

### Biodegradación del herbicida atrazina por bacterias aisladas de suelos agrícolas

*Biodegradation of herbicide atrazine by bacteria isolated from agricultural soils*

Miguel Cervantes<sup>1</sup> y Pablo Ramírez<sup>2</sup>  
Universidad Nacional Mayor de San Marcos

#### RESUMEN

Atrazina es uno de los herbicidas más usados a nivel mundial en cultivos de maíz, sorgo, caña de azúcar, piña entre otros, pertenece a la familia de los s-triazínicos por presentar un anillo heterocíclico que le confiere una alta estabilidad. Es considerado por la EPA, OMS, OSPAR y WWF como disruptor hormonal y por su persistencia ambiental, facilidad para filtrarse en los suelos, es un contaminante de depósitos de agua subterránea, ríos y lagos. En el presente trabajo se evaluó la eficiencia de degradación de la atrazina por bacterias aisladas de suelos agrícolas. Se seleccionaron 7 consorcios microbianos MIG-AI, MIG-AS, MIG-BS, MIG-DI, MIG-E, MIG-F y MIG-G por crecimiento y progresiva solubilidad del herbicida durante 4 subcultivos en medio mínimo en atrazina como una única fuente de carbono y nitrógeno. El consorcio MIG-AI seleccionado por mejor rendimiento presentó una velocidad específica de crecimiento  $0.31 \text{ h}^{-1}$  solubilizando atrazina en 2 días y generando áreas de aclaramiento en 4 días en medio líquidos y sólido, respectivamente. Se identificó mediante análisis del gen RNAr 16S la cepa *Stenotrophomonas maltophilia* MIG-AI/2 que presentó capacidad de degradar atrazina.

**PALABRAS CLAVE:** Atrazina; *Stenotrophomonas*; biodegradación; disruptor hormonal.

#### ABSTRACT

Atrazine is one of the most widely used herbicides worldwide in corn, sorghum, sugarcane, pineapple and others, belongs to the family of s-triazine to present a heterocyclic ring that confers high stability. It is considered by the EPA, WHO, OSPAR, WWF as hormonal disruptor and its environmental persistence, ability to seep into the soil, is a contaminant of groundwater reservoirs, rivers and lakes. The present work is evaluated efficiency of atrazine degradation by bacteria isolated from agricultural soils. 7 microbial consortia MIG-AI, MIG-AS-BS MIG MIG-DI, MIG-E,-F and MIG MIG-G selected by growth and progressive solubility of the herbicide over 4 subcultures in minimal medium as a sole atrazine carbon and nitrogen source. The MIG-AI consortium selected for best performance presents a specific growth rate of  $0.31 \text{ h}^{-1}$  atrazine solubilizing in 2 days and generating areas of clearance in 4 days in liquid and solid medium, respectively. It was identified by analysis of 16S rRNA gene of strain *Stenotrophomonas maltophilia* MIG-AI/2 having ability to degrade atrazine.

**KEYWORDS:** Atrazine; *Stenotrophomonas*; biodegradation; hormonal disruptor.

Recibido: 30/09/2015

Aprobado: 13/11/2015

1 Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, <micersan@gmail.com>.

2 Laboratorio de Microbiología Molecular y Biotecnología, Facultad de Ciencias Biológicas, <pramirezr@unmsm.edu.pe>.  
Correspondencia: Apartado postal 110058, Lima 11, Perú.

## Introducción

Entre las muchas sustancias químicas utilizadas como herbicidas, se tiene la familia de las *s*-triazinas, siendo la atrazina una de las más difundidas y utilizadas en el mundo (Davidson *et al.* 2005). La atrazina se usa en cultivos de caña de azúcar, maíz, sorgo, piña y en ciertos tipos de almendras y nueces; también se ha usado en silvicultura, en zonas con cultivos de pino y para prevenir el crecimiento de hierbas a lo largo de carreteras y líneas ferroviarias (Rias & Anis, 2009).

El nombre científico de la atrazina según IUPAC es 2-cloro-4-etil amino-6-isopropilamino-1,3,5-triazina. Su acción herbicida consiste en bloquear el transporte de electrones entre las plastoquinonas QA y QB durante la reacción de Hill en el fotosistema II, provocando la inhibición de la fotosíntesis de hidratos de carbono y la acumulación de dióxido de carbono dentro de la hoja, que deriva en el daño de estomas y en la inhibición de la transpiración (Tafoya, 2008).

La atrazina es un compuesto que, pese a su elevada toxicidad y permanencia en el medio ambiente, es susceptible de ser biodegradado por bacterias del suelo (Dehghani *et al.* 2013). Se tiene entendido que a bajas concentraciones de plaguicidas, en el suelo, no afectan a la mayoría de poblaciones de grupos microbianos, y en el caso específico de atrazina se ha encontrado que la población bacteriana bajo condiciones aeróbicas lo emplean como fuente de carbono y nitrógeno (Radosevich *et al.* 1995).

La ruta metabólica para la biodegradación de atrazina, puede variar de un organismo a otro. La cantidad y tipo del metabolito generado varía entre las diferentes rutas. La alta especificidad de las enzimas de las distintas bacterias como AtzA (o TrzN), AtzB y AtzC, les permite actuar sobre compuestos *s*-triazínicos específicamente, para metabolizarlos hasta

ácido cianúrico el cual puede ser transformado posteriormente por numerosas enzimas de menor especificidad (Shapir *et al.*, 2007). La AtzD actúa en conjunto con AtzE y AtzF para hidrolizar el ácido cianúrico, obteniéndose en total tres moles de dióxido de carbono y tres moles de amonio.

Muchas de las bacterias que degradan atrazina recientemente aisladas contienen *tzrN* en lugar de *atzA* como la enzima responsable de la etapa inicial del metabolismo. Los sustratos sobre las que actúa la enzima AtzA son muy específicos, limitándose a las *s*-triazinas con grupo cloruro pero no fluoruro, por lo que las bacterias que poseen AtzA, AtzB y AtzC son incapaces de metabolizar herbicidas *s*-triazínicos no clorados (Seffernick *et al.* 2002). Por otra parte, tanto estos herbicidas no clorados como la atrazina, pueden ser metabolizados por microorganismos que contengan las enzimas TzrN, AtzB y AtzC. Este hecho apoya la hipótesis de que, debido a su mayor poder catalítico de TzrN en comparación con AtzA, esta enzima se ha propagado más exitosamente entre los microorganismos ambientales (Tafoya 2008).

Las enzimas que participan en la ruta metabólica de la degradación de la atrazina han sido identificadas bacterias Gram negativas como: *Pseudomonas sp.* ADP, *Ralstonia brasiliensis* M91-3, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Aminobacter aminovorans*, *Aminobacter ciceronei*, entre otros (Martínez *et al.* 2001). En Gram positivas: *Nocardioides sp.* SP12, *Arthrobacter aurescens* TC1, *Rhodococcus corallinus* NRRL B-15444 y *Arthrobacter crystallopoietes* (Mulbry, 1994; Topp *et al.* 2000; Shapir *et al.* 2005).

En el Perú, el uso de herbicidas triazínicos está bien difundido. Sin embargo, no se han desarrollado monitoreos de control ambiental en relación a la atrazina, generando un desconocimiento sobre el nivel de contaminación de fuentes subterráneas de agua, ríos, lagunas y humedales; de igual manera hay

pocas investigaciones en nuestro país sobre los plaguicidas y su efecto posible en la salud humana. Tampoco hay investigación sobre su biodegradación y posibles soluciones. En este sentido, contribuirá en el conocimiento de la biodegradabilidad de la atrazina por microorganismos de suelos en nuestro país.

## Materiales y métodos

**Material Químico y Biológico.** Se usó el herbicida GESAPRIM granulado 90WG (Novartis AG, Basel, Suiza) conteniendo 90% de atrazina. Se colectaron 11 muestras de suelos de estación experimental del Programa de Maíz de la UNALM, con más de 2 décadas de antigüedad.

**Selección de consorcios que degradan atrazina.** Las muestras fueron cultivadas por 7 días, 28°C, 200 rpm en medio mínimo MS (De souza *et al.* 1998) compuesto por (g/L):  $K_2HPO_4$  1.74,  $NaH_2PO_4$  0.36,  $MgSO_4$  0.12, atrazina 0.1 como única fuente de carbono y nitrógeno, pH 6.8; 10 mL/L de solución de trazas (Tafoya *et al.* 1998; De souza *et al.* 1998). Al cabo de los 7 días, se realizaron 4 trasplantes de 10 mL a nuevos medios de cultivos. Se seleccionaron los consorcios crecieron solubilizando atrazina midiendo la densidad óptica a 600 nm ( $DO_{600}$ ). De igual manera los consorcios fueron sembrados sobre la superficie de medio mínimo sólido MS (De souza *et al.* 1998) revestido en su superficie con atrazina por 14 días a 28°C. La presencia de áreas claras y colonias indicaron degradación y crecimiento microbiano.

**Amplificación del gen rRNA 16S.** DNA genómico usado fue de la cepa MIG-A12. Para la extracción de DNA cromosómico se utilizó la metodología de *Wizard genomic DNA purification kit* (Promega®) (Orbegozo *et al.* 2008).

Para la amplificación por PCR se empleó los iniciadores 27f (5'-AGA GTT TGA TCM TGG

CTC AG-3') y 536R (5'-GWA TTA CCG CGG CKG CTG-3'); el tamaño del producto esperado fue de 500 pb (Abanto, 2008), y se siguió las indicaciones de la *KOD HOT start DNA polimerasa* (Novagen®) para la reacción de PCR, la cual consistió en: desnaturalización inicial a 95°C por 2 min, 33 ciclos de desnaturalización a 95°C por 30 seg, hibridación a 62°C por 10 seg, amplificación a 70°C por 10 seg, y amplificación final a 70°C por 10 min. Para visualizar el DNA cromosomal y los productos de PCR se utilizó geles de agarosa 1% en amortiguador TAE 0.5X. La tinción se realizó con bromuro de etidio y las bandas se visualizaron en un transiluminador de luz UV. La secuenciación de los amplificadores se realizó bajo las condiciones de *BigDye™ terminator cycling* y la corrida utilizando *Automatic Sequencer 3730xl* de la empresa *MacroGen Korea* (<http://www.macrogenusa.com>).

**Análisis molecular.** La secuencia consenso del gen rRNA 16S de la cepa seleccionada fue alineada con el programa ClustalX 2.0.12 (Thompson *et al.* 1997). Luego, éstas fueron comparadas con la base de datos del GenBank/EMBL/DDBJ usando la plataforma del programa local de alineamiento de secuencias BlastN versión 2.0 (Altschul *et al.* 1990). Luego, se realizó un alineamiento múltiple con el programa Clustal W de Bioedit 7.0.9 (Hall *et al.* 1999) con secuencias que presentaron similitud mayor o igual a 98% a otras especies relacionadas obtenidas de la base de datos. Luego, y finalmente, se construyó el árbol filogenético con el programa Mega 5.0 (Kumar *et al.* 2008) empleando el método de Neighbor-Joining con modelo de sustitución Jukes y Cántor para análisis de Máxima Verosimilitud.

**Cinética de crecimiento del consorcio MIG-A1.** El consorcio fue reactivado por 72 horas, luego se inoculó al 2% en medio MS con atrazina a 40 y 100 mg/L. El crecimiento de la po-

blación de bacterias fue determinada a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas, en medio TSA a 28°C por 48 horas.

**Cinética de degradación de atrazina.** El consorcio MIG-AI fue reactivado por 72 horas, luego se inoculó al 2% en medio MS con atrazina a 40 y 100 mg/L e incubadas a 28°C con agitación constante a 200 rpm. Se tomaron alícuotas de 1 mL a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas, fueron diluidas, centrifugadas a 13000 rpm y evaluadas por absorbancia a 221 nm de longitud de onda por espectrofotometría UV (Tafoya, 2008). Se trabajó sin y con el antimicótico ciclohexemide a una concentración final de 10 mg/L.

**Determinación de ácido cianúrico por espectrofotometría.** El consorcio MIG-AI se inoculó al 2% en medio MS con atrazina a 40 y 100 mg/L e incubado a temperatura ambiente en agitación constante a 150 rpm. Se tomaron alícuotas de 2 mL a las 0, 24, 48, 72 y 120 horas, centrifugadas a 5000 rpm y mezcladas con el reactivo melanina en relación de 2:1. Luego se midió la absorbancia por espectrofotometría a 480 nm de longitud de onda (Galíndez *et al.* 2010; HACH 1989).

## Resultados

**Selección de consorcios bacterianos resistentes a atrazina.** De las 11 muestras evaluadas solo 7 solubilizaron atrazina y presentaron crecimiento microbiano al observarse el aclaramiento de los medios de cultivo (MIG:\_AI, BS, E, G, F, DI, AS), los otros consorcios MIG-DCS, MIG-HCS+HI y MIG-C no generaron ningún cambio. Los consorcios MIG-AI, MIG-G presentaron mejores resultados. Los 7 consorcios seleccionados generaron áreas de aclaramiento en medio sólido tal como se muestra el halo de degradación en la figura 1.

**Cinética de aclaramiento por solubilidad y consumo de atrazina.** Los consorcios seleccionados generaron halos de aclaramiento a los 6 días, siendo el consorcio MIG-AI el de más rápida solubilización (48 horas) con crecimiento bacteriano hasta el día 5, posteriormente decayó la población microbiana. Los demás consorcios presentaron valores de aclaramiento posterior a las 72 horas (Fig. 2).

**Cinética de crecimiento del consorcio MIG-AI.** El consorcio evaluado a una concentración de 100 mg/L de atrazina, exponencialmente dentro de las 48 horas con una velocidad de crecimiento de 0.312 h<sup>-1</sup>. En fase de latencia disminuye su velocidad de crecimiento entre las 48 y 120 horas, para finalmente entrar en fase de decaimiento celular después de las 120 horas. Cuando el consorcio MIG-AI es evaluado en medio de cultivo líquido MS a 40 mg/L de atrazina, crece exponencialmente dentro de las 48 horas a 0.32 h<sup>-1</sup>, disminuyendo su velocidad de crecimiento entre las 24 y 72 horas, para finalmente entrar en fase de latencia a las 72 horas y fase de muerte entre las 72 y 120 horas por ausencia de nutrientes.

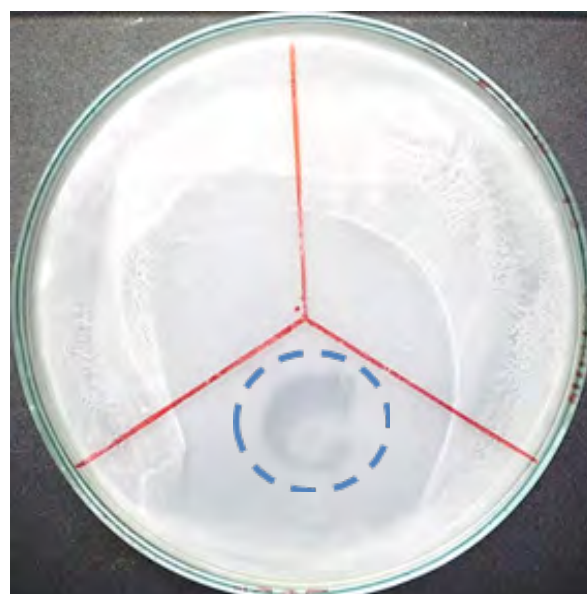


Figura 1. Área de degradación (aclaramiento) de atrazina por el Consorcio MIG-AI en medio sólido MS con atrazina, a los 4 días de cultivo.

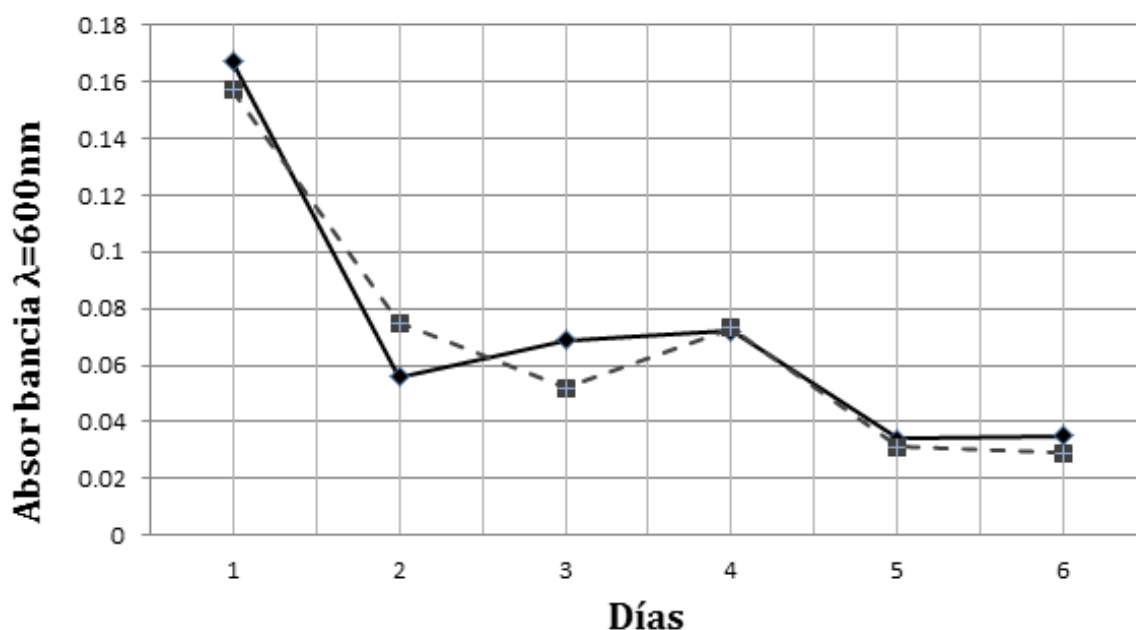


Figura 2. La cinética de degradación de la atrazina por los consorcios MIG-AI y AS, evaluados durante 6 días.

**Cuantificación de la degradación de la atrazina.** El consorcio MIG-AI consumió el 70% de atrazina a las 48 horas en medio MS a 100 mg/L de atrazina, y cuando fue inoculado en medio líquido MS a 40 mg/L de concentración inicial de atrazina, consume el 18% a las 48 horas, alcanzando valores estables después de las 120 horas. Estos resultados indican que el consorcio MIG-AI consume mayor cantidad de atrazina cuando su concentración es de 100 mg/L en contraste de 40 mg/L, probablemente debido a la existencia de una mayor población de microorganismos por mayor cantidad de nutrientes disponibles (Fig. 04).

**Evaluación de la presencia de ácido cianúrico por espectrofotometría.** El consorcio MIG-AI al degradar 40 y 100 mg/L del herbicida presenta una acumulación de ácido cianúrico gradual entrando en fase exponencial entre el día 2 y 4, alcanzando la mayor concentración de ácido cianúrico en el día 5; donde consumo de este metabolito por el consorcio bacteriano supera a la generación de ácido cianúrico. La producción de ácido cianúrico fue mayor en los medios que presentaron mayor

concentración de atrazina, esto se debe probablemente a una mayor actividad del consorcio por mayor consumo de nutrientes y producción de metabolitos (Fig. 05).

**Ensayos fenotípicos.** Se aislaron las cepas MIG-AI/1, MIG-AI/2, MIG-AI/4G, MIG-AI/5, MIG-AI/24A, MIG-AI/24C, MIG-AI/120A y MIG-AI/120B. Las características culturales de las cepas aisladas fueron: Gram negativas, forma circular, borde entero, elevación plana, textura cremosa, brillante de pigmentación crema con elevación plana y entera; a excepción de MIG 24C que difiere con el borde irregular y pigmentación amarilla, pruebas bioquímicas son mostradas en la Tabla 1. De las 8 cepas bacterianas, la cepa MIG-AI/2 logró solubilizar la atrazina con crecimiento microbiano a las 48 horas; sin embargo, al ser mantenida en medio TSA sin atrazina, perdió su capacidad degradativa. La cepa MIG-AI/2 presenta las siguientes características fenotípicas a 28°C: bacilo Gram negativo, catalasa positiva de crecimiento rápido, móvil, prueba de oxidasa negativa y DNAsa positiva, olor característico a amoníaco. Características culturales de co-



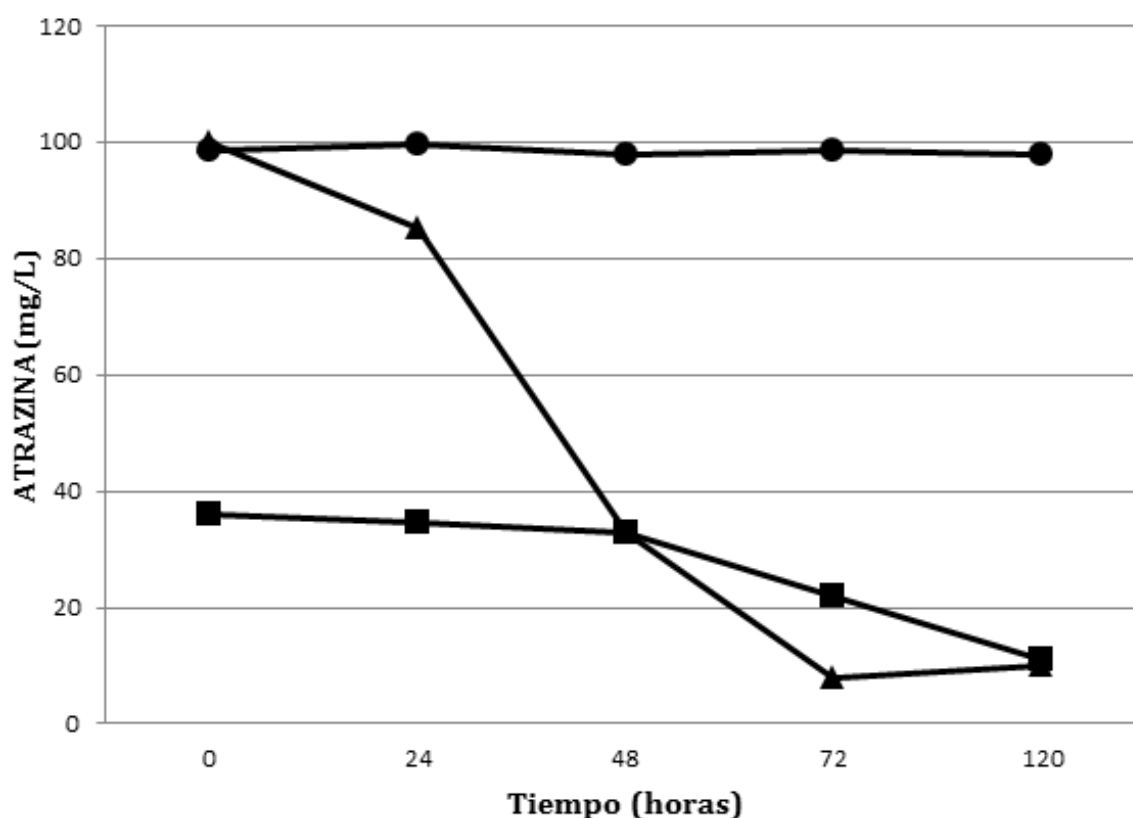


Figura 4. Cinética de degradación de atrazina por el consorcio MIG-AI en medio MS, evaluado a 100 mg/L (●), 40 mg/L (■) y con un control de 100 mg/L (▲). Incubado a 28°C y 180 rpm. Promedio de tres repeticiones.

lonia en agar TSA a 28°C por 24 horas: circular, opaca con centro amarillo y un promedio de 3 mm de diámetro. En medio sólido MS con glucosa al 0.3%, sulfato de amonio al 1% y atrazina con 20 mg/L de concentración, las características culturales a 28°C por 72 horas fueron: plana, de crecimiento lento (48 h), color blanco, opaco, circular y un diámetro de 2 mm.

**Determinación de la relación filogenética.** La secuencia consenso del gen rRNA 16S de MIG-AI/2 fue comparada con las Base de Datos mediante el programa BLASTn 2.0, y se obtuvo como resultado una identidad de 99% y una similitud de 100% con *Stenotrophomonas maltophilia* S4 (KF542911.1), *S. maltophilia* TS51(2010)(GU998810.1), *S. maltophilia* (DQ813325.1), y con similitud de

99% con *S. maltophilia* S2(KF542909.1), *Stenotrophomonas* sp. S2 (KF542909.1), *Stenotrophomonas* P-Q-4 (KC991320.1), *Stenotrophomonas* JT-0602 (JN571747.1); así como otras secuencias de bacterias no cultivables. Se construyó el árbol filogenético con el programa MEGA 5.0 (Fig 03).

## Discusión

**Evaluación de parámetros de la degradación de la atrazina.** La atrazina es un herbicida altamente persistente en el ambiente por su estabilidad química (EPA, 2007). Estudios del proceso de biodegradación de atrazina en suelos agrícolas reportan una vida media de 120 días en el suelo DR063 de Sinaloa (González-Márquez & Hansen, 2009), otros

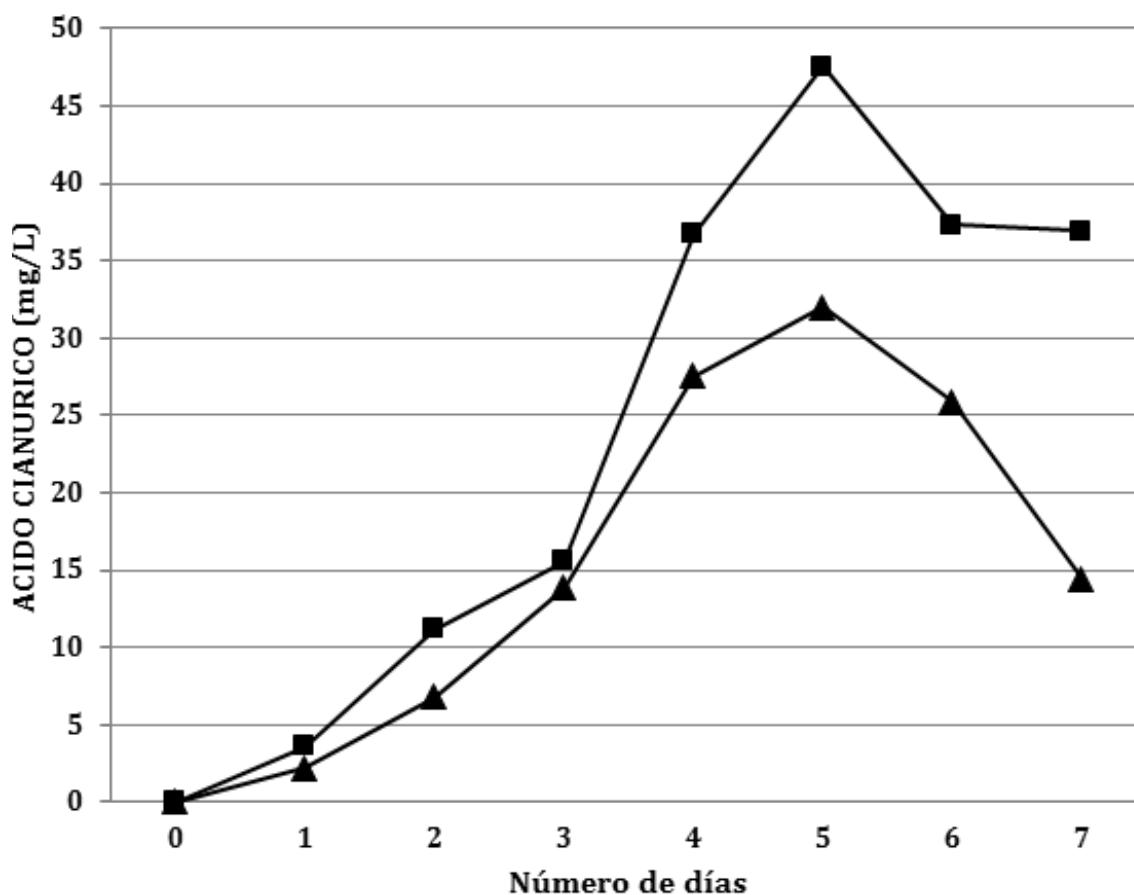


Figura 5. Cinética de la formación del ácido cianúrico a lo largo de la degradación de la atrazina del consorcio MIG-AI evaluado a 100 mg/L (□) y 40 mg/L (△).

estudios reportan vidas medias en suelos superficiales en suelos de Cárdenas, Tabasco y DR063 de 0.99 a más de 35 días. Estas diferencias de vidas medias se explican por la presencia de fertilizantes nitrogenados y de sales que retardan la degradación de la atrazina (Guillén Garcés *et al.* 2007). El crecimiento celular en medios conteniendo atrazina y una fuente adicional de carbono mostró menos degradación y biomasa en *Cryptococcus laurentii*, similares resultados fueron observados en el caso de *Agrobacterium radiobacter* J14a, donde la adicional fuente de carbón tal como sacarosa no incrementó significativamente la tasa de degradación de atrazina (Struthers, 1998); sin embargo, se reporta que la adición de sacarosa y citrato de sodio en medios de 100 mg/L de atrazina obtuvo una alta tasa de

biodegradación de 87.72%, las demás fuentes de carbono como glucosa, sacarosa, citrato de sodio y almidón disminuyeron la tasa de biodegradación del herbicida (Dehghandi *et al.* 2013).

La atrazina puede hidrolizarse con bastante rapidez en medios ácidos o alcalinos, pero es muy resistente a la hidrólisis en medios neutros; además, también se reporta que la hidrólisis de la atrazina a pH 4 sin aditivos toma 244 días y de 1.73 días en presencia de ácidos húmicos (FAO, 2000). Estas características probablemente favorecen la biodegradación de la atrazina a un pH de 6.5 que es ligeramente ácido y un parámetro que presentaron nuestros medios de cultivo. Sin embargo, se reporta que el pH óptimo para la degradación de la atrazina por consorcios microbianos fue de 7

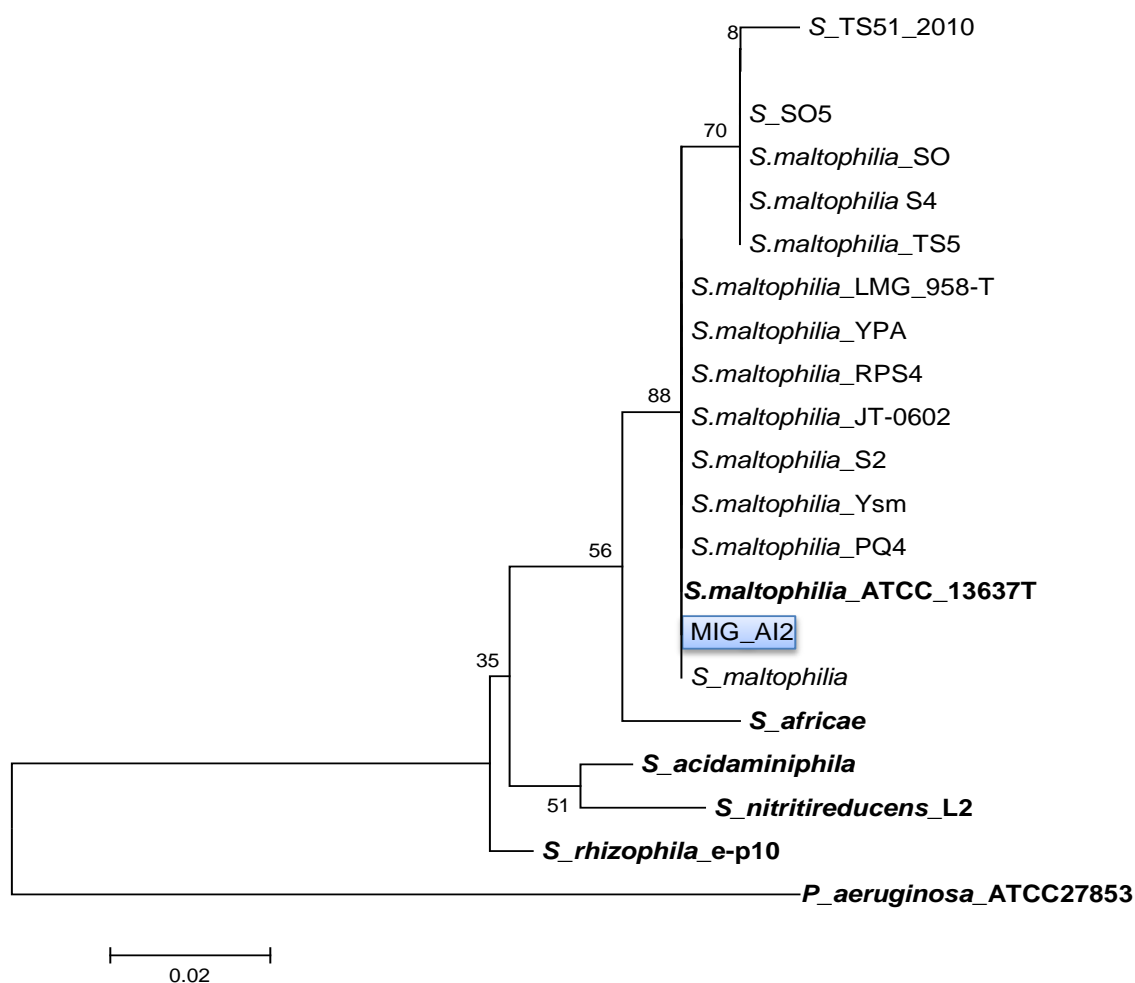


Figura 3. Árbol filogenético de *Stenotrophomonas maltophilia* MIG-A1/2 [ ] en la que conforma un clado de 88% de probabilidad con diferentes secuencias de la especie *S. maltophilia*. Los valores de los nodos de las ramas representa el porcentaje de bootstraps y el valor 0.02 bajo la barra representa el porcentaje de sustituciones nucleotídicas.

en comparación a 6.5, 7.5, 8 y 8.5 (Dehghani *et al.* 2013). La capacidad de biodegradación por consorcios bacterianos no fue marcadamente alterada a pH de 6.5 y 7.5 a 30°C (Mandelbaum *et al.* 1995).

**Cinética de solubilidad de la atrazina y crecimiento bacteriano.** La velocidad específica de crecimiento del consorcio MIG-AI fue de 0.312 h<sup>-1</sup> y 0.32 h<sup>-1</sup> para una concentración inicial de 40 mg/L y 100 mg/L de atrazina, respectivamente. Esta ligera diferencia nos indica que la población bacteriana presenta un mejor crecimiento a concentraciones próximas a la

solubilidad, con un rango de detección dentro de los 2 hasta 35 mg/L (ATSDR, 2003). Es probable que a mayores concentraciones la velocidad específica de crecimiento disminuya, debido a la poca disponibilidad del herbicida al no estar en su fase soluble. Las poblaciones bacterianas en los medios mínimos de cultivo MS evaluados a 100 mg/L crecen ininterrumpidamente hasta las 120 horas, en contraste con las 72 horas de los medios MS a 40 mg/L. Similares resultados obtuvo Rasodevich *et al.* (1995), al trabajar con 21.5 mg/L de atrazina en fase soluble, evaluando el crecimiento poblacional a 660 nm de absorbancia, a dife-



rencia de los 600 nm utilizados en la presente investigación para evaluar la solubilidad de la atrazina y el crecimiento bacteriano que se detectó por aumento de turbidez en el rango de las 48 y 72 horas, que coincide con el final de la fase logarítmica y terminal estacionario. La degradación de la atrazina no se ve afectada cuando se trabajó entre 30 y 200 mg/L de concentración para medios líquidos con *Cryptococcus laurentii* y *Agrobacterium* J14a con un mejor crecimiento a 30°C de incubación (Nilanjana *et al.* 2012).

**Evaluación de la cinética de degradación de atrazina.** El consorcio MIG-AI a 100 mg/L de atrazina presentó una velocidad de degradación de 2.174 mg atrazina/L.h mientras evaluado a 40 mg/L se obtuvo 0.455 mg atrazina/L.h. Tafoya *et al.* (2008) evaluó la degradación del herbicida en un sistema continuo de lecho empacado con consorcios microbianos produciendo una velocidad de remoción de atrazina de 3.2 mg atrazina/L.h. Esta mayor eficiencia se debe al sistema de alimentación continua de 122 mg/L de concentración inicial de atrazina. Se aislaron 8 cepas bacterianas destacándose la cepa MIG-AI/2 al solubilizar la atrazina a las 72 horas; sin embargo, al mantenerla en medios TSA sin atrazina por 2 meses perdió su capacidad degradativa. La inestabilidad fenotípica de bacterias Gram negativas, como la *Pseudomonas sp.* ADP, para degradar xenobióticos se ha reportado durante su cultivo y propagación en medios enriquecidos que presentan otras fuentes de carbono y nitrógeno de mayor afinidad por los microorganismos. La cepa *Pseudomonas sp.* ADP en medios que presentan  $\text{NH}_4\text{Cl}$  en ausencia de atrazina como única fuente de nitrógeno (De Souza *et al.*, 1998) mostró similar comportamiento a la MIG-AI/2. Asimismo, se ha reportado que las cepas bacterianas con capacidad degradativa de atrazina mantenidas en medio Luria-Bertani generó con el tiempo la pérdida de las primeras enzimas

que degradan la atrazina, dichos genes se encuentran solo en 96 kb del pADP-1 que fue transferido para la cepa *Escherichia coli* con una frecuencia de  $4.7 \times 10^{-2}$ , que sugiere un mecanismo molecular para la dispersión de los genes atzABC hacia otras bacterias de suelos (De Souza *et al.* 1998; Mogodin *et al.* 2006). Esta inestabilidad fenotípica de la capacidad degradativa de muchos compuestos xenobióticos distintos a atrazina ya se ha reportado en otras bacterias aislada de suelos (Nakatsu *et al.* 1991; Tomasek *et al.* 1989), y en esta investigación se reporta esta inestabilidad para *S. maltophilia* MIG-AI/2. Se tiene reportado que el plásmido pB10 en ausencia de antibiótico o algún factor que estimule el uso de ese plásmido por *S. maltophilia* P21 y *Pseudomonas putida* H2 (De Gelder *et al.* 2005; 2007).

La presencia de ácido cianúrico en los medios mínimos por reacción con la melamina que se une preferentemente con las moléculas de ácido cianúrico, manteniéndolo en suspensión y facilitando la evaluación por absorbancia a una longitud de onda de 525 nm (HACH, 1989). Este método es más específico y preciso que la cuantificación por espectrometría UV a absorbancias de 212 y 213 nm, que presentan interferencias con la atrazina y sus metabolitos producidos durante su mineralización (Fig. 04).

**Caracterización molecular de la cepa MIG-AI/2.** La secuencia parcial del gen rRNA ribosomal 16S de la cepa MIG-AI/2 permitió identificarla con 100% de similitud y 99% de identidad con *S. maltophilia*. El alineamiento de la parcial secuencia de MIG-AI/2 con otras secuencias altamente similares presentó un sitio polimórfico. La comparación con la cepa *S. maltophilia* ATCC 13637<sup>T</sup> representa una similitud del 100%, y al compararla con la secuencias de las especies del género *Stenotrophomonas sp.* presentó una similitud de 95.89%, 95.67%, 95.21% y 94.98%, con *S. africanae*, *S. acidaminiphila*, *S. rhizophila* y *S. ni-*

*tritireducens* respectivamente, lográndose diferenciar a nivel de especie. La comparación de secuencias con *P. aeruginosa* ATCC 27853 como grupo externo, presenta una similitud de 84.54%, permitiendo distinguir las cepas del género *Stenotrophomonas* de *Pseudomonas*. Adicionalmente, las características fenotípicas ensayadas concuerda con el género *Stenotrophomona sp.* listadas en el Manual de Bacteriología y Sistemática de Bergey (Brenner *et al.* 2005).

### Agradecimientos

El presente trabajo fue parcialmente financiado por la UNMSM a través del Vicerrectorado de Investigación.

### Referencias bibliográficas

ATSDR (Agency for Toxic Substances y Disease Registry). 2003. (En línea). Reseña Toxicológica de la atrazina. Atlanta, GA: Departamento de Salud y Servicios Humanos de los EEUU, Servicio de Salud Pública. <[http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es\\_phs153.html](http://www.atsdr.cdc.gov/es/phs/es_phs153.html)>. Acceso: 15/05/14.

ALTSCHUL S., W. GISH, E. MILLER, D. MYERS & D. LIPMAN. 1990. Basic Local Alignment Search Tool. *J Mol Biol.* 215:403-410.

BRENNER D., N. KRIEG, J. STALEY. 2005. Bergey's manual of systematic bacteriology (volumen two: The proteobacteria part B the Gammaproteobacteria). Editor in Chief: George M. Garrity. Segunda edición. London New York: Springer Dordrecht Heidelberg. 1136p. ISBN 0-387-95040-0.

DAVIDSON, P.C. 2005. Bioremediation of Groundwater Contaminated With Agricultural Chemicals. B.S. thesis. Asesor: Prasanta K. Agricultural Engineering Dept. University of Illinois, Urbana. USA.

DE GELDER I., C. VANDCASTEELE, I. BROWN, J. FORNEY & E.M.

TOP. 2005. Plasmid donor affects host range of the promiscuous IncP-1 $\beta$  Plasmid pB10 in a sewage sludge microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 71:5309-5317.

DE GELDER I., J. PONCIANO, P. JOYCE & E.M. TOP. 2007. Stability of a promiscuous plasmid in different host: no guarantee for a long-term relationship. *Microbiology.* 153:452-463.

DEGHANI, M., S. NASSERI, H. HASHEMI. 2013. Study of Bioremediation of Atrazine under variable Carbon and Nitrogen Source by Mixed Bacterial Consortium Isolated from Corn Field Soil in Fars Province of Iran. *Journal of Environmental and Public Health.* Article ID 973165, p. 7. 47.

DE SOUZA, M., J. SEFFERNICK, B. MARTÍNEZ, M. SADOWSKY & L. WACKETT. 1998. The Atrazine Catabolism Genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *Journal of Bacteriology.* 180(7):1951-1954.

EPA (Environmental Protection Agency). 2007. Triazine herbicides as atrazine in water by quantitative immunoassay. Washington, DC.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). 2000. Evaluación de la contaminación del suelo. Manual de referencia. Roma, Italia. <<http://www.fao.org/docrep/005/x2570s/X2570S09>>. Acceso: 23/04/13.

GALÍNDEZ, S. 2010. Biodegradación simultánea de los herbicidas atrazina y simazina por un cultivo bacteriano binario en un reactor de Biopelícula. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias Quimicobiológicas. Instituto Politécnico Nacional. México D.F.

GONZÁLES-MARQUÉZ L. & A. HANSEN. 2009. Adsorción y mineralización de atrazina y relación con parámetros de suelos del DR 063 Guasave, Sinaloa. *Revista Mexicana de Ciencias Geológicas* 26(3):587-599.

GUILLÉN-GARCÉS, R.A., A.M. Hansen, M. Afferden. 2007. Mineralization of atrazine in agricultural soil: Inhibition by nitrogen. *Environ. Toxicol. Chem.* 844-850.

HACH COMPANY/HACH LANGE GMBH. 1989. Turbidimetric Method 8139.

- HALL, Tom. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp.*41: 95-98.
- JUKES, T. H. & CANTOR, C. R. 1969. Evolution of protein molecules. Ed. H. N. Munro. In *Mammalian Protein Metabolism*. Academic Press, New York. Pp. 21-132.
- KUMAR, S., N. MASATOSHI, J. DUDLEY, K. TAMURA. 2008. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Briefings in Bioinformatics* 9(4):299-306.
- NILANJANA, D., E. AGITAIL, V. LAKSHMI. 2012. Biodegradation of atrazine by *Cryptococcus laurentii* isolated from contaminated agriculture soil. *J. Microbiol. Biotech. Res.* 2(3):450-457.
- MANDELBAUM, R.T., D. L. ALLAN, L.P. WACKETT. 1995. Isolation and characterization of a *Pseudomonas* sp. that mineralizes the s-triazine herbicide atrazine. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 1451 - 1457.
- MARTÍNEZ, B., J. TOMKINS, L. WACKETT, R. WING, M. SADOWSKY. 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.
- MULBRY, W. 1994. Purification and Characterization of an Inducible s-Triazine Hydrolase from *Thodococcus corallinus* NRRL B-15444R. *Appl Environ Microbiol* 60(2):613.
- ORBEGOZO, J., M. ABANTO, R. GARCIA, P. RAMÍREZ. 2008. Identificación molecular de *Pichia guilliermondii* aislada de aguas ácidas de minas del Perú y su resistencia a metales pesados. *Rev. Perú. Biol.* 15(1): 91-96.
- RADOSEVICH, M., S.J. TRAINA, Y.L. HAO, O.H. TOUVINEN. 1995. Degradation and mineralization of atrazine by a soil bacterial isolate. *Applied and Environmental Microbiology.* 1995. 61(1):297-302.
- RIAZ, A., R. ANIS. 2009. Sorption Characteristics of Atrazine and Imazethapyr in Soils of New Zealand: Importance of Independently Determined Sorption Data. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 57(22) ,10866-10875.
- SEFFERNICK, J.L., H.M. TAVISH, J.P. OSBORNE, M.L. SOUZA, M.J. SADOWSKY, L.P. WACKETT. 2002. Atrazine chlorohydrolase from *Pseudomonas* sp. Strain ADP is a metalloenzyme. *Biochemistry.* 41:14430-14437.
- SHAPIR, N., E.F. MONGODIN, M.J. SADOWSKY, S.C. DAUGHERTY, K.E. NELSON, L.P. WACKETT. 2007. Evolution of Catabolic Pathways: Genomic Insights into Microbial s-Triazine Metabolism. *Minireview. Journal of Bacteriology.* 189(3):674-682.
- STRUTHERS, J.K., K. JAYACHANDRAN, T.B. MOORMAN. 1998. Biodegradation of Atrazine by *Agrobacterium radiobacter* J14a and Use of This Strain in Bioremediation of Contaminated Soil. *Appl Environ Microbio* 64(9): 3368-3375.
- TAFOYA, T. 2008. Biodegradación del herbicida triazínico, atrazina, por una comunidad bacteriana, seleccionada en quimiostato, inmovilizada en reactores de lecho empacado. Tesis Doctoral. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del Instituto Politécnico Nacional. México. <<http://itzamna.bnct.ipn.mx:8080/dspace/simple-search?query=atrazina>>. Acceso: 15/04/14.
- THOMPSON, J., T. GIBSON, F. PLEIONIAK, F. JEANMOUGIN, D. HIGGINS. 1997. The Clustal\_X interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucl Acids Res.* 25:4876-4882.
- TOMASEK, P.H., B. FRANTZ, U.M.X. SANGODKAR, R.A. HAUGLAND, M. CHAKRABARTY. 1989. Characterization and nucleotide sequence determination of a repeat element isolated from a 2,4,5-T degrading strain of *Pseudomonas cepacia*. *Gene.* 76:227-238.
- TOPP, E., W.M. MULBRY, H. ZHU, S.M. NOUR, D. CUPPELS. 2000. Characterization of S-triazine herbicide metabolism by a *Nocardioides* sp. isolated from agricultural soils. *Appl Environ Microbiol* 66(8):3134-41. PMID: 10919761.