 24.42"
6-AT	Arroyo Tegua	Dalmacio Vélez	32° 37' 58.0''	63° 36' 52.6''
7-CRP	Canal rural	Pasco	32° 45' 32.68"	63° 22' 33.72"
8-CDB	Canal desviador de Bell Ville (Cruce RN 9)	Bell Ville	32° 36' 13.7''	62° 40' 17.7''
9-CRI	Canal rural (Cruce RP 12)	Inriville	32° 52' 48.91"	62° 9' 10.11"
10-LLS	Laguna La salada	Pasco	32° 49' 005''	63° 23' 040''

**Referencias.** RP: Ruta Provincial; RN: Ruta Nacional



**Figura 6.** Estaciones de monitoreo de aguas superficiales en la región centro-sur de Córdoba.

Los monitoreos se realizaron entre 2011-2015 y en dos épocas diferentes:

- a) octubre-noviembre: corresponde a la estación de primavera, con intensa aplicación de herbicidas y mayor frecuencia/volumen de precipitaciones;

b) abril-mayo: corresponde a la estación de otoño, coincide con la escasa o nula aplicación de herbicidas y menor frecuencia/volumen de precipitaciones.

Se obtuvieron los valores de precipitaciones ocurridas en la localidad más cercana a cada sitio de muestreo, a partir de la base de datos de la Bolsa de cereales de Córdoba ([www.bccba.com.ar](http://www.bccba.com.ar)). Para cada período de monitoreo se calcularon las precipitaciones medias en cada sitio, considerando para la estación de primavera las precipitaciones ocurridas desde la aplicación de atrazina hasta el momento de muestreo (octubre a diciembre), y para otoño las precipitaciones ocurridas desde el monitoreo de primavera hasta el de otoño (enero a mayo).

#### **4.2. Técnicas de recolección de muestras**

Se recolectaron 1,5 L de agua, en botellas limpias de vidrio color caramelo. Las muestras procedentes de ríos y arroyos se tomaron a una profundidad media del cauce (0,1-1 m) y a 0,5 m de la orilla, tratando de que fueran homogéneas. Las mismas fueron identificadas y conservadas a 4 °C hasta su análisis.

#### **5. Cepas bacterianas de referencia**

En los diferentes ensayos, se utilizaron como controles positivos cepas bacterianas de referencia degradadoras de atrazina:

a) *Pseudomonas* sp. ADP con capacidad de mineralizar atrazina a través de la vía enzimática codificada por los genes *atzABCDEF* localizados en el plásmido pADP-1 (Mandelbaum y col., 1995).

b) *Arthrobacter* sp. SD: con capacidad de degradar parcialmente atrazina a ácido cianúrico, por enzimas específicas codificadas por los genes *trzN* y *atzBC* (Fernández y col., 2013).

## 6. Métodos de preservación de los microorganismos

Las cepas bacterianas fueron mantenidas en placas de medio mínimo M9 con glucosa como fuente de C y atrazina como única fuente de N y repicadas cada 15 días. Las placas se conservaron a 4 °C.

La conservación a largo plazo de las cepas bacterianas se realizó por congelación lenta de cultivos en fase logarítmica tardía suplementados con glicerol estéril en una concentración final del 25% v/v. Los criotubos se almacenaron a -80 °C.

## 7. Aislamiento de bacterias nativas potencialmente degradadoras de herbicidas s-triazinas

El aislamiento de bacterias nativas potencialmente degradadoras de atrazina se realizó mediante métodos de enriquecimiento selectivo. Para ello, se tomaron muestras de agua superficial de diferentes puntos de la región en los que previamente se detectó el herbicida: RTP, ACR y RCA. Alícuotas de 100 mL de cada una de las muestras se colocaron en erlenmeyers estériles y se adicionó atrazina (50 ó 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como única fuente de N. Se incubaron a 28 °C en agitación (150 rpm) y oscuridad durante 28 días. A los 14 y 28 días se sembraron alícuotas de 0,1 mL de los cultivos iniciales en placas de medio mínimo M9, suplementadas con diferentes concentraciones del herbicida (50, 100 y 300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) y con cicloheximida (50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) para inhibir crecimiento de células fúngicas (Rousseaux y col., 2001). Las placas se incubaron durante 72 h a 28 °C y las colonias crecidas fueron seleccionadas de acuerdo a su morfología y purificadas mediante siembra en estrías por agotamiento. La visualización de zonas claras translúcidas alrededor de las colonias bacterianas en placas de M9 suplementadas con atrazina (300  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) se empleó como criterio para la identificación de aislamientos potencialmente degradadores de atrazina (Mandelbaum y col., 1995).



## 7.1. Caracterización morfológica y bioquímica de los aislamientos bacterianos

Se realizó la caracterización morfológica y bioquímica de los aislamientos obtenidos que consistió en:

- Tinción de gram
- Evaluación de la movilidad mediante siembra por punción en medio de prueba para motilidad. Esta prueba se interpreta haciendo un examen macroscópico del medio para una zona difusa de crecimiento que se propaga desde la línea de inoculación.
- Caracterización bioquímica mediante el sistema comercial API 20NE (API® BioMérieux, Francia) siguiendo las instrucciones del fabricante. Este sistema permite evaluar nueve capacidades enzimáticas específicas (fermentación de la glucosa, arginina dihidrolasa, ureasa, hidrólisis de esculina, gelatinasa,  $\beta$ -galactosidasa, reducción de nitrato, oxidasa y triptofanasa) y la habilidad de crecer aeróbicamente en doce compuestos como única fuente de C (D-glucosa, L-arabinosa, d-manosa, D-manitol, *N*-acetil-D-glucosamina, maltosa, D-gluconato, ácido cáprico, ácido adípico, ácido málico, ácido cítrico y ácido fenilacético). La producción de catalasa y la presencia de oxidasa fueron determinadas mediante métodos estándar.

## 8. Estudios de cinética de crecimiento bacteriano

### 8.1. Preparación de preinóculos

La obtención de los preinóculos se realizó a partir de una colonia bacteriana crecida en placas de M9 con glucosa como fuente de C y atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como fuente de N. Éstos se inocularon en tubos conteniendo M9 con atrazina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) y los cultivos se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  y en agitación (150 rpm) durante 24 h.

### 8.2. Curvas de crecimiento

Para realizar las curvas de crecimiento, una alícuota del preinóculo se adicionó a erlenmeyes conteniendo en 30 mL de M9 ajustándose la concentración bacteriana inicial a una  $\text{DO}_{600}$  de 0,01 (correspondiendo a  $1 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ). Se avaluó la cinética de

crecimiento de la población bacteriana en diferentes condiciones nutricionales y de cultivo, según se detalla a continuación:

- **Fuentes de carbono**

Se realizaron cultivos adicionando atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como única fuente de N y diferentes fuentes de C: a) glucosa  $0,022 \text{ M}$ ; b) manitol  $0,022 \text{ M}$ ; c) sacarosa  $0,011 \text{ M}$ ; d) citrato de sodio  $0,022 \text{ M}$ .

- **Fuentes de nitrógeno**

Se realizaron cultivos empleando glucosa ( $0,4\%$ ) como fuente de C y dos fuentes de N: a)  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $0,5\%$ ); b) atrazina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ); c) atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Además se ensayó el crecimiento en presencia de atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como fuente de N y C.

- **pH**

Se realizaron cultivos con atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) y glucosa  $0,022 \text{ M}$  como fuentes de N y C, respectivamente y se evaluó el crecimiento a diferentes valores de pH: a) pH 5; b) pH 6; c) pH 7; d) pH 8; e) pH 9. Para ajustar el valor de pH se utilizó NaOH  $1 \text{ M}$  o HCl  $1 \text{ M}$ .

Los cultivos se incubaron en agitación ( $150 \text{ rpm}$ ) a  $28^\circ \text{ C}$  durante  $72 \text{ h}$  y se evaluó el crecimiento bacteriano (viabilidad celular) cada  $24 \text{ h}$  mediante recuento en placa en superficie en medio TSA. Los resultados se expresaron en  $\text{UFC.mL}^{-1}$ .

### **8.3. Estudios de la cinética de biodegradación de atrazina**

#### **8.3.1. Evaluación de la capacidad biodegradadora de atrazina de los aislamientos nativos**

En primer lugar, a fin de identificar entre todos los aislamientos obtenidos a aquellos con capacidad de degradar atrazina, se realizó un tamizaje preliminar. Para ello, cultivos en tubos con medio mínimo M9 adicionado con el herbicida ( $10, 50, 100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como única fuente de N se incubaron a  $28^\circ \text{ C}$  durante 28 días. A intervalos de 3 días, alícuotas de  $1 \text{ mL}$  se centrifugaron durante  $3 \text{ min}$  a máxima velocidad y la concentración residual de atrazina se determinó cualitativamente mediante espectrofotometría UV-vis ( $\lambda 225 \text{ nm}$ )

A partir de las curvas de crecimiento (sección 8.2.) se evaluó además la cinética de degradación de atrazina. A intervalos de  $12 \text{ h}$ , alícuotas de  $1 \text{ mL}$  se centrifugaron durante  $3$

min a máxima velocidad. La concentración residual de atrazina en las muestras fue determinada cuantitativamente mediante MEKC (sección 9.2.2.).

### **8.3.2. Ensayos de resting-cell**

La eficiencia para degradar atrazina se determinó mediante ensayos de resting-cell según García-González y col. (2003). Se realizaron preinóculos bacterianos. Las células fueron cosechadas por centrifugación (12000 rpm, 5 min) y lavadas tres veces con buffer fosfato salino. Luego de los lavados, las células se resuspendieron en 9 mL de M9 adicionado con atrazina ( $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como única fuente de N y se incubaron a  $28^\circ\text{C}$  durante 24 h hasta fase exponencial temprana ( $\text{DO}_{600}\sim 0,4$ ). Posteriormente, las células fueron nuevamente cosechadas por centrifugación y lavadas tres veces con buffer U y resuspendidas en el mismo buffer a una  $\text{DO}_{600}\sim 0,4$  en tubos de ensayo. Las suspensiones bacterianas se incubaron en baño termostatzado ( $28^\circ\text{C}$ ) durante 2 min y se adicionó atrazina ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). A intervalos de 5 min, se tomaron alícuotas de 0,5 mL y se centrifugaron durante 3 min a máxima velocidad. La concentración residual de atrazina en las muestras fue determinada mediante espectrofotómetro UV-vis ( $\lambda 225 \text{ nm}$ ) y confirmada mediante MEKC (sección 9.2.2.).

## **9. Detección y cuantificación de atrazina**

### **9.1. Técnicas analíticas empleadas para muestras de aguas ambientales**

#### **9.1.1. Cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)**

Durante 2011 y 2012, la detección y cuantificación de atrazina en muestras de aguas superficiales fue realizada mediante HPLC MS/MS en la empresa JLA Argentina (General Cabrera, Córdoba). Para el análisis se siguió el método 6630B (“Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 21st Edition, 2005, APHA”) con modificaciones. Para la cuantificación de atrazina se realizó una inyección directa de muestra y análisis mediante HPLC (HPLC cuaternario marca Waters, modelo Alliance 2965) con detector

masa (detector de triple cuadrupolo (QqQ) en tándem, marca Micromass, modelo Quattro Ultima Pt.). Los resultados obtenidos se expresaron en  $\mu\text{g.L}^{-1}$  y el LD de la técnica fue de  $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$ .

### 9.1.2. Inmunoensayo enzimático (ELISA)

A partir de 2013 la concentración de atrazina en agua superficial se determinó en el laboratorio mediante el kit comercial “Atrazine ELISA Microtiter Plate” (Abraxis LLC, USA). El kit de ELISA utilizado es un inmunoensayo para la detección y cuantificación de atrazina, es del tipo competitivo y se basa en el reconocimiento del herbicida por anticuerpos específicos inmovilizados en la placa. Posee alta sensibilidad ya que posee un LD de  $0,04 \mu\text{g.L}^{-1}$ . La determinación se realizó según las especificaciones del fabricante. Las determinaciones en soluciones estándar, muestras y controles se realizaron por duplicado. Después del lavado y de la adición de la solución conteniendo el sustrato de revelado se produce un cambio de color (de azul a amarillo), cuya intensidad es inversamente proporcional a la concentración de atrazina presente en la muestra. La cuantificación de atrazina se determinó mediante la absorbancia a 450 nm en un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific). Se calculó el %B/B0 (siendo B la absorbancia de un estándar determinado y B0 la absorbancia del estándar cero) para cada estándar, dividiendo el valor medio de absorbancia de cada estándar por el promedio de absorbancia obtenido en el estándar cero. Con estos valores se construyó una curva estándar y se calculó el %B/B0 para cada muestra. La concentración se obtuvo por interpolación de dichos valores en la curva estándar. Los resultados obtenidos se expresaron en  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Las muestras que presentaron una concentración de atrazina menor al estándar 1 ( $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) se consideraron negativas.

## 9.2. Técnicas analíticas empleadas en ensayos de biodegradación

### 9.2.1. Espectrofotometría UV-vis

La determinación cualitativa de atrazina en los ensayos de biodegradación se realizó mediante espectrofotometría UV-vis. Los sobrenadantes se analizaron mediante espectrofotómetro UV-VIS (Specord S600 simultaneous spectrophotometer, Analytikjena, Alemania). Las mediciones para atrazina se realizaron a una longitud de onda de 225 nm ( $A_{225\text{nm}}$ ) (García-González y col., 2003).

### 9.2.2. Cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC)

La cuantificación de atrazina y su intermediario de degradación ácido cianúrico se realizó mediante una variante de la técnica de Electroforesis Capilar, la cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC, de sus siglas en inglés) por ser una metodología sensible que permite la separación de moléculas neutras como las s-triazinas, las cuales son acomplejadas por el uso de un surfactante en el buffer de corrida que determina la formación de micelas. Se utilizó un equipo Agilent Technologies 7100 (Alemania) con detector de arreglo de diodos (DAD). El mismo posee un capilar de sílice fundida de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro interno, 60 cm de longitud total y 50 cm de longitud efectiva. La detección se llevó a cabo en una solución buffer de corrida conteniendo  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (10 mM), SDS (30 mM) y metanol (8% v/v) (pH 9) (Penmetsa y col., 1996). Las muestras se inyectaron durante 10 seg a 50 mbar y la separación se efectuó a 12 kV y 20 °C. Las longitudes de onda de detección fueron de 225 nm para atrazina y 210 nm para el intermediario ácido cianúrico.

Previo a su uso, los capilares de sílice fundida fueron acondicionados inyectando por presión (930 mbar) una solución de NaOH 0,1 M durante 10 min, agua bidestilada durante 5 min y finalmente el buffer de corrida durante 5 min. El lavado del capilar se realizó al comienzo y al final del día, y también entre inyecciones, lo cual permitió obtener una buena reproducibilidad en las detecciones. El protocolo de lavado que se utilizó fue el siguiente:

- $\text{H}_2\text{O}$ : 930 mbar, 5 min

- NaOH 0,1M: 930 mbar, 5 min
- H<sub>2</sub>O: 930 mbar, 5 min
- Buffer: 930 mbar, 5 min

Todas las soluciones fueron preparadas con agua ultrapura y filtradas mediante filtros de membrana de 0,22  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro.

Para obtener las respectivas curvas de calibración se inyectaron soluciones patrones de atrazina (0,25-20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y de ácido cianúrico (0,5-20  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

## **10. Estudio del impacto de atrazina sobre las comunidades microbianas nativas en ecosistemas acuáticos**

### **10.1. Ensayos en microcosmos**

Se realizaron ensayos en microcosmos empleando muestras de agua (150 mL) colectadas en dos ecosistemas diferentes: Río Tercero-Balneario de Pampayasta (RTP) y Arroyo Cabral (ACR) (sección 4.1.). Las mismas se colocaron en erlenmeyers estériles (500 mL) y se suplementaron con atrazina (10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ). Se incluyeron los controles correspondientes: a) control sin adición de herbicida y b) control de muestra estéril (previamente autoclavado) adicionado con la misma concentración del herbicida. Los erlenmeyers se incubaron en agitación (150 rpm) a 28 °C y en oscuridad durante 28 días. Se realizaron dos ensayos independientes por triplicado.

La concentración del herbicida utilizada en los ensayos ha sido empleada por otros autores (López y col., 2005) estando además próxima a los valores del herbicida reportados en sistemas hídricos.

### **10.2. Métodos microbiológicos convencionales para el recuento de bacterias**

#### **10.2.1. Recuento de microorganismos heterótrofos cultivables**

A partir de los microcosmos se evaluó el recuento de microorganismos heterótrofos cultivables (MHC). Para ello se determinó el número de viables (UFC. $\text{mL}^{-1}$ ) a los 0, 3, 7,

14, y 28 días de incubación mediante recuento en placa en superficie en medio TSA. Las placas se incubaron a 28 °C durante 72 h.

### **10.2.2. Recuento de microorganismos degradadores de atrazina**

Se realizó el recuento de microorganismos degradadores de atrazina (MDA) por enumeración en microplacas mediante el método de Número Más Probable (NMP). Se determinó la actividad respiratoria mediante el indicador 2,3,5-trifenil-2H-cloruro de tetrazolio (TTC) según Dinamarca y col. (2007) con modificaciones. Para ello se tomó 1 mL de agua de los microcosmos a diferentes tiempos (0, 7, 14 y 28 días) y se realizaron diluciones decimales seriadas (por triplicado) hasta extinción en medio mínimo M9 adicionado con atrazina ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como factor de selección y succinato (28 mM) como dador de electrones. Se inocularon alícuotas de cada dilución (100  $\mu\text{L}$ ) en microplacas de 96 pocillos y se incubaron a 28 °C durante 7 días. Al cabo de ese tiempo se adicionó el indicador respiratorio TTC (20  $\mu\text{L}$  de solución 1% p/v) y se incubaron durante 4 h a 28 °C. Los pocillos positivos fueron determinados en base a la producción de TTC-formazán (color rosado-rojo). Las muestras fueron disueltas con etanol (1 vol) y la producción de formazán fue evaluada visualmente y por espectrofotometría UV-VIS a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 450 nm en un lector de microplacas (Multiskan FC, Thermo Scientific). Se determinó el número de pocillos positivos por serie de diluciones y se estimó el NMP de MDA utilizando tablas estadísticas especialmente diseñadas para tal fin. Los resultados se expresaron en NMP de microorganismos. $\text{mL}^{-1}$ . Se realizaron tres ensayos por triplicado para cada ecosistema.

## **11. Métodos de biología molecular**

### **11.1. Extracción de ADN total**

La extracción de ADN total de los aislamientos seleccionados se llevó a cabo a partir de cultivos en fase exponencial tardía crecidos en medio mínimo M9, empleando el kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (Promega, USA) siguiendo las

especificaciones del fabricante. El ADN obtenido se empleó como templado para la realización de los ensayos de biología molecular realizados en este estudio.

### 11.2. Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se llevó a cabo a partir de cultivos en fase exponencial tardía, crecidos en medio mínimo M9 con atrazina como única fuente de N. Para ello se utilizó el kit comercial ZR Plasmid Miniprep (Zymo Research, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. El ADN plasmídico obtenido se empleó como templado en las reacciones de PCR. Se incluyó como control positivo de la extracción de plásmidos a la cepa *Pseudomonas* sp. ADP, que posee el plásmido p-ADP (De Souza y col., 1998b).

### 11.3. Extracción de ADN de las comunidades microbianas de los microcosmos

Se realizó la extracción de ADN total de comunidades microbianas presentes en los microcosmos ACR y RTP mediante el kit comercial PowerWater DNA Isolation Kit Sample (MoBio Laboratories, CA, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante. Las extracciones de ADN se realizaron en dos tiempos diferentes:

- T0: corresponde al inicio del ensayo; se utilizó un volumen de 500 mL de muestra.
- T14: a los 14 días de iniciado el ensayo a partir de 150 mL de muestras tratadas y de los controles negativos (sin adición del herbicida), dado que corresponde al tiempo en el cual se observó una degradación de atrazina mayor al 50%.

En T14, en los microcosmos de ACR suplementados con atrazina se produjo un notable incremento de la biomasa microbiana y éstos adquirieron una consistencia viscosa. Ello determina que existan inconvenientes en el proceso de extracción de ADN de estas muestras (la filtración es extremadamente lenta aunque sin saturación de los filtros) y el rendimiento de la extracción es bajo. Para solucionar estos inconvenientes se ensayaron diversas estrategias:

- a) Se decidió fraccionar las muestras a fin de filtrar volúmenes menores (60 mL). Cuando se realizó la correspondiente extracción de ADN a partir de cada filtro, se obtuvo



una mayor eficiencia de extracción (pasando de una concentración media de ADN de 10 ng.µL<sup>-1</sup> a 25-40 ng.µL<sup>-1</sup>). Para optimizar el rendimiento se repitió la extracción pero empleando sólo la mitad de cada filtro, los que además fueron cortados (en esterilidad) en porciones más pequeñas para favorecer el desprendimiento de las células adheridas a la membrana del filtro, permitiendo la acción adecuada de los reactivos y la lisis de los microorganismos.

b) Se incluyó un paso adicional en la lisis inicial. Los tubos correspondientes al kit que contenían el filtro y la solución de lisis en su interior se calentaron a 65 °C durante 10 min para favorecer la ruptura de paredes celulares más resistentes.

## 11.4. Reacción en cadena de la polimerasa

### 11.4.1. Amplificación del gen ARNr 16S para la identificación de cultivos puros

Se realizó la identificación taxonómica de los aislamientos potencialmente degradadores de atrazina mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y secuenciación del gen marcador molecular ARNr 16S. La región de interés (1300-1500 pb) se amplificó empleando los cebadores universales 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3') y 1492R (5'-TACGGYTACCTTGT TACGACTT -3') (Weisburg y col., 1991). La amplificación se realizó en un termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad), en un volumen de reacción de 25 µL conteniendo 100 ng de ADN; 0,4 µM de cada cebador; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 2,5 µL de 10X buffer Taq y 1,5 U de Taq polimerasa (Promega, Madison). Las condiciones de amplificación se describen en la **Tabla 6**.

**Tabla 6.** Condiciones de amplificación del gen ARNr 16S

Etapa	Condiciones	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<i>Desnaturalización inicial</i>	94	2
<i>Extensión 30 ciclos</i>	94	1
	55	1
	72	2
<i>Extensión final</i>	72	10

### 11.4.2. Amplificación del gen ARNr 16S del ADN de las comunidades bacterianas de los microcosmos

Se llevó a cabo la amplificación por PCR del gen ARNr 16S de las comunidades bacterianas. Se utilizaron los cebadores F341-GC (5' CGCCCGCCGCGCCCCGCGC CCGTCCCGCCGCCCCCGCCCGCCTACGGGAGGCAGCAG 3') y R518 (5' CCGTCA ATTCTTTRAGTTT 3') que permiten la amplificación de fragmentos de aproximadamente 200 pb para organismos del Dominio Bacteria (Muyzer y col., 1993). La amplificación se realizó en un termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad), en un volumen de reacción de 25 µL conteniendo 100 ng de ADN, 0,5 pM de cada cebador, 0,2 mM de cada dNTP, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 2,5 µL de 10X buffer Taq y 2 U de Taq polimerasa (Promega, Madison). Las condiciones de amplificación se describen en la **Tabla 7**.

**Tabla 7.** Condiciones de amplificación del gen ARNr16S

Etapa	Condiciones	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<i>Desnaturalización inicial</i>	94	5
<i>8 ciclos</i>	94	1
	70	1
	72	3
<i>8 ciclos</i>	94	1
	65	1
	72	3
<i>20 ciclos</i>	94	1
	60	1
	72	3
<i>Extensión final</i>	72	10

### 11.4.3. Amplificación de genes catabólicos de degradación de atrazina

Para evaluar la presencia de los genes catabólicos de degradación de atrazina se realizaron reacciones de amplificación mediante PCR. Los genes estudiados fueron *trzN*, *atzA*, *atzB* y *atzC* de la vía catabólica superior y *atzD*, *atzE* y *atzF* de la vía catabólica inferior, empleando los cebadores específicos (**Tabla 8**).

**Tabla 8.** Descripción de los cebadores utilizados en la amplificación de los genes de la vía catabólica de degradación de atrazina.

Gen	Nombre del cebador	Secuencia nucleotídica (5'-3')	Temperatura de anilado (°C)	Referencias
atzA	Af	CCATGTGAACCAGATCCT	56	De souza y col., 1998b
	Ar	TGAAGCGTCCACATTACC		
atzB	Bf	TCACCGGGGATGTCGCGGGC	56	De souza y col., 1998b
	Br	CTCTCCCGCATGGCATCGGG		
atzC	Cf	GCTCACATGCAGGTACTCCA	56	De souza y col., 1998b
	Cr	GTACCATATCACCGTTTGCCA		
atzD	Df	GGTAATGGGCAAGACCGAG	56	Smith y col., 2005
	Dr	ACGCCAGTGACGATGAGAG		
atzE	Ef	GCCTTCGTTATCACTGCC	56	Smith y col., 2005
	Er	GTGTCTTGTAATACCTTGCTG		
atzF	Ff	ACAGCAATCTGGGCTTCTAC	56	Smith y col., 2005
	Fr	ACTTACAAACGCACCGAAC		
trzN	C190-10	CACCAGCACCTGTACGAAGG	55	Mulbry y col., 2001
	C190-11	GATTCGAACCATTCCAAACG		

Para las reacciones de amplificación se utilizó como templado ADN total, ADN plasmídico o ADN de las comunidades bacterianas de los microcosmos. La amplificación se realizó en un termociclador (T100 Thermal Cycler, Bio-Rad), en un volumen de reacción de 25 µL conteniendo aproximadamente 100 ng de ADN; 0,2 µM de cada cebador; 0,2 mM de cada dNTP; 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>; 2,5 µL de 10X buffer Taq y 0,5 U de Taq polimerasa (KAPA Biosystems, USA). Se incluyeron como controles positivos las cepas *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum y col., 1995) y *Arthrobacter* sp. SD (Fernández y col., 2013) para los genes atzABCDEF y trzN, respectivamente. Las condiciones de amplificación se detallan en la **Tabla 9** y **Tabla 10**.

**Tabla 9.** Condiciones de amplificación del gen trzN.

Etapa	Condiciones	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<i>Desnaturalización inicial</i>	94	3
<i>Extensión 30 ciclos</i>	94	1
	55	1
	72	2
<i>Extensión final</i>	72	5

**Tabla 10.** Condiciones de amplificación de los genes *atz*ABCDEF.

Etapa	Condiciones	
	Temperatura (°C)	Tiempo (min)
<i>Desnaturalización inicial</i>	94	2
<i>Extensión 30 ciclos</i>	94	1
	56	1
	72	5
<i>Extensión final</i>	72	10

### 11.5. Análisis de la estructura de las comunidades bacterianas mediante electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE)

Para llevar a cabo la electroforesis en gel con gradiente desnaturizante (DGGE) se utilizó un sistema de detección de mutaciones universal Bio Rad DCode (Bio Rad Laboratories, Inc.). Se preparó el gel de poliacrilamida en buffer TAE 1X utilizando una concentración final de acrilamida-bisacrilamida al 6% (acrilamida-N,N'-metilene bis-acrilamida, 37:1). Se utilizó un gradiente de 30 a 60% de urea y formamida. Las dimensiones del gel obtenido fueron de 160 x 160 x 1 mm, ocupando un volumen final de aproximadamente 30 mL. En cada pocillo del gel, se sembraron 20 µL de los productos de amplificación de cada una de las muestras. La corrida electroforética se realizó a voltaje constante (120 V) a 60 °C durante 4 h. La tinción de los geles se realizó con SYBR<sup>®</sup> Gold (Molecular Probes, Eugene, OR). Para su observación se utilizó un transiluminador UV en un analizador de imágenes (Gel Doc 2000, Bio Rad), empleando el software Quantity One (versión 4.3.1., Bio Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) mediante el cual se capturaron imágenes digitales del gel, que luego se usaron para los análisis comparativos.

Estos ensayos se realizaron en colaboración con la Dra. Marcela Ferrero de la Planta Piloto de Procesos Industriales Microbiológicos (PROIMI, CONICET, San Miguel de Tucumán).

#### 11.5.1. Análisis de los geles

A partir de las imágenes obtenidas de los geles se realizó un análisis de conglomerados con el programa estadístico Infostat (versión 2.0) utilizando el método de Ward (simple

matching [sqrt (1-S)]) que considera la posición de la banda en el gel. Se calcularon los valores de Rango Ponderado de la Riqueza (Rr) según Marzorati y col. (2008). El Índice de Rr se calculó multiplicando el número total de bandas por el porcentaje de gradiente de desnaturalización necesario para describir la diversidad total de la muestra analizada, de acuerdo con la fórmula (1):

$$Rr = (N^2 \times Dg) \quad (1)$$

donde N representa el número total de bandas en el patrón y Dg el gradiente de desnaturalización que existe entre la primera y la última banda del patrón.

### 11.5.2. Escisión de las bandas

Las bandas visualizadas fueron cortadas del gel, eluidas con agua y reamplificadas utilizando los cebadores F357 y R518 (Muyzer y col, 1993). En esta reacción de amplificación se empleó un programa de PCR convencional con una temperatura de alineamiento de los cebadores de 65 °C durante 25 seg. La identificación de cada taxón se realizó mediante secuenciación de las bandas de interés.

### 11.6. Visualización del ADN y de los productos de amplificación

El ADN extraído y los productos de amplificación fueron separados mediante electroforesis horizontal en geles de agarosa, en concentraciones de 0,8% (p/v) para ADN y 1,2% (p/v) para los productos de amplificación (Ultrapure™ Agarose, Invitrogen) preparados en buffer TAE 1X (pH 8) adicionado con SYBRgreen® (1X) (Invitrogen). Se sembraron 5 µL de muestra y la corrida se realizó a 70 V en buffer TAE 1X. Las bandas obtenidas se visualizaron en un transiluminador UV (320 nm) en un analizador de imágenes (GelDoc 2000, Bio Rad). Se utilizó el marcador de peso molecular ZR 100 pb DNA Marker (Zymo Research, USA).

### 11.7. Purificación y secuenciación de los productos de amplificación

Todos los productos de PCR se purificaron con el kit comercial DNA Clean and Concentrator-5 (Zymo Research, USA) según especificaciones del fabricante. La secuenciación de los productos de amplificación se realizó mediante electroforesis capilar utilizando el servicio comercial del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina).

### 11.8. Cuantificación del ADN

La cuantificación de ADN se realizó utilizando un espectrofotómetro Picodrop (Pico100 µl spectrophotometer, UK) empleando 2,5 µL de muestra. El ADN se almacenó a -20 °C hasta su análisis.

### 11.9. Análisis de las secuencias nucleotídicas de los productos de amplificación

Las secuencias obtenidas se analizaron y editaron manualmente y se ensamblaron con el programa BioEdit Sequence Alignment Editor ([www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html](http://www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html)). Las secuencias parciales (1300-1500 pb) del gen 16S ARNr obtenidas se compararon contra secuencias relacionadas de cepas tipo con nomenclatura taxonómica validada, de acuerdo con la *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature LPSN* (<http://www.bacterio.net>). Para arribar a la afiliación taxonómica a nivel de género y determinar la especie más cercana se utilizaron las bases de datos especializadas del *Ribosomal Data Project Release 10* (RDP) utilidad SeqMatch (<http://rdp.cme.msu.edu/>), Ez-Biocloud (Taxon-e) (<http://eztaxon-e.ezbiocloud.net/>) y la utilidad SINA Aligner Service del proyecto SILVA-ARB (<http://www.arb-silva.de/aligner>).

Las secuencias parciales de los genes catabólicos de degradación de atrazina (*atzBC*, *trzN*) se compararon mediante el programa BLASTn con secuencias que conforman la base de datos del NCBI GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

## 12. Optimización de las condiciones de inmovilización de *Arthrobacter* sp. AAC22 en matriz polimérica de quitosano

Para la inmovilización del aislamiento nativo *Arthrobacter* sp. AAC22 se ensayaron diferentes metodologías, detalladas a continuación:

### 12.1. Encapsulación de AAC22 en perlas de quitosano nativo

Con la finalidad de optimizar las condiciones de inmovilización por encapsulación del aislamiento nativo *Arthrobacter* sp. AAC22 en matriz de quitosano (Q) se utilizaron soluciones de  $Q_M$  al 1% (p/v) (sección 1.2). Una vez obtenido el gel de Q se adicionó un inóculo del aislamiento bacteriano nativo *Arthrobacter* sp. AAC22 ( $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>) obtenido de cultivos frescos, previamente cosechados por centrifugación (5500 rpm, 20 min), lavados dos veces y resuspendidos con PBS estéril. La mezcla de Q + AAC22 se incubó en agitador orbital rotatorio a 150 rpm durante 10 min para favorecer la homogeneización. Se analizó la supervivencia de AAC22 durante el proceso de inmovilización mediante recuento en placa en superficie en medio TSA, a los 10, 20, 30, 60, 90 y 120 min posteriores a la inoculación. Los resultados se expresaron en UFC.mL<sup>-1</sup>.

Para la formación de las perlas, la mezcla de Q + AAC22 se hizo gotear empleando una punta de pipeta de 1 mL en una solución de TPP al 1% (p/v) pH 9. Las perlas se mantuvieron en la solución de TPP durante 1 h para completar el proceso y se lavaron con agua destilada estéril hasta alcanzar pH cercano a 7.

A partir de las perlas se analizó:

a) La viabilidad de las bacterias inmovilizadas: para ello se colocaron en tubos plásticos, 10 perlas de Q+ AAC22 en 500  $\mu$ l de PBS conjuntamente con 5 perlas de vidrio, y se disgregaron con TissueLysser (Quiagen, Alemania) durante 3 min a una frecuencia de 20 Hz.seg<sup>-1</sup>. A partir de diluciones seriadas se realizó el recuento en placa en superficie en medio TSA. Los resultados se expresaron en UFC.g<sup>-1</sup>.

b) Las condiciones óptimas de almacenamiento de las bacterias inmovilizadas: las perlas conteniendo las bacterias entrampadas fueron conservadas a 4 °C en erlenmeyers conteniendo diferentes soluciones: PBS, solución fisiológica o medio mínimo M9. Durante un período de 2 días, se tomaron muestras de 10 perlas de Q para establecer el número de

células inmobilizadas que permanecen viables mediante recuento en placa en superficie. Los resultados se expresaron como UFC.g<sup>-1</sup>.

c) La superficie y el aspecto interno de las perlas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, del inglés *Scanning Electron Microscopy*).

### **12.1.1. Evaluación del aspecto interno de las perlas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM)**

La evaluación del aspecto interno de las perlas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) fue realizada en el área de Microscopía electrónica del Centro Científico Tecnológico CONICET Bahía Blanca (Bs. As., Argentina).

En primer lugar se realizó la deshidratación de las perlas. Una porción de cada perla fue colocada en un portaobjetos provisto de polilisina durante 1 h. A continuación, se realizó la deshidratación gradual de la muestra en 30% acetona/70% agua, seguido por 50% acetona/50% agua, 75% acetona/25% agua y finalmente dos cambios en 100% acetona. Cada paso tuvo una duración de 15 min. Posteriormente se les realizó un secado por punto crítico (Secador por punto crítico, Polaron) y se metalizaron con oro (Metalizadora por plasma de Argón, sputter coater, PELCO, modelo 91000). Finalmente las perlas fueron observadas en un Microscopio Electrónico de Barrido (SEM) (LEO, modelo EVO 40 XVP).

### **12.2. Adherencia de AAC22 en perlas de quitosano nativo**

Como estrategia de inmobilización alternativa, se evaluó la adherencia de *Arthrobacter* sp. AAC22 en perlas preformadas de Q<sub>M</sub> al 1,5% (p/v) (sección 1.2.). Para la formación de las perlas la solución de Q<sub>M</sub> se hizo gotear mediante una punta de pipeta de 1 mL en una solución de TPP al 1% (p/v) pH 9. Las perlas se mantuvieron en la solución de TPP durante 1 h para completar el proceso y se lavaron con agua destilada estéril (pH 7).

Posteriormente, las perlas se adicionaron a cultivos de *Arthrobacter* sp. AAC22 conteniendo 1x10<sup>7</sup> UFC.mL<sup>-1</sup> y se incubaron en agitador orbital rotatorio a 150 rpm durante 5 días. A diferentes tiempos (1, 2, 3 y 5 días) se evaluó la adherencia bacteriana a



las perlas, para lo cual las mismas se vortearon vigorosamente con arena estéril y PBS a fin de permitir un mejor desprendimiento de las bacterias adheridas. Se realizó el recuento en placa en superficie en medio TSA y los resultados se expresaron como UFC.g<sup>-1</sup>.

### **12.3. Encapsulación de AAC22 en perlas de quitosano derivatizado**

#### **12.3.1. Derivatización de quitosano con glucosa**

La derivatización de Q con glucosa se llevó a cabo mediante una reacción de N-alquilación reductora (Yalpani y Hall, 1984). Se prepararon soluciones de Q de peso molecular medio (Q<sub>M</sub>) al 2% (p/v) en ácido acético al 1% (v/v). Para llevar a cabo la reacción se mezcló la solución de Q con un vol. de metanol, se adicionó glucosa a una concentración de 0,15 M y un exceso de cianoborohidruro de sodio (NaBH<sub>3</sub>CN) como agente reductor. Esta mezcla se mantuvo a 35 °C en agitación (150 rpm) durante 10 h. Luego, el quitosano derivatizado (QD) obtenido se lavó con 3 vol. de metanol (60 mL) para eliminar los restos de glucosa y NaBH<sub>3</sub>CN, y se secó en estufa de vacío (Arcano, Argentina) hasta peso constante. Se estimó el rendimiento de la reacción calculando la relación masa de producto obtenido/masa de producto utilizado.

#### **12.3.2. Caracterización de quitosano derivatizado con glucosa**

##### **12.3.2.1. Determinación del grado de deacetilación por titulación potenciométrica**

Debido a que Q se obtiene por deacetilación de quitina (polímero de N-acetil-D-glucosamina), el grado de deacetilación (GDA) expresa la cantidad de grupos aminos libres en la molécula de Q. De esta manera un mayor valor de %GDA indica una mayor proporción de grupos NH<sub>2</sub>.

El protocolo fue basado en la metodología propuesta por Balázs y Sipos (2007). Se pesaron 0,1 g de Q o QD y se disolvieron en 100 mL de HCl 0,01 M, se añadió NaCl para ajustar la fuerza iónica de la solución y se agitó durante 5 h hasta lograr la solubilización total del polímero. Una alícuota de 20 mL fue titulada potenciométricamente con NaOH

0,1 M previamente valorado (pHmetro HANNA HI 2211). La curva de dicha titulación presenta dos puntos de inflexión; el primero, corresponde a la neutralización del exceso de HCl y el segundo a la de QD protonado. La diferencia de ambos da el valor neto de NaOH requerido para calcular el número de grupos amino. Las ecuaciones (1) a (3) son las necesarias para el cálculo del % GDA.

$$\text{GDA (\%)} = \frac{x}{(x + y)} \times 100 \quad (1)$$

Donde:

$$x = \text{mol } (-\text{NH}_2) / \text{g}_{\text{muestra}} = \Delta V_{\text{NaOH}} \times C_{\text{NaOH}} / \text{g}_{\text{muestra}} \quad (2)$$

$$y = \text{mol } (-\text{NHCOCH}_3) / \text{g}_{\text{muestra}} = ((1 - x) \times 161) / 204 \quad (3)$$

Donde:  $g_{\text{muestra}}$  son los g de QD de bajo o medio PM;  $C_{\text{NaOH}}$  la concentración de NaOH y 161 y 204, los PM de glucosamina y acetilglucosamina, respectivamente.

### 12.3.2.2. Determinación de masa molar de quitosano derivatizado por viscosímetro capilar

Se realizaron diluciones seriadas de QD desde 2,5 g.L<sup>-1</sup> hasta 0,5 g.L<sup>-1</sup> utilizando como disolvente buffer CH<sub>3</sub>COOH 0,5 M/CH<sub>3</sub>COONa 0,5 M. Se empleó un viscosímetro tipo Ubbelohde, con un diámetro de capilar de 0,63 mm. El ensayo se realizó a una temperatura constante de 25 °C. Los valores obtenidos se relacionan con la viscosidad por medio de coeficientes de *viscosidad específica* ( $\eta_{\text{sp}}$ ) y *viscosidad reducida* ( $\eta_{\text{red}}$ ), definidas por las expresiones (4) y (5) respectivamente.

$$\eta_{\text{sp}} = \frac{\eta - \eta_0}{\eta_0} \approx \frac{t}{t_0} \quad (4)$$

$$\eta_{\text{red}} = \frac{\eta_{\text{sp}}}{C} \quad (5)$$

Para calcular la viscosidad intrínseca se representa gráficamente la viscosidad reducida frente a la concentración del polímero disuelto y se realiza la regresión lineal correspondiente. La viscosidad intrínseca es el valor de la ordenada al origen de dicha recta (Berghoff, 2011). Una vez calculada la viscosidad intrínseca, se puede determinar el peso molecular viscosimétrico ( $M_v$ ) de un polímero a partir de la ecuación de Mark-Houwink-Kuhn-Sakurada (MHKS) (6).

$$[\eta] = K \times M_v^a \quad (6)$$

Donde  $K$  y  $x$  son constantes empíricas válidas sólo para un sistema establecido de solvente-polímero, las cuales dependen de la naturaleza del polímero, del sistema de disolvente utilizado y temperatura (Knaul y col., 1998).

#### 12.3.2.3. Análisis estructural de quitosano nativo y derivatizado por espectroscopía IR

Las muestras de Q nativo y QD fueron comparadas por espectroscopía infrarroja transformada de Fourier (FT-IR) en el IR medio ( $4000 \text{ cm}^{-1}$  a  $400 \text{ cm}^{-1}$ ) en un espectrómetro Nexus (modelo Nicolet, USA) mediante un detector MCT (telurio-cadmio-mercurio), con un promedio de 20 espectros y resolución de  $2 \text{ cm}^{-1}$ . La muestra fue triturada en una relación 1:100 con bromuro de potasio (1 mg de muestra: 100 mg bromuro de potasio) y comprimida en discos.

#### 12.3.3. Formación de perlas de quitosano derivatizado

Con el objetivo de inmovilizar el aislamiento nativo *Arthrobacter* sp. AAC22 en QD, se ensayaron diferentes variantes a fin de evaluar la supervivencia del aislamiento y la eficiente formación de perlas.

En primer lugar se evaluó la influencia del PM del QD y de la concentración del mismo sobre la viabilidad bacteriana y la formación de perlas. Se prepararon soluciones de Q

derivatizado de peso molecular medio (QD<sub>M</sub>) y bajo (QD<sub>L</sub>) a concentraciones de 1% y 1,3% disueltas en ácido acético 0,5% (v/v). Se sonicaron (potencia: 70 W, frecuencia: 40 KHz) y vortearon alternadamente durante 12 h, hasta observar la completa desaparición de grumos y obtener una solución de consistencia viscosa y apariencia homogénea. A estas soluciones se adicionó un inóculo bacteriano ( $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>) del aislamiento nativo *Arthrobacter* sp. AAC22 obtenido de cultivos frescos previamente cosechados por centrifugación, lavados y resuspendidos en PBS estéril. La mezcla de QD + AAC22 se incubó en agitador orbital rotatorio a 150 rpm durante 30 min para favorecer la homogeneización.

Para la formación de las perlas la mezcla de QD + AAC22 se hizo gotear en una solución de TPP al 1% (p/v) pH 9. Dado que el tamaño de las perlas puede ser un factor importante tanto en la formación de las mismas como en el proceso de biorremediación con bacterias encapsuladas, se decidió evaluar el efecto de la variación de este parámetro. Se utilizaron agujas de diferentes calibres, de manera tal de obtener tres tamaños distintos de perlas. Las mismas se mantuvieron en la solución de TPP durante 1 h para completar el proceso de reticulación y se lavaron con agua destilada estéril hasta alcanzar pH cercano a 7.

Para determinar la viabilidad de las bacterias dentro de las perlas, se colocaron en tubos de 2 mL, 10 perlas de QD en 500 µL de PBS conjuntamente a 5 perlas de vidrio, y se disgregaron con TissueLysser (Quiagen, Alemania), según se describió anteriormente. Se realizaron diluciones seriadas y recuento en placa en superficie en medio TSA. Los resultados se expresaron en UFC.g<sup>-1</sup>. Posteriormente, se evaluó la viabilidad de las bacterias inmovilizadas dentro de las perlas conservadas en heladera con medio mínimo M9 durante 30 días.

La superficie y el aspecto interno de las perlas fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido (SEM) según se describe en la sección 12.1.1.

### **13. Biodegradación de atrazina por *Arthrobacter* sp. AAC22 inmovilizadas en matriz de quitosano**

Se realizaron ensayos de biorremediación utilizando las perlas de Q con *Arthrobacter* sp. AAC22 inmovilizadas mediante:

- a) adherencia en perlas de Q nativo
- b) atrapamiento en perlas de QD

Los ensayos se realizaron en erlenmeyers con 20 mL de medio mínimo M9 suplementado con atrazina (10 ó 100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) inoculados con AAC22 adheridas a perlas de Q nativo o atrapadas en perlas de QD. Los mismos se incubaron en agitación (150 rpm) a 28 °C durante 24 h. Se evaluó además el efecto del número de perlas inoculadas (20 a 120 perlas) sobre la eficiencia de degradación. Para ello, a diferentes tiempos se evaluó el porcentaje de degradación de atrazina mediante espectrofotometría UV-vis y el recuento bacteriano en la solución remediada.

#### **14. Bioaumentación con *Arthrobacter* sp. AAC22 inmovilizadas en perlas de quitosano derivatizado para la remediación de atrazina**

Se realizaron ensayos de bioaumentación utilizando las perlas de QD con *Arthrobacter* sp. AAC22 inmovilizadas mediante encapsulación. El tratamiento (1) consistió en erlenmeyers con 20 mL de agua proveniente de RTP a los que se adicionó atrazina (100  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y se inocularon 100 perlas de QD+AAC22. Se incorporaron los siguientes controles: 2) agua + bacterias libres; 3) agua estéril + perlas; 4) agua + perlas (sin AAC22); 5) agua.

El ensayo se realizó por triplicado y los erlenmeyers se incubaron en agitación (150 rpm) a 28 °C durante 24 h. A diferentes tiempos se evaluó el porcentaje de degradación de atrazina y en el control (3) se evaluó además el recuento de bacterias liberadas.

#### **15. Estudios de toxicidad de la solución de remoción de atrazina en los ensayos de bioaumentación con *Arthrobacter* sp. AAC22**

Se realizaron ensayos de biorremediación en microcosmos conteniendo agua superficial mediante estrategias de bioaumentación. Para ello, en frascos de vidrio (1500 mL) conteniendo agua (500 mL) de RTP y atrazina (10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) se adicionó un inóculo de *Arthrobacter* sp. AAC22 a una concentración final de  $1 \times 10^7$  UFC. $\text{mL}^{-1}$ . Se incluyeron además cuatro controles, detallados en la **Tabla 11**. Luego de 48 h de incubación se observó la degradación total de atrazina con la aparición del metabolito ácido cianúrico y se evaluó la

toxicidad de cada muestra. Mediante la inhibición del crecimiento del alga de agua dulce *Pseudokirchneriella subcapitata*, anteriormente *Selenastrum capricornutum* expuesta durante 72 h, de acuerdo con la norma ISO 8692 (2004). Antes de la realización de los ensayos se evaluó la sensibilidad del organismo utilizando como referencia el compuesto tóxico dicromato de potasio. Los ensayos de inhibición de crecimiento de *P. subcapitata* se realizaron a 23 °C, bajo condiciones continuas de luz blanca.

**Tabla 11.** Tratamientos y controles empleados en el ensayo de toxicidad con algas

Control/ Tratamiento	Agua de RTP	Atrazina (10 µg.L <sup>-1</sup> )	Ácido cianúrico (5 µg.L <sup>-1</sup> )	AAC22
1. Control	No estéril	+	-	-
2. Control	Estéril	-	-	-
3. Control	No estéril	-	-	+
4. Control	No estéril	-	+	-
5. Tratamiento	No estéril	+	-	+

La concentración de células de algas se obtuvo por enumeración directa. Se calcularon, mediante métodos gráficos, los principales parámetros de toxicidad aguda:

- CI 50% (concentración inhibitoria 50%), concentración que provoca una reducción del 50% en el crecimiento de algas en relación al control, luego de un periodo de exposición de 72 h.
- CI 20%
- CI10%, equivale al NOEC (No observed effect concentration).

## 16. Análisis estadístico

A partir de los datos de la concentración de atrazina obtenidos en los monitoreos (2011-2015) en aguas superficiales se realizó un análisis estadístico descriptivo utilizando los softwares *Spss* y *R*. Aquellos valores que se encontraron debajo del LD de la técnica fueron convertidos a resultados numéricos, asignándose un valor correspondiente a la mitad del límite de cuantificación (0,025 µg.L<sup>-1</sup>).

Las variables categóricas se resumieron en porcentajes y para las variables cuantitativas se calcularon estadísticos descriptivos (media, mediana, rango, desviación estándar y rango intercuartílico). Para determinar la relación entre la concentración de atrazina y las

distintas variables que podrían afectarla -sitio de monitoreo, clasificación del sitio (urbano o rural), año de monitoreo, estación (primavera u otoño), volumen de lluvia- se realizaron análisis bivariados a través de tablas de contingencia y prueba chi cuadrado ( $\chi^2$ ) de independencia; diagrama de cajas y estadísticos agrupados con contrastes para diferencias de medias, análisis paramétricos (test t para dos muestras y ANOVA) y no-paramétricos (pruebas de Kolmogorov-Smirnov, de Mann-Whitney y de Kruskal-Wallis); y/o análisis de correlación lineal de Pearson y de Spearman, según fuera apropiado. Se empleó la técnica multivariada de análisis de correspondencias múltiples para el estudio de los factores que inciden de manera conjunta en los distintos niveles detectados de atrazina. Para los contrastes se consideró un nivel de significancia del 5 % ( $p < 0,05$ ) y un 95% de confianza para la construcción de los intervalos informados (IC).

Los ensayos en microcosmos y los recuentos de MHC y MDA se realizaron por triplicado, a fin de asegurar la representatividad de los datos. Los resultados se evaluaron estadísticamente mediante análisis de la varianza (ANOVA) empleando el programa *GraphPad Prism* 5.0 con un nivel de significancia de 0,05.

# *Capítulo 3*

**DETECCIÓN DE ATRAZINA EN AGUAS  
SUPERFICIALES DE LA REGIÓN CENTRO-SUR DE  
CÓRDOBA**

---



## **DETECCIÓN DE ATRAZINA EN AGUAS SUPERFICIALES DE LA REGIÓN CENTRO-SUR DE CÓRDOBA**

### **1. Características hidroclimáticas de la provincia de Córdoba**

La provincia de Córdoba se encuentra ubicada en la región central de Argentina y se extiende en su totalidad en una zona templada. El territorio provincial se caracteriza por el predominio de planicies o llanuras suavemente onduladas y el desarrollo del cordón serrano de las Sierras Pampeanas de Córdoba en la dirección N. Estas particularidades geográficas influyen notablemente en el comportamiento hídrico asociado a la dinámica atmosférica y climática, ya que facilitan el desplazamiento de las masas de aire en el sentido predominante NE-SO de la circulación atmosférica, caracterizada como de tipo monzónica (Garreaud y col., 2009; Piovano y col., 2009).

El régimen térmico de la provincia de Córdoba está determinado por las temperaturas del mes más cálido (enero), del mes más frío (julio) y de su amplitud térmica anual (Gorgas y Tassile, 2006). Los valores térmicos del mes de enero (estación estival) se distribuyen en un rango de entre 23,5 °C en el sur provincial hasta valores superiores a 26 °C en el extremo N. Las temperaturas del mes de julio (estación invernal) presentan un rango de entre 8 °C en el sur hasta los 11,5 °C en el norte. La amplitud anual de la temperatura representa la variación de los meses extremos, presentando mayores amplitudes en el S y O del territorio. La temperatura no alcanza registros extremos y la amplitud térmica anual no supera los 16 °C en toda la provincia.

La marcada variabilidad del sistema climático sudamericano controla el ciclo hidrológico a diferentes escalas espaciales y temporales a lo largo de esta región, repercutiendo sobre la cantidad y calidad del agua, como así también en la frecuencia e intensificación de eventos extremos (Garreaud y col., 2009; Piovano y col., 2009). En la provincia de Córdoba, la mayor parte de las precipitaciones ocurren entre octubre y abril, mientras que el semestre frío (mayo-setiembre) presenta escasas precipitaciones, siendo característico del régimen climático de tipo monzónico (Vera y col., 2006; Garreaud y col., 2009). En esta provincia, de manera coincidente con una amplia región del SE de Sudamérica, se ha observado un aumento importante de las precipitaciones medias anuales (Castañeda y Barros, 1994; Minetti y col., 2003) e incrementos en las frecuencias de

lluvias intensas, con precipitaciones que exceden los 100 mm (Barros, 2004), lo que ha resultado en inundaciones más frecuentes en las últimas décadas.

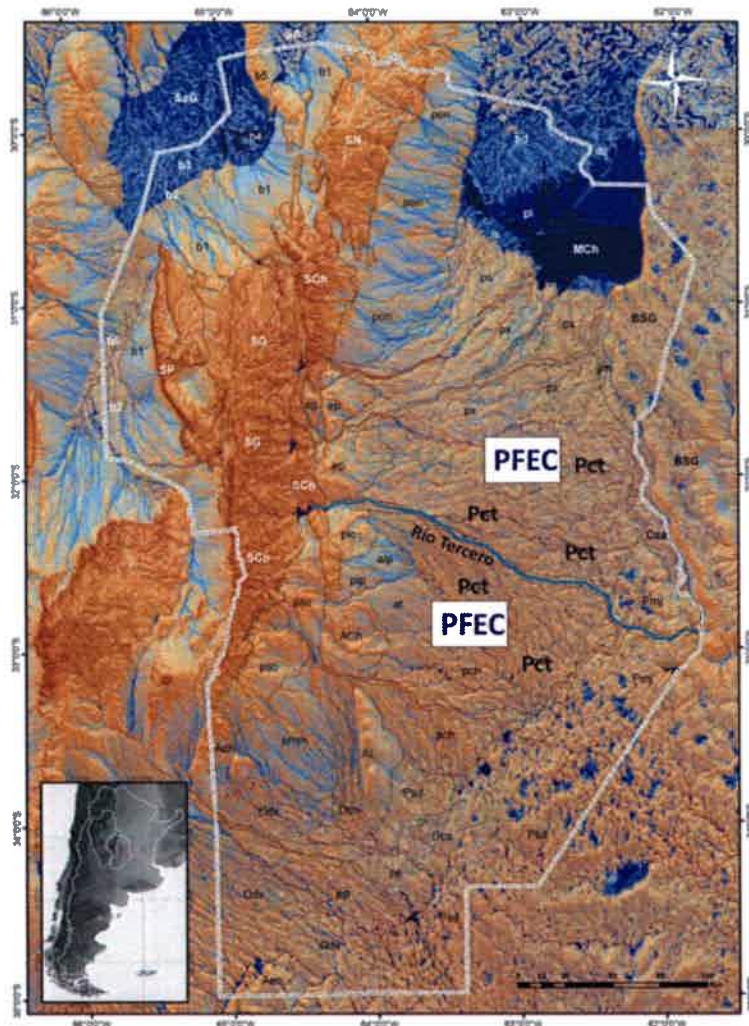
### **1.1. Marco geomorfológico regional: la planicie fluvioeólica central**

La planicie fluvioeólica central es una extensa llanura que se ubica al este de las Sierras de Córdoba, aproximadamente entre los 31°00' S y los 33°20' S y entre los 62°00' O y los 64°00' O (Carignano 1996, 1997a y 1997b, 1999). Tiene una superficie de más de 35.000 km<sup>2</sup> y se ubica entre los 80 y 400 m s. n. m. Está formada por grandes abanicos aluviales coalescentes generados por los ríos que tienen sus nacientes en las Sierras Grandes y descargan sus aguas hacia oriente: Suquía y Xanaes, que desembocan en la Laguna Mar Chiquita y los ríos Ctlamochita y Chocancharava, que se unen para formar el río Carcarañá y desaguar en el río Paraná (Dasso y col., 2014). La planicie está conformada por los paleoabanicos aluviales y las fajas fluviales de cada uno de los cuatro ríos principales citados previamente. Estos abanicos se formaron por acumulación de sedimentos aluviales y fluviales y como consecuencia de la removilización hídrica del loess que se acumuló en gran parte del área durante los períodos secos del Cuaternario Superior. Así, se conformó un complejo ambiente donde el depósito primario de loess fue alterado por los ríos con significativa capacidad de transporte de sedimentos. Los cuatro extensos abanicos aluviales formados por el Suquía, Xanaes, Ctlamochita y Chocancharava se encuentran separados en sus zonas apicales por grandes interfluvios (donde exclusivamente se depositó loess) e interdigitados en sus zonas medias y distales (Carignano 1996, 1997a y 1997b, 1999).

#### **1.1.1. Paleoabanico aluvial y faja fluvial del río Ctlamochita**

El paleoabanico aluvial del río Ctlamochita (Tercero) es el mayor de los paleoabanicos de la planicie fluvioeólica central (14.000 km<sup>2</sup>) y está conformado por la superposición de cuatro abanicos principales (**Figura 7**). Se extiende desde el piedemonte de la sierra de Los Cóndores (390 m s. n. m.) hasta la depresión tectónica Cañada de San Antonio (100 m s. n. m.), con la que limita por el oriente y la planicie loessica de Marcos Juárez-Corral de

Bustos (110 m s. n. m.) ubicada al E-SE, de la que está separada por el río Saladillo (Ferpozzi 1988a; 1988b; Carignano 1996; 1997a; 1997b; 1999). Los dos abanicos más antiguos se encuentran completamente cubiertos por un manto de loess y sólo son reconocibles por la presencia de paleocauces que presentan un diseño distributivo radial. Los paleocauces mayores aún funcionan como sistemas independientes drenando parte de la llanura (arroyos Las Junturas, Algodón, Las Mojarras, Cabral, etc.).



**Figura 7.** Modelo digital del terreno de la provincia de Córdoba (Adaptado de Carignano y col., 2014). **Referencias:** Zonas deprimidas y concentración de drenajes (tonos de azul y celeste) y gradiente de la pendiente en sectores elevados (tonos de marrón y naranja). Límites entre unidades líneas grises. SN= Sierra Norte-Ambargasta. SG= Sierras Grandes. SCo= Comechingones. SCh= Sierras Chicas. SP= Sierras de Pocho-Guasapampa. SaG= Salinas Grandes. **PFEC**= Planicie fluvioeólica central. **pct**= Paleoabanico aluvial del río Ctalamochita; **pmj**= Planicie loésica de Marcos Juárez-Corral de Bustos (Adaptado de Carignano y col., 2014).

El abanico de Villa María conforma una amplia planicie con pendiente muy baja al SE, que se destaca por sus paleocauces de orientación O-E y NO-SE separados por extensos interfluvios casi planos y porque alberga la faja fluvial activa del río Ctalamochita. En toda la zona sur, como en la sudoriental y oriental, el paleoabanico del Ctalamochita está afectado por procesos de deflación que han generado dunas parabólicas con cubetas de deflación en su interior y ahondado tramos de paleocauces, los que están ocupados por lagunas efímeras y bañados, muy condicionados por la posición del acuífero libre.

El río Ctalamochita (río Tercero) recorre de O a E la llanura de la provincia de Córdoba, localizándose en la región centro-sur de la misma. Es uno de los ríos más caudalosos de la provincia, con un módulo de  $27,6 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ , siendo una corriente de carácter permanente y el principal abastecimiento de agua de esta región. La cuenca hidrográfica del río Tercero posee una superficie de  $474 \text{ km}^2$ , se encuentra limitada al O por las altas cumbres de la Sierra Grande y al E por las sierras de los Cóndores y la Cumbrecita. El límite S está formado por las colinas tendidas de NO a SO, entre la Sierra Grande y la de los Cóndores. De las cumbres de la sierra Grande se desprenden numerosas quebradas con dirección O-E, por donde corren infinidad de arroyos que se reúnen para formar los cinco principales afluentes: los ríos Santa Rosa, Quillinzo, Grande, La Cruz y el Arroyo Amboy. Actualmente se encuentra regulado por una cadena de reservorios artificiales como son los sistemas Río Grande y Río Tercero. Luego de atravesar la Sierra Chica, continúa su recorrido hacia el E y al N de la ciudad de Almafuerde, siendo nuevamente embalsado con la presa de Piedras Moras. Desde allí contornea el extremo sur de la Elevación Pampeana y alcanza el piedemonte, excavando un valle estrecho (0,5 a 2 km de ancho) y profundo, donde ha labrado tres niveles de terrazas que se extienden hasta 5 km al este de la ciudad de Río Tercero. Continúa encajado en un valle muy angosto de 0,5 a 1 km con dos niveles de terrazas hasta la localidad de Pampayasta. Desde allí continúa hacia el SE, marginado por un solo nivel de terrazas bajas, hasta la ciudad de Villa María. Además existen numerosos arroyos y canales que surcan la región con régimen permanente o temporario pertenecientes a la cuenca media y baja. Entre Río Tercero y Villa María el cauce alcanza su máximo ancho y entre esta última ciudad y Bell Ville su cauce se estrecha nuevamente y queda encajonado entre barrancas, recibiendo en dicha localidad las aguas del Canal Desviador de Bell Ville (Moreyra, 2008). El tramo del cauce que se extiende hasta 15 km al E de la ciudad de Bell Ville presenta un notable aumento de sinuosidad, y el último segmento del cauce actual, de dirección NO-SE, está representado por segmentos

rectilíneos cortos unidos por curvas suaves, limitado por barrancas de 6 a 10 m de altura. El valle que lo contiene aparece compuesto por pendientes laterales simples y fondo cóncavo, sin terrazas asociadas. Tiene 1,5 a 2 km de ancho y profundidades que se acentúan gradualmente en dirección aguas abajo (desde 1 a 8 m) y se extiende hasta la localidad de Saladillo donde confluye con el río Chocancharava (Cuarto). Desde el Embalse Piedras Moras hasta su confluencia con el Río Saladillo, tiene una extensión de aproximadamente 250 Km. La unión de estos forma el Río Carcarañá, el cual desemboca en el Río Paraná (Moreyra, 2008).

El río Ctlamochita forma parte del sistema de río Carcarañá. En lo que respecta a sus características hidroquímicas, este sistema posee en general aguas dulces con concentraciones de sólidos totales disueltos (STD) inferiores a  $1.000 \text{ mg.L}^{-1}$ . Los valores de pH se encuentran dentro del rango característico de las aguas naturales (entre 6 y 8) (Drever, 1997). Las aguas del sistema del río Carcarañá evidencian gran variabilidad en las concentraciones de sólidos totales disueltos, conductividad y sulfatos disueltos. Además, son bicarbonatadas cálcicas a mixtas (sin catión dominante) en las áreas serranas o periserranas, evolucionando a bicarbonatadas-sódicas en la cuencas medias y bajas, donde gradualmente se mezclan con agua freática que le aporta sulfatos y cloruros (Dasso y col., 2014).

## **2. Actividades productivas y aplicación de herbicidas en la provincia de Córdoba**

El desarrollo económico de la región centro-sur de la provincia de Córdoba se sustenta principalmente en la actividad agropecuaria. Las características de los suelos, las condiciones climáticas y la existencia de numerosos recursos hídricos que garantizan el abastecimiento de agua posibilitan la realización de actividades como la agricultura, la horticultura y la ganadería. En los sistemas agropecuarios de la región, los cultivos son altamente dependientes de la aplicación de herbicidas, y la contaminación de las aguas superficiales es un importante efecto secundario no deseado del uso generalizado de estos xenobióticos. Luego de su aplicación, el agua de lluvia transporta los herbicidas hacia los canales, arroyos y ríos que drenan las zonas agrícolas y es posible detectar concentraciones de estos compuestos en niveles que pueden resultar tóxicos para los organismos acuáticos. Conjuntamente, los arroyos, lagos, lagunas son frecuentemente utilizados como fuentes de

agua para el consumo de animales (e inclusive del hombre). De este modo, los herbicidas pueden alcanzar en estos sistemas hidrológicos concentraciones que son inaceptables para el consumo de los organismos superiores.

Los herbicidas que llegan a las aguas superficiales en las zonas agrícolas pueden provenir de fuentes puntuales o fuentes difusas. Las fuentes puntuales pueden ser controladas mientras que las fuentes difusas son mucho más difíciles de manejar ya que están influenciadas por la interacción de múltiples factores incluyendo: las propiedades del suelo y del compuesto, el clima, las prácticas de manejo agrícola, etc. (Kladivko y col., 2001). A partir de estudios a campo se conoce que menos del 2% de la masa total del herbicida aplicado se pierde en las aguas superficiales, principalmente durante e inmediatamente después del período de aplicación. El tipo de suelo y uso de la tierra son factores cruciales que influyen en la pérdida global de herbicidas (Blanchard y Lerch, 2000; Leu y col., 2004).

El herbicida atrazina se aplica en la pre y post-emergencia de cultivos como maíz, sorgo, alfalfa, entre otros. En nuestro país existen escasos antecedentes de detección de atrazina en cuerpos de agua. Estudios recientes revelaron su presencia en cuencas hídricas de la provincia de Buenos Aires y Tucumán (De Gerónimo y col., 2014) y en el río Suquía de la provincia de Córdoba (Bonansea y col., 2013) siendo este último el único antecedente de detección en esta provincia.

El conocimiento de las fuentes de contaminación, así como de factores específicos del compuesto y del ambiente que controlan la distribución espacial y temporal del herbicida en una cuenca determinada resulta de importancia para la toma de medidas adecuadas que permitan reducir al mínimo la llegada de estos compuestos desde las zonas agrícolas a las aguas superficiales. Por ello, resulta de relevancia monitorear la presencia de este herbicida en cursos de agua de la provincia de Córdoba, ya que la aplicación de atrazina en los cultivos agrícolas de esta provincia, principalmente maíz, se encuentra ampliamente difundida.

### **3. Marco legal del uso de atrazina**

En los últimos años, el conocimiento de la presencia de activos de plaguicidas en los sistemas hídricos de todo el mundo ha llevado en las últimas décadas a la creación de

marcos regulatorios a fin de proteger las fuentes de agua potable y los seres vivos que habitan estos recursos. En el caso particular del herbicida atrazina, numerosos organismos internacionales y nacionales han establecido límites (en base a investigaciones científicas relacionadas con efectos sobre la salud) para regular los niveles de residuos tanto en agua destinada al consumo humano como en aguas ambientales (Tabla 12).

**Tabla 12.** Límites permisibles de atrazina en agua.

	Organismo	Marco regulatorio	Límites permisibles de atrazina ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	
			Agua de bebida	Aguas ambientales
Internacional	OMS	Guías para la Calidad del agua potable	2	NR
Europa	Unión Europea (UE)	Directiva 2008/105/CE	NR	2
		Directiva 98/83/CE	0,1	NR
EE.UU.	US EPA	National Primary Drinking Water Regulations	3	NR
Canadá	Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME)	Guías de Calidad de agua para protección de la vida acuática (2006)	NR	1,8
	Committee on Health and the Environment	Guidelines for Canadian Drinking Water Quality	5	NR
Brasil	CONAMA (Brasil)	Res. N° 357 (2005)	NR	2
	Ministerio de Salud (Brasil)	Ordenanza 2914/2011	2	NR
Argentina	ANMAT	Código Alimentario Argentino (CAA)	No regulado	NR
	Ministerio de Justicia y Derechos Humanos	Ley 24.051 de desechos peligrosos	3	NR
	Subsecretaría de Rec. Hídricos de la Nación	Niveles Guía Nacionales de calidad de agua (2013)	1,5	3
	Subsecretaría de Rec. Hídricos de la provincia de Córdoba	Normas provinciales de calidad y control de agua para bebida (Res. DIPAS, 1993)	NR	NR

Referencias. NR: no regulado

Las principales normativas regulatorias se describen a continuación:

- La OMS publicó Guías para la Calidad del agua potable que pretenden proporcionar una base científica para el desarrollo de normas sobre la calidad del agua de consumo en

los diferentes países. Estas guías contemplan todos los aspectos de la calidad del agua de bebida y establecen que los riesgos para la salud asociados a los componentes químicos del agua de consumo se deben principalmente a la capacidad de estos compuestos de producir efectos adversos sobre la salud tras períodos de exposición prolongados (OMS, 2011).

- La UE estableció una legislación más restrictiva referente a la calidad del agua, creando directivas tendientes a minimizar el impacto de los compuestos químicos sobre el medio ambiente (Palma y col., 2009). La Directiva 2000/60/CE establece un marco de actuación en el ámbito de la política de aguas, y su objetivo principal es proteger la calidad de la misma. Dicha directiva fue modificada en el año 2008 (2008/105/CE), donde se incluye a atrazina dentro de la Lista de sustancias prioritarias, según criterios de toxicidad, persistencia y bioacumulación mediante la aplicación del análisis de riesgos ambientales.

- En Canadá, el Canadian Council of Ministers of the Environment (CCME) es el principal foro intergubernamental para el debate y la acción conjunta en temas ambientales de preocupación nacional e internacional. Así, propone directrices ambientales a nivel nacional, pero no tiene autoridad para implementar o hacer cumplir la legislación, estableciendo “Guías de Calidad de agua para protección de la vida acuática” (CCME, 2006).

- En México la NOM-127-SSA-1994 (ANEAS, 2007) define los límites de calidad y los tratamientos a que debe someterse el agua para su potabilización y entre sus parámetros considera algunos plaguicidas; por otra parte existe un proyecto de norma “Agua para uso y consumo humano: Límites máximos permisibles de la calidad del agua, control y vigilancia de los sistemas de abastecimiento”, que estima un mayor número de plaguicidas entre ellos la atrazina que no está en la norma actual (Hansen y col., 2013).

- En Brasil, el Reglamento del Consejo Nacional Asesor del Medio Ambiente (CONAMA), regula los niveles de atrazina en aguas ambientales (Resolución N° 357/2005) y la Norma brasilera de agua potable (Ministerio de Salud, Ordenanza 2914/2011) regula los procedimientos para el control y seguimiento de la calidad del agua para el consumo humano y sus normas de potabilidad.

- En Argentina existen normativas que establecen los valores admitidos tanto en aguas ambientales como de consumo humano. La Subsecretaría de Recursos Hídricos de la Nación establece, teniendo en cuenta estudios de toxicidad aguda y crónica sobre organismos acuáticos de diferentes taxones y factores de bioconcentración, un niveles guía



de calidad para agua de bebida y para la protección de la biota acuática en aguas ambientales. En cuanto a la Ley N° 24.051 de Desechos Peligrosos (Decreto 831/93 del Ministerio de Justicia y Derechos Humanos), establece niveles guía para atrazina en fuentes de agua de bebida humana con tratamiento convencional de  $3 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Finalmente, el Código Alimentario Argentino (CAA), en el capítulo XII, establece los valores máximos permitidos de 26 contaminantes orgánicos en agua potable, incluyendo sólo unos pocos plaguicidas dentro de los que no considera la atrazina (CAA, 2007). En el caso particular de la provincia de Córdoba, las Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas para Bebida (Resolución DIPAS N° 608/1993) controlan la calidad del agua potable y regulan la presencia de plaguicidas, aunque sólo establece límites tolerables para un acotado número de plaguicidas (sólo 11 activos), entre los que no se incluye a la atrazina.

Es de destacar que el uso y/o aplicación de atrazina ha sido limitado o restringido en diversos países. En la década del 90' este herbicida perdió su aprobación en la mayoría de los países del norte de Europa, siendo prohibido totalmente en la Unión Europea en 2004 (UE, 2004). En Estados Unidos, la utilización de este compuesto se encuentra restringida en zonas periurbanas desde 1993, y sólo se permite su aplicación en áreas agrícolas. Contrariamente, el uso de este herbicida se encuentra permitido sin restricciones en Canadá, en América Latina y El Caribe. En Argentina, el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) permite su aplicación sin restricciones en cultivos de cereales, plantas forrajeras, caña de azúcar y té, entre otros (SENASA, 1998).

En este contexto, y dado que atrazina es uno de los herbicidas de mayor aplicación en Córdoba, resulta de importancia monitorear este activo en aguas superficiales de la región centro-sur de la provincia (principales fuentes de agua potable tanto en zonas urbanas como rurales) con el objetivo de conocer la situación actual de la contaminación de los cursos de agua por este xenobiótico.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

En la región agrícola centro-sur de la provincia de Córdoba se produce la llegada de atrazina desde los campos cultivados hacia las aguas superficiales transportada principalmente por escorrentía, alterando la calidad hidroquímica final de estos recursos.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el impacto ambiental que generan los sistemas de producción agrícola sobre recursos de agua dulce de la provincia de Córdoba

### **Objetivos específicos**

- ✓ Detectar la presencia de atrazina en aguas superficiales de la región centro-sur de la provincia de Córdoba.
- ✓ Determinar la correlación existente entre las concentraciones de atrazina detectadas y diferentes variables ambientales y espacio-temporales de la región.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **1. Contaminación con atrazina en aguas superficiales de la región centro-sur de Córdoba**

La actividad agrícola ejerce una marcada influencia en el desarrollo económico de la provincia de Córdoba. La atrazina es uno de los herbicidas de mayor volumen de aplicación para el control de malezas que afectan principalmente al cultivo de maíz. Dado que posee un elevado potencial para alcanzar los ambientes acuáticos mediante procesos de escorrentía, resulta importante el monitoreo de este compuesto en aguas superficiales de la región para evaluar el estado actual de la contaminación causada por las prácticas agrícolas modernas.

En el presente trabajo se monitoreó la presencia del herbicida atrazina, entre 2011 y 2015, en 10 sitios de muestreo localizados sobre ríos, arroyos, canales y lagunas de la región centro-sur de Córdoba. Los monitoreos se realizaron en dos estaciones diferentes: en primavera (octubre/noviembre) y en otoño (abril/mayo). Los resultados obtenidos respecto de la concentración media de atrazina detectada, el rango de concentraciones y la frecuencia de detección en los distintos sitios de monitoreo se muestran en la **Tabla 13**.

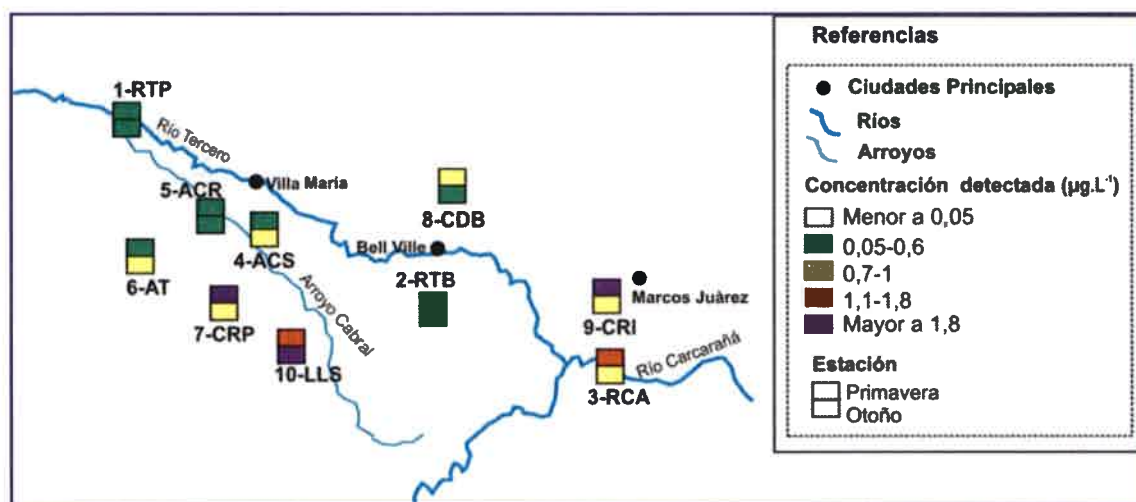
Se observó una elevada frecuencia de detección del herbicida en todos los sitios de monitoreo. En primavera, en 8 de los 10 sitios monitoreados se detectó atrazina con una frecuencia del 100%, mientras que en otoño, en 7 sitios la frecuencia de detección fue del 67%. Las concentraciones de atrazina detectadas variaron dentro de un amplio rango de valores, encontrándose en algunos sitios de monitoreo concentraciones inferiores al LD de la técnica ( $0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) y alcanzando en otros casos concentraciones de hasta  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$  (CRP y CRI).

**Tabla 13.** Concentración de atrazina en aguas superficiales de la región centro-sur de Córdoba (monitoreos 2011-2015).

Referencia	Primavera			Otoño		
	Concentración media ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Rango de concentraciones ( $\mu\text{g/L}$ )	Frecuencia de detección (%)	Concentración media ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Rango de concentraciones ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )	Frecuencia de detección (%)
1-RTP	0,23	0,07-0,6	100	0,07	0,06-0,07	67
2-RTB	0,29	0,26-0,32	100	0,26	0,07-0,44	67
3-RCA	1,1	0,77-1,33	100	0,77	0,06-1,47	67
4-ACS	0,62	0,15-1	100	0,91	ND-0,91	33
5-ACR	0,25	0,1-0,6	100	0,60	ND-0,6	33
6-AT	0,23	ND-0,41	50	0,96	ND-1,55	67
7-CRP	3,00	1,9-5	100	1,00	ND-1	33
8-CDB	0,70	ND-0,9	67	0,49	ND-0,78	67
9-CRI	2,04	0,11-5	100	1,00	ND-1,88	67
10-LLS	1,61	0,22-2,8	100	2,51	ND-4,96	67

**Referencias.** ND: no detectado. Primavera: 4 muestreos en 2011, 2012, 2013 y 2014; LLS (n=3) y RTB (n=2) dada su incorporación en 2012 y 2013, respectivamente. Otoño: 3 muestreos en 2013, 2014 y 2015.

Para una mejor visualización de los resultados se establecieron rangos para las concentraciones de atrazina detectadas y se realizó la referenciación geográfica correspondiente. En la **Figura 8** se representan las concentraciones medias de atrazina detectadas en cada sitio de monitoreo en primavera y otoño durante los años 2011-2015.



**Figura 8.** Concentración media de atrazina en agua superficial (2011-2015) en otoño y primavera en los sitios de monitoreo.

En primavera, en cinco sitios de monitoreo (RTP, RTB, ACS, ACR y AT) las concentraciones medias detectadas se encontraron entre 0,05 y 0,6 µg.L<sup>-1</sup>, sólo en uno de ellos (CDB) la concentración media estuvo entre 0,7 y 1 µg.L<sup>-1</sup>, mientras que en RCA y LLS las concentraciones medias estuvieron entre 1,1 y 1,8 µg.L<sup>-1</sup> y en CRP y CRI fue superior a 1,8 µg.L<sup>-1</sup>. En la estación de otoño, en cuatro sitios de monitoreo (RTP, RTB, ACR, CDB) las concentraciones medias detectadas se encontraron entre 0,05 y 0,6 µg.L<sup>-1</sup>, en 5 sitios (RCA, ACS, AT, CRP, CRI) la concentración media estuvo entre 0,7 y 1 µg.L<sup>-1</sup> y sólo en LLS la concentración media superó el valor de 1,8 µg.L<sup>-1</sup>. Estos resultados no permiten establecer un patrón espacial claro de las concentraciones de atrazina en el área estudiada, aunque sí revela que los sitios RCA, CRP, CRI y LLS poseen los mayores niveles de atrazina en ambas estaciones, mientras que RTP, RTB y ACR serían los sitios con menor contaminación por atrazina.

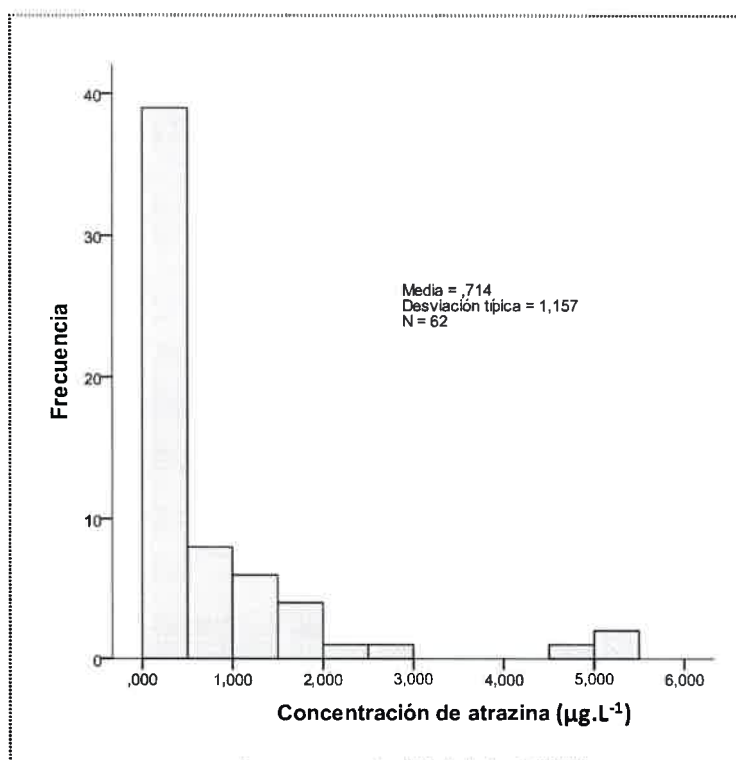
Con la finalidad de establecer la posible relación entre la concentración de atrazina y las variables ambientales y espacio-temporales se realizó un análisis estadístico descriptivo de los datos utilizando los programas Spss (versión 20.0) y R (versión

2.12.2) (Capítulo 2, sección 16). Las variables analizadas fueron: concentración, sitio de monitoreo, clasificación del sitio (urbano o rural), año de monitoreo (2011-2015), estación (primavera y otoño) y volumen de lluvia.

Previo a la realización de los análisis estadísticos, los puntos cuyas concentraciones de atrazina se encontraron por debajo del límite de cuantificación fueron transformados en datos numéricos, estableciendo dichos valores como la mitad ( $0,025 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) del límite de cuantificación de la técnica (Farnham et al., 2002; Hildebrandt y col., 2008).

En primer lugar se llevó a cabo un análisis exploratorio descriptivo. Debido a que el objetivo de este análisis es explicar los valores de atrazina detectados, se procedió a cruzar la variable concentración con las variables restantes.

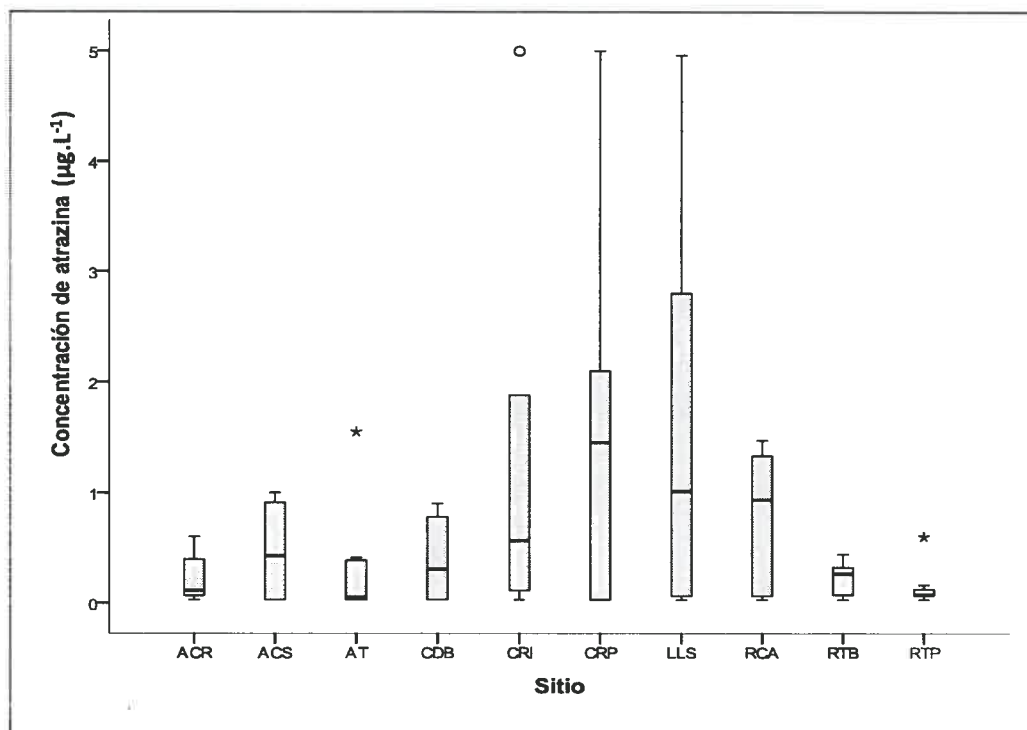
El análisis de distribución de las concentraciones de atrazina detectadas ( $n=62$ ) (**Figura 9**) presentó valores menores o iguales a  $1,00 \mu\text{g.L}^{-1}$  en más del 80% de los casos, con un promedio de  $0,71 \mu\text{g.L}^{-1}$ , un mínimo de  $0,025 \mu\text{g.L}^{-1}$  y un máximo de  $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ , con una desviación típica de  $1,157 \mu\text{g.L}^{-1}$ .



**Figura 9.** Análisis descriptivo de la distribución de las concentraciones de atrazina.

El análisis descriptivo de las concentraciones para cada sitio de monitoreo demuestra una mayor dispersión de datos en los sitios CRI, CRP y LLS (**Figura 10**) con valores

extremos en CRP y CRI ( $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) en primavera de 2014. CRI y CRP corresponden a sitios de monitoreo localizados sobre canales rurales que atraviesan zonas de intensa actividad agrícola-ganadera, lo cual explicaría la presencia de atrazina en tan altas concentraciones. Además estos cursos de agua poseen caudales bajos, lo cual disminuye la velocidad de dilución del compuesto.

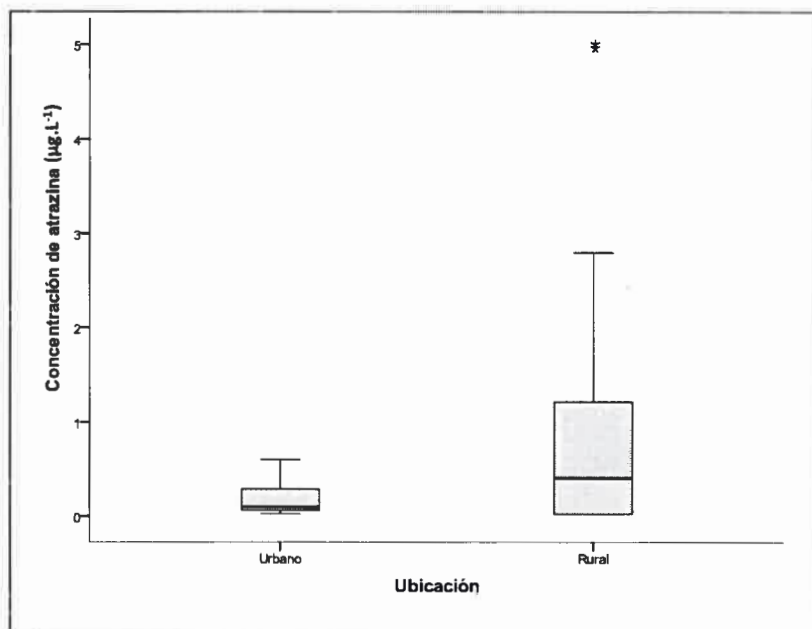


**Figura 10.** Análisis descriptivo del comportamiento de las concentraciones de atrazina vs. sitio de monitoreo.

Por otra parte, el sitio LLS presentó concentraciones extremas, con valores de  $1,80 \mu\text{g.L}^{-1}$  en primavera de 2013 y  $4,96 \mu\text{g.L}^{-1}$  en otoño de 2014. Este sitio corresponde a un humedal de régimen temporal conocido como laguna La Salada ubicado entre las localidades de Pasco y Ticino. Los humedales son reservorios de agua dulce y hábitat de una gran diversidad de comunidades de organismos, sirviendo de refugio para la alimentación y reproducción de aves, mamíferos y otros animales. Además, los recursos naturales provistos por los humedales son necesarios para el desarrollo de diversas actividades humanas como la pesca, el aprovechamiento de la fauna silvestre, el pastoreo, etc. Estos ambientes cumplen importantes funciones como la retención de sedimentos, nutrientes y sustancias tóxicas. Por su acción como filtros naturales, ayudan a mejorar la calidad del agua de escorrentía proveniente de áreas urbanas y rurales,

reteniendo contaminantes (Cinara Rojas y Verwey, 2003). Así, las altas concentraciones de atrazina detectadas en LLS estarían relacionadas a las características propias del ambiente, ya que al tener un menor flujo de agua y mayor tiempo de renovación en comparación con los cursos de agua (como los ríos) podría actuar como reservorio de este tipo de contaminantes (Konstantinou y col., 2006).

Se decidió luego clasificar a los puntos de monitoreo en urbanos o rurales, estableciendo arbitrariamente su aproximación (menor o mayor a 1 Km, respectivamente) a centros poblados. De este modo, siete de ellos que corresponden a zonas rurales (RCA, ACS, AT, CRP, CDB, CRI y LLS) (**Figura 11**) presentan las concentraciones de atrazina más altas. La concentración media en estos sitios ( $0,939 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) resultó significativamente mayor ( $p=0,019$ ) a la media correspondiente a sitios localizados en zona urbana ( $0,201 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) (RTP, RTB, ACR). Esta diferencia resulta razonable ya que en las zonas rurales la cercanía de los campos cultivados favorece la llegada de atrazina a los cuerpos de agua, transportada mediante la escorrentía del agua de lluvia.

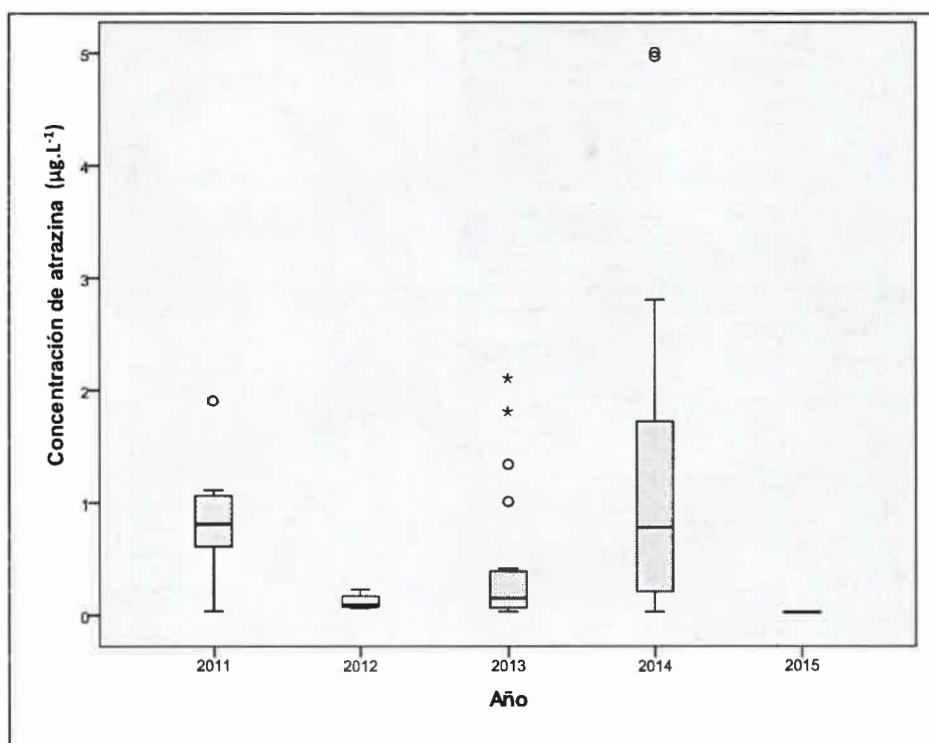


**Figura 11.** Análisis descriptivo de las variables concentración de atrazina vs. ubicación de los sitios de monitoreo.

Cuando se analizaron las concentraciones de atrazina en función del año de monitoreo (**Figura 12**), los resultados revelaron valores más bajos en 2012. En 2013 se observaron cuatro valores extremos, pero el resto de los datos corresponde a valores



relativamente bajos. Una situación similar puede observarse en 2014, donde se detectaron valores extremos elevados, con una gran dispersión en los datos, lo cual afecta al promedio que asciende a  $1,4 \mu\text{g.L}^{-1}$  casi el doble que el valor de la mediana ( $0,775 \mu\text{g.L}^{-1}$ ).

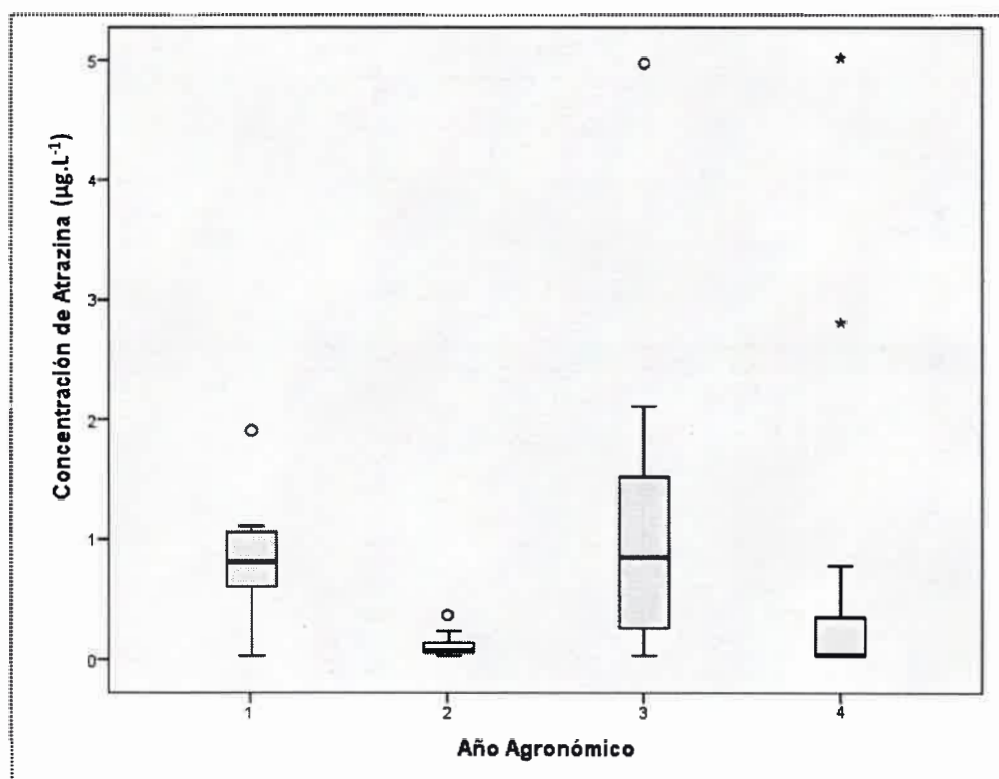


**Figura 12.** Análisis descriptivo de las variables concentración de atrazina vs. año de monitoreo.

En 2015 sólo se realizó el monitoreo en otoño no pudiendo detectarse atrazina ( $LD 0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) en ninguno de los sitios muestreados. En particular, el volumen de precipitaciones ocurridas en los meses transcurridos entre la aplicación de atrazina en la región (primavera de 2014) y el de otoño de 2015 fue excepcionalmente elevado, lo cual podría explicar las bajas concentraciones del herbicida detectadas en este período.

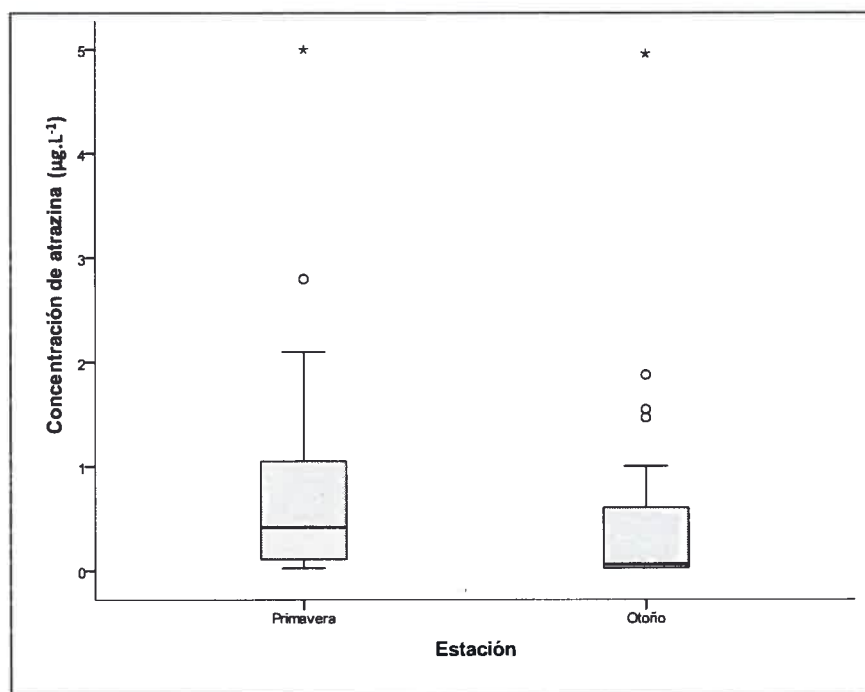
Para un mejor análisis, las concentraciones se analizaron considerando el tiempo entre la primavera (estación en la que se aplica atrazina) hasta la misma estación del año siguiente. Si bien el análisis de ANOVA no arrojó diferencias significativas, se observó que el año 2 presentó los valores más bajos y la menor dispersión de datos (**Figura 13**). El año 3 presentó, en general, los valores de concentraciones más altas, la mayor concentración media ( $1,055 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) y una gran variabilidad de los datos. En el

cuarto año agronómico también se observaron valores extremos que afectaron al promedio ( $0,743 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) aunque el 50% de los datos se encuentran por debajo del límite de detección.



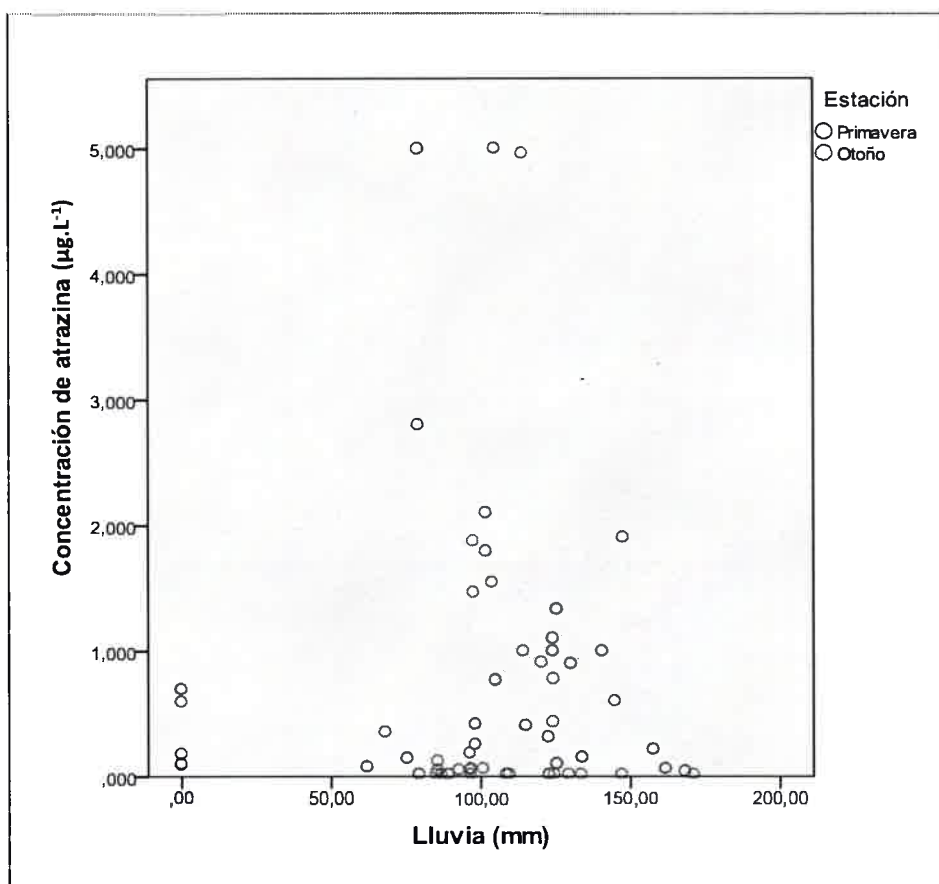
**Figura 13.** Análisis descriptivo de las variables concentración de atrazina vs. año agronómico.

En relación a la estación del año en la que se llevó a cabo el monitoreo (**Figura 14**) se puede observar que en primavera los valores de concentraciones de atrazina detectados son más elevados, duplicando prácticamente el promedio de otoño. En la estación cálida la concentración media fue más elevada ( $0,916 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) que en otoño ( $0,497 \mu\text{g.L}^{-1}$ ), aunque la diferencia de medias no resulte estadísticamente significativa ( $p=0,15$ ). Sin embargo, si se descartan los valores extremos (outliers) superiores a  $4 \mu\text{g.L}^{-1}$  la diferencia de medias resulta significativa al 10% ( $p=0,072$ ), indicando que en primavera se produce una mayor llegada del herbicida a los cuerpos de agua.



**Figura 14.** Análisis descriptivo de las variables concentración de atrazina vs. estación del año (primavera/ otoño).

Como se mencionó anteriormente, uno de los factores determinantes de la llegada de atrazina a los cuerpos de aguas superficiales es las precipitaciones. A los efectos de considerar este factor se registraron los volúmenes de precipitaciones a partir de la base de datos de la Bolsa de Cereales de Córdoba, tal como se describe en metodología (sección 4.1.). El análisis de correlación entre los volúmenes de lluvia y la concentración de atrazina detectada (**Figura 15**) demostró que existe una correlación negativa entre las variables, revelando una tendencia a que disminuya la concentración de atrazina detectada en agua a medida que aumenta el volumen de las precipitaciones. No obstante, la magnitud de los coeficientes de correlación tanto paramétricos ( $r=-0,014$ ) como no paramétricos ( $r_s=-0,078$ ) es muy baja y no es significativa, razón por la cual, el modelo de regresión lineal entre la concentración de atrazina y el volumen de lluvia caída además de no ser significativo presenta una mala bondad de ajuste ( $p=0,914$  - $R^2=0,0001$ ).



**Figura 15.** Modelo de regresión lineal entre la concentración de atrazina y el volumen de lluvia.

A los fines de profundizar el análisis, la variable concentración de atrazina se clasificó de manera arbitraria, estableciendo cinco categorías:

- Categoría I:  $< 0,05 \mu\text{g.L}^{-1}$
- Categoría II:  $0,05$  a  $0,70 \mu\text{g.L}^{-1}$
- Categoría III:  $0,71$  a  $1,00 \mu\text{g.L}^{-1}$
- Categoría IV:  $1,01$  a  $1,80 \mu\text{g.L}^{-1}$
- Categoría V:  $> 1,80 \mu\text{g.L}^{-1}$

Para el volumen de precipitaciones se establecieron tres categorías:

- Bajo:  $< 100$  mm
- Moderado:  $101$ - $140$  mm
- Alto  $> 141$  mm

Se encontró que existe una asociación moderada ( $C=0,49$ ) aunque no significativa ( $< 5\%$ ;  $p=0,011$ ) entre la concentración de atrazina y la lluvia caída (**Figura 16**)

evidenciándose que cuando el volumen de precipitaciones es alto los niveles de atrazina detectados son bajos (el 90% de esta categoría presenta valores menores a  $0,70 \mu\text{g.L}^{-1}$ ). Por el contrario, el 86% de los valores de atrazina superiores a  $1,80 \mu\text{g.L}^{-1}$  se detectan cuando el volumen de lluvias es bajo o moderado.

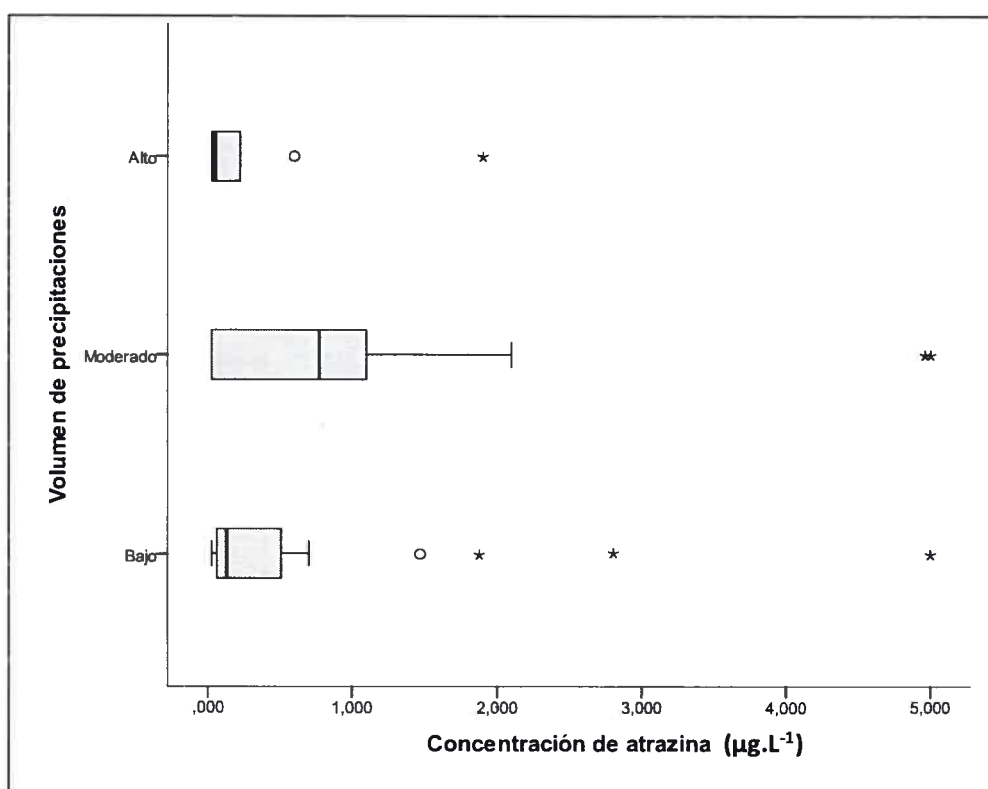


Figura 16. Relación entre las concentraciones de atrazina detectadas en los sitios de monitoreo y la lluvia caída (por categorías).

En la región centro-sur de la provincia de Córdoba la principal aplicación del herbicida atrazina se lleva a cabo en primavera, durante el barbecho y después de la siembra (preemergencia) de los cereales de verano. Estas aplicaciones, en cultivos como el maíz, pueden extenderse hasta que las plántulas alcanzan una altura de aproximadamente 30 cm (etapa vegetativa de crecimiento).

Además, la aplicación de atrazina entre los meses de septiembre a noviembre coincide con el período de mayor volumen/frecuencia de precipitaciones. Este herbicida puede alcanzar los cuerpos de agua por diferentes vías, como la deposición de microgotas que se encuentran en suspensión en el aire, la inapropiada disposición de los envases y maquinarias de aplicación y principalmente mediante procesos de escorrentía

del agua de lluvia en los campos fumigados (Dua y col., 2002; Singh y Walker, 2006; Mobaser y col., 2012).

Durante un evento de lluvia, el agua entra en contacto con los herbicidas que se encuentran en la matriz del suelo, poniendo a estos compuestos en solución y transportándolos mediante escorrentía. La velocidad de la descarga de agua influye en la disolución del contaminante, y junto con el volumen de agua condicionan la concentración del herbicida detectada. Cuando el agua tiene un flujo elevado, existe un corto tiempo para alcanzar un estado de equilibrio entre los compuestos disueltos y adsorbidos, por lo que sólo una pequeña cantidad de los mismos quedan disponibles en solución (Sparks y Suárez, 1991). Müller y col. (2002) postulan que en el suelo existe una rápida desorción inicial del herbicida y como consecuencia se detectan altas concentraciones en el agua al inicio de las precipitaciones. Más tarde ocurriría una desorción más lenta, debido a que se establecen enlaces más fuertes entre el compuesto y la matriz del suelo resultando en la detección de concentraciones más bajas. Luego de reiterados eventos de lluvias, las concentraciones detectadas en agua disminuyen de manera exponencial, dado que además se produce la infiltración de agua en los poros del suelo reduciéndose la cantidad de herbicida disponible para ser descargado a los cuerpos de aguas superficiales (Haider, 1994; Spatz y Hurle, 2001). De este modo, en la concentración final de atrazina detectada no sólo influye el volumen de precipitaciones caídas, sino también otras características como la frecuencia y la intensidad de las precipitaciones. Al mismo tiempo, una vez que alcanza un cuerpo de agua, el herbicida sufre un proceso de dilución que depende principalmente de las características mismo, tales como caudal, profundidad del cauce, partículas disueltas, entre otras, que en conjunto también condicionan la concentración del compuesto en el agua en un momento dado.

Debido a que la aplicación de atrazina durante la estación de primavera coincide con un período de elevado volumen/frecuencia de precipitaciones, resulta esperable que se registre en esta estación un pico de descarga del herbicida en los cuerpos de aguas superficiales (Lorente y col., 2015). Sin embargo, los análisis estadísticos no revelaron correlación positiva entre los registros de precipitaciones y las concentraciones de atrazina detectadas (**Figura 15**). Esta discrepancia puede ser atribuida a que la aplicación de herbicidas puede resultar en eventos de contaminación de corto tiempo

(horas) después de la primera lluvia, lo cual junto con la rápida movilidad de los compuestos determinaría su presencia en bajas concentraciones en las aguas de escorrentía después de los eventos de lluvia intensa (Stoeckel y col., 2012.; Lorente y col., 2015). En este estudio, para realizar los monitoreos luego de eventos de lluvia se debió esperar unos días para ingresar a los sitios con lo cual, posiblemente, las muestras fueron colectadas luego de uno de estos picos de descarga de atrazina determinando, consecuentemente, las bajas concentraciones de herbicidas en las muestras. Leu y col. (2004) detectaron atrazina en un arroyo en estudio durante las primeras horas luego de los primeros eventos de lluvia que siguieron a su aplicación, y después de dos horas las concentraciones se diluyeron rápidamente, dificultando su detección. Mediante un estudio a pequeña escala revelaron que las pérdidas desde el suelo (de origen puntual) se produjeron principalmente al comenzar un evento de lluvia, durante un período breve (de escasas horas) determinando las máximas concentraciones cuantificadas en el agua. Por otra parte, demostraron descargas difusas de herbicidas desde los campos agrícolas, con concentraciones más bajas pero de mayor duración (unos días), resultantes principalmente de mecanismos de transporte rápidos (como la escorrentía superficial y los sistemas de drenaje subterráneo). Estos autores proponen que las características del campo tienen una mayor influencia en las pérdidas de herbicidas que las características del compuesto.

En este trabajo, resultan llamativas las altas concentraciones de atrazina en otoño dado que, desde la época de aplicación del herbicida y hasta el momento de los muestreos transcurrieron entre 5 a 7 meses. Dadas las relativamente altas frecuencias de detección y las elevadas concentraciones de atrazina detectadas en otoño se postula que:

- como consecuencia del transporte de atrazina por mecanismos rápidos se produce la acumulación transitoria de reservas del herbicida en la zona saturada del suelo, lo suficientemente grandes como para generar el transporte de concentraciones elevadas durante períodos de tiempo considerables (Leu y col., 2004);
- los sedimentos del lecho de los ríos o arroyos que reciben el contaminante, actuarían como depósitos del mismo (por adsorción del herbicida) y por lo tanto, se produciría una liberación continua del herbicida al curso de agua (Nödler y col., 2013);
- en las aguas subterráneas podrían encontrarse reservas de atrazina que llegan a ellas por lixiviación y que debido al elevado tiempo de residencia del agua dentro de los

acuíferos, presentarían alta persistencia en los mismos. Como consecuencia de la conexión existente entre aguas superficiales y subterráneas, la atrazina podría estar alcanzando los cursos superficiales por este mecanismo (Poulier y col., 2014).

- otros factores determinantes son las características propias del herbicida atrazina, como su alta estabilidad química y moderada solubilidad en agua, persistencia en el agua, entre otras (Chung y col., 2003).

En la llegada de atrazina a los cuerpos de agua también influyen las características de los campos aledaños, por lo que en adelante sería necesario considerar en los sitios de monitoreo las características del terreno (historia de uso, cobertura, pendiente y distancia a los cuerpos de agua) así como el tipo de suelo y sus propiedades, para una mayor comprensión de las concentraciones de atrazina detectadas en los cursos de agua. Becerra y col. (2013) estimaron el índice  $K_d$  de atrazina en suelos de la provincia de Córdoba utilizando un modelo predictivo de regresión múltiple a partir de mediciones como pH, materia orgánica y arcillas. La atrazina, por sus propiedades químicas y su elevada retención a la materia orgánica, es considerada de moderada a baja movilidad en el horizonte superficial del suelo. Estos autores estimaron que aproximadamente el 85% del territorio de la provincia de Córdoba presenta entre baja y media capacidad de adsorción de atrazina. En este estudio, ocho de los diez sitios monitoreados en el presente estudio se encuentran dentro de la zona de capacidad de adsorción media, lo cual favorecería la disolución y transporte (movilidad) de atrazina por el agua de lluvia. Contrariamente, sólo dos sitios (CRI y RCA) se localizan en una zona de alta capacidad de adsorción. Estos antecedentes respaldan la hipótesis de que en la región el herbicida atrazina es transportado por escorrentía desde suelos agrícolas hacia los cuerpos de aguas superficiales, dependiendo este proceso de múltiples factores.

Las características propias del curso de agua (superficie, profundidad y caudal) y las condiciones climáticas de la región, que incluyen temperatura, humedad, vientos, etc. (Vryzas y col., 2009) también influyen en la dispersión de herbicidas. En este sentido, Freitas y col. (2008) demostraron que dentro de pequeñas cuencas agrícolas, cada campo individual puede exhibir riesgos hidrológicos diferentes, dados por las condiciones climáticas y las diferencias de pendientes, entre otras causas, que contribuyen a las pérdidas de herbicidas. Dada la complejidad del sistema, el efecto



combinado de estos factores sobre la magnitud temporal y espacial de las concentraciones de atrazina en los recursos hídricos resulta difícil de predecir.

Para tomar las medidas apropiadas tendientes a reducir al mínimo el ingreso de atrazina a las aguas superficiales, se requeriría el conocimiento detallado de todos los factores que controlan las pérdidas del compuesto, tanto de fuentes puntuales como difusas, lo cual resulta realmente complejo debido a la gran diversidad de variables que condicionan estos procesos. Cabe destacar que la provincia de Córdoba no existen bases de datos que reporten el volumen de atrazina aplicada por área cultivada, variable que ayudaría a explicar las concentraciones detectadas en los cursos de agua analizados. En este sentido, se observó una dependencia proporcional de las concentraciones de atrazina detectadas en el agua de escorrentía con la cantidad aplicada (Haider, 1994).

Sánchez-Camazano y col. (2005) evaluaron el comportamiento espacial y temporal de la detección de herbicidas *s*-triazinas en aguas superficiales ( $0,04\text{--}25,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) y subterráneas ( $0,04\text{--}3,45 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) de la región de Castilla-León (España), que en general se vincularon a las épocas de lluvias. Vitanov y col. (2003) realizaron un monitoreo de dos años en el río Danubio (Bulgaria), detectaron atrazina en concentraciones de  $0,39\text{--}0,67 \mu\text{g.L}^{-1}$  y observaron una variación estacional de las concentraciones detectadas. En un estudio realizado en Sudáfrica en aguas de lagunas, se detectaron concentraciones de  $1,2\text{--}9,3 \mu\text{g.L}^{-1}$  en zonas de cultivo de maíz y de  $0,39$  a  $0,84 \mu\text{g.L}^{-1}$  en zonas no cultivadas relacionadas en el último caso con el posible transporte atmosférico (Du Preez y col., 2005). En Argentina, De Gerónimo y col. (2014) analizaron las concentraciones de herbicidas en aguas superficiales en función de la variación geográfica y de los cultivos regionales, siendo atrazina el más frecuentemente detectado. Sin embargo, no evaluaron variaciones estacionales ni relaciones con otras variables. Bonansea y col. (2013) detectaron atrazina en el río Suquía (Córdoba) con concentraciones máximas de  $4,3 \mu\text{g.L}^{-1}$ , pero no establecieron relaciones con otras variables.

En conjunto, los resultados obtenidos en los monitoreos de los cursos de aguas superficiales realizados entre 2011-2015 evidenciaron que atrazina es un herbicida sistemáticamente detectado en la región y que se produce una considerable llegada del compuesto a los cuerpos de agua, constituyendo un peligro potencial para todas las formas de vida. Es de destacar que en numerosos puntos monitoreados los valores de

atrazina detectados exceden los niveles admitidos por las normativas internacionales. En primavera, el 78% de las detecciones realizadas superaron el máximo nivel permisible para agua de bebida de  $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$  establecido por la directiva de la Comunidad Europea (Directiva 98/83/EC), mientras que en otoño este porcentaje fue notablemente menor (40%). Por otra parte, en primavera, el 18,8% de las detecciones superaron el valor máximo de  $1,8 \mu\text{g.L}^{-1}$  considerado perjudicial para los organismos acuáticos por la Canadian Environmental Quality Guidelines (CCME, 2006), a diferencia de otoño donde sólo el 6,7% superó el valor límite establecido por dicha normativa.

Dadas las características fisicoquímicas y toxicológicas del herbicida atrazina, su presencia en las concentraciones detectadas afecta la calidad del agua de los recursos hídricos de la región. Si bien en la zona de influencia de la cuenca del río Tercero el agua superficial no es utilizada directamente como agua de bebida para consumo humano, la presencia de atrazina podría impactar negativamente en el funcionamiento normal de los ecosistemas acuáticos. Por otra parte, los contaminantes presentes en los cursos de agua podrían llegar a los acuíferos (principales reservas de agua potable de la región) por la existencia de interacciones entre las aguas subterráneas y superficiales. La contaminación de estas importantes reservas hídricas subterráneas con herbicidas como la atrazina podría producirse tanto por lixiviación durante el escurrimiento del agua de lluvia, como por medio de flujo lateral de aguas superficiales como lagos, humedales, arroyos o ríos (Younger, 2009).

Este trabajo refleja la importancia del monitoreo de la calidad del agua de los recursos hídricos superficiales. Los resultados de los niveles de atrazina en ríos, canales, arroyos y lagunas de la provincia de Córdoba provistos por este estudio son relevantes ya que sientan antecedentes de la contaminación del agua por las prácticas agrícolas y provee información para ser considerada por los organismos gubernamentales para la elaboración de normativas y la toma de decisiones. La aplicación de medidas eficaces para prevenir y/o reducir las pérdidas de herbicidas como atrazina procedentes principalmente de fuentes no puntuales, en detrimento de los ecosistemas naturales, es un reto para los organismos reguladores y para la administración de los recursos hídricos.

## CONCLUSIONES

- El monitoreo de atrazina en los cursos de aguas superficiales de la región centro-sur de la provincia de Córdoba reveló que se produce una considerable llegada del herbicida a los cuerpos de agua, relacionada directamente con el período de aplicación del herbicida y la abundancia de precipitaciones, pudiendo causar desequilibrios en los ecosistemas y constituyendo un problema para la salud humana y animal.
- La presencia de atrazina en los cursos de agua depende del sitio de monitoreo y se encuentra directamente relacionada con la localización del sitio, encontrándose concentraciones mayores de atrazina en zonas rurales.
- Las concentraciones de atrazina detectadas en primavera fueron por lo general superiores a las detectadas en otoño, lo cual se relaciona directamente con el período de aplicación del compuesto.
- La presencia del herbicida en otoño demuestra su llegada continua desde el suelo incluso meses después de su aplicación y/o su persistencia en los sistemas acuáticos estudiados.
- Los altos volúmenes de lluvia determinan una mayor dilución del herbicida por lo que las concentraciones detectadas tienden a ser más bajas.
- **El vertido de plaguicidas en la región, la distribución estacional de precipitaciones y el consecuente balance hidrológico del medio incide en el escenario final de contaminación del agua superficial por atrazina.**

# *Capítulo 4*

**IMPACTO DE HERBICIDAS S-TRIAZINAS SOBRE  
COMUNIDADES BACTERIANAS NATIVAS DE  
AMBIENTES ACUÁTICOS**

---

## **IMPACTO DE HERBICIDAS S-TRIAZINAS SOBRE COMUNIDADES BACTERIANAS NATIVAS DE AMBIENTES ACUÁTICOS**

### **1. Efecto de los herbicidas sobre las comunidades microbianas acuáticas**

Los ecosistemas acuáticos son ambientes microbiológicamente complejos dado que contienen una gran diversidad de poblaciones microbianas (algas, bacterias, hongos y protozoos) que cumplen importantes roles en la productividad primaria, en el ciclado de nutrientes y en la descomposición de compuestos orgánicos. Estos ambientes reciben aportes directos e indirectos de diferentes compuestos como por ejemplo los herbicidas, con la inevitable exposición de las comunidades microbianas a estos xenobióticos y provocando, consecuentemente, cambios cualitativos y cuantitativos sobre éstas. Estos efectos pueden impactar luego sobre niveles tróficos superiores y en los procesos que contribuyen a la calidad global del agua (Verrhiest y col., 2002; Ensz y col., 2003). En este sentido, se produce una alteración del funcionamiento del ecosistema por interferencia en el flujo de C y la regeneración de nutrientes (Downing y col., 2004). No obstante, la información acerca de los efectos de los herbicidas sobre las comunidades microbianas de agua dulce es limitada. Los estudios existentes se han focalizado en la biodegradación de estos compuestos pero no evalúan su impacto sobre los microorganismos nativos (DeLorenzo y col., 2001). Por lo tanto, la evaluación de la dinámica de las comunidades microbianas constituye un factor primordial para la comprensión de los complejos procesos que ocurren dentro de los ecosistemas teniendo un claro aporte en la sustentabilidad ambiental.

Es conocido que la atrazina es absorbida por las algas y plantas acuáticas a través de las paredes celulares, siendo su acción tóxica ejercida principalmente mediante la inhibición de la fotosíntesis, dado que bloquea el transporte de electrones en el fotosistema II (Forney y Davis, 1981; DeLorenzo y col., 2001). Debido a sus similitudes fisiológicas con los organismos blanco (malezas) sobre los que ejerce su acción, los organismos acuáticos fotosintéticos (denominados en conjunto fitoplancton) representan la fracción de la microbiota acuática más vulnerable a los herbicidas, entre ellos la atrazina (DeLorenzo y col., 2001; Dorigo y col., 2004). El efecto de atrazina sobre éstos ha sido evaluado por numerosos autores, observándose una variación de su toxicidad en función de las

concentraciones utilizadas, la duración de la exposición y las especies ensayadas. La disminución significativa en la diversidad de especies de fitoplancton de un lago de Canadá fue demostrada por Hamilton y col. (1988). Stratton (1984) determinó la toxicidad del herbicida sobre el crecimiento y la fotosíntesis en algas de las especies *Anabaena inaequalis*, *A. cylindrica*, *A. variabilis*, *Chlorella pyrenoidosa* y *Scenedesmus quadricauda*. Scott y col. (1988) observaron una disminución en el contenido de clorofila en algas de las especies *Chlorella vulgaris*, *Tenue stigeoclonium* y *Oscillatoria lutea*, y la toxicidad aguda fue evaluada sobre *Raphidocelis subcapitata* (Ma y col., 2006) y *Scenedesmus obliquu* (He y col., 2012). Simultáneamente, como consecuencia de la toxicidad de atrazina, se producen cambios en la calidad del agua, tales como incrementos de las concentraciones de C, N y/o P inorgánico, modificaciones en el pH y aumento de la conductividad relacionados con la reducción de la absorción fotosintética de bicarbonato y de las tasas de absorción de nutrientes (Brockway y col., 1984; Johnson 1986; Hamilton y col., 1989; Hoagland y col., 1993; Detenbeck y col., 1996) y disminución de la concentración de O<sub>2</sub> disuelto debido a la reducción de la productividad primaria (fijación de C) por los organismos fotosintéticos (Pearson y Crossland, 1996; De Lorenzo y col., 1999; 2001).

En los ecosistemas acuáticos se observa con frecuencia una covariación entre las poblaciones de algas y de bacterias (Gao y col., 2005) debido principalmente a que estas últimas utilizan el C orgánico producido por los organismos fotosintéticos (Gasol y Duarte, 2000), por lo que las alteraciones en las poblaciones de microorganismos productores afectarían a las bacterias. Las poblaciones bacterianas representan un nivel trófico clave en ecosistemas fluviales ya que desempeñan un rol esencial en la atenuación natural de contaminantes orgánicos, siendo capaces de transformar o mineralizar estos compuestos utilizándolos como fuentes de nutrientes (Christensen y col., 2001), proceso que se denomina biodegradación. Sin embargo, existen escasos estudios que evalúen los efectos de la exposición a atrazina sobre las comunidades bacterianas de agua dulce (Dorigo y col., 2002, 2004), por lo que la comprensión de cómo estos ecosistemas reaccionan a la llegada de este xenobiótico es limitada (Schulz, 2004). En un canal al sur de Florida (USA) Downing y col. (2004) determinaron que una dosis de atrazina de 200 µg.L<sup>-1</sup> redujo significativamente el contenido de clorofila a, la asimilación de C y la biomasa de algas fototróficas, pero estimuló la productividad de bacterias heterótrofas, posiblemente como efecto indirecto de la disminución de la competencia por nutrientes o por un incremento en

el C libre. Pesce y col. (2008) determinaron que en ríos impactados con elevadas concentraciones de atrazina ( $0,32 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) se produce una importante disminución de la biomasa de algas, aunque la densidad de bacterias heterótrofas permanece constante. Iker y col. (2010) observaron que la atrazina afectó negativamente los procesos metabólicos de las comunidades microbianas de un acuífero y modificó la abundancia de especies capaces de utilizar compuestos nitrogenados, conduciendo a la acumulación de nitratos, alterando el ciclo normal del N y modificando, por consiguiente, la calidad del agua de los acuíferos.

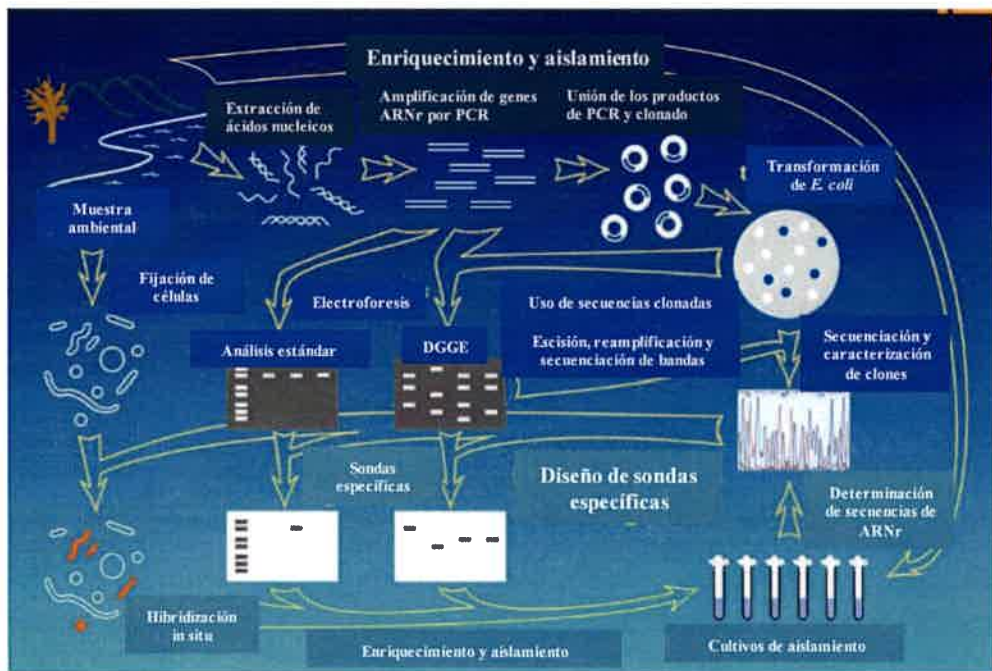
Atrazina es uno de los herbicidas clorados de mayor aplicación en la región centro-sur de Córdoba y su detección es frecuente en aguas superficiales (Capítulo 3, sección 1). Por lo tanto, resulta importante estudiar el impacto de este compuesto sobre las comunidades microbianas de ambientes acuáticos a fin de comprender y predecir posibles consecuencias en los ecosistemas y entender los procesos de atenuación natural de estos contaminantes.

## 2. Técnicas de estudio en ecología microbiana

El estudio de las comunidades microbianas es un requisito fundamental para conocer el funcionamiento de los ecosistemas y su respuesta frente a disturbios antrópicos. Las modificaciones en la abundancia, actividad metabólica, diversidad y/o estructura de estas comunidades son indicadores sensibles y relevantes de perturbaciones ambientales (Ager y col., 2010). La utilización tanto de técnicas microbiológicas convencionales como de metodologías de biología molecular independientes de cultivo permite el seguimiento de las comunidades microbianas que habitan los ecosistemas acuáticos (**Figura 17**).

Los métodos dependientes de cultivo más comúnmente utilizados para la evaluación de la abundancia microbiana incluyen la estimación de células totales por densidad óptica (espectrofotometría) y el recuento de células viables (recuento en placa). Éstas son rápidas, de bajo costo y proveen información sobre la población microbiana activa cultivable (Kirk y col., 2004; Vladár y col., 2008; Abril y col., 2010; Agarás y col., 2012; Casado-Murillo y Abril, 2011). Conjuntamente, los estudios sobre la actividad metabólica de las comunidades microbianas también adquieren relevancia dado que permiten evaluar actividades enzimáticas específicas (Nannipieri y col., 2003; Bell y col., 2009; Dinamarca y col., 2007; Morgante y col., 2010). No obstante, estas metodologías tienen limitaciones debido a la imposibilidad de cultivar numerosas especies de bacterias ambientales

mediante técnicas convencionales. Por lo tanto, estas metodologías podrían limitar el conocimiento de la biodiversidad microbiana y la importancia ecológica de organismos no cultivables puede pasar desapercibida (Brockman, 1995; Widada y col., 2002; Rappe y Giovannoni, 2003; Van Hamme y col., 2003; Gilbride y col., 2006).



**Figura 17.** Estudio de comunidades microbianas mediante métodos dependientes e independientes de cultivo (Adaptado de Head y col., 1998).

En las últimas décadas, el desarrollo de metodologías independientes de cultivo como las técnicas de biología molecular han implicado un importante avance en la caracterización de la estructura y función de las comunidades microbianas (Head y col., 1998; Giovannoni y Rappé, 2000; Rosselló-Mora y Amann, 2001). Éstas se basan en la caracterización de componentes celulares, principalmente ácidos nucleicos, que pueden extraerse directamente de muestras ambientales sin la necesidad de realizar cultivos previos, conservando la composición de la comunidad microbiana (Wilson y col., 1999; Rosselló-Mora y Amann, 2001; Araya y col., 2003). Las técnicas actuales permiten eludir el requisito del cultivo y por lo tanto, incrementan en gran medida la comprensión de la diversidad microbiana de muestras ambientales complejas. Así, se logra obtener una aproximación más exacta de la composición microbiana ya que consiguen describir toda la diversidad, incluida la no cultivable, que se estima superior al 95% (Sabree y col., 2009; Hirsch y col., 2010; Barton y Northup, 2011).



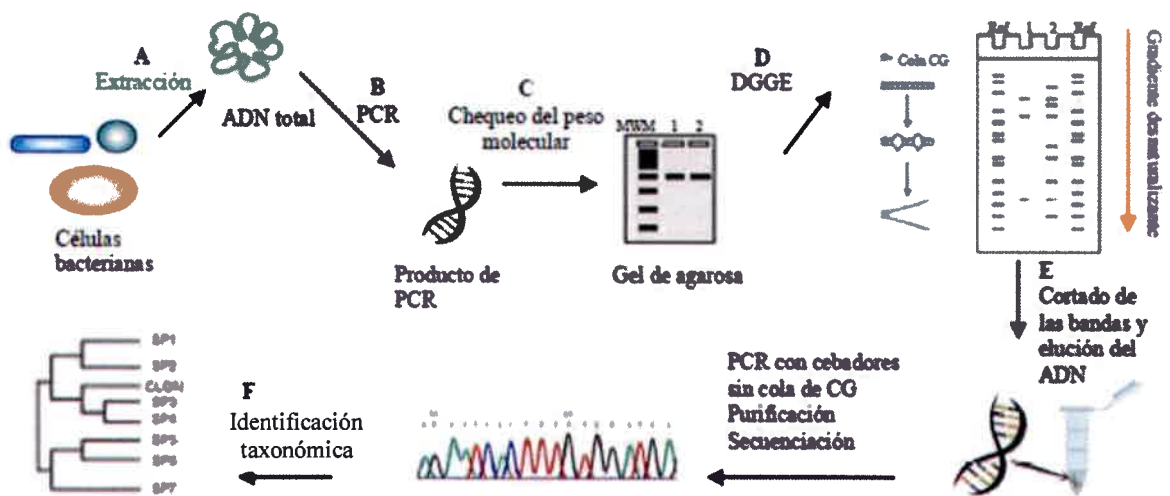
La estructura de las comunidades microbianas puede ser estudiada mediante el análisis de secuencias de genes específicos. El gen que codifica para el ARN ribosomal 16S (ARNr 16S) es el más extensamente utilizado para analizar la diversidad bacteriana en numerosos ambientes (Cummings y col., 2003; Lemke y col., 2009; Febria y col., 2010; Laque y col., 2010; Peeters y col., 2011) ya que posee regiones lo suficientemente conservadas como para permitir el diseño de cebadores de PCR que son blanco para diferentes grupos taxonómicos (desde reino a género), pero que tienen suficiente variabilidad como para permitir comparaciones filogenéticas entre los microorganismos de las comunidades (Woese, 1987; Nannipieri y col., 2003; Paul, 2006; Barton y Northup, 2011). De esta manera, la composición de las comunidades microbianas ambientales puede ser analizada mediante diferentes técnicas basadas en la amplificación por PCR del gen ARNr 16S y comparación de las secuencias amplificadas (**Figura 17**). Las técnicas más utilizadas para el estudio de la estructura de la comunidad bacteriana son la secuenciación de nucleótidos y los métodos de *fingerprinting* o huellas dactilares. Estos últimos se basan en la amplificación por PCR sin necesidad de establecer una biblioteca de clones, y permiten distinguir diferencias en la estructura genética de las comunidades microbianas de diferentes muestras. Actualmente son las herramientas más utilizadas en el análisis de la biodiversidad de comunidades microbianas acuáticas y presentan como ventajas que: a) son más rápidas que los métodos de secuenciación, lo que permite analizar una gran cantidad de muestras (Nannipieri y col., 2003; Lynch y col., 2004; Paul, 2006; Comte y del Giorgio, 2010); b) permiten evaluar la riqueza de microorganismos de comunidades complejas y monitorear la respuesta de las mismas frente a cambios ambientales a través del tiempo (Muyzer y col., 1993; Nakatsu, 2007; Perryman y col., 2008; Miletto y col., 2007; Agaras y col., 2011). Entre las metodologías de *fingerprinting* más utilizadas se destacan el polimorfismo de fragmentos largos de restricción (RFLP); polimorfismo de fragmentos largos de restricción terminal (T-RFLP); análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado (ARDRA); electroforesis en gel con gradiente desnaturante (DGGE), análisis de los espacios intergénicos ribosomales (RISA) y análisis automatizados de los espacios intergénicos ribosomales (ARISA) entre otras (Nannipieri y col., 2003; Kirk y col., 2004; Paul, 2006; Marzorati y col., 2008; Barton y Northup, 2011).

Todas estas herramientas proporcionan una aproximación de las diversas especies presentes en las comunidades, pero no brindan información sobre el metabolismo celular o su función en el ecosistema.

## 2.1. Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE)

La electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (DGGE de sus siglas en inglés: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), introducida hace más de 10 años, es actualmente utilizada en estudios de ecología microbiana para evaluar cambios en las comunidades microbianas y para monitorear su dinámica, dado que proporciona una huella genética de la comunidad (Muyzer, 1999; Salloto y col., 2012; Mulling y col., 2014).

Para llevar a cabo la técnica de DGGE (**Figura 18**) se realiza la extracción de ADN a partir de una muestra ambiental, por lo que se obtiene una mezcla de ADN de todas las especies bacterianas presentes (**A**). Este ADN es utilizado como templado en la amplificación por PCR del gen ARNr 16S, obteniéndose una mezcla de amplicones de la misma longitud que difieren en sus secuencias en por lo menos un nucleótido (**B**). Luego se comprueba el peso molecular en un gel de agarosa (**C**) y la mezcla de ADN se separa por electroforesis en gel de acrilamida a través un gradiente lineal de desnaturalizantes químicos (urea y formamida) (**D**). Las moléculas de ADN migran hacia el polo positivo y al llegar al sitio del gel con su correspondiente fuerza desnaturalizante se detienen. Las bandas pueden ser cortadas del gel, el ADN extraído y secuenciado (**E**). La comparación de las secuencias del gen ARNr 16S con una base de datos permite determinar la filiación filogenética de los microorganismos presentes en la muestra (**F**).



**Figura 18.** Representación esquemática de la técnica de DGGE (Tomado de Kikot, 2012).

El resultado final es una huella genética que es específica de la muestra analizada y contiene una serie de bandas en relación con los taxones microbianos presentes en dicha muestra. La técnica de DGGE permite el análisis simultáneo de diferentes muestras, facilitando el monitoreo de las variaciones que las comunidades microbianas pueden sufrir debido a perturbaciones ambientales. La identificación se puede lograr mediante la purificación, reamplificación y secuenciación de las bandas (Forney y col., 2004).

Numerosos trabajos utilizan DGGE para estudios ambientales y determinación de variaciones en las comunidades microbianas ante perturbaciones ambientales (Cycón y col., 2013; Zhou y col., 2015; Marileo y col., 2016). Ha sido comúnmente utilizada para la evaluación de la estructura de comunidades microbianas en ambientes como suelos (Cycon y col., 2013; Souza y col., 2013; Marileo y col., 2016; Crouzet y col., 2016) o agua (Salloto y col., 2012; Bricheux y col., 2013; Aguayo y col., 2014; Paule y col., 2015) contaminados con herbicidas con resultados interesantes.

La técnica de DGGE es un método de elección cuando la información requerida no tiene que ser tan exhaustiva filogenéticamente como la proporcionada por bibliotecas de genes ARNr 16S, pero sí precisa como para determinar los miembros dominantes de una comunidad microbiana (Sanz y Kochling, 2007). Entre sus principales ventajas se destacan que, mediante un análisis simple de patrones de bandas, permite el seguimiento de los cambios espaciales/temporales en la estructura de las comunidades microbianas, observar el efecto de una variable sobre la composición de una comunidad (Barnes y col., 2010; Salloto y col., 2012; Chen y col., 2013; Tien y col., 2013; Dutta y col., 2015) y proporciona una visión simple de los taxones microbianos dominantes dentro de una muestra (Casamayor y col., 2000; Rafedzi y col., 2015; Zhi y col., 2015).

Sin embargo, esta técnica presenta algunas limitaciones: los fragmentos de secuencias de ARNr 16S obtenidos son menores a 500 pb y pueden carecer de la especificidad requerida para la identificación filogenética de algunos organismos (Gilbride y col., 2006); debido a la existencia de múltiples copias de ARNr en algunos organismos, pueden aparecer múltiples bandas para una sola especie (Nübel y col., 1997); además diferentes secuencias pueden tener movilidades idénticas y el análisis de comunidades microbianas mediante DGGE produce un perfil complejo que puede ser sensible a la variación del muestreo espacial y temporal (Murray y col., 1998).

Dado que este tipo de herramientas moleculares facilitan el estudio de la estructura y función de las comunidades microbianas en ecosistemas acuáticos, la técnica de DGGE ha

sido utilizada en este trabajo para evaluar posibles cambios en las comunidades nativas de cursos de aguas superficiales de la región frente a perturbaciones como la llegada del herbicida atrazina.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La presencia de atrazina en aguas superficiales de la región centro-sur de Córdoba en concentraciones relevantes produce una disminución en la riqueza y composición de la comunidad microbiana nativa de estos ambientes, favoreciendo el desarrollo de las poblaciones tolerantes y/o degradadoras del herbicida.

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el impacto del herbicida atrazina sobre la estructura y función de las comunidades microbianas presentes en dos ecosistemas acuáticos de la región centro-sur de la provincia de Córdoba.

### **Objetivos específicos**

- ✓ Analizar la atenuación natural de atrazina en los ecosistemas ACR y RTP.
- ✓ Estudiar el efecto de atrazina sobre la microbiota acuática nativa de los ecosistemas ACR y RTP mediante métodos microbiológicos convencionales.
- ✓ Determinar variaciones en las comunidades bacterianas acuáticas ante la presencia de atrazina mediante métodos independientes de cultivo.
- ✓ Detectar la presencia de genes catabólicos específicos de degradación de *s*-triazinas en dichas comunidades bacterianas.

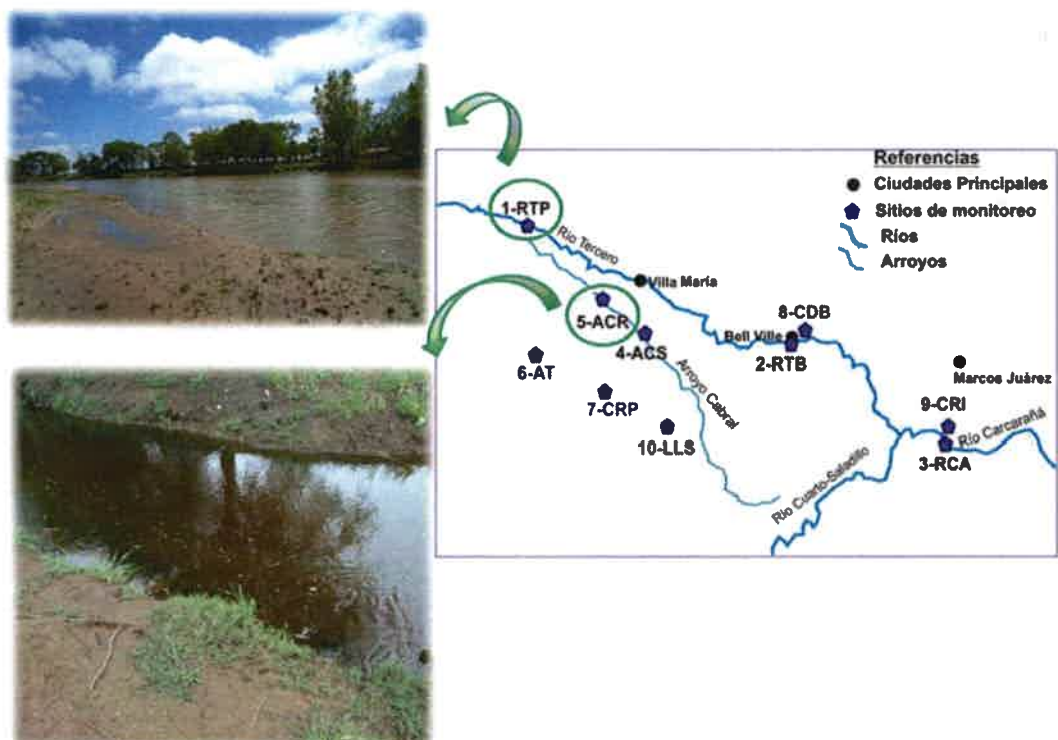
## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Impacto de atrazina sobre las comunidades microbianas nativas en ecosistemas acuáticos

En los ecosistemas acuáticos conviven una gran diversidad de seres vivos, tanto organismos superiores como organismos más simples. La diversidad y la riqueza de las distintas especies existentes es el resultado de procesos históricos y biológicos que determinan la composición de las comunidades (Ager y col., 2010). Como consecuencia de algún evento de contaminación se producen, en general, modificaciones en la diversidad de especies presentes, acompañadas de cambios en la estructura y, consecuentemente, en la función de las comunidades.

La atrazina es el herbicida de mayor aplicación por la agricultura regional, luego de glifosato. Por sus características de movilidad y persistencia ha sido sistemáticamente detectada, en este estudio, en agua superficial de la provincia de Córdoba aún en períodos no coincidentes con su aplicación (Cap 3 sección 1). A partir de estos antecedentes se decidió estudiar el efecto de atrazina sobre la microbiota acuática nativa mediante métodos microbiológicos convencionales e independientes de cultivos. Los dos ecosistemas seleccionados para llevar a cabo los ensayos de microcosmos fueron Arroyo Cabral (ACR), cuyo cauce de bajo caudal atraviesa un área netamente agrícola y río Tercero (RTP) en la localidad de Pampayasta (zona urbanizada) cuyo cauce es de alto caudal (**Figura 19**). Las características físico-químicas de cada ambiente se presentan en la **Tabla 14**.

En ensayos en microcosmos, con agua de RTP o ACR suplementadas con atrazina ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) se determinó la degradación del herbicida, el número de microorganismos heterótrofos cultivables (MHC) y de microorganismos degradadores de atrazina (MDA). Conjuntamente, se realizó la detección de genes catabólicos específicos (PCR) y el estudio de variaciones de las comunidades nativas mediante PCR-DGGE a partir de ADN comunitario.



**Figura 19.** Cursos de agua dulce (ACR y RTP) a partir de los cuales se llevaron a cabo los ensayos de microcosmos.

**Tabla 14.** Características físico-químicas de muestras de agua superficial empleada en los ensayos en microcosmos.

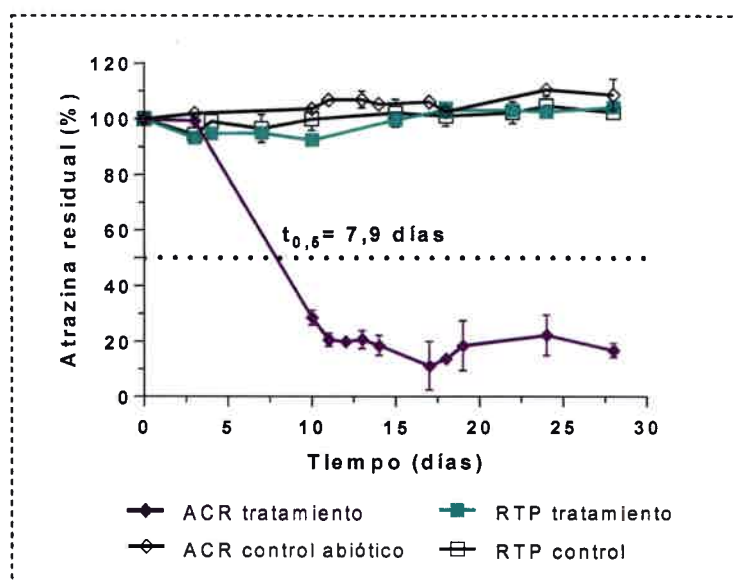
Determinación	Ecosistema ACR	Ecosistema RTP	Método empleado/Norma
Sólidos disueltos totales (mg.L <sup>-1</sup> )	818	170	Gravimétrico/APHA
Nitritos (mg.L <sup>-1</sup> )	0,005	ND	Electrodo selectivo Orion/APHA
Nitratos (mg.L <sup>-1</sup> )	6,4	1,30	Electrodo selectivo Orion/APHA
Alcalinidad total (mg.L <sup>-1</sup> )	280	114,53	Titulación potenciométrica con electrodo selectivo Orion/APHA
Dureza total (CaCO <sub>3</sub> ) (mg.L <sup>-1</sup> )	70	85,46	Titulación potenciométrica con electrodo selectivo Orion/APHA
Fluoruros (mg.L <sup>-1</sup> )	0,53	ND	Electrodo selectivo de iones, Orion/APHA
Cloruros (mg.L <sup>-1</sup> )	39	37,58	Titulación colorimétrica/APHA
Sulfatos (mg.L <sup>-1</sup> )	189	32,30	Turbidimetría/ APHA
Arsénico (mg.L <sup>-1</sup> )	0	0,005	Espectrofotometría de absorción atómica
Conductividad eléctrica (μS.cm <sup>-1</sup> )	1079	360	Electrodo Orion/APHA
pH	7,83	7,80	Electrodo Orion/APHA

**Referencias.** ND: no detectado

### 1.1. Atenuación natural de atrazina en ambientes acuáticos de Córdoba

La presencia de bacterias capaces de metabolizar herbicidas en el ambiente es el resultado de un proceso de evolución de poblaciones microbianas autóctonas que se han adaptado a la existencia de estos contaminantes. La capacidad de la microbiota nativa de utilizarlos como fuente de nutrientes y por lo tanto, de eliminarlos del ambiente, contribuye con la atenuación natural. En este trabajo se evaluó la capacidad de la microbiota acuática nativa de los ecosistemas ACR y RTP de degradar el herbicida durante 28 días mediante el análisis de la concentración residual (mediante espectrofotometría UV-Vis y MEKC) en microcosmos con agua a la que se adicionó atrazina ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ).

En ACR se observó una marcada disminución (85%) en la concentración inicial de atrazina. El tiempo de vida media ( $t_{0,5}$ ) del herbicida en dichos microcosmos fue de 7,9 días. Contrariamente, en los microcosmos del ecosistema RTP la concentración de atrazina permaneció constante durante los 28 días de ensayo (**Figura 20**).



**Figura 20.** Concentración residual de atrazina en microcosmos de los ecosistemas ACR y RTP (n=4).

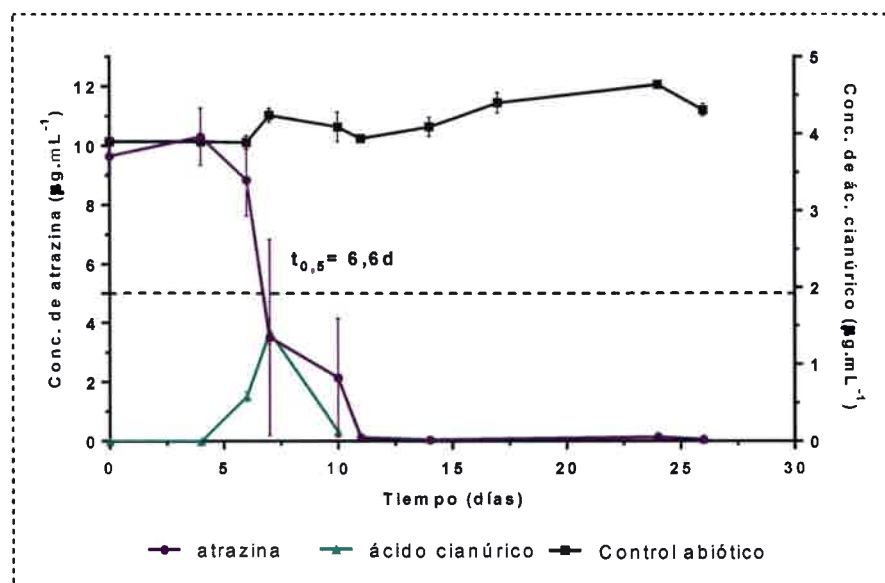
Dado que en los controles abióticos la concentración del herbicida permaneció constante, la disminución detectada del herbicida en ACR puede ser atribuida exclusivamente al proceso de biodegradación.

La espectrofotometría UV-vis permite estimar la concentración de un compuesto presente en una muestra dada a partir de la determinación de la absorbancia a una longitud



de onda determinada. Sin embargo, los productos intermedios de degradación pueden absorber a una longitud de onda similar, resultando en una sobreestimación de la concentración del compuesto. Por lo tanto, resulta necesario el empleo de metodologías analíticas más sensibles que permitan discriminar otros compuestos de características similares en la muestra y cuantificar con mayor precisión. Para tal fin, se trabajó en la puesta a punto de una variante de la técnica de Electroforesis Capilar, la cromatografía capilar electrocinética micelar (MEKC, de sus siglas en inglés) por ser una metodología sensible que permite la separación de moléculas neutras como las s-triazinas, las cuales son acomplejadas por el uso de un surfactante en el buffer de corrida que determina la formación de micelas. La MEKC ha sido utilizada por numerosos autores para la detección de atrazina (Penmetsa y col., 1996; Menzinger y col., 2000; Turiel y col., 2000).

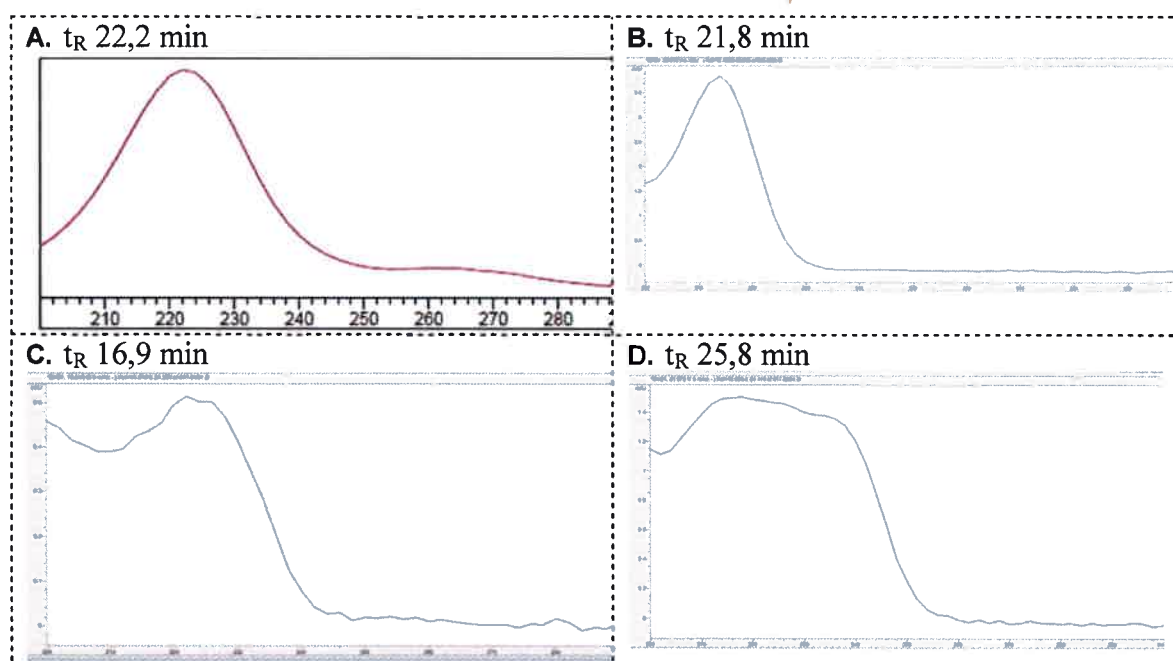
Dado que sólo en ACR se evidenció la atenuación del herbicida, dichas muestras fueron luego analizadas mediante MEKC (**Figura 21**).



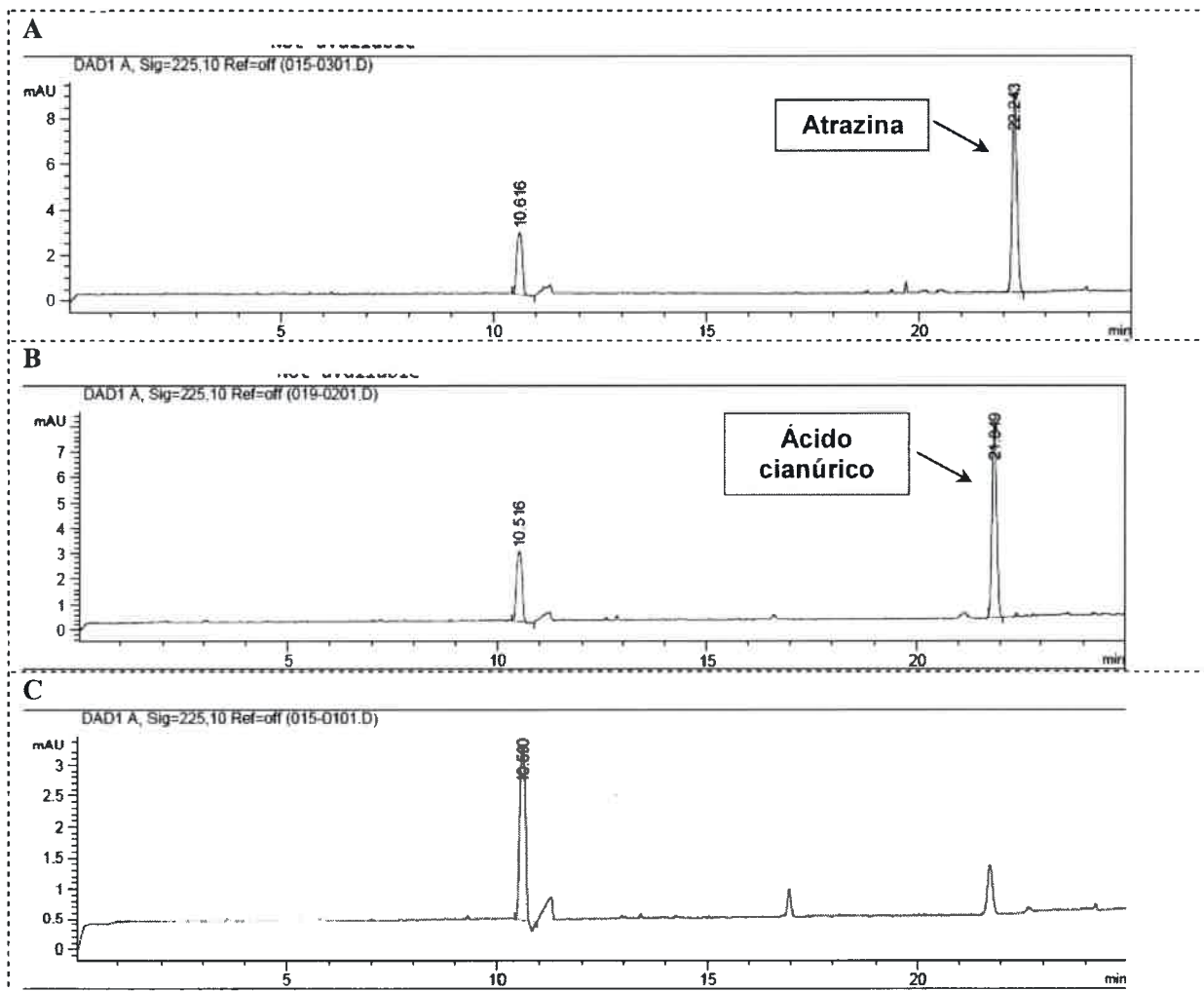
**Figura 21. Atenuación natural de atrazina en microcosmos de ACR.** La concentración de atrazina residual se cuantificó mediante MEKC (n=3).

La concentración inicial de atrazina determinada mediante esta técnica fue de  $9,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (**Figura 23 A**). Se comprobó que entre los 5 y 7 días existe una marcada disminución de la concentración del compuesto y la aparición de ácido cianúrico, principal intermediario de la vía metabólica de degradación de atrazina (**Figura 21 y 23 B**). De este modo, la  $t_{0,5}$  de atrazina fue de 6,6 días (inferior a  $t_{0,5}$ : 7,9 días determinada mediante espectrofotometría UV-Visible).

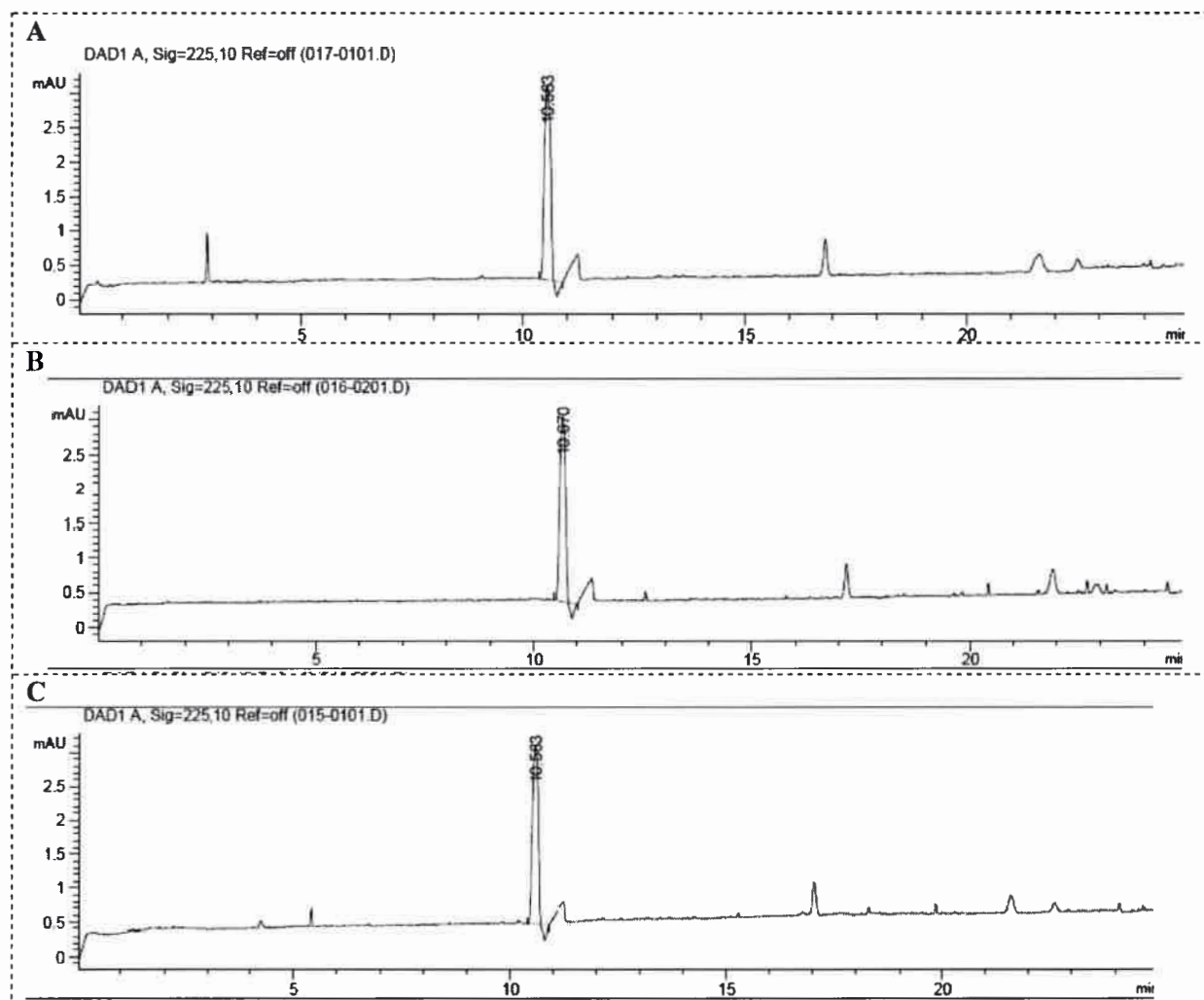
El ácido cianúrico presenta una absorbancia máxima a 210 nm, y su espectro de absorción se muestra en la **Figura 22B**. Este intermediario alcanzó una concentración máxima de  $3,7 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a los 7 días de ensayo, disminuyendo a  $0,33 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a los 10 días, y no se detectó en días posteriores. A partir del día 10 se puede observar además la aparición de nuevos picos (**Figura 24A** y **Figura 24B**) que podrían corresponder a otros intermediarios de la vía metabólica de degradación, ya que sus espectros de absorción se encuentran dentro del rango de absorbancia de atrazina. Dichos picos no fueron comparados con patrones estándar.



**Figura 22.** Espectros de absorción de los picos obtenidos en los electroferogramas. Referencias: **A.** atrazina; **B.** ácido cianúrico; **C** y **D.** Compuestos no identificados.



**Figura 23.** Electroferogramas correspondientes a la determinación de atrazina y sus metabolitos en ensayos de microcosmos de ACR. Referencias: A. T0, B. T6, C.T7.



**Figura 24.** Electroferogramas correspondientes a la determinación de atrazina y sus metabolitos en ensayos de microcosmos de ACR. Referencias: **A.** T10, **B.** T11, **C.** T28.

Finalmente, las determinaciones analíticas demuestran la degradación total de atrazina (>99%) en ACR luego de 28 días de incubación (**Figura 24C**). Estos resultados confirman la disipación del herbicida debido a la presencia en este ambiente de microorganismos adaptados a atrazina y con capacidad para mineralizarla. En consecuencia, se podría inferir que se produce su atenuación natural del herbicida con la consiguiente recuperación del ambiente luego de la llegada del compuesto a este curso de agua superficial.

Existen numerosos estudios que demuestran la atenuación natural de herbicidas s-triazinas en suelos con historia previa de aplicación (Aislabe y col., 2004; Morán y col., 2005; Briceño y col., 2010; Vryzas y col., 2012; Wang y col., 2015). Sin embargo, escasos estudios evalúan el potencial de degradación de atrazina en ambientes acuáticos. Diversos trabajos demuestran la disipación de atrazina en humedales de áreas agrícolas como consecuencia de la degradación microbiana (Moore y col., 2000; Gregoire y col., 2009; Douglass y col., 2015). En estudios realizados por Kao y col. (2001) y Anderson y col. (2002) la atrazina fue degradada tanto en los sedimentos como en el agua. Si bien en estos ambientes la atrazina se disipa finalmente mediante degradación microbiana, su biodisponibilidad y retención en el humedal dependen de factores físicos y químicos específicos del lugar. En ríos, Tappin y col. (2012) observaron un decrecimiento en la concentración de atrazina como consecuencia de la biodegradación por la microbiota nativa del río Tamar (zona rural), mientras que en el río Mersey (zona urbana) la concentración del herbicida permaneció constante, concluyendo que la remoción del mismo depende principalmente de las características de la población bacteriana indígena.

En este estudio encontramos que en Córdoba existen ambientes como ACR en los cuales ocurre la atenuación natural del herbicida atrazina debido a la presencia de microorganismos con capacidad de metabolizarla. Por el contrario, la remoción del mismo no ocurriría en ambientes como RTP, determinando la persistencia del compuesto. Considerando estos aspectos, a continuación se evaluó el efecto de este xenobiótico sobre la microbiota acuática nativa.

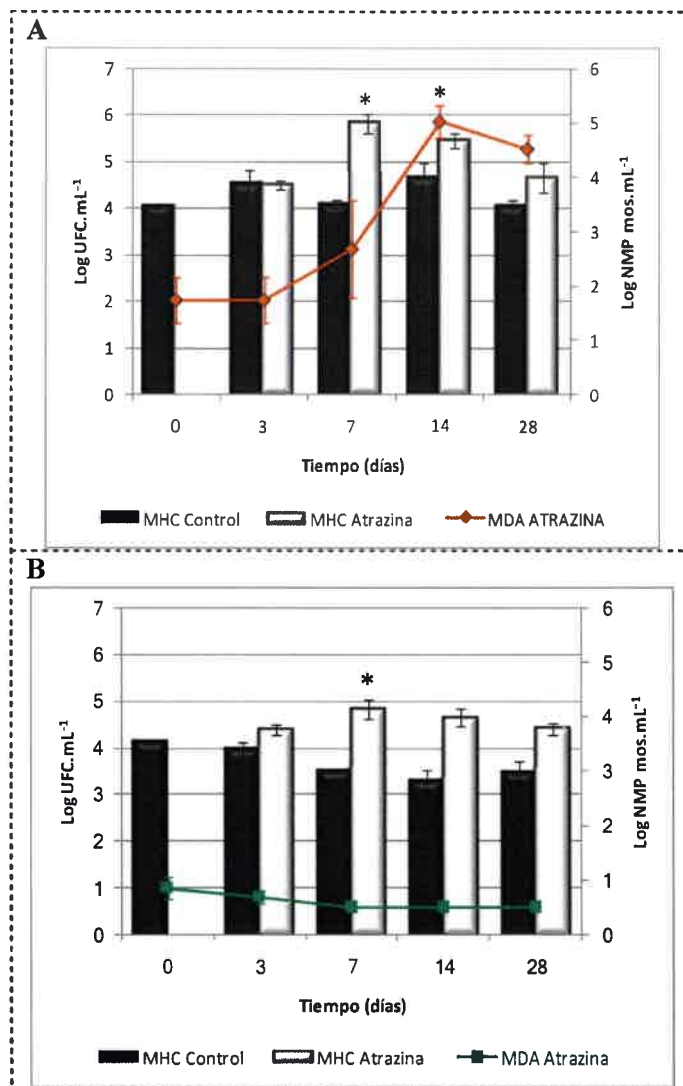
## 1.2. Efecto de atrazina sobre microorganismos heterótrofos cultivables y degradadores

Se determinó la abundancia de MHC presentes en ambos sistemas (ACR y RTP) mediante el recuento de bacterias viables y estimación del número más probable.

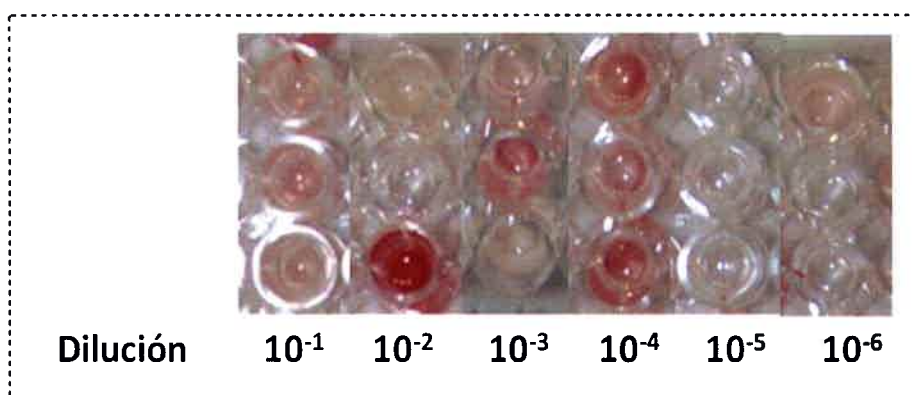
En el ecosistema ACR el recuento inicial de microorganismos heterótrofos cultivables (MHC) fue de  $1,28 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup> (**Figura 25A**). La adición de atrazina en dicho microcosmos se correlacionó con un incremento significativo ( $p < 0,05$ ) de 1,2 Log en el recuento de MHC a los 7 días de incubación respecto al control sin herbicida, manteniéndose una diferencia similar durante los 28 días del ensayo.

En el ecosistema RTP el recuento inicial de MHC fue de  $1,35 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Luego de la adición de atrazina (**Figura 25B**) se observaron aumentos significativos ( $p < 0,05$ ) de MHC a los 7 días de incubación (2,4 Log) respecto al control, manteniéndose esta tendencia a lo largo del ensayo (28 días). Los recuentos iniciales de MHC obtenidos en los ecosistemas en estudio son similares a los reportados en ríos de Reino Unido (Ainsworth y Goulder 1998; Tappin y col., 2012). En la provincia de Córdoba, Merlo y col. (2011) determinaron en el río Suquía en épocas de alto caudal (primavera-verano) recuentos de MHC del orden de  $1 \times 10^3$ -  $1 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>.

La actividad metabólica es de gran relevancia ya que es esencial para la transformación de energía y el ciclado de nutrientes. El estudio de las actividades enzimáticas específicas permite evaluar procesos microbianos de manera particular. En este estudio se evaluó la actividad respiratoria en comunidades microbianas a partir de la estimación del número de MDA mediante la técnica de NMP, según Dinamarca y col. (2007) con modificaciones. Para ello se utilizó el indicador respiratorio cloruro de 2,3,5-trifenil-2H tetrazolio (TTC) dado que es un aceptor de electrones que compete con NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup> entre la ubiquinona y el citocromo b de la cadena transportadora de electrones. De este modo, las deshidrogenasas presentes en la cadena transportadora de electrones reducen el TTC convirtiéndolo en formazán (compuesto color rojo). Este producto fue detectado por visualización de un cambio de color (**Figura 26**) y medición de la absorbancia. En ACR, el recuento inicial de MDA fue de  $1,64 \times 10^2$  NMP de microorganismos.mL<sup>-1</sup> y se observaron variaciones como consecuencia de la adición de atrazina durante el ensayo. Se observó un aumento de 0,95 Log en el recuento promedio de MDA a los 7 días de incubación y un incremento significativo de 3,3 Log a los 14 días ( $p < 0,05$ ) (**Figura 25A**).



**Figura 25.** Impacto de atrazina sobre la microbiota acuática nativa. Recuento de MHC (UFC.mL<sup>-1</sup>) y recuento de microorganismos degradadores de atrazina (MDA) A. ACR; B. RTP; (\*) p<0,05 (n=5).



**Figura 26.** Estimación de la capacidad catabólica de degradación de atrazina en ambientes acuáticos de Córdoba. Se muestra la combinación de TTC positivos y negativos en una microplaca con diferentes diluciones de aguas ambientales, para determinar el NMP.

El incremento de MDA a los 7 días coincide con el  $T_{0,5} = 6,6$  días de atrazina determinado mediante MEKC (**Figura 21**) en dicho ambiente. Finalmente, a los 28 días de incubación el recuento de MDA disminuyó significativamente ( $p < 0,05$ ) obteniéndose un recuento final promedio de  $4,2 \times 10^4$  NMP de microorganismos.mL<sup>-1</sup>. En los microcosmos de RTP el número inicial de MDA fue de 3 NMP de microorganismos.mL<sup>-1</sup>, pero contrariamente a lo observado en ACR, luego de la adición de atrazina no se obtuvieron incrementos de MDA en ninguno de los tiempos evaluados, y los valores permanecieron por debajo del límite de detección de la técnica (**Figura 25B**). De este modo, las diferencias de MDA observadas estarían relacionadas a la capacidad de la microbiota nativa para transformar y/o utilizar dicho compuesto como fuente de nutrientes. Sin embargo, dicha habilidad varía según el ecosistema analizado evidenciando actividades degradadoras diferentes.

La estimación del NMP de microorganismos mediante indicadores respiratorios específicos ha sido utilizada para diferentes contaminantes. En el caso particular de s-triazinas, Dinamarca y col. (2007) y Morgante y col. (2012) observaron que la adición de simazina en suelo produce un incremento en el recuento de microorganismos degradadores coincidiendo con la degradación del herbicida. Sin embargo, de nuestro conocimiento, esta metodología no ha sido utilizada por otros autores para la estimación de MDA en ecosistemas acuáticos. En conjunto, los resultados obtenidos respaldan la hipótesis de que en el ecosistema ACR existen microorganismos nativos con capacidad para degradar atrazina, que jugarían un rol clave en la atenuación natural de este herbicida. Por el contrario, en Córdoba, existen ecosistemas como RTP donde no se produce la remoción del contaminante, debido a la ausencia de microorganismos con vías metabólicas adecuadas para utilizar este herbicida como fuente de nutrientes, o bien a que las condiciones de dicho ambiente no son las adecuadas para que ocurra la degradación. En este sentido, la disponibilidad del herbicida conjuntamente con otros nutrientes esenciales para el metabolismo microbiano podrían influir en el proceso de biodegradación. La relación C/N es un factor importante que condiciona la degradación de atrazina y ha sido ampliamente estudiado en suelos (Fenoll y col., 2014), pero una situación similar podría darse en aguas superficiales.



### 1.3. Efecto de atrazina sobre la estructura de las comunidades microbianas nativas

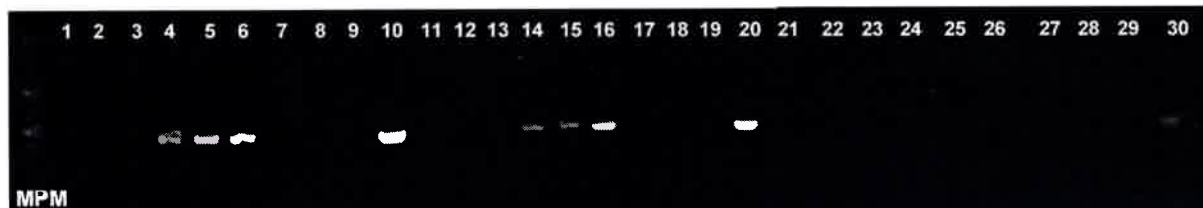
Se decidió evaluar cambios en las comunidades nativas ante la llegada de atrazina mediante métodos independientes de cultivo, que analizan el ADN extraído directamente desde muestras ambientales. Se procedió a la extracción de ADN de las comunidades microbianas de ACR y RTP con y sin la adición de atrazina, obteniéndose concentraciones de ADN de 25-40 ng. $\mu\text{L}^{-1}$ .

#### 1.3.1. Presencia de genes catabólicos de degradación de atrazina en el ADN de las comunidades bacterianas de los microcosmos

Otro aspecto analizado fue el potencial degradador de las poblaciones bacterianas nativas mediante la detección de los genes catabólicos específicos en dichos ambientes. En este estudio a partir del ADN total obtenido de los microcosmos se evaluó la presencia de los genes de las vías superior e inferior de degradación de atrazina (*atzABCDEF* y *trzN*).

Como se observa en la **Figura 27**, en ACR se observaron las señales de amplificación esperadas para los genes *trzN* (400 pb), *atzB* (300 pb) y *atzC* (200 pb) en las muestras tratadas con atrazina, a los 14 días de ensayo (T14). Se llevó a cabo además la amplificación de los genes *atzDEF* que codifican para enzimas de la vía inferior de degradación de atrazina. Sin embargo, luego de tres reacciones no se obtuvieron las señales de amplificación esperadas (*atzD*: 500 pb, *atzE*: 200 pb y *atzF*: 300 pb). Estos resultados coinciden con lo observado anteriormente y confirman la presencia en este ambiente de especies microbianas con capacidad para degradar atrazina que juegan un rol clave en la disipación de este contaminante. Estos resultados sugieren la ausencia de los genes de la vía catabólica inferior de degradación de atrazina en las comunidades microbianas presentes en dicho ambiente. Dado que en ACR se evidenció la mineralización de atrazina se postula que en este ecosistema podría haber otras enzimas involucradas en la degradación del ácido cianúrico a  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_3$ , como por ejemplo la enzima codificada por el gen *trzD* (no analizado en este estudio), así como también vías metabólicas alternativas. Por lo tanto, nuevos estudios serían necesarios para entender las bases moleculares implicadas en la mineralización del ácido cianúrico en estos ambientes.

Contrariamente, en RTP no se observaron los productos de amplificación de los genes estudiados durante todo el ensayo (28 días), lo cual confirmaría que en este ecosistema no existen microorganismos con vías catabólicas específicas o bien, dichos microorganismos se encuentran en bajo número en este ambiente.



**Figura 27.** Detección de genes de degradación de *s*-triazinas a partir de ADN de las comunidades microbianas de microcosmos de ACR. **MPM:** marcador de peso molecular. **Gen *trzN*.** Calles 1, 2, 3: T0 control; Calles 4, 5, 6: T14 atrazina; Calles 7, 8, 9: T14 control; Calle 10: *Pseudomonas* sp. ADP (control positivo). **Gen *atzB*.** Calles 11, 12, 13: T0 control; Calles 14, 15, 16: T14 atrazina; Calles 17, 18, 19: T14 control; Calle 20: *Pseudomonas* sp. ADP (control positivo). **Gen *atzC*.** Calles 21, 22, 23: T0 control; Calles 24, 25, 26: T14 atrazina; Calles 27, 28, 29: T14 control; Calle 30: *Arthrobacter* sp. SD (control positivo).

La detección de genes de degradación de *s*-triazinas ha sido utilizada en diferentes trabajos como indicador del potencial catabólico de los microorganismos presentes en el ambiente, y se relaciona con la capacidad de recuperación del mismo ante la llegada del herbicida. Iker y col. (2010) demostraron la presencia de los genes *atzABC* y *trzN* en suelos agrícolas y en sedimentos de acuíferos expuestos a atrazina. En un estudio realizado por Wan y col. (2014) en microcosmos de suelo se evidenció un aumento significativo en la abundancia relativa del gen *atzC* luego de 6 días de la adición de simazina. Sherchan y Bachoon (2011) y posteriormente, Sherchan y col. (2013) encontraron una correlación positiva entre el número de copias del gen *atzA* y la contaminación por atrazina existente en aguas costeras de Georgia y Puerto Rico. Udikovovic Kolic y col. (2008) encontraron una alta diversidad microbiana y presencia de los genes *trzN*, *atzB*, *atzC* y *trzD*, conjuntamente con una alta eficiencia la actividad degradadora de atrazina, en aguas de desecho de una planta de fabricación de agroquímicos que contenían en su composición diversos herbicidas *s*-triazinas.

### 1.3.2. Análisis de las comunidades bacterianas nativas mediante DGGE

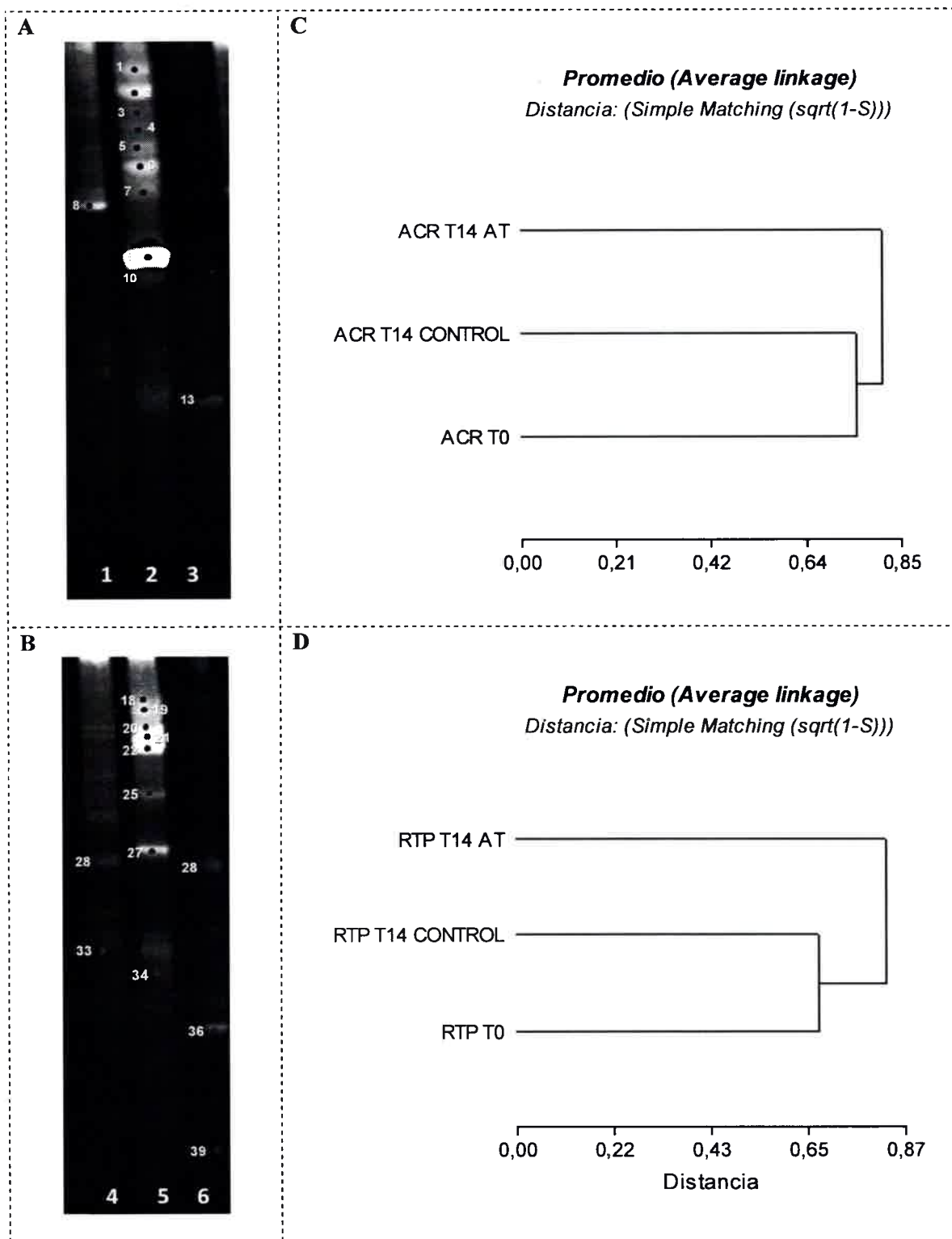
La habilidad de los microorganismos de responder rápidamente a los cambios ambientales y su elevada tasa reproductiva determina que se generen modificaciones en la composición microbiana de las comunidades microbianas nativas de ambientes impactados (Janniche y col., 2012; Morgante y col., 2012).

Considerando los resultados anteriormente descritos, se evaluó la estructura de las comunidades bacterianas presentes en los ecosistemas en estudio (ACR y RTP), usando como templado ADN de las comunidades microbianas y análisis de un fragmento interno del gen ARNr 16S mediante PCR-DGGE. Los perfiles fueron comparados con fragmentos amplificados a partir de ADN extraído directamente de muestras de agua de los microcosmos control, sin agregado de atrazina (T0 y T14 controles) (**Figura 28**). Los geles de DGGE obtenidos (**Figura 28A y 28B**) revelaron en general una baja resolución de las bandas debido posiblemente a las bajas concentraciones de ADN ( $25-40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) obtenidas a partir de las muestras de los microcosmos.

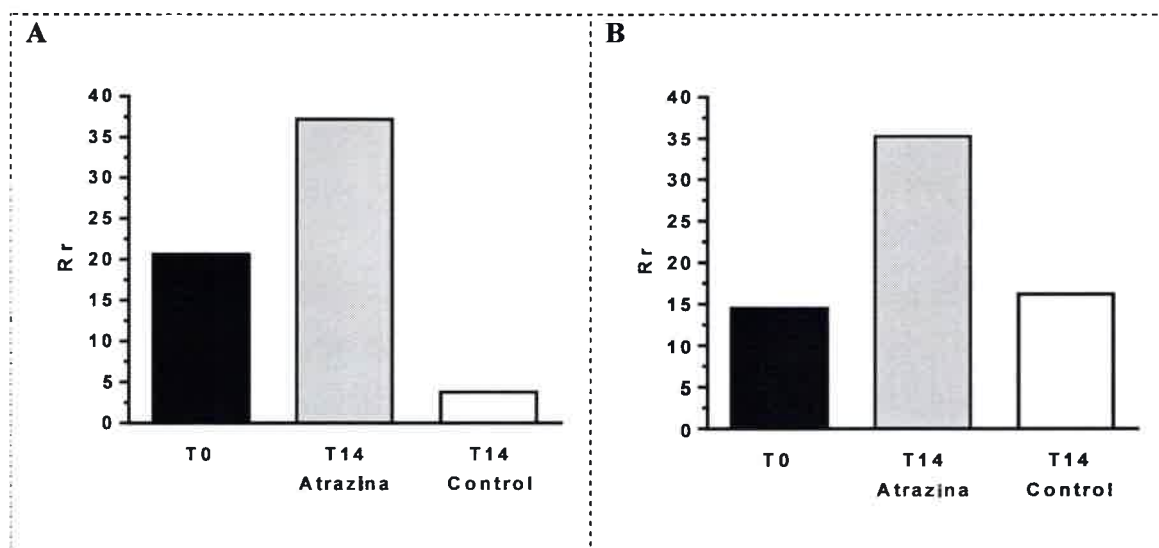
El análisis de conglomerados de los geles de los ecosistemas ACR y RTP (**Figura 28C y 28D**) mostró que las comunidades presentes en los controles T0 y T14 se agruparon entre sí mientras que en T14, los microcosmos tratados con atrazina se diferenciaron notablemente de los controles, demostrando que la adición del herbicida produjo modificaciones en las comunidades bacterianas.

Por otra parte, se analizó la estructura de las comunidades bacterianas en los microcosmos utilizando el parámetro de “Rango Ponderado de la Riqueza” (Rr) según Marzorati y col. (2008) (**Figura 29**).

El valor de Rr obtenido en el microcosmos de ACR fue de 20,6 al inicio del ensayo (T0). A los 14 días (T14) el Rr de los microcosmos con atrazina fue mayor (37,2) respecto de los controles (3,8). Llamativamente, en RTP se observó un comportamiento similar, con un aumento considerable del valor de Rr en los microcosmos suplementados con atrazina (35,3) respecto del control negativo (16,2) a los 14 días (T14). Los valores de Rr obtenidos al inicio del ensayo (T0) en ambos ecosistemas se encuentran dentro del rango de valores intermedios (entre 10 y 30) considerándose ambientes con una diversidad microbiana media (Marzorati y col., 2008).



**Figura 28. Geles de DGGE de los microcosmos. Referencias: A. Ecosistema ACR. Calles: 1. T0 Control, 2. T14 atrazina, 3. T14 Control. B. Ecosistema RTP. Calles: 4. T0 Control, 5. T14 atrazina, 6. T14 Control. Los números en el gel corresponden a las bandas secuenciadas. Análisis de conglomerados: C. Ecosistema ACR; D. Ecosistema RTP.**



**Figura 29.** Rango ponderado de la riqueza en los microcosmos impactados con atrazina. **A.** ACR, **B.** RTP.

Valores de Rr superiores a 30 son típicos de ambientes con una alta diversidad microbiana, lo cual se obtuvo en este estudio en las muestras enriquecidas con atrazina (T14 atrazina). Este marcado incremento en el valor de Rr a los 14 días, sugiere que la llegada del herbicida a estos ambientes contribuye a un aumento significativo (enriquecimiento) de taxones bacterianos no detectados en la muestra inicial, probablemente por encontrarse en muy bajo número, conduciendo a la aparición de nuevas bandas en el gel. Coincidentemente con otros autores, los cambios cualitativos o cuantitativos en las comunidades son indicadores del impacto que genera el herbicida en estos ambientes (Watanabe y Hamamura, 2003).

Resulta llamativo el incremento del valor de Rr obtenido en T14 atrazina en RTP, ya que en este ambiente no se produjo degradación del herbicida. Atrazina podría estar ejerciendo efecto citotóxico sobre algunos grupos microbianos, lo cual produciría una menor competencia por los nutrientes o incrementos del C libre, favoreciendo indirectamente el aumento de la diversidad bacteriana (Downing y col., 2014).

El número de bandas de DGGE está relacionado con el número de poblaciones presentes en la muestra. Sin embargo, no todas las poblaciones presentes *in situ* pueden ser recuperadas mediante análisis de PCR-DGGE (Detectabilidad). Muyzer y col. (1993) encontraron que la técnica de DGGE no pudo detectar poblaciones cuya abundancia es menor al 1% del recuento total de células, en ensayos con mezclas de cultivos puros y Casamayor y col. (2000) observaron un umbral similar en muestras naturales. De este

modo, la riqueza de especies o diversidad microbiana total en el sistema no puede ser determinado con precisión con este método y, probablemente, existen numerosas poblaciones que representan menos del 1% del total de células que no pueden ser recuperados por DGGE, siendo éste un patrón frecuente en las comunidades microbianas acuáticas.

De un total de 16 bandas obtenidas en ACR en las diferentes condiciones estudiadas, 11 pudieron ser recortadas del gel y reamplificadas. Sin embargo, sólo 9 secuencias fueron recuperadas y comparadas en las bases de datos BLAST y RDP con identidades de entre 95 y 100%. En las bandas que no pudieron ser identificadas el problema podría ser la presencia de diferentes secuencias en la misma posición o posiciones muy similares en el gel dando como resultado secuencias de baja pureza. De todas maneras, las 9 bandas resultantes del presente análisis generaron secuencias de elevada pureza, indicando que cada banda representaría una población microbiana diferente. Todas las bandas identificadas se clasificaron dentro del phylum Proteobacteria, siendo el 88,9% betaproteobacterias (bandas 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10, 13) y el 11,1% epsilonproteobacterias (banda 8). El género predominante dentro de las betaproteobacterias fue *Methylophilus* (77,8%) (bandas 3, 4, 5, 6, 7, 9, 10), que posee representantes tanto cultivables como no cultivables. Resulta llamativo que estas siete bandas presentaron alta identidad con el género *Methylophilus*, lo cual se relacionaría a la presencia de múltiples operones del gen ARNr 16S en una misma especie con diferentes comportamientos de migración en el gel de DGGE, o a que simplemente se trate de distintos representantes de este género. Los miembros del género *Methylophilus* son bacterias ambientales que han sido aisladas de lodos activados, sedimentos, ríos y estanques (Jenkins y col., 1987; Doronina y col., 2014) y se caracterizan por utilizar metanol como fuente de C para su crecimiento. Además, también se identificaron bandas con alta homología con el género *Arcobacter* (banda 8) y *Polynucleobacter* (banda 13). Los miembros del género *Arcobacter* se han aislado a partir de ambientes acuáticos marinos y de aguas residuales, mientras que el género *Polynucleobacter* corresponde a bacterias planctónicas características de lagos y ríos (Hahn y col., 2010; 2012). Al analizar el patrón de bandas en el ecosistema ACR se observó que las bandas 8 (identificada como *Arcobacter* sp.) y 14 (no identificada) estuvieron ausentes en los microcosmos adicionados con atrazina (T14 atrazina), pero presentes en el control, lo cual revela que estos taxones serían afectados negativamente ante la llegada del herbicida. Por el contrario, las bandas 4, 9 y 10 (identificadas como

*Methylophilus* sp.) y la banda 16 (no identificada) sólo fueron detectadas en T14 atrazina, por lo que las poblaciones de estos taxones bacterianos se estarían enriqueciendo a expensas del herbicida.

Entre las 22 bandas obtenidas en el ecosistema RTP, 13 fueron recortadas y reamplificadas. Entre éstas sólo 5 pudieron ser identificadas como pertenecientes a los phylum Bacteroidetes, clase Cytophagia (banda 25) y Proteobacterias, tanto alphaproteobacterias (bandas 28 y 36) como betaproteobacterias (bandas 27 y 39). Los géneros identificados fueron *Methylophilus* e *Hydrogenophaga*. Los representantes de este último género se caracterizan por ser oxidantes de hidrógeno y han sido aislados de aguas residuales y lodos activados (Kämpfer y col., 2005; Chung y col., 2007). La secuencia de nucleótidos de la banda 25 mostró alta homología (99%) con Flexibacteraceae no cultivable, que es un miembro aún no clasificado perteneciente a la familia Cytophagaceae. La banda 28 posee alta homología con bacterias no cultivables pertenecientes al cluster SAR11 (alpha proteobacteria) que en la actualidad tampoco se encuentran clasificadas. El patrón de bandas en el ecosistema RTP reveló que las bandas 24 (no identificada) y 28 (cluster SAR11) estuvieron ausentes en T14 atrazina, pero presentes en el control, sugiriendo un efecto negativo del herbicida sobre estos taxones. En contraposición, las bandas 19, 22, 23, 37, 38 (no identificadas) y la banda 27 (identificada como *Methylophilus* sp.) sólo fueron detectadas en T14 atrazina, por lo que estas poblaciones bacterianas se estarían enriqueciendo ante la adición del herbicida.

En general, las secuencias obtenidas tuvieron alta homología con secuencias correspondientes a bacterias no cultivables disponibles en las bases de datos, lo que demuestra la importancia del empleo de métodos independientes de cultivo en estudios de ecología microbiana.

A pesar de que la técnica de PCR-DGGE presenta ciertas limitaciones, permite el seguimiento de cambios en la estructura de las comunidades microbianas ante la llegada de atrazina así como la identificación de los taxones microbianos dominantes dentro de las muestras. Los resultados obtenidos demuestran que atrazina produce un efecto diferencial sobre las comunidades bacterianas nativas de los ecosistemas acuáticos ACR y RTP, generando cambios en su composición. Estos resultados sientan bases para futuros estudios con técnicas más sensibles (como FISH, bibliotecas genómicas, entre otras) para estudios de diversidad.

El conocimiento de la ecología microbiana de ambientes acuáticos contaminados con atrazina ayuda a comprender la toxicidad residual del contaminante, la capacidad de recuperación de ambientes acuáticos en agroecosistemas impactados por la llegada del herbicida y a predecir comportamientos futuros. Los recursos hídricos superficiales son ambientes muy diferentes al suelo y a los sedimentos ya que, entre otros factores, poseen menor densidad microbiana y el comportamiento de los microorganismos es diferente por tratarse de sistemas dinámicos (Schulz 2004). Numerosos estudios evalúan el efecto de los herbicidas *s*-triazinas sobre las comunidades microbianas del suelo, considerando la biomasa microbiana, la abundancia de microorganismos degradadores y de genes catabólicos específicos (Rhine y col., 2003; Devers y col., 2004, 2007; Dinamarca y col., 2007; Morgante y col., 2009). Se han realizado además algunos estudios tendientes a evaluar el impacto de la aplicación de estos compuestos sobre las comunidades microbianas de aguas subterráneas (De Liphay y col., 2003; Caracciolo y col., 2010; Janniche y col., 2012; Iker y col., 2010) y en cursos superficiales de las comunidades presentes en biofilms (Dorigo y col., 2009; Tien y col., 2013) y sedimentos (Douglass y col., 2015). Sin embargo, existen escasos estudios que evalúen el impacto de las *s*-triazinas sobre las comunidades microbianas planctónicas en sistemas lóticos, como los estudiados en este trabajo (Pesce y col., 2008).



## CONCLUSIONES

- En sistemas acuáticos como ACR, la microbiota nativa presenta la capacidad de transformar y utilizar atrazina como fuente de nutrientes, produciendo la degradación del herbicida y su atenuación natural en dicho ecosistema. La detección de los genes catabólicos de degradación de atrazina *trzN* y *atzBC* evidencia el potencial de metabolizar el herbicida de los microorganismos nativos, demostrando la capacidad de recuperación de este ambiente.
- En el ecosistema RTP no se produjo la degradación del herbicida probablemente debido a la ausencia de microorganismos con capacidad de metabolizarlo o bien, a que dichos microorganismos se encuentran en muy bajo número y/o a que las condiciones ambientales no son las adecuadas para que ocurra la degradación.
- La adición de atrazina en los microcosmos de ACR y RTP produjo cambios en la estructura de las comunidades bacterianas de ambos ambientes, evidenciado por incrementos en la riqueza de taxones bacterianos que probablemente se encontraban en muy bajo número en la muestra inicial.

# *Capítulo 5*

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE  
BACTERIAS DEGRADADORAS DE ATRAZINA**

---

## AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE BACTERIAS DEGRADADORAS DE ATRAZINA

### 1. Mecanismos enzimáticos de degradación de atrazina

En las últimas décadas la presencia de bacterias capaces de metabolizar herbicidas clorados ha recibido especial atención, dado que resultaría de un proceso de evolución de poblaciones microbianas autóctonas que se han adaptado a la presencia de estos contaminantes. Los microorganismos, ya sea en forma individual o en consorcios, pueden transformar o degradar compuestos siguiendo vías metabólicas que implican transformaciones paso a paso. La introducción de atrazina ha llevado a que se produzcan adaptaciones metabólicas en los microorganismos expuestos como respuesta a la presión de selección. Se han descrito numerosas especies bacterianas (tanto grampositivas como gramnegativas) con capacidad de utilizarla como sustrato (fuente de C y/o N) para su crecimiento (Udiković-Kolić y col., 2012). Entre éstas, *Pseudomonas* sp. ADP ha sido el modelo bacteriano empleado para el estudio de la vía metabólica de degradación de s-triazinas y su regulación. La misma consiste en dos vías catabólicas, una superior y una inferior, cuyos genes *atzABCDEF* están localizados en el plásmido pADP-1 (Figura 30) (Martínez y col., 2001).

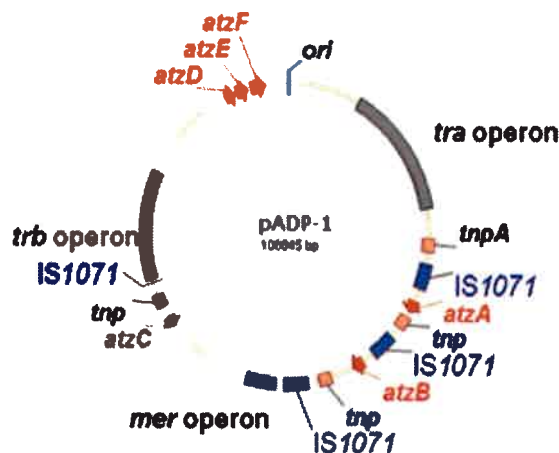


Figura 30. Mapa físico del plásmido pADP-1 que contiene a los genes *atz* responsables de la degradación de atrazina (Martínez y col., 2001).

Las enzimas codificadas por estos genes catalizan seis hidrólisis sucesivas: una declorinación, dos dealquilaciones, el clivaje del anillo, la deaminación de biuret y una hidrólisis de alofanato (**Figura 31**). Así, la vía catabólica superior convierte atrazina en ácido cianúrico, y las enzimas responsables de estas transformaciones son codificadas por los genes *atzA*, *atzB* y *atzC* (Mandelbaum y col., 1995; De Souza y col., 1996; 1998b; Boundy-Mills y col., 1997; Sadowsky y col., 1998). Se ha descrito además una hidrolasa inicial diferente a *AtzA*, pero con idéntica función, denominada *TrzN*, principalmente en bacterias grampositivas, tales como *Arthrobacter aurescens* TC1, *Nocardioides* sp. C190, *Nocardioides* sp. SP12 (Topp y col., 2000a; Piutti y col., 2003; Sajjaphan y col., 2004; Smith y col., 2005). No obstante, su presencia también ha sido demostrada en géneros gramnegativos como *Sinorhizobium* y *Polaromonas* (Devers y col., 2007a). Así, la declorinación de atrazina resulta de la actividad de *AtzA* (atrazina clorohidrolasa) o *TrzN* (triazina hidrolasa), ambas amidohidrolasas, que producen hidroxiatrazina (HA). Es conocido que *AtzA* y *TrzN* exhiben diferencias en sus rangos de sustratos: *AtzA* se restringe a la hidrólisis de compuestos *s*-triazinas, mientras que *TrzN* hidroliza grupos radicales (-OCH<sub>3</sub>, -SCH<sub>3</sub>, -Cl, -F, -CN) tanto de *s*-triazinas como de pirimidinas (De Souza y col., 1996; Seffernick y col., 2000; 2002; Strong y col., 2002; Shapir y col., 2005a, 2006b). Posteriormente, la HA es transformada en N-etilamelida o N-isopropilamelida por la remoción hidrolítica de los grupos laterales N-isopropilo o N-etilo. Luego, la conversión a N-isopropilamelida es catalizada por *AtzB* (hidroxiatrazina hidrolasa) (Boundy-Mills y col., 1997) que también es capaz de catalizar la deaminación hidrolítica de N-etilamelida a ácido cianúrico (Smith y col., 2005), un intermediario común en el catabolismo de *s*-triazinas (Cook, 1987). Sin embargo, N-isopropilamelida es convertida en ácido cianúrico y N-isopropilamina por la enzima *AtzC* (N-isopropilamelida hidrolasa) (Sadowsky y col., 1998). Estos intermediarios liberados del anillo *s*-triazínico por *AtzB* y *AtzC* pueden ser usados como fuentes de C, N y/o energía para el crecimiento bacteriano del propio microorganismo o de otros presentes en dicho ambiente (De Souza y col., 1998a; Strong y col., 2002; Kolić y col., 2007).

La vía inferior es llevada a cabo por tres enzimas codificadas por los genes *atzD*, *atzE* y *atzF* (Strong y col., 2002) y conduce a la mineralización final del ácido cianúrico a CO<sub>2</sub> y NH<sub>3</sub>. Comienza con el clivaje del anillo en el ácido cianúrico catalizado por la enzima ácido cianúrico hidrolasa (*AtzD*) resultando en la formación del intermediario inestable biuret carboxilato, el cual se descompone espontáneamente en biuret y CO<sub>2</sub> (Seffernick y

col., 2012). Alternativamente, se ha descrito el gen *trzD*, con función homóloga al gen *atzD*, que codifica una enzima responsable de la ruptura del anillo *s*-triazina del ácido cianúrico, en diversos géneros bacterianos degradadores de *s*-triazinas tales como *Pseudomonas*, *Chelatobacter*, *Aminobacter*, *Acidovorax*, *Klebsiella*, *Alcaligenes* y *Ralstonia* (Karns y col., 1999; Rousseaux y col., 2001; Fruchey y col., 2003; Devers y col., 2007a). El biuret es seguidamente hidrolizado por la biuret hidrolasa (AtzE) a alofanato (Martinez y col., 2001; Cheng y col., 2005) y esta deaminación libera amonio, el cual puede ser utilizado por las bacterias como fuente de N para su crecimiento. Finalmente, la alofanato hidrolasa (AtzF) produce CO<sub>2</sub> y NH<sub>4</sub> a partir del alofanato (Martinez y col., 2001; Cheng y col., 2005; Shapir y col., 2005b; 2006a).

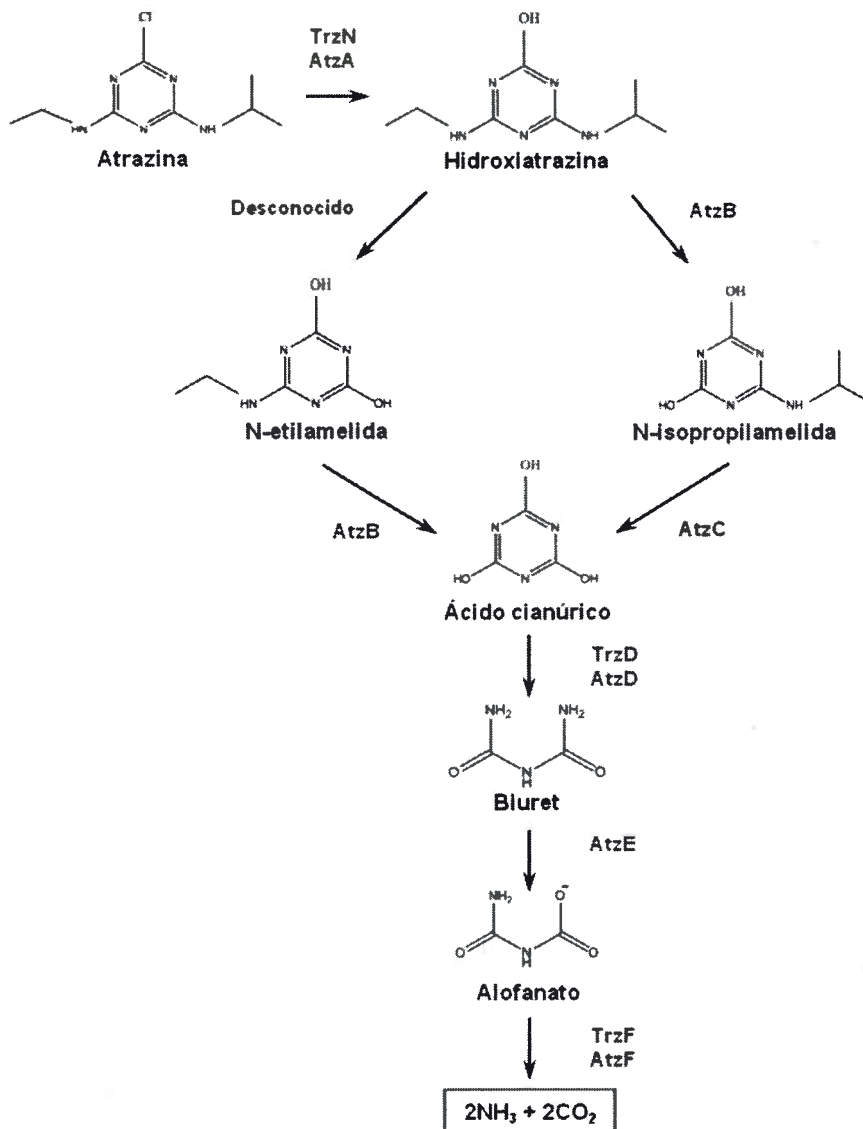


Figura 31. Vía enzimática de degradación de atrazina (Adaptado de Udiković-Kolić y col., 2012).

Las comparaciones entre las cepas degradadoras conocidas revelan una considerable heterogeneidad en la organización y ubicación de estos genes catabólicos en el genoma. Así, estos pueden estar localizados en: a) en un único plásmido (Piutti y col., 2003; Aislabie y col., 2005; Devers y col., 2007a); b) en varios plásmidos de tamaño variable en un mismo huésped (Topp y col., 2000b.; Rousseaux y col., 2002; Devers y col., 2007a); c) ocasionalmente en el cromosoma bacteriano (Cai y col., 2003; Devers y col., 2007a; 2007b; Vaishampayan y col., 2007).

Dado que recién a partir de la década del 90' se aislaron e identificaron bacterias con capacidad para mineralizar *s*-triazinas, Udiković-Kolić y col. (2012) plantean la hipótesis de que las vías metabólicas para el catabolismo de dichos compuestos se ensamblaron recientemente y que algunas actividades enzimáticas, tales como la declorinación de la atrazina, probablemente se desarrollaron posteriormente a la introducción de la atrazina en el ambiente. Los genes catabólicos de degradación de triazinas se encuentran altamente conservados (De Souza y col., 1998b; Topp y col., 2000b; Rousseaux y col., 2001) lo que demuestra que su aparición es reciente y que se habrían diseminado entre los diversos géneros microbianos mediante mecanismos de transferencia horizontal (De Souza y col., 1998a; 1998b; Seffernick y Wackett, 2001; Shapir y col., 2007). Las bacterias capaces de degradar atrazina se encuentran actualmente distribuidas en todo el mundo.

## 2. Especies bacterianas degradadoras de atrazina

Los primeros aislamientos bacterianos con capacidad de utilizar *s*-triazinas reportados por Cook y Hütter (1981) fueron obtenidos de aguas residuales y suelos de Suiza, e identificados como *Pseudomonas* sp. (cepas A, D y F) y *Klebsiella pneumoniae* cepas 90 y 99. Años más tarde, Yanze-Kontchou y Gschwind (1994) obtuvieron el aislamiento *Pseudomonas* sp. YAYA6, el primero capaz de mineralizar atrazina y utilizarla como única fuente de C para el crecimiento. Un año después, Mandelbaum y col. (1995) aislaron de suelos de EE.UU. con historia previa de aplicación de herbicidas *s*-triazinas a la bacteria *Pseudomonas* sp. ADP capaz de crecer con atrazina como única fuente de C y N. Este aislamiento ha sido el modelo bacteriano empleado en estudios de degradación de *s*-triazinas y en la caracterización del mecanismo enzimático de mineralización de atrazina

(Mandelbaum y col., 1995; De Souza y col., 1995, 1996; Boundy-Mills y col., 1997; Sadowsky y col., 1998; Martínez y col., 2001).

Desde entonces, numerosos aislamientos bacterianos capaces de degradar *s*-triazinas, ya sea de forma total o parcial, pertenecientes a grupos filogenéticamente diversos han sido aislados en todo el mundo. Entre los géneros bacterianos más representativos se encuentran *Pseudomonas*, *Arthrobacter*, *Chelatobacter*, *Agrobacterium*, *Rhodococcus*, *Stenotrophomonas*, *Pseudaminobacter* y *Nocardiodes* entre otros (Yanze- Kontchou y Gschwind, 1994; Topp y col., 2000 a, b; Rousseaux y col., 2001; Hernández y col., 2008). En la **Tabla 15** se presentan los principales aislamientos descritos hasta la actualidad conjuntamente con sus productos de degradación y los genes catabólicos específicos.

Existen diversos factores que influyen en la eficiencia del proceso de biodegradación. El efecto de los compuestos nitrogenados en la regulación de la vía catabólica de atrazina ha sido objeto de numerosos estudios (García-González y col., 2005). La adición de N externo ha demostrado un efecto negativo en la degradación de atrazina en la mayoría de las bacterias estudiadas (García-González y col., 2003). La alta salinidad del agua afectó la degradación de atrazina en una comunidad bacteriana de aguas residuales industriales (Udikovic y col., 2003). La eficiencia de degradación de atrazina tanto en presencia de O<sub>2</sub> como en anaerobiosis no mostró diferencias en ambas condiciones, por lo que el O<sub>2</sub> no influiría en el metabolismo de este herbicida en los casos estudiados hasta el presente (Mandelbaum y col., 1995).

Los residuos de herbicidas poseen una distribución muy ubicua pudiendo encontrarse en diferentes compartimentos del ambiente, por lo cual estos sitios contaminados son los más apropiados para el aislamiento de microorganismos tolerantes y con capacidad para degradarlos (Ortiz-Hernández y col., 2001). Si bien existe una gran diversidad de aislamientos degradadores de atrazina obtenidos en todo el mundo, la mayoría de ellos han sido aislados a partir de suelos agrícolas con historia previa de aplicación de atrazina (Cook y Hütter, 1981; Mandelbaum y col., 1995; Rousseaux y col., 2001; Piutti y col., 2003; Devers y col., 2007a; Vibber y col., 2007; Hernández y col., 2008; Fernández y col., 2013) y sólo algunos a partir de aguas de efluentes de industrias de fabricación de agroquímicos (De Souza y col. 1998b; Cai y col., 2003; Cheng y col. 2005; Yang y col., 2010; Qingyan y col., 2008).

**Tabla 15.** Principales aislamientos bacterianos degradadores de atrazina descritos hasta la actualidad.

Identificación	Producto final de degradación	Genes detectados	Origen	Referencias
<i>Gramnegativas</i>				
<i>Pseudomonas</i> sp. (A, D y F)	CO <sub>2</sub>	ND	Suelo (Suiza)	Cook y Huter, 1981
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (90, 99)	CO <sub>2</sub>	ND	Suelo (Suiza)	Cook y Huter, 1981
<i>Pseudomonas</i> sp. YAYA6	CO <sub>2</sub>	<i>atzA</i>	Suelo (Suiza)	Yanze-Kontchou y Gschwind, 1994.
<i>Ralstonia brasiliensis</i> M91-3	CO <sub>2</sub>	<i>atzABC</i> , <i>trzD</i>	Suelo (EE.UU.)	Radosevich y col., 1995 De Souza y col., 1998b
<i>Pseudomonas</i> sp. ADP	CO <sub>2</sub>	<i>atzABCDEF</i>	Suelo (EE.UU.)	Mandelbaum y col., 1995
<i>Rhizobium</i> sp. PATR	Hidroxiatrazina	<i>atzA</i>	Suelo (Francia)	Bouquard y col., 1997
<i>Alcaligenes</i> sp. SG1	CO <sub>2</sub>	<i>atzABC</i> , <i>trzD</i>	Desechos industriales(EE.UU.)	De Souza y col., 1998b; Cheng y col., 2005
<i>Pseudaminobacter</i> sp. C147	CO <sub>2</sub>	<i>atzABC</i>	Suelo (Canadá)	Topp y col., 2000b
<i>Pseudaminobacter</i> sp. C150	Hidroxiatrazina	<i>atzAC</i>	Suelo (Canadá)	Topp y col., 2000b
<i>Chelatobacter heintzi</i> Cit1	CO <sub>2</sub>	<i>atzABC</i> , <i>trzD</i>	Suelo (Francia)	Rousseaux y col., 2001
<i>Chelatobacter heintzi</i> Sal1	Hidroxiatrazina	<i>atzA</i>	Suelo (Francia)	Rousseaux y col., 2001
<i>Aminobacter aminovorans</i>	CO <sub>2</sub>	<i>atzC</i> , <i>trzD</i>	Suelo (Francia)	Rousseaux y col., 2001
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Hidroxiatrazina	<i>atzA</i>	Suelo (Francia)	Rousseaux y col., 2001
<i>Sinorhizobium</i> sp. NEA-B	Ácido cianúrico	<i>trzN</i> , <i>atzBC</i>	Suelo (Francia)	Devers y col., 2007a
<i>Polaromonas</i> sp. NEA-C	Ácido cianúrico	<i>trzN</i> , <i>atzBC</i>	Suelo (Francia)	Devers y col., 2007a
<i>Pseudomonas</i> sp. MHP41	CO <sub>2</sub>	<i>atzABCDEF</i>	Suelo (Chile)	Hernández y col., 2008
<i>Klebsiella ornithinolytica</i> ND2	ND	<i>atzA</i>	Suelo (EE.UU.)	Siripattanakul y col., 2009
<i>Agrobacterium</i> sp. NEA-D	CO <sub>2</sub>	<i>atzABCDEF</i>	Suelo (Francia)	Devers y col., 2007a
<i>Agrobacterium tumefaciens</i> ND4	ND	<i>atzA</i>	Suelo (EE.UU.)	Siripattanakul y col., 2009
<i>Agrobacterium radiobacter</i> J14a	CO <sub>2</sub>	<i>atzABCDEF</i>	Suelo (EE.UU.)	Struthers y col., 1998; De Souza y col., 1998b; Cheng y col., 2005
<i>Agrobacterium</i> sp. NEA-D	CO <sub>2</sub>	<i>atzABCDEF</i>	Suelo (Francia)	Devers y col. 2007a
<i>Ancylobacter</i> sp. T10A11	ND	<i>atzABCDEF</i>	Suelo (Colombia)	Arbeli y Fuentes, 2010
<i>Comamonas testosterone</i> A2	CO <sub>2</sub>	<i>atzABCDEF</i>	Aguas residuales (China)	Yang y col., 2010



<i>Grampositivas</i>				
<i>Clavibacter michiganese</i> ATZ1	N-etilamelida	<i>atzABC</i>	Suelo (EE.UU.)	Alvey y Crowley, 1996; De Souza y col., 1998a
<i>Nocardioides</i> sp. C190	N-etilamelida	<i>trzN</i>	Suelo (Canadá)	Topp y col., 2000a
<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> Cit2	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (Francia)	Rousseaux y col., 2001
<i>Arthrobacter aurescens</i> TC1	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (EE.UU.)	Strong y col., 2002
<i>Nocardioides</i> sp. SP12	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (Francia)	Piutti y col., 2003
<i>Arthrobacter</i> sp. AD1	ND	<i>atzA</i>	Aguas residuales (China)	Cai y col., 2003
<i>Nocardia</i> sp.	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzC</i>	Suelo (EE.UU.)	Smith y col., 2005
<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> HIM	Ácido cianúrico	<i>atzABC</i>	Suelo (Nueva Zelanda)	Aislabie y col., 2005
<i>Nocardioides panacihumi</i>	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzC</i>	Suelo (EE.UU.)	Vibber y col., 2007
<i>Nocardioides kribbensis</i> CMU5	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (EE.UU.)	Vibber y col., 2007
<i>Arthrobacter</i> sp. CMU6	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzC</i>	Suelo (EE.UU.)	Vibber y col., 2007
<i>Arthrobacter</i> sp. MCM B-436	Biuret	<i>trzN, atzABCD</i>	Suelo (India)	Vaishampayan y col., 2007
<i>Arthrobacter</i> sp. AG1	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (China)	Xian-Zhu y col., 2007
<i>Nocardioides</i> sp. 1D	Hidroxiatrazina	<i>trzN</i>	Suelo (Croacia)	Devers y col. 2007a
<i>Nocardioides</i> sp. NEA-A	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (Francia)	Devers y col. 2007a
<i>Arthrobacter</i> sp. 3A; 2B	Hidroxiatrazina	<i>trzN</i>	Suelo (Croacia)	Devers y col. 2007a
<i>Arthrobacter</i> sp. AD26	ND	<i>trzN, atzBC</i>	Aguas residuales (China)	Li y col., 2008
<i>Nocardioides</i> sp. AN3	ND	<i>trzN</i>	Suelo (Japón)	Yamazaki y col., 2008
<i>Nocardioides</i> sp. MTD22	ND	<i>trzN</i>	Suelo (Japón)	Yamazaki y col., 2008
<i>Nocardioides</i> sp. C1S	ND	<i>trzN, atzCDEF</i>	Suelo (Colombia)	Arbeli y Fuentes, 2010
<i>Nocardioides</i> sp. V3A16	ND	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (Colombia)	Arbeli y Fuentes, 2010
<i>Arthrobacter</i> sp. T12B12	ND	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (Colombia)	Arbeli y Fuentes, 2010
<i>Arthrobacter</i> sp. DNS10	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (China)	Zhang y col., 2011
<i>Arthrobacter</i> sp. TES6	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (Egipto)	El Sebai y col., 2011
<i>Arthrobacter</i> sp. (FD, MD, SD)	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (Argentina)	Fernández y col., 2013
<i>Arthrobacter</i> sp. AK-YN10	Ácido cianúrico	<i>trzN, atzBC</i>	Suelo (India)	Sagarkar y col., 2016
<i>Arthrobacter</i> sp. C3	Hidroxiatrazina	<i>trzN</i>	Suelo (China)	Wang y col., 2016

Referencia. ND: no detectado.

Dado que los resultados previos demuestran la llegada y persistencia de atrazina en cuerpos de agua del centro-sur de Córdoba (ríos, arroyos y lagunas), resulta relevante el aislamiento de bacterias nativas adaptadas al herbicida y con capacidad de utilizarlo como fuente de nutrientes. Dichos microorganismos ofrecerían ventajas adaptativas frente a la introducción de bacterias aisladas de otros ambientes (exógenas) para la recuperación de ecosistemas acuáticos impactados por atrazina, permitiendo a la vez el desarrollo de innovadoras estrategias de biorremediación.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

El aislamiento de bacterias nativas adaptadas a las condiciones ambientales de la región y capaces de metabolizar eficientemente herbicidas *s*-triazinas, resulta de utilidad para la decontaminación de ecosistemas acuáticos mediante el diseño de nuevas estrategias de biorremediación.

## **OBJETIVO GENERAL**

Seleccionar especies bacterianas nativas aisladas de cursos de aguas superficiales y eficientes en la degradación de atrazina, para su futura aplicación en procesos de biorremediación de ambientes acuáticos contaminados.

### **Objetivos específicos**

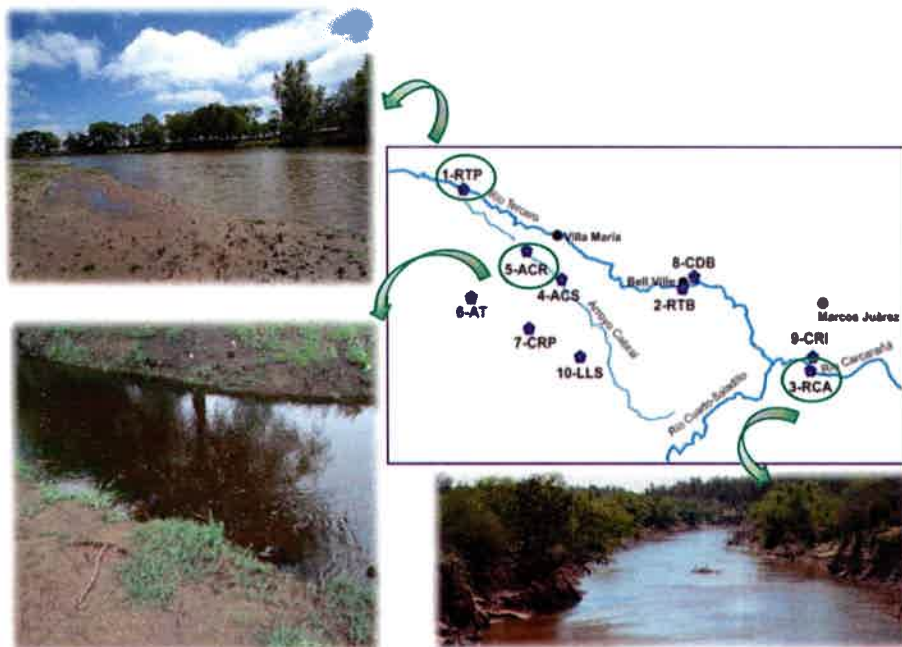
- ✓ Aislar bacterias degradadoras de atrazina a partir de muestras de aguas superficiales de la región agrícola centro-sur de Córdoba.
- ✓ Realizar la caracterización fenotípica y genotípica de los aislamientos degradadores de atrazina.
- ✓ Detectar la presencia de genes catabólicos específicos en el genoma de las mismas.
- ✓ Determinar la eficiencia de las bacterias en la biodegradación del herbicida.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Aislamientos nativos de agua superficial potencialmente degradadores de s-triazinas

En los ambientes acuáticos, las comunidades microbianas son dinámicas y están conformadas por una diversidad de especies capaces de tolerar o degradar xenobióticos. La exposición continua de estas comunidades a contaminantes ha llevado a que se produzcan adaptaciones en el metabolismo microbiano, posibilitando que algunos géneros bacterianos adquieran la capacidad de utilizarlos como fuentes de nutrientes para el crecimiento, conduciendo de esta manera a su biodegradación.

Dado que en los cuerpos de aguas superficiales de agroecosistemas de Córdoba la atrazina aparece como principal contaminante en sucesivos monitoreos (2011-2015), se decidió entonces aislar bacterias nativas potencialmente degradadoras de atrazina de diferentes ambientes de la región en estudio. El enriquecimiento selectivo se realizó a partir de muestras de agua de los sitios ACR, RTP y RCA (**Figura 32**), en ensayos independientes, en medio mínimo M9 suplementado con atrazina ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como factor de selección.



**Figura 32.** Cursos de agua dulce de la provincia de Córdoba a partir de los cuales se realizó el aislamiento de bacterias nativas potencialmente degradadoras de atrazina.

Se obtuvieron 45 colonias diferentes, de las cuales el 64,4% correspondió a bacterias gramnegativas y 35,6% a grampositivas. Entre las bacterias gramnegativas el 76% resultó oxidasa positiva.

Entre los aislamientos de la colección, sólo cuatro (AAC1, AAC19, AAC22 y AAC24) fueron tolerantes a mayores concentraciones de atrazina ( $100\text{-}300\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en medio M9 sólido. Los mismos fueron seleccionados para su identificación taxonómica mediante la amplificación y secuenciación del gen ARNr 16S.

### 1.1. Identificación taxonómica de los aislamientos nativos tolerantes a atrazina

Los métodos moleculares son elegidos cada vez más frecuentemente para la caracterización de organismos procariontes, ya que actualmente pueden realizarse de manera rápida y ofrecen un alto nivel de resolución. La amplificación por PCR y posterior secuenciación de genes que codifican para el ARN ribosomal (ARNr) se considera actualmente el marcador molecular más importante en taxonomía (Kampfer y Glaeser, 2012)

Como se describió anteriormente, entre los 45 aislamientos obtenidos los denominados AAC1, AAC19, AAC22 y AAC24 procedentes del sitio ACR fueron tolerantes a altas concentraciones de atrazina (hasta  $300\ \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en placas, por lo que fueron seleccionados para su identificación taxonómica. La identificación a nivel de género se realizó a partir de la utilidad Classifier de la base de datos del RDP y para conocer la especie más relacionada se empleó la utilidad SeqMatch de la misma base de datos. En **Tabla 16** se muestran los resultados de la identificación molecular de estos aislamientos.

Según la utilidad Classifier de la base de datos RDP todos los aislamientos estudiados (AAC1, AAC19, AAC22 y AAC24) pertenecieron al dominio Bacteria, sin embargo tres de estos (AAC1, AAC19 y AAC24) fueron clasificados dentro del phylum Proteobacteria. El aislamiento AAC1 fue clasificado como perteneciente a la clase Alphaproteobacteria, orden Sphingomonadales, familia Sphingomonadaceae, género *Sphingobium* con alta probabilidad de corresponder a la especie *S. yanoikuyae* (99,8% de similitud según EzBioCloud). AAC19 fue clasificado como perteneciente a la clase Alphaproteobacteria, orden Rhizobiales, familia Rhizobiaceae, género *Rhizobium* con alta probabilidad de corresponder a la especie *R. radiobacter*. Finalmente, el aislamiento AAC24 fue

clasificado como perteneciente a la clase Gammaproteobacteria, orden Pseudomonadales, familia Pseudomonadaceae, género *Pseudomonas* altamente relacionada con *P. stutzeri*.

**Tabla 16.** Identificación taxonómica de aislamientos bacterianos tolerantes a atrazina

Aislamiento	Long. de la secuencia (pb)	Grupo filogenético	Identificación taxonómica	Especie más relacionada (Nº de Acceso)	Identidad (%)
AAC1	1348	Alphaproteobacteria	<i>Sphingobium</i> sp.	<i>Sphingobium yanoikuyae</i> (GIFU 9882; D16145)	99,8
AAC19	1346	Alphaproteobacteria	<i>Rhizobium</i> sp.	<i>Rhizobium radiobacter</i> (IAM 12048; AB247615)	100
AAC22	1394	Actinobacteria	<i>Arthrobacter</i> sp.	<i>Arthrobacter ureafaciens</i> . (X80744)	99,8
AAC24	1379	Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Pseudomonas stutzeri</i> (ATCC 17588; CP002881)	99

Numerosos trabajos describen la presencia de bacterias del género *Sphingobium* como parte de la microbiota acuática (Tokajian y Hashwa, 2004), y existen antecedentes de bacterias de este género con capacidad para degradar xenobióticos como fenoles (Ushiba y col., 2003; Inoue y col., 2008) o hidrocarburos policíclicos aromáticos (Cunliffe y col., 2006). En particular, el aislamiento de suelo *Sphingomonas yanokoikuyae*, que forma parte de un consorcio, posee los genes específicos de degradación de atrazina *atzC* y *trzD*, por lo que desempeña un importante rol en la disipación de este compuesto (Smith y col., 2005).

La identificación de bacterias del género *Rhizobium* con capacidad de degradar atrazina ha sido reportada por otros autores. Así, la cepa *Rhizobium* sp. PATR aislada por Bouquard y col. (1997) de suelos agrícolas de Francia evidenció la capacidad para realizar la declorinación inicial de la molécula (gen *atzA*), mientras que el aislamiento *Rhizobium* sp. (Smith y col., 2005) mineraliza esta molécula dado que posee la combinación de genes *atzBC* y *trzD* de las vías superior e inferior, respectivamente, de degradación del herbicida.

Dada su amplia distribución en el ambiente, numerosos trabajos destacan la habilidad de diferentes especies de *Pseudomonas* de crecer y degradar una gran variedad de

contaminantes como por ejemplo herbicidas *s*-triazinas. Se ha documentado la degradación total o parcial de estos compuestos tanto en ecosistemas acuáticos (López y col., 2005; Udikovick kolic y col., 2008) como en suelos (Udikovick kolic y col., 2007, Hernández y col, 2008). Particularmente, las cepas de *Pseudomonas* sp. A, D y F (Cook y Huter 1981), *Pseudomonas* sp. YAYA6 (Yanze-Kontchou y Gschwind, 1994), *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum y col., 1995) y *Pseudomonas* sp. MHP41 (Hernández y col., 2008) entre otras, demostraron ser eficientes en la degradación de estos herbicidas.

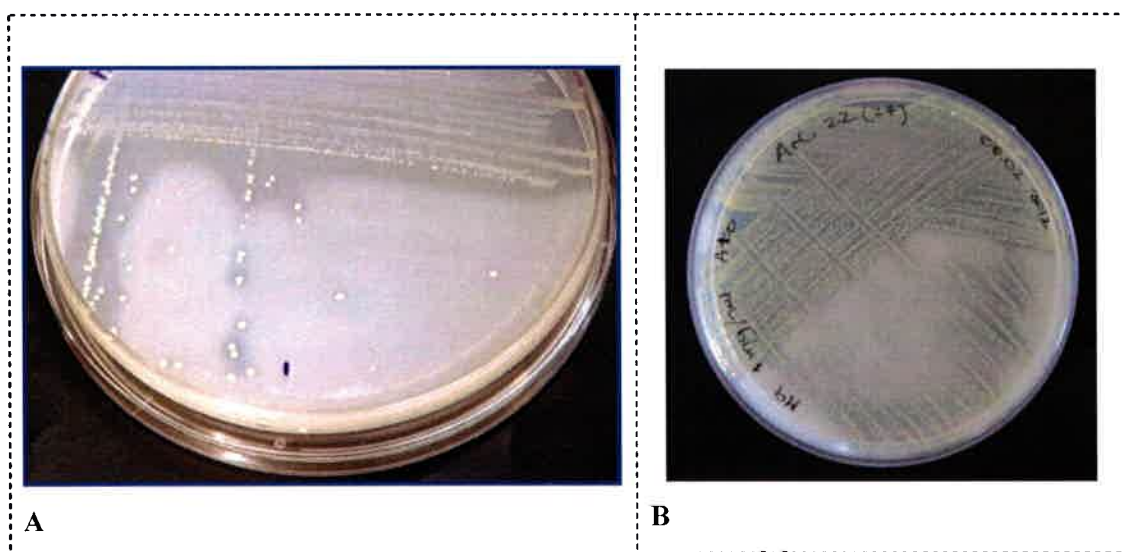
Finalmente, los resultados obtenidos permitieron clasificar al aislamiento AAC22 como perteneciente al phylum Actinobacteria, clase Actinobacteria, orden Actinomycetales, familia Micrococcaceae, género *Arthrobacter* con alta probabilidad de pertenecer a la especie *A. ureafaciens*. La secuencia de nucleótidos del gen ARNr 16S de la cepa AAC22 fue depositada en la base de datos del EMBL bajo el N° acceso: KT591504. En adelante dicho aislamiento se denominará *Arthrobacter* sp. AAC22. Dicho aislamiento presenta un alto porcentaje de similitud de secuencia con *Arthrobacter ureafaciens* (X80744).

Los miembros del género *Arthrobacter* están ampliamente distribuidos en el ambiente y juegan un importante rol en la remoción de una gran variedad de contaminantes orgánicos como hidrocarburos aromáticos (Keddie y col., 1986; Narancic y col., 2012), fenantrenos (Keuth y Rehm, 1991), compuestos nitroaromáticos (Kotouckova y col., 1997; 2004), fenoles y clorofenoles (Westerberg y col., 2000) o herbicidas (Tixier y col., 2002; Shareef y col., 2014). La capacidad de diferentes especies de *Arthrobacter* para utilizar herbicidas *s*-triazinas como fuente de N ha sido documentada en aislamientos de suelo (Rousseaux y col., 2002; Strong y col., 2002; Aislabie y col., 2005; Getenga y col., 2009; Sajjaphan y col., 2010; Fernández y col., 2013). Sin embargo, sólo unos pocos aislamientos de este género han sido obtenidos a partir de muestras de agua (Cai y col., 2003; Li y col., 2008).

## 2. Características fenotípicas del aislamiento nativo *Arthrobacter* sp. AAC22

### 2.1. Tolerancia a altas concentraciones de atrazina

La capacidad de las bacterias para degradar *s*-triazinas sobre una matriz sólida puede ser fácilmente detectada mediante la aparición de zonas claras (translúcidas) alrededor del crecimiento bacteriano, en contraste con un fondo blanco opaco (dado por la presencia de atrazina) correspondiendo a halos de degradación (Mandelbaum y col., 1995). Estos halos no se producen en colonias bacterianas incapaces de degradar este herbicida. Entre la colección de aislamientos obtenidos, sólo la cepa identificada como *Arthrobacter* sp. AAC22 evidenció halos translúcidos de degradación alrededor de las colonias en placas de medio mínimo M9 suplementadas con atrazina ( $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como única fuente de N (Figura 33).



**Figura 33.** Halos de degradación de atrazina por el aislamiento AAC22 en medio mínimo M9 sólido. A.  $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ; B.  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .

Se ensayó luego la tolerancia de AAC22 a mayores concentraciones de atrazina ( $500$  y  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en placas de medio mínimo M9, y en todas las condiciones fue posible visualizar los halos de degradación. Su elevada tolerancia al herbicida sería comparable con la observada en las mismas condiciones de cultivo en la cepa de referencia *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum y col., 1995) considerada como el principal



aislamiento capaz de metabolizar atrazina en concentraciones que exceden la solubilidad del compuesto en agua.

Es de destacar que *Arthrobacter* sp. AAC22 proviene de una muestra de agua colectada de agua superficial del Arroyo Cabral, Córdoba (ACR) cuyo curso atraviesa zonas agrícolas donde se aplica herbicidas. En dicho ambiente, la concentración media de atrazina es de  $0,25 \mu\text{g.L}^{-1}$  en primavera y de  $0,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  en otoño, con frecuencias de detección del 100% y del 33,3% respectivamente. Paralelamente, en los ensayos en microcosmos se observó la degradación de atrazina, evidenciando la capacidad de la microbiota nativa de remover atrazina. Esta capacidad podría ser atribuida a la presencia de bacterias del género *Arthrobacter* en el curso de agua. Resulta llamativo que los mismos no fueron detectados en el ensayo de DGGE, sin embargo, dado que el agua es un sistema dinámico, la principal fuente de microorganismos en ambientes acuáticos son los sedimentos, aspecto que no ha sido abordado en este estudio.

## 2.2. Características morfológicas y fisiológicas

El aislamiento AAC22 es un bacilo grampositivo, catalasa y oxidasa positivo, no móvil, capaz de crecer con atrazina como única fuente de C y N. En medio mínimo M9 forma colonias redondas y cremosas, de aprox. 3 mm de diámetro y color amarillo pálido (Figura 34).



**Figura 34.** Morfología de las colonias del aislamiento AAC22 visualizadas bajo lupa (x2).

Se evaluaron las características bioquímicas de la cepa AAC22 mediante la utilización del sistema comercial API 20NE (bioMérieux, Francia). Los perfiles de coloración de las galerías fueron interpretados siguiendo las indicaciones del fabricante y los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 17**. Los resultados obtenidos evidencian la capacidad del aislamiento AAC22 de utilizar múltiples fuentes de carbono, dado que puede asimilar azúcares (glucosa, manitol y maltosa), ácidos (málico y cítrico) aunque no fermenta la glucosa. Por otra parte, produce las enzimas  $\beta$ -glucosidasa y  $\beta$ -galactosidasa y reduce nitratos.

**Tabla 17.** Caracterización bioquímica del aislamiento AAC22 (Sistema API 20NE).

<b>Característica</b>	<b>Resultado</b>
<b>Producción de enzimas</b>	
Arginina Dihidrolasa	-
Ureasa	-
$\beta$ -glucosidasa (Hidrólisis de esculina)	+
Proteasa (Hidrólisis de gelatina)	-
$\beta$ -galactosidasa	+
<b>Asimilación de azúcares</b>	
Glucosa	+
Arabinosa	-
Manosa	-
Manitol	+
N-Acetil-Glucosamina	-
Maltosa	+
Gluconato potásico	-
<b>Asimilación de ácidos</b>	
Ácido cáprico	-
Ácido adípico	-
Ácido málico	+
Ácido cítrico	+
Ácido fenilacético	-
Reducción de nitratos (NO <sub>3</sub> )	+
Producción de indol	-
Fermentación de D-glucosa	-

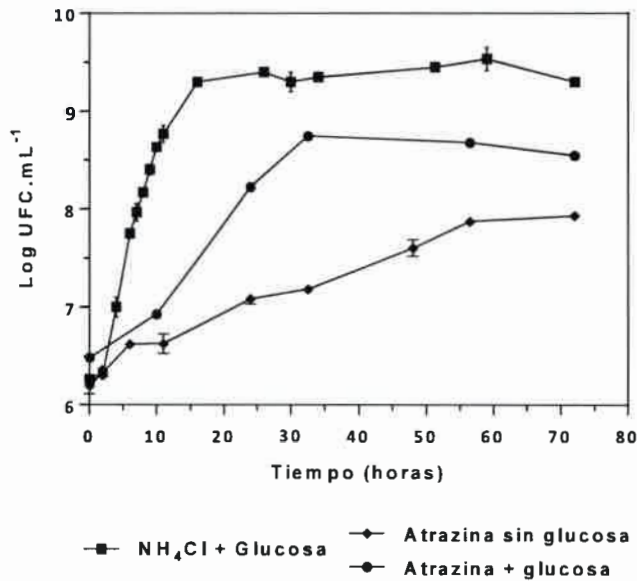
**Referencia:** (+) reacción positiva, (-) reacción negativa

Dado que el sistema API 20NE ha sido diseñado para la identificación de bacilos y cocobacilos gramnegativos no enterobacterias, especialmente de origen clínico, también resultan de utilidad para caracterizar bacterias de origen ambiental, ya que aportan datos sobre propiedades bioquímicas de las mismas. Aunque este sistema no permitió la identificación del aislamiento AAC22, los resultados de las pruebas metabólicas son coincidentes con las descriptas para el género *Arthrobacter* (Crocker y col., 2000).

### 2.3. Efecto de diferentes condiciones de cultivo sobre el crecimiento de AAC22

Si bien las bacterias del género *Arthrobacter* son sumamente versátiles y ubiucas, existen diferentes parámetros nutricionales y ambientales que pueden afectar el crecimiento y la actividad catabólica de las mismas. Los efectos de algunas de esas variables se describen a continuación.

Se evaluó la cinética de crecimiento de AAC22 en medio mínimo M9 con diferentes fuentes de N o C y a diferentes valores de pH. Las curvas de crecimiento se muestran en las **Figura 35** y **Figura 36** mientras que los respectivos valores de las constantes de velocidad de crecimiento ( $\mu$ ) y de biomasa final para cada condición se presentan en la **tabla 18**.



**Figura 35.** Curvas de crecimiento del aislamiento *Arthrobacter* sp. AAC22 con diferentes fuentes de N.

Se observó que cuando AAC22 crece con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  y glucosa como fuente de N y C, respectivamente, la velocidad de crecimiento es máxima y alcanza una elevada biomasa final. Con atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como única fuente de N, la velocidad de crecimiento es notablemente inferior con respecto al  $\text{NH}_4$  debido a la mayor complejidad del sustrato, obteniéndose una biomasa final sólo medio orden inferior.

**Tabla 18.** Constantes de velocidad de crecimiento de *Arthrobacter* sp. AAC22 en diferentes condiciones de cultivo.

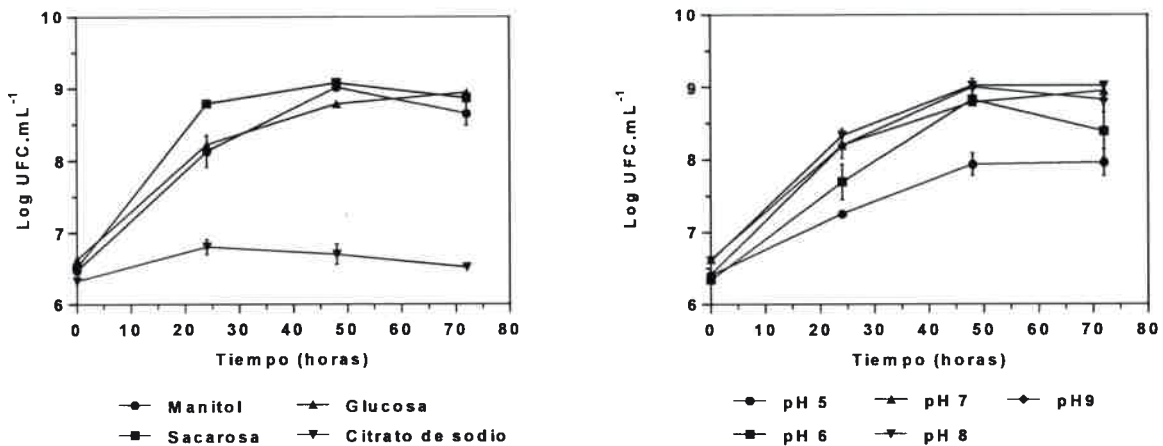
Condiciones de cultivo		$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )	Biomasa final (UFC.mL <sup>-1</sup> )
Fuente de N	Fuente de C		
$\text{NH}_4\text{Cl}$	Glucosa	0,27	$2,5 \times 10^9$
Atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )		0,08	$7,0 \times 10^8$
Atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )	0,03	$1,6 \times 10^8$
Atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ )	Manitol	0,07	$5,3 \times 10^8$
	Sacarosa	0,09	$7,6 \times 10^8$
	Citrato de sodio	0,02	$3,7 \times 10^6$

Por otra parte, el aislamiento AAC22 también sería capaz de crecer con atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como única fuente de C y N, alcanzando una menor velocidad de crecimiento y encontrándose la biomasa final dentro del mismo orden que cuando se adiciona glucosa como fuente de C alternativa. Tanto el C como el N serían aportados por los radicales presentes en el anillo *s*-triazínico. Como se puede observar en las curvas de crecimiento, con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  como fuente de N la población alcanza la fase estacionaria aproximadamente a las 15 h, mientras que cuando la fuente de N es atrazina alcanza esta fase a partir de las 30 h de cultivo. Estudios previos demostraron que el C presente en el anillo *s*-triazina no puede ser utilizado por todas las bacterias como fuente de energía. Sin embargo, el C de los grupos alquilo representa un importante aporte de C para el crecimiento bacteriano. Por otra parte, bajas concentraciones de atrazina no pueden soportar el crecimiento bacteriano y, en tales casos, resulta necesario suplementar con una fuente de C adicional (Dehghani y col., 2013).

Se observó que *Arthrobacter* sp. AAC22 fue capaz de utilizar glucosa, manitol o sacarosa como fuentes de C, con atrazina ( $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) como fuente de N. Con los tres azúcares se obtuvieron biombras finales del orden de  $1 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> y velocidades de crecimiento óptimas (**Figura 36 A y Tabla 18**). Sin embargo cuando se adicionó citrato de sodio como fuente de C, AAC22 mostró una baja velocidad de crecimiento

significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) a la obtenida con los otros tres azúcares y alcanzando una menor biomasa final.

El estudio del crecimiento de *Arthrobacter* sp. AAC22 con otros nutrientes resulta de importancia, ya que la presencia de sustratos adicionales podría iniciar el metabolismo de xenobióticos como la atrazina. La capacidad de diferentes aislamientos de *Arthrobacter* sp. para crecer con diferentes fuentes de C también ha sido estudiada por otros autores. Así, las cepas *Arthrobacter* sp. AD1 (Cai y col., 2003), *Arthrobacter* sp. AD26 (Li y col., 2008) y *Arthrobacter* sp. SD, MD y FD (Fernández y col., 2013) fueron capaces de utilizar sacarosa y citrato de sodio como fuentes de C, mientras que *Arthrobacter* sp. SD3-25 (Guo y col., 2014) utilizó eficientemente sacarosa y glucosa como fuentes de C.



**Figura 36.** Curvas de crecimiento del aislamiento *Arthrobacter* sp. AAC22 en diferentes condiciones de cultivo. **A.** Fuentes de C. **B.** pH.

El pH es un factor variable en el ambiente, siendo a la vez una característica importante a considerar en el diseño de estrategias de biorremediación. Por lo tanto, resulta necesario evaluar la supervivencia de *Arthrobacter* sp. AAC22 en diferentes valores de pH. Así, el aislamiento fue capaz de crecer en todos los valores de pH ensayados (pH 5-9) (**Figura 36 B, Tabla 19**). No obstante, a pH 5 la biomasa bacteriana final fue significativamente menor ( $p < 0,05$ ), a la vez que se comprobó un leve incremento (aunque no significativo) de la biomasa final y de la velocidad de crecimiento a medida que se incrementaba el pH del medio.

**Tabla 19.** Constantes de velocidad de crecimiento de *Arthrobacter* sp. AAC22 a diferentes valores de pH.

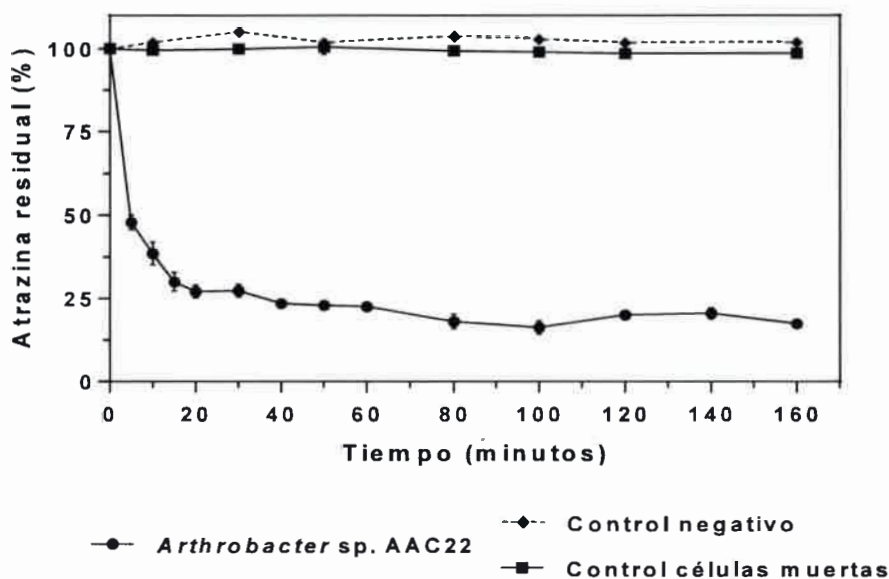
Condición de cultivo	$\mu$ (h <sup>-1</sup> )	Biomasa final (UFC.mL <sup>-1</sup> )
Valores de pH		
pH 5	0,04	9,9x10 <sup>7</sup>
pH 6	0,06	3,4x10 <sup>8</sup>
pH 7	0,08	8,8x10 <sup>8</sup>
pH 8	0,07	2,1x10 <sup>9</sup>
pH 9	0,07	7,0x10 <sup>8</sup>

Estos resultados concuerdan con los reportados para otras cepas del género *Arthrobacter* descritas en la bibliografía. Wang y col. (2011) reportaron que el rango de pH óptimo para el crecimiento y degradación de atrazina de *Arthrobacter* sp. HB5 fue entre 6 y 9, mientras que para *Arthrobacter* sp. DAT1 dicho rango fue más amplio (pH 5–10) (Wang y Xie, 2012). Al igual que en esos trabajos, el amplio rango de pH en el que es capaz de crecer *Arthrobacter* sp. AAC22 en medios suplementados con atrazina indican su habilidad para crecer en ambientes ligeramente ácidos o alcalinos.

## 2.4. Eficiencia del aislamiento AAC22 en la biodegradación de atrazina

### 2.4.1. Ensayos de resting-cell

Los ensayos de resting-cell han sido ampliamente utilizados para evaluar la eficiencia de diferentes especies bacterianas para degradar herbicidas s-triazinas (García-González y col., 2003; Hernández y col., 2008). Los mismos consisten en realizar un cultivo bacteriano con una fuente de N simple y luego enfrentarlos a otra fuente de N compleja, como la atrazina, para evaluar si tienen la capacidad de utilizarlo como fuente de N. Los ensayos realizados en este estudio (**Figura 37**) demuestran que *Arthrobacter* sp. AAC22 es capaz de degradar el 75% de la concentración inicial de atrazina en los primeros 60 min del ensayo, alcanzando el 80% de degradación a los 80 min.



**Figura 37.** Eficiencia de degradación de atrazina por *Arthrobacter* sp. AAC22 en ensayos de resting-cell.

Estudios similares revelaron que *Pseudomonas* sp. MHP41 es capaz de degradar el 80% de simazina (herbicida *s*-triazina) en 60 min (Hernández y col., 2008) mientras que *Pseudaminobacter* sp. C147 degradó el 75% de atrazina en el mismo tiempo (Topp y col., 2000b). La cepa de referencia *Pseudomonas* sp. ADP mineraliza la totalidad de atrazina ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) en 150 min (Mandelbaum y col., 1995). Sin embargo, no se han reportado en la bibliografía ensayos de resting-cell para bacterias del género *Arthrobacter*.

El análisis de los sobrenadantes del ensayo de resting-cell mediante MEKC demostró la desaparición total de la atrazina (100%) presente en el medio con la consecuente aparición de ácido cianúrico (**Figura 38**), único subproducto de degradación del herbicida.

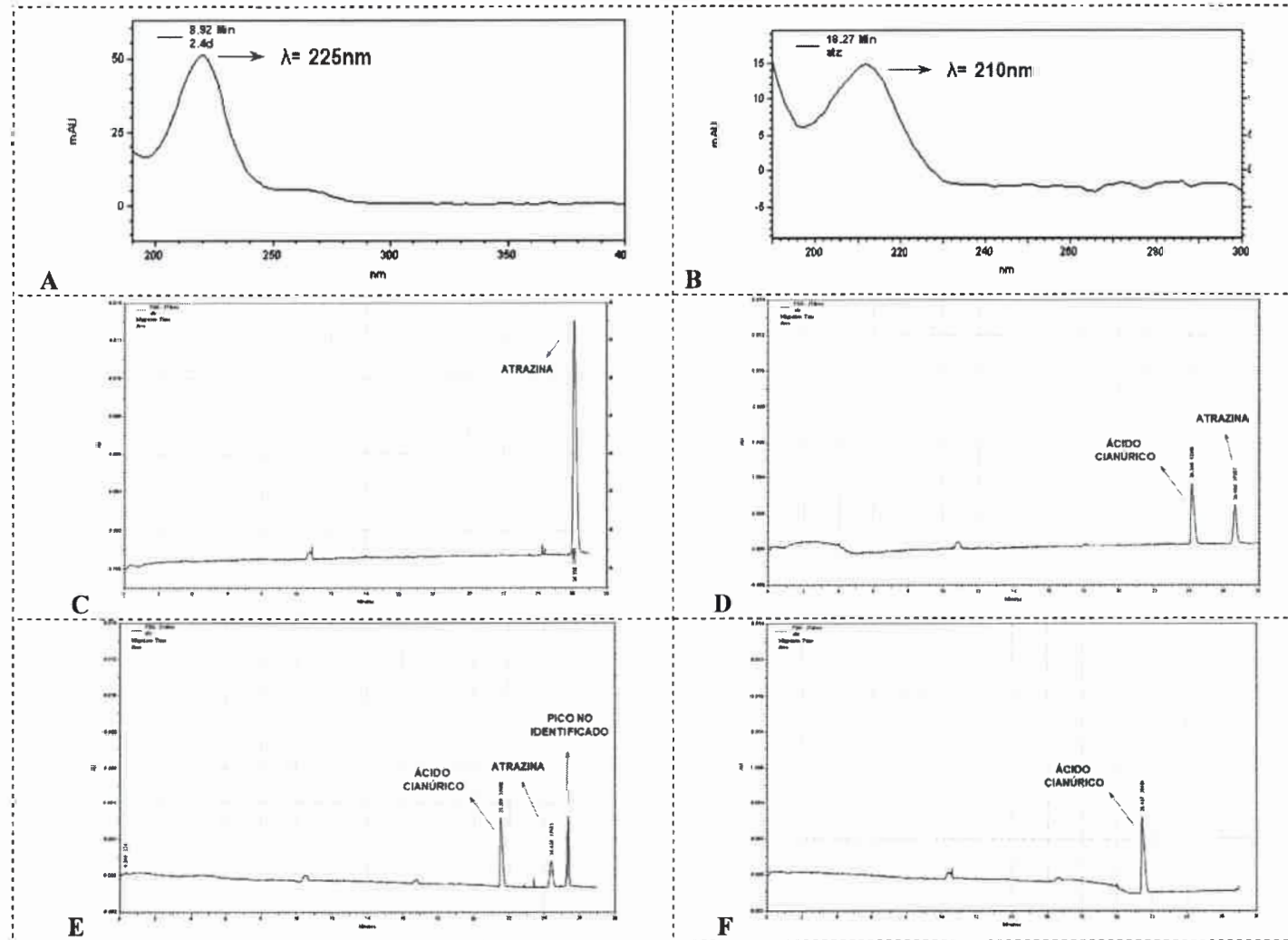
De este modo el 20% de la concentración residual detectada mediante espectrofotometría UV-vis (**Figura 37**) corresponde al intermediario ácido cianúrico, lo cual evidenciaría que *Arthrobacter* sp. AAC22 es capaz de degradar el 100 % de la atrazina. Diferentes autores describen la degradación parcial de esta molécula con la aparición de ácido cianúrico como intermediario catabólico para el género *Arthrobacter*. En particular, *Arthrobacter aurescens* TC1 (Strong y col., 2002), *Arthrobacter nicotinovorans* HIM (Aislable y col., 2005) y *Arthrobacter* sp. AD26 (Zhu y col., 2009)

constituyen las especies bacterianas reportadas en la bibliografía que acumulan como metabolito principal de degradación dicho intermediario.

Se ha propuesto que por tratarse de un anillo sin sustituyentes clorados, el ácido cianúrico es de fácil degradación en el ambiente pudiendo ser utilizado como fuente de N por diversas bacterias (Cook y col., 1985; Mandelbaum y col., 1995; Topp y col., 2000b; Rousseaux y col., 2001; Hernández y col., 2008) o bien degradado mediante enzimas peroxidasa extracelulares sintetizadas por hongos (Zeyer y col., 1981, Reddy, 1995). Las reacciones de apertura hidrolítica de amidas cíclicas, como el anillo *s*-triazina, son catalizadas por enzimas que se encuentran muy extendidas en el mundo biológico (Fruchey y col., 2003; Udikovic kolic y col., 2008). En este contexto, el metabolismo microbiano del ácido cianúrico se encuentra ampliamente difundido en el ambiente.

A diferencia de los herbicidas *s*-triazinas como la atrazina, que son sustancias químicas producidas por el hombre, el ácido cianúrico ha sido descrito como un producto natural presente en el suelo. Wise y Walters (1917) detectaron este compuesto previo al inicio de la aplicación de *s*-triazinas por las prácticas agrícolas en la década del 50', lo cual confirma la presencia natural del compuesto, aunque su origen en el suelo es desconocido (Fruchey y col., 2003). Por otra parte, el ácido cianúrico es un compuesto utilizado desde la década del 50' en aguas de piletas de natación para disminuir la fotólisis de compuestos clorados. Desde entonces, se han realizado estudios a fin de evaluar su toxicidad, demostrando que no sería mutagénico (Hammond y col., 1985) ni tampoco sería teratogénico ni fetotóxico en conejos y ratas (Wheeler y col., 1985). Conjuntamente, el ácido cianúrico mostró ser eliminado fácilmente del cuerpo por orina sin sufrir modificaciones luego de su ingesta por vía oral, tanto en animales como en humanos (Allen y col., 1982). Si bien a partir de la década del 80' los estudios sobre los efectos tóxicos de este compuesto han sido escasos, existe un margen sustancial de seguridad frente a la exposición humana a este compuesto.

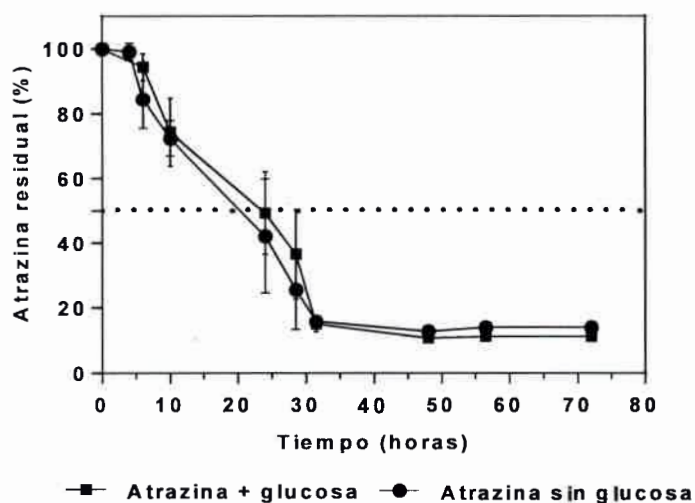




**Figura 38.** Análisis de la degradación de atrazina por *Arthrobacter* sp. AAC22 en ensayos de resting-cell. **A.** Espectro de absorción de atrazina, **B.** Espectro de absorción de ácido cianúrico. Electroferogramas de sobrenadantes de Resting-cell: **C.** 0 min, **D.** 5 min, **E.** 10 min, **F.** 60 min.

### 2.4.2. Cinética de degradación de atrazina en cultivos líquidos

Se decidió estudiar la cinética de degradación de atrazina del aislamiento nativo AAC22 en cultivos en medio mínimo M9 con atrazina (**Figura 39**) durante 72 h.



**Figura 39.** Cinética de degradación de atrazina por *Arthrobacter* sp. AAC22 en medio mínimo M9.

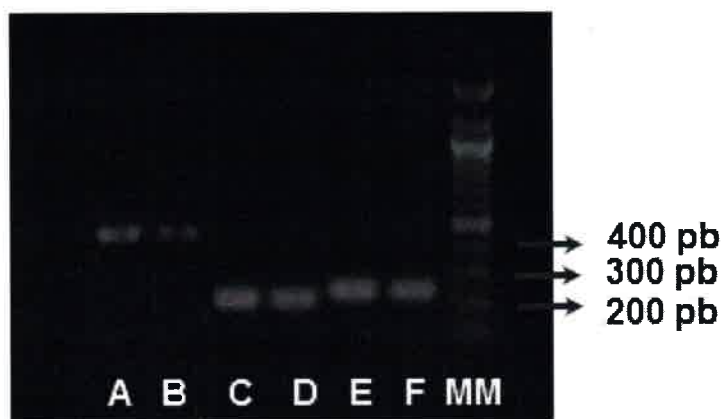
En este ensayo, la  $T_{0,5}$  de atrazina fue de 20 h en presencia de glucosa y atrazina como fuentes de C y N, respectivamente, en tanto que con atrazina como única fuente de C y N fue de 24 h, coincidiendo en ambos casos con cultivos en fase exponencial (**Figura 35**). El análisis de los sobrenadantes mediante MEKC demostró la remoción de la totalidad de la atrazina adicionada luego de 35 h, con la consecuente aparición de ácido cianúrico, producto de la vía superior de degradación de atrazina, coincidiendo con los resultados previos. Según Cai y col. (2003), el aislamiento *Arthrobacter* sp. AD1 fue capaz de crecer y degradar atrazina ( $300 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) como única fuente de N, en cultivos de medio mínimo, con una alta eficiencia (99%) luego de 48 h de cultivo.

### 3. Genes catabólicos de degradación de atrazina en el aislamiento AAC22

Dada la capacidad de metabolizar atrazina de *Arthrobacter* sp. AAC22 observada en los ensayos bioquímicos previos se decidió estudiar la presencia de genes específicos en el

genoma de este microorganismo. Se realizó la amplificación por PCR de los genes *atzABCDEF* y *trzND* empleando cebadores específicos (De Souza y col., 1998b; Mulbry y col., 2002; Rousseaux y col., 2001; Devers y col., 2004) a partir de ADN total y plasmídico según se detalla en la sección 11.6.3, capítulo 2.

Se obtuvieron los fragmentos de amplificación esperadas para los genes *atzB* (300 pb) y *atzC* (200 pb) de la vía catabólica superior de degradación de *s*-triazinas (**Figura 40**). Sin embargo, no se observó la señal de amplificación del gen *atzA*, por lo cual se decidió evaluar la presencia del gen *trzN* cuyo producto posee una función enzimática homóloga a la enzima AtzA. En este caso se obtuvo un fragmento de 400 pb (**Figura 40**) indicando la presencia del gen *trzN*. Se emplearon como controles positivos *Arthrobacter* sp. SD (Fernández y col., 2013) para el gen *trzN* y *Pseudomonas* sp. ADP (Mandelbaum y col., 1995) para los genes *atzABCDEF*.



**Figura 40.** Amplificación por PCR de los genes de degradación de *s*-triazinas en *Arthrobacter* sp. AAC22. Referencias. *trzN*: **A.** AAC22; **B.** *Arthrobacter* sp. SD (control positivo). *atzB*: **C.** AAC22; **D.** *Pseudomonas* sp. ADP (control positivo); *atzC*: **E.** AAC22; **F.** *Pseudomonas* sp. ADP (control positivo). **MM.** Marcador de Peso Molecular.

Los productos de amplificación fueron purificados, secuenciados y analizados en base a su porcentaje de similitud con otras secuencias disponibles en la base de datos del NCBI. Como se puede observar en la **Tabla 20**, en todos los casos se comprobó una alta homología (>99%) con secuencias de genes específicos de la vía de degradación de *s*-triazinas disponibles en dicha base de datos.

**Tabla 20.** Porcentajes de identidad de las secuencias de los genes *trzN*, *atzB* y *atzC* de *Arthrobacter* sp. AAC22 con secuencias disponibles en la base de datos (NCBI).

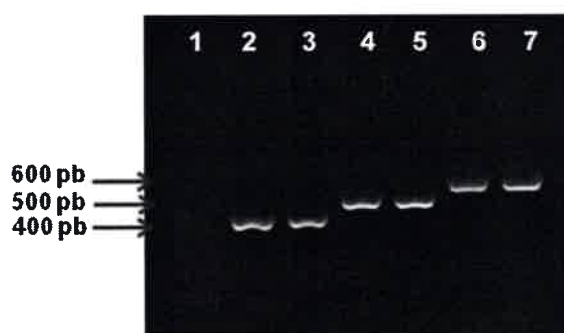
Producto de amplificación	Especie bacteriana relacionada/ proteína de función conocida	Identidad (%)	Nº de acceso
<i>trzN</i>	<i>Arthrobacter</i> sp. AK_YN10 Gen de triazina hidrolasa ( <i>trzN</i> )	100	<a href="#">HE716868.1</a>
	<i>Arthrobacter</i> sp. T3AB1 Gen de triazina hidrolasa ( <i>trzN</i> )	99	<a href="#">AY456696.1</a>
	<i>Pseudomonas</i> sp. AD39 Gen de triazina hidrolasa ( <i>trzN</i> )	100	<a href="#">FJ161692.1</a>
<i>atzB</i>	<i>Arthrobacter</i> sp. T3AB1 Gen de Hidroxiatrazina hidrolasa ( <i>atzB</i> )	99	<a href="#">EU621846.1</a>
	<i>Arthrobacter nicotinovorans</i> HIM Gen de Hidroxiatrazina hidrolasa ( <i>atzB</i> )	99	<a href="#">AY650036.1</a>
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> MHP41 Gen de Hidroxiatrazina hidrolasa ( <i>atzB</i> )	99	<a href="#">FN568346.1</a>
<i>atzC</i>	<i>Arthrobacter crystallopoietes</i> Cit2 Gen de N-isopropilammelida isopropilamino hidrolasa ( <i>atzC</i> )	100	<a href="#">AF364905.1</a>
	<i>Arthrobacter</i> sp. AD26 Gen de N-isopropilammelida isopropilamino hidrolasa ( <i>atzC</i> ),	99	<a href="#">EU621847.1</a>
	<i>Pseudomonas nitroreducens</i> MHP41 Gen de N-isopropilammelida isopropilamino hidrolasa ( <i>atzC</i> )	99	<a href="#">FN568347.1</a>

La capacidad catabólica para degradar atrazina del aislamiento *Arthrobacter* sp. AAC22 se debe a que posee la combinación de los genes *trzN-atzB-atzC*, correspondientes a la vía superior. No se observaron las señales de amplificación esperadas para los genes *atzD*, que codifica para la enzima ácido cianúrico hidrolasa, ni para *atzE* y *atzF*. La ausencia de los genes de la vía catabólica inferior en el aislamiento AAC22 es consistente con la degradación parcial de atrazina y la consecuente acumulación de ácido cianúrico en los cultivos durante su crecimiento con el herbicida. Estos resultados coinciden con la bibliografía, dado que no se han reportado bacterias del género *Arthrobacter* con capacidad para romper el anillo *s*-triazina, siendo el ácido cianúrico el principal producto intermediario de degradación parcial de atrazina.

En general es conocido que las bacterias grampositivas combinan en su vía catabólica enzimas codificadas por los genes *trzN*, *atzB* y *atzC* y degradan el herbicida a ácido cianúrico sin mineralizar el anillo *s*-triazina (Vibber y col., 2007; Zhu y col., 2009; Arbeli

y Fuentes, 2010). Esta combinación de genes ha sido descrita en diferentes aislamientos del género *Arthrobacter* (Rousseaux y col., 2001; Strong y col., 2002; Xian-Zhu y col., 2007; Li y col., 2008; El Sebai y col., 2012; Fernández y col., 2013) y además en especies del género *Nocardioides* (Piutti y col., 2003; Vibber y col., 2007; Devers y col., 2007a) y *Clavibacter michiganense* (Alvey y Crowley, 1996; De Souza y col., 1998a). En general, en los aislamientos bacterianos que poseen el gen *trzN* no se encuentran los genes *atzDEF* (Piutti y col., 2003; Devers y col., 2007a; Vibber y col., 2007; Fernández y col., 2013). Sin embargo, Arbeli y Fuentes (2010) aislaron la cepa *Nocardioides* sp. C1S de suelos con historia previa de aplicación de atrazina, con capacidad para mineralizar atrazina dado que presenta el gen *trzN* y los genes de la vía inferior de degradación de atrazina.

La presencia de genes de degradación con secuencias de nucleótidos semejantes en diversos géneros bacterianos sugiere que la transferencia horizontal mediada por plásmidos y/o elementos transponibles es el proceso involucrado en la diseminación de los genes de degradación de herbicidas *s*-triazinas. En el presente trabajo se analizó además la presencia de dichos genes en ADN plasmídico mediante amplificación por PCR empleando cebadores específicos (De Souza y col., 1998b; Mulbry y col., 2002; Rousseaux y col., 2001; Devers y col., 2004). Nuevamente, se obtuvieron las señales de amplificación esperadas tanto para *trzN* como para *atzBC* (Figura 41).



**Figura 41.** Amplificación por PCR de los genes de degradación de *s*-triazinas a partir de ADN plasmídico de *Arthrobacter* sp. AAC22. **Referencias:** 1. Marcador de Peso Molecular; 2. *trzN* AAC22; 3. *trzN* *Arthrobacter* sp. SD; 4. *atzB* AAC22; 5. *atzB* *Pseudomonas* sp. ADP; 6. *atzC* AAC22; 7. *atzC* *Pseudomonas* sp. ADP.

En conjunto, los resultados obtenidos revelan que la combinación de los genes *trzN*-*atzB*-*atzC* pertenecientes a la vía superior de degradación de *s*-triazinas se localizan en el ADN plasmídico de *Arthrobacter* sp. AAC22. En general se ha demostrado que los genes de degradación de *s*-triazinas se localizan en plásmidos autotransmisibles (Martinez y col.,

2001; Devers y col., 2007a) que permiten su distribución mediante transferencia horizontal (Devers y col., 2004, Devers y col., 2007b, Vaishampayan y col., 2007). Así, *Pseudomonas* sp. ADP posee los seis genes catabólicos: *atzA*, *atzB*, y *atzC* y el operón *atzDEF* localizados en el plásmido pADP-1 (Martinez y col., 2001). Aislabe y col. (2005) identificaron en *A. nicotinovorans* HIM los genes *atzABC* en un plásmido de 96 kb. En un estudio realizado por Rousseaux y col. (2002) se estudió la localización de los genes de degradación de atrazina en 25 aislamientos, demostrando la presencia de los genes *atzABC* y *trzD* de *Chelatobacter heintzii* en dos plásmidos diferentes, mientras que en cepas de *A. crystallopoietes* los genes *atzBC* se localizan en un único plásmido de 117 kb. Teniendo en cuenta los antecedentes presentados sumados a otros disponibles en la bibliografía, se puede concluir que dichos genes catabólicos han sido encontrados en microorganismos aislados de phylum diferentes (*Actinobacteria*, *Proteobacteria*, *Firmicutes* y *Bacteroides*) en los seis continentes (Kruz y col., 2010).

De nuestro conocimiento, en Sudamérica no se registran antecedentes de especies bacterianas degradadoras de atrazina aisladas de cursos de agua, siendo *Arthrobacter* sp. AAC22 el primer aislamiento obtenido a partir de aguas superficiales de agroecosistemas de Córdoba, Argentina, eficiente en la degradación de atrazina.

#### **4. Estudios de toxicidad de la solución de remoción de atrazina en ensayos de bioaumentación con *Arthrobacter* sp. AAC22**

La desaparición de un contaminante luego de un proceso de biorremediación no asegura que haya ocurrido su completa detoxificación, debido a que la acumulación de productos de degradación pueden llegar a ser más tóxicos que el compuesto de origen. Para controlar los procesos de tratamiento de aguas contaminadas, la US EPA recomienda el empleo de ensayos biológicos que complementan los métodos químicos. En este estudio se realizaron ensayos de toxicidad empleando el alga *Pseudokirchneriella subcapitata* (antes conocida como *Selenastrum capricornutum* o *Rhaphidocelis subcapitata*) organismo modelo de algas de agua dulce, utilizado en pruebas de inhibición de crecimiento de algas, según la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OCDE, 1984) y por la US EPA. *P. subcapitata* es un alga verde (clorófitas) unicelular con forma de media luna (**Figura 42**) característica de sistemas acuáticos epicontinentales

eutróficos u oligotróficos (Díaz-Báez y col., 2004). Diversos estudios han demostrado su alta sensibilidad a los herbicidas *s*-triazinas (Graymore y col., 2001; Ralston-Hooper y col., 2009).



Figura 42. Microfotografía de *Pseudokirchnerella subcapitata*

Dado que el ácido cianúrico es el principal metabolito de degradación de atrazina, se decidió evaluar la toxicidad de la solución remediada por bioaumentación con *Arthrobacter* sp. AAC22 mediante ensayos de inhibición del crecimiento de algas acuáticas, como método de evaluación de riesgo ambiental (Radix y col., 2000; Blinova, 2004). Se realizaron ensayos en microcosmos con agua del ecosistema RTP adicionada con atrazina ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) dado que, como se describió previamente, en dicho ambiente no ocurre la atenuación natural del herbicida. Los microcosmos fueron bioaumentados con el aislamiento nativo *Arthrobacter* sp. AAC22 ( $1 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup>) (células libres) y se incluyeron además cuatro controles, según se detalla en metodología (sección 15). Luego de 48 h de incubación se observó la degradación total de atrazina con la aparición del metabolito ácido cianúrico y se evaluó la toxicidad de cada muestra. La mayor concentración de muestra problema (remanente de los microcosmos) ensayada fue de 78,75%, dado que el diseño experimental del ensayo toxicológico contempla la realización de una dilución inicial con el fin de añadir el inóculo del alga a la muestra.

En los controles sin inocular adicionados con atrazina ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) se observaron efectos inhibitorios sobre la población de *P. subcapitata*. La máxima concentración ensayada produjo la inhibición del 100% de la población de algas, lo cual se relaciona a su alta toxicidad sobre estos organismos. Para esta muestra se calcularon los principales parámetros de toxicidad aguda de la muestra: CI 50%, CI 20% y CI10% (NOEC) cuyos resultados se muestran en la **Tabla 21**.

**Tabla 21.** Principales parámetros de toxicidad de atrazina contra el alga *P. subcapitata*.

		Parámetros de toxicidad ( $\mu\text{g.L}^{-1}$ )		
		CI 10% (NOEC)	CI 20%	CI 50%
1. Control	Atrazina ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) SIN AAC22	0,968	1,285	2,63

La CI 50% de atrazina calculada en este trabajo fue de  $2,63 \mu\text{g.L}^{-1}$ , valor semejante a la CI 50 % de  $1,6 \mu\text{g.L}^{-1}$  determinada por Ralston-Hooper y col. (2009).

Por el contrario, el agua residual de los microcosmos suplementados con ácido cianúrico o bioaumentados con *Arthrobacter* sp. AAC22 no ejerció un efecto inhibitorio sobre la población de algas. (Tabla 22).

**Tabla 22.** Toxicidad de las soluciones decontaminadas contra el alga *P. subcapitata* en ensayos de bioaumento con AAC22.

Control/ Tratamiento	Agua de RTP	Atrazina ( $10 \mu\text{g.L}^{-1}$ )	Ácido cianúrico ( $5 \mu\text{g.L}^{-1}$ )	AAC22	Inhibición tasa de crecimiento (%)
2. Control	Estéril	-	-	-	4,4
3. Control	No estéril	-	-	+	6,9
4. Control	No estéril	-	+	-	0,8
5. Tratamiento	No estéril	+	-	+	5,6

De este modo se deduce que el ácido cianúrico, principal metabolito generado en el proceso de biodegradación, no resultaría tóxico para el alga de agua dulce *P. subcapitata* a las concentraciones ensayadas. Además, las pruebas de toxicidad efectuadas respaldan la hipótesis de que la biorremediación de ambientes contaminados con atrazina por *Arthrobacter* sp. AAC22, determinada previamente por métodos analíticos, constituye un método eficiente para la decontaminación del agua, con la consecuente disminución de la toxicidad para los organismos nativos. Actualmente se están realizando nuevos experimentos a fin de aumentar el número de determinaciones, como así también para evaluar la toxicidad residual resultante del bioaumento en microcosmos con mayores concentraciones de atrazina ( $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

La realización de pruebas de toxicidad sobre organismos de diferentes niveles tróficos contribuiría a una mejor evaluación del efecto de atrazina y su remediación sobre los organismos acuáticos (Hernando y col., 2005; Cedergreen y Streibig, 2005).



## CONCLUSIONES

- Las bacterias aisladas de aguas superficiales contaminadas con atrazina y tolerantes al herbicida pertenecen a los géneros *Sphingobium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Arthrobacter*.

- *Arthrobacter* sp. AAC22 aislado de muestras de agua de ACR, tolera altas concentraciones de atrazina ( $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) y es capaz de crecer en presencia del herbicida como única fuente de N. Presenta rápida velocidad de crecimiento y alcanza una elevada biomasa en presencia de atrazina como única fuente de N, es capaz de crecer con diferentes fuentes de C y en un amplio rango de pH (5-9), lo cual demuestra su versatilidad metabólica.

- El aislamiento nativo es eficiente en la remoción total del herbicida dado que posee la combinación de los genes de la vía superior de degradación de *s*-triazinas *trzN* y *atzBC* de localización plasmídica, lo que se relacionaría a la acumulación de ácido cianúrico, producto intermediario de degradación.

- El agua residual de los microcosmos bioaumentados con *Arthrobacter* sp. AAC22 no ejerció un efecto inhibitorio sobre la población de algas de la especie *P. subcapitata*, evidenciando una disminución de la toxicidad para los organismos nativos y demostrando la eficiencia de este aislamiento para la decontaminación de aguas contaminadas con atrazina.

- **AAC22 es un candidato para su aplicación en la biorremediación de ambientes acuáticos contaminados por herbicidas del tipo *s*-triazinas.**

# Capítulo 6

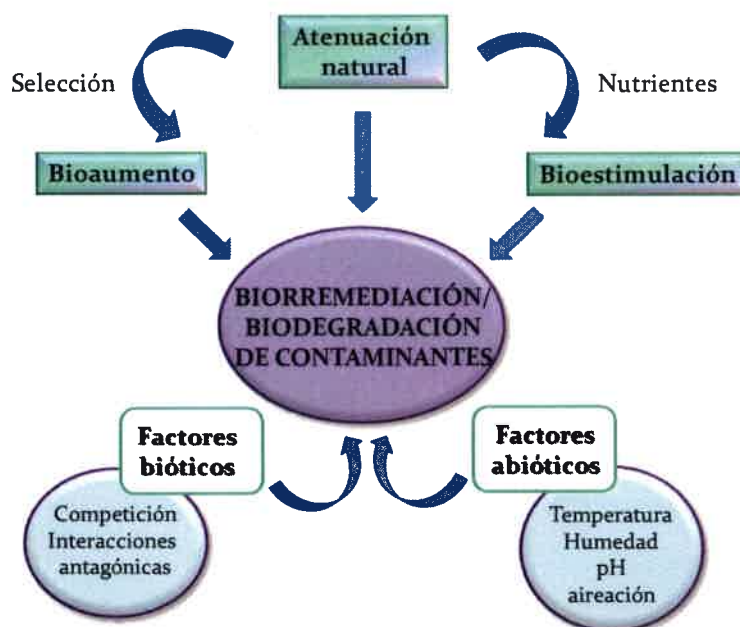
**INMOVILIZACIÓN DE *Arthrobacter* sp. AAC22 EN  
MATRIZ DE QUITOSANO: OPTIMIZACIÓN Y  
BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CONTMINADAS**

---

## INMOVILIZACIÓN DE *Arthrobacter* sp. AAC22 EN MATRIZ DE QUITOSANO: OPTIMIZACIÓN Y ENSAYOS DE BIORREMEDIACIÓN DE AGUAS CONTAMINADAS

### 1. Biotecnologías que permiten la eliminación de herbicidas en ambientes contaminados: la biorremediación

Cuando un herbicida es introducido en el ambiente, una gran proporción permanece en el suelo, pudiendo también dispersarse en el aire o llegar por diferentes vías a los cursos de agua. En el ambiente, estos compuestos comienzan a sufrir complejas modificaciones, a través de procesos abióticos (reacciones de intercambio iónico, hidrólisis, fotólisis, etc.) y biológicos (biodegradación microbiana, captación por plantas y animales), determinando su atenuación natural. Entre estos últimos la biodegradación llevada a cabo por los microorganismos nativos constituye el principal mecanismo de disipación de estos compuestos. Sin embargo, en algunos ambientes la microbiota nativa no es eficaz en la eliminación de contaminantes o bien este proceso ocurre de manera extremadamente lenta, por lo que resulta necesario recurrir al empleo de estrategias biotecnológicas (Figura 43).



**Figura 43.** Estrategias de biorremediación de contaminantes y factores condicionantes. (Adaptado de Joutey y col., 2013).

La biorremediación es una tecnología que utiliza a los microorganismos para la eliminación de contaminantes orgánicos persistentes presentes en diversos ambientes (aguas superficiales y subterráneas, suelo, sedimentos, etc.) aprovechando su potencial catabólico para degradar compuestos orgánicos. Estos microorganismos pueden ser nativos del área contaminada o aislados de otro sitio (exógenos) y luego introducidos. Por lo tanto, para llevar a cabo la biorremediación, es importante el aislamiento y estudio de microorganismos capaces de degradar el contaminante de interés. La biorremediación microbiana presenta múltiples ventajas sobre los procedimientos químicos de remediación, ya que son menos costosas, no son destructivas, no existe necesidad de eliminación del material contaminado, no causan una mayor contaminación y tienen amplia aceptación pública (Demnerová y col., 2005).

### **1.1. El bioaumentación como estrategia de remediación: requisitos para su implementación**

El bioaumentación implica la adición de microorganismos degradadores a un ambiente contaminado con el fin de mejorar la actividad metabólica de la comunidad existente e incrementar la velocidad de degradación del compuesto xenobiótico. La elección del bioaumentación como estrategia de remediación es viable si el factor limitante de la biodegradación es la ausencia de los genes catabólicos específicos dentro de la comunidad microbiana nativa, por lo que esta carencia puede ser cubierta por la nueva cepa introducida (Thompson y col., 2005).

Existen dos retos principales en el desarrollo de estrategias de bioaumentación para la eliminación de herbicidas de los cuerpos de agua. En primer lugar, su implementación debe ser precedida por el aislamiento e identificación exitosa de cepas individuales o consorcios microbianos que presenten las siguientes características: a) capacidad metabólica y fisiológica de utilizar el herbicida de interés a bajas concentraciones y en una gama diversa de escenarios ambientales (contenido de humedad, concentración de nutrientes, temperatura, potencial redox, pH, factores osmóticos y diversidad microbiana del sitio (Dua y col., 2002)); b) preferentemente rápida velocidad de crecimiento; c) elevada eficiencia de degradación; d) que no liberen subproductos de mayor toxicidad que el compuesto inicial (Thompson, y col., 2005; Philp y Atlas, 2005; Navia y Seeger, 2010).

En segundo lugar, los microorganismos degradadores deben permanecer en el compartimiento de biorremediación y mantener su actividad constante en escalas de tiempo extendidas. La cepa inoculada debe adaptarse al nuevo ambiente y sobrevivir a largo plazo, para lo cual debe considerarse como otra variable la competencia con otros microorganismos. Generalmente suelen ser inoculadas en altas densidades, ya que la inoculación de un elevado número de bacterias permite superar la competencia con bacterias nativas y la predación por protozoos y bacteriófagos (Philp y Atlas, 2005). Se requiere, por ello, de numerosas investigaciones para hacer frente a estos requisitos, no obstante, si la implementación de estrategias de bioaumentación es exitosa, tiene beneficios significativos para el ambiente y la salud humana (Benner y col., 2013).

Además, debe considerarse el impacto de la inoculación de microorganismos vivos sobre el ambiente, así como también en la salud humana y animal. Los microorganismos utilizados pueden ser nativos del área contaminada o aislados de otro sitio y luego introducidos (exógenos). En general, las cepas bacterianas nativas muestran una mayor eficiencia de biorremediación que las bacterias exógenas (Rousseaux, y col., 2003; Morgante y col., 2010, Seeger y col., 2010). La información genética que contiene las capacidades de degradación puede también ser introducida por especies dadoras, que no sobreviven largo tiempo en el ambiente pero transfieren esta información carente a los microorganismos nativos (Perelo y col., 2010).

Existen diversas estrategias de bioaumentación dependiendo de las características del sitio y del contaminante de interés. Los métodos que se aplican actualmente son: a) utilización de cepas bacterianas o consorcios preadaptados y b) utilización de inóculos comerciales; y las que aún se encuentran en fase experimental son: a) la utilización de microorganismos genéticamente modificados y b) el bioaumentación genética (Lyon y Vogel, 2013). El bioaumentación también se puede utilizar en combinación con otras estrategias de remediación.

A pesar de la aparente simplicidad y eficacia del bioaumentación, esta tecnología sigue siendo controvertida debido a la complejidad inherente de los sistemas naturales que no se comportan como microcosmos de laboratorio, y a la incapacidad de controlar organismos liberados en el medio ambiente. Existen varios criterios que deben ser abordados antes de que el bioaumentación se convierta en una alternativa fiable para la remediación de un contaminante, por lo que resulta sumamente necesario profundizar en el estudio de esta tecnología.

### 1.1.1. Rol del bioaumentación en la remediación de ambientes contaminados con atrazina

La persistencia de las *s*-triazinas en diferentes sitios contaminados sugiere un bajo potencial de biodegradación microbiana natural. Como se describió previamente, en sitios donde la atenuación natural no es eficiente, se requiere entonces de la adición de microorganismos que mineralicen o transformen los compuestos *s*-triazinas en metabolitos no tóxicos. Existen antecedentes de utilización de estrategias de bioaumentación para la recuperación de ambientes contaminados con compuestos *s*-triazinas. La inoculación de un consorcio degradador de atrazina formado por tres especies bacterianas en suelos sin historia previa de aplicación del herbicida produjo un incremento en la mineralización de alrededor del 80% (Alvey y Crowley 1996). La adición de *Agrobacterium radiobacter* J14a aumentó 2 a 5 veces la degradación de atrazina ( $50$  ó  $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) luego de 72 h, en suelos con bajo recuento de microorganismos degradadores de atrazina (Struthers y col., 1998) y la inoculación de *Pseudaminobacter* sp. C147 y *Nocardioides* sp. C190 condujo a la degradación del 100% de atrazina ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) entre los 20-30 días de ensayo (Topp, 2001). Diversos estudios evaluaron el efecto del bioaumentación con la cepa *Pseudomonas* sp. ADP en suelos contaminados con atrazina (Newcombe y Crowley 1999; Silva y col., 2004; Monard y col., 2008) y del bioaumentación en combinación con bioestimulación (Lima y col., 2009) demostrando, en todos los casos, un incremento en la velocidad y el porcentaje de degradación del herbicida. Morgante y col. (2009) evaluaron el bioaumentación con *Pseudomonas* sp. MHP41 en suelos contaminados con simazina, observando un incremento en la remoción del compuesto del 89% en 28 días. Wang y col. (2013) ensayaron el bioaumentación en suelos altamente contaminados con atrazina ( $400 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) utilizando el aislamiento bacteriano *Arthrobacter* sp. DAT1, observando una reducción del 90% del herbicida luego de 2-3 días. Por otra parte, se han propuesto estrategias de biorremediación de ambientes acuáticos contaminados con atrazina, tal como la bioconcentración del herbicida por microalgas verdes *Chlorella vulgaris* y cianobacterias de la especie *Synechococcus elongatus* en sistemas acuáticos de agua dulce (González-Barreiro y col., 2006). Hunter y Shaner (2009) evaluaron la capacidad para eliminar atrazina ( $1 \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de aguas subterráneas, en biobarreras realizadas en columnas rellenas con partículas de arena recubiertas con aceite de soja, e inoculadas con un consorcio de

microorganismos degradadores de atrazina. El sistema permitió la degradación de la totalidad de atrazina durante 24 semanas funcionando con flujo continuo.

Aunque las bacterias han sido reconocidas como agentes biológicos muy eficientes para la transformación de la atrazina y otras *s*-triazinas, los métodos microbiológicos proporcionados hasta el momento para la eliminación de estos compuestos del ambiente no son comercialmente viables, y de nuestro conocimiento, hasta la actualidad estas estrategias no han sido aplicadas en ambientes acuáticos naturales contaminados con atrazina. Por consiguiente, existe todavía una demanda para el desarrollo de métodos biotecnológicos que permitan la remoción rápida y completa de atrazina en condiciones ambientales variables y en ocasiones muy específicas.

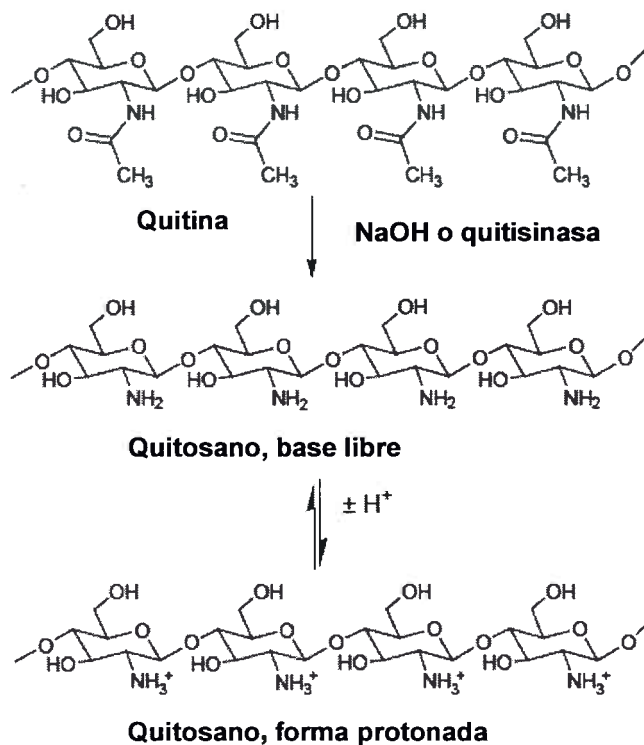
## **2. Inmovilización de microorganismos en matrices poliméricas: el polisacárido quitosano**

Como se expuso anteriormente, la inmovilización de bacterias degradadoras en matrices poliméricas para la biorremediación de ambientes contaminados constituye una estrategia biotecnológica sumamente ventajosa. Existe una gran diversidad de compuestos que pueden ser empleados con este fin, seleccionándose para este trabajo el polímero quitosano (Q) cuyas características y principales aplicaciones ambientales se describen a continuación.

### **2.1. Características generales del quitosano**

El Q es un copolímero lineal de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina unidos por enlaces glicosídicos  $\beta$  (1-4) que se puede obtener por deacetilación química (acción de soluciones fuertes de NaOH) o biológica (enzima quitinasa) de la quitina (**Figura 44**). Cuando la deacetilación es parcial el Q se considera un heteropolímero. La quitina (un poliaminosacárido) es el polímero más abundante en la naturaleza después de la celulosa, ya que es el componente principal del caparazón de crustáceos, exoesqueletos de insectos y paredes celulares de los hongos de los cuales se extrae comercialmente (Tsigos y col., 2000; Kurita 2006). Este compuesto es un residuo sólido de la industria de procesamiento

de mariscos en muchos países (Kumar, 2000), por lo que la obtención de Q a partir de quitina y su utilización como matriz para inmovilización de células podría contribuir a reciclar los residuos originados por el cultivo de camarón y podría convertirse en una fuente de ingresos rentable.



**Figura 44.** Obtención de quitosano mediante deacetilación de quitina. Equilibrio ácido-base del quitosano (Tomado de Friedman y Juneja, 2010).

El Q se caracteriza por poseer un alto porcentaje de N bajo la forma de grupos amino (-NH<sub>2</sub>), responsables de la unión de cationes metálicos a través de mecanismos de quelación. Posee tres tipos de grupos funcionales reactivos: un grupo amino y grupos hidroxilos primarios y secundarios en las posiciones C-2, C-3 y C-6, respectivamente (Zhang y col., 2010). Los grupos amino del polímero, en condiciones ácidas, pueden interactuar con iones polianiónicos para formar geles que pueden ser adaptados adecuadamente para diversos usos, entre ellos el entrapamiento de células. El tamaño molecular del quitosano (que varía entre 2.000 a más de 100.000 Da, aproximadamente), así como el tamaño de partícula (Qi y col., 2004; Chen y col., 2009) también influyen sobre su actividad biológica (Kim y col., 2003; Tsai y col., 2004; Zivanovic y col., 2004).



## 2.2. Inmovilización de bacterias en matriz de quitosano: su aplicación en tecnología ambiental

El Q presenta diversas aplicaciones como biomaterial debido a que carece de toxicidad, es biocompatible, biodegradable y bioactivo (Suh, 2000; Molinaro y col., 2002) y se encuentra ampliamente disponible en la naturaleza (Kumar, 2000; Kurita, 2006). Debido a su alta capacidad de adsorción el Q ha demostrado ser muy eficiente para la eliminación de metales tóxicos (Guibal, 2004) y colorantes (Guibal y col., 2005) en aguas contaminadas y en la inmovilización de bacterias para la biorremediación de contaminantes (Khondee y col., 2012; Angelim y col., 2013).

En los últimos años, el Q ha sido estudiado por numerosos autores como matriz en la inmovilización de bacterias degradadoras para su aplicación en la biorremediación de diversos contaminantes. La inmovilización de bacterias en matriz de Q para la biorremediación de hidrocarburos fue ensayada por Gentili y col. (2006) utilizando *Rhodococcus* sp. QBTo; Khondee y col. (2012) decontaminaron aguas residuales utilizando *Sphingobium* sp. P2 y Angelim y col. (2013) remediaron sedimentos inmovilizando un consorcio bacteriano compuesto por diecisiete aislamientos. *Pseudomonas putida* BCRC14349 encapsuladas en perlas de Q fueron utilizadas en la biorremediación de fenol y tricloroetileno (Chen y col., 2007); y *Chryseomonas luteola* TEM05 entrampadas en geles de carragenano recubiertos de Q fueron empleadas en la eliminación de iones metálicos tales como  $\text{Cr}^{+6}$ ,  $\text{Cd}^{+2}$  y  $\text{Co}^{+2}$  de soluciones acuosas (Baysal y col., 2009). También se ha estudiado la inmovilización de consorcios de algas del género *Scenedesmus* para la biorremediación de ambientes acuáticos contaminados con nitratos y fosfatos (Fierro y col., 2008).

Sin embargo, a pesar de sus ventajas como matriz de inmovilización de microorganismos, la principal dificultad para su empleo es su actividad antimicrobiana inherente (Liu y col., 2001; No y col., 2002; Benhabiles y col., 2012) atribuida a la naturaleza policationica resultante de los grupos  $\text{NH}_3^+$  cuando el polímero se disuelve en soluciones ácidas. Éstos pueden interactuar con los grupos carboxilos ( $-\text{COO}^-$ ) de la superficie de las membranas celulares bacterianas, alterando la distribución de cargas en las membranas y causando la formación de una capa impermeable alrededor de la célula. Consecuentemente, se producen cambios en la permeabilidad de la membrana, lo que compromete la estabilidad de las células bacterianas interrumpiendo las funciones

normales de la membrana, por ejemplo, permitiendo la fuga de componentes intracelulares e inhibiendo el transporte de nutrientes resultando, frecuentemente, en la lisis celular (Rabea y col., 2003; Liu y col., 2004; Chung y Chen, 2008; Raafat y col., 2008). Otro mecanismo que podría explicar la toxicidad de quitosano implica la adsorción de oligosacáridos de quitosano a las moléculas de ADN bloqueando la transcripción (Liu y col., 2001).

A pesar de ello, dadas las múltiples ventajas de Q, continúa posicionándose como un candidato interesante para su aplicación en la inmovilización de bacterias biodegradadoras. Para lograr este objetivo, resulta esencial el desarrollo de nuevas estrategias que disminuyan o eliminen la acción antimicrobiana del Q para la inmovilización de especies bacterianas sensibles.

### 2.3. Modificaciones de las propiedades de quitosano mediante reacciones de derivatización

El Q es una molécula que puede modificarse químicamente sin perturbar su grado de polimerización ya que proporciona grupos funcionales amino primarios e hidroxilos primarios y secundarios en sus monómeros (Figura 45).

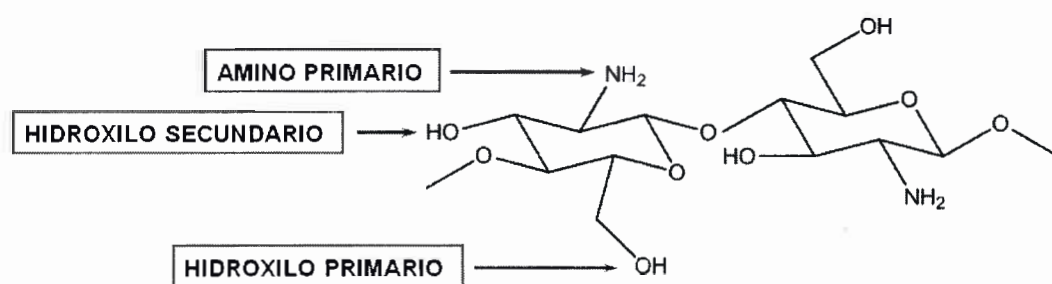
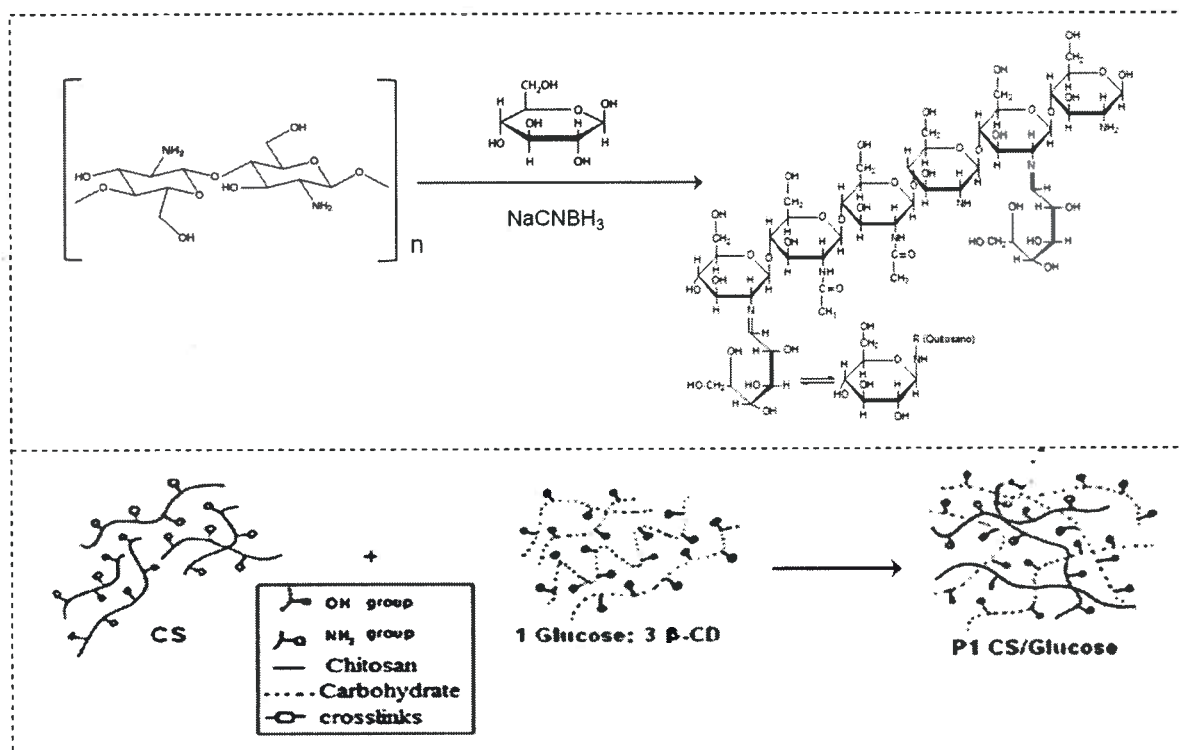


Figura 45. Grupos funcionales presentes en el monómero de la molécula de Q (Adaptado de Mourya y col., 2008)

Dadas estas características, una alternativa para disminuir o eliminar su actividad antimicrobiana consiste en producir un bloqueo de los grupos amino primarios (-NH<sub>3</sub><sup>+</sup>) propuestos como responsables de su actividad antimicrobiana. Esto es posible mediante reacciones de derivatización que pueden realizarse, por ejemplo, por la adición de carbohidratos. Para tal fin, se lleva a cabo una reacción de N-alquilación reductora con

carbohidratos, por ejemplo glucosa, utilizando cianoborohidruro de sodio como catalizador (**Figura 46 A y Figura B**). Esta reacción modifica además, algunas propiedades físicas y químicas de la molécula, tales como su solubilidad en agua y solventes orgánicos, su viscosidad, etc.



**Figura 46. A.** N-alkilación reductora de la molécula de Q con glucosa (Kumar y col., 2004). **B.** Representación esquemática del proceso de derivatización de Q con carbohidratos (Adaptado de Abdelaal y col., 2013).

Las moléculas de Q derivatizado han sido utilizadas con diversos fines, por ejemplo en aplicaciones médicas y farmacéuticas, empleándose Q derivatizado con azúcares como fucosa y galactosa, como soporte de fármacos (Kumar y col., 2004), y Q derivatizado con dietilaminoetil quitosano para la inmovilización de enzimas en la industria alimenticia (Spagna y col., 2001). Sin embargo, de nuestro conocimiento, el empleo de Q derivatizado con glucosa como soporte en la inmovilización de bacterias para llevar a cabo estrategias de biorremediación de plaguicidas no ha sido reportado. Por lo tanto, la inmovilización de bacterias nativas degradadoras de atrazina en Q derivatizado con glucosa resulta una estrategia novedosa e interesante para la biorremediación de ecosistemas contaminados con herbicidas del tipo *s*-triazinas.

## **HIPÓTESIS DE TRABAJO**

La inmovilización de la bacteria nativa *Arthrobacter* sp. AAC22 en matriz de Q garantiza la supervivencia de las células y conserva su actividad catabólica, siendo un producto biotecnológico para su utilización en biorremediación de ambientes contaminados.

## OBJETIVO GENERAL

Inmovilizar el aislamiento bacteriano nativo *Arthrobacter* sp. AAC22 en una matriz polimérica de quitosano para su futura aplicación en la remediación de aguas contaminadas con atrazina.

### Objetivos específicos

- ✓ Establecer las condiciones óptimas de inmovilización del aislamiento bacteriano nativo *Arthrobacter* sp. AAC22 en una matriz polimérica de quitosano.
- ✓ Estudiar la eficiencia de biodegradación de dicho aislamiento bacteriano inmovilizado en quitosano y su aplicación en ensayos de bioaumento.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Inmovilización de *Arthrobacter* sp. AAC22 en matrices poliméricas de quitosano y eficiencia de biodegradación

#### 1.1. Encapsulación de AAC22 en perlas de quitosano nativo

La contaminación de los ecosistemas acuáticos de agua dulce con herbicidas como atrazina constituye un problema ambiental de gran relevancia. La utilización de microorganismos degradadores inmovilizados en una matriz polimérica puede resultar una solución eficiente para la eliminación de este herbicida del ambiente. El Q es uno de los polímeros naturales más prometedores para la inmovilización de microorganismos debido a su biodegradabilidad, su escasa toxicidad y su disponibilidad en la naturaleza (Kumar, 2000; Kurita, 2006). Sin embargo, dadas las características conocidas de este compuesto, resulta de suma importancia evaluar el efecto antimicrobiano de Q sobre el aislamiento nativo *Arthrobacter* sp. AAC22 y determinar las condiciones óptimas para llevar a cabo su inmovilización.

En primera instancia, se decidió evaluar la actividad antimicrobiana y la formación de perlas a partir de dos soluciones de Q de distinto peso molecular ( $Q_M$  y  $Q_L$ ), dado que se ha demostrado la dependencia del efecto antibacteriano respecto del peso molecular (Jeon y col., 2001; No y col., 2002). Se ensayaron soluciones de  $Q_M$  y  $Q_L$  en concentraciones de 0,01-2,5 % (p/v), a las que se adicionó la cepa AAC22 a una concentración final de  $1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>. Se observó que a bajas concentraciones (0,01-0,1%) el Q no afectó la viabilidad bacteriana, aunque en esas condiciones no fue posible la formación de las perlas cuando se hizo gotear la mezcla de Q+AAC22 en TPP. Contrariamente, las soluciones de  $Q_M$  y  $Q_L$  al 1% disueltas en ácido acético-buffer acetato (1:3) no afectaron la supervivencia de las bacterias durante los primeros 10 min de contacto con la solución siendo posible, además, la formación de perlas de morfología esférica. Entre éstas, las perlas obtenidas con  $Q_M$  presentaron una morfología más uniforme, por lo cual se seleccionó esta molécula para los ensayos posteriores.

Dado que para la obtención de perlas a mediana y gran escala se requiere el empleo de grandes volúmenes de solución de Q como también de mayores tiempos de homogeneización de la mezcla de Q y las bacterias, resulta relevante analizar la supervivencia de AAC22 cuando permanece en contacto con el gel de Q<sub>M</sub> 1% a tiempos mayores (entre 10 y 120 min). Los recuentos obtenidos evidenciaron una fuerte actividad antibacteriana inicial de Q<sub>M</sub> sobre la cepa AAC22 ya que en los primeros 10 min de contacto entre la solución de Q<sub>M</sub> y el cultivo bacteriano, se redujo el número de bacterias viables en 4 órdenes de logaritmo ( $1,3 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>) respecto al inóculo inicial ( $1,1 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Los recuentos realizados entre los 20 y 90 min se encontraron dentro del mismo orden, sin embargo a los 120 min se produjo nuevamente un descenso en el número de bacterias ( $1 \times 10^4$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Dado que hasta los 90 min el recuento permaneció constante se estableció que la etapa de homogeneización de la mezcla de Q+AAC22 debe ser inferior a los 90 min.

Se evaluó además el efecto del TPP sobre la viabilidad bacteriana dado que el mismo se emplea como agente reticulante de las moléculas de Q para la formación de las perlas. Dicha solución posee un pH alcalino (pH 9) por lo que cuando la solución de Q<sub>M</sub>+AAC22 (cuyo pH es cercano a 5) toma contacto con el TPP el brusco cambio de pH que podría ser nocivo para las bacterias. Sin embargo, el recuento bacteriano permaneció constante ( $1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup>) luego de la formación de las perlas por lo que esta etapa no afectaría la viabilidad de *Arthrobacter* sp. AAC22.

Finalmente, se evaluó la viabilidad de las bacterias inmovilizadas en diferentes condiciones de almacenamiento. Para tal fin, las perlas de Q<sub>M</sub>+AAC22 se conservaron a 4 °C en diferentes soluciones estériles: PBS, solución fisiológica o M9. Los resultados de los recuentos obtenidos a las 24 y 48 h se presentan en la **Tabla 23**.

**Tabla 23.** Viabilidad de *Arthrobacter* sp. AAC22 en perlas de Q<sub>M</sub> a 4 °C.

Solución de conservación	Recuento bacteriano (UFC.g <sup>-1</sup> )	
	24 h	48 h
PBS	$8,3 \times 10^3$	$5 \times 10^3$
Sn. fisiológica	$3,7 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$
M9	$1,7 \times 10^3$	$1,4 \times 10^3$

Los resultados evidencian una disminución significativa del recuento de AAC22 de aproximadamente 2 órdenes de logaritmo ( $1 \times 10^3$  UFC.mL<sup>-1</sup>) durante el tiempo de almacenamiento de las perlas, independientemente de las soluciones de conservación ensayadas. No se obtuvieron recuentos bacterianos en las soluciones (PBS, SF o M9) lo cual confirma la muerte de las bacterias dentro de las perlas y descarta la salida de bacterias hacia el medio externo. La pérdida de viabilidad de AAC22 dentro de las perlas podría deberse a que el Q continúa ejerciendo una acción antimicrobiana aún luego de la reticulación. La actividad antimicrobiana de Q puede ser atribuida a la naturaleza policatiónica de los grupos NH<sub>4</sub><sup>+</sup> cuando el polímero se encuentra en soluciones ácidas que pueden interactuar con los grupos carboxilos (-COO<sup>-</sup>) de las membranas celulares bacterianas, causando cambios en su permeabilidad e interrumpiendo las funciones normales de la membrana (Rabea y col., 2003; Liu y col., 2004; Chung y Chen, 2008; Raafat y col., 2008). Teniendo esto en consideración, el empleo de Q en su estado nativo no resultaría adecuado para la inmovilización de AAC22, ya que uno de los objetivos de este procedimiento con fines de biorremediación es asegurar en el tiempo la supervivencia de las células dentro de la matriz polimérica.

### 1.2. Adherencia de AAC22 en perlas de quitosano nativo

Dado que la inmovilización por encapsulación de *Arthrobacter* sp. AAC22 en matriz de Q no arrojó resultados satisfactorios se decidió ensayar, como estrategia alternativa, la adherencia bacteriana a la superficie de perlas de Q<sub>M</sub> preformadas. Para ello, se inoculó la cepa AAC22 ( $2 \times 10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup>) y se mantuvieron las perlas durante 5 días en agitación a 28 °C. Los recuentos obtenidos entre los días 1 a 5 revelaron que el número de células adheridas permaneció constante a través del tiempo (Tabla 24).

**Tabla 24.** Adherencia de *Arthrobacter* sp. AAC22 a perlas de Q<sub>M</sub> 1%

Tiempo (días)	Recuentos (UFC.g <sup>-1</sup> )			
	1	2	3	5
Cultivo	$2,6 \times 10^8$	$3,2 \times 10^8$	$2,1 \times 10^8$	$8 \times 10^7$
Perlas	$3 \times 10^7$	$4 \times 10^7$	$4,9 \times 10^7$	$6,7 \times 10^7$



A partir de los 5 días de incubación en el medio de cultivo las perlas comenzaron a modificar su consistencia y a deformarse, alterando su geometría. El descenso del pH que ocurre como consecuencia del metabolismo microbiano podría afectar las interacciones existentes entre las moléculas de la matriz, alterando así la estructura de las perlas.

La inmovilización de bacterias por adherencia en matrices de Q ha sido estudiada por otros autores. Gentili y col. (2006) observaron que la adherencia de la cepa degradadora de hidrocarburos *Rhodococcus corynebacterioides* QBTo en copos de quitina y Q mejoró la supervivencia y la actividad degradadora de la bacteria. Por otra parte, Giaveno y col. (2008) inmovilizaron *Acidithiobacillus ferrooxidans* en perlas de Q por formación de biopelículas para la biooxidación de Fe (II) en un biorreactor de lecho empacado. En nuestro estudio, la inmovilización de *Arthrobacter* sp. AAC22 por adherencia a perlas de Q resultó efectiva.

### **1.2.1. Biodegradación de atrazina con *Arthrobacter* sp. AAC22 adheridas a perlas de quitosano nativo**

Se realizaron ensayos de biorremediación en medio mínimo M9 conteniendo atrazina ( $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) al que se adicionaron perlas de Q<sub>M</sub> 1% con *Arthrobacter* sp. AAC22 adheridas a la superficie (20 perlas por erlenmeyer). Si bien se obtuvo una remoción del 70% del herbicida entre las 24-48 h del inicio del ensayo, el recuento de bacterias en el medio de cultivo a las 24 h de iniciada la reacción fue elevado ( $9,6 \times 10^6 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ). Los altos recuentos bacterianos obtenidos en el medio son efectos indeseados, dado que se pretende la mínima liberación de células desde la matriz de inmovilización hacia el medio a ser decontaminado. Ello podría deberse a: a) un desprendimiento de las bacterias adheridas a las perlas de Q con la consecuente liberación al medio externo, debido a una unión laxa entre la matriz polimérica y las células de AAC2; b) las condiciones del ensayo (realizado en medio mínimo M9) favorecerían la duplicación de las células (crecimiento bacteriano) y consecuentemente, la liberación de éstas al medio. Por lo tanto, la adherencia de AAC22 a perlas de Q nativo no resulta una estrategia adecuada para la biorremediación de agua contaminada con atrazina.

### 1.3. Encapsulación de AAC22 en perlas de quitosano derivatizado

#### 1.3.1. Derivatización de Q con glucosa

La inmovilización de *Arthrobacter* sp. AAC22 en Q nativo, ya sea por encapsulación o adherencia, mostró ciertas dificultades debido a la actividad antimicrobiana del polisacárido o a la alta liberación de células al medio cuando éstas se encuentran adheridas a la superficie, respectivamente. Por lo tanto, dadas las características de este polímero, una alternativa para disminuir su actividad antimicrobiana, que fue ensayada en este trabajo, consistió en bloquear los grupos amino primarios ( $-\text{NH}_3^+$ ) mediante reacciones de derivatización. Para esto, se decidió realizar reacciones de N-alkilación reductora con un azúcar simple como la glucosa, utilizando soluciones de  $Q_M$  según se detalla en Materiales y Métodos (Capítulo 2, sección 12.3.1.). El rendimiento de la reacción de derivatización (Masa producto/Masa reactivo) fue de 81,66 %.

#### 1.3.2. Caracterización de Q derivatizado

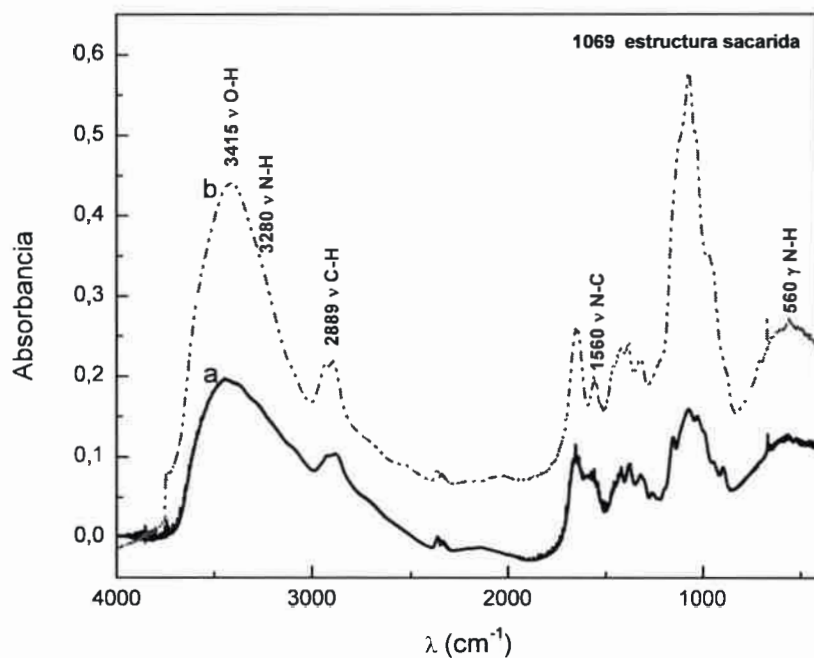
En la **Tabla 25** se presentan los valores del Grado de deacetilación (%GDA) y el peso molecular viscosimétrico ( $M_v$ ) obtenidos para las muestras de Q nativo y QD. Se observa una reducción del %GDA en un 22% posterior a la reacción de derivatización con glucosa, indicando la efectiva sustitución de los grupos  $-\text{NH}_2$  de la molécula de Q nativo. Adicionalmente se observa un incremento del  $M_v$ , el cual es proporcional al grado de sustitución obtenido durante la reacción por la incorporación de glucosa.

**Tabla 25.** Valores de %GDA y  $M_v$  para muestras de Q nativo y Q derivatizado.

MUESTRA	%GDA	$M_v$ (kDa)
Q	78,19	580
QD	55,78	711

En la **Figura 47**, se muestra el espectro de absorción FT-IR entre 4000 y 400  $\text{cm}^{-1}$  de Q nativo y QD. Puede observarse que, a modo de efecto global de la reacción, QD presenta mayor estructura fina a 3400  $\text{cm}^{-1}$ , correspondiente a la mayor disponibilidad de los grupos  $-\text{OH}$ , fuertemente ligados en la molécula nativa (Ying y col. 2011). Los incrementos asociados a las bandas a 1560  $\text{cm}^{-1}$  y 3280  $\text{cm}^{-1}$  responden a un cambio de ángulo en el plano de  $-\text{NH}_2$  y a un aumento de estiramiento de los enlaces  $\text{N}-\text{H}$  de  $-\text{NH}_2$ , respectivamente, denotando mayor accesibilidad a dichos grupos funcionales.

La región delimitada por el incremento en la banda a 1560  $\text{cm}^{-1}$ , es caracterizada también por el establecimiento de nuevos enlaces amida  $\text{R}-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$ , producto de la fusión del grupo carbonilo reductor de la glucosamina y el grupo  $-\text{NH}_2$  de Q. La zona alrededor de 1100 - 1155  $\text{cm}^{-1}$ , muestra el cambio conformacional (estiramiento anti-simétrico del enlace  $\text{C}-\text{O}-\text{C}$ ) de la estructura piranósica o sacárida, sugiriendo la incorporación de moléculas de azúcar D-(+)-glucosa (ramificación), al polímero en cuestión (Kasaai, 2008).



**Figura 47.** Espectros de absorción en el IR: a) Q nativo; b) Q derivatizado.

Los resultados obtenidos indican que posterior a la reacción de derivatización entre Q y glucosa, bajo las condiciones experimentales establecidas en este trabajo, se obtuvo un polímero de menor %GDA y mayor  $M_v$  que el Q nativo.

### **1.3.3. Capacidad antimicrobiana y encapsulación de AAC22 en perlas de Q derivatizado**

Se evaluó la supervivencia de *Arthrobacter* sp. AAC22 en contacto con los geles de Q derivatizado (QD) en concentraciones de 1% ó 1,3%. No se obtuvieron diferencias significativas en los recuentos con las dos concentraciones ensayadas. En todos los casos se obtuvo una buena viabilidad, con recuentos del orden de  $1 \times 10^7$  UFC.mL<sup>-1</sup> luego de 40 min de contacto de los geles de QD y el cultivo bacteriano (inóculo inicial de  $1,3 \times 10^9$  UFC.mL<sup>-1</sup>). Paralelamente, dado que no es posible realizar la esterilización del polímero derivatizado, se decidió determinar la carga bacteriana inicial de la solución de QD 1% a partir del control sin inocular. Sin embargo, no se obtuvo crecimiento microbiano lo cual garantiza que las perlas obtenidas sólo contienen inmovilizado al aislamiento nativo AAC22.

Las perlas tuvieron en general una adecuada consistencia y geometría esférica. El tamaño de las perlas podría ser un factor importante en el proceso de biorremediación con bacterias encapsuladas, influyendo sobre la velocidad de difusión del contaminante. Se decidió entonces evaluar el efecto del tamaño de las perlas sobre la eficiencia de la biodegradación y sobre la estabilidad de las mismas. Las características generales de los tres tipos de perlas obtenidas y los resultados de los recuentos bacterianos se presentan en la **Tabla 26** y **Figura 48**.

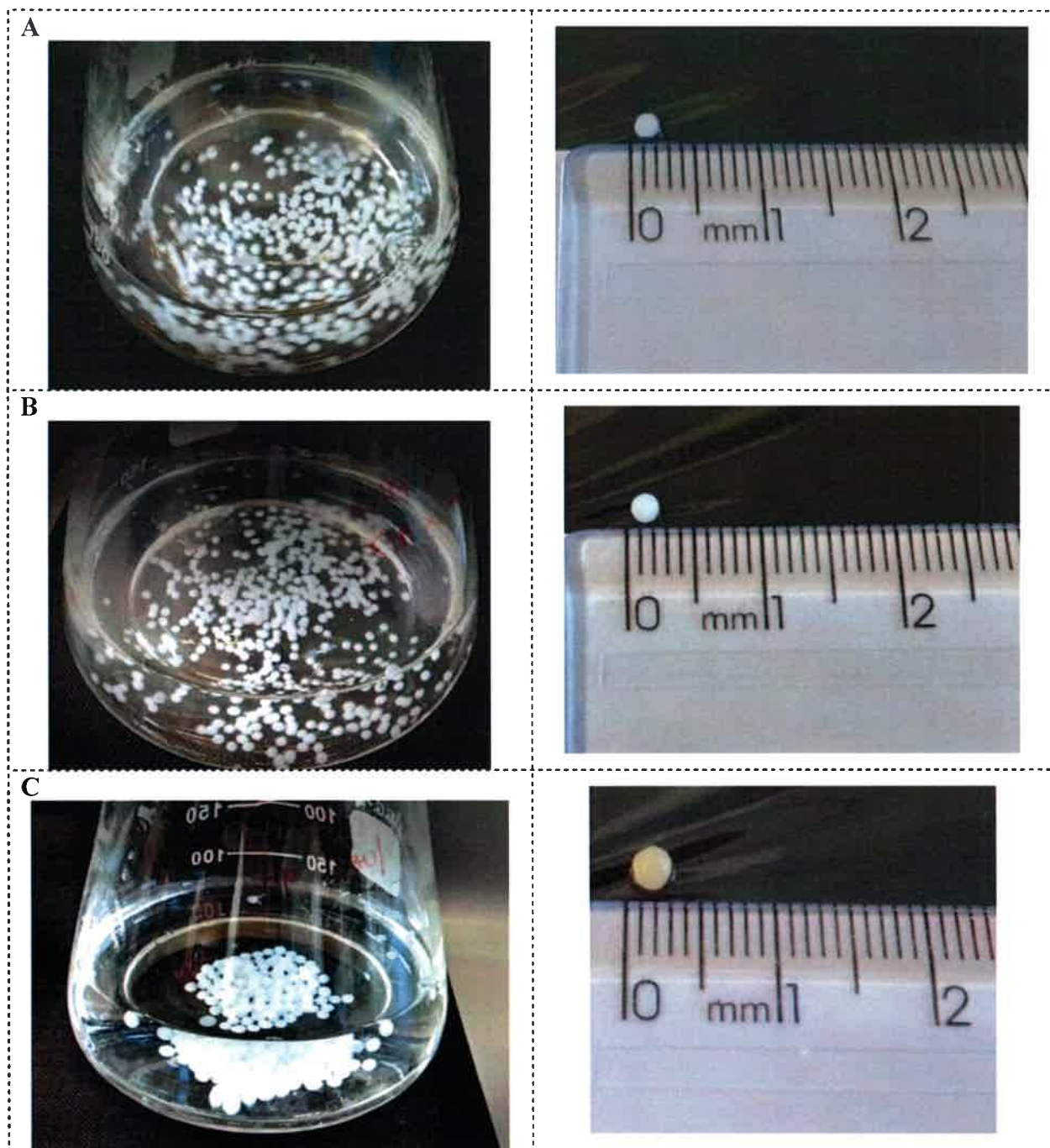


Figura 48. Apariencia macroscópica de perlas de QD 1%. Tamaños A. (1 mm), B. (1,5 mm), C. (2,5 mm).

Tabla 26. Características de las perlas de QD conteniendo células de *Arthrobacter* sp. AAC22.

	Tamaño de perla (mm)	Cantidad de perlas/mL (Γ)	Volumen c/10 perlas (mL)	Peso c/10 perlas	Recuento bacteriano (UFC.g <sup>-1</sup> )
A	1	120	0,08	0,0658	6,7x10 <sup>7</sup>
B	1,5	77	0,13	0,118	5,0x10 <sup>7</sup>
C	2,5	45	0,22	0,2367	1,1x10 <sup>8</sup>

El rendimiento (número de perlas.mL<sup>-1</sup> de gel de QD+ AAC22), el volumen y el peso de 10 perlas fueron utilizados para los cálculos correspondientes a las concentraciones de bacterias encapsuladas. En las perlas de los tres tamaños diferentes se obtuvieron recuentos bacterianos comprendidos entre 5x10<sup>7</sup> y 1x10<sup>8</sup> UFC.g<sup>-1</sup> coincidiendo, en general, con los resultados de inmovilización en Q de otros autores (Gentili y col., 2006; Khondee y col., 2012; Angelim y col., 2013). La densidad de bacterias obtenidas en este proceso de inmovilización resultó adecuada para su utilización en ensayos de biorremediación.

La supervivencia de las bacterias dentro de las perlas y la utilización de las mismas en sucesivos ensayos de biorremediación son dos factores importantes para su futura aplicación a mediana o gran escala. En este sentido, se evaluó la viabilidad de las células inmovilizadas en perlas de QD durante su almacenamiento. Para tal fin, las perlas se conservaron a 4 °C en medio mínimo M9 estéril y se tomaron muestras periódicamente durante 30 días. Los resultados obtenidos (**Tabla 27**) revelan que no se observaron diferencias significativas en la supervivencia de las bacterias en los diferentes tamaños de perlas, por lo que no existiría una relación entre la viabilidad bacteriana y el tamaño de las mismas.

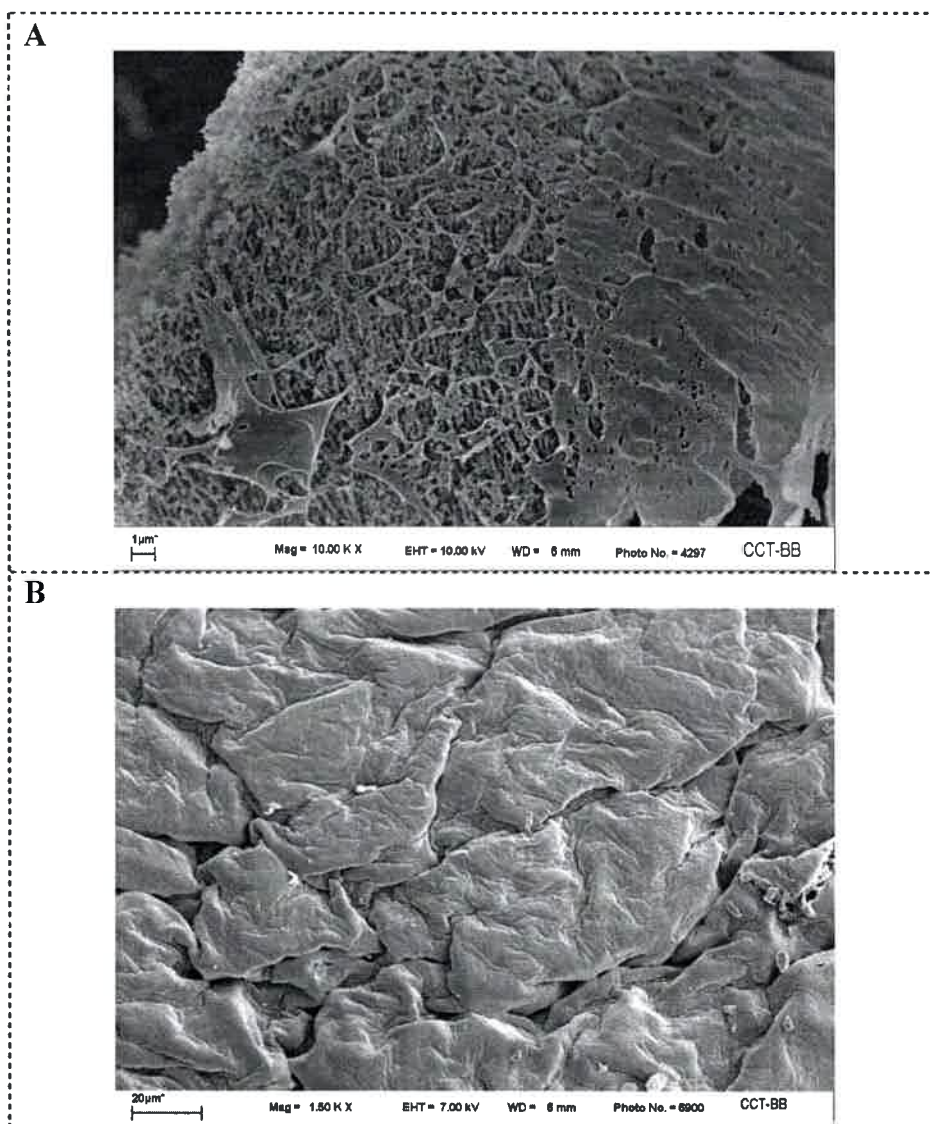
**Tabla 27.** Viabilidad de *Arthrobacter* sp. AAC22 en perlas de QD conservado a 4 °C.

Perlas	Recuento bacteriano (UFC.g <sup>-1</sup> )				
	Tiempo (días)				
	1	2	7	21	30
A	7,6x10 <sup>7</sup>	4,3x10 <sup>7</sup>	2,9x10 <sup>7</sup>	3,9x10 <sup>7</sup>	2,1x10 <sup>7</sup>
B	3,3x10 <sup>7</sup>	9,3x10 <sup>7</sup>	9,1x10 <sup>7</sup>	7,4x10 <sup>7</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>
C	5,2x10 <sup>7</sup>	4,4x10 <sup>7</sup>	9x10 <sup>7</sup>	1,2x10 <sup>8</sup>	1,6x10 <sup>7</sup>

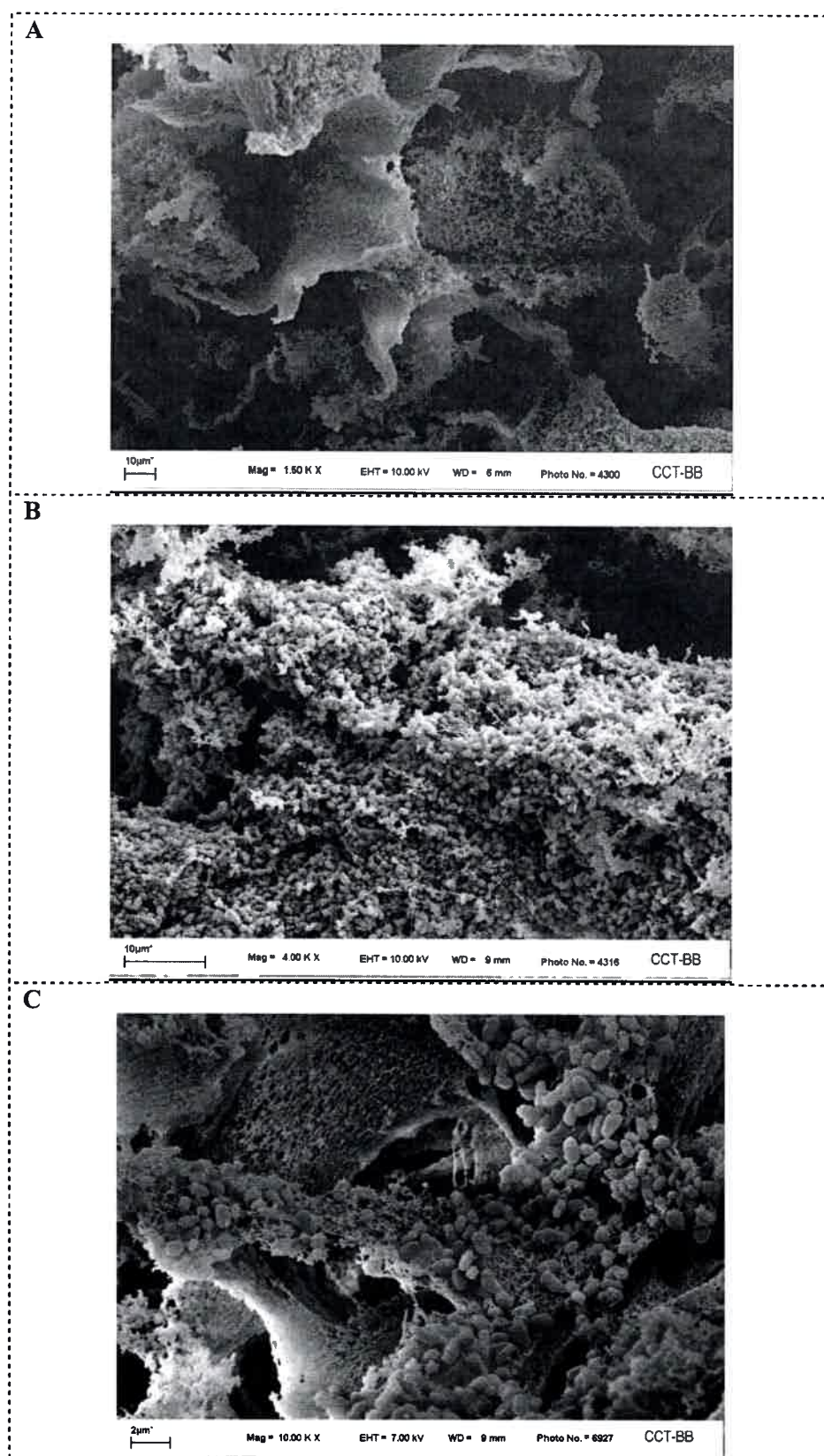
*Arthrobacter* sp. AAC22 es capaz de sobrevivir dentro de las perlas de QD hasta 30 días posteriores a la inmovilización, evidenciando que la derivatización del polímero Q constituye una estrategia adecuada para la inmovilización de bacterias sensibles a Q nativo, dado que se redujo su actividad antimicrobiana.

Finalmente, se analizó la ultraestructura de las perlas de **tamaño B** mediante Microscopía Electrónica de Barrido (SEM). En las **Figuras 49** y **Figura 50** se muestran

microfotografías de la superficie y de un corte transversal, respectivamente, de una perla de QD con células de *Arthrobacter* sp. AAC22 encapsuladas. Se observó la presencia de canales y poros, y las bacterias (tamaño estimado:  $1,4 \times 0,7 \mu\text{m}$ ) se encuentran en la parte interna de la perla de QD pero no crecen en la superficie de la misma. Además, se observa que las células se distribuyen de manera uniforme en toda la perla, lo que indicaría que dicha matriz sería adecuada para su uso como soporte de bacterias para la degradación del herbicida atrazina.



**Figura 49.** Microfotografía (SEM) de la superficie una perla de QD con *Arthrobacter* sp. AAC22 encapsuladas. **A.** Aumento 10000X; **B.** Aumento 1500X.



**Figura 50.** Microfotografías (SEM) de corte transversal de una perla de QD 1% con *Arthrobacter* sp. AAC22 encapsuladas. **A.** Aumento 1500X, **B.** Aumento 10000X, **C.** Aumento 10000X.



En conjunto, este trabajo ofrece un nuevo método para la obtención de una matriz polimérica alternativa (QD), así como las condiciones óptimas de inmovilización bacteriana y el almacenamiento de las cápsulas. Los resultados obtenidos revelan que la derivatización de la molécula de Q produce una fuerte reducción de la capacidad antimicrobiana del compuesto, favoreciendo la supervivencia de las bacterias, y permitiendo, por lo tanto, la inmovilización de especies bacterianas sensibles al Q nativo. Simultáneamente, el proceso de derivatización le confiere al compuesto nuevas propiedades físicas y químicas tales como un mayor PM, mayor solubilidad en agua y mayor viscosidad. La adecuada densidad de bacterias atrapadas en perlas de QD y su supervivencia en el tiempo, conjuntamente con la morfología uniforme y la consistencia de dichas perlas, permitiría su aplicación como biorreactor en ensayos de biorremediación de aguas ambientales contaminadas con atrazina, aspecto que se analizará a continuación.

#### **1.3.4. Biodegradación de atrazina con *Arthrobacter* sp. AAC22 encapsuladas en perlas de Q derivatizado**

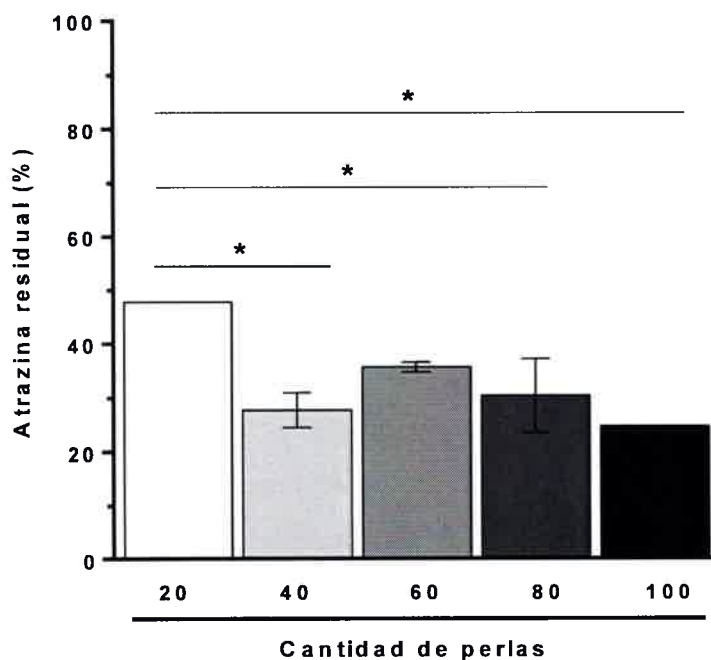
Como segunda estrategia se evaluó la biodegradación de atrazina por *Arthrobacter* sp. AAC22 inmovilizadas en perlas de QD 1%. Se realizaron cultivos en batch en erlenmeyers conteniendo 20 mL de M9 con atrazina ( $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) a los que se adicionaron, en ensayos independientes, las perlas de QD de diferentes tamaños. Se inocularon 20 ó 40 perlas de los tamaños A, B o C y a las 24 h se determinó la concentración residual de atrazina (espectrofotometría UV-vis) y el número de bacterias presentes dentro de las perlas (**Tabla 28**). Las bacterias encapsuladas en perlas de QD removieron eficientemente el herbicida durante las primeras 24 h, siendo mayor la degradación de atrazina en los tratamientos inoculados con 40 perlas (46-60%), y en particular con perlas de tamaño B, por lo cual éstas fueron seleccionadas para ensayos posteriores. En todos los casos, los recuentos dentro de las perlas a las 24 h de ensayo fueron del orden de  $1 \times 10^9$  UFC. $\text{mL}^{-1}$ , evidenciándose un marcado aumento del número de bacterias, debido posiblemente a que las condiciones del ensayo favorecieron el crecimiento de las mismas en el interior de las perlas.

**Tabla 28.** Biodegradación de atrazina por *Arthrobacter* sp. AAC22 inmovilizadas en perlas de QD 1%.

	Cantidad de perlas	Bacterias inoculadas (UFC.g <sup>-1</sup> )	Remoción a las 8 h (%)	Remoción a las 24 h (%)
<b>A</b>	20	5,6x10 <sup>6</sup>	0	32
	40	1,1x10 <sup>7</sup>	8	46
<b>B</b>	20	2,2x10 <sup>7</sup>	5	55
	40	4,4x10 <sup>7</sup>	9	60
<b>C</b>	20	2,1x10 <sup>7</sup>	30	53
	40	4,1x10 <sup>7</sup>	25	50
<b>Control abiótico</b>	40	-	5	10

**Referencias.** Tamaños de perlas: **A.** 1 mm; **B.** 1,5 mm; **C.** 2,5 mm.

Luego, se decidió optimizar el número de perlas a inocular a fin de minimizar los tiempos de remoción del herbicida y de reducir de esta manera la liberación de bacterias al medio. En la **Figura 51** se muestra la concentración de atrazina residual, luego de 24 h de ensayo, con 20, 40, 60, 80 y 100 perlas.



**Figura 51.** Degradación de atrazina (24 h) vs. número de perlas inoculadas para la biodegradación por *Arthrobacter* sp. AAC22 inmovilizadas en perlas de QD 1%.

La adición de 20 perlas permitió una degradación del 52% de atrazina a las 24 h, siendo este valor significativamente inferior ( $p < 0,05$ ) a la remoción observada (65-75%) con mayor número de perlas (40 a 100 perlas). Entre estas últimas, no se obtuvieron diferencias significativas en los porcentajes de degradación.

A continuación, se evaluó la velocidad de degradación de atrazina en función de la variación del número de perlas (40, 60, 80 ó 100 perlas) (Figura 52).

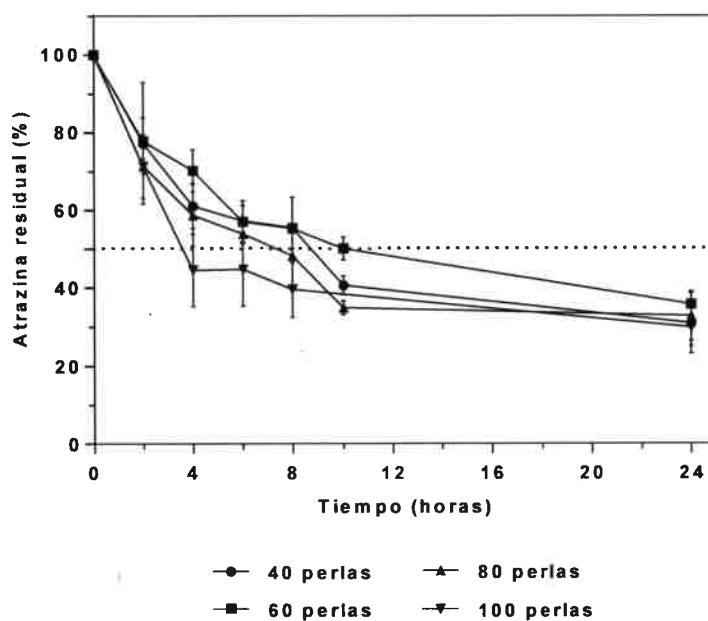


Figura 52. Cinética de degradación de atrazina en ensayos de biodegradación con AAC22 vs. número de perlas.

Los resultados revelaron que, en general, no hubo diferencias en las velocidades de degradación de atrazina al utilizar 40, 60 u 80 perlas ( $T_{0,5} = 8,7; 10,1$  y  $7,1$  respectivamente) aunque si se puede observar que con 100 perlas se produce un incremento en la velocidad de degradación en las primeras 8 h, siendo el  $T_{0,5} = 3,6$  h. Por lo tanto, para llevar a cabo los ensayos de bioaumentación, cuyos resultados se describirán a continuación, se utilizaron 100 perlas de QD con una densidad bacteriana de  $5 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup>.

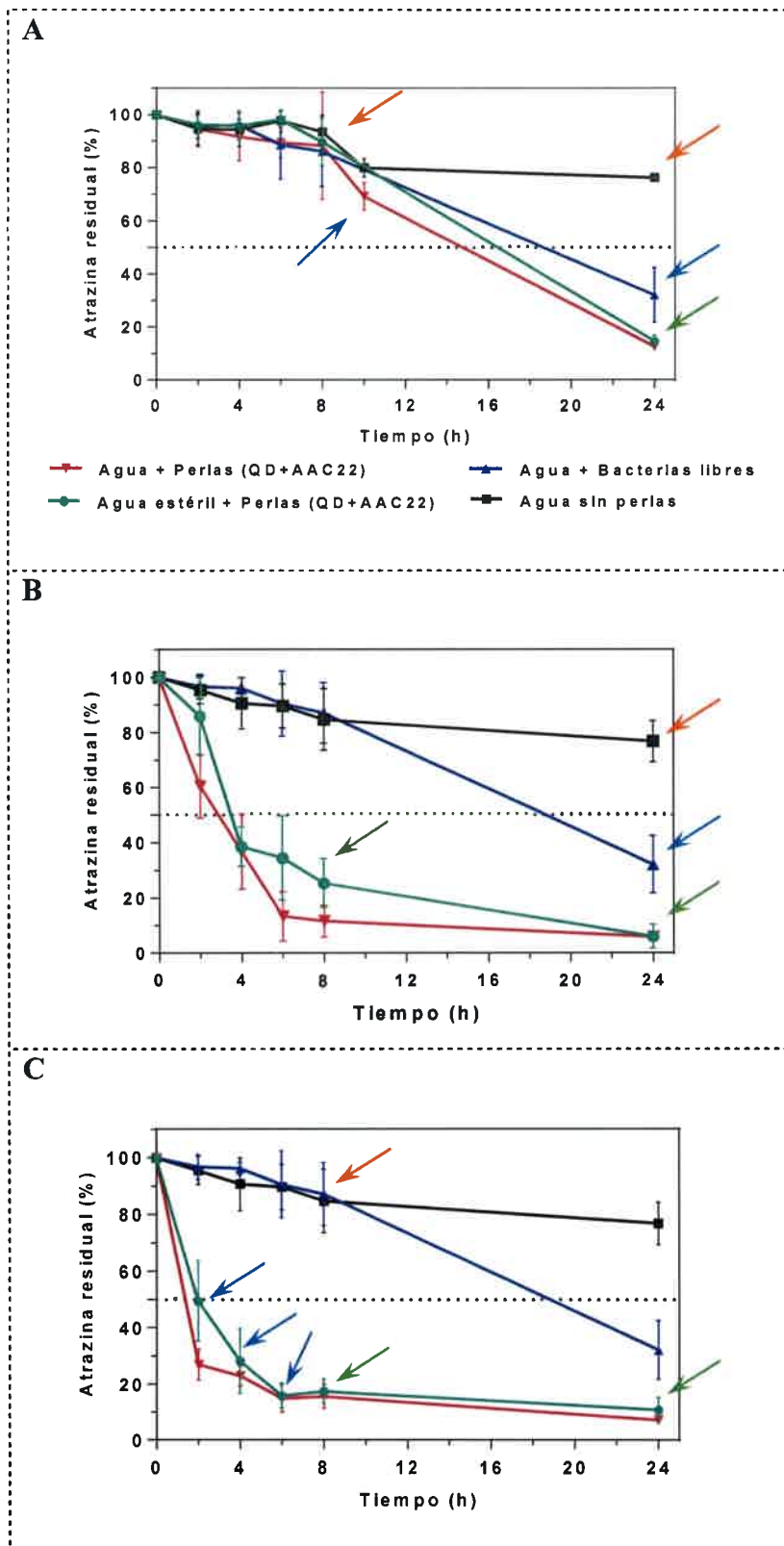
## 2. Biorremediación de atrazina en agua mediante estrategias de bioaumentación

### 2.2. Bioaumentación con AAC22 encapsuladas en perlas de Q derivatizado

Para determinar la capacidad de AAC22 inmovilizada en perlas de QD de remediar aguas contaminadas con atrazina se realizaron ensayos de bioaumentación en microcosmos. Se colectaron muestras de agua superficial de RTP (descrito en Capítulo 3, sección 1) a las que se adicionaron atrazina ( $100 \mu\text{g.L}^{-1}$ ) y 100 perlas de tamaño B (QD+AAC22). Se determinó la eficiencia de biodegradación del sistema y el recuento bacteriano en las perlas (UFC.mL<sup>-1</sup>) a partir del control 3) Agua estéril+ perlas (QD+AAC22). Con el objetivo de estudiar la posible reutilización de las perlas las mismas fueron reinoculadas sucesivamente en nuevos microcosmos (segundo y tercer uso). La estrategia de bioaumentación aplicada en este estudio resultó efectiva, ya que se evidenció la degradación total de atrazina (100%) con la consiguiente aparición del metabolito ácido cianúrico (**Figura 53 A, B y C**).

Como se puede observar, las sucesivas reinoculaciones de QD+AAC22 permitieron un incremento de la velocidad de degradación de atrazina, lo que se evidencia por la progresiva disminución de los  $T_{0,5}$  del herbicida en los tratamientos 1 y 2 (**Tabla 29**). A su vez, los recuentos de *Arthrobacter* sp. AAC22 dentro de las perlas se fueron incrementando luego de cada inoculación, lo que se relacionaría a que las células se encuentran metabólicamente activas y a que la disponibilidad de nutrientes favoreció eventos de división celular. Cabe destacar que al finalizar los ensayos de bioaumentación (24 h) las perlas no sufrieron modificaciones en su morfología y estructura, permaneciendo intactas y en condiciones de ser reutilizadas incluso luego de la tercer inoculación. Esta observación demuestra la estabilidad del QD en el tiempo, garantizando la eficiencia del sistema de inmovilización.

Conjuntamente, en el bioaumentación en microcosmos con agua estéril el  $T_{0,5}$  de atrazina fue mayor que en aquellos que contenían la microbiota nativa (agua no estéril), lo cual sugiere que las poblaciones nativas podrían estar cooperando con el proceso de degradación del herbicida.



**Figura 53.** Cinética de degradación de atrazina en ensayos de bioaumentación con AAC22. **A.** Perlas de primer uso; **B.** Perlas de segundo uso; **C.** Perlas de tercer uso. **Referencias:** Flecha roja: atrazina; flecha azul: mezcla de metabolitos; flecha verde: ácido cianúrico.

**Tabla 29.** Vida media de atrazina en las sucesivas reinoculaciones de perlas de QD+AAC22.

Ensayos	T <sub>0,5</sub> atrazina (h)		
	Perlas 1° uso	Perlas 2° uso	Perlas 3° uso
1. Agua+ perlas (QD+AAC22)	14,7	2,9	1,4
2. Agua+ bacterias libres	18,6	18,6	18,6
3. Agua estéril+ perlas (QD+AAC22)	16	13,5	2,1
4. Agua+perlas blanco (sin inocular)	-	-	-
5. Agua	-	-	-

(-) Controles 4 y 5: ausencia de degradación de atrazina.

A medida que se incrementó el uso de las perlas, la diferencia de T<sub>0,5</sub> de atrazina entre los microcosmos bioaumentados con perlas y aquellos inoculados con bacterias libres también aumentó (**Figuras 51 A, B y C**), evidenciando una mayor eficiencia de biodegradación. Por otra parte, aun cuando se inocula el mismo número de bacterias, las células inmovilizadas permiten una mayor eficiencia de degradación que las células libres, confirmando las ventajas de la inmovilización, que otorga protección a las bacterias degradadoras

Considerando que, según resultados previos (Capítulo 4, sección 1.1.) en RTP la microbiota nativa no posee capacidad para degradar atrazina, permaneciendo este herbicida como contaminante, la aplicación de bioaumento con QD+AAC22 en este ambiente resulta una estrategia de biorremediación sumamente ventajosa que favorece la eliminación de atrazina del agua. Por otra parte, dado que el monitoreo de atrazina en los cursos de agua superficial de la región en estudio reveló la presencia de algunos puntos críticos (CRP, CRI, LLS) en los cuales el herbicida es detectado con elevada frecuencia y en concentraciones que habitualmente exceden las normativas, esta estrategia de biorremediación podría ser aplicada para la depuración de estos ambientes.

En la actualidad existen sistemas disponibles para la recuperación de aguas contaminadas, los cuales en general suelen ser muy costosos desde un punto de vista económico. Además, puede suceder que la remediación de un contaminante no sea factible o efectiva con las tecnologías disponibles. Se dispone de algunos tratamientos comerciales de remediación de plaguicidas, aunque en general estos tratamientos se basan en procesos físicos o químicos. La empresa Lenntech (Países Bajos) propone la utilización de tecnologías de nanofiltración para la remoción de plaguicidas en aguas

superficiales y subterráneas. También ofrece la aplicación de filtros de carbón activado, para la remoción de concentraciones traza (ppb), a través de los cuales se hace pasar el agua a tratar. Cuando este lecho se satura y pierde la capacidad absorbente, se puede optar por desecharlo y sustituirlo o bien regenerarlo. Puntualmente, en el caso de atrazina diversos estudios proponen la utilización de la fotocatalisis para la degradación del herbicida, aunque esta metodología aun no se encuentra comercializada (Zahraa y col., 2003; Chan y col., 2004; Marchetti y col., 2013). Sus principales desventajas son que no permite la degradación total de atrazina, sino que sólo transforma el compuesto en ácido cianúrico. Además, dada su baja selectividad es capaz de actuar sobre diversas moléculas orgánicas presentes, e inclusive sobre organismos vivos, por lo que no resultan recomendables en aguas que se desean tratar y devolver al ambiente, sino que sólo serían aplicables en procesos de potabilización.

En este contexto, las estrategias de bioaumentación con bacterias nativas atrapadas en perlas de Q representan una alternativa de biorremediación emergente para el tratamiento de sitios contaminados con atrazina. Este polímero presenta como ventajas que es biocompatible, biodegradable y carece de toxicidad. Además se encuentra ampliamente disponible en la naturaleza siendo un importante subproducto de industria pesquera nacional, lo que lo convierte en una matriz de inmovilización más económica con respecto a otras frecuentemente utilizadas como el alginato.

En este trabajo, la modificación de la molécula de Q mediante N-alquilación reductora con glucosa produjo el bloqueo de los grupos amino primarios (-NH<sub>2</sub>), obteniéndose un gel de Q derivatizado (QD) que carece de actividad antimicrobiana. El QD puede ser empleado para la inmovilización bacterias naturalmente sensibles al Q nativo como el aislamiento *Arthrobacter* sp. AAC22, ofreciendo un sistema novedoso. A su vez, la modificación de la estructura de Q a través de la reticulación con TPP, no sólo le otorga mayor estabilidad estructural en condiciones de bajo pH, sino que también mejora sus características físico-químicas, tales como la porosidad, la permeabilidad, el área superficial y la capacidad de sorción.

Si bien la inmovilización en alginato comparte las mismas ventajas que el empleo de otras matrices poliméricas (como protección de la bacteria frente a predadores, reducción del estrés nutricional, preservación de la viabilidad celular, etc.) existen ciertas desventajas entre las que se destaca principalmente la sensibilidad del alginato

frente a agentes quelantes (como fosfato, citrato y/o iones magnesio), los cuales son naturalmente abundantes en ambientes como el suelo y cursos de agua. La interacción directa entre el alginato y los agentes mencionados reemplazan a los iones de calcio de la red entrecruzada del gel, desestabilizando las cápsulas y liberando las células inmovilizadas. Por lo tanto, la aplicación en procesos de biorremediación de agua y suelo se ve limitada en relación al tiempo y capacidad de protección del inóculo lo cual no ocurre cuando se emplea Q.

La degradación de atrazina en los microcosmos bioaumentados con las perlas de QD+AAC22 fue altamente efectivo, produciéndose la disipación total de atrazina dentro de las 24 h. Esta tecnología de biorremediación, que fue aplicada a escala de laboratorio, puede ser utilizada para el tratamiento de diversos sistemas contaminados con herbicidas, tales como aguas subterráneas y aguas superficiales, efluentes industriales, y eventualmente, en sedimentos o suelos contaminados. A diferencia de otros desarrollos biotecnológicos (Turtakovsky y col., 2000), de nuestro conocimiento este es el primer trabajo que describe la utilización de Q derivatizado con glucosa para la inmovilización de bacterias sensibles a Q nativo.



## CONCLUSIONES

- El aislamiento nativo *Arthrobacter* sp. AAC22 fue altamente sensible a Q nativo y su viabilidad se vio severamente afectada, por lo cual la inmovilización por encapsulación no representa un método adecuado para bacterias de esta especie.

- La estrategia de inmovilización de la cepa AAC22 por adherencia en perlas de Q nativo fue eficiente. Sin embargo, los altos recuentos bacterianos en el medio a decontaminar demuestran que este sistema no es óptimo para su aplicación en estrategias de biorremediación con AAC22.

- La derivatización de la molécula de Q con glucosa produjo el bloqueo de los grupos NH<sub>2</sub> disminuyendo la actividad antimicrobiana del compuesto y confiriéndole nuevas propiedades. Este compuesto (QD) resulta adecuado para la inmovilización de bacterias sensibles (como *Arthrobacter* sp. AAC22). Se observó una adecuada densidad y viabilidad bacteriana dentro de las perlas, garantizando la supervivencia de las células durante el almacenamiento.

- El bioaumento con perlas de QD+*Arthrobacter* sp. AAC22 fue eficiente dado que permitió la degradación del 100% atrazina dentro de las 6-8 h de ensayo y reducir el T<sub>0,5</sub> del herbicida en agua.

- **La inmovilización de *Arthrobacter* sp. AAC22 en perlas de QD con glucosa es un sistema biotecnológico adecuado para su aplicación en la biorremediación de aguas contaminadas con herbicidas s-triazinas y para la inmovilización de bacterias que no sean tolerantes al Q en su forma nativa.**

*Consideraciones  
Finales*

---

---

---

## CONSIDERACIONES FINALES

El empleo de herbicidas constituye una herramienta fundamental para la eliminación de malezas en los cultivos agrícolas, favoreciendo el incremento en la producción de alimentos. Actualmente, uno de los herbicidas de mayor utilización en Córdoba es la atrazina, miembro de la familia de las *s*-triazinas, que se aplica principalmente en cultivos de maíz, sorgo y alfalfa. Las propiedades de este herbicida, tales como su moderada solubilidad en agua, su alto PM y su bajo  $K_d$  determinan su relativamente alto potencial para alcanzar cuerpos de agua mediante escorrentía y/o lixiviación y de persistir en el ambiente. En este trabajo se monitoreó la presencia de atrazina en cuerpos de agua de la cuenca del río Tercero (ríos, canales, arroyos y lagunas) dado que constituyen importantes reservas de agua dulce de la región agrícola centro-sur de Córdoba. Resulta llamativo el hecho de que, durante el período de estudio (2011 - 2015) este herbicida ha sido sistemáticamente detectado en todos los sistemas evaluados, inclusive en épocas alejadas de su período de aplicación (con frecuencias de detección de 50-100% en primavera y de 33-67% en otoño). Conjuntamente, las concentraciones detectadas en algunos sitios (CRP, CRI y LLS) frecuentemente superaron las normativas internacionales, como la UE (2008/105/CE) o la CCME (2006), constituyendo un riesgo potencial para la salud humana y los organismos que habitan esos ecosistemas. Estos resultados revisten de gran importancia ya que son los primeros antecedentes de detección de atrazina en recursos hídricos de la región y demuestran el severo impacto que las prácticas agrícolas actuales ejercen sobre la calidad del agua de esta provincia. Conjuntamente, los conocimientos aportados en esta tesis son de claro aporte para los sectores socio/productivos a la vez que sientan precedentes para la actualización de las normativas nacionales vigentes y/o la formulación de nuevas reglamentaciones en pos de proteger a este recurso natural. En lo que respecta al retraso reglamentario, es notable que en nuestro país existen 276 plaguicidas habilitados para su uso por el SENASA y sólo 26 se encuentran prohibidos por este organismo. Además, entre los 30 plaguicidas más comercializados en Argentina, sólo uno está regulado en el CAA (ANMAT) y en las Normas Provinciales de Calidad de Agua (SsRH de Córdoba). En 2010 el Foro Ambiental Córdoba (<http://www.fundeps.org>) presentó a las autoridades provinciales una propuesta de actualización de la normativa, ya que sólo once plaguicidas son controlados en agua para bebida de los cuales nueve ya no se aplican desde hace varios años. Además, solicita incorporar a la atrazina dentro de la

lista de sustancias químicas a regular, dado que hasta el momento no está incluida. Finalmente, los resultados obtenidos demuestran la necesidad de generar y/o establecer nuevas políticas que permitan coordinar y controlar las actividades humanas, a fin de asegurar la protección del recurso agua.

En los ambientes acuáticos habitan una gran diversidad de organismos que constituyen complejas redes tróficas, en las cuales cada miembro es fundamental para el correcto funcionamiento del ecosistema. Cualquier perturbación que afecte a un grupo de organismos repercutirá en los miembros restantes, con efectos ecológicos difícilmente predecibles. El seguimiento de las comunidades microbianas en sitios contaminados permite analizar los cambios que ocurren ante la llegada del compuesto y sus posibles consecuencias. Dado que atrazina inhibe el proceso de fotosíntesis, los organismos fotosintéticos son los principales perjudicados. Consecuentemente, se producen efectos indirectos sobre otras poblaciones de microorganismos como las bacterias heterótrofas alterando, en general, las cadenas tróficas. A partir de los antecedentes anteriores, se decidió luego evaluar el efecto de atrazina sobre las comunidades bacterianas presentes en agua de dos agroecosistemas de la región. Mediante estudios microbiológicos, bioquímicos y moleculares en microcosmos, fue posible identificar que el herbicida favoreció el desarrollo de bacterias heterótrofas cultivables (MHC) tanto en ACR como RTP. La microbiota nativa de ACR es capaz de degradar atrazina, contribuyendo a su atenuación natural, debido a la presencia de genes catabólicos específicos (*trzN* y *atzBC*) de degradación de *s*-triazinas. Particularmente, se correlacionó con un marcado aumento de la actividad respiratoria de microorganismos degradadores de atrazina (MDA). Por el contrario en RTP la concentración del herbicida permaneció constante en el tiempo (28 días) probablemente debido a la ausencia de microorganismos con capacidad de degradarlo. Además, los análisis por DGGE revelaron cambios en la estructura de las comunidades nativas y aumentos en la Rr en los microcosmos de ACR y RTP ante la adición del herbicida. Estos conocimientos demuestran que la atrazina produce, efectivamente, modificaciones en las comunidades bacterianas nativas de los agroecosistemas estudiados, y constituye un primer acercamiento para la comprensión del impacto que ejerce este herbicida y la identificación de ambientes vulnerables.

La exposición prolongada de las comunidades microbianas a compuestos xenobióticos, como los herbicidas, permite la adaptación metabólica de algunos grupos microbianos que podrían contribuir con su biodegradación en los sitios contaminados. La selección de la

cepa bacteriana adecuada es un factor crítico para el diseño de estrategias de biorremediación. Estos microorganismos deben presentar la capacidad de degradar el herbicida y de adaptarse y sobrevivir en el sitio contaminado por períodos prolongados de tiempo (Seeger y col., 2010). En este sentido, resulta ventajoso el empleo de bacterias nativas adaptadas a las condiciones ambientales de la región, ya que generalmente presentan mayor eficiencia en la biorremediación que las bacterias exógenas. En este trabajo se obtuvo el primer aislamiento de Argentina, de aguas superficiales contaminadas con capacidad para degradar atrazina. La cepa bacteriana denominada *Arthrobacter* sp. AAC22 (N° Acceso KT591504) posee una capacidad de degradación de atrazina comparable a cepas de referencia como *Arthrobacter* sp. SD, MD y FD (Fernández y col., 2013) y *Arthrobacter* sp. AD1 (Cai y col., 2003). Puede degradar eficientemente el herbicida (100%) y reducir rápidamente su toxicidad. Coincidentemente con otras especies de *Arthrobacter* descritas, AAC22 inicia dicha degradación mediante la enzima TrzN, localizada en ADN plasmídico, hasta ácido cianúrico. Además, posee rápida velocidad de crecimiento, utiliza diferentes azúcares como fuentes de C (glucosa, manitol y sacarosa) y es capaz de crecer en un amplio rango de pH (5-9). La información presentada proporciona las bases fisiológicas y moleculares del metabolismo degradativo de este aislamiento nativo, a la vez que revelan su potencial uso como biocatalizador para su aplicación en procesos de biorremediación de ambientes acuáticos.

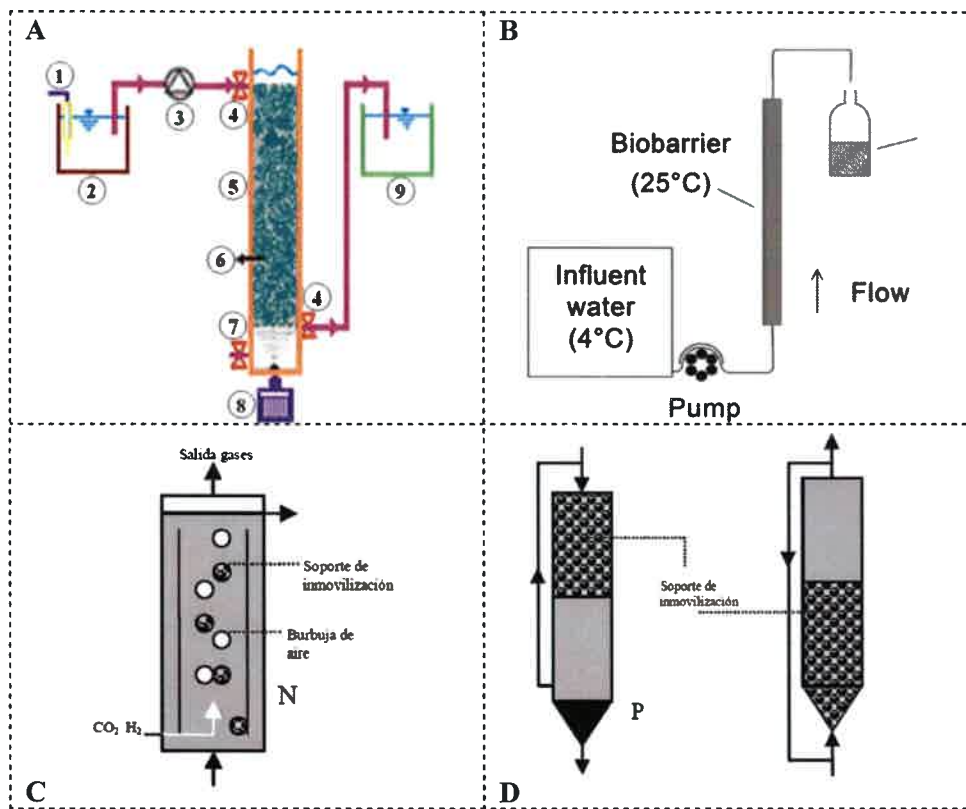
Las técnicas de biorremediación han cobrado gran interés comercial en las últimas décadas como consecuencia de las numerosas desventajas de los tratamientos físicos o químicos. Actualmente se cuenta con algunos sistemas que permiten la decontaminación de diferentes ambientes, sin embargo, la eficacia de estas técnicas se encuentra en continua discusión (Tyagi y col., 2011). La complejidad de las condiciones ambientales dificulta predecir *in situ* la actividad metabólica microbiana, la capacidad de adaptación de los microorganismos adicionados y su competencia ecológica. Para asegurar la supervivencia de las bacterias en el ambiente al que se las introduce, se propone como estrategia biotecnológica la inmovilización (encapsulación) de *Arthrobacter* sp. AAC22 en matriz de QD. La principal novedad de este desarrollo consistió en derivatizar la molécula de Q con glucosa, mediante N-alquilación reductora, a fin de bloquear los grupos amino primarios (-NH<sub>2</sub>) que posee Q. A diferencia del Q nativo, el QD obtenido no presenta actividad antimicrobiana, siendo posible su uso para la inmovilización de bacterias sensibles como por ejemplo, el aislamiento nativo AAC22. El sistema

compuesto por QD+AAC22 garantiza una óptima cinética de degradación y la remoción completa de atrazina, dado que la modificación de la matriz no afecta la difusión del herbicida. Adicionalmente, no se produce la deformación de las perlas de QD+AAC22 durante su almacenamiento a 4 °C (> 30 días). A la vez, constituye una metodología novedosa que puede efectivamente emplearse en la biorremediación de diferentes sistemas (como agua superficial o subterránea, sedimentos, etc.) dado que no se afecta la supervivencia ni el metabolismo de las células inmovilizadas.

Además, se ha demostrado que Q es un excelente agente quelante de metales pesados tóxicos (Cu, As, Zn) y una matriz adecuada para la adsorción de ciertos contaminantes orgánicos usualmente presentes aguas residuales como colorantes, taninos, fenoles, entre otros. El uso de Q en métodos de biorremediación, combinados con la inmovilización de microorganismos con capacidades catabólicas específicas es un área tecnológica muy prometedora dado que, a diferencia de otros polímeros la matriz es estable en el tiempo presentando un amplio potencial para numerosas aplicaciones ambientales.

Actualmente es escasa la información disponible acerca de la utilización de la biorremediación en aguas contaminadas con herbicidas. El estudio de la biorremediación de atrazina en agua se ha centrado en la utilización de tecnologías *ex situ*, mediante la utilización de diferentes tipos de reactores. Para la biorremediación de atrazina con células en suspensión se utilizan en general reactores discontinuos de tanque agitado (Biglione y col., 2008) mientras que para la aplicación de bacterias inmovilizadas se han desarrollado, por ejemplo, sistemas de filtros biológicos (Baghapour y col., 2013) y biobarreras (Hunter y col., 2008) (**Figura 54 A y B**). Otro tipo de reactores empleados en biorremediación con bacterias inmovilizadas son los reactores de tipo *gas lift* o *air lift* (**Figura 54 C**). Los *air lift* o *gas lift* son reactores de generalmente dos fases, con una gran diferencia de densidad entre ellas (gas-líquido o gas-suspensión) con agitación neumática. Se caracterizan por la circulación de fluido en un patrón cíclico definido a través de canales construidos específicamente para este propósito. Otra opción factible son los reactores de lecho fluidizado (**Figura 54 D**), los cuales se caracterizan por poseer un lecho de sólidos o partículas catalíticas soportado por un flujo de gas. Poseen múltiples ventajas ya que facilita la carga y la extracción del catalizador, permite una alta conversión del sustrato con un gran flujo, tienen una excelente transferencia de calor lo que permite un adecuado control de la temperatura y una distribución uniforme del catalizador, permitiendo una mayor duración del mismo. Dado que el diseño de todos los

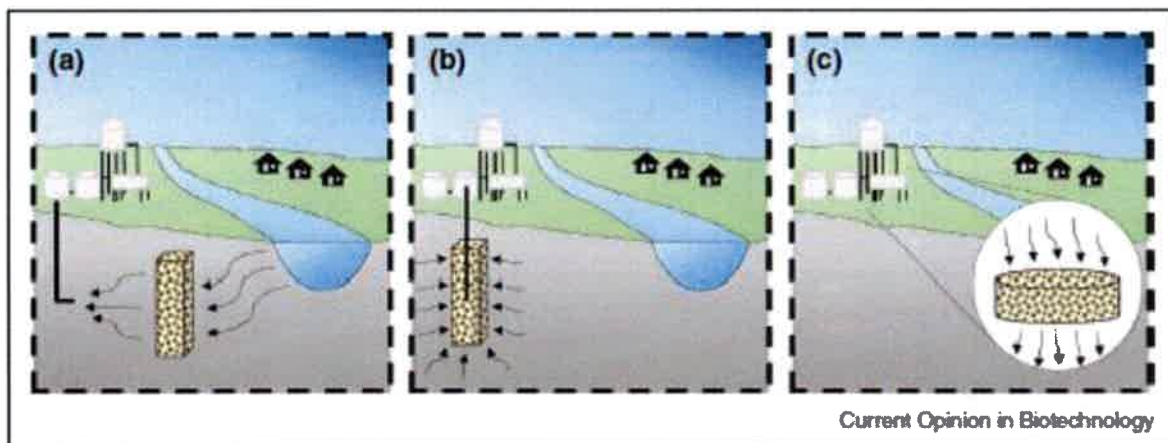
biorreactores descriptos permite la utilización de soportes o matrices sólidas, constituyen opciones factibles para ser empleados con perlas de QD+AAC22 en la biorremediación *ex situ* de aguas contaminadas con atrazina.



**Figura 54.** Biorreactores empleados en la biorremediación de contaminantes con bacterias inmovilizadas. **A.** sistemas de filtros biológicos (Baghapour y col., 2013); **B.** biobarreras (Hunter y col., 2008); **C.** Reactor tipo air lift o gas lift con células inmovilizadas; **D.** Reactores de lecho fluidizado de flujo descendente y ascendente (Hao y col., 1996; Hulshoff Pol y col., 1998).

Por otra parte, algunos trabajos proponen diferentes estrategias para la bioremediación *in situ* de aguas ambientales contaminadas con plaguicidas. Helbling (2015) presenta esquemas posibles de biofiltración (**Figura 55**) que se pueden implementar dentro de un sistema de potabilización de agua: **(a)** aplicación de la biofiltración en una zona previa a la toma de la planta de tratamiento de agua potable; **(b)** aplicación de la biofiltración directamente en la entrada a la planta de tratamiento de agua potable, donde el agua contaminada con plaguicidas es tratada previo a la potabilización tradicional y **(c)** aplicación de los biofiltros, en conjunto con métodos tradicionales de filtración, dentro de la planta de tratamiento de agua potable. Estas tres estrategias representan alternativas mediante las cuales el bioaumentación podría ser utilizado en procesos de potabilización para

la biorremediación de plaguicidas en agua subterránea, mientras que (c) podría aplicarse además en plantas depuradoras que se abastecen de cursos de agua superficial.



**Figura 55.** Esquemas generales de métodos de biorremediación de agua contaminada con plaguicidas dentro del sistema de extracción (Tomado de Helbling y col., 2015).

Considerando los antecedentes expuestos, las perlas de QD+AAC22 podrían emplearse para en diseño de biofiltros para su aplicación tanto *ex situ* como *in situ*. Dicho sistema podría aplicarse en las plantas depuradoras que extraen agua a partir de un curso de agua superficial o, eventualmente, de perforaciones subterráneas. No obstante, ante un evento de contaminación con este herbicida, se deberá seleccionar la estrategia de biorremediación más conveniente para su aplicación considerando las condiciones particulares del ambiente.



## PROYECCIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo de tesis doctoral sientan bases para el desarrollo de líneas de investigaciones. En este sentido, se propone:

- ✓ Realizar la detección y cuantificación de atrazina en acuíferos dado que constituyen importantes fuentes de agua dulce para la vida del hombre en áreas agrícolas de esta provincia.
- ✓ Realizar estudios de movilidad de atrazina en suelos del centro-sur de Córdoba, su potencial de lixiviación y persistencia en aguas subterráneas.
- ✓ Profundizar con estudios que permitan vincular la composición de las comunidades microbianas nativas de ambientes acuáticos impactados con su funcionalidad (expresión génica), mediante el empleo de técnicas de secuenciación masiva combinadas como la metagenómica y metatranscriptómica.
- ✓ Ensayar a escala piloto y/o en mesocosmos, la eficiencia de la biorremediación de atrazina empleando perlas de QD+AAC22 mediante sistemas de biorreactores de lecho fluidizado o de filtros biológicos.

# *Bibliografía*

---

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

### A

- Abdelaal, M. Y., Sobahi, T. R., & Al-Shareef, H. F. (2013). Modification of chitosan derivatives of environmental and biological interest: a green chemistry approach. *International journal of biological macromolecules*, 55, 231-239.
- Abril, A., Noe, L., & Merlo, C. (2010). Grupos metabólicos microbianos de la laguna Mar Chiquita (Córdoba, Argentina) y su implicancia en el ciclado de nutrientes. *Ecol Austral*, 20, 81-88.
- Abuknesha, R. A., & Griffith, H. M. (2004). Evaluation of a polyclonal antiserum to pentachlorothiophenol-acetic acid-KLH immunogen: binding properties and use with heterologous PCP derivatives in ELISA for pentachlorophenol. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 379(3), 411-418.
- Abu-Salah, K., Shelef, G., Levanon, D., & Armon, R. (1996). Microbial degradation of aromatic and polyaromatic toxic compounds adsorbed on powdered activated carbon. *Journal of Biotechnology*, 51(3), 265-272.
- Ackerman, F. (2007). The economics of atrazine. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 13(4), 437-445.
- Agaras, B., Wall, L. G., & Valverde, C. (2012). Specific enumeration and analysis of the community structure of culturable pseudomonads in agricultural soils under no-till management in Argentina. *Applied soil ecology*, 61, 305-319.
- Ager, D., Evans, S., Li, H., Lilley, A. K., & Van Der Gast, C. J. (2010). Anthropogenic disturbance affects the structure of bacterial communities. *Environmental microbiology*, 12(3), 670-678.
- Aggarwal, P. K., Means, J. L., Hinchee, R. E., Headington, G. L., & Gavaskar, A. R. (1990). *Methods to Select Chemicals for In Situ Biodegradation of Fuel Hydrocarbons*. BATTELLE COLUMBUS DIV OH.
- Aguayo, P., González, C., Barra, R., Becerra, J., & Martínez, M. (2014). Herbicides induce change in metabolic and genetic diversity of bacterial community from a cold oligotrophic lake. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 1101-1110.
- Ainsworth, A. M., & Goulder, R. (1998). Microbial organic-nitrogen transformations along the Swale-Ouse river system, Northern England. *Science of the total environment*, 210, 329-355.
- Aislabie, J., Bej, A. K., Ryburn, J., Lloyd, N., & Wilkins, A. (2005). Characterization of *Arthrobacter nicotinovorans* HIM, an atrazine-degrading bacterium, from agricultural soil New Zealand. *FEMS microbiology ecology*, 52(2), 279-286.
- Albarrán, A., Celis, R., Hermosín, M. C., Lopez-Pineiro, A., & Cornejo, J. (2004). Behaviour of simazine in soil amended with the final residue of the olive-oil extraction process. *Chemosphere*, 54(6), 717-724.
- Albillos García, S. M. (2003). Aplicación de la Electroforesis Capilar para el Análisis y Seguimiento del Grado de Maduración de Quesos de Oveja y Mezcla de la Provincia de Burgos. *Tesis doctoral*. Departamento de Biotecnología y Ciencia de los Alimentos Universidad de Burgos, Burgos (España).
- Alister, C., Araya, M., & Kogan, M. (2011). Effects of physicochemical soil properties of five agricultural soils on herbicide soil adsorption and leaching. *Ciencia e investigación agraria: revista latinoamericana de ciencias de la agricultura*, 38(2), 243-251.
- Allen, L. M., Briggles, T. V., & Pfaffenberger, C. D. (1982). Absorption and excretion of cyanuric acid in long-distance swimmers. *Drug metabolism reviews*, 13(3), 499-516.
- Allen-King, R. M., Schultheis, K. A., Schaumlöffel, C., & Keller, K. (2000). Mechanisms of Pesticide Transport to Surface Water at the Field Scale in a Dryland Agriculture Region. *Washington State University, Pullman*.

- Alvey, S., & Crowley, D. E. (1996). Survival and activity of an atrazine-mineralizing bacterial consortium in rhizosphere soil. *Environmental science & technology*, 30(5), 1596-1603.
- Al-Zuhair, S., & El-Naas, M. (2011). Immobilization of *Pseudomonas putida* in PVA gel particles for the biodegradation of phenol at high concentrations. *Biochemical engineering journal*, 56(1), 46-50.
- Anderson, K. L., Wheeler, K. A., Robinson, J. B., & Tuovinen, O. H. (2002). Atrazine mineralization potential in two wetlands. *Water Research*, 36(19), 4785-4794.
- Andrade, M., Covelo, E., & Alonso Vega, M. (2005). Influencia del manejo agrícola intensivo en la contaminación del suelo. *Revista Pilquen*, 7(7), 1-17.
- Andreu, V., & Picó, Y. (2004). Determination of pesticides and their degradation products in soil: critical review and comparison of methods. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 23(10), 772-789.
- ANEAS (Asociación Nacional de Empresas de Agua y Saneamiento de México) (2007). Agua para uso y consumo humano. Límites máximos permisibles de la calidad del agua, control y vigilancia de los sistemas de abastecimiento (PROYECTO de Norma Oficial Mexicana NOM-127-SSA). Asociación Nacional de Empresas de Agua y Saneamiento [en línea]. <http://www.aneas.com.mx/contenido/nom> (Acceso: 14/07/2016).
- Angelim, A. L., Costa, S. P., Farias, B. C. S., Aquino, L. F., & Melo, V. M. M. (2013). An innovative bioremediation strategy using a bacterial consortium entrapped in chitosan beads. *Journal of environmental management*, 127, 10-17.
- APHA, A. W. W. A. (2012). WEF.(2012). *Standard methods for the examination of water and wastewater*, 22.
- Aranaz, I., Mengíbar, M., Harris, R., Paños, I., Miralles, B., Acosta, N., Galed, G. & Heras, Á. (2009). Functional characterization of chitin and chitosan. *Current Chemical Biology*, 3(2), 203-230.
- Araya, R., Tani, K., Takagi, T., Yamaguchi, N., & Nasu, M. (2003). Bacterial activity and community composition in stream water and biofilm from an urban river determined by fluorescent in situ hybridization and DGGE analysis. *FEMS Microbiology Ecology*, 43(1), 111-119.
- Arbeli, Z., & Fuentes, C. (2010). Prevalence of the gene *trzN* and biogeographic patterns among atrazine-degrading bacteria isolated from 13 Colombian agricultural soils. *FEMS microbiology ecology*, 73(3), 611-623.
- Arias-Estévez, M., López-Periago, E., Martínez-Carballo, E., Simal-Gándara, J., Mejuto, J. C., & García-Río, L. (2008). The mobility and degradation of pesticides in soils and the pollution of groundwater resources. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 123(4), 247-260.
- Assaf, N. A., & Turco, R. F. (1994). Accelerated biodegradation of atrazine by a microbial consortium is possible in culture and soil. *Biodegradation*, 5(1), 29-35.
- Auge, M. (2007). Agua fuente de vida. *Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Ciencias Geológicas*.

## B

- Baghapour, M. A., Nasser, S., & Derakhshan, Z. (2013). Atrazine removal from aqueous solutions using submerged biological aerated filter. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 11(1), 1.
- Balázs, N., & Sipos, P. (2007). Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan. *Carbohydrate research*, 342(1), 124-130.
- Banerjee, A., & Ghoshal, A. K. (2011). Phenol degradation performance by isolated *Bacillus cereus* immobilized in alginate. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(7), 1052-1060.

- Barba Ho, E. L., (2002). Conceptos básicos de la contaminación del agua y parámetros de medición. In *Curso Internacional Gestión Integral del Tratamiento de Aguas Residuales* (pp. 1-51). UNC.
- Barbash, J. E., Thelin, G. P., Kolpin, D. W., & Gilliom, R. J. (2001). Major herbicides in ground water. *Journal of Environmental Quality*, 30(3), 831-845.
- Barchañska, H., & Baranowska, I. (2009). Procedures for analysis of atrazine and simazine in environmental matrices. In *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Vol 200* (pp. 53-84). Springer US.
- Barnes, R. J., van der Gast, C. J., Riba, O., Lehtovirta, L. E., Prosser, J. I., Dobson, P. J., & Thompson, I. P. (2010). The impact of zero-valent iron nanoparticles on a river water bacterial community. *Journal of hazardous materials*, 184(1), 73-80.
- Barriuso, E. (2000). Contaminaciones con pesticidas utilizados en agricultura: el comportamiento de los pesticidas en el suelo como base para la interpretación y la previsión de los riesgos de contaminación. Workshop Internacional sobre Contaminación de suelos y aguas por agroquímicos. XVII Congreso Argentino Ciencia del Suelo, Mar del Plata 11-14/4/00. Libro de resúmenes y Compact disk del Congreso.
- Barros, V. (2004). Segundo informe al proyecto de la Agenda Ambiental de Argentina, componente Cambio Climático. Fundación Torcuato Di Tella, 25 p. Buenos Aires.
- Barton, L. L., & Northup, D. E. (2011). Microbial Ecology: Beginnings and the Road Forward. *Microbial Ecology*, 1-28.
- Baysal, Ş. H., Önal, S., & Özdemir, G. (2009). Biosorption of chromium, cadmium, and cobalt from aqueous solution by immobilized living cells of *Chryseomonas luteola* TEM 05. *Preparative biochemistry & biotechnology*, 39(4), 419-428.
- Becerra, M. A., Hang, S., Díaz Zorita, M., & Mercuri, P. A. (2013). Aplicación de Sistemas de Información Geográfica para la Delimitación de Áreas con Diferente Capacidad de Adsorción de Atrazina.
- Bedmar, F. (2006) Seminario de Actualización Técnica "Manejo de Malezas". Sitio Argentino de Producción Animal.
- Bedmar, F., Daniel, P. E., Costa, J. L., & Giménez, D. (2011). Sorption of acetochlor, S-metolachlor, and atrazine in surface and subsurface soil horizons of Argentina. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 30(9), 1990-1996.
- Bell, C. W., Acosta-Martinez, V., McIntyre, N. E., Cox, S., Tissue, D. T., & Zak, J. C. (2009). Linking microbial community structure and function to seasonal differences in soil moisture and temperature in a Chihuahuan desert grassland. *Microbial ecology*, 58(4), 827-842.
- Benhabiles, M. S., Salah, R., Lounici, H., Drouiche, N., Goosen, M. F. A., & Mameri, N. (2012). Antibacterial activity of chitin, chitosan and its oligomers prepared from shrimp shell waste. *Food hydrocolloids*, 29(1), 48-56.
- Benimeli, C. S., Fuentes, M. S., Abate, C. M., & Amoroso, M. J. (2008). Bioremediation of lindane-contaminated soil by *Streptomyces* sp. M7 and its effects on *Zea mays* growth. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(3), 233-239.
- Benner, J., Helbling, D. E., Kohler, H. P. E., Wittebol, J., Kaiser, E., Prasse, C., Ternes, T.A., Albers, C.N. Aamand, J., Horemans, B., Springael, D., Walravens, E., & Boon, N. (2013). Is biological treatment a viable alternative for micropollutant removal in drinking water treatment processes? *Water research*, 47(16), 5955-5976.
- Benotti, M. J., Trenholm, R. A., Vanderford, B. J., Holady, J. C., Stanford, B. D., & Snyder, S. A. (2008). Pharmaceuticals and endocrine disrupting compounds in US drinking water. *Environmental science & technology*, 43(3), 597-603.

- Berghoff, C. F. (2011). Desarrollo y caracterización de matrices compuestas quitosano/polímero sintético para regeneración de tejido óseo. Tesis doctoral. UNLP. <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/2769>.
- Bickerstaff, G. F. (1995). Impact of genetic technology on enzyme technology. *Genetic Engineer and Biotechnologist*, 15(1), 13-30.
- Biglione, N., Rodgers, V. G. J., & Peeples, T. L. (2008). Determining Design and Scale-up Parameters for Degradation of Atrazine with Suspended *Pseudomonas* sp. ADP in Aqueous Bioreactors. *Biotechnology progress*, 24(3), 588-592.
- Birnbaum, L. S., & Fenton, S. E. (2003). Cancer and developmental exposure to endocrine disruptors. *Environmental health perspectives*, 111(4), 389.
- Blanchard, P. E., & Lerch, R. N. (2000). Watershed vulnerability to losses of agricultural chemicals: Interactions of chemistry, hydrology, and land-use. *Environmental science & technology*, 34(16), 3315-3322.
- Blarasin, M., Cabrera, A., Matteoda, E., Damilano, G., & Giuliano-Albo, J. (2008). Indicadores para evaluar cambios ambientales en acuíferos. Consideraciones sobre el fondo natural de la calidad de agua. *Evaluación de la sustentabilidad ambiental en sistemas agropecuarios*, 69-80.
- Blumhorst, M. R., & Weber, J. B. (1994). Chemical versus microbial degradation of cyanazine and atrazine in soils. *Pesticide Science*, 42(2), 79-84.
- Boettcher G., Nyer E.K. (2001). In situ bioremediation. *In situ Treatment Technology*. CRC Press, Boca Raton.
- Bolsa de Cereales de Córdoba. [www.bccba.com.ar](http://www.bccba.com.ar).
- Bonansea, R. I., Amé, M. V., & Wunderlin, D. A. (2013). Determination of priority pesticides in water samples combining SPE and SPME coupled to GC-MS. A case study: Suquia River basin (Argentina). *Chemosphere*, 90(6), 1860-1869.
- Borba da Cunha, A. C., Lopez de Alda, M. J., Barcelo, D., Pizzolato, T. M., & Dos Santos, J. H. Z. (2004). Multianalyte determination of different classes of pesticides (acidic, triazines, phenyl ureas, anilines, organophosphates, molinate and propanil) by liquid chromatography-electrospray-tandem mass spectrometry: Liquid chromatography-mass spectrometry. *Analytical & bioanalytical chemistry*, 378(4), 940-954.
- Bottoni, P., Grenni, P., Lucentini, L., & Caracciolo, A. B. (2013). Terbutylazine and other triazines in Italian water resources. *Microchemical Journal*, 107, 136-142.
- Boundy-Mills, K. L., De Souza, M. L., Mandelbaum, R. T., Wackett, L. P., & Sadowsky, M. J. (1997). The atzB gene of *Pseudomonas* sp. strain ADP encodes the second enzyme of a novel atrazine degradation pathway. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 916-923.
- Bouquard, C., Ouazzani, J., Prome, J., Michel-Briand, Y., & Plesiat, P. (1997). Dechlorination of Atrazine by a *Rhizobium* sp. Isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(3), 862-866.
- Bricheux, G., Le Moal, G., Hennequin, C., Coffe, G., Donnadieu, F., Portelli, C., Jacques Bohatier, J. & Forestier, C. (2013). Characterization and evolution of natural aquatic biofilm communities exposed in vitro to herbicides. *Ecotoxicology and environmental safety*, 88, 126-134.
- Brockman, F. J. (1995). Nucleic-acid-based methods for monitoring the performance of in situ bioremediation. *Molecular Ecology*, 4(5), 567-578.
- Brockway, D. L., Smith, P. D., & Stancil, F. E. (1984). Fate and effects of atrazine in small aquatic microcosms. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 32(1), 345-353.
- Byer, J. D., Struger, J., Sverko, E., Klawunn, P., & Todd, A. (2011). Spatial and seasonal variations in atrazine and metolachlor surface water concentrations in Ontario (Canada) using ELISA. *Chemosphere*, 82(8), 1155-1160.

C

- Cabrera, A., Cox, L., Koskinen, W. C., & Sadowsky, M. J. (2008). Availability of triazine herbicides in aged soils amended with olive oil mill waste. *Journal of agricultural and food chemistry*, 56(11), 4112-4119.
- Cai, B., Han, Y., Liu, B., Ren, Y., & Jiang, S. (2003). Isolation and characterization of an atrazine-degrading bacterium from industrial wastewater in China. *Letters in Applied Microbiology*, 36(5), 272-276.
- Calva, L., & Torres, M. (1998). Plaguicidas organoclorados. *Revista Contactos*, 30, 35-46.
- CCME (Canadian Council of Ministers of the Environment), Canadian Environmental Quality Guidelines, 2006.
- Carabias-Martínez, R., Rodríguez-Gonzalo, E., Miranda-Cruz, E., Domínguez-Álvarez, J., & Hernández-Méndez, J. (2006). Comparison of a non-aqueous capillary electrophoresis method with high performance liquid chromatography for the determination of herbicides and metabolites in water samples. *Journal of Chromatography A*, 1122(1), 194-201.
- Caracciolo, A. B., Fajardo, C., Grenni, P., Saccà, M. L., Amalfitano, S., Ciccoli, R., Martín, M. & Gibello, A. (2010). The role of a groundwater bacterial community in the degradation of the herbicide terbuthylazine. *FEMS microbiology ecology*, 71(1), 127-136.
- Carafa, R., J. Wollgast, E. Canuti, J. Lighthart, S. Dueri, S.J. Eisenreich, P. Viaroli, Zaldivar J. M. (2006). Analysis of selected herbicides and related metabolites in a coastal lagoon under the influence of water runoff. Water column. EUR report n° 22262 EN.
- Carignano, C. (1996). Evolucion geomorfológica de las planicies en la Provincia de Cordoba durante el Pleistoceno superior. *Revista del Instituto de Geología y Minería* 11: 7-26.
- Carignano, C. (1997a). Caracterización y evolución durante el Cuaternario superior de los ambientes geomorfológicos extraserranos en el noroeste de la Provincia de Córdoba. Tesis Doctoral. Universidad Nacional de Córdoba (inedita), 208 p. Córdoba.
- Carignano, C. (1997b). El Holoceno de la Provincia de Córdoba. *Revista del Instituto de Geología y Minería de la Universidad Nacional de Jujuy*; Lugar: San Salvador de Jujuy 11: 1-20.
- Carignano, C. (1999). Late Pleistocene to recent climate change in Córdoba province, Argentina: geomorphological evidence. *Quaternary International* 57-58: 117-134.
- Carr, G. M., & Neary, J. P. (2008). *Water quality for ecosystem and human health*. UNEP/Earthprint.
- Casado-Murillo, N., & Abril, A. (2011). Crop residue contribution to N fertilization under long term no-till systems in the central semiarid region of Argentina. *Semi-arid Ecosystems: Agriculture, Water Supply and Vegetation*, 63-82.
- CASAFE, 2013. Mercado Argentino de Productos fitosanitarios, 2013. <http://casafe.org.ar/estad/Mercado2013.htm>
- Casamayor, E. O., Schäfer, H., Bañeras, L., Pedrós-Alió, C., & Muyzer, G. (2000). Identification of and spatio-temporal differences between microbial assemblages from two neighboring sulfurous lakes: comparison by microscopy and denaturing gradient gel electrophoresis. *Applied and environmental microbiology*, 66(2), 499-508.
- Castañedas, E. y Barros, V. (1994). Las tendencias de la precipitación en el Cono Sur de América al Este de los Andes. *Meteorológica* 19: 23-32.
- Cedergreen, N., & Streibig, J. C. (2005). The toxicity of herbicides to non-target aquatic plants and algae: assessment of predictive factors and hazard. *Pest management science*, 61(12), 1152-1160.
- Celis, R., Barriuso, E., & Houot, S. (1998). Effect of liquid sewage sludge addition on atrazine sorption and desorption by soil. *Chemosphere*, 37(6), 1091-1107.

- Cerdeira, A. L., Santos, N. A. G., Ueta, J., Shuhama, I. K., Pessoa, M. C. P. Y., Smith, S., & Lanchote, V. L. (2004). Atrazine in water and biodegradation in a recharge area of Guarany Aquifer in Brazil. *Bulletin of environmental contamination and toxicology*, 73(1), 117-124.
- Chan, C. Y., Tao, S., Dawson, R., & Wong, P. K. (2004). Treatment of atrazine by integrating photocatalytic and biological processes. *Environmental Pollution*, 131(1), 45-54.
- Chen, F., Shi, Z., Neoh, K. G., & Kang, E. T. (2009). Antioxidant and antibacterial activities of eugenol and carvacrol-grafted chitosan nanoparticles. *Biotechnology and bioengineering*, 104(1), 30-39.
- Chen, F., Wang, M., Zheng, Y., Li, S., Wang, H., Han, D., & Guo, S. (2013). The effect of biocontrol bacteria on rhizosphere bacterial communities analyzed by plating and PCR-DGGE. *Current microbiology*, 67(2), 177-182.
- Chen, Y. M., Lin, T. F., Huang, C., Lin, J. C., & Hsieh, F. M. (2007). Degradation of phenol and TCE using suspended and chitosan-bead immobilized *Pseudomonas putida*. *Journal of Hazardous Materials*, 148(3), 660-670.
- Cheng, G., Shapir, N., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2005). Allophanate hydrolase, not urease, functions in bacterial cyanuric acid metabolism. *Applied and environmental microbiology*, 71(8), 4437-4445.
- Cheng, H.H. (1990). Pesticides in the soil environment—An Overview. Chapter 1: 1-5. In: Pesticides in the soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling. Ed. Cheng, H.H. SSSA, Inc. Madison, USA.
- Chitiva Urbina, L., & Dussan, J. (2003). Evaluación de matrices para la inmovilización de *Pseudomonas* spp. en biorremediación de fenol. *Revista colombiana de biotecnología*, 5(2), 5-10.
- Christensen, T. H., Kjeldsen, P., Bjerg, P. L., Jensen, D. L., Christensen, J. B., Baun, A., Albrechtsen, H. & Heron, G. (2001). Biogeochemistry of landfill leachate plumes. *Applied geochemistry*, 16(7), 659-718.
- Chung, B. S., Ryu, S. H., Park, M., Jeon, Y., Chung, Y. R., & Jeon, C. O. (2007). *Hydrogenophaga caeni* sp. nov., isolated from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 57(5), 1126-1130.
- Chung, S. W., & Gu, R. R. (2003). Estimating time-variable transformation rate of atrazine in a reservoir. *Advances in Environmental Research*, 7(4), 933-947.
- Chung, Y. C., & Chen, C. Y. (2008). Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan. *Bioresource Technology*, 99(8), 2806-2814.
- Cinara Rojas, M., Verwey, A. (2003). Análisis de sensibilidad de un modelo hidrodinámico en SOBEK para manejo de humedales. Seminario internacional la hidroinformática en la gestión integrada de los recursos hídricos.
- Close, M. E., & Flintoft, M. J. (2004). National survey of pesticides in groundwater in New Zealand—2002. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 38(2), 289-299.
- Código Alimentario Argentino (CAA), capítulo XII. (2012). Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas\\_alimentos\\_caa.asp](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/normativas_alimentos_caa.asp), Revisado: 14/07/2016)
- Cohen, S. Z., Wauchope, R. D., Klein, A. W., Eadsforth, C. V., & Graney, R. L. (1995). Pesticides report 35. Offsite transport of pesticides in water: Mathematical models of pesticide leaching and runoff (Technical Report). *Pure and applied chemistry*, 67(12), 2109-2148.
- Comfort, S. D., Shea, P. J., & Roeth, F. W. (1994). EC94-135 Understanding Pesticides and Water Quality in Nebraska.
- Consejo Nacional Asesor del Medio Ambiente (CONAMA) de Brasil (<http://www.mma.gov.br/port/conama/>). Resolución N° 357 (2005).
- Cook, A. M. (1987). Biodegradation of s-triazine xenobiotics. *FEMS Microbiology Reviews*, 3(2), 93-116.



- Cook, A. M., & Hütter, R. (1981). s-Triazines as nitrogen sources for bacteria. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 29(6), 1135-1143.
- Cook, A. M., Beilstein, P., Grossenbacher, H., & Hütter, R. (1985). Ring cleavage and degradative pathway of cyanuric acid in bacteria. *Biochemical Journal*, 231(1), 25-30.
- Cox, L., Celis, R., Hermosin, M. C., Becker, A., & Cornejo, J. (1997). Porosity and herbicide leaching in soils amended with olive-mill wastewater. *Agriculture, ecosystems & environment*, 65(2), 151-161.
- Cox, L., Celis, R., Hermosin, M. C., Cornejo, J., Zsolnay, A., & Zeller, K. (2000). Effect of organic amendments on herbicide sorption as related to the nature of the dissolved organic matter. *Environmental science & technology*, 34(21), 4600-4605.
- Crocker, F. H., Fredrickson, J. K., White, D. C., Ringelberg, D. B., & Balkwill, D. L. (2000). Phylogenetic and physiological diversity of *Arthrobacter* strains isolated from unconsolidated subsurface sediments. *Microbiology*, 146(6), 1295-1310.
- Crouzet, O., Poly, F., Bonnemoy, F., Bru, D., Batisson, I., Bohatier, J., Philippot, L. & Mallet, C. (2016). Functional and structural responses of soil N-cycling microbial communities to the herbicide mesotrione: a dose-effect microcosm approach. *Environmental Science and Pollution Research*, 23(5), 4207-4217.
- Cummings, D. E., Snoeyenbos-West, O. L., Newby, D. T., Niggemyer, A. M., Lovley, D. R., Achenbach, L. A., & Rosenzweig, R. F. (2003). Diversity of *Geobacteraceae* species inhabiting metal-polluted freshwater lake sediments ascertained by 16S rDNA analyses. *Microbial ecology*, 46(2), 257-269.
- Cunliffe, M., Kawasaki, A., Fellows, E., & Kertesz, M. A. (2006). Effect of inoculum pretreatment on survival, activity and catabolic gene expression of *Sphingobium yanoikuyae* B1 in an aged polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated soil. *FEMS microbiology ecology*, 58(3), 364-372.
- Cunningham, C. J., Ivshina, I. B., Lozinsky, V. I., Kuyukina, M. S., & Philp, J. C. (2004). Bioremediation of diesel-contaminated soil by microorganisms immobilised in polyvinyl alcohol. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 54(2), 167-174.
- Curran, W. S. (1998). Persistence of herbicides in soil, Agronomy Facts 36.PA: Penn State College of Agricultural Sciences, University Park.
- Cycoń, M., Markowicz, A., & Piotrowska-Seget, Z. (2013). Structural and functional diversity of bacterial community in soil treated with the herbicide napropamide estimated by the DGGE, CLPP and r/K-strategy approaches. *Applied soil ecology*, 72, 242-250.

## D

- Danial, E. N., Elnashar, M. M., & Awad, G. E. (2010). Immobilized inulinase on grafted alginate beads prepared by the one-step and the two-steps methods. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 49(7), 3120-3125.
- Dasso, C. M., Piovano, E. L., Pasquini, A. I., Córdoba, F. E., Lecomte, K. L., Guerra, L., & Campodónico, V. A. (2014). Recursos hídricos superficiales. In *Relatorio del XIX Congreso Geológico Argentino: Geología y Recursos Naturales de la Provincia de Córdoba (RD Martino, AB Guerreschi, Ed). Asociación Geológica Argentina* (pp. 1209-1231).
- De Gerónimo, E., Aparicio, V. C., Bárbaro, S., Portocarrero, R., Jaime, S., & Costa, J. L. (2014). Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere*, 107, 423-431.
- De Liphay, J. R., Tuxen, N., Johnsen, K., Hansen, L. H., Albrechtsen, H. J., Bjerg, P. L., & Aamand, J. (2003). In situ exposure to low herbicide concentrations affects microbial population composition and catabolic gene frequency in an aerobic shallow aquifer. *Applied and environmental microbiology*, 69(1), 461-467.

- De Souza, M. L., Newcombe, D., Alvey, S., Crowley, D. E., Hay, A., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (1998a). Molecular basis of a bacterial consortium: interspecies catabolism of atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(1), 178-184.
- De Souza, M. L., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (1996). Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. strain ADP: gene sequence, enzyme purification, and protein characterization. *Journal of Bacteriology*, 178(16), 4894-4900.
- De Souza, M. L., Seffernick, J., Martinez, B., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (1998b). The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology*, 180(7), 1951-1954.
- De Souza, M. L., Wackett, L. P., Boundy-Mills, K. L., Mandelbaum, R. T., & Sadowsky, M. J. (1995). Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Applied and environmental microbiology*, 61(9), 3373-3378.
- Dehghani, M., Nasser, S., & Hashemi, H. (2013). Study of the bioremediation of atrazine under variable carbon and nitrogen sources by mixed bacterial consortium isolated from corn field soil in Fars Province of Iran. *Journal of environmental and public health*, 973165-973165.
- Delgado-Moreno, L., & Peña, A. (2009). Compost and vermicompost of olive cake to bioremediate triazines-contaminated soil. *Science of the total environment*, 407(5), 1489-1495.
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., & Ross, P. E. (1999). Effects of the agricultural pesticides atrazine, deethylatrazine, endosulfan, and chlorpyrifos on an estuarine microbial food web. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(12), 2824-2835.
- DeLorenzo, M. E., Scott, G. I., & Ross, P. E. (2001). Toxicity of pesticides to aquatic microorganisms: a review. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 84-98.
- Demnerová, K., Mackova, M., Speváková, V., Beranova, K., Kochánková, L., Lovecká, P., Ryslavá, E., & Macek, T. (2005). Two approaches to biological decontamination of groundwater and soil polluted by aromatics-characterization of microbial populations. *International microbiology: the official journal of the Spanish Society for Microbiology*, 8(3), 205-211.
- Detenbeck, N. E., Hermanutz, R., Allen, K., & Swift, M. C. (1996). Fate and effects of the herbicide atrazine in flow-through wetland mesocosms. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 15(6), 937-946.
- Devers, M., El Azhari, N., Kolic, N. U., & Martin-Laurent, F. (2007a). Detection and organization of atrazine-degrading genetic potential of seventeen bacterial isolates belonging to divergent taxa indicate a recent common origin of their catabolic functions. *FEMS microbiology letters*, 273(1), 78-86.
- Devers, M., Rouard, N., & Martin-Laurent, F. (2007b). Genetic rearrangement of the *atzAB* atrazine-degrading gene cassette from pADP1: Tn5 to the chromosome of *Variovorax* sp. MD1 and MD2. *Gene*, 392(1), 1-6.
- Devers, M., Soulas, G., & Martin-Laurent, F. (2004). Real-time reverse transcription PCR analysis of expression of atrazine catabolism genes in two bacterial strains isolated from soil. *Journal of Microbiological Methods*, 56(1), 3-15.
- Díaz-Báez, M. C., Bustos-López, M. C. & Espinosa-Ramírez, A. J. (2004). Pruebas de toxicidad acuática; fundamentos y métodos. *Universidad Nacional de Colombia, Bogotá*, 142.
- Dinamarca, M. A., Cereceda-Balic, F., Fadic, X., & Seeger, M. (2007). Analysis of s-triazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number enumeration and tetrazolium-salt detection. *INTERNATIONAL MICROBIOLOGY*, 10, 209-215.
- Dorigo, U., Bérard, A., & Humbert, J. F. (2002). Comparison of eukaryotic phyto-benthic community composition in a polluted river by partial 18S rRNA gene cloning and sequencing. *Microbial ecology*, 44(4), 372-380.

- Dorigo, U., Bourrain, X., Berard, A., & Leboulanger, C. (2004). Seasonal changes in the sensitivity of river microalgae to atrazine and isoproturon along a contamination gradient. *Science of the Total Environment*, 318(1), 101-114.
- Dorigo, U., Lefranc, M., Leboulanger, C., Montuelle, B., & Humbert, J. F. (2009). Spatial heterogeneity of periphytic microbial communities in a small pesticide-polluted river. *FEMS microbiology ecology*, 67(3), 491-501.
- Doronina, N., Kaparullina, E., & Trotsenko, Y. (2014). The Family Methylophilaceae. *The Prokaryotes: Alphaproteobacteria and Betaproteobacteria*, 869-880.
- Douglass, J. F., Radosevich, M., & Tuovinen, O. H. (2015). Molecular analysis of atrazine-degrading bacteria and catabolic genes in the water column and sediment of a created wetland in an agricultural/urban watershed. *Ecological Engineering*, 83, 405-412.
- Downing, H. F., Delorenzo, M. E., Fulton, M. H., Scott, G. I., Madden, C. J., & Kucklick, J. R. (2004). Effects of the agricultural pesticides atrazine, chlorothalonil, and endosulfan on South Florida microbial assemblages. *Ecotoxicology*, 13(3), 245-260.
- Drever, J.I. 1997. *The Geochemistry of Natural Waters. Surface and Groundwater Environments*, 2<sup>o</sup> Edición, Prentice Hall, 436 p. New Jersey.
- Du Preez, L. H., Van Rensburg, P. J., Jooste, A. M., Carr, J. A., Giesy, J. P., Gross, T. S., Smith, E.E., Van Der Kraak, G. & Solomon, K. R. (2005). Seasonal exposures to triazine and other pesticides in surface waters in the western Highveld corn-production region in South Africa. *Environmental Pollution*, 135(1), 131-141.
- Dua, M., Singh, A., Sethunathan, N., & Johri, A. (2002). Biotechnology and bioremediation: successes and limitations. *Applied microbiology and biotechnology*, 59(2-3), 143-152.
- Duhigg, C. (2009). Debating how much weed killer is safe in your water glass. *The New York Times*, 22.
- Dutta, A., Vasudevan, V., Nain, L., & Singh, N. (2016). Characterization of bacterial diversity in an atrazine degrading enrichment culture and degradation of atrazine, cyanuric acid and biuret in industrial wastewater. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 51(1), 24-34.

## E

- Ehrhardt, H. M., & Rehm, H. J. (1989). Semicontinuous and continuous degradation of phenol by *Pseudomonas putida* P8 adsorbed on activated carbon. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 30(3), 312-317.
- Elnashar, M. M. M. (2005). *Development of a Novel Matrix for the Immobilisation of Enzymes for Biotechnology* (Doctoral dissertation, University of Leeds).
- El Sebaï, T., Devers-Lamrani, M., Changey, F., Rouard, N., & Martin-Laurent, F. (2011). Evidence of atrazine mineralization in a soil from the Nile Delta: isolation of *Arthrobacter* sp. TES6, an atrazine-degrading strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(8), 1249-1255.
- Elnashar, M.M. (2005). Ph.D. thesis entitled *Development of a Novel Matrix for the Immobilization of Enzymes for Biotechnology*. Leeds University, UK.
- Elnashar, M. M., & Yassin, M. A. (2009). Covalent immobilization of  $\beta$ -galactosidase on carrageenan coated with chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 114(1), 17-24.
- Elnashar, M.M. (2011). The art of immobilization using biopolymers, biomaterials and nanobiotechnology. In: Elnashar, M.M.M. (Ed.), *Biotechnology of Biopolymers*. InTech, 3-32.
- Ensz, A. P., Knapp, C. W., & Graham, D. W. (2003). Influence of autochthonous dissolved organic carbon and nutrient limitation on alachlor biotransformation in aerobic aquatic systems. *Environmental science & technology*, 37(18), 4157-4162.
- Erickson, L. E., Lee, K. H., & Sumner, D. D. (1989). Degradation of atrazine and related s-triazines. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 19(1), 1-14.

- Evy, A.A.M., Lakshmi, V., Nilanjana, D. (2012). Microbial degradation of Atrazine, commonly used herbicide. *Int J Advanc Biol Res*, 2(1):16–23.

## F

- Fan, W., Yanase, T., Morinaga, H., Gondo, S., Okabe, T., Nomura, M., Hayes, T.B., Takayanagi, R. & Nawata, H. (2007). Herbicide atrazine activates SF-1 by direct affinity and concomitant co-activators recruitments to induce aromatase expression via promoter II. *Biochemical and biophysical research communications*, 355(4), 1012-1018.
- Fang, H., Lian, J., Wang, H., Cai, L., & Yu, Y. (2015). Exploring bacterial community structure and function associated with atrazine biodegradation in repeatedly treated soils. *Journal of hazardous materials*, 286, 457-465.
- FAO (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (2006). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas.
- FAO, (Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación) (1997). Lucha Contra la Contaminación Agrícola de los Recursos Hídricos. (Estudio FAO Riego y Drenaje - 55) ISBN 92-5-303875-6. Disponible en <http://www.fao.org/docrep/W2598S/w2598s06.htm>.
- Farnham, I. M., Singh, A. K., Stetzenbach, K. J., & Johannesson, K. H. (2002). Treatment of nondetects in multivariate analysis of groundwater geochemistry data. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 60(1), 265-281.
- Fazlurrahman, Batra, M., Pandey, J., Suri, C. R., & Jain, R. K. (2009). Isolation and characterization of an atrazine-degrading *Rhodococcus* sp. strain MB-P1 from contaminated soil. *Letters in applied microbiology*, 49(6), 721-729.
- Febria, C. M., Fulthorpe, R. R., & Williams, D. D. (2010). Characterizing seasonal changes in physicochemistry and bacterial community composition in hyporheic sediments. *Hydrobiologia*, 647(1), 113-126.
- Fenoll, J., Vela, N., Navarro, G., Pérez-Lucas, G., & Navarro, S. (2014). Assessment of agro-industrial and composted organic wastes for reducing the potential leaching of triazine herbicide residues through the soil. *Science of the Total Environment*, 493, 124-132.
- Fernández, L. A., Valverde, C., & Gómez, M. A. (2013). Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strains from Argentine agricultural soils. *Annals of microbiology*, 63(1), 207-214.
- Ferpozzi, L. (1988a). Principales rasgos geomorfológicos y dinámica hídrica de un sector de la llanura sudoriental de la Provincia de Córdoba, República Argentina. 2o Simposio Latinoamericano sobre Sensores Remotos, Actas. p. 23. Bogotá.
- Ferpozzi, L. (1988b). Paleoformas eólicas reconocidas entre los 32° y 33° 45' lat. S, en un sector de la llanura sudoriental de la Provincia de Córdoba, República Argentina. 2o Simposio Latinoamericano sobre Sensores Remotos; Actas 32 p. Bogotá.
- Fierro, S., del Pilar Sánchez-Saavedra, M., & Copalcua, C. (2008). Nitrate and phosphate removal by chitosan immobilized *Scenedesmus*. *Bioresource technology*, 99(5), 1274-1279.
- Fishel F.M. (2005). Pesticide- Organism Interactions, PI-43 Document, Pesticide Information Office, Florida Cooperative Extension Service, Institute of Food and Agricultural Sciences, University of Florida.
- Foght, J., April, T., Biggar, K., & Aislabie, J. (2001). Bioremediation of DDT-contaminated soils: a review. *Bioremediation Journal*, 5(3), 225-246.
- Forney, D. R., & Davis, D. E. (1981). Effects of low concentrations of herbicides on submersed aquatic plants. *Weed Science*, 677-685.

- Forney, L. J., Zhou, X., & Brown, C. J. (2004). Molecular microbial ecology: land of the one-eyed king. *Current opinion in microbiology*, 7(3), 210-220.
- Foro ambiental Córdoba. Disponible en: <http://foroambientalcba.org.ar/informe-sobre-la-necesidad-de-actualizar-la-nomina-de-plaguicidas-y-cianotoxinas-indicadas-en-las-normas-provinciales-de-calidad-y-control-de-aguas-para-bebida-resolucion-dipas-608-del-ano-1993/>. Consultado el 14/07/2016).
- Franck, M., Kolar, V., & Eremin, S. A. (1995). Enzyme immunoassays for s-triazine herbicides and their application in environmental and food analysis. *Analytica chimica acta*, 311(3), 349-356.
- Frazar, C. (2000). The bioremediation and phytoremediation of pesticide-contaminated sites. *US Environmental Protection Agency, Office of Solid Waste and Emergency Response Technology Innovation Office, Washington DC*.
- Freitas, L. G., Singer, H., Müller, S. R., Schwarzenbach, R. P., & Stamm, C. (2008). Source area effects on herbicide losses to surface waters—a case study in the Swiss Plateau. *Agriculture, ecosystems & environment*, 128(3), 177-184.
- Friedman, M., & Juneja, V. K. (2010). Antimicrobial and other Beneficial Applications of Chitosans. CAB International. *Natural Antimicrobials in Food Safety and Quality* (eds M. Rai and M. Chikindas), 131-153.
- Fruchey, I., Shapir, N., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2003). On the origins of cyanuric acid hydrolase: purification, substrates, and prevalence of AtzD from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and environmental microbiology*, 69(6), 3653-3657.
- Funari, E., Barbieri, L., Bottoni, P., Del Carlo, G., Forti, S., Giuliano, G., Marineli, A., Santini, C. & Zavatti, A. (1998). Comparison of the leaching properties of alachlor, metolachlor, triazines and some of their metabolites in an experimental field. *Chemosphere*, 36(8), 1759-1773.

## G

- Gámiz, B., Celis, R., Cox, L., Hermosín, M. C., & Comejo, J. (2012). Effect of olive-mill waste addition to soil on sorption, persistence, and mobility of herbicides used in Mediterranean olive groves. *Science of the Total Environment*, 429, 292-299.
- Gao, X., Olapade, O. A., & Leff, L. G. (2005). Comparison of benthic bacterial community composition in nine streams. *Aquatic Microbial Ecology*, 40(1), 51-60.
- García-González, V., Govantes, F., Porrúa, O., & Santero, E. (2005). Regulation of the *Pseudomonas* sp. strain ADP cyanuric acid degradation operon. *Journal of bacteriology*, 187(1), 155-167.
- García-González, V., Govantes, F., Shaw, L. J., Burns, R. G., & Santero, E. (2003). Nitrogen control of atrazine utilization in *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Applied and environmental microbiology*, 69(12), 6987-6993.
- Garreaud, R.D., Vuille, M., Compagnucci, R. y Marengo, J. (2009). Presentday South American Climate (LOTRED South America). *PALAEO3* 281: 180-195.
- Gasol, J. M., & Duarte, C. M. (2000). Comparative analyses in aquatic microbial ecology: how far do they go?. *FEMS Microbiology Ecology*, 31(2), 99-106.
- Gavrilesco, M. (2005). Fate of pesticides in the environment and its bioremediation. *Engineering in Life Sciences*, 5(6), 497.
- Gentili, A. R., Cubitto, M. A., Ferrero, M., & Rodríguez, M. S. (2006). Bioremediation of crude oil polluted seawater by a hydrocarbon-degrading bacterial strain immobilized on chitin and chitosan flakes. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 57(4), 222-228.
- Gerstl, Z. (2000). An update on the Koc concept in regard to regional scale management. *Crop Protection*, 19:643-648.

- Getenga, Z., Dörfler, U., Iwobi, A., Schmid, M., & Schroll, R. (2009). Atrazine and terbuthylazine mineralization by an *Arthrobacter* sp. isolated from a sugarcane-cultivated soil in Kenya. *Chemosphere*, 77(4), 534-539.
- Giaveno, A., Lavalle, L., Guibal, E., & Donati, E. (2008). Biological ferrous sulfate oxidation by *A. ferrooxidans* immobilized on chitosan beads. *Journal of microbiological methods*, 72(3), 227-234.
- Gil, M. I., Aschkar, G. A., Ardizzi, M. C. P., Pellejero, G., & Abrameto, M. (2005). Evaluación de residuos de plaguicidas en aguas del río Negro en sitios estratégicos para la captación de agua potable. *Pilquen-Sección Agronomía*, (7), 3.
- Gilbride, K. A., Lee, D. Y., & Beaudette, L. A. (2006). Molecular techniques in wastewater: understanding microbial communities, detecting pathogens, and real-time process control. *Journal of microbiological methods*, 66(1), 1-20.
- Giovannoni, S. Rappé, M.S., (2000). Evolution, diversity, and molecular ecology of marine prokaryotes. *Microbial ecology of the oceans*, 47-84.
- González Estévez, M., & Sánchez Munguía, V. (2013). Riesgo de contaminación del acuífero arroyo Alamar en Tijuana, Baja California. *Región y sociedad*, 25(56), 103-126.
- González-Barreiro, O., Rioboo, C., Herrero, C., & Cid, A. (2006). Removal of triazine herbicides from freshwater systems using photosynthetic microorganisms. *Environmental pollution*, 144(1), 266-271.
- Gorgas, J. y Tassile, J. (2006). Recursos Naturales de la Provincia de Córdoba: Los Suelos. Nivel de Reconocimiento 1:500.000. Agencia Córdoba Ambiente S. E., Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria EEA Manfredi. Córdoba, Argentina.
- Graymore, M., Stagnitti, F., & Allinson, G. (2001). Impacts of atrazine in aquatic ecosystems. *Environment international*, 26(7), 483-495.
- Graziano, N., McGuire, M. J., Roberson, A., Adams, C., Jiang, H., & Blute, N. (2006). 2004 national atrazine occurrence monitoring program using the abraaxis ELISA method. *Environmental science & technology*, 40(4), 1163-1171.
- Green, R.E., & Karickhoff, S.W. (1990). Sorption estimates for modelling. In: *Pesticides in the soil environment: processes, impacts, and modelling* (ed. Cheng H.H.), 79-101. Soil Science Society of America book series; no. 2, Madison, Wis., USA.
- Gregoire, C., Elsaesser, D., Huguenot, D., Lange, J., Lebeau, T., Merli, A., Mose, R., Passeport, E., Payraudeau, S., Schulz, T., Schulz, R., Tapia-Padilla, G., Tournebize, J., Trevisan, M. & Wanko, A., (2009). Mitigation of agricultural nonpoint-source pesticide pollution in artificial wetland ecosystems. *Environmental Chemistry Letters*, 7(3), 205-231.
- Grenni, P., Rodríguez-Cruz, M. S., Herrero-Hernández, E., Marín-Benito, J. M., Sánchez-Martín, M. J., & Caracciolo, A. B. (2012). Effects of wood amendments on the degradation of terbuthylazine and on soil microbial community activity in a clay loam soil. *Water, Air, & Soil Pollution*, 223(8), 5401-5412.
- Grillo, R., dos Santos, N. Z. P., Maruyama, C. R., Rosa, A. H., de Lima, R., & Fraceto, L. F. (2012). Poly ( $\epsilon$ -caprolactone) nanocapsules as carrier systems for herbicides: Physico-chemical characterization and genotoxicity evaluation. *Journal of hazardous materials*, 231, 1-9.
- Gruessner, B., Shambaugh, N. C., & Watzin, M. C. (1995). Comparison of an enzyme immunoassay and gas chromatography/mass spectrometry for the detection of atrazine in surface waters. *Environmental science & technology*, 29(1), 251-254.
- Guibal, E. (2004). Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review. *Separation and Purification Technology*, 38(1), 43-74.
- Guibal, E. (2005). Heterogeneous catalysis on chitosan-based materials: a review. *Progress in Polymer Science*, 30(1), 71-109.

- Guo, Q., Zhang, J., Wan, R., & Xie, S. (2014). Impacts of carbon sources on simazine biodegradation by *Arthrobacter* strain SD3-25 in liquid culture and soil microcosm. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 89, 1-6.

## H

- Hahn, M. W., Lang, E., Brandt, U., Lünsdorf, H., Wu, Q. L., & Stackebrandt, E. (2010). *Polynucleobacter cosmopolitanus* sp. nov., free-living planktonic bacteria inhabiting freshwater lakes and rivers. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 60(1), 166-173.
- Hahn, M. W., Minasyan, A., Lang, E., Koll, U., & Spröer, C. (2012). *Polynucleobacter difficilis* sp. nov., a planktonic freshwater bacterium affiliated with subcluster B1 of the genus *Polynucleobacter*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 62(2), 376-383.
- Haider, J. (1994). *Herbizide in Oberflächenabfluss und Bodenabtrag-Feldversuche mit simuliertem Regen*. Diss (Doctoral dissertation, thesis, Technische Universität München).
- Hamilton, P. B., Jackson, G. S., Kaushik, N. K., Solomon, K. R., & Stephenson, G. L. (1988). The impact of two applications of atrazine on the plankton communities of in situ enclosures. *Aquatic Toxicology*, 13(2), 123-139.
- Hamilton, P. B., Lean, D. R. S., Jackson, G. S., Kaushik, N. K., & Solomon, K. R. (1989). The effect of two applications of atrazine on the water quality of freshwater enclosures. *Environmental pollution*, 60(3-4), 291-304.
- Hammond, B. G., Barbee, S. J., Wheeler, A. G., & Cascieri, T. (1985). Absence of mutagenic activity for monosodium cyanurate. *Toxicological Sciences*, 5(4), 655-664.
- Hansen, A.M.; Treviño-Quintanilla, L.G.; Márquez-Pacheco, H.; Villada-Canela, M.; González-Márquez, L.C.; Guillén-Garcés, R.A.; Hernández-Antonio, A. (2013). Atrazina: un herbicida polémico. *Revista Internacional Contaminación Ambiental* 29, 65-84.
- Hayes, T. B., Case, P., Chui, S., Chung, D., Haeffele, C., Haston, K., Lee, M., Mai, V.P., Marjua, Y., Parker, J. & Tsui, M. (2006). Pesticide mixtures, endocrine disruption, and amphibian declines: are we underestimating the impact?. *Environmental health perspectives*, 114, 40.
- Hayes, T. B., Collins, A., Lee, M., Mendoza, M., Noriega, N., Stuart, A. A., & Vonk, A. (2002). Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(8), 5476-5480.
- He, H., Yu, J., Chen, G., Li, W., He, J., & Li, H. (2012). Acute toxicity of butachlor and atrazine to freshwater green alga *Scenedesmus obliquus* and cladoceran *Daphnia carinata*. *Ecotoxicology and environmental safety*, 80, 91-96.
- Head, I. M., Saunders, J. R., & Pickup, R. W. (1998). Microbial evolution, diversity, and ecology: a decade of ribosomal RNA analysis of uncultivated microorganisms. *Microbial ecology*, 35(1), 1-21.
- Helbling, D. E. (2015). Bioremediation of pesticide-contaminated water resources: the challenge of low concentrations. *Current opinion in biotechnology*, 33, 142-148.
- Hernández Borges, J., (2005). Nuevas metodologías de análisis de pesticidas por electroforesis capilar. *Tesis doctoral*. ISBN: 84-7756-695-X.
- Hernández, M., Villalobos, P., Morgante, V., González, M., Reiff, C., Moore, E., & Seeger, M. (2008). Isolation and characterization of a novel simazine-degrading bacterium from agricultural soil of central Chile, *Pseudomonas* sp. MHP41. *FEMS microbiology letters*, 286(2), 184-190.
- Hernández-Antonio, A., & Hansen, A. M. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 27(2), 115-127.

- Hernando, M. D., Fernández-Alba, A. R., Tauler, R., & Barceló, D. (2005). Toxicity assays applied to wastewater treatment. *Talanta*, 65(2), 358-366.
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M. S., Álvarez-Martín, A., Pose-Juan, E., Rodríguez-Cruz, M. S., & Sánchez-Martín, M. J. (2013). Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *Journal of Hydrology*, 486, 234-245.
- Herrero-Hernández, E., Andrades, M. S., Álvarez-Martín, A., Pose-Juan, E., Rodríguez-Cruz, M. S., & Sánchez-Martín, M. J. (2013). Occurrence of pesticides and some of their degradation products in waters in a Spanish wine region. *Journal of Hydrology*, 486, 234-245.
- Hildebrandt, A., Guillamón, M., Lacorte, S., Tauler, R., & Barceló, D. (2008). Impact of pesticides used in agriculture and vineyards to surface and groundwater quality (North Spain). *Water research*, 42(13), 3315-3326.
- Hirsch, P. R., Mauchline, T. H., & Clark, I. M. (2010). Culture-independent molecular techniques for soil microbial ecology. *Soil Biology and Biochemistry*, 42(6), 878-887.
- Hladik, M. L., Bouwer, E. J., & Roberts, A. L. (2008). Neutral degradates of chloroacetamide herbicides: Occurrence in drinking water and removal during conventional water treatment. *Water research*, 42(20), 4905-4914.
- Hoagland, K. D., Drenner, R. W., Smith, J. D., & Cross, D. R. (1993). Freshwater community responses to mixtures of agricultural pesticides: Effects of atrazine and bifenthrin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 12(4), 627-637.
- Houot, S., Barriuso, E., & Bergheaud, V. (1998). Modifications to atrazine degradation pathways in a loamy soil after addition of organic amendments. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(14), 2147-2157.
- Hsieh, F. M., Huang, C., Lin, T. F., Chen, Y. M., & Lin, J. C. (2008). Study of sodium tripolyphosphate-crosslinked chitosan beads entrapped with *Pseudomonas putida* for phenol degradation. *Process Biochemistry*, 43(1), 83-92.
- Hunter, W. J., & Shaner, D. L. (2009). Nitrogen limited biobarriers remove atrazine from contaminated water: Laboratory studies. *Journal of contaminant hydrology*, 103(1), 29-37.

## I

- Iker, B. C., Kambesis, P., Oehrlé, S. A., Groves, C., & Barton, H. A. (2010). Microbial atrazine breakdown in a karst groundwater system and its effect on ecosystem energetics. *Journal of environmental quality*, 39(2), 509-518.
- Inoue, D., Hara, S., Kashihara, M., Murai, Y., Danzl, E., Sei, K., Tsunoi, S., Fujita, M. & Ike, M. (2008). Degradation of bis (4-hydroxyphenyl) methane (bisphenol F) by *Sphingobium yanoikuyae* strain FM-2 isolated from river water. *Applied and environmental microbiology*, 74(2), 352-358.

## J

- Janniche, G. S., Spliid, H., & Albrechtsen, H. J. (2012). Microbial community-level physiological profiles (CLPP) and herbicide mineralization potential in groundwater affected by agricultural land use. *Journal of contaminant hydrology*, 140, 45-55.
- Jayachandran, K., Stolpe, N. B., Moorman, T. B., & Shea, P. J. (1998). Application of 14 C-most-probable-number technique to enumerate atrazine-degrading microorganisms in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 30(4), 523-529.
- Jenkins, O., Byrom, D., & Jones, D. (1987). *Methylophilus*: a new genus of methanol-utilizing bacteria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 37(4), 446-448.
- Jenks, B. M., Roeth, F. W., Martin, A. R., & McCallister, D. L. (1998). Influence of surface and subsurface soil properties on atrazine sorption and degradation. *Weed Science*, 132-138.



- Jeon, Y. J., Park, P. J., & Kim, S. K. (2001). Antimicrobial effect of chitooligosaccharides produced by bioreactor. *Carbohydrate polymers*, 44(1), 71-76.
- Jiang, L., Ma, L., Sui, Y., Han, S. Q., & Yang, H. (2011). Mobilization and plant accumulation of prometryne in soil by two different sources of organic matter. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(7), 1935-1943.
- Johnson, B. T. (1986). Potential impact of selected agricultural chemical contaminants on a northern prairie wetland: a microcosm evaluation. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 5(5), 473-485.
- Jorgensen K.S. (2007). In situ bioremediation. *Adv Appl Microbiol.* 61:285–305.
- Joutey, N. T., Bahafid, W., Sayel, H., & El Ghachtouli, N. (2013). Biodegradation: involved microorganisms and genetically engineered microorganisms. *Biodegradation-life of science. InTech, Rijeka*, 289-320.

## K

- Kämpfer, P., & Glaeser, S. P. (2012). Prokaryotic taxonomy in the sequencing era—the polyphasic approach revisited. *Environmental microbiology*, 14(2), 291-317.
- Kämpfer, P., Schulze, R., Jäckel, U., Malik, K. A., Amann, R., & Spring, S. (2005). *Hydrogenophaga defluvii* sp. nov. and *Hydrogenophaga atypica* sp. nov., isolated from activated sludge. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 55(1), 341-344.
- Kao, C. M., Wang, J. Y., & Wu, M. J. (2001). Evaluation of atrazine removal processes in a wetland. *Water science and technology*, 44(11-12), 539-544.
- Karns, J. S. (1999). Gene Sequence and Properties of ans-Triazine Ring-Cleavage Enzyme from *Pseudomonas* sp. Strain NRRLB-12227. *Applied and environmental microbiology*, 65(8), 3512-3517.
- Keddie, R. M., Collins, M. D., & Jones, D. (1986). Genus *Arthrobacter*. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2, 1288-1301.
- Kesari, R., & Gupta, V. K. (1998). A sensitive spectrophotometric method for the determination of dithiocarbamate fungicide and its application in environmental samples. *Talanta*, 45(6), 1097-1102.
- Kettles, M. K., Browning, S. R., Prince, T. S., & Horstman, S. W. (1997). Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of Kentucky counties. *Environmental health perspectives*, 105(11), 1222.
- Keuth, S., & Rehm, H. J. (1991). Biodegradation of phenanthrene by *Arthrobacter polychromogenes* isolated from a contaminated soil. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(6), 804-808.
- Khondee, N., Tathong, S., Pinyakong, O., Powtongsook, S., Chatchupong, T., Ruangchainikom, C., & Luepromchai, E. (2012). Airlift bioreactor containing chitosan-immobilized *Sphingobium* sp. P2 for treatment of lubricants in wastewater. *Journal of hazardous materials*, 213, 466-473.
- Kijne, J. W. (2003). *Descubrir el potencial del agua para la agricultura* (No. CIDAB-S401. F7-K5d). Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.
- Kim, K. W., Thomas, R. L., Lee, C., & Park, H. J. (2003). Antimicrobial activity of native chitosan, degraded chitosan, and O-carboxymethylated chitosan. *Journal of Food Protection*, 66(8), 1495-1498.
- Kirk, J. L., Beaudette, L. A., Hart, M., Moutoglis, P., Klironomos, J. N., Lee, H., & Trevors, J. T. (2004). Methods of studying soil microbial diversity. *Journal of microbiological methods*, 58(2), 169-188.

- Kladvko, E. J., Brown, L. C., & Baker, J. L. (2001). Pesticide transport to subsurface tile drains in humid regions of North America. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 31(1), 1-62.
- Knaul, J.Z.; Kasaai, M.R.; Bui, V.T.; Creber KM. (1998). Characterization of deacetylated chitosan and chitosan molecular weight review. *Can J Chem*. 76(11):1699-1706.
- Köck-Schulmeyer, M., Villagrasa, M., de Alda, M. L., Céspedes-Sánchez, R., Ventura, F., & Barceló, D. (2013). Occurrence and behavior of pesticides in wastewater treatment plants and their environmental impact. *Science of the total environment*, 458, 466-476.
- Kolić, N. U., Hršak, D., Kolar, A. B., Petrić, I., Stipičević, S., Soulas, G., & Martin-Laurent, F. (2007). Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(4), 299-307.
- Konstantinou, I. K., Hela, D. G., & Albanis, T. A. (2006). The status of pesticide pollution in surface waters (rivers and lakes) of Greece. Part I. Review on occurrence and levels. *Environmental Pollution*, 141(3), 555-570.
- Kortekamp A. (2011). Herbicides and Environment. Croatia, 760
- Koskinen, W.C. & Harper, S.S. (1990). The retention process: mechanisms. Chapter 3: 51-77. In: Pesticides in the soil Environment: Processes, Impacts, and Modeling. Ed. Cheng, H.H. SSSA, Inc. Madison, USA, 530p.
- Kotoučková, L., Schumann, P., Durnová, E., Spröer, C., Sedláček, I., Neča, J., Zdrahal, Z. & Němec, M. (2004). *Arthrobacter nitroguajacolicus* sp. nov., a novel 4-nitroguaiacol-degrading actinobacterium. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 54(3), 773-777.
- Kotoučková, L., Vavřík, J., Němec, M., Plocek, J., & Zdráhal, Z. (1997). Use of immobilized cells of the strain *Corynebacterium* sp. for 4-nitrophenol degradation. *Folia Microbiologica*, 42(5), 509-512.
- Krutz, L., Shaner, D., Weaver, M., Webb, R., Zablotowicz, R., Reddy, K., Huang, Y. & Thomson, S. (2010). Agronomic and Environmental Implications of Enhanced s-Triazine Degradation. *Pest Management Science*, 66, 461-481.
- Kumar, M. N. R. (2000). A review of chitin and chitosan applications. *Reactive and functional polymers*, 46(1), 1-27.
- Kumar, M. R., Muzzarelli, R., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., & Domb, A. J. (2004). Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chemical reviews*, 104(12), 6017-6084.
- Kurita, K. (2006). Chitin and chitosan: functional biopolymers from marine crustaceans. *Marine Biotechnology*, 8(3), 203-226.

## L

- Laird, D. A., & Koskinen, W. C. (2008). Triazine soil interactions. *The Triazine Herbicides*, 50, 275-299.
- Laque, T., Farjalla, V. F., Rosado, A. S., & Esteves, F. A. (2010). Spatiotemporal variation of bacterial community composition and possible controlling factors in tropical shallow lagoons. *Microbial ecology*, 59(4), 819-829.
- Lasserre, J., Fack, F., Revets, D., Planchon, S., Renaut, J., Hoffmann, L., Gutleb, A.C., Muller, C.P., Bohn, T. (2009). Effects of the endocrine disruptors atrazine and PCB 153 on the protein expression of MCF-7 human cells. *Journal of Proteome Research* 8, 5485-5496.
- Laws, S.C., Ferrel, J.M., Stoker, T. (2000). The effects of atrazine on female wistar rats: An evaluation of the protocol for assessing pubertal development and thyroid function. *Toxicol Sci* 58:366-376.

- Leeds-Harrison, P.B. (1995). Movement of water and solutes to surface and ground waters, 3-12. Proceedings of a Symposium held at The University of Warwick, Coventry, 3-5/05/95. Edited by Walker, A., Allen, R., Bailey, S.W., Blair, A.M., Brown, C.D., Günther, P., Leake, C.R. and Nicholls, P.H. BCPC, Monograph No 62, 414p.
- Lemke, M. J., Lienau, E. K., Rothe, J., Pagioro, T. A., Rosenfeld, J., & DeSalle, R. (2009). Description of freshwater bacterial assemblages from the upper Paraná river floodpulse system, Brazil. *Microbial ecology*, 57(1), 94-103.
- Leu, C., Singer, H., Stamm, C., Müller, S. R., & Schwarzenbach, R. P. (2004). Simultaneous assessment of sources, processes, and factors influencing herbicide losses to surface waters in a small agricultural catchment. *Environmental science & technology*, 38(14), 3827-3834.
- Li, Q., Li, Y., Zhu, X., & Cai, B. (2008). Isolation and characterization of atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. AD26 and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Journal of environmental sciences (China)*, 20(10), 1226-1230.
- Lima, D., Viana, P., André, S., Chelinho, S., Costa, C., Ribeiro, R., Sousa, J.P., Fialho, A.M. & Viegas, C. A. (2009). Evaluating a bioremediation tool for atrazine contaminated soils in open soil microcosms: the effectiveness of bioaugmentation and biostimulation approaches. *Chemosphere*, 74(2), 187-192.
- Liu, H., Du, Y., Wang, X., & Sun, L. (2004). Chitosan kills bacteria through cell membrane damage. *International journal of food microbiology*, 95(2), 147-155.
- Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li, Z., & De Yao, K. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79(7), 1324-1335.
- Lopez, L., Pozo, C., Rodelas, B., Calvo, C., Juarez, B., Martinez-Toledo, M. V., & Gonzalez-Lopez, J. (2005). Identification of bacteria isolated from an oligotrophic lake with pesticide removal capacities. *Ecotoxicology*, 14(3), 299-312.
- Lorente, C., Causape, J., Glud, R. N., Hancke, K., Merchan, D., Muñoz, S., Val, J. & Navarro, E. (2015). Impacts of agricultural irrigation on nearby freshwater ecosystems: the seasonal influence of triazine herbicides in benthic algal communities. *Science of the Total Environment*, 503, 151-158.
- Lu, D., Zhang, Y., Niu, S., Wang, L., Lin, S., Wang, C., ... & Yan, C. (2012). Study of phenol biodegradation using *Bacillus amyloliquefaciens* strain WJDB-1 immobilized in alginate-chitosan-alginate (ACA) microcapsules by electrochemical method. *Biodegradation*, 23(2), 209-219.
- Lynch, J. M., Benedetti, A., Insam, H., Nuti, M. P., Smalla, K., Torsvik, V., & Nannipieri, P. (2004). Microbial diversity in soil: ecological theories, the contribution of molecular techniques and the impact of transgenic plants and transgenic microorganisms. *Biology and Fertility of Soils*, 40(6), 363-385.
- Lyon, D. Y., & Vogel, T. M. (2013). Bioaugmentation for groundwater remediation: an overview. In *Bioaugmentation for Groundwater Remediation* (pp. 1-37). Springer New York.

## M

- Ma, J., Wang, S., Wang, P., Ma, L., Chen, X., & Xu, R. (2006). Toxicity assessment of 40 herbicides to the green alga *Raphidocelis subcapitata*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 63(3), 456-462.
- Mackay, D., & Fraser, A. (2000). Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental pollution*, 110(3), 375-391.
- Madsen, E.L. (1991). Determining in situ biodegradation: facts and challenges. *Environ Sci Technol*, 25:1663-73.
- Majumdar, K., & Singh, N. (2007). Effect of soil amendments on sorption and mobility of metribuzin in soils. *Chemosphere*, 66(4), 630-637.

- Malato S., Blanco J., Caceres Estrada C.A., Bandala E.R., (2001). Degradación de Plaguicidas. In: Blesa MA, ed. Eliminación de Contaminantes por Fotocatálisis Heterogénea. La Plata, Argentina: Digital Grafic, 269–281.
- Mallat, E., Barcelo, D., Barzen, C., Gauglitz, G., & Abuknesha, R. (2001). Immunosensors for pesticide determination in natural waters. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 20(3), 124-132.
- Mandelbaum, R. T., Allan, D. L., & Wackett, L. P. (1995). Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(4), 1451-1457.
- Mandelbaum, R. T., Wackett, L. P., & Allan, D. L. (1993). Mineralization of the s-triazine ring of atrazine by stable bacterial mixed cultures. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(6), 1695-1701.
- Manohar, S., & Karegoudar, T. B. (1998). Degradation of naphthalene by cells of *Pseudomonas* sp. strain NGK 1 immobilized in alginate, agar and polyacrylamide. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 49(6), 785-792.
- Marchetti, G., Minella, M., Maurino, V., Minero, C., & Vione, D. (2013). Photochemical transformation of atrazine and formation of photointermediates under conditions relevant to sunlit surface waters: laboratory measures and modelling. *Water research*, 47(16), 6211-6222.
- Marileo, L. G., Jorquera, M. A., Hernández, M., Briceño, G., Mora, M. D. L. L., Demanet, R., & Palma, G. (2016). Changes in bacterial communities by post-emergent herbicides in an Andisol fertilized with urea as revealed by DGGE. *Applied Soil Ecology*, 101, 141-151.
- Marinescu, M., Dumitru, M., & Lăcătușu, A. (2009). Biodegradation of petroleum hydrocarbons in an artificial polluted soil biodegradarea hidrocarburilor din petrol într-un sol poluat artificial. *Research Journal of Agricultural Science*, 41, 2.
- Marin-Morales, M. A., de Campos Ventura-Camargo, B., & Hoshina, M. M. (2013). Toxicity of herbicides: impact on aquatic and soil biota and human health. *Herbicides—Current Research and Case Studies in Use*, 399-443.
- Martinez, B., Tomkins, J., Wackett, L. P., Wing, R., & Sadowsky, M. J. (2001). Complete Nucleotide Sequence and Organization of the Atrazine Catabolic Plasmid pADP-1 from *Pseudomonas* sp. Strain ADP. *Journal of Bacteriology*, 183(19), 5684-5697.
- Martínez-Iñigo, M. J., Gibello, A., Lobo, C., Nande, M., Vargas, R., Garbi, C., ... & Martín, M. (2010). Evaluation of the *atzB* gene as a functional marker for the simazine-degrading potential of an agricultural soil. *Applied Soil Ecology*, 45(3), 218-224.
- Martin-Laurent, F., Cornet, L., Ranjard, L., López-Gutiérrez, J. C., Philippot, L., Schwartz, C., ... & Soulas, G. (2004). Estimation of atrazine-degrading genetic potential and activity in three French agricultural soils. *FEMS microbiology ecology*, 48(3), 425-435.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., & Verstraete, W. (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 10(6), 1571-1581.
- McConnell, L. L., Harman-Fetcho, J. A., & Hagy, J. D. (2004). Measured concentrations of herbicides and model predictions of atrazine fate in the Patuxent River estuary. *Journal of environmental quality*, 33(2), 594-604.
- Megharaj, M., Ramakrishnan, B., Venkateswarlu, K., Sethunathan, N., & Naidu, R. (2011). Bioremediation approaches for organic pollutants: a critical perspective. *Environment International*, 37(8), 1362-1375.
- Menzinger, F., Schmitt-Kopplin, P., Freitag, D., & Kettrup, A. (2000). Analysis of agrochemicals by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 891(1), 45-67.
- Merlo, C., Abril, A., Amé, M. V., Argüello, G. A., Carreras, H. A., Chiappero, M. S., ... & González, C. M. (2011). Integral assessment of pollution in the Suquia River (Córdoba, Argentina)

as a contribution to lotic ecosystem restoration programs. *Science of the Total Environment*, 409(23), 5034-5045.

- Miletto, M., Bodelier, P. L., & Laanbroek, H. J. (2007). Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. *Journal of Microbiological Methods*, 70(1), 103-111.
- Minetti, J.L., Vargas, W.M., Poblete, A.G., Acuña, L.R. y Casagrande, G. (2003). Non-linear trends and low frequency oscillations in annual precipitation over Argentina and Chile, 1931-1999. *Atmósfera* 16: 119-135.
- Ministerio de Salud de Brasil, Ordenanza 2914/2011 (Disponible en : [http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914\\_12\\_12\\_2011.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html), consultado el 12/07/2016).
- Mobaser, J. A., Moazed, H., Behfar, A., Boroom, S., & Khorasgani, Z. N. (2012). Atrazine transport and distribution in field soils and comparison of the predictions made by leaching estimation and chemistry model-pesticide (LEACHP) model. *Scientific Research and Essays*, 7(40), 3348-3356.
- Molinaro, G., Leroux, J. C., Damas, J., & Adam, A. (2002). Biocompatibility of thermosensitive chitosan-based hydrogels: an in vivo experimental approach to injectable biomaterials. *Biomaterials*, 23(13), 2717-2722.
- Monard, C., Vandenkoornhuysen, P., Le Bot, B., & Binet, F. (2011). Relationship between bacterial diversity and function under biotic control: the soil pesticide degraders as a case study. *The ISME journal*, 5(6), 1048-1056.
- Moore, M. T., Rodgers Jr, J. H., Cooper, C. M., & Smith Jr, S. (2000). Constructed wetlands for mitigation of atrazine-associated agricultural runoff. *Environmental pollution*, 110(3), 393-399.
- Moran, A. C., Müller, A., Manzano, M., & Gonzalez, B. (2006). Simazine treatment history determines a significant herbicide degradation potential in soils that is not improved by bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. ADP. *Journal of applied microbiology*, 101(1), 26-35.
- Moreyra F. (2008). Informe Técnico- Práctica supervisada: Aspectos medioambientales de la cuenca del Río Tercero (Ctalamochita) y su Relación con la Calidad del Agua. Fac. de Cs. Exactas, Físicas y Naturales, UNC, Córdoba, Argentina.
- Morgante, V., Flores, C., Fadic, X., González, M., Hernández, M., Cereceda-Balic, F., & Seeger, M. (2012). Influence of microorganisms and leaching on simazine attenuation in an agricultural soil. *Journal of environmental management*, 95, S300-S305.
- Morgante, V., López-López, A., Flores, C., González, M., González, B., Vásquez, M., Roselló Mora, R. & Seeger, M. (2010). Bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. strain MHP41 promotes simazine attenuation and bacterial community changes in agricultural soils. *FEMS microbiology ecology*, 71(1), 114-126.
- Mourya, V. K., & Inamdar, N. N. (2008). Chitosan-modifications and applications: opportunities galore. *Reactive and Functional polymers*, 68(6), 1013-1051.
- Mulbry, W. W., Zhu, H., Nour, S. M., & Topp, E. (2002). The triazine hydrolase gene *trzN* from *Nocardioideis* sp. strain C190: cloning and construction of gene-specific primers. *FEMS microbiology letters*, 206(1), 75-79.
- Muller, K., Trollove, M., James, T. K., & Rahman, A. (2002). Herbicide runoff studies in an arable soil under simulated rainfall. *New Zealand Plant Protection*, 172-176.
- Mulling, B. T., Soeter, A. M., Van Der Geest, H. G., & Admiraal, W. (2014). Changes in the planktonic microbial community during residence in a surface flow constructed wetland used for tertiary wastewater treatment. *Science of the Total Environment*, 466, 881-887.
- Muyzer, G., De Waal, E. C., & Uitterlinden, A. G. (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied and environmental microbiology*, 59(3), 695-700.

## N

- Nannipieri, P., Ascher, J., Ceccherini, M., Landi, L., Pietramellara, G., & Renella, G. (2003). Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*, 54(4), 655-670.
- Navarro, S., Vela, N., & Navarro, G. (2007). Review. An overview on the environmental behaviour of pesticide residues in soils. *Spanish journal of agricultural research*, (3), 357-375.
- Narancic, T., Djokic, L., Kenny, S. T., O'Connor, K. E., Radulovic, V., Nikodinovic-Runic, J., & Vasiljevic, B. (2012). Metabolic versatility of Gram-positive microbial isolates from contaminated river sediments. *Journal of hazardous materials*, 215, 243-251.
- Navarro, S., Vela, N., & Navarro, G. (2007). Review. An overview on the environmental behaviour of pesticide residues in soils. *Spanish journal of agricultural research*, (3), 357-375.
- Navia, R., & Seeger, M. (2006). Biorremediación de suelos contaminados con compuestos orgánicos persistentes (COPs), Editorial Universidad de La Frontera. *Temuco. Chile*.
- Newcombe, D. A., & Crowley, D. E. (1999). Bioremediation of atrazine-contaminated soil by repeated applications of atrazine-degrading bacteria. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(6), 877-882.
- Nguyen, L. N., Hai, F. I., Yang, S., Kang, J., Leusch, F. D., Roddick, F., Price, W.E. & Nghiem, L. D. (2014). Removal of pharmaceuticals, steroid hormones, phytoestrogens, UV-filters, industrial chemicals and pesticides by *Trametes versicolor*: role of biosorption and biodegradation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 169-175.
- Niti, C., Sunita, S., Kamlesh, K., & Rakesh, K. (2013). Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Res J Chem Environ*, 17, 88-105.
- No, H. K., Park, N. Y., Lee, S. H., & Meyers, S. P. (2002). Antibacterial activity of chitosans and chitosan oligomers with different molecular weights. *International journal of food microbiology*, 74(1), 65-72.
- Nödler, K., Licha, T., & Voutsas, D. (2013). Twenty years later—atrazine concentrations in selected coastal waters of the Mediterranean and the Baltic Sea. *Marine pollution bulletin*, 70(1), 112-118.
- Nübel, U., Garcia-Pichel, F., & Muyzer, G. (1997). PCR primers to amplify 16S rRNA genes from cyanobacteria. *Applied and environmental microbiology*, 63(8), 3327-3332.
- Nwani, C. D., Nagpure, N. S., Kumar, R., Kushwaha, B., Kumar, P., & Lakra, W. S. (2011). Mutagenic and genotoxic assessment of atrazine-based herbicide to freshwater fish *Channa punctatus* (Bloch) using micronucleus test and single cell gel electrophoresis. *Environmental toxicology and pharmacology*, 31(2), 314-322.

## O

- OCDE, Organización para la Cooperación y el desarrollo, (1984). Guidelines for the testing of chemicals. Disponible en: <http://www.oecd.org/general>
- Oesterheld, M. (2005). Los cambios de la agricultura argentina y sus consecuencias. *Ciencia hoy: Asociación Ciencia Hoy*, 15(87), 6-12.
- Oh, Y. S., Maeng, J., & Kim, S. J. (2000). Use of microorganism-immobilized polyurethane foams to absorb and degrade oil on water surface. *Applied microbiology and biotechnology*, 54(3), 418-423.
- Ojeda, C. B., & Rojas, F. S. (2004). Recent developments in derivative ultraviolet/visible absorption spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 518(1), 1-24.

- ONU (Organización de las Naciones Unidas), (2006). El agua una responsabilidad compartida. 2º Informe de la Naciones Unidas sobre el Desarrollo de los Recursos Hídricos en el Mundo. Disponible en: <http://unesdoc.unesco.org/images/0014/001444/144409s.pdf>
- Organización Mundial de la Salud (OMS), (2011). Guidelines for Drinking-water Quality. (4<sup>th</sup> edition). ISBN 978 92 4 154815 1.
- Ortiz-Hernández, M. L., Monterrosas-Brisson, M., Yanez-Ocampo, G., & Sánchez-Salinas, E. (2001). Biodegradation of methyl-parathion by bacteria isolated of agricultural soil. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 17(3), 147-155.

## P

- Palanaippan, M., Gleick, P. H., Allen, L., Cohen, M. J., Christian-Smith, J., & Smith, C. UNEP (2010). Clearing the waters: a focus on water quality solutions.
- Palma, P., Kuster, M., Alvarenga, P., Palma, V. L., Fernandes, R. M., Soares, A. M. V. M., López de Alda, M.J., Barceló, D. & Barbosa, I. R. (2009). Risk assessment of representative and priority pesticides, in surface water of the Alqueva reservoir (South of Portugal) using on-line solid phase extraction-liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Environment International*, 35(3), 545-551.
- Park, J. K., & Chang, H. N. (2000). Microencapsulation of microbial cells. *Biotechnology advances*, 18(4), 303-319.
- Pathak, R.K. & Dikshit, A.K. (2012) Atrazine and its use. *Int J Res Chem Environ* 2:1-6.
- Paul, E. A. (2006). *Soil microbiology, ecology and biochemistry*. Academic press.
- Paule, A., Lamy, A., Roubex, V., Delmas, F., & Rols, J. L. (2015). Influence of the natural growth environment on the sensitivity of phototrophic biofilm to herbicide. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(11), 8031-8043.
- Pearson, N., & Crossland, N. O. (1996). Measurement of community photosynthesis and respiration in outdoor artificial streams. *Chemosphere*, 32(5), 913-919.
- Peeters, K., Hodgson, D. A., Convey, P., & Willems, A. (2011). Culturable diversity of heterotrophic bacteria in Forlidas Pond (Pensacola Mountains) and Lundström Lake (Shackleton Range), Antarctica. *Microbial ecology*, 62(2), 399-413.
- Penmetsa, K. V., Leidy, R. B., & Shea, D. (1996). Herbicide analysis by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*, 745(1), 201-208.
- Perelo, L. W. (2010). Review: in situ and bioremediation of organic pollutants in aquatic sediments. *Journal of hazardous materials*, 177(1), 81-89.
- Perryman, S. E., Rees, G. N., & Walsh, C. J. (2008). Analysis of denitrifying communities in streams from an urban and non-urban catchment. *Aquatic Ecology*, 42(1), 95-101.
- Pesce, S., Fajon, C., Bardot, C., Bonnemoy, F., Portelli, C., & Bohatier, J. (2008). Longitudinal changes in microbial planktonic communities of a French river in relation to pesticide and nutrient inputs. *Aquatic Toxicology*, 86(3), 352-360.
- Philp, J. C., & Atlas, R. M. (2005). Bioremediation: Applied Microbial Solutions for Real-World Environmental Cleanup. Atlas, R.M., and Philp, J.M. (Eds.), ASM Press. Washington DC, 138.
- Picó, Y., & Mañes, J. (2003). Capillary electrophoresis for the determination of pesticide residues. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 22(3), 133-151.
- Piovano, E., Ariztegui, D., Córdoba, F., Cioccale, M. y Sylvestre, F. (2009). Hydrological variability in South America below the Tropic of Capricorn (Pampas and eastern Patagonia, Argentina) during the last 13.0 ka. En: Vimeux, F., Sylvestre, F., Khodri, M. (Eds.) Past climate variability from the Last Glacial Maximum to the Holocene in South America and Surrounding

regions: From the Last Glacial Maximum to the Holocene). Springer - Developments in Paleoenvironmental Research Series (DPER), 323–351.

- Piutti, S., Semon, E., Landry, D., Hartmann, A., Dousset, S., Lichtfouse, E., Topp, E., Soulas, G. & Martin-Laurent, F. (2003). Isolation and characterisation of *Nocardioides* sp. SP12, an atrazine-degrading bacterial strain possessing the gene *trzN* from bulk-and maize rhizosphere soil. *FEMS microbiology letters*, 221(1), 111-117.
- Poulhier, G., Lissalde, S., Charriau, A., Buzier, R., Cleries, K., Delmas, F., Mazzela, N. & Guibaud, G. (2014). Estimates of pesticide concentrations and fluxes in two rivers of an extensive French multi-agricultural watershed: application of the passive sampling strategy. *Environmental Science and Pollution Research International*, 22(11), 8044.
- Portocarrero, R.; Aparicio, V.C.; de Gerónimo, E.; Morales, C.; Lizondo, M.; Costa, J.L.(2016). Presencia de ametrina y atrazina en los sistemas hídricos superficiales y subterráneos del este cañero de la provincia de Tucumán. Informe INTA.

## Q

- Qi, L., Xu, Z., Jiang, X., Hu, C., & Zou, X. (2004). Preparation and antibacterial activity of chitosan nanoparticles. *Carbohydrate research*, 339(16), 2693-2700.

## R

- Raafat, D., Von Bargen, K., Haas, A., & Sahl, H. G. (2008). Insights into the mode of action of chitosan as an antibacterial compound. *Applied and environmental microbiology*, 74(12), 3764-3773.
- Rabea, E. I., Badawy, M. E. T., Stevens, C. V., Smagghe, G., & Steurbaut, W. (2003). Chitosan as antimicrobial agent: applications and mode of action. *Biomacromolecules*, 4(6), 1457-1465.
- Radix, P., Léonard, M., Papantoniou, C., Roman, G., Saouter, E., Gallotti-Schmitt, S., Thiébaud, H. & Vasseur, P. (2000). Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria, and invertebrates assessed with sixteen chemicals. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 47(2), 186-194.
- Radosevich, M., Traina, S. J., Hao, Y. L., & Tuovinen, O. H. (1995). Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(1), 297-302.
- Rafedzi, E. A. K., Krsek, M., & Wellington, E. M. (2015). Microbial diversity of various agricultural soil sites using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) community profiling (Kepelbagaian mikrob bagi pelbagai kawasan tanah pertanian menggunakan DGGE profil komuniti). *Journal of Tropical Agriculture and Food Science*, 37, 233-239.
- Rainero, H. P. (2014). Manejo de malezas en pasturas base alfalfa. *Jornada Nacional de Forrajes Conservados. 5. 2014 04 09-10, 09 y 10 de abril de 2014. Manfredi, Córdoba. AR.*
- Ralston-Hooper, K., Hardy, J., Hahn, L., Ochoa-Acuña, H., Lee, L. S., Mollenhauer, R., & Sepúlveda, M. S. (2009). Acute and chronic toxicity of atrazine and its metabolites deethylatrazine and deisopropylatrazine on aquatic organisms. *Ecotoxicology*, 18(7), 899-905.
- Ramírez J.A. y Lacasaña M., (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. *Arch Prev Riesgos Labor* 4(2):67-75.
- Rappe, M. S., & Giovannoni, S. J. (2003). The uncultured microbial majority. *Annual Reviews in Microbiology*, 57(1), 369-394.



- Reddy, C. A. (1995). The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Current opinion in Biotechnology*, 6(3), 320-328.
- Rhine, E. D., Fuhrmann, J. J., & Radosevich, M. (2003). Microbial community responses to atrazine exposure and nutrient availability: linking degradation capacity to community structure. *Microbial ecology*, 46(2), 145-160.
- Ribeiro, A. B., Rodriguez-Maroto, J. M., Mateus, E. P., & Gomes, H. (2005). Removal of organic contaminants from soils by an electrokinetic process: the case of atrazine.: Experimental and modeling. *Chemosphere*, 59(9), 1229-1239.
- Rockne K. and Reddy K., (2003). *Bioremediation of Contaminated Sites*, University of Illinois at Chicago.
- Rosselló-Mora, R., & Amann, R. (2001). The species concept for prokaryotes. *FEMS microbiology reviews*, 25(1), 39-67.
- Rousseaux, S., Hartmann, A., & Soulas, G. (2001). Isolation and characterisation of new Gram-negative and Gram-positive atrazine degrading bacteria from different French soils. *FEMS Microbiology Ecology*, 36(2-3), 211-222.
- Rousseaux, S., Hartmann, A., Lagacherie, B., Piutti, S., Andreux, F., & Soulas, G. (2003). Inoculation of an atrazine-degrading strain, *Chelatobacter heintzii* Cit1, in four different soils: effects of different inoculum densities. *Chemosphere*, 51(7), 569-576.
- Rousseaux, S., Soulas, G., & Hartmann, A. (2002). Plasmid localisation of atrazine-degrading genes in newly described *Chelatobacter* and *Arthrobacter* strains. *FEMS microbiology ecology*, 41(1), 69-75.

## S

- Sabree, Z. L., Rondon, M. R., Handelsman, J. 2009. Metagenomics. En: *The Desk Encyclopedia of Microbiology*. Schaechter M (ed.). Academic Press, San Diego, Estados Unidos. Pp. 751-761.
- Sadowsky, M. J., Tong, Z., de Souza, M., & Wackett, L. P. (1998). AtzC is a new member of the amidohydrolase protein superfamily and is homologous to other atrazine-metabolizing enzymes. *Journal of bacteriology*, 180(1), 152-158.
- Sagarkar, S., Bhardwaj, P., Storck, V., Devers-Lamrani, M., Martin-Laurent, F., & Kapley, A. (2016). s-triazine degrading bacterial isolate *Arthrobacter* sp. AK-YN10, a candidate for bioaugmentation of atrazine contaminated soil. *Applied microbiology and biotechnology*, 100(2), 903-913.
- Sajjaphan, K., Shapir, N., Wackett, L. P., Palmer, M., Blackmon, B., Tomkins, J., & Sadowsky, M. J. (2004). *Arthrobacter aurescens* TC1 atrazine catabolism genes *trzN*, *atzB*, and *atzC* are linked on a 160-kilobase region and are functional in *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, 70(7), 4402-4407.
- Sajjaphan, K., Heepngoen, P., Sadowsky, M. J., & Boonkerd, N. (2010). *Arthrobacter* sp. strain KU001 isolated from a Thai soil degrades atrazine in the presence of inorganic nitrogen sources. *Journal of microbiology and biotechnology*, 20(3), 602-608.
- Salloto, G. R., Cardoso, A. M., Coutinho, F. H., Pinto, L. H., Vieira, R. P., Chaia, C., Lima, J.L., Albano, R.M., Martins, O.B. & Clementino, M. M. (2012). Pollution impacts on bacterioplankton diversity in a tropical urban coastal lagoon system. *PLoS one*, 7 (11), e51175.
- Sánchez-Camazano, M., Lorenzo, L. F., & Sánchez-Martín, M. J. (2005). Atrazine and alachlor inputs to surface and ground waters in irrigated corn cultivation areas of Castilla-Leon region, Spain. *Environmental monitoring and assessment*, 105(1-3), 11-24.
- Sanz, J. L., & Köchling, T. (2007). Molecular biology techniques used in wastewater treatment: an overview. *Process Biochemistry*, 42(2), 119-133.

- Schulz, R. (2004). Field studies on exposure, effects, and risk mitigation of aquatic nonpoint-source insecticide pollution. *Journal of Environmental Quality*, 33(2), 419-448.
- Scott, G. I., Moore, D. W., Fulton, M. H., Hampton, T. W., Baughman, D. S., Trim, A. H., ... & Marcus, J. M. (1988). Agricultural insecticide runoff effects on estuarine organisms: Correlating field and laboratory toxicity testing with ecotoxicological biomonitoring. *Report for test year*.
- Scragg, A. (2005). Bioremediation. *Environmental Biotechnology*, 173-229.
- Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Nación, Argentina. (1991). Ley 24.051 de Desechos Peligrosos (decreto reglamentario 831/93).
- Seeger M., Morgante V., Hernández M. (2010). Bacterial degradation of s-triazine herbicides in soils. *Bacterial Populations: Basic and Applied Aspects of Their Structure and Evolution*, ISBN: 978-81-7895-486-8 Editor: Anibal Lodeiro
- Seffernick, J. L., & Wackett, L. P. (2001). Rapid evolution of bacterial catabolic enzymes: a case study with atrazine chlorohydrolase. *Biochemistry*, 40(43), 12747-12753.
- Seffernick, J. L., Erickson, J. S., Cameron, S., Cho, S., Dodge, A. G., Richman, J., Sadowsky, M.J. & Wackett, L. P. (2012). Defining the cyanuric acid hydrolase (AtzD)/barbiturase protein family: sequences and reactions. *Journal of Bacteriology*, JB-00791.
- Seffernick, J. L., Johnson, G., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2000). Substrate specificity of atrazine chlorohydrolase and atrazine-catabolizing bacteria. *Applied and environmental microbiology*, 66(10), 4247-4252.
- Seffernick, J. L., Shapir, N., Schoeb, M., Johnson, G., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2002). Enzymatic degradation of chlorodiamino-s-triazine. *Applied and environmental microbiology*, 68(9), 4672-4675.
- Shapir, N., Cheng, G., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2006a). Purification and characterization of TrzF: biuret hydrolysis by allophanate hydrolase supports growth. *Applied and environmental microbiology*, 72(4), 2491-2495.
- Shapir, N., Mongodin, E. F., Sadowsky, M. J., Daugherty, S. C., Nelson, K. E., & Wackett, L. P. (2007). Evolution of catabolic pathways: genomic insights into microbial s-triazine metabolism. *Journal of bacteriology*, 189(3), 674-682.
- Shapir, N., Pedersen, C., Gil, O., Strong, L., Seffernick, J., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2006b). TrzN from *Arthrobacter aureescens* TC1 is a zinc amidohydrolase. *Journal of bacteriology*, 188(16), 5859-5864.
- Shapir, N., Rosendahl, C., Johnson, G., Andreina, M., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2005a). Substrate specificity and colorimetric assay for recombinant TrzN derived from *Arthrobacter aureescens* TC1. *Applied and environmental microbiology*, 71(5), 2214-2220.
- Shapir, N., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2005b). Purification and characterization of allophanate hydrolase (AtzF) from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *Journal of bacteriology*, 187(11), 3731-3738.
- Shareef, A., Page, D., Vanderzalm, J., Williams, M., Gupta, V. V. S. R., Dillon, P., & Kookana, R. (2014). Biodegradation of simazine and diuron herbicides under aerobic and anoxic conditions relevant to managed aquifer recharge of storm water. *CLEAN—Soil, Air, Water*, 42(6), 745-752.
- Shenoy, K. (2012). Environmentally realistic exposure to the herbicide atrazine alters some sexually selected traits in male guppies. *PLoS One*, 7(2), e30611.
- Sherchan, S. P., & Bachoon, D. S. (2011). The presence of atrazine and atrazine-degrading bacteria in the residential, cattle farming, forested and golf course regions of Lake Oconee. *Journal of applied microbiology*, 111(2), 293-299.
- Sherchan, S. P., Bachoon, D. S., Otero, E., & Ramsubhag, A. (2013). Molecular detection of atrazine catabolism gene atzA in coastal waters of Georgia, Puerto Rico and Trinidad. *Marine pollution bulletin*, 69(1), 215-218.

- Silva, E., Fialho, A. M., Sá-Correia, I., Burns, R. G., & Shaw, L. J. (2004). Combined bioaugmentation and biostimulation to cleanup soil contaminated with high concentrations of atrazine. *Environmental science & technology*, 38(2), 632-637.
- Silva, E., Mendes, M. P., Ribeiro, L., & Cerejeira, M. J. (2012). Exposure assessment of pesticides in a shallow groundwater of the Tagus vulnerable zone (Portugal): a multivariate statistical approach (JCA). *Environmental Science and Pollution Research*, 19(7), 2667-2680.
- Singh, B. K., & Walker, A. (2006). Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS microbiology reviews*, 30(3), 428-471.
- Singh, N., Megharaj, M., Kookana, R. S., Naidu, R., & Sethunathan, N. (2004). Atrazine and simazine degradation in Pennisetum rhizosphere. *Chemosphere*, 56(3), 257-263.
- Singh, P., Suri, C. R., & Cameotra, S. S. (2004). Isolation of a member of Acinetobacter species involved in atrazine degradation. *Biochemical and biophysical research communications*, 317(3), 697-702.
- Siripattanakul, S., Wirojanagud, W., McEvoy, J. M., Casey, F. X., & Khan, E. (2009). Atrazine removal in agricultural infiltrate by bioaugmented polyvinyl alcohol immobilized and free Agrobacterium radiobacter J14a: a sand column study. *Chemosphere*, 74(2), 308-313.
- Skipper, H. D., Arthur, G., Wollum, I. I., Turco, R. F., & Wolf, D. C. (1996). Microbiological aspects of environmental fate studies of pesticides. *Weed technology*, 174-190.
- Smith, D., Alvey, S., & Crowley, D. E. (2005). Cooperative catabolic pathways within an atrazine-degrading enrichment culture isolated from soil. *FEMS Microbiology Ecology*, 53(2), 265-273.
- Souza, R. C., Cantão, M. E., Vasconcelos, A. T. R., Nogueira, M. A., & Hungria, M. (2013). Soil metagenomics reveals differences under conventional and no-tillage with crop rotation or succession. *Applied Soil Ecology*, 72, 49-61.
- Spagna, G., Barbagallo, R. N., Casarini, D., & Pifferi, P. G. (2001). A novel chitosan derivative to immobilize  $\alpha$ -L-rhamnopyranosidase from *Aspergillus niger* for application in beverage technologies. *Enzyme and microbial technology*, 28(4), 427-438.
- Sparks, D., Suarez, D. (1991). Rates of soil chemical processes. SSSA Special Publication No 7
- Spatz, R. & Hurlé, K. (2001). Rückhaltevermögen von Pufferstreifen für pflanzen schutz mittelbelasteten Oberflächenabfluss. In: Rodemann, B., Bartels, G., Pestemer, W., Becker, H. (Eds.), Nachhaltige Landwirtschaft-Pflanzenschutz und Gewässerschutz: Mitteilungen aus der Biologischen Bundesanstalt fuer Land- und Forstwirtschaft Berlin-Dahlem, 381, pp. 154-160.
- Stoeckel, J. A., Morris, J., Ames, E., Glover, D. C., Vanni, M. J., Renwick, W., & González, M. J. (2012). Exposure Times to the Spring Atrazine Flush Along a Stream-Reservoir System1. *JAWRA Journal of the American Water Resources Association*, 48(3), 616-634.
- Stratton, G. W. (1984). Effects of the herbicide atrazine and its degradation products, alone and in combination, on phototrophic microorganisms. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 13(1), 35-42.
- Strong, L. C., Rosendahl, C., Johnson, G., Sadowsky, M. J., & Wackett, L. P. (2002). *Arthrobacter aurescens* TC1 metabolizes diverse s-triazine ring compounds. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(12), 5973-5980.
- Struthers, J. K., Jayachandran, K., & Moorman, T. B. (1998). Biodegradation of atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3368-3375.
- Subsecretaria de Recursos Hídricos de la Nación, Argentina (2003). Desarrollo de niveles guía nacionales de calidad de agua ambiente correspondientes a atrazina (Disponible en: <http://www.pnuma.org/agua-miaac/>. Consultado el 14/07/2016).

- Subsecretaría de Recursos Hídricos de la provincia de Córdoba, (ex DIPAS). Normas Provinciales de Calidad y Control de Aguas para Bebida, Resolución DIPAS N° 608/1993.
- Suh, J. K. F., & Matthew, H. W. (2000). Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials*, 21(24), 2589-2598.
- Suthersan, S. S. (2001). *Natural and enhanced remediation systems*. CRC Press.

## T

- Tadeo, J. L., Sanchez-Brunete, C., Perez, R. A., & Fernández, M. D. (2000). Analysis of herbicide residues in cereals, fruits and vegetables. *Journal of Chromatography A*, 882(1), 175-191.
- Tappin, A. D., Loughnane, J. P., McCarthy, A. J., & Fitzsimons, M. F. (2012). Removal of atrazine from river waters by indigenous microorganisms. *Environmental chemistry letters*, 10(1), 89-96.
- Thompson, I. P., Van Der Gast, C. J., Ciric, L., & Singer, A. C. (2005). Bioaugmentation for bioremediation: the challenge of strain selection. *Environmental Microbiology*, 7(7), 909-915.
- Thurman, E. M., Meyer, M., Pomes, M., Perry, C. A., & Schwab, A. P. (1990). Enzyme-linked immunosorbent assay compared with gas chromatography/mass spectrometry for the determination of triazine herbicides in water. *Analytical Chemistry*, 62(18), 2043-2048.
- Tien, C. J., Lin, M. C., Chiu, W. H., & Chen, C. S. (2013). Biodegradation of carbamate pesticides by natural river biofilms in different seasons and their effects on biofilm community structure. *Environmental pollution*, 179, 95-104.
- Tixier, C., Sancelme, M., Aït-Aïssa, S., Widehem, P., Bonnemoy, F., Cuer, A., ... & Veschambre, H. (2002). Biotransformation of phenylurea herbicides by a soil bacterial strain, *Arthrobacter* sp. N2: structure, ecotoxicity and fate of diuron metabolite with soil fungi. *Chemosphere*, 46(4), 519-526.
- Tokajian, S., & Hashwa, F. (2004). Microbiological quality and genotypic speciation of heterotrophic bacteria isolated from potable water stored in household tanks. *Water quality research journal of Canada*, 39(1), 64-73.
- Tong, H. W., Mutlu, B. R., Wackett, L. P., & Aksan, A. (2014). Manufacturing of bioreactive nanofibers for bioremediation. *Biotechnology and bioengineering*, 111(8), 1483-1493.
- Topp, E. (2001). A comparison of three atrazine-degrading bacteria for soil bioremediation. *Biology and Fertility of Soils*, 33(6), 529-534.
- Topp, E., Mulbry, W. M., Zhu, H., Nour, S. M., & Cuppels, D. (2000a). Characterization of s-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioide* sp. isolated from agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(8), 3134-3141.
- Topp, E., Zhu, H., Nour, S. M., Houot, S., Lewis, M., & Cuppels, D. (2000b). Characterization of an Atrazine-Degrading *Pseudaminobacter* sp. Isolated from Canadian and French Agricultural Soils. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(7), 2773-2782.
- Tsai, G. J., Zhang, S. L., & Shieh, P. L. (2004). Antimicrobial activity of a low-molecular-weight chitosan obtained from cellulase digestion of chitosan. *Journal of Food Protection*, 67(2), 396-398.
- Tsigos, I., Martinou, A., Kafetzopoulos, D., & Bouriotis, V. (2000). Chitin deacetylases: new, versatile tools in biotechnology. *Trends in biotechnology*, 18(7), 305-312.
- Turiel, E., Fernández, P., Pérez-Conde, C., & Cámara, C. (2000). Trace-level determination of triazines and several degradation products in environmental waters by disk solid-phase extraction and micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Chromatography A*, 872(1), 299-307.
- Turtakovsky, B., Petti, L., & Gulot, S. (2000). *U.S. Patent No. 6,051,411*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

- Tyagi, M., da Fonseca, M. M. R., & de Carvalho, C. C. (2011). Bioaugmentation and biostimulation strategies to improve the effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, 22(2), 231-241

## U

- Udikovic Kolic, N., Hrsak, D., Begonja Kolar, A., Petric, I., Stipicevic, S., Soulas, G., & Martin-Laurent, F. (2007). Combined metabolic activity within an atrazine-mineralizing community enriched from agrochemical factory soil. *International biodeterioration & biodegradation*, 60(4), 299-307.
- Udiković Kolić, N., Martin-Laurent, F., Devers, M., Petrić, I., Begonja Kolar, A., & Hršak, D. (2008). Genetic potential, diversity and activity of an atrazine-degrading community enriched from a herbicide factory effluent. *Journal of applied microbiology*, 105(5), 1334-1343.
- Udiković-Kolić, N., Scott, C., & Martin-Laurent, F. (2012). Evolution of atrazine-degrading capabilities in the environment. *Applied microbiology and biotechnology*, 96(5), 1175-1189.
- UNESCO (2003) "Agua para el futuro: ¿Cuáles son las tendencias?".
- Unión Europea (UE), 2004. Anexo I to 91/414/EEC
- Unión Europea (UE), 2008. Directiva 2008/105/EC del Parlamento Europeo y del consejo de 16 de diciembre de 2008 relativa a las normas de calidad ambiental en el ámbito de la política de aguas.
- Unión Europea (UE), 1998. Directiva 98/83/EC sobre la calidad de agua para consume humano.
- Urseler, N. L., Bachetti, R. A., Rotondaro, D.I., Porporatto, C. & Morgante, C. A. (2014) Contaminación por atrazina de aguas superficiales y subterráneas en la región agrícola-ganadera centro-sur de Córdoba. Memorias de Trabajos CYTAL. Editorial. edUTecNe. Bs. As. Argentina. ISBN. 978-987-1896-34-9. 273-277.
- US Environmental Protection Agency (US EPA), 2004. Environmental Testing Verification Program. Washington, DC: US EPA.
- US EPA. Atrazine: Carcinogenicity characterization and hazard assessment, office of pesticide programs, health effects division. 1999. <http://www.epa.gov/scipoly/sap/#jan>
- US EPA. Environmental Protection Agency (2009). National Primary Drinking Water Regulations. Disponible en: <http://water.epa.gov/drink/contaminants/upload/mcl-2.pdf> (Revisado 13 de julio de 2016).
- Ushiba, Y., Takahara, Y., & Ohta, H. (2003). *Sphingobium amiense* sp. nov., a novel nonylphenol-degrading bacterium isolated from a river sediment. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 53(6), 2045-2048.

## V

- Vaishampayan, P. A., Kanekar, P. P., & Dhakephalkar, P. K. (2007). Isolation and characterization of *Arthrobacter* sp. strain MCM B-436, an atrazine-degrading bacterium, from rhizospheric soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 60(4), 273-278.
- Van Hamme, J. D., Singh, A., & Ward, O. P. (2003). Recent advances in petroleum microbiology. *Microbiology and molecular biology reviews*, 67(4), 503-549.
- Vassilakis, I., Tsipi, D., & Scoullou, M. (1998). Determination of a variety of chemical classes of pesticides in surface and ground waters by off-line solid-phase extraction, gas chromatography with electron-capture and nitrogen-phosphorus detection, and high-performance liquid chromatography with post-column derivatization and fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 823(1), 49-58.

- Vera, C., Baez, J., Douglas, M., Emmanuel, C.B., Marengo, J., Meitin, J., Nicolini, M., Nogues-Paegle, J., Paegle, J., Penalba, O., Salio, P., Saulo, C., Silva Dias, M.A. y Zipser, E. (2006). The South American Low-Level Jet Experiment. *American Meteorological Society* 87(1): 63- 77.
- Verrhiest, G. J., Clement, B., Volat, B., Montuelle, B., & Perrodin, Y. (2002). Interactions between a polycyclic aromatic hydrocarbon mixture and the microbial communities in a natural freshwater sediment. *Chemosphere*, 46(2), 187-196.
- Vibber, L. L., Pressler, M. J., & Colores, G. M. (2007). Isolation and characterization of novel atrazine-degrading microorganisms from an agricultural soil. *Applied microbiology and biotechnology*, 75(4), 921-928.
- Vitanov, N. K., Lekova, K. I., & Dobрева, N. I. (2003). Monitoring river water in the lower Danube for atrazine contamination. *Acta Chromatographica*, 230-242.
- Vladár, P., Ruzsnyák, A., Márialigeti, K., & Borsodi, A. K. (2008). Diversity of sulfate-reducing bacteria inhabiting the rhizosphere of *Phragmites australis* in Lake Velencei (Hungary) revealed by a combined cultivation-based and molecular approach. *Microbial ecology*, 56(1), 64-75.
- Vonberg, D., Vanderborght, J., Cremer, N., Pütz, T., Herbst, M., & Vereecken, H. (2014). 20 years of long-term atrazine monitoring in a shallow aquifer in western Germany. *Water research*, 50, 294-306.
- Vryzas, Z., Papadakis, E. N., Oriaklí, K., Moysiadis, T. P., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2012). Biotransformation of atrazine and metolachlor within soil profile and changes in microbial communities. *Chemosphere*, 89(11), 1330-1338.
- Vryzas, Z., Vassiliou, G., Alexoudis, C., & Papadopoulou-Mourkidou, E. (2009). Spatial and temporal distribution of pesticide residues in surface waters in northeastern Greece. *Water Research*, 43(1), 1-10.

## W

- Wackett, L., Sadowsky, M., Martinez, B., & Shapir, N. (2002). Biodegradation of atrazine and related s-triazine compounds: from enzymes to field studies. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 58(1), 39-45.
- Wan, R., Wang, Z., & Xie, S. (2014). Dynamics of communities of bacteria and ammonia-oxidizing microorganisms in response to simazine attenuation in agricultural soil. *Science of the Total Environment*, 472, 502-508.
- Wang, H., Liu, Y., Li, J., Lin, M., & Hu, X. (2016). Biodegradation of atrazine by *Arthrobacter* sp. C3, isolated from the herbicide-contaminated corn field. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 13(1), 257-262.
- Wang, J., Van Tittelboom, K., De Belie, N., & Verstraete, W. (2012). Use of silica gel or polyurethane immobilized bacteria for self-healing concrete. *Construction and building materials*, 26(1), 532-540.
- Wang, J., Zhu, L., Liu, A., Ma, T., Wang, Q., Xie, H., Wan, J., Jiang, T. & Zhao, R. (2011). Isolation and characterization of an *Arthrobacter* sp. strain HB-5 that transforms atrazine. *Environmental geochemistry and health*, 33(3), 259-266.
- Wang, Q., & Xie, S. (2012). Isolation and characterization of a high-efficiency soil atrazine-degrading *Arthrobacter* sp. strain. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 71, 61-66.
- Wang, Q., Xie, S., & Hu, R. (2013). Bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. strain DAT1 for remediation of heavily atrazine-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77, 63-67.
- Watanabe, K., & Hamamura, N. (2003). Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 289-295.

- Weber, J. B., Wilkerson, G. G., Michael Linker, H., Wilcut, J. W., Leidy, R. B., Senseman, S., & Mueller, T. C. (2000). A proposal to standardize soil/solution herbicide distribution coefficients. *Weed Science*, 48(1), 75-88.
- Weisburg, W. G., Barns, S. M., Pelletier, D. A., & Lane, D. J. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Journal of bacteriology*, 173(2), 697-703.
- Westerberg, K., Elväng, A. M., Stackebrandt, E., & Jansson, J. K. (2000). *Arthrobacter chlorophenolicus* sp. nov., a new species capable of degrading high concentrations of 4-chlorophenol. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50(6), 2083-2092.
- Wheeler, A. G., Barbee, S. J., Hammond, B. G., Inoue, T., Ishida, N., Cascieri, T., & Schardein, J. (1985). Three generation reproduction study in rats administered cyanurate. *Toxicologist*, 5, 189.
- Widada, J., Nojiri, H., Yoshida, T., Habe, H., & Omori, T. (2002). Enhanced degradation of carbazole and 2, 3-dichlorodibenzo-p-dioxin in soils by *Pseudomonas resinovorans* strain CA10. *Chemosphere*, 49(5), 485-491.
- Wilson, M. S., Bakermans, C., & Madsen, E. L. (1999a). In situ, real-time catabolic gene expression: extraction and characterization of naphthalene dioxygenase mRNA transcripts from groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(1), 80-87.
- Wise, L. E., & Walters, E. H. (1917). Isolation of cyanuric acid from soil. *J. Agric. Res. (Washington, DC)*, 10, 85-91.
- Woese, C. R. (1987). Bacterial evolution. *Microbiological reviews*, 51(2), 221.

## X

- Xian-Zhu, D. A. I., Jiang, J. D., Li-Feng, G. U., Rong-Qing, P. A. N., & Shun-Peng, L. I. (2007). Study on the atrazine-degrading genes in *Arthrobacter* sp. AG1. *Chinese Journal of Biotechnology*, 23(5), 789-793.
- Xiong, G., Liang, J., Zou, S., & Zhang, Z. (1998). Microwave-assisted extraction of atrazine from soil followed by rapid detection using commercial ELISA kit. *Analytica chimica acta*, 371(1), 97-103.
- Xu, W. A. N. G., Jilong, L. I., Houjuan, X. I. N. G., & Shiwen, X. U. (2011). Review of toxicology of atrazine and chlorpyrifos on fish. *Journal of Northeast Agricultural University (English edition)*, 18(4), 88-92.

## Y

- Yalpani, M., & Hall, L. D. (1984). Some chemical and analytical aspects of polysaccharide modifications. III. Formation of branched-chain, soluble chitosan derivatives. *Macromolecules*, 17(3), 272-281.
- Yamazaki, K., Fujii, K., Iwasaki, A., Takagi, K., Satsuma, K., Harada, N., & Uchimura, T. (2008). Different substrate specificities of two triazine hydrolases (TrzNs) from *Nocardioide*s species. *FEMS microbiology letters*, 286(2), 171-177.
- Yang, C., Li, Y., Zhang, K., Wang, X., Ma, C., Tang, H., & Xu, P. (2010). Atrazine degradation by a simple consortium of *Klebsiella* sp. A1 and *Comamonas* sp. A2 in nitrogen enriched medium. *Biodegradation*, 21(1), 97-105.
- Yanze-Kontchou, C., & Gschwind, N. (1994). Mineralization of the herbicide atrazine as a carbon source by a *Pseudomonas* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(12), 4297-4302.
- Younger, P. L. (2009). *Groundwater in the environment: an introduction*. John Wiley & Sons.

## Z

- Zahraa, O., Sauvanaud, L., Hamard, G., & Bouchy, M. (2003). Kinetics of atrazine degradation by photocatalytic process in aqueous solution. *International Journal of Photoenergy*, 5(2), 87-93.
- Zeyer, J., Bodmer, J., & Hütter, R. (1981). Rapid degradation of cyanuric acid by *Sporothrix schenckii*. *Zentralblatt für Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene: I. Abt. Originale C: Allgemeine, angewandte und ökologische Mikrobiologie*, 2(2), 99-110.
- Zhang, J., Xia, W., Liu, P., Cheng, Q., Tahiri, T., Gu, W., & Li, B. (2010). Chitosan modification and pharmaceutical/biomedical applications. *Marine drugs*, 8(7), 1962-1987.
- Zhang, L. S., Wu, W. Z., & Wang, J. L. (2007). Immobilization of activated sludge using improved polyvinyl alcohol (PVA) gel. *Journal of environmental sciences*, 19(11), 1293-1297.
- Zhang, Y., Jiang, Z., Cao, B., Hu, M., Wang, Z., & Dong, X. (2011). Metabolic ability and gene characteristics of *Arthrobacter* sp. strain DNS10, the sole atrazine-degrading strain in a consortium isolated from black soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65(8), 1140-1144.
- Zhi, E., Song, Y., Duan, L., Yu, H., & Peng, J. (2015). Spatial distribution and diversity of microbial community in large-scale constructed wetland of the Liao River Conservation Area. *Environmental Earth Sciences*, 73(9), 5085-5094.
- Zhou, A. X., Zhang, Y. L., Dong, T. Z., Lin, X. Y., & Su, X. S. (2015). Response of the microbial community to seasonal groundwater level fluctuations in petroleum hydrocarbon-contaminated groundwater. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(13), 10094-10106.
- Zhu, X. K., Li, Q. Y., & Cai, B. L. (2009). Isolation and Identification of *Arthrobacter* sp. AD26 and Joint Degradation of Atrazine by *Arthrobacter* sp. AD26 and *Pseudomonas* sp. ADP [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 3, 042.
- Zivanovic, S., Basurto, C. C., Chi, S., Davidson, P. M., & Weiss, J. (2004). Molecular weight of chitosan influences antimicrobial activity in oil-in-water emulsions. *Journal of Food Protection*, 67(5), 952-959.



73060