

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**“Integración de una comunidad microbiana capaz de
degradar herbicidas organoclorados y sus derivados”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS
QUIMICOBILÓGICAS:**

PRESENTA:

NAHUM TORRES ARREDONDO



DIRECTORES DE TESIS

DR. JUVENCIO GALINDEZ MAYER

DRA. FORTUNATA SANTOYO TEPOLE

O 2011



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 10:00 horas del día 15 del mes de Junio del 2011 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas para examinar la tesis titulada:

Integración de una comunidad microbiana capaz de degradar herbicidas organoclorados y sus derivados.

Presentada por el alumno:

Torres	Arredondo	Nahúm
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
		Con registro: B 0 9 1 0 3 7

aspirante de:

Maestría en Ciencias Quimicobiológicas

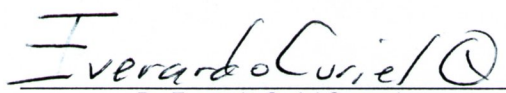
Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

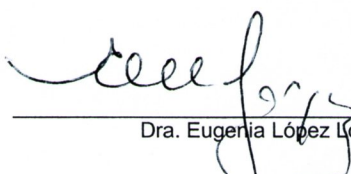
Directores de tesis


Dr. Cutberto José Juvencio Galíndez Mayer


Dra. Fortunata Santoyo Tepole


Dr. Everardo Curiel Quesada


Dra. Deifilia Ahuatzi Chacón


Dra. Eugenia López López

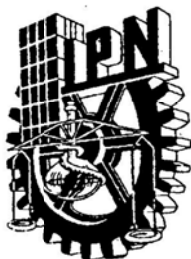

Dra. Nora Ruiz Ordaz

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES


Dr. Manuel Jesús Piñón López



S. E. P.
Escuela Nacional de Ciencias Biológicas
Sección de Estudios de Posgrado e Investigación

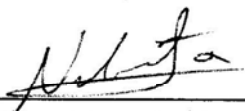


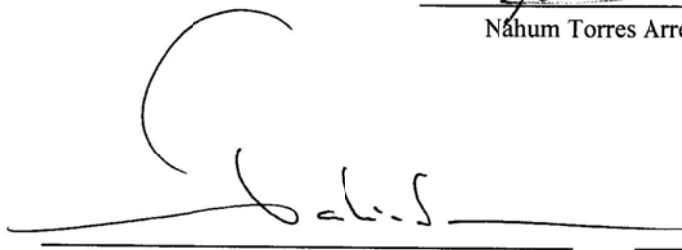
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

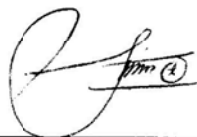
CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F., el día 15 del mes junio del año 2011, el (la) que suscribe Nahúm Torres Arredondo alumno (a) del Programa de Maestría en Ciencias Quimicobiológicas con número de registro B091037, adscrito a la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Cutberto José Juvencio Galíndez Mayer y la Dra. Fortunata Santoyo Tepole y ceden los derechos del trabajo intitulado, “Integración de una comunidad microbiana capaz de degradar herbicidas organoclorados y sus derivados” al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección ibq.torres@gmail.com o juvenciogm@yahoo.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.


Nahúm Torres Arredondo


Dr. Cutberto José Juvencio Galíndez Mayer


Dra. Fortunata Santoyo Tepole

INDICE GENERAL

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Generalidades	1
1.2. Agroquímico	2
1.2.1. Herbicida	4
1.2.2. Clasificación	4
1.2.3. Herbicidas Triazínicos	5
1.3. Atrazina	6
1.3.1. Permanencia en el ambiente	7
1.3.2. Efectos tóxicos de la atrazina	7
1.4. Simazina	8
1.4.1. Permanencia en el ambiente	9
1.4.2. Efectos tóxicos de la simazina	9
2. ANTECEDENTES	10
2.1. Degradación de atrazina	10
2.1.1. Vía de degradación de la atrazina	14
2.2. Degradación de simazina	15
2.2.1. Vía de degradación de la simazina	17
2.3. Degradación de mezclas de herbicidas	18
3. JUSTIFICACIÓN	21
4. OBJETIVO	22
4.1. General	22
4.2. Específicos	22
5. DESARROLLO EXPERIMENTAL	23
6. MATERIALES	24
6.1. Microorganismos	23
6.2. Medio de cultivo	24
6.2.1. Medio de conservación de las cepas	25
6.3. Herbicidas e intermediarios de la degradación	26

6.3.1. Atrazina	26
6.3.2. Simazina	26
6.3.3. Intermediarios de la degradación	27
6.4. Biorreactor de lecho empacado	28
7. MÉTODOS EXPERIMENTALES	29
7.1. Evaluación del crecimiento de los microorganismos en los herbicidas e intermediarios en medio sólido	29
7.2. Evaluación de la degradación de los herbicidas e intermediarios en medio líquido y cultivo por lote.	29
7.3. Capacidad de adsorción de la mezcla de herbicidas en el material de soporte.	29
7.4. Inmovilización del cultivo seleccionado en el material de soporte.	30
7.5. Evaluación cinética de la degradación de los herbicidas en el reactor horizontal de lecho empacado	30
7.6. Evaluación de la capacidad de degradación de los intermediarios por la comunidad seleccionada en cultivo por lote en medio líquido con células inmovilizadas.	32
7.7. Determinación de cuenta viable en el soporte del reactor.	33
7.8. Evaluación de la permanencia de la comunidad en el reactor.	33
7.9. Seguimiento de los genes que codifican para las enzimas que degradan los diferentes herbicidas.	34
8. MÉTODOS ANALÍTICOS Y TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR	35
8.1. Determinación de concentración celular	35
8.1.1. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)	35
8.2. Determinación de concentración de herbicidas e intermediarios	35
8.2.1. Espectrofotometría UV	35
8.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)	36
8.2.2.1. Atrazina y simazina	36
8.2.2.2. Ácido cianúrico	37
8.2.2.3. Intermediarios	37
8.2.2.4. Intermediarios deshalogenados	37
8.2.2.5. Intermediarios halogenados	38
8.2.3. Determinación de glucosa	38

8.2.4. Carbono orgánico total (COT)	38
8.2.5. Ácido cianúrico	38
8.3. Técnicas de biología molecular	39
8.3.1. Extracción de DNA	39
8.3.2. Amplificación de DNA	39
8.3.3. Electroforesis en gel de agarosa	41
8.3.4. Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE)	41
9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	43
9.1. Comunidades que degradan atrazina y simazina	43
9.2. Pruebas de crecimiento de diferentes microorganismos en intermediarios de la degradación de los herbicidas en medio sólido.	43
9.3. Selección de la comunidad que se inmovilizó en el reactor de lecho empacado.	48
9.4. Pruebas de crecimiento de la comunidad artificial en medio líquido	48
9.5. Construcción del reactor	53
9.5.1. Operación abiótica y saturación del reactor	54
9.6. Operación del reactor en régimen continuo con la comunidad artificial seleccionada.	56
9.6.1. Monitoreo de la acumulación de intermediarios en la degradación del reactor.	61
9.6.2. Monitoreo de la acumulación de ácido cianúrico	65
9.7. Monitoreo del mantenimiento de la comunidad artificial en el reactor de lecho empacado.	66
9.8. Seguimiento de los genes que codifican para las enzimas que degradan los diferentes herbicidas.	70
10. Conclusión	73
11. Bibliografía	75
11.1. Consultas en internet	79

INDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Interacción de los agentes agroquímicos con los ecosistemas	2
Figura 2. Anillo s-triazina, con sustituyentes	5
Figura 3. Fotosistema I y II.	6
Figura 4. 6-chloro- <i>N</i> -ethyl- <i>N'</i> -isopropyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (Atrazina)	6
Figura 5. 6-chloro- <i>N,N'</i> -diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (Simazina)	8
Figura 6. Vía de degradación de la atrazina	14
Figura 7. Vía de degradación de la simazina	17
Figura 8. Similitud en las vías de degradación de los herbicidas triazinicos	20
Figura 9. Desarrollo experimental	23
Figura 10. Espectros de absorción en cultivos por lote, empleando la mezcla de las cepas seleccionadas de la comunidad que degrada simazina, utilizando como sustrato la mezcla atrazina-simazina (50:10 ppm). Los resultados corresponden a duplicados.	45
Figura 11. Espectros de absorción de muestras de cultivos por lote, empleando el conjunto de integrantes seleccionados de las comunidades que degradan simazina (C ₃ y C ₅) y atrazina (C ₉ , C ₁₀ y C ₁₁), utilizando como sustrato la mezcla atrazina-simazina (50:10 ppm).	47
Figura 12. Perfil cromatográfico de la degradación de atrazina por la comunidad, en cultivo por lote con células inmovilizadas.	50
Figura 13. Perfil cromatográfico que ilustra degradación de desisopropil-atrazina exógena por la comunidad en cultivo por lote con células inmovilizadas.	50
Figura 14. Perfil cromatográfico que ilustra la degradación de desetil atrazina por la comunidad en cultivo por lote con células inmovilizadas (40 ppm de glucosa como fuente de carbono adicional).	52
Figura 15. Perfil cromatográfico que ilustra la degradación de desisopropil atrazina por la comunidad en cultivo por lote con células inmovilizadas (40	52

ppm de glucosa como fuente de carbono adicional).

Figura 16. Esquema y fotografía del reactor air-lift-empacado	53
Figura 17. Espectros de absorción de las muestras tomadas en el suministro y el efluente del reactor a diferentes tiempos, durante la saturación del soporte con la mezcla de herbicidas.	54
Figura 18. Cinética de saturación del soporte. La concentración de herbicidas se expresa como ppm de atrazina, determinada espectrofotométricamente ($A_{221\text{ nm}}$).	55
Figura 19. Comportamiento de la A_{221} del suministro y del efluente del reactor a las diferentes velocidades de flujo.	56
Figura 20. Perfil cromatográfico del suministro y del efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de $0.8\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$.	57
Figura 21. Perfil cromatográfico del suministro y del efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de $2.1\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$.	57
Figura 22. Perfil cromatográfico del suministro y del efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de $4.36\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$.	58
Figura 23. Perfil cromatográfico del suministro y del efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de $8.7\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$.	58
Figura 24. Perfil cromatográfico del suministro y del efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de $17.4\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$.	58
Figura 25. Perfil cromatográfico del suministro y el efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de $34.9\text{ mg L}^{-1}\text{ d}^{-1}$.	59
Figura 26. Velocidad volumétrica de remoción de la mezcla de herbicidas (R_{V_H}) en función de la carga de la mezcla de herbicidas (B_{V_H}).	59
Figura 27. Velocidad volumétrica de remoción de ácido cianúrico ($R_{V_{AC}}$) en función de la carga de ácido cianúrico ($B_{V_{AC}}$), suministrado como fracción de la molécula de los herbicidas.	60
Figura 28. Eficiencia de remoción del herbicida y del ácido cianúrico en función de la carga de herbicidas (B_{V_H}).	61

Figura 29. Perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios a una concentración de 10 ppm leídas a 210 nm. 1) Acido cianurico, 2) Hidroxi desetil desisopropil atrazina, 3) Desetil desisopropil atrazina, 4) Hidroxi desetil atrazina, 5) Desisopropil atrazina, 6) Hidroxi simazina, 7) Desetil atrazina, 8) Hidroxi atrazina, 9) Simazina, 10) Atrazina.	62
Figura 30. Perfil cromatográfico del efluente del reactor comparado con el perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios. Velocidad de flujo: 4 mL h ⁻¹ .	63
Figura 31. Perfil cromatográfico del efluente del reactor comparado con el perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios. Velocidad de flujo: 10 mL h ⁻¹ .	63
Figura 32. Perfil cromatográfico del efluente del reactor comparado con el perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios. Velocidad de flujo: 40 mL h ⁻¹ .	64
Figura 33. Perfil cromatográfico del efluente del reactor comparado con el perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios. Velocidad de flujo: 80 mL h ⁻¹ .	64
Figura 34. Perfil cromatográfico del efluente del reactor comparado con el perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios. Velocidad de flujo: 160 mL h ⁻¹ .	65
Figura 35. Velocidad específica de remoción de ácido cianúrico, por <i>S. maltophilia</i> , en función de la carga teórica de ácido cianúrico suministrada al reactor.	68
Figura 36. Remoción total de los herbicidas por unidad formadora de colonia en función de la carga.	68
Figura 37. TGGE de muestras de las células inmovilizadas del reactor de lecho empacado	69
Figura 38. TGGE de cepas puras inoculadas en el reactor de lecho empacado.	69
Figura 39. Geles de agarosa con el amplificado del gen <i>atz A</i> para cada una de	70

las muestras tomadas, A) cepas puras, B) células libres y C) células inmovilizadas.

Figura 40. Geles de agarosa con el amplificado del gen *atz B* para cada una de las muestras tomadas, A) cepas puras, B) células libres y C) células inmovilizadas. 71

Figura 41. Geles de agarosa con el amplificado del gen *atz C* para cada una de las muestras tomadas, A) cepas puras, B) células libres y C) células inmovilizadas. 72

INDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Clasificación de plaguicidas	3
Tabla 2. Integrantes de las comunidades utilizadas durante el desarrollo del trabajo	24
Tabla 3. Composición del medio mínimo mineral empleado	25
Tabla 4. Composición de la solución de oligoelementos	25
Tabla 5. Composición porcentual del herbicida Gesaprim 90 WG	26
Tabla 6. Composición porcentual del herbicida Sinamex 50 SC	27
Tabla 7. Cálculo de valores cinéticos	31
Tabla 8. Iniciadores utilizados para la evaluación de la riqueza de las especies de la comunidad seleccionada	34
Tabla 9. Iniciadores utilizados para detectar la presencia de genes catabólicos en la comunidad seleccionada	34
Tabla 10. Longitud de onda de máxima absorbancia de los herbicidas e intermediarios	36
Tabla 11. Mezcla de reacción para la amplificación de DNA mediante la técnica de PCR	39
Tabla 12. Condiciones de la PCR para la amplificación de los genes de las enzimas.	41
Tabla 13. Condiciones de operación del equipo de TGGE	42
Tabla 14. Integrantes de las comunidades y sus claves a utilizar durante el desarrollo del trabajo	43
Tabla 15. Evaluación de crecimiento de los integrantes de la comunidad microbiana aislada que degrada simazina en los herbicidas y en los diferentes	44

intermediarios de degradación

Tabla 16. Evaluación de crecimiento de los integrantes de la comunidad aislada de medio con atrazina en los diferentes intermediarios de degradación.	46
Tabla 17. Evaluación del crecimiento de los integrantes de la comunidad seleccionada en los diferentes intermediarios de degradación.	47
Tabla 18. Comunidad artificial seleccionada para inocular el reactor.	48
Tabla 19. Eficiencia de remoción en medio líquido de los herbicidas e intermediarios de su degradación en cultivo por lote, por la comunidad artificial proveniente del lecho empacado.	49
Tabla 20. Eficiencia de degradación de los intermediarios en cultivo por lote, empleando medio líquido adicionado con glucosa.	51
Tabla 21. Características volumétricas del reactor	53
Tabla 22. Concentración de ácido cianúrico a las diferentes cargas volumétricas	66
Tabla 23. . Unidades formadoras de colonias (UFC) provenientes del soporte, a las velocidades de flujo ensayadas.	67
Tabla 24. Resultados del balance de ácido cianúrico en la última velocidad de flujo del reactor.	69

Resumen

Por razones económicas, una enorme cantidad de áreas boscosas o selváticas, han sido convertidas en campos de cultivo para la producción intensiva de alimentos o biocombustibles. La economía de plantación, exige eliminar la competencia por espacios y nutrientes que representan para el plantío las denominadas malezas con la consecuente utilización masiva de herbicidas. Aunque esto incrementa la productividad agrícola, provoca una severa contaminación en suelos y agua que, finalmente afecta los ecosistemas, pudiendo incluso provocar daños a la salud de los trabajadores agrícolas. Por su amplio uso, los herbicidas triazínicos representan un importante grupo de herbicidas. Las s-triazinas tienen en común un anillo heterocíclico con tres átomos de nitrógeno y tres de carbono distribuidos simétricamente. Este anillo es responsable del carácter recalcitrante de este grupo de herbicidas. Aunque la atrazina y la simazina son compuestos ligeramente solubles en agua, la presencia de agentes humectantes y dispersantes en sus formulaciones comerciales, favorecen la contaminación de cuerpos de agua.

Se han reportado diferentes procesos para remover atrazina y simazina de agua contaminada. Entre ellos tenemos métodos químicos y fisicoquímicos, que han demostrado tener elevadas eficiencias de oxidación, pero con elevados costos. Los métodos biológicos, principalmente los métodos aeróbicos presentan altas eficiencias de remoción cuando se emplean comunidades microbianas en vez de cultivos axénicos.

En el presente estudio se empleó una comunidad artificial, integrada a partir de comunidades previamente aisladas, capaces de degradar los compuestos atrazina y simazina, para metabolizar una mezcla de atrazina-simazina. La capacidad que presenta esta comunidad para degradar intermediarios metabólicos de ambos herbicidas fue también evaluada. Esto se realizó probando la capacidad de crecimiento de los integrantes de las comunidades en medio sólido con los diferentes herbicidas e intermediarios, evaluando su crecimiento a diferentes tiempos, y después probando la capacidad de las mejores cepas en medio líquido. Basados en estos resultados, la comunidad artificial compuesta por los géneros *Cellulomonas*, *Pseudonocardia*, *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter* y *Rhizobium*.

Para la evaluación cinética y estequiométrica de esta comunidad, fue construido un reactor de lecho empacado rectangular en el que la recirculación de reactantes y de líquido oxigenado a la biopelícula inmovilizada en el soporte se logró por medio de un canal *airlift* ubicado en el centro

del bio-reactor. En este bio-reactor se probó la degradación de la mezcla atrazina-simazina (50:10 ppm), a diferentes velocidades de flujo, que se variaron de 4 mL h⁻¹ a 160 mL h⁻¹. En todos los casos, la remoción de herbicidas fue del 100%, medida por HPLC y COT, sin embargo, se observó la aparición de intermediarios metabólicos que el COT no es capaz de detectar.

La acumulación de estos compuestos, principalmente el ácido cianúrico (AC), fue detectada por HPLC. Conforme se aumentó la carga volumétrica de herbicidas, la acumulación de AC se incrementó en el bio-reactor. Esto podría relacionarse con la gradual disminución de una bacteria del género *Stenotrophomonas*, que contiene la maquinaria enzimática para la degradación de AC.

Una vez que finalizó el proceso de biodegradación, se calculó estequiométricamente la eliminación de AC; la cual se debió a la adsorción de la biopelícula, biodegradación y acumulación intracelular, presuntamente en las bacterias que carecen de la información genética para producir la enzima cianúrico amidohidrolasa.

Abstract

For economic reasons, an enormous amount of forested areas have been converted in agricultural lands for extensive food or biofuels production. The plantation economy requires eliminating weed competition for space and nutrients; with the consequent massive use of herbicides. The extensive agriculture increased crop productivity, but causes severe soil and water pollution that ultimately affect aquatic ecosystems and may even damage the health of agricultural workers. The s-triazinic compound share a heterocyclic ring with three nitrogen and three carbon atoms symmetrically arranged. This ring is responsible of the recalcitrance of this group of herbicides. Although atrazine and simazine are slightly water-soluble compounds, due to the presence of wetting and dispersant agents in herbicide commercial formulations, they can contaminate water bodies.

Different processes have been reported to remove atrazine and simazine from contaminated water. Among them, the chemical and physicochemical methods have demonstrated high-oxidation efficiencies, but also high cost. Biological methods, especially the aerobic processes, could remove, economically and efficiently these herbicides, particularly when microbial communities, instead axenic cultures, are used.

In the present study, an artificial community built from previously isolated bacterial strain, able to degrade atrazine or simazine, was used to metabolize a mixture of atrazine and simazine. The capability to degrade metabolic intermediaries of both herbicides was also evaluated for this community. This was done by testing the cell growth of community's members in solid medium with different herbicides and intermediaries, assessing growth at different times, and the evaluating the degradation capability of the best strains in liquid medium. Based on these results, the artificial community was integrated by bacterial strains pertaining to the genera *Cellulomonas*, *Pseudonocardia*, *Stenotrophomonas*, *Arthrobacter* and *Rhizobium*.

For the kinetic and stoichiometric evaluation of this community, a rectangular packed-bed biofilm-reactor was constructed. The recirculation of oxygenated liquid and reactants to the attached biofilm was achieved by means of an airlift channel located at the center of the bioreactor. In this bioreactor, the biodegradation of a mixture of atrazine-simazine (50:10 ppm) was evaluated at six flow rates, ranging from 4 to 160 mL h⁻¹. In all cases, the removal efficiencies measured by HPLC and TOC were 100%; however, the recalcitrant heterocyclic metabolic intermediaries were not

determined by COT. The accumulation of compounds, mainly cyanuric acid (CA), was detected by HPLC. When the volumetric loading rate of herbicides was increased, CA accumulation was also increased in the bioreactor. This fact could be related to the gradual decay of *Stenotrophomonas*, bacteria which contains the enzymatic machinery for CA degradation.

Once that biodegradation process ends, it was stoichiometrically estimated that CA removal was due to biofilm adsorption, biodegradation, and intracellular accumulation; presumptively by bacterial strains lacking the information to synthesize the cyanuric amidohydrolase enzyme.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Generalidades

Durante el desarrollo de la humanidad y después de que el ser humano se convirtiera en sedentario, éste ha buscado conseguir el alimento de una forma u otra, principalmente empleando la agricultura como fuente principal de insumos, lamentablemente la mayoría de los campos de cultivo no son lo suficientemente productivos, por lo que la generación de planicies para siembra, donde antes se encontraba un bosque, selva, o cualquier ecosistema, ha aumentado considerablemente.

El ser humano en su afán de producir más y al mismo tiempo conservar el medio ambiente ha buscado alternativas para aumentar la producción de los campos de cultivo actuales, esto mediante el uso de productos agroquímicos (fertilizantes químicos y plaguicidas), que aumentan la producción por hectárea considerablemente (Ewald y Aebischer, 2000).

La implementación de una agricultura sustentable caracterizada por su inocuidad medioambiental y la preservación de los recursos naturales, la utilización de recursos renovables locales y tecnologías apropiadas y baratas, una mínima compra de insumos externos y por consiguiente, un alto grado de autosuficiencia local, permitiría reducir el uso de fertilizantes y plaguicidas. Desafortunadamente el uso de estos agentes agroquímicos no es controlado y genera una severa contaminación al ambiente y más si son utilizados en exceso, afectando principalmente los cuerpos de agua (Figura 1).



Figura 1. Interacción de los agentes agroquímicos con los ecosistemas
<http://edafologia.urg.es/conta/tema13/imagenes/interac.gif> junio 2008

En México el volumen anual consumido de agua, tanto de aguas superficiales como subterráneas, asciende a 73 km³, de los cuales el mayor porcentaje le corresponde al sector agrícola (83%), y después al uso doméstico (12%), la industria (3%), y a la acuicultura intensiva y otros (2%). Por ende el sector agrícola es responsable de generar 10.65 km³ de aguas residuales (aguas de retorno agrícola) al año. No existen en el país datos relativos a la contaminación de agua derivada de la actividad agrícola, pero sin duda es significativa, dado el intenso uso de plaguicidas y fertilizantes químicos. En la mayoría de los casos la contaminación de acuíferos subterráneos, ríos y lagos es difusa y no puntual, lo que dificulta el tratamiento de las denominadas aguas de retorno agrícola (<http://www.acsmedioambiente.com/lonuevo/> junio 2009).

1.2. Agroquímico

El término se refiere a las sustancias químicas utilizadas en agricultura como fertilizantes y plaguicidas. Los plaguicidas son sustancias químicas destinadas a matar, repeler, regular o interrumpir el crecimiento de seres vivos considerados plagas. Dentro de esta denominación se incluyen insectos, hierbas, aves, mamíferos, peces y microorganismos que compiten con los humanos para conseguir alimento, destruyen las siembras y propagan enfermedades (Ellis y col., 1998).

Este tipo de compuestos se pueden clasificar por su actividad biológica, naturaleza química o por características como: persistencia, toxicidad, hidrosolubilidad, o volatilidad. Su potencial como contaminante del medio depende de sus propiedades físicas, químicas o biológicas (Tabla 1).

Tabla 1. Clasificación de plaguicidas

Actividad biológica	Insecticidas Acaricidas Nematicidas Fungicidas Antibióticos Herbicidas Rodenticidas Avicidas Molusquicidas Atrayentes y repelentes de insectos	
Naturaleza química	Organoclorados Organofosforados Carbamatos Derivados de la urea Compuestos heterocíclicos Compuestos inorgánicos	Insecticidas, herbicidas, fungicidas Insecticidas Insecticidas, herbicidas Herbicidas Herbicidas Acciones diversas
Toxicidad	Supertóxicos Extremadamente tóxicos Muy tóxicos Moderadamente tóxicos Ligeramente tóxicos Prácticamente no tóxicos	$DL_{50} < 5 \text{ mg/Kg}$ $DL_{50} \text{ 5 - 50 mg/Kg}$ $DL_{50} \text{ 50 - 500 mg/Kg}$ $DL_{50} \text{ 500 - 5000 mg/Kg}$ $DL_{50} \text{ 5 - 15 g/Kg}$ $DL_{50} > 15 \text{ g/Kg}$

Fuente: <http://edafologia.urg.es/conta/tema13/clasif.htm> 2008

1.2.1. Herbicidas

Los herbicidas son productos químicos fitosanitarios diseñados específicamente para matar malezas (plantas indeseadas). Los herbicidas selectivos atacan ciertos blancos, siendo inocuos para el resto de las plantas cultivadas. Los herbicidas utilizados para limpiar grandes terrenos no son selectivos y matan toda planta con la que entran en contacto.

En países donde se practica la agricultura intensiva y altamente mecanizada, los herbicidas han reemplazado en gran parte los métodos manuales o mecánicos de control de malezas (Whitacre y Ware, 2004).

1.2.2. Clasificación

No existe un sólo sistema de clasificación de los herbicidas. Los diferentes sistemas se basan en criterios muy dispares, como su naturaleza química, su mecanismo de acción o su toxicidad. No obstante, se pueden dividir en dos grandes grupos:

Herbicidas residuales: se aplican al suelo, sobre la tierra desnuda y forman una película tóxica que controla el nacimiento de las malas hierbas al atacarlas durante su germinación. Dos aplicaciones al año de herbicidas residuales pueden ser suficientes para mantener un suelo limpio de malezas que nacen de semilla. Normalmente no son activos sobre especies perennes que rebrotan a partir de rizomas, estolones o bulbillos.

Herbicidas sistémicos: se aplican sobre la planta, que absorbe el producto y lo transporta a diferentes tejidos mediante el floema.

1.2.3. Herbicidas triazinicos

Las s-triazinas contienen un anillo heterocíclico simétrico que contiene tres átomos de nitrógeno y tres de carbono. Pueden tener varios sustituyentes (Figura 2).

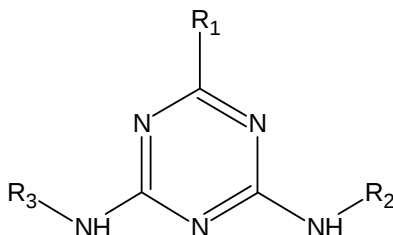


Figura 2. Anillo s-triazina, con sustituyentes

Se estima que posiblemente la mitad de los herbicidas disponibles presentan un modo de acción que involucra a la cadena de transporte de electrones del fotosistema II. Una etapa crítica en esta cadena es la reducción de la plastoquinona (PQ) por la proteína Q_A en la membrana del tilacoide. Estos herbicidas se enlazan a la proteína Q_A, con lo que se bloquea la reducción de la PQ y se interrumpe el proceso de transferencia de electrones, afectándose la síntesis de ATP y NADPH en el cloroplasto (Figura 3). Esto impide la fijación de CO₂, necesaria para la producción de los carbohidratos indispensables para la sobrevivencia de la planta. La interrupción en la transferencia de electrones causa, además, un estrés oxidativo por la generación de radicales libres que producen daños celulares (Markwell y col., 2007).

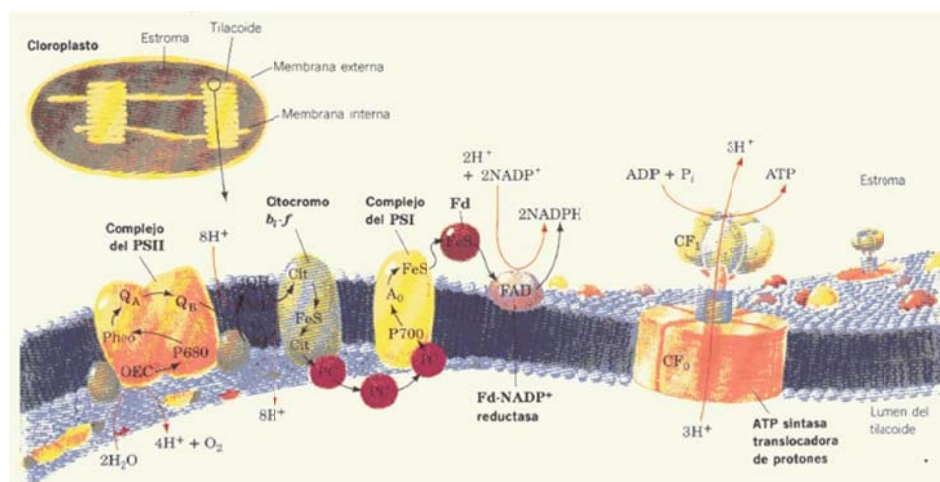


Figura 3. Fotosistema I y II (Bohinski, R.C. 1998).

Los herbicidas triazínicos se usan de manera selectiva en ciertos cultivos y no selectiva en otros. La mayor cantidad se usan en producción de maíz y los usos no selectivos son para eliminar malezas en sitios industriales (Whitacre y Ware, 2004). En general, este tipo de compuestos generan un impacto serio al medio ambiente y la exposición a los herbicidas triazínicos incrementa el riesgo de desarrollar cáncer en humanos (Kettles y col., 1997).

1.3. Atrazina

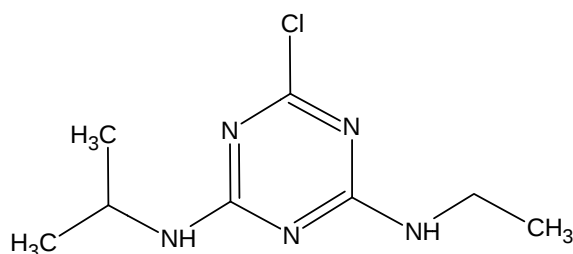


Figura 4. 6-cloro-*N*-etil-N'-isopropil-1,3,5-triazina-2,4-diamine (Atrazina)

La atrazina (Figura 4), es un polvo blanco sin olor, no muy volátil que es relativamente soluble en agua. La EPA estimó que en 1999 la atrazina fue el pesticida más empleado en los EEUU, alrededor de 80 millones de libras, principalmente en el cultivo del maíz (Donaldson y col., 2002).

1.3.1. Permanencia en el ambiente

La atrazina es altamente persistente en suelos, donde permanece por más de un año en condiciones de baja humedad y temperatura, su movilidad varía de moderada a alta, sobre todo en suelos de zonas lluviosas con bajo contenido de arcilla y materia orgánica. Debido a su débil adsorción a las partículas, a su hidrosolubilidad y a su relativamente larga vida media (60 a más de 100 días) representa un riesgo elevado de contaminación para las aguas subterráneas.

En los cuerpos de agua su degradación es lenta y no se adsorbe fuertemente a los sedimentos. En peces, no tiende a bioacumularse, ya que se han encontrado niveles bajos de este plaguicida en cerebro, vesícula biliar, hígado y tracto digestivo (<http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/atrazina.pdf>. Septiembre 2009).

1.3.2. Efectos tóxicos de la atrazina

Está ampliamente documentado que la atrazina pura o mezclada con otros agroquímicos daña diversas especies acuáticas (Sullivan y Spence, 2003; Russo y Lagidick, 2004; Fatima y col., 2007). Es un compuesto clastogénico y posible carcinogénico (Cantemir y col., 1997). Es un conocido perturbador del sistema endócrino en anfibios; Aún en dosis que están por debajo de los límites establecidos por la USEPA para agua potable (3 ppb), afecta el sistema endócrino de ranas (Hayes y col., 2002).

Este herbicida inhibe la fotosíntesis en plantas acuáticas afectando la cadena trófica y causa múltiples efectos en animales, por ejemplo interviene en el sistema respiratorio y funciones endocrinas del salmón (Moore y Lower, 2001), además de alterar el comportamiento social y el comportamiento antipredador en peces dorados (Salgio y Trijasse, 1998).

La atrazina causa una reducción significativa de las poblaciones microbianas en el suelo (Taiwo y Oso, 1997), ocasiona tumores en ratas (Stevens y col., 1999), y ha sido catalogada como posible agente carcinogénico en humanos (IARC 1999).

Otro estudio muestra los efectos sobre las larvas de corvina roja, que ven alterado su crecimiento al crecer en ambientes contaminados con este herbicida, así como un aumento en la tasa de mortalidad de las mismas (Alvares y Fuiman, 2005).

1.4. Simazina

La simazina (Figura 5) es un herbicida perteneciente al grupo de las triazinas, es un polvo blanco incoloro de olor característico utilizado para el control de malezas de hoja ancha en cultivos como maíz, alfalfa, caña de azúcar entre otros. Es de acción sistémica y residual, se absorbe por las raíces y se aplica en la pre-emergencia o pos-emergencia de las malezas en combinación con un herbicida de contacto como Paraquat. También se ha registrado como un alguicida (Mondragón y col., 2008; Ware, 2000).

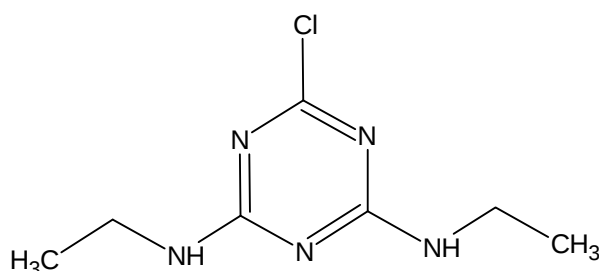


Figura 5. 6-chloro-*N,N'*-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine (Simazina)

1.4.1. Permanencia en el ambiente

En el suelo presenta una movilidad que varía de baja a alta. En este medio puede ser biodegradado, generando N-desetil-simazina y 2-cloro-4,6-bisamino-s-triazina como principales metabolitos.

En los cuerpos de agua se adsorbe parcialmente a los sólidos suspendidos y sedimentos. Este compuesto es susceptible a la hidrólisis a pH ácido, siendo la 2-hidroxi-4,6-bis(etilamina)-s-triazina el principal producto de esta reacción.

La volatilización desde el suelo y agua no es un destino ambiental importante para este plaguicida. Su potencial de bioconcentración en organismos acuáticos varía de bajo a moderado (<http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/simazina.pdf>. Septiembre 2009).

1.4.2. Efectos tóxicos de la simazina

Se ha detectado que la simazina causa problemas en el sistema endócrino, afectando la reproducción de varias especies acuáticas. Se clasifica como categoría toxicológica IV, como ligeramente tóxico y en la clasificación C como posible carcinogénico humano (USEPA, 2004. Versión electrónica).

La simazina está catalogada por la Unión Europea como muy tóxica para organismos acuáticos, como las algas y *Daphnia*, originando la prohibición o restricción de su uso en algunos países europeos (European Comission, 2003). La simazina puede ocasionar en los seres humanos, temblores, daño a testículos, riñones, hígado y tiroides, mutaciones y cáncer principalmente de riñón, seno y ovarios (Snedeker, 1998; USEPA, 2004. Versión electrónica), con dosis mayores a la MCL (Maximun Contaminat Level, $4\mu\text{gL}^{-1}$).

También es considerado modificador del sistema endócrino ya que cambia el metabolismo de los estrógenos en el cuerpo (Toop y col., 2000; Ralebitso y col., 2002; Birkhoj y col., 2004).

2. ANTECEDENTES

Los herbicidas triazínicos son un grupo importante de xenobióticos que ingresan al ambiente a través de residuos industriales y de la actividad agrícola. En la mayoría de las ocasiones, principalmente por su uso indiscriminado, tienen como destino final cuerpos de agua superficial y subterránea; por tal razón sus efectos tóxicos son de gran relevancia para los ecosistemas acuáticos.

Con el fin de eliminar estos xenobióticos y así lograr la depuración del agua contaminada se han realizado una diversidad de estudios donde se aplican diferentes métodos.

2.1. Degradación de atrazina

La atrazina es uno de los herbicidas de mayor uso en la agricultura y presenta una ecotoxicidad elevada, es por eso que se han propuesto diversos métodos para lograr su remoción del medio ambiente, destacando los químicos y los biológicos.

Los métodos de oxidación (Beytul y col., 2009), foto-oxidación (Seema y col., 2009; Grcic y col., 2009) y los electroquímicos (Zaviska y col., 2011) han sido estudiados para degradar atrazina.

Los métodos microbiológicos pueden ser en condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Pranab y Ligy (2004) reportan que utilizando un cultivo mixto en condiciones de anaerobiosis degradaron, en un sistema por lote, concentraciones de atrazina que variaron de 0.5 – 1.5 mgL⁻¹. Utilizando una fuente de carbono adicional (dextrosa) obtuvieron un máximo de degradación del 15%, cuando la composición del medio fue de 300 mg L⁻¹ de dextrosa y 5 mg L⁻¹ de atrazina, resaltando que no hubo generación de metano.

Hunter y Shaner (2009) estudiaron la degradación de atrazina empleando una columna empacada con arena (biobarrera), la cual contenía una comunidad bacteriana y aceite de soya como fuente de carbono. La atrazina (16.3 mg L^{-1}) se utilizó como fuente de nitrógeno obteniendo una degradación del 97%. Se observó también que la presencia de otra fuente de nitrógeno provocó una disminución del 60% en la degradación de atrazina. También se observó una acumulación de hidroxiatrazina en el efluente por deshalogenación del compuesto original, indicando que la mineralización no es completa.

Por otra parte Siripattanakul y colaboradores (2009a) estudiaron la biodegradación empleando a una comunidad capaz de degradar atrazina en un soporte de arena, reportando eficiencias de remoción del 42 al 80%. Los anteriores resultados hablan de las limitaciones que presentan los procesos anaerobios para remover atrazina.

En lo referente a procesos aeróbicos, Siripattanakul y colaboradores (2009b), realizaron el estudio de la degradación de atrazina a partir de un suelo contaminado con este herbicida. Mediante técnicas de enriquecimiento obtuvieron una comunidad integrada por 4 microorganismos (*Alcaligenes faecalis*, *Klebsiella ornithinolytica*, *Bacillus megaterium* y *Agrobacterium tumefaciens*) los cuales crecieron en un medio con 100 mgL^{-1} de atrazina con eficiencias de degradación que variaron del 33 al 51%, posteriormente identificaron la comunidad por técnicas moleculares así como la presencia de el gen *atzA* en un par de especies aisladas (*Klebsiella ornithinolytica* y *Agrobacterium tumefaciens*).

Por otro lado Satsuma (2009) analizó la degradación de la atrazina (1 mgL^{-1}) utilizando una comunidad aislada a partir de muestras tomadas de un río, observando acumulación de ácido cianúrico que era mineralizado lentamente. Se encontró que la comunidad estaba integrada por bacterias del genero *Nocardioides* y *Pedomicrobium*. La primera era la responsable de la degradación de la atrazina y la segunda del ácido cianúrico, posteriormente se empleó a esta comunidad para degradar otros herbicidas s-clorotriazínicos, encontrando bajas eficiencias de remoción de éstos.

Tafoya y colaboradores (2009) realizaron la evaluación cinética de la degradación de atrazina en cultivo continuo de células en suspensión y en células inmovilizadas en carbón activado granular utilizando un consorcio microbiano aislado a partir de suelos contaminados con herbicidas, en las determinaciones realizadas se obtuvieron altas velocidades de degradación. Con células inmovilizadas se obtiene velocidades y eficiencias remoción elevadas; $R_V = 12.2 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$ y una eficiencia de remoción del 100%. Al realizar la prueba con células libres se obtuvieron resultados similares de degradación y en ambos casos, una baja acumulación de intermediarios.

Uno de los antecedentes importantes para este trabajo es el presentado por Macías y colaboradores (2009), que estudiaron la degradación de este herbicida aislando una comunidad a partir de suelos contaminados, la cual fue identificada. Se encontraron los géneros bacterianos *Massilia*, *Stenotrophomonas maltophilia*, *Ochrobactrum*, *Arthobacter*, *Microbacterium*, *Xanthomonas* y *Ornithinimicrobium*, esta comunidad fue capaz de utilizar atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno en un reactor de lecho empacado, en régimen continuo con eficiencias de remoción cercanas al 100%. Después de periodos largos de operación se analizó la riqueza del reactor encontrando la presencia de sólo 3 especies *S. maltophilia*, *Ochrobactrum* y *Arthobacter*, de las cuales sólo la primera contiene el gen *atzD* que codifica a la enzima ácido cianúrico amidohidrolasa.

En la Figura 6 se presenta la ruta de degradación propuesta por Smith y colaboradores (2005) en donde las enzimas Atz A, B, C, desempeñan diferentes funciones. La *AtzA*, desempeña la función de deshalogenación del compuesto, generando hidroxiatrazina, en los siguientes pasos de la vía de degradación se encuentra la *AtzB* (N-etilamelida amidohidrolasa) y la *AtzC* (N-isopropilamelida amidohidrolasa). El producto de la hidrólisis es el ácido cianúrico, que es la molécula más recalcitrante de la vía de degradación de este compuesto.

Para la degradación del ácido cianúrico, se ha descrito y reportado que *Pseudomonas sp.* produce la enzima específica para la hidrólisis de este compuesto, la ácido cianúrico hidrolasa, codificada por *atzD* (Fruchey y col., 2003).

2.1.1. Vía de degradación de la atrazina

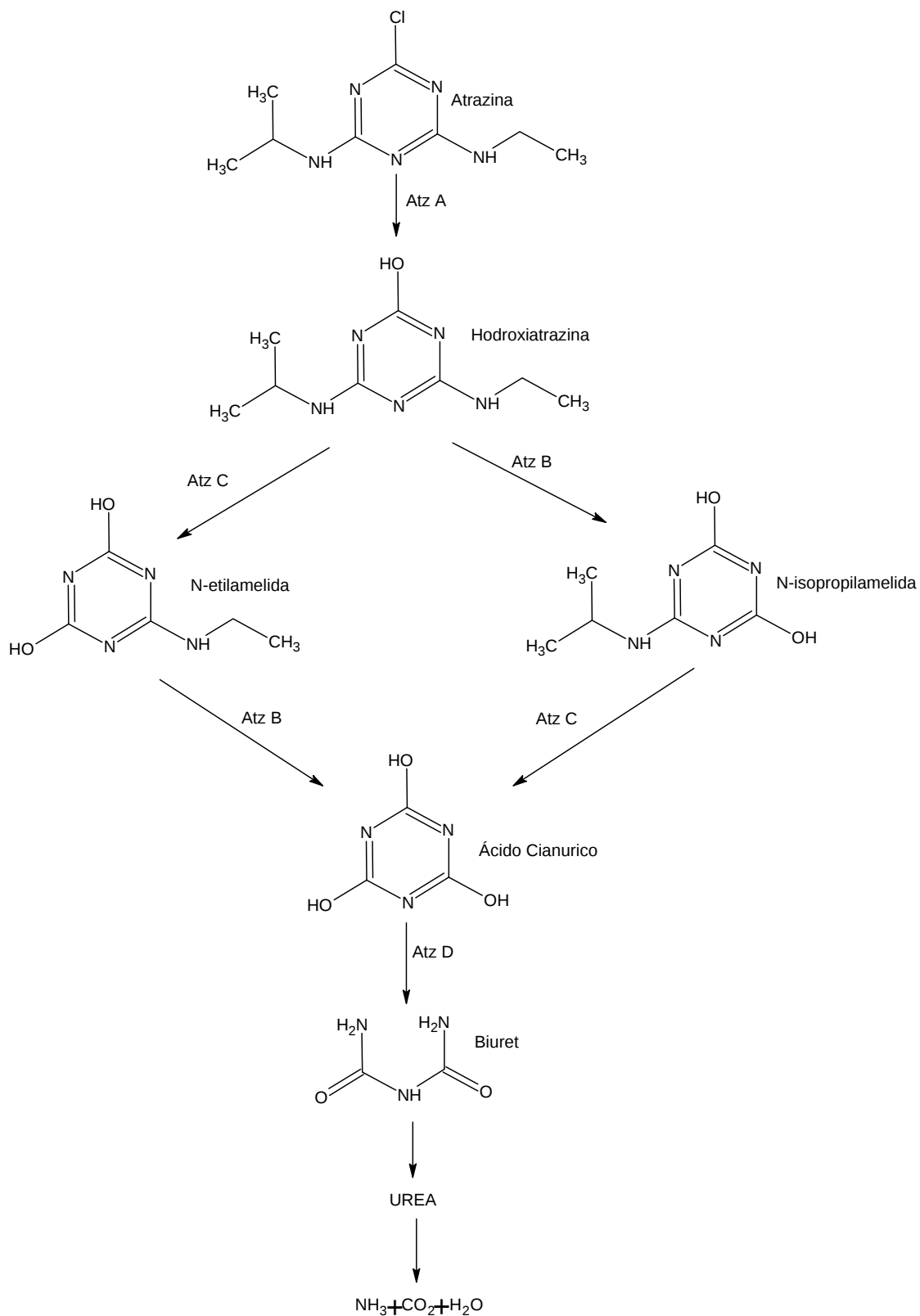


Figura 6. Vía de degradación de la atrazina (Smith y col., 2005)

2.2. Degradación de simazina

Para la degradación de simazina, que es uno de los herbicidas más empleados en México, también se han reportado métodos de oxidación química (Catalkaya y Kargi 2009), y métodos biológicos. Montalvo y colaboradores (1997) publicaron la determinación de parámetros cinéticos obtenidos en un reactor de lecho empacado con células inmovilizadas y empleando una comunidad bacteriana (DSZ1). Lo más relevante es la elevada eficiencia de remoción del xenobiótico.

Martin y colaboradores (2008b) estudiaron la degradación de simazina por una comunidad bacteriana aislada a partir de suelos contaminados con simazina, encontrando la presencia de dos microorganismos *Pseudomonas* sp. y *Klebsiella planticola*, los que se cultivaron en simazina utilizando diferentes concentraciones ($2 \mu\text{g mL}^{-1}$, $5 \mu\text{g mL}^{-1}$, $8 \mu\text{g mL}^{-1}$) además se adicionó un marcador de fluorescencia al gen *atzB* (al cual llamaron *atzB1*), con el cuál pudieron detectar en el cultivo, la presencia de la enzima que hidroliza el grupo amino; lo que permitió monitorear el crecimiento de la población capaz de degradar este herbicida. Un punto también importante de este trabajo fue que no se encontró acumulación de ácido cianúrico, principal intermediario de la degradación de este compuesto.

Martin y colaboradores (2008a) estudiaron la degradación de simazina en tres diferentes reactores de película utilizando un cultivo de *Klebsiella planticola*, realizando modificaciones a las concentraciones y obtuvieron velocidades de remoción que variaron de 0.06 a 3.39 mgh^{-1} , en un reactor con células inmovilizadas.

Morán y colaboradores (2006) analizaron comunidades bacterianas aisladas de diferentes tipos de suelos donde se tenían antecedentes de la aplicación de herbicidas y determinaron que son capaces de degradar eficientemente en un periodo de 28 días la simazina (40 ppm) presente en el medio, predominando el género *Pseudomonas*.

Mondragón y colaboradores (2008) realizaron el aislamiento de una comunidad de microorganismos capaces de degradar a la simazina empleando un selector continuo. Se obtuvieron eficiencias de remoción superiores al 97%, operando con cargas volumétricas de simazina de hasta $12 \text{ mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$, mediante una comunidad integrada por ocho géneros microbianos: *Ochrobactrum*, *Mycobacterium*, *Cellulomonas*, *Arthobacter*, *Microbacterium*, *Rhizobium*, *Pseudomonas* y *Pseudonocardia*. Al probar mayores cargas, disminuyó la eficiencia de degradación. Posteriormente se probaron mezclas de simazina, atrazina, 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina (CAAT) y ácido cianúrico, estos últimos intermediarios de la degradación de los herbicidas, obteniendo eficiencias de remoción del 90%.

La ruta de degradación propuesta por Erickson y Lee (1989) y Karthikeyan y colaboradores (2003) se muestra en la Figura 7.

2.2.1. Vía de degradación de la simazina

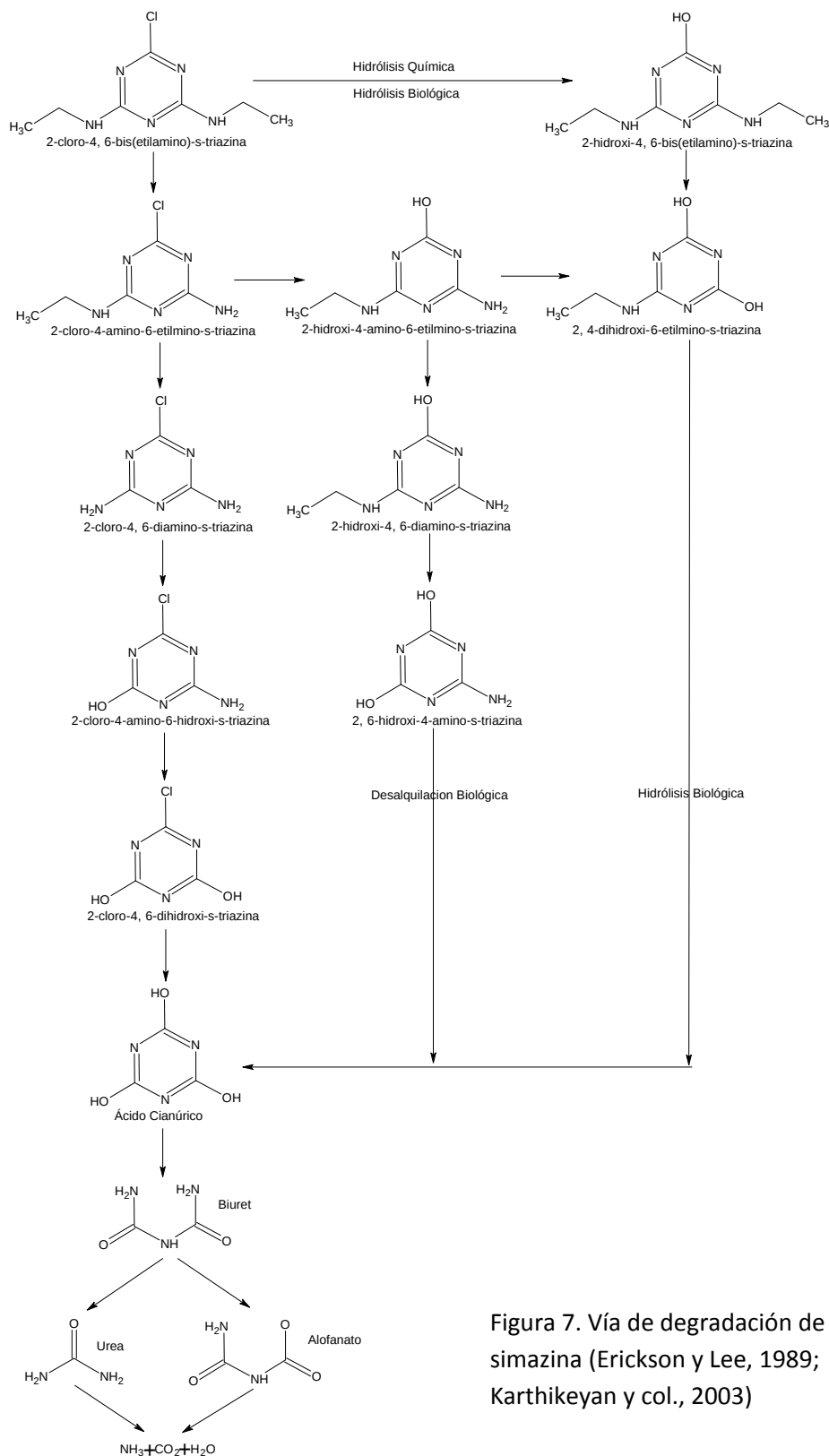


Figura 7. Vía de degradación de la simazina (Erickson y Lee, 1989; Karthikeyan y col., 2003)

2.3. Degradación de mezclas de herbicidas.

Dado que los herbicidas frecuentemente se aplican en forma secuencial o mezclados, es importante estudiar la degradación de mezclas de herbicidas. Por ejemplo, Guang Gu y colaboradores (2003) analizaron la degradación de tres herbicidas: atrazina, cianazina y dicrama, en condiciones metanogénicas, alcanzando eficiencias de remoción del 60% y 70% para la dicrama y la cianazina, respectivamente. La atrazina resultó ser aún más recalcitrante que los otros dos compuestos,

Beynon y colaboradores (2004) estudiaron la degradación de los herbicidas atrazina, simazina y cianazina en muestras de suelos y en sabia de maíz utilizando técnicas de radioisótopos para marcar las moléculas. Se describe que en suelo, la simazina y la atrazina se degradan más lentamente que la cianazina.

Radosevich y colaboradores (1995) estudiaron la biodegradación de mezclas binarias y ternarias de atrazina, simazina y cianazina, utilizando un cultivo puro de *Ralstonia pickettii*, que fue aislada en un cultivo con atrazina como única fuente de carbono y nitrógeno. La velocidad de remoción de atrazina y simazina fue similar y superior a la velocidad de remoción de la cianazina.

Kontchou y Gschwind (1994) emplearon un cultivo mixto de microorganismos para degradar una mezcla de atrazina, simazina y cianazina, ellos demostraron que se obtenía una degradación completa en un periodo de 6 días. También se reporta que las velocidades de degradación de la atrazina no se ven afectadas cuando se encuentran presentes otros herbicidas o contaminantes (Grigg y col., 1997).

Gebendinger y Radosevich (1999) estudiaron un mecanismo de degradación de una mezcla de atrazina y cianazina, determinando que la cianazina inhibe el proceso de degradación de la atrazina.

Kontcou y Gschwind (1999) realizaron un estudio sobre la degradación de mezclas de herbicidas triazínicos empleando una comunidad (16MIX) enriquecida que degrada atrazina. La adición de otros compuestos s-triazínicos (ciromazina ametrina, desetilatrazina, hidroxiatrazina, simazina y terbutilatrazina), en un cultivo por lote no afectó la mineralización de la atrazina ni la de los otros herbicidas, sólo se incrementó el tiempo de degradación de la mezcla.

De los antecedentes más cercanos a esta investigación encontramos el de Galíndez y colaboradores (2011), quienes estudiaron la degradación de la mezcla de herbicidas atrazina y simazina (40:10) por un cultivo binario de *Stenotrophomonas maltophilia* y *Arthrobacter sp.* en un reactor de biopelícula de dos etapas, encontrando una remoción completa de los herbicidas pero una acumulación del intermediario más recalcitrante, el ácido cianúrico, además se monitoreó la presencia de los genes de la degradación de los herbicidas empleando los iniciadores de *atzABC* y *D*; El gene *atzD* únicamente se detectó en *S. maltophilia*, que mientras que los otros tres se revelaron en las otras dos cepas.

De acuerdo con estos antecedentes queda claro que el éxito de la degradación eficiente de la mezcla de estos herbicidas, dependerá de los microorganismos que integren la comunidad seleccionada.

En la Figura 8 se muestra la convergencia de las rutas de degradación de los herbicidas en el intermediario común que es la desisopropilatrazina.

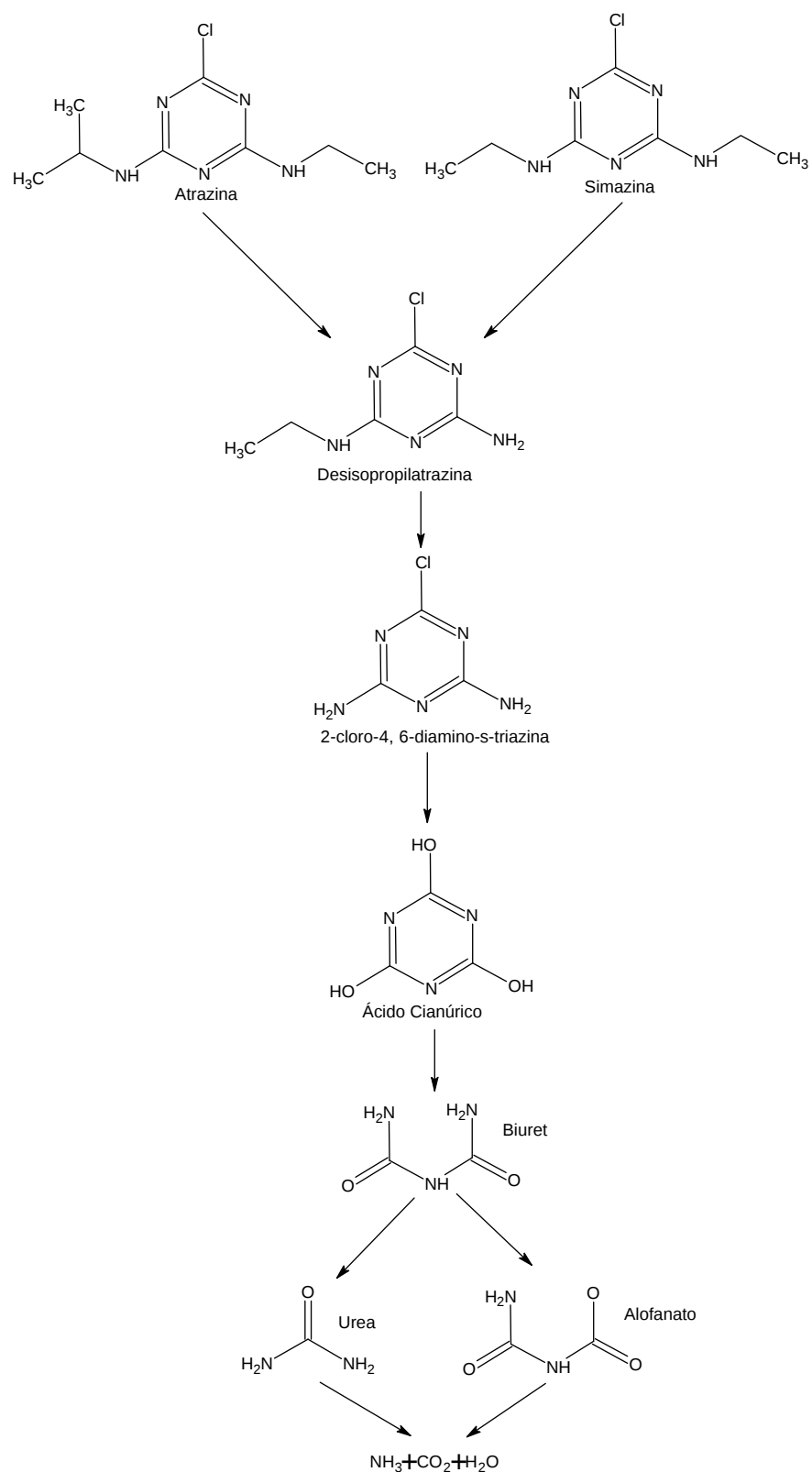


Figura 8. Similitud en las vías de degradación de los herbicidas triazínicos (Lerch y col., 1998)

3. JUSTIFICACIÓN

Debido a que en México no se tiene una regulación y un control sobre el uso de herbicidas triazínicos, el uso indiscriminado y la falta de capacitación para la aplicación de estos compuestos puede generar una contaminación muy seria en el suelo y principalmente en los cuerpos de agua.

Se sabe que los compuestos triazínicos de interés para este trabajo (simazina y atrazina) representan un problema serio por su ecotoxicidad, ya que a pesar de que para el ser humano no resultan ser tan nocivos, en los cuerpos de agua pueden causar un desequilibrio en los ecosistemas acuáticos.

Es por eso que tomando como base las comunidades aisladas en trabajos previos (Mondragón y col., 2008; Macías y col., 2009), con capacidad probada para degradar simazina y atrazina, se pretende integrar una comunidad artificial que sea capaz de mineralizar completamente mezclas de estos herbicidas en un nuevo tipo de reactor de biopelícula que sea susceptible de escalamiento.

Por lo anterior, y con base en los resultados obtenidos en investigaciones previas se integrará una comunidad artificial que sea capaz de mineralizar completamente una mezcla de atrazina simazina empleando un reactor empacado que opere en aerobiosis, con recirculación de reactantes y líquido oxigenado mediante un dispositivo airlift.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Construir una comunidad artificial, a partir de cepas previamente aisladas que sea capaz de degradar mezclas de herbicidas triazínicos empleando un reactor de lecho empacado.

4.2. Objetivos específicos

- Analizar el crecimiento de cada una de las cepas, integrantes de dos comunidades previamente seleccionadas, en los herbicidas atrazina y simazina.
- Analizar el crecimiento individual de cada cepa en diferentes intermediarios de la degradación de los herbicidas.
- Integrar la comunidad artificial con las cepas que muestren mejor crecimiento en los sustratos mencionados (herbicidas e intermediarios).
- Evaluar las velocidades y eficiencias de remoción de mezclas de herbicidas y de los intermediarios metabólicos, en un reactor de lecho empacado, en diversas condiciones de operación.

5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

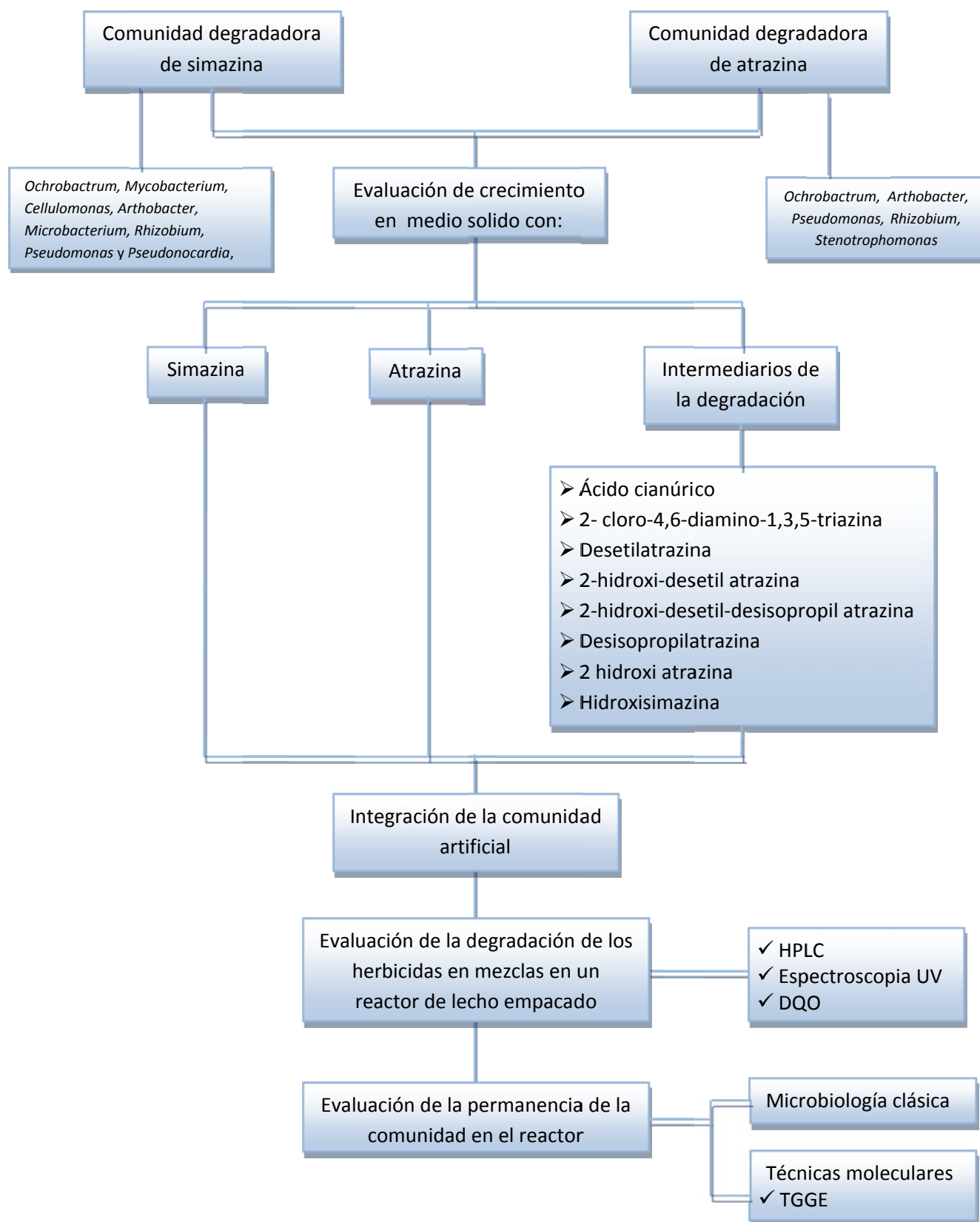


Figura 9. Desarrollo experimental

6. MATERIALES

6.1. Microorganismos

Las cepas utilizadas (Tabla 2) fueron aisladas en investigaciones anteriores y presentan la capacidad para degradar a los herbicidas. Para la degradación de simazina (Mondragón y col., 2008), se proporcionaron ocho cepas que integran la comunidad aislada con capacidad de degradar este herbicida. Para la atrazina se proporcionaron los integrantes de una comunidad (cinco especies microbianas) aislada y evaluada por Macías y colaboradores (2009)

Tabla 2. Integrantes de las comunidades utilizadas durante el desarrollo del trabajo

Comunidad atrazina	Comunidad simazina
<i>Ochrobactrum</i> <i>Arthobacter</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Rhizobium</i> <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Ochrobactrum</i> , <i>Mycobacterium</i> <i>Cellulomonas</i> <i>Arthobacter</i> <i>Microbacterium</i> <i>Rhizobium</i> <i>Pseudomonas</i> <i>Pseudonocardia</i>

6.2. Medio de cultivo

El medio de cultivo utilizado, para la evaluación de la degradación de la mezcla de herbicidas, fue el reportado por Mondragón y colaboradores (2008) (Tabla 3). Este también se empleó para la evaluación de la remoción de los intermediarios durante las diferentes etapas del trabajo. Cabe mencionar que el medio formulado fue complementado con solución de oligoelementos (Tabla 4) utilizando 1 mL L⁻¹.

Tabla 3. Composición del medio mínimo mineral empleado

Componente	Concentración (g L ⁻¹)
K ₂ HPO ₄	0.4
KH ₂ PO ₄	0.1
MgSO ₄	0.1
NaCl	0.1
CaCl ₂	0.02

Tabla 4. Composición de la solución de oligoelementos

Componente	Concentración (g L ⁻¹)
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.55
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0.23
MnSO ₄ 7H ₂ O	0.34
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.065
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.047
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0.034

*Para el medio sólido se agregan 20 g L⁻¹ de agar bacteriológico.

6.2.1. Medio de conservación de las cepas

Las cepas se conservaron en viales con medio mínimo mineral y agar con la mezcla de herbicidas atrazina y simazina como únicas fuentes de carbono y nitrógeno en una concentración 50:10 ppm, respectivamente, a una temperatura de 4 °C. Por otro lado las muestras de células libres se crioconservaron, a -20 °C, en tubos Eppendorf de 2 mL con 0.5 mL de glicerol estéril al 70% .

6.3. Herbicidas e intermediarios de la degradación.

6.3.1. Atrazina

Presentación comercial del herbicida

El producto comercial se llama Gesaprim 90 WG y se encuentra en presentación granular. Sus características se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Composición porcentual del herbicida Gesaprim 90 WG

Componente	Composición porcentual
Atrazina (i.a.)	90
Ingredientes inertes: diluyente, humectante y dispersante.	10

El ingrediente activo (i.a) fue fabricado en E.U.A., la formulación e importación las realizaron Agan Chemical Manufacturers LTD y Novartis Agro, S.A. de C.V. respectivamente.

Estándar de atrazina

El estándar de atrazina fue proporcionado por ChemService Inc., West Chester, PA. USA., con una pureza del 98%.

6.3.2. Simazina

Presentación comercial del herbicida

El producto comercial se llama "Sinamex 50 SC", y se encuentra en presentación acuosa concentrada, equivalente a 500 g de ingrediente activo (i.a) L⁻¹ (Tabla 6).

Tabla 6. Composición porcentual del herbicida Sinamex 50 SC

Componente	Composición porcentual
Simazina (i.a)	No menos de 43.5
Ingredientes inertes: diluyente, humectante y dispersante.	No menos de 56.5

El ingrediente activo fue fabricado en Israel, formulado por: Agan chemical Manufactured LTD, importado por: Koor Intercomercial, S.A. y distribuido por Dinámica Agrícola y Ambiental, S.A. de C.V. (DinAgra).

Estándar de simazina

El estándar de simazina fue proporcionado por ChemService Inc., West Chester, PA. USA., con una pureza del 99%.

6.3.3. Intermediarios de la degradación.

La mayoría de los intermediarios fueron proporcionados por ChemService Inc., West Chester, PA. USA. La pureza en cada caso fue la siguiente:

Estándar de hidroxiatrazina	99.5%
Estándar de hidroxisimazina	98.9%
Estándar de desetil atrazina	99.5%
Estándar de desisopropil atrazina	97.3%
Estándar de 2-hidroxi-desetil,desisopropil-atrazina	98.7%
Estándar de 2-hidroxi-desetil-atrazina	99.5%
Estándar de 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	96.7%.

Estándar de Ácido Cianúrico

El estándar de ácido cianúrico fue proporcionado por Sigma-Aldrich Inc. Steinheim, Germany, con una pureza del 98%. Este producto se encuentra como un polvo blanco.

6.4. Biorreactor de lecho empacado

Se construyó un reactor rectangular de 22.5 x 22.5 x 31.5 centímetros, de acrílico de 6 mm de espesor. El reactor tiene tres compartimentos, los dos externos están empacados con fragmentos de roca volcánica. El compartimento central opera como un canal *airlift* para circulación del líquido aireado a las zonas empacadas (Figura 10). El volumen total del reactor es de 11.0 L y el volumen drenado (líquido circulante) es de 6.6 L. La densidad aparente de las zonas empacadas es de 2.65 g/cm³.

7. MÉTODOS EXPERIMENTALES

7.1. Evaluación del crecimiento de los microorganismos en los herbicidas e intermediarios en medio sólido

Para seleccionar a las bacterias que integraron el consorcio artificial, se evaluó el crecimiento de las integrantes de las comunidades en los diferentes herbicidas e intermediarios por el método de crecimiento en placa en el medio selectivo de propagación, utilizando cada uno de los intermediarios y herbicidas a una concentración de 50 ppm.

7.2. Evaluación de la degradación de los herbicidas e intermediarios en medio líquido y cultivo por lote.

Las cepas que presentan mejor crecimiento, en los intermediarios y herbicidas en medio sólido, se propagaron en cultivo por lote con células libres utilizando medio mínimo mineral con una mezcla de atrazina y simazina (50:10), así como cada uno de los herbicidas por separado y cada uno de los intermediarios metabólicos, midiendo la desaparición por espectrofotometría UV.

7.3. Capacidad de adsorción de la mezcla de herbicidas en el material de soporte.

Se alimentó al reactor empacado con roca volcánica, medio mineral (Tabla 3 y 4), conteniendo la mezcla de herbicidas atrazina (50 ppm) y simazina (10 ppm), a un flujo constante de 10 mL h⁻¹, y se registraron los cambios en la concentración de los compuestos, medidos mediante espectrofotometría UV (221 nm), en el efluente.

7.4. Inmovilización del cultivo seleccionado en el material de soporte.

Las cepas seleccionadas para integrar la comunidad que se inmovilizó en el reactor fueron extraídas de las cajas de agar-medio selectivo con agua estéril. Una vez obtenida la suspensión celular se inocularon dos matraces de 500 mL con 150 mL de medio mínimo mineral y la mezcla de herbicidas atrazina (50 ppm) y simazina (10 ppm), los cuales se dejaron en cultivo por lote y agitación durante 48 horas. Posteriormente se inyectaron en el reactor por los puntos A y B. Una vez realizada esta acción se dejó el reactor operando en un sistema por lote por un periodo de 72 horas.

7.5. Evaluación cinética de la degradación de los herbicidas en el reactor horizontal de lecho empacado

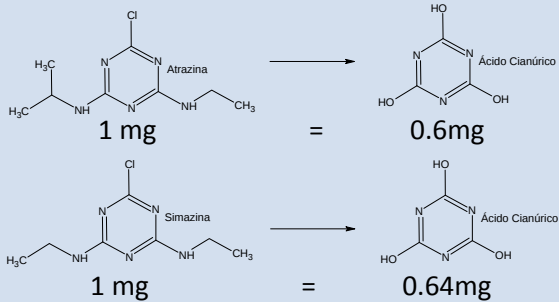
Para la evaluación de la remoción de la mezcla de herbicidas con la comunidad artificial, se construyó un reactor horizontal de biopelícula con un sistema airlift para la oxigenación y la recirculación del líquido. Se determinaron las concentraciones máximas de los herbicidas con los cuales operó el reactor de acuerdo con la solubilidad de cada uno de ellos y de la mezcla.

Una vez iniciada la operación del reactor, se realizó un monitoreo de su capacidad de degradación empleando la espectrofotometría UV, manejando diferentes velocidades de dilución, monitoreando periódicamente y midiendo la concentración de herbicidas e intermediarios (principalmente ácido cianúrico), para una estimación semicuantitativa de los niveles de degradación. Paralelamente se realizó la cuantificación utilizando HPLC, además del Carbono Orgánico Total (COT), para cuantificación global de la remoción de herbicidas e intermediarios.

Una vez que se alcanzó la estabilidad con cada velocidad de flujo se tomaron muestras de piedras del interior del reactor para el monitoreo de la biomasa adherida y la riqueza de especies de la comunidad.

En la Tabla 7 se muestran algunos valores calculados con la información obtenida con los diferentes métodos de cuantificación de herbicidas e intermediarios.

Tabla 7. Cálculo de valores cinéticos.

Valores cinéticos	Cálculo
Carga volumétrica de sustrato Bv_H ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$Bv_H = \frac{F \times Sr}{V} = D \times Sr$ F= flujo de alimentación (mL h^{-1}) Sr= Concentración de sustrato en el suministro (mg L^{-1}) V= Volumen de operación (mL) D= Dilución ($D = \frac{F}{V}$; h^{-1})
Velocidad volumétrica de remoción de sustrato: Rv_H ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$Rv_H = \frac{F \times (Sr - S)}{V} = D \times (Sr - S)$ F = Flujo de alimentación (mL h^{-1}) Sr = Concentración de sustrato en el suministro (mg L^{-1}) S = Concentración de sustrato en el efluente del reactor (mg L^{-1}) V = Volumen de operación (mL) D = Dilución ($D = \frac{F}{V}$; h^{-1})
Ácido Cianúrico: Sr_{AC} (mg L^{-1}) (teórico formado)	Es el ácido cianúrico teóricamente formado tomando la relación estequiométrica de la degradación de los herbicidas a ácido cainúrico.  The diagram illustrates the stoichiometric conversion of two herbicides to cyanuric acid. Atrazina, a 1,3,5-triazine derivative with a 4-chlorophenyl group and two isopropylamino groups, is shown with a 1 mg input leading to a 0.6 mg output of cyanuric acid. Simazina, a 1,3,5-triazine derivative with a 4-chlorophenyl group and two ethylamino groups, is shown with a 1 mg input leading to a 0.64 mg output of cyanuric acid. The structures of the herbicides and the resulting cyanuric acid (a 1,3,5-triazine-2,4,6-triol) are depicted with their respective chemical labels.
Carga volumétrica de Ac. Cianúrico Bv_{AC} ($\text{mg L}^{-1} \text{h}^{-1}$)	$Bv_{AC} = \frac{F \times Sr_{AC}}{V} = D \times Sr_{AC}$ F= flujo de alimentación (mL h^{-1}) Sr_{AC}= Concentración teórica de ácido cianúrico en el suministro (mg L^{-1}) V= Volumen de operación (mL) D= Dilución ($D = \frac{F}{V}$; h^{-1})

Velocidad volumétrica de remoción de Ac. Cianúrico: Rv_{AC} ($\text{mg L}^{-1} \text{ h}^{-1}$)	$Rv_{AC} = \frac{F \times (Sr_{AC} - S_{AC})}{V} = D \times (Sr_{AC} - S_{AC})$ F = Flujo de alimentación (mL h^{-1}) Sr_{AC} = Concentración teórica de ácido cianúrico en el suministro (mg L^{-1}) S_{AC} = Concentración de ácido cianúrico en el efluente del reactor (mg L^{-1}) V = Volumen de operación (mL) D = Dilución ($D = \frac{F}{V}$; h^{-1})
Ácido Cianúrico degradado	Es el resultado del balance de sustrato $AC \text{ consumo} = AC \text{ entrada} - AC \text{ acumulado} - AC \text{ salida}$

7.6. Evaluación de la capacidad de degradación de los intermediarios por la comunidad seleccionada en cultivo por lote en medio líquido con células inmovilizadas.

Del lecho del reactor se tomaron muestras de fragmentos de soporte conteniendo a las células inmovilizadas y se procedió a pesarlas y a realizar la evaluación de la degradación de los diferentes intermediarios y de los herbicidas. Esto se hizo en cultivo sumergido por lote, usando medio mínimo mineral con los diferentes compuestos a una concentración de 10 ppm. La fase líquida se analizó empleando espectrofotometría UV y HPLC. De igual forma esta determinación se realizó en presencia de una fuente adicional de carbono como fue la glucosa (40 ppm), la cual se cuantificó enzimáticamente con la técnica de la glucosa oxidasa-peroxidasa.

7.7. Determinación de cuenta viable en el soporte del reactor.

Muestras de piedra tomadas a cada una de las velocidades de flujo se pesaron, se transfirieron a un tubo, adicionando 3 mL de agua estéril. Éste se agitó en un Vortex por 1 minuto. De la suspensión celular obtenida por desprendimiento de la biopelícula adherida al soporte, se realizaron diluciones y se sembraron en medio de cultivo agar cuenta estándar para evaluar las unidades formadoras de colonias (UFC).

Para el cálculo de UFC g⁻¹ de piedra seca, las UFC mL⁻¹, obtenidas de cada extracción, se multiplicaron por el volumen de agua utilizado y se dividieron entre los gramos de piedra seca.

7.8. Evaluación de la permanencia de la comunidad en el reactor.

Para determinar la permanencia de la comunidad artificial en el reactor de biopelícula se utilizaron técnicas de microbiología básica como: morfología colonial y recuento en placa de las diferentes morfologías, además de que a la biomasa desprendida del soporte se le extrajo el DNA para amplificarlo mediante la reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR), utilizando los iniciadores U 968-GC y L 1041 (Felske y col., 1996), específicos para 16S rDNA (Tabla 8). Los amplicones con una longitud aproximada de 500 pb se analizaron mediante la electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE).

Tabla 8. Iniciadores utilizados para la evaluación de la riqueza de las especies de la comunidad seleccionada

Iniciador	Secuencia
**U 968-GC	5'- (GC clamp)- AACGCGAAGAACCTTAC-3'
L 1014	5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'
**El iniciador U 968-GC contiene además una secuencia o pinza (<i>clamp</i>) de 40 nucleótidos rica en GC (5'-CGCCCGGGGCGCGCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG3') que ayuda a la separación de los amplificados cuando se emplea la TGE.	

7.9. Seguimiento de los genes que codifican a las enzimas que degradan los diferentes herbicidas.

Se utilizó para esta evaluación el DNA obtenido de las células inmovilizadas así como de las células libres y las cepas puras, utilizando los diferentes iniciadores reportados para genes que codifican a las enzimas de la ruta de degradación de los herbicidas (Tabla 9), como son el *atzA*, -*B*, -*C* (De Souza y col., 1998), y el *atzD* (Fruchey y col., 2003).

Tabla 9. Iniciadores utilizados para detectar la presencia de genes catabólicos en la comunidad seleccionada

Gene blanco	Iniciadores		Tamaño del amplicón
<i>atzD</i>	CAAHR	5'-GCGGATCCAGATGGCCTGTATCGCT-3'	1400 pb
	CAAHF	5'-GCGGATCCTGCGTTCATCGACAGAG-3'	
<i>atzA</i>	ATZA-R	5'-TGAAGCGTCCACATTACC-3'	550 pb
	ATZA-F	5'-CCATGTGAACCAGATCCT-3'	
<i>atzB</i>	ATZB-R	5'-CTCTCCCGCATGGCATCGGG-3'	550 pb
	ATZB-F	5'-TCACCGGGGATGTCGCGGGC-3'	
<i>atzC</i>	ATZC-R	5'-GTACCATATCACCGTTTGCCA-3'	600 pb
	ATZC-F	5'-GCTCACATNGCAGGTACTCCA-3'	

8. MÉTODOS ANALÍTICOS Y TÉCNICAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

8.1. Determinación de concentración celular

8.1.1. Recuento de unidades formadoras de colonias (UFC)

Se hicieron diluciones decimales de las muestras del efluente del reactor, o de las suspensiones celulares obtenidas después de desprender mecánicamente las células inmovilizadas en el soporte. De cada dilución se tomaron alícuotas que se sembraron en placas de agar nutritivo por espatulado. Se contó el número de colonias formadas en las placas y se calculó el número de UFC por mililitro de la suspensión original.

8.2. Determinación de concentración de herbicidas e intermediarios

8.2.1. Espectrofotometría UV

En un espectrofotómetro Beckman DU 650 se obtuvieron los espectros de absorción (200 a 300 nm) de las muestras. Para cada uno de los sustratos se determinó la longitud de onda de absorbencia máxima, Tabla 10. La concentración de cada uno de ellos se estimó en forma semicuantitativa mediante una curva de calibración construida a la longitud de onda de máxima absorbencia correspondiente a cada compuesto.

Tabla 10. Longitud de onda de máxima absorbancia de los herbicidas e intermediarios.

Compuesto	λ (nm)
Atrazina	221
Hidroxiatrazina	210
Desetil atrazina	214
Desisopropil atrazina	213
2-hidroxi-desetil,desisopropil-atrazina	208
2-hidroxi-desetil-atrazina	206
Simazina	221
Hidroxisimazina	204
Ácido cianúrico	212
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	208

8.2.2. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)

La cuantificación de los sustratos empleados se realizó mediante cromatografía de líquidos de alta resolución. En cada caso se utilizó uno de los siguientes métodos.

8.2.2.1. Atrazina y simazina

Se empleó un cromatógrafo de líquidos marca Beckman Coulter Modelo System Gold, detector de arreglo de diodos, utilizando una columna Nova-Pack C₁₈ (4 μ m, 150x3.9mm ID). Fase móvil (60% agua – 40% acetonitrilo) con flujo constante (isocrático) de 1mLmin⁻¹.

8.2.2.2. Ácido Cianúrico

Se empleó un cromatógrafo de líquidos marca Shimadzu modelo SPD-10A con un detector UV usando una columna Inertsil (150x4.6mm) (Alltech Associates, Deerfield, 11), 5 μm de tamaño de partícula, con una fase móvil isocrática de octan sulfonato de sodio 5mM en H_3PO_4 al 0.05% a un pH de 2.8, con una velocidad de flujo de 1 mL min^{-1} .

8.2.2.3. Intermediarios

Se empleó un cromatógrafo de líquidos marca Beckman Coulter Modelo System Gold, detector de arreglo de diodos, utilizando una columna Spherisorb ODS (5 μm , 250x4.6 mm ID). Fase móvil acetonitrilo – regulador de fosfatos 0.005 M pH 7.2, en un gradiente lineal de 2 – 90% con un tiempo de 60 min con flujo constante de 1 mL min^{-1} .

8.2.2.4. Intermediarios deshalogenados (Hidroxiatrazina, hidroxisimazina, 2-hidroxi-desetil-desisopropil-atrazina, 2-hidroxi-desetil-atrazina)

Se empleó un cromatógrafo de líquidos marca Shimadzu modelo SPD-10A, detector UV, utilizando una columna Nova-Pack C_{18} (4 μm , 150x3.9mm ID). Fase móvil (60% agua – 40% acetonitrilo) con flujo constante (isocrático) de 1 mLmin^{-1} .

8.2.2.5. Intermediarios halogenados (desetil atrazina, desisopropil atrazina, 2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina)

Se empleó un cromatógrafo de líquidos marca Beckman Coulter Modelo System Gold, detector de arreglo de diodos, utilizando una columna Nova-Pack C₁₈ (4µm, 150x3.9mm ID). Fase móvil (60% agua – 40% acetonitrilo) con flujo constante (isocrático) de 1mLmin⁻¹.

8.2.3. Determinación de glucosa

Se utilizó el método colorimétrico basado en la acción de la enzima glucosa oxidasa sobre la glucosa. En la reacción, el peróxido liberado oxida estequiometricamente a la ortodianisidina (que actúa como cromógeno) mediante la peroxidasa. Finalmente la ortodianisidina oxidada en medio ácido adquiere un color rosa cuya absorbencia puede medirse a 540nm. El ensayo se realizó de la forma tradicional, ajustando con un blanco de reactivos y empleando un testigo de concentración conocida.

8.2.4. Carbono orgánico total (COT)

Se utilizó el kit del método Hach No. 10129 con un intervalo de 0.3-20 ppm de COT.

8.2.5. Ácido cianúrico

Se utilizó el kit del método turbidimétrico Hach No. 8139 con un intervalo de 5 - 50 ppm de ácido cianúrico.

8.3. Técnicas de biología molecular

8.3.1. Extracción de DNA

Se realizó de acuerdo al protocolo de UltraClean™ Soil DNA isolation Kit, marca Mo BIO.

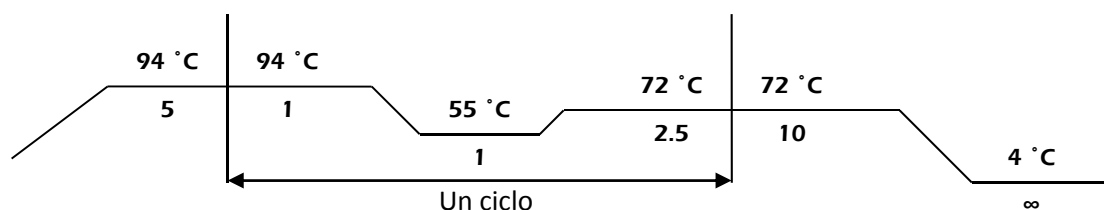
8.3.2. Amplificación de DNA

Para la reacción de PCR se utilizó la mezcla de reacción que se presenta en la Tabla 11.

Tabla 11. Mezcla de reacción para la amplificación de DNA mediante la técnica de PCR

Componente	Volumen (μL)
Regulador	2.5
MgCl ₂	0.75
dNTP's	0.5
Taq polimerasa	0.125
H ₂ O (grado BM)	18.925
Iniciador 1 (10 mM)	0.6
Iniciador 2 (10 mM)	0.6
DNA muestra	1.0
<i>Volumen de reacción</i>	25

La reacción de PCR se realiza en un termociclador (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2400) con el siguiente programa:



* Se programan 35 ciclos y se utilizarán los iniciadores según el experimento.

La reacción en cadena de la polimerasa se desarrolla en tres pasos determinados por temperaturas y tiempos específicos:

1^{er} paso.- Desnaturalización (94°C por 5min.), en el cual se separan las dos cadenas complementarias del DNA blanco.

2^{do} paso.- 35 ciclos integrado por las siguientes temperaturas

- 94°C por 1min, que es donde se desnaturaliza el DNA
- 55°C por 1min, donde se da el apareamiento específico entre los iniciadores y las cadenas simples del segmento de DNA blanco desnaturalizado.
- 72°C por 2.5min, donde la DNA polimerasa extiende la longitud de los iniciadores apareados al DNA blanco, al ir polimerizando los desoxirribonucleótidos libres, resultando en nuevas cadenas complementarias a las dos cadenas sencillas presentes al inicio de la reacción.

3^{er} paso.- Extensión final (72°C por 10 min.).

Para obtener amplicones de los genes que codifican a las enzimas responsables de la degradación de los compuestos triazínicos se utilizaron métodos diferentes al anterior, estos métodos se reportan en la Tabla 12, al igual que en el caso anterior los ciclos empleados son 35.

Tabla 12. Condiciones de la PCR para la amplificación de los genes de las enzimas.

gen blanco	Condiciones de PCR				
	Desnaturalización inicial	Desnaturalización	Alineamiento	Extensión	Extensión final
<i>atzD</i>	94°C por 5 min	94°C por 15 seg	63°C por 30 seg	72°C por 1.5 min	72°C por 10 min
<i>atzA</i>					
<i>atzB</i>	94°C por 5 min	94°C por 1 min	55°C por 1 min	72°C por 1 min	72°C por 10 min
<i>atzC</i>					

8.3.3. Electroforesis en gel de agarosa

El DNA amplificado durante la PCR, se observó mediante una electroforesis en gel de agarosa, donde se incluyó el marcador de peso molecular para comparar el tamaño del amplicón obtenido. El procedimiento fue descrito por Tafoya (2008).

8.3.4. Electroforesis en gel con gradiente de temperatura (TGGE)

Por la técnica de TGGE se pueden separar fragmentos de DNA de la misma longitud con diferente secuencia. Ésta se realiza para determinar en forma dogmática el número probable de especies en la comunidad seleccionada, así como la pureza de las cepas una vez aisladas.

La técnica consiste en la amplificación de una región variable del gen 16S rDNA con una longitud aproximadamente de 500 pares de bases (pb) y su posterior análisis por electroforesis utilizando un gradiente de temperatura (agente desnaturalizante) a lo largo del gel de poliacrilamida. El gradiente es proporcionado por una base en la cámara de electroforesis (Tabla 13). Para la amplificación del gen se usa un iniciador con una secuencia adicional en el extremo 5' de 40 pb rica en guanina-citosina (G-C).

Durante la migración de las muestras amplificadas en el gel con el gradiente de temperatura las muestras presentan diferentes estados de transición en su estructura, el DNA de doble cadena pasa a ser parcialmente de cadena sencilla, este fenómeno ocurre en determinado punto del gel en el cual se detendrá la migración o se hará más lenta. La región rica en G-C actúa como una “abrazadera” lo que evita que se forme DNA de cadena sencilla. Como la secuencia de fragmentos es diferente, cada muestra adopta una conformación particular de DNA de cadena sencilla parcial, lo que ocasiona que los fragmentos migren a diferente velocidad, localizándolos en diferentes posiciones a lo largo del gel. El procedimiento fue descrito por Tafoya (2008).

Condiciones de operación del equipo

Tabla 13. Condiciones de operación del equipo de TGGE

Condición de operación	
Gradiente de temperatura	49 – 58 °C
Voltaje	125 V
Tiempo de corrida	2 horas
Intensidad	6 mA
Potencia	0.8 W

9. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

9.1. Comunidades que degradan atrazina y simazina.

Los microorganismos empleados para el desarrollo de este trabajo, fueron aislados en investigaciones previas. Los microorganismos degradadores de atrazina por Macías y colaboradores (2009) y los degradadores de simazina por Mondragón y colaboradores (2008). Los microorganismos integrantes de estas comunidades (Tabla 14), fueron recuperados de tubos de crio-conservación con glicerol y reactivados empleando placas de agar cuenta estándar y medio sólido selectivo. A la par se verificó la pureza de las cepas.

Tabla 14. Integrantes de las comunidades y sus claves a utilizar durante el desarrollo del trabajo

Comunidad atrazina	Clave	Comunidad simazina	Clave
		<i>Microbacterium</i>	C ₁
<i>S. maltophilia</i>	C ₉	<i>Arthrobacter</i>	C ₂
<i>Arthrobacter</i>	C ₁₀	<i>Cellulomonas</i>	C ₃
<i>Rhizobium</i>	C ₁₁	<i>Mycobacterium</i>	C ₄
<i>Ochrobactrum</i>	C ₁₂	<i>Pseudonocardia</i>	C ₅
<i>Pseudomonas</i>	C ₁₃	<i>Pseudomonas</i>	C ₆
		<i>Ochrobactrum,</i>	C ₇
		<i>Rhizobium</i>	C ₈

9.2. Pruebas de crecimiento de los microorganismos en diferentes intermediarios de la degradación de los herbicidas en medio sólido.

Para evaluar el crecimiento de los integrantes de las comunidades mencionadas, se utilizaron como sustratos a los herbicidas y diferentes intermediarios de degradación a una concentración de 50 ppm con medio mínimo mineral y agar.

Primero se realizó la evaluación de crecimiento en placa de los microorganismos procedentes de la comunidad degradadora de simazina arrojando los resultados reportados en la Tabla 15, observando el crecimiento a los 3 y 6 días de incubación.

Tabla 15. Evaluación de crecimiento de los integrantes de la comunidad microbiana aislada que degrada simazina, en los herbicidas y en los diferentes intermediarios de degradación.

Cepa		C ₁	C ₂	C ₃	C ₄	C ₅	C ₆	C ₇	C ₈
Compuesto	Días								
Atrazina	3	+-	+-	++	+++	+++	---	++	---
	6	+-	++	+++	+++	+++	+-	+++	+-
Hidroxiatrazina	3	+-	+-	++	++	++	+-	+++	+-
	6	+-	++	+++	+++	+++	+-	+++	+-
Desetil atrazina	3	---	+-	++	+-	++	---	++	+-
	6	+-	+-	+++	++	+++	+-	+++	++
Desisopropil atrazina	3	---	+-	++	+-	++	---	+++	---
	6	+-	++	+++	++	+++	+-	+++	+-
2-hidroxi-desetil, desisopropil - atrazina	3	+-	+-	++	+-	+-	+-	++	+-
	6	+-	+-	+++	+++	+++	+-	+++	+-
2-hidroxi-desetil-atrazina	3	+-	+-	+++	++	++	+-	++	+-
	6	+-	++	+++	+++	+++	+-	+++	++
Simazina	3	+-	+-	+++	+++	+++	+-	+-	+-
	6	+-	++	+++	+++	+++	+-	+++	+-
Hidroxisimazina	3	+-	+-	+++	+++	++	+-	+++	---
	6	+-	++	+++	+++	+++	+-	+++	+-
Acido cianúrico	3	+-	+-	++	++	++	+-	+++	+-
	6	++	++	+++	++	+++	+-	+++	+-
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	3	+-	+-	+++	++	++	+-	+++	+-
	6	+-	++	+++	+++	+++	+-	+++	++

Para la evaluación del crecimiento se realizó con la escala que se marca a continuación:

(+++) Buen crecimiento (++) Crecimiento regular (+-) Crecimiento escaso (---) Sin crecimiento

Después de evaluar el crecimiento en medio sólido con intermediarios de la degradación, se seleccionaron a las cepas: C₃ (*Cellulomonas*), C₄ (*Mycobacterium*), C₅ (*Pseudonocardia*), C₇ (*Ochrobactrum*). Para realizar pruebas de degradación en medio líquido de las cepas

seleccionadas, se utilizó un medio mínimo mineral que contenía 50 ppm de atrazina y 10 ppm de simazina, y se pudo determinar que esta comunidad no puede degradar la mezcla de herbicidas. En la Figura 10 se observa que el espectro correspondiente a la mezcla de los herbicidas, se mantiene sin cambios de absorción a 221nm, posiblemente lo anterior se deba a que la comunidad cuando es cultivada en suspensión pierde las relaciones inter especies que se tienen en una biopelícula.

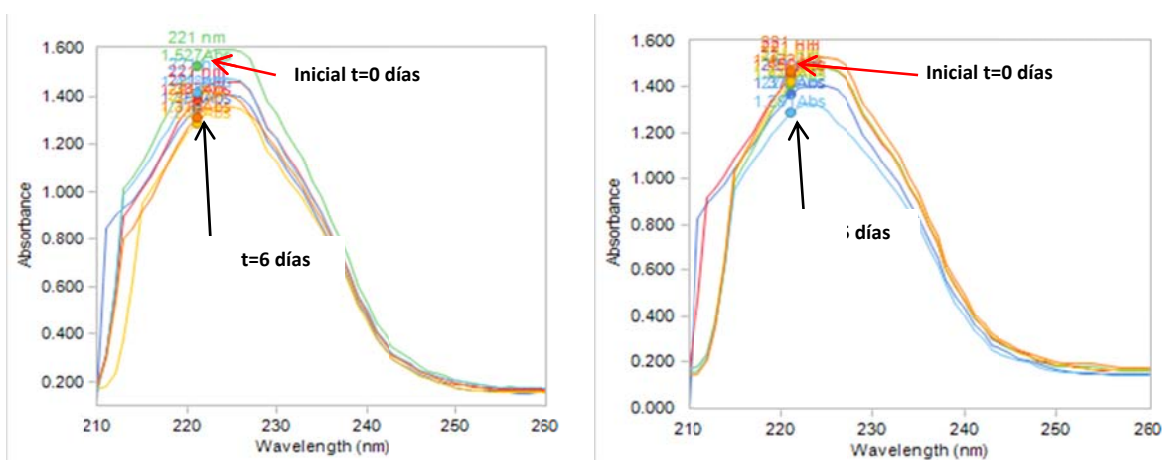


Figura 10. Espectros de absorción en cultivos por lote, empleando la mezcla de las cepas seleccionadas de la comunidad que degrada simazina, utilizando como sustrato la mezcla atrazina-simazina (50:10 ppm). Los resultados corresponden a duplicados.

Una vez observado el deficiente crecimiento presentado en medio líquido, por la comunidad seleccionada a partir del aislamiento con simazina, se procedió a realizar la evaluación de la comunidad microbiana proveniente de medio con atrazina en los diferentes sustratos (herbicidas e intermediarios) en medio sólido, arrojando los resultados que se observan en la Tabla 16.

Tabla 16. Evaluación de crecimiento de los integrantes de la comunidad, aislada de medio con atrazina, en los herbicidas y en los intermediarios de degradación.

Cepa		C ₉	C ₁₀	C ₁₁	C ₁₂	C ₁₃
Compuesto	Días					
Atrazina	3	++	++	+-	---	---
	6	+++	+++	++	+-	+-
Hidroxiatrazina	3	++	++	++	+-	+-
	6	+++	+++	+++	+-	+-
Desetil atrazina	3	+++	++	+-	---	+-
	6	+++	+++	++	+-	++
Desisopropil atrazina	3	+++	++	+-	---	---
	6	+++	+++	++	+-	+-
2-hidroxi-desetil,desisopropil-atrazina	3	+++	++	+-	+-	+-
	6	+++	++	++	+-	+-
2-hidroxi-desetil-atrazina	3	+++	++	+-	+-	+-
	6	+++	++	++	+-	++
Simazina	3	+++	+-	+-	+-	+-
	6	+++	+++	+++	+-	+-
Hidroxisimazina	3	+++	++	+-	+-	---
	6	+++	+++	++	+-	+-
Acido cianúrico	3	+++	++	+-	+-	+-
	6	+++	+++	++	+-	+-
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	3	+++	++	+-	+-	+-
	6	+++	+++	+++	+-	++

Para la evaluación del crecimiento se realizó con la escala que se marca a continuación:

(+++) Buen crecimiento (++) Crecimiento regular (+-) Crecimiento escaso (---) Sin crecimiento

Después de evaluar el crecimiento en cada uno de los intermediarios de la degradación, fueron seleccionadas las cepas C₉ (*S. maltophilia*), C₁₀ (*Arthrobacter*) y C₁₁ (*Rhizobium*) para integrar una comunidad con los microorganismos seleccionados de la comunidad de simazina que crecen en medio sólido. Nuevamente se evaluó el crecimiento de cada una de estas cepas en medio sólido con diferentes intermediarios (Tabla 17).

Esta comunidad se propagó en medio líquido con la mezcla de herbicidas en cultivo por lote, y los resultados fueron satisfactorios cuando se analizó por espectrofotometría UV a 221 nm (Figura 11), apreciando una elevada eficiencia de remoción a las 120 horas de cultivo.

Tabla 17. Evaluación del crecimiento de los microorganismos que integraron una nueva comunidad en los diferentes intermediarios de degradación.

Cepa		C ₃	C ₅	C ₉	C ₁₀	C ₁₁
Compuesto	Días					
Atrazina	3	+++	+++	++	++	+-
	6	+++	+++	+++	+++	++
Hidroxiatrazina	3	++	+++	++	++	++
	6	+++	+++	+++	+++	+++
Desetil atrazina	3	++	+++	+++	++	+-
	6	+++	+++	+++	+++	++
Desisopropil atrazina	3	++	+++	+++	++	+-
	6	++	+++	+++	+++	++
2-hidroxi-desetil, desisopropil-atrazina	3	++	+++	+++	++	+-
	6	+++	+++	+++	++	++
2-hidroxi-desetil-atrazina	3	++	+++	+++	++	+-
	6	+++	+++	+++	++	++
Simazina	3	+++	++	+++	+-	+-
	6	+++	+++	+++	+++	+++
Hidroxisimazina	3	+++	+++	+++	++	+-
	6	+++	+++	+++	+++	++
Ácido cianurico	3	+++	+++	+++	++	+-
	6	+++	+++	+++	+++	++
2-cloro-4,6-diamino- 1,3,5-triazina	3	++	+++	+++	++	+-
	6	+++	+++	+++	+++	+++

Para la evaluación del crecimiento se realizó con la escala que se marca a continuación:

(+++) Buen crecimiento (++) Crecimiento regular (+-) Crecimiento escaso (--) Sin crecimiento

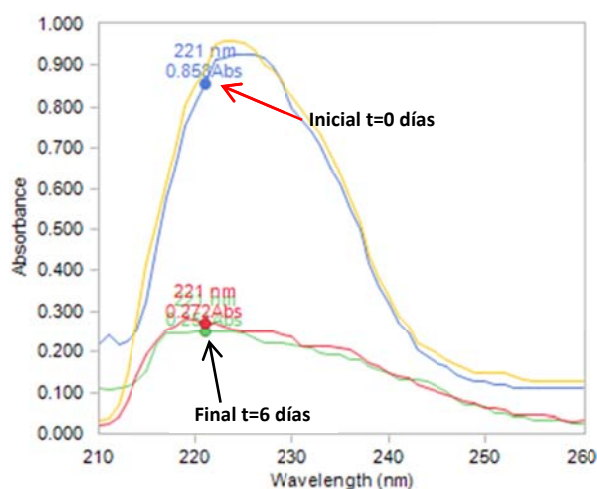


Figura 11. Espectros de absorción de muestras de cultivos por lote, empleando el conjunto de integrantes seleccionados de las comunidades que degradan simazina (C₃ y C₅) y atrazina (C₉, C₁₀ y C₁₁), utilizando como sustrato la mezcla atrazina-simazina (50:10 ppm).

9.3. Selección de la comunidad que se inmovilizó en el reactor de lecho empacado.

Una vez analizados los datos de crecimiento de las cepas en medio sólido que contenía a los diferentes intermediarios; así como la degradación de la mezcla de herbicidas en medio líquido por los microorganismos provenientes de las dos comunidades probadas, se integró la comunidad artificial, misma que se inoculó en un reactor de lecho empacado que operó de manera continua para llevar a cabo la degradación de la mezcla de herbicidas a una concentración de 50 ppm de atrazina y 10 ppm de simazina. Las cepas seleccionadas para integrar la comunidad artificial se muestran en la Tabla 18.

Tabla 18. Comunidad artificial seleccionada para inocular el reactor.

Comunidad artificial seleccionada		
Cepa	Clave	Origen
<i>Cellulomonas</i>	C ₃	Mondragón y colaboradores (2008)
<i>Pseudonocardia</i>	C ₅	Mondragón y colaboradores (2008)
<i>S. maltophilia</i> <i>Arthrobacter</i>	C ₉	Macías y colaboradores (2009)
<i>Rhizobium</i>	C ₁₀	Macías y colaboradores (2009)
	C ₁₁	Macías y colaboradores (2009)

9.4. Pruebas de crecimiento de la comunidad artificial en medio líquido

Después de operar el reactor durante 2200 horas (aproximadamente), se tomaron muestras de fragmentos de roca volcánica, colonizados por la comunidad artificial, y se colocaron en matraces que contenían medio mínimo mineral con los herbicidas y los diferentes intermediarios de su degradación. Todos ellos probados a una concentración de 10 ppm. Se observó que en mayor o menor grado hubo degradación de los dos herbicidas y de varios intermediarios metabólicos, pero no de ácido cianúrico, Tabla 19.

La determinación se realizó mediante espectrofotometría UV y HPLC. En la misma tabla se muestran los tiempos de retención en HPLC de cada uno de los intermediarios.

Tabla 19. Eficiencia de remoción en medio líquido de los herbicidas e intermediarios de su degradación en cultivo por lote, por la comunidad artificial proveniente del lecho empacado.

Compuesto	TR (min)	Eficiencia de degradación (%)	
		UV	HPLC
Atrazina	6.1	79	100
Hidroxiatrazina	3.2	29	71
Desetilatrazina	3.6	53	78
Desisopropilatrazina	3.2	22	34
2-hidroxi-desetil,desisopropil-atrazina	2.3	16	48
2-hidroxi-desetil-atrazina	2.5	20	5
Simazina	4.9	61	100
Hidroxisimazina	3.4	43	66
Ácido cianúrico	1.9	0	0
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	2.6	10	3

Se puede observar que esta comunidad muestra una elevada eficiencia de remoción de ambos herbicidas, prácticamente el 100 % (Tabla 19), cuando se determina por HPLC. En la Figura 12 se aprecia el perfil cromatográfico de muestras de medio de cultivo adicionado con atrazina, donde se observa la desaparición del pico correspondiente a este herbicida al final del cultivo por lote, pero no para los diferentes intermediarios de la degradación. En la Figura 13 se puede apreciar la acumulación de algunos subproductos de la degradación cuando se utiliza como sustrato la desisopropil-atrazina exógena.

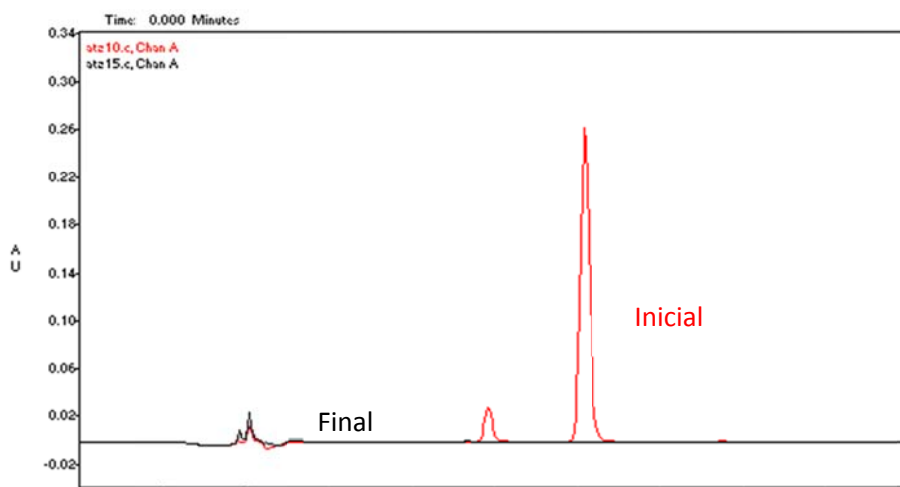


Figura 12. Perfil cromatográfico de la degradación de atrazina por la comunidad, en cultivo por lote con células inmovilizadas.

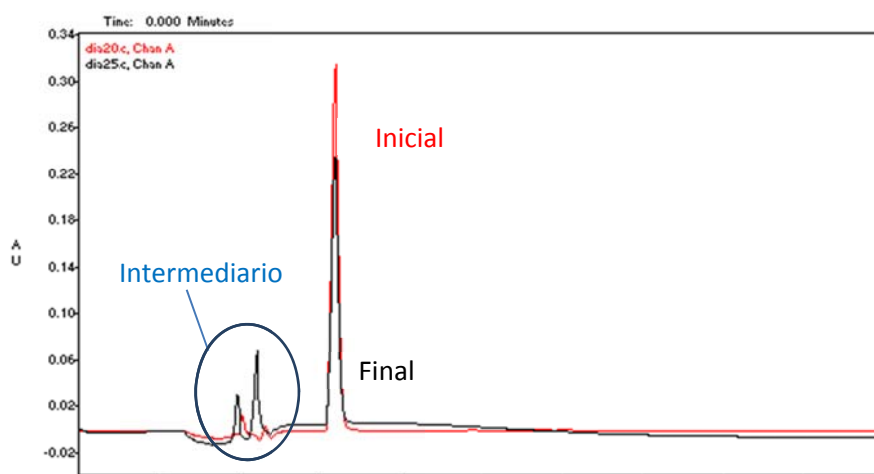


Figura 13. Perfil cromatográfico que ilustra degradación de desisopropil-atrazina exógena por la comunidad en cultivo por lote con células inmovilizadas.

Para saber si la eficiencia de degradación de estos intermediarios puede aumentar al adicionar una fuente de carbono de fácil asimilación, como la glucosa, se realizó nuevamente un cultivo por lote con cada uno de los intermediarios, utilizando glucosa como fuente de carbono adicional. Los resultados de la eficiencia de degradación se expresan en porcentaje (Tabla 20). Éstos fueron obtenidos por espectrofotometría UV y

HPLC, mientras que la determinación de glucosa se realizó mediante el método enzimático de glucosa oxidasa, observándose para todos los casos un consumo total de la hexosa, a las 72 horas.

En la Tabla 20 se aprecia que la adición de una fuente externa de carbono favorece la degradación de algunos intermediarios como la desetil-atrazina o la desisopropil-atrazina; por el contrario también existen aquellos en los que la degradación se ve disminuida por este mismo compuesto como es el caso de 2-hidroxi-desetil, desisopropil-atrazina y la hidroxisimazina.

Al igual que en el caso anterior se aprecia en el cromatograma la desaparición y en algunos casos la acumulación de compuestos de la degradación de estos mismos intermediarios (Figura 14 y 15).

Tabla 20. Eficiencia de degradación de los intermediarios en cultivo por lote, empleando medio líquido adicionado con glucosa.

Compuesto	TR (min)	Eficiencia de degradación (%)	
		UV	HPLC
Atrazina	6.1	53	100
Hidroxiatrazina	3.2	36	70
Desetil atrazina	3.6	38	100
Desisopropil atrazina	3.2	29	99
2-hidroxi-desetil,desisopropil-atrazina	2.3	47	27
2-hidroxi-desetil-atrazina	2.5	23	2
Simazina	4.9	82	100
Hidroxisimazina	3.4	0	50
Ácido cianúrico	1.9	0	0
2-cloro-4,6-diamino-1,3,5-triazina	2.6	9	12

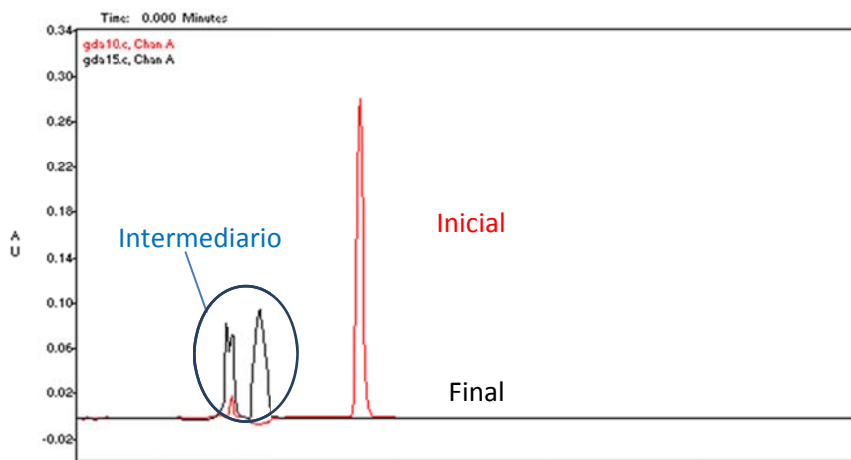


Figura 14. Perfil cromatográfico que ilustra la degradación de desetil-atrazina por la comunidad en cultivo por lote con células inmovilizadas (40 ppm de glucosa como fuente de carbono adicional).

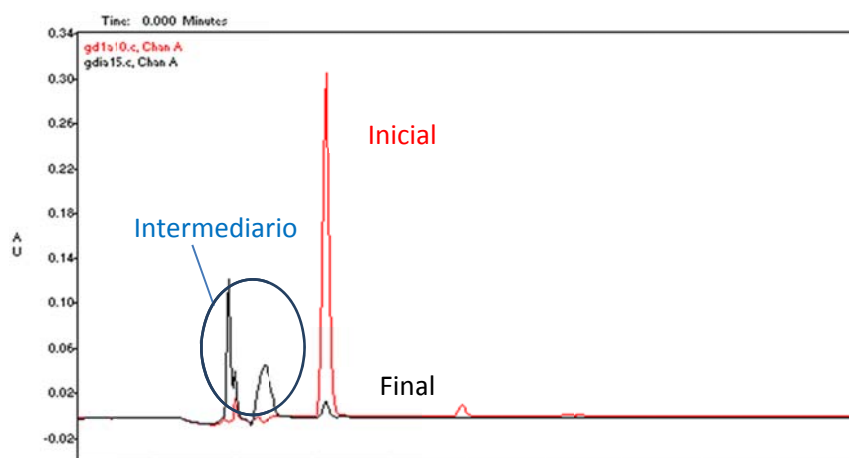


Figura 14. Perfil cromatográfico que ilustra la degradación de desisopropil-atrazina por la comunidad en cultivo por lote con células inmovilizadas (40 ppm de glucosa como fuente de carbono adicional).

9.5. Construcción del reactor

Para el desarrollo del presente trabajo se construyó un reactor rectangular de lecho empacado. El reactor tiene un canal central con paredes de malla para la oxigenación y la recirculación axial y transversal del líquido hacia los compartimentos empacados. El material empleado fue de acrílico con un difusor de aire de tubo perforado (Figura 16). Este reactor presentó las características volumétricas presentadas en la Tabla 21.

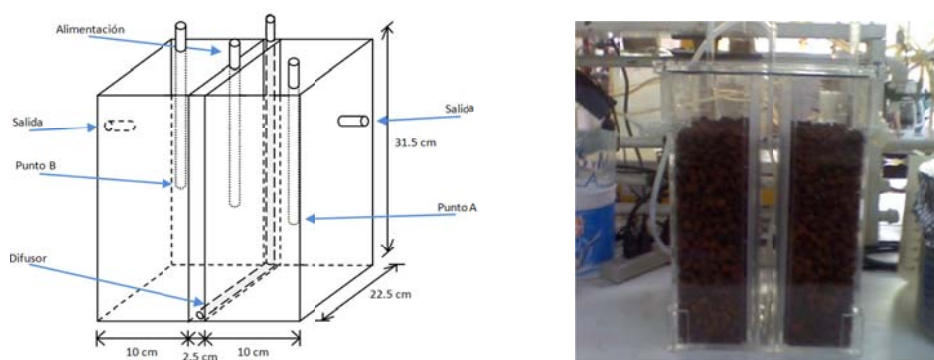


Figura 16. Esquema y fotografía del reactor *airlift* empacado

Tabla 21. Características volumétricas del reactor

Reactor Horizontal	Altura de operación (cm)	Volumen del líquido (cm ³)	Volumen empacado (cm ³)	Volumen total del reactor (cm ³)
	25	6600	8400	11000

El reactor cuenta con portas para el muestreo y para entrada y salida del medio de alimentación, como se muestra en el esquema. Este reactor presenta una forma rectangular para facilitar su escalamiento, además el soporte fue seleccionado por su bajo costo, resistencia a la compactación y área de contacto irregular para la inmovilización de células.

9.5.1. Operación abiótica y saturación del reactor

El reactor se empacó con roca volcánica hasta el nivel de la tubería de salida. Una vez empacado se procedió a realizar una prueba de saturación del lecho, mediante la alimentación de medio mínimo mineral con una concentración de 50 ppm de atrazina y 10 ppm de simazina, manteniendo un flujo constante de alimentación de 10 mL h⁻¹.

El grado de saturación se monitoreó en los puntos de toma de muestra del reactor; esto es a la entrada, el punto A, punto B y a la salida (mostrados en la Figura 17), determinando semi cuantitativamente la concentración de herbicida en los puntos de toma de muestra, hasta que se igualaron los espectros del medio de suministro y del efluente del reactor, así como los de los puntos A y B de los compartimentos empacados (Figura 17).

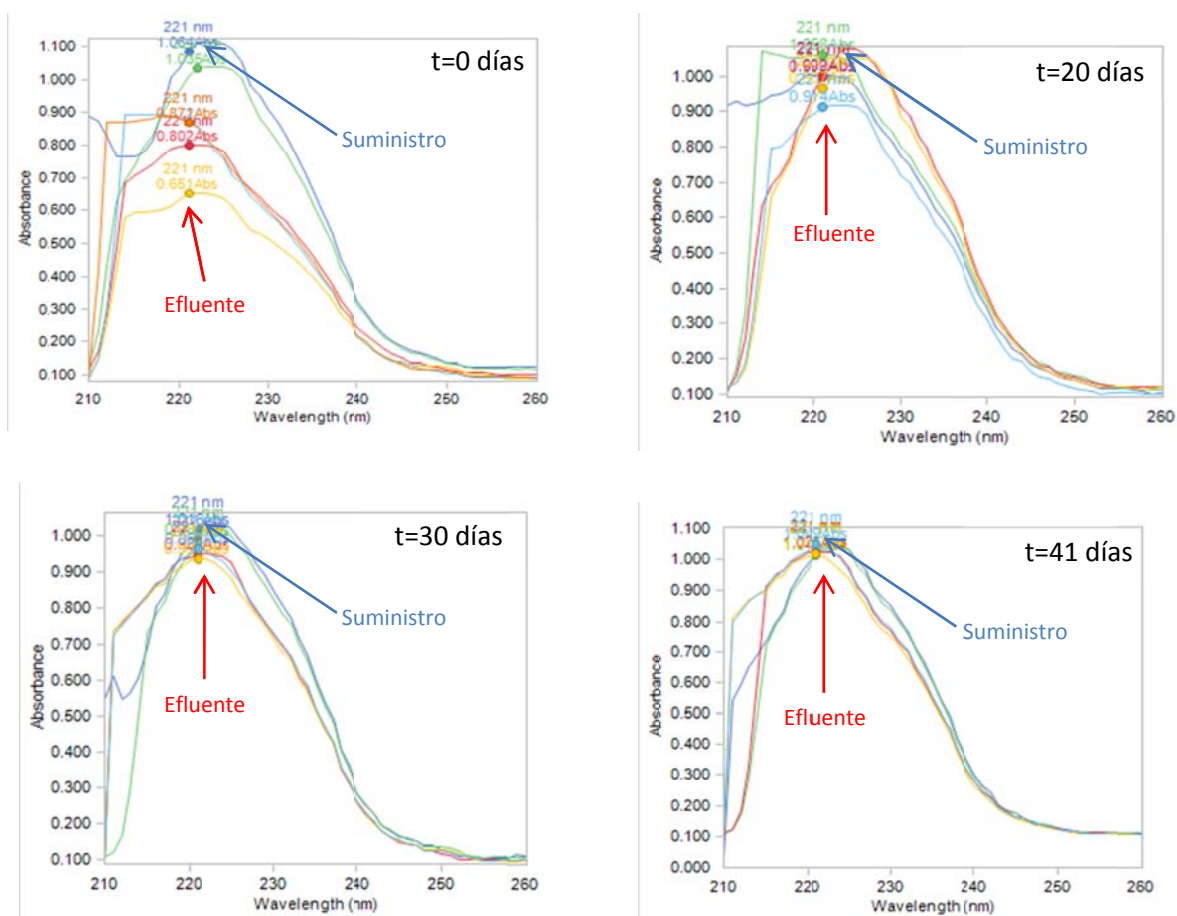


Figura 17. Espectros de absorción de las muestras tomadas en el suministro y el efluente del reactor a diferentes tiempos, durante la saturación del soporte con la mezcla de herbicidas.

En la Figura 18, se muestra la variación en la concentración de herbicidas estimada como atrazina utilizando una curva patrón de ésta, midiendo la absorbencia a 221 nm. La cinética de saturación se siguió hasta que las curvas no presentaron diferencias. Después de un periodo de 40 días de operación se alcanzó la saturación del sistema de reacción.

Cabe mencionar que el monitoreo en los puntos A y B no se realizó desde el inicio de la alimentación de la mezcla de herbicidas en medio mínimo mineral, debido a que se esperó a que la concentración en la entrada y salida del reactor se aproximara a la estabilización.

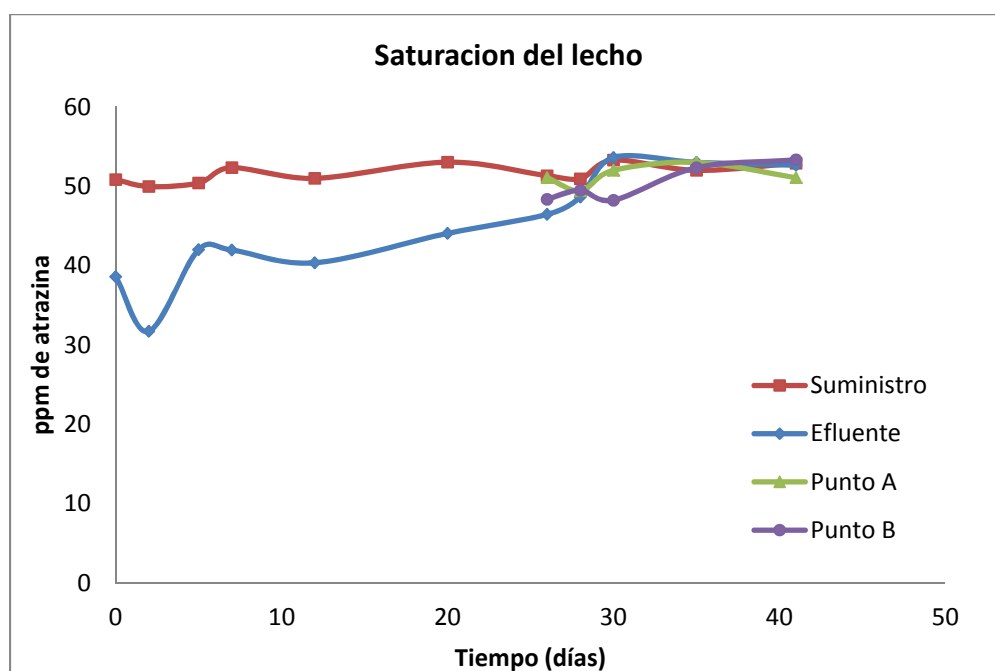


Figura 18. Cinética de saturación del soporte. La concentración de herbicidas se expresa como ppm de atrazina, determina espectrofotométricamente ($A_{221\text{ nm}}$)

9.6. Operación del reactor en régimen continuo con la comunidad artificial seleccionada.

Después de la selección de la comunidad y de la saturación del lecho con los herbicidas a utilizar, se procedió a inocular el reactor con la comunidad seleccionada, dejando operar al reactor en cultivo por lote por un tiempo de 48 horas, para posteriormente iniciar la operación en continuo a una velocidad de flujo de 4 mL h^{-1} , por un periodo de 168 horas. El sistema se operó a diferentes velocidades de flujo y en cada caso se llegó a alcanzar el estado de estable como se aprecia en la Figura 19, donde se muestran los flujos probados (4 mL h^{-1} , 10 mL h^{-1} , 20 mL h^{-1} , 40 mL h^{-1} , 80 mL h^{-1} , 160 mL h^{-1}).

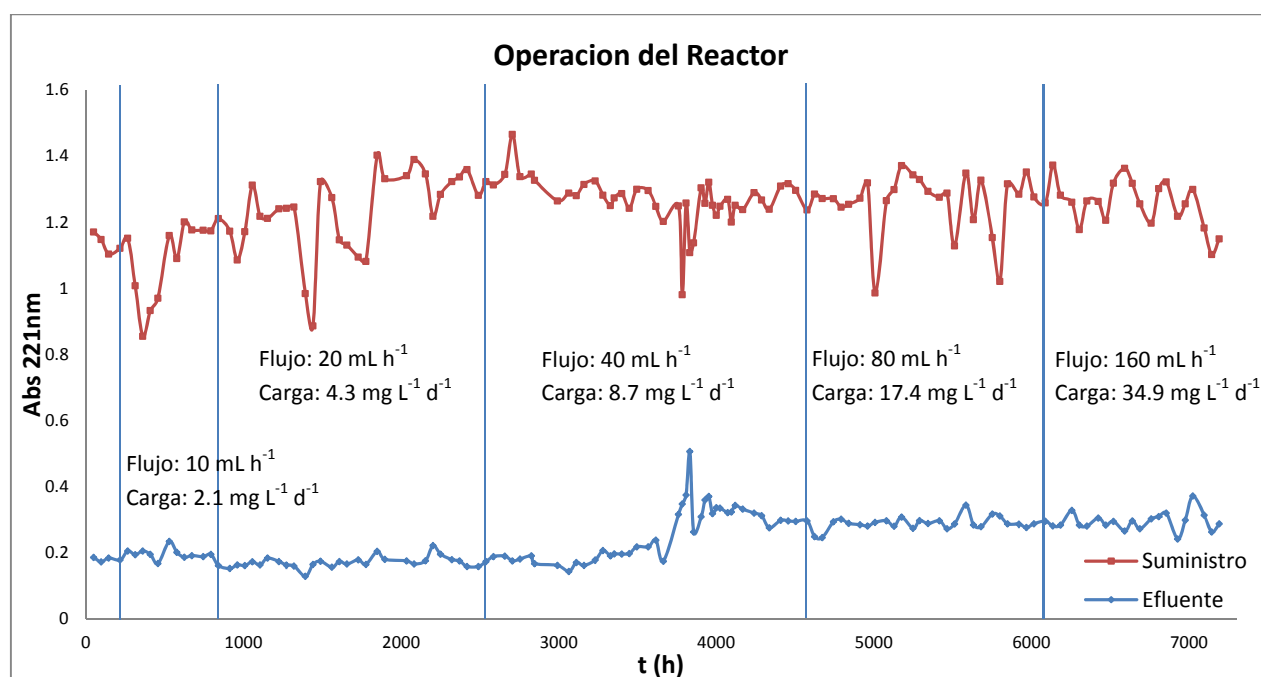


Figura 19. Comportamiento de la As221 del suministro y del efluente del reactor a las diferentes velocidades de flujo.

Cabe mencionar que conforme se aumentó la carga volumétrica aumentó la acumulación de intermediarios metabólicos (Figuras 20 a 25). Cuando el reactor operó con las cargas más altas (17.4 y 34.9 mg L⁻¹) se observó una importante acumulación de intermediarios (Figuras 24 a 25). Se puede apreciar la señal correspondiente a un posible intermediario con un tiempo de retención de 1.9 min. Sin embargo, al realizar la determinación de COT los resultados arrojaron altas eficiencias de degradación no concordante con la presencia de intermediarios, a menos que sean recalcitrantes a la oxidación química. Por ejemplo, la estabilidad del ácido cianúrico dificulta su determinación por este método. Por tanto, este compuesto podría ser uno de los principales intermediarios acumulados.

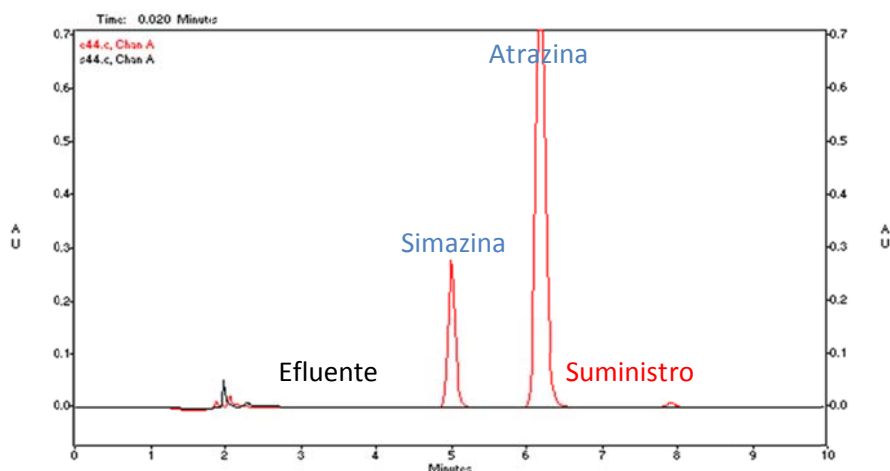


Figura 20. Perfil cromatográfico del suministro y del efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de 0.8 mg L⁻¹ d⁻¹.

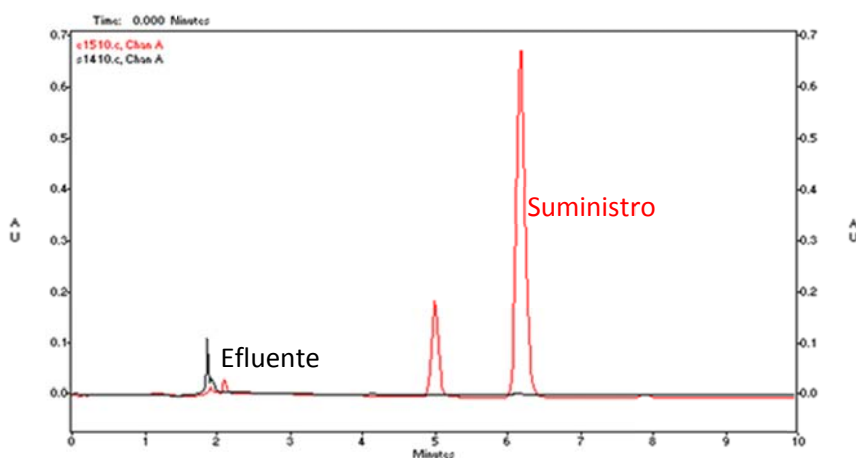


Figura 21. Perfil cromatográfico del suministro y del efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de 2.1 mg L⁻¹ d⁻¹.

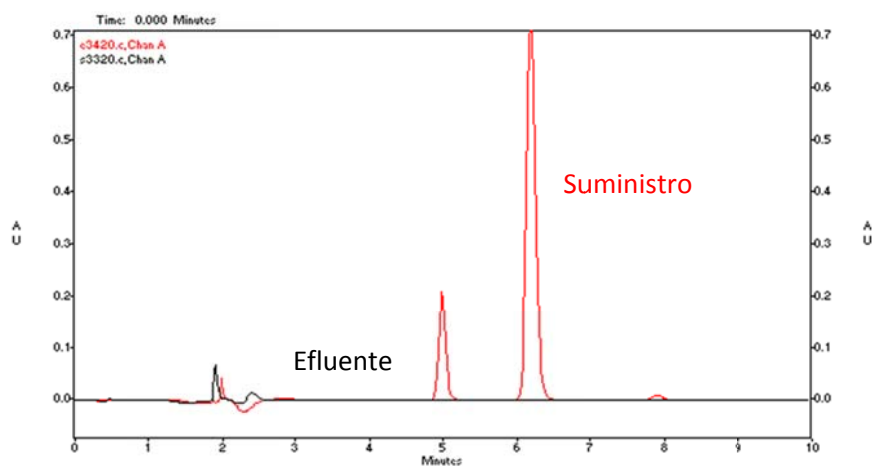


Figura 22. Perfil cromatográfico del suministro y del efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de $4.36 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

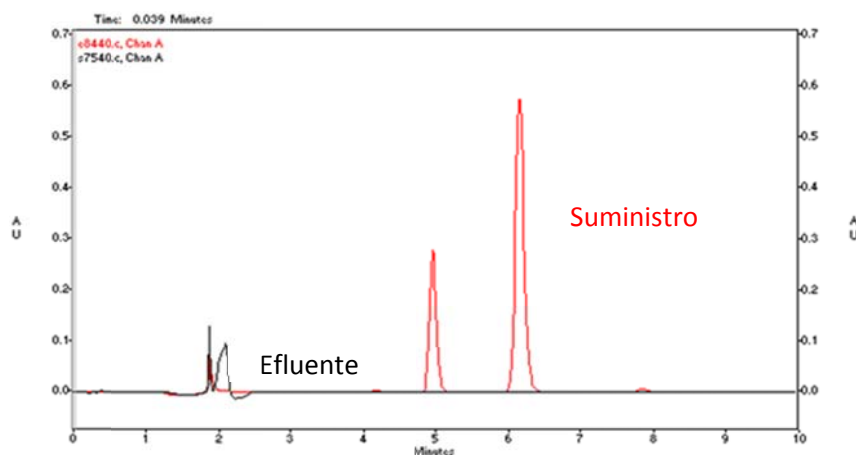


Figura 23. Perfil cromatográfico del suministro y del efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de $8.7 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

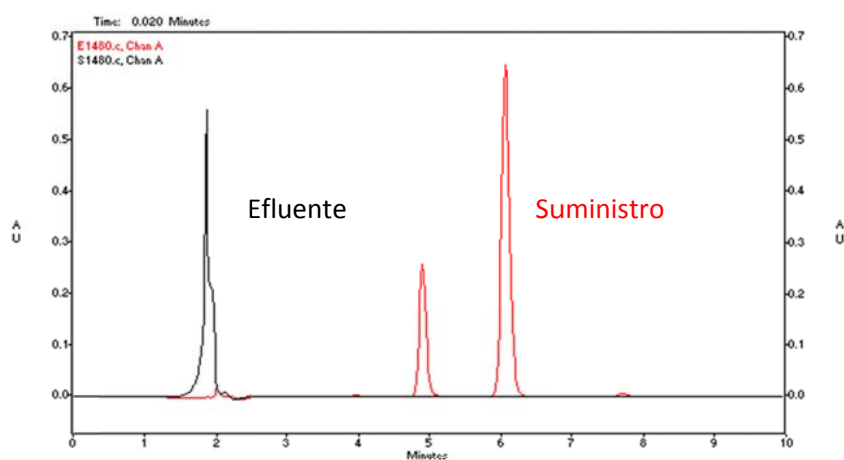


Figura 24. Perfil cromatográfico del suministro y del efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de $17.4 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

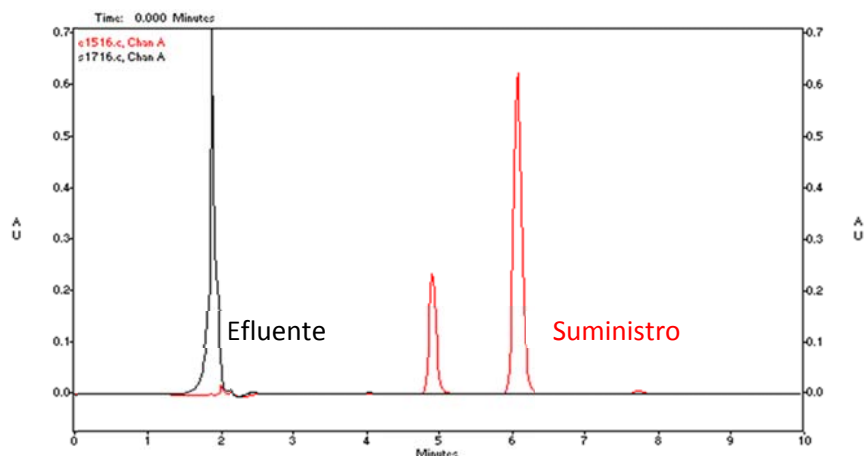


Figura 25 Perfil cromatográfico del suministro y el efluente del reactor a una carga de la mezcla de herbicidas de $34.9 \text{ mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$.

Analizando los datos obtenidos durante la evaluación de la degradación de la mezcla de herbicidas se pueden determinar las velocidades volumétricas de remoción de los herbicidas (R_{VH}) y compararlas con las de suministro (B_{VH}) (Figura 26). Se observa un comportamiento lineal de R_{VH} con respecto a B_{VH} y con una pendiente de uno lo que indica una eficiencia de remoción del 100% de los herbicidas a las diferentes velocidades de flujo probadas.

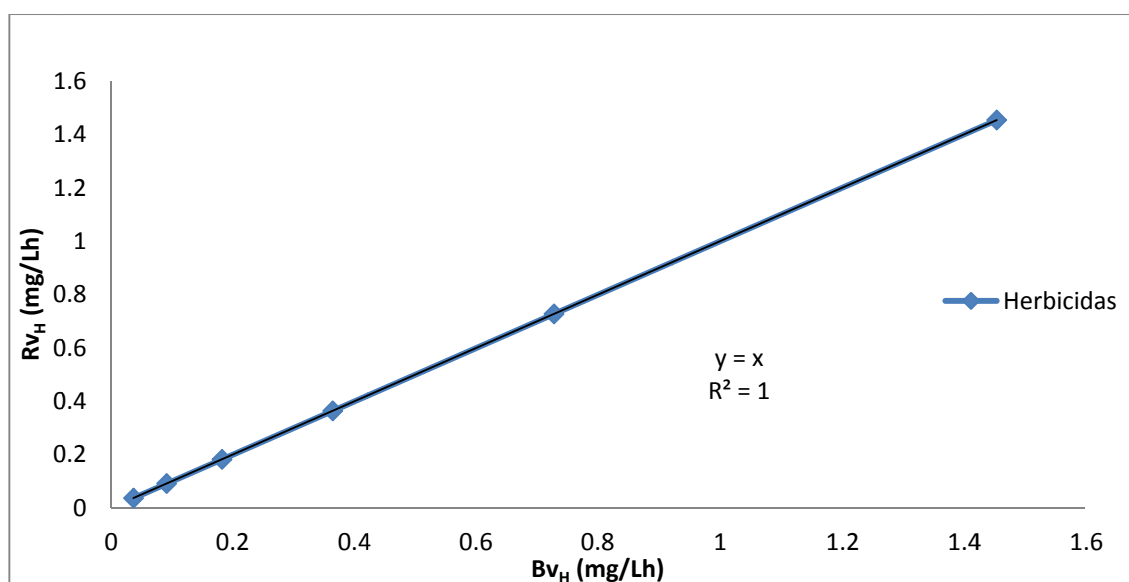


Figura 26. Velocidad volumétrica de remoción de la mezcla de herbicidas (R_{VH}) en función de la carga de la mezcla de herbicidas (B_{VH}).

Aunque en el reactor no se llega el límite de la capacidad de remoción de los herbicidas, si se observa la acumulación de intermediarios (ácido cianúrico). En la Figura 27 se muestran dos líneas. La línea superior es una recta que representa la remoción total del ácido cianúrico (comportamiento ideal), la línea inferior, es una curva que refleja la acumulación real de este compuesto conforme aumenta la carga de herbicidas.

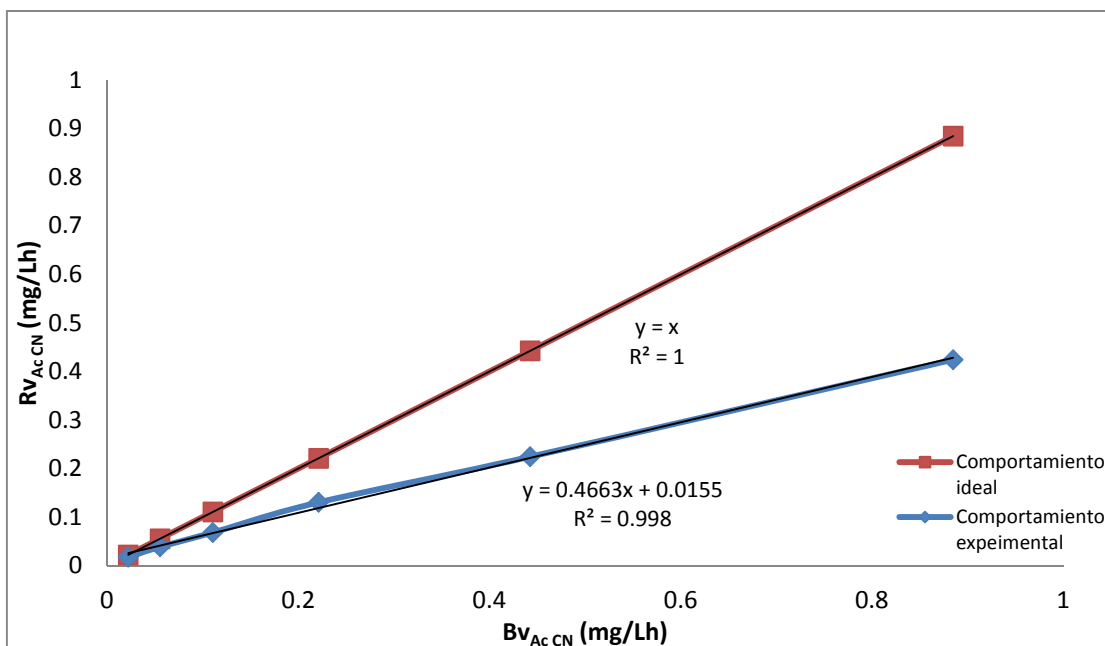


Figura 27. Velocidad volumétrica de remoción de ácido cianúrico (Rv_{Ac}) en función de la carga de ácido cianúrico (Bv_{Ac}), suministrado como fracción de la molécula de los herbicidas.

En la Figura 28 se muestra que aun cuando la eficiencia de remoción de herbicidas en función de la carga volumétrica aplicada al reactor es del 100%, la eficiencia de remoción del cianúrico decrece, acumulándose en consecuencia el intermediario.

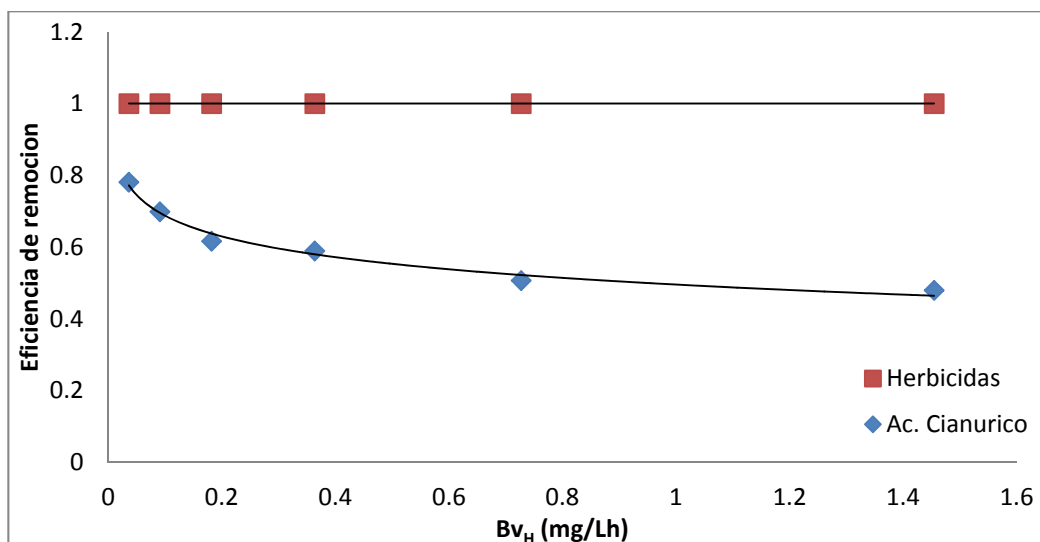


Figura 28. Eficiencia de remoción del herbicida y del ácido cianúrico en función de la carga de herbicidas (Bv_H).

9.6.1. Monitoreo de la acumulación de intermediarios en la degradación del reactor.

Mediante HPLC se monitoreó, para cada flujo probado en el sistema de reacción, la formación de los diferentes intermediarios de la degradación de los herbicidas.

Se utilizó un método modificado con respecto al reportado por Carabias y colaboradores (2002), que permitió la separación e identificación de cada uno de los intermediarios disponibles para la realización de este trabajo (Figura 29), que fueron más que los reportados por estos autores. Este método se logró adecuar a un cromatógrafo de líquidos marca Beckman Coulter Modelo System Gold, con detector de arreglo de diodos, utilizando una columna Spherisorb ODS ($5\mu\text{m}$, 250×4.6 mm ID). Fase móvil acetonitrilo – regulador de fosfatos 5 mM pH 7.2, en un gradiente lineal de 2 – 90% en un tiempo de 60 min con flujo constante de 1 mL min^{-1} sin control de temperatura.

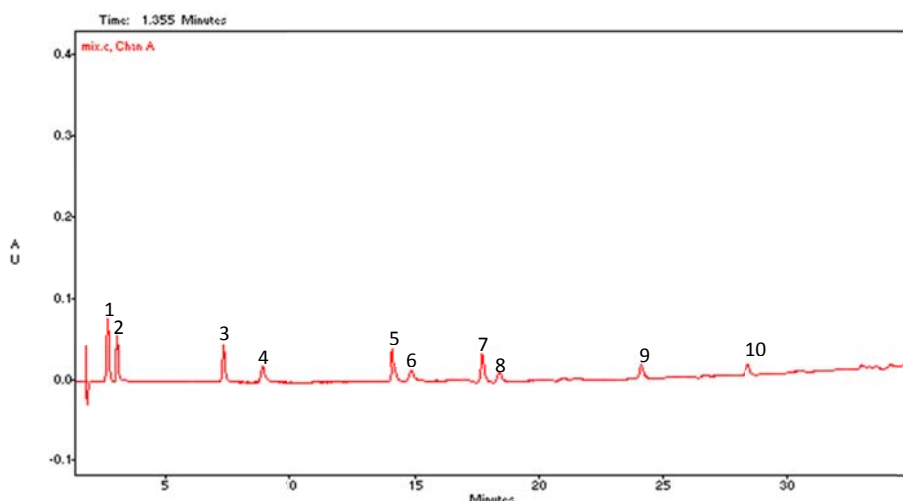


Figura 29. Perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios a una concentración de 10 ppm leídas a 210 nm. 1) Acido cianurico, 2) Hidroxi desetil desisopropil atrazina, 3) Desetil desisopropil atrazina, 4) Hidroxi desetil atrazina, 5) Desisopropil atrazina, 6) Hidroxi simazina, 7) Desetil atrazina, 8) Hidroxi atrazina, 9) Simazina, 10) Atrazina.

Al analizar las diferentes muestras del reactor a las velocidades de flujo probadas y compararlas con el patrón de la mezcla de intermediarios (Figuras 30 a 34), se observa que básicamente se acumula ácido cianúrico. Sin embargo, al aumentar la carga de herbicidas aparece otro intermediario; aparentemente la 2-hidroxi-desetil-desisopropil-atrazina (HDEIA) dada la cercanía de los picos ya que sólo se corrió un poco el tiempo de retención (Figura 33). Esta acumulación se mantiene durante las últimas velocidades de flujo como lo muestran las figuras 33 y 34.

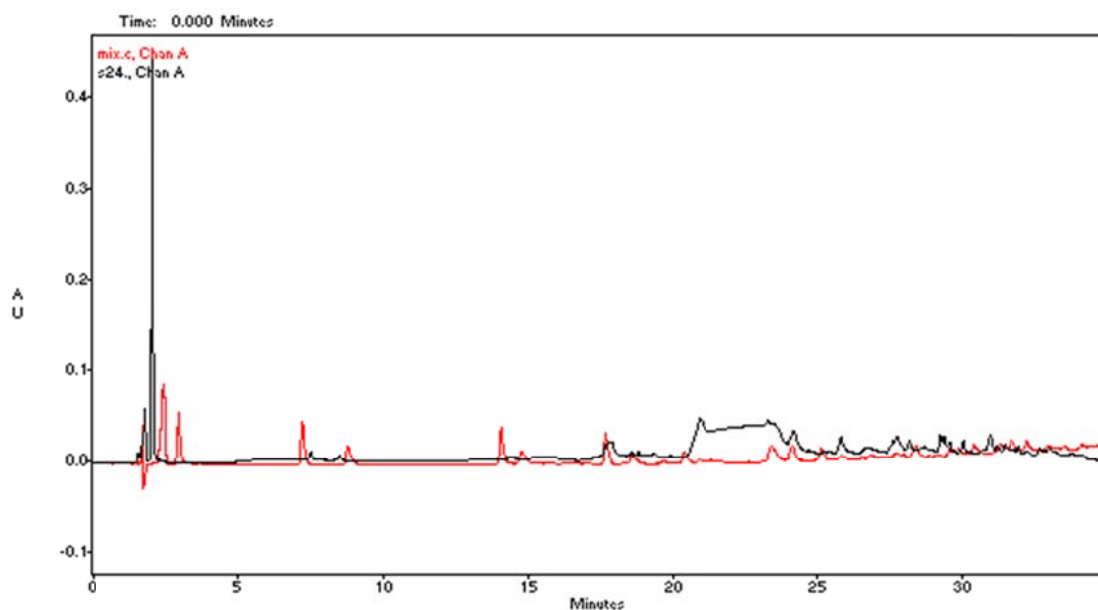


Figura 30. Perfil cromatográfico del efluente del reactor comparado con el perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios. Velocidad de flujo: 4 mL h^{-1} .

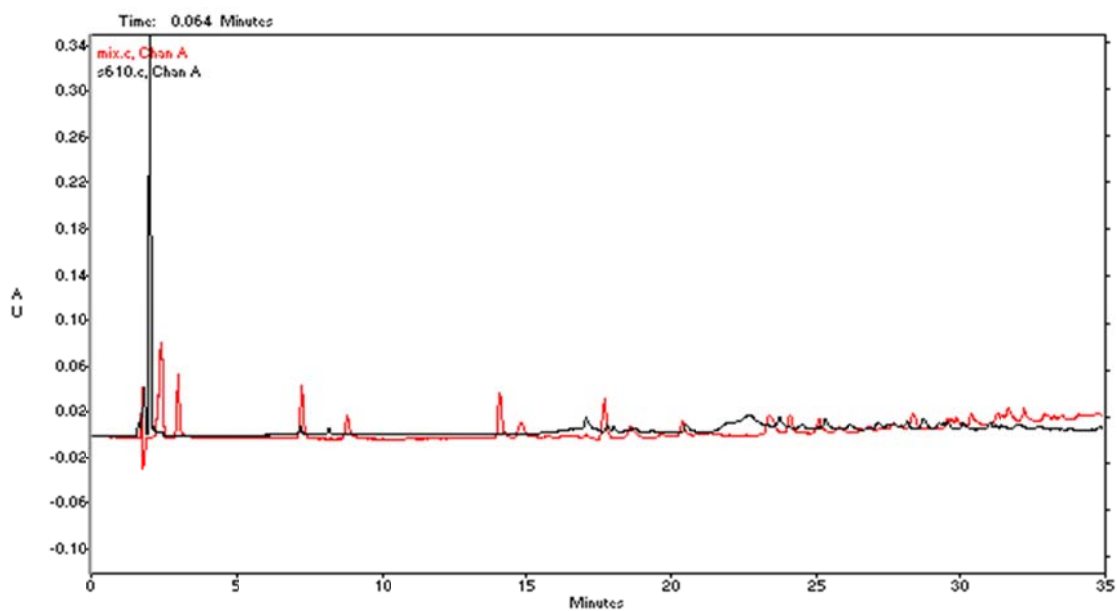


Figura 31. Perfil cromatográfico del efluente del reactor comparado con el perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios. Velocidad de flujo: 10 mL h^{-1} .

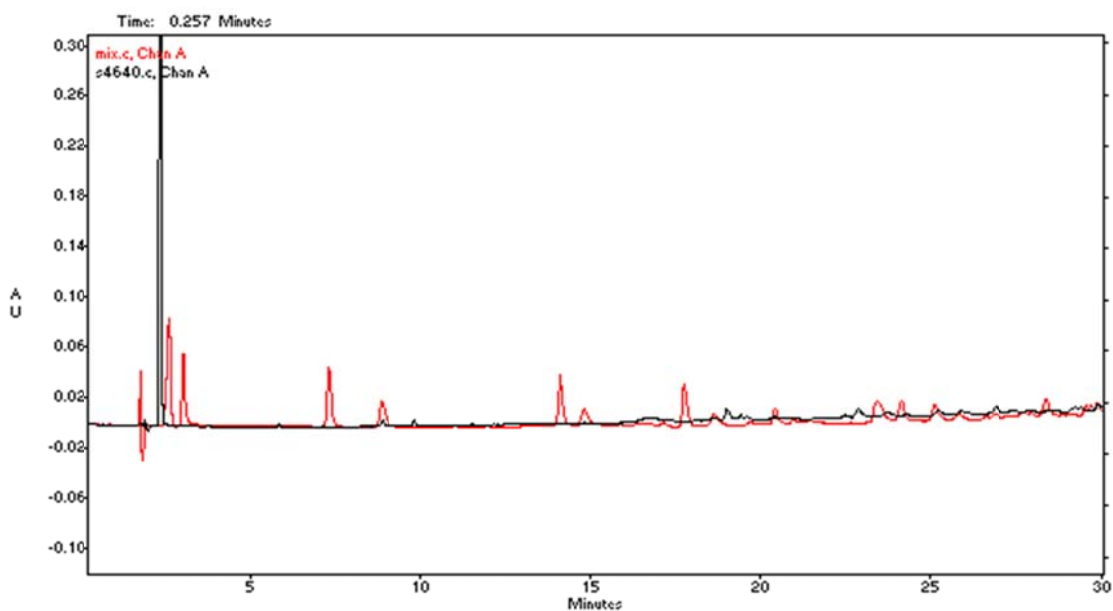


Figura 32. Perfil cromatográfico del efluente del reactor comparado con el perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios. Velocidad de flujo: 40 mL h⁻¹.

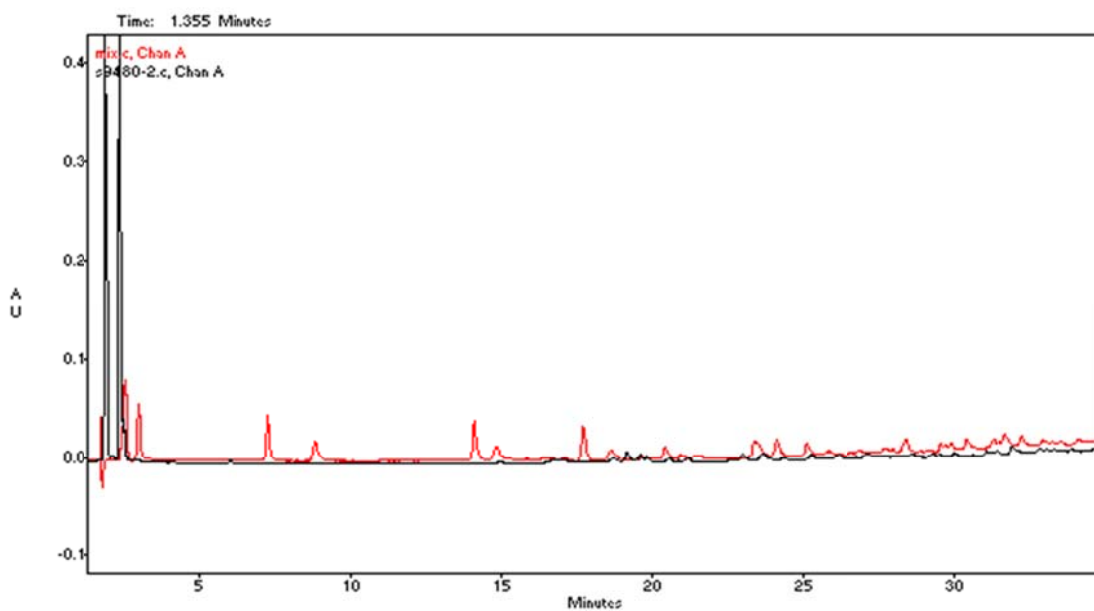


Figura 33. Perfil cromatográfico del efluente del reactor comparado con el perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios. Velocidad de flujo: 80 mL h⁻¹.

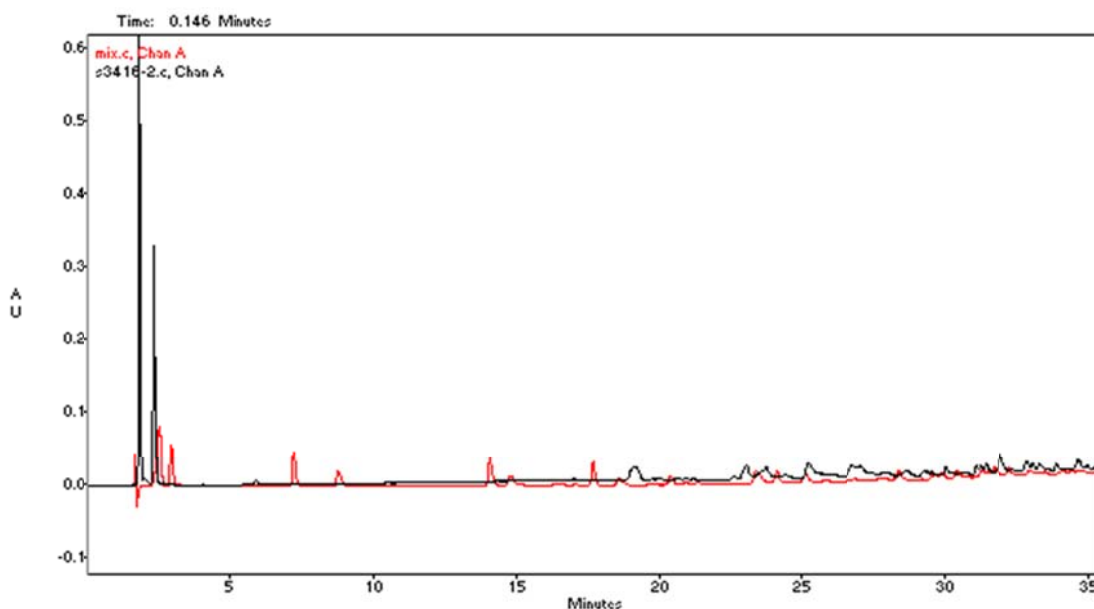


Figura 34. Perfil cromatográfico del efluente del reactor comparado con el perfil cromatográfico de la mezcla de intermediarios. Velocidad de flujo: 160 mL h^{-1} .

9.6.2. Monitoreo de la acumulación de ácido cianúrico

El ácido cianúrico es uno de los compuestos más recalcitrantes en la vía de degradación de los compuestos triazínicos y debido a la estabilidad de la molécula no alcanza a ser detectada por el método de COT. Por tal motivo se realizó la determinación de este compuesto mediante el método Hach. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 22, donde se aprecia que su concentración aumenta conforme aumenta la carga volumétrica.

Tabla 22. Concentración de ácido cianúrico a las diferentes cargas volumétricas

Carga Vol. (mg L ⁻¹ d ⁻¹)	Ácido Cianúrico (mg L ⁻¹)	
	Teórico	Método Hach
0.872	36.5	8
2.181		11
4.363		14
8.727		15
17.454		18
34.90		19

9.7. Monitoreo del mantenimiento de la comunidad artificial en el reactor de lecho empacado.

Cuando se alcanzó la estabilidad en cada carga volumétrica, se tomaron muestras de soporte del interior del reactor para evaluar la riqueza de las especies. Después de la recuperación de las células, se realizó la cuenta viable (Tabla 23) y la extracción de DNA, mismo que se amplificó con los iniciadores U y L para observar la riqueza de las especies por TGGE.

Al realizar la cuenta viable se pudieron apreciar 5 morfologías coloniales diferentes; la de *S. maltophilia*, que claramente se puede diferenciar del resto, está presente en todas las condiciones de operación probadas. Esta cepa tiene la información genética para sintetizar la enzima cianúrico hidrolasa (AtzD) (Tafoya, y col., 2009, Galíndez y col., 2011). Sin embargo, la cuenta viable de esta bacteria disminuyó, coincidentemente con la acumulación de ácido cianúrico, conforme se aumenta la carga de herbicidas (Tabla 23).

Tabla 23. Unidades formadoras de colonias (UFC) provenientes del soporte, a las velocidades de flujo ensayadas.

Carga ($\text{mg L}^{-1} \text{ d}^{-1}$)	UFC totales/g	UFC <i>S. maltophilia</i> /g	ϕ <i>S. maltophilia</i> *)
0.8	1.101E+04		
2.1	3.431E+03	2.795E+03	0.81
4.3	1.358E+04	2.497E+03	0.18
8.7	3.424E+03	1.141E+03	0.33
17.4	6.201E+03	1.069E+03	0.17
34.9	1.312E+04	0.245E+03	0.018

* ϕ = Fracción de la población de *S. maltophilia*.

Para comprobar si había una relación entre el decaimiento en la velocidad de remoción del ácido cianúrico y la disminución de la población bacteriana poseedora de *AtzD*, se calculó la velocidad específica de remoción de las UFC totales y la de *S. maltophilia*, y su relación con la carga volumétrica de herbicidas. Aparentemente, aumenta continua y exageradamente la velocidad específica de remoción de AC de esta bacteria (Figura 35), en tanto que la velocidad correspondiente a la comunidad completa se incrementa a bajas cargas de herbicidas, alcanza un máximo y comienza a decrecer cuando se aumenta el suministro de herbicidas (Figura 36). Ambos comportamientos, permiten suponer que no toda la remoción de ácido cianúrico se puede adjudicar a la bacteria que tiene la capacidad de degradarlo (*S. maltophilia*), sino que el resto de la comunidad bacteriana tiene algún papel en la remoción de este compuesto; fundamentalmente de mecanismos de adsorción y/o acumulación intracelular del cianúrico, ya que para el resto de las bacterias es un subproducto terminal que presuntamente no pudiesen secretar en su totalidad.

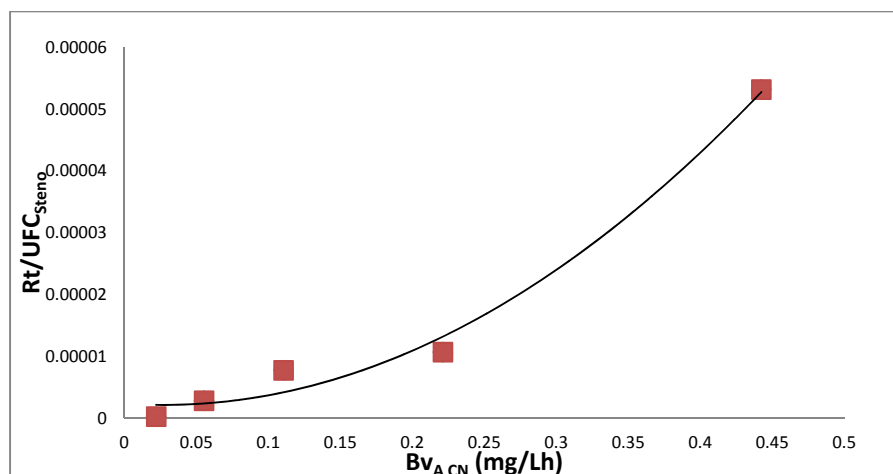


Figura 35. Velocidad específica de remoción de ácido cianúrico, por *S. maltophilia*, en función de la carga teórica de ácido cianúrico suministrada al reactor.

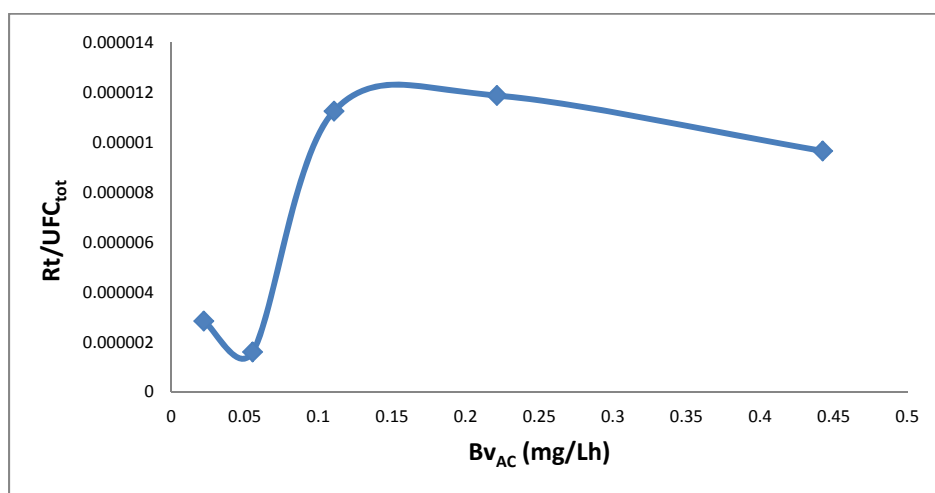


Figura 36. Remoción total de los herbicidas por unidad formadora de colonia en función de la carga.

Para confirmar esta hipótesis, se hizo la determinación de cianúrico adsorbido y acumulado en la biopelícula. Se estimó la cantidad de ácido cianúrico presente en el reactor, y en las células a partir de muestras de soporte obtenidas a la última velocidad de flujo, de acuerdo al siguiente balance:

$$Entrada = Consumo + Acumulacion + Salida$$

Además de observar una importante acumulación intracelular de ácido cianúrico (22% del valor teórico suministrado), hubo una pequeña adsorción del compuesto en la biopelícula (1%). Se puede decir que el resto del cianúrico efectivamente fue metabolizado (25%), por *S. maltophilia* (Tabla 24).

Tabla 24. Resultados del balance de ácido cianúrico en la última velocidad de flujo del reactor.

	Entrada	Consumo	Acumulación		Salida
			Biopelícula	Células	
μg_{Ac} totales	6167040	3210240	62737	1356720	3210240
%	100	25	1	22	52

La acumulación intracelular de compuestos se ha reportado en el caso de moléculas de peso molecular relativamente grande, como pigmentos (Fava y col., 1993), o catecoles (Tran y col., 2009), cuando las células son sometidas a condiciones de estrés.

En cuanto a los resultados obtenidos por la TGGE, sólo se logró la separación de tres bandas de las cinco que se esperaban (Figura 37), esto debido a la similitud de los frentes de corrimiento de los amplificados, ya que al realizar la misma prueba con los amplicones obtenidos de las cepas puras pudimos apreciar que efectivamente algunas de ellas presentan el mismo frente (Figura 38).

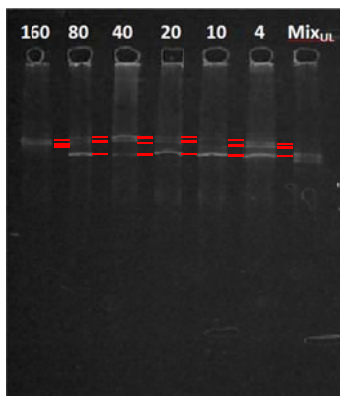


Figura 37. TGGE de muestras de las células inmovilizadas del reactor de lecho empacado

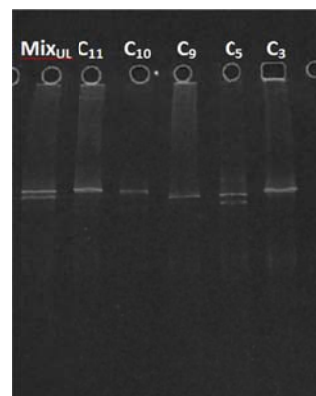


Figura 38. TGGE de cepas puras inoculadas en el reactor de lecho empacado.

Se aprecia además, que existe la predominancia de una banda en las primeras velocidades de flujo, la cual se vuelve más tenue al final de la operación, esta banda presumiblemente podría tratarse de *S. maltophilia* dado a que su comportamiento es similar.

9.8. Seguimiento de los genes que codifican las enzimas que degradan los diferentes herbicidas.

Finalmente se obtuvieron amplicones de los genes catabólicos mencionados anteriormente, empleando el DNA de las cepas puras, de las células libres y de las células inmovilizadas, en las diferentes condiciones de operación del reactor.

atzA:

Este gen codifica a la enzima que deshalogena a la atrazina, y corresponde correspondiente al primer paso de la vía de degradación, se encuentra presente en todas las cepas puras (Figura 39 A), en todas las cargas en las células libres (Figura 39 B) y de igual forma en las células inmovilizadas (Figura 39 C).

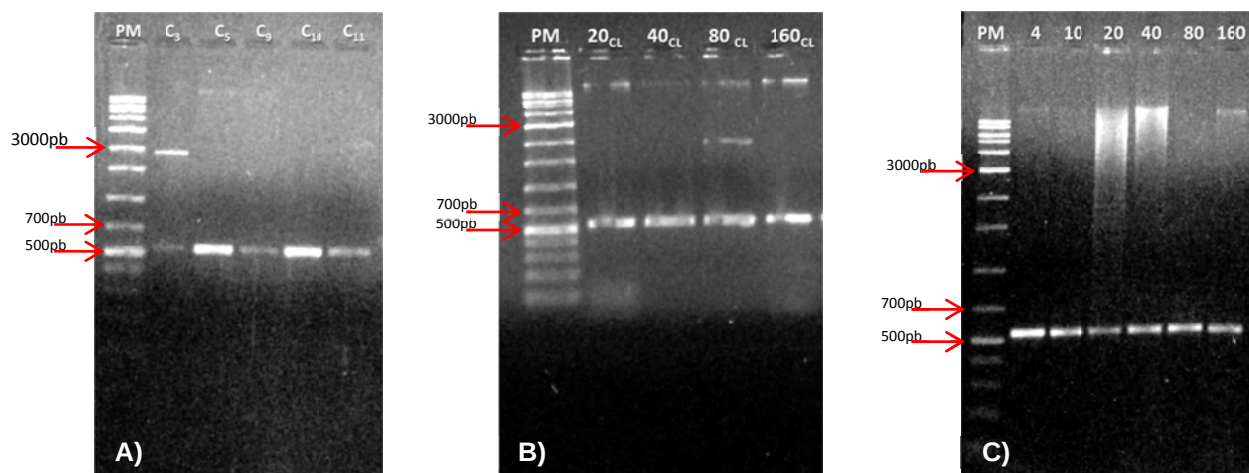


Figura 41. Electroferogramas del amplicón (550 pb) del gen *atzA* correspondiente a: A) cepas puras, B) Muestras de células libres y C) Muestras de células inmovilizadas.

PM= Marcador de peso molecular

C₃, C₅, C₉, C₁₀ y C₁₁. Fuente de DNA: cepas puras

20_{CL}, 40_{CL}, 80_{CL}, 160_{CL} (mL/h). Fuente de DNA: células libres del reactor en distintas condiciones de operación.

4, 10, 20, 40, 80 y 160. Fuente de DNA: Células inmovilizadas del reactor en distintas condiciones de operación.

atzB

Este gen está presente en algunas de las cepas puras (Figura 40 A), y en las células libres, aunque está presente, tiene una amplificación inespecífica (Figura 40 B). En las células que están inmovilizadas en el soporte, claramente se aprecia su presencia en todas las condiciones de operación del reactor (Figura 40 C).

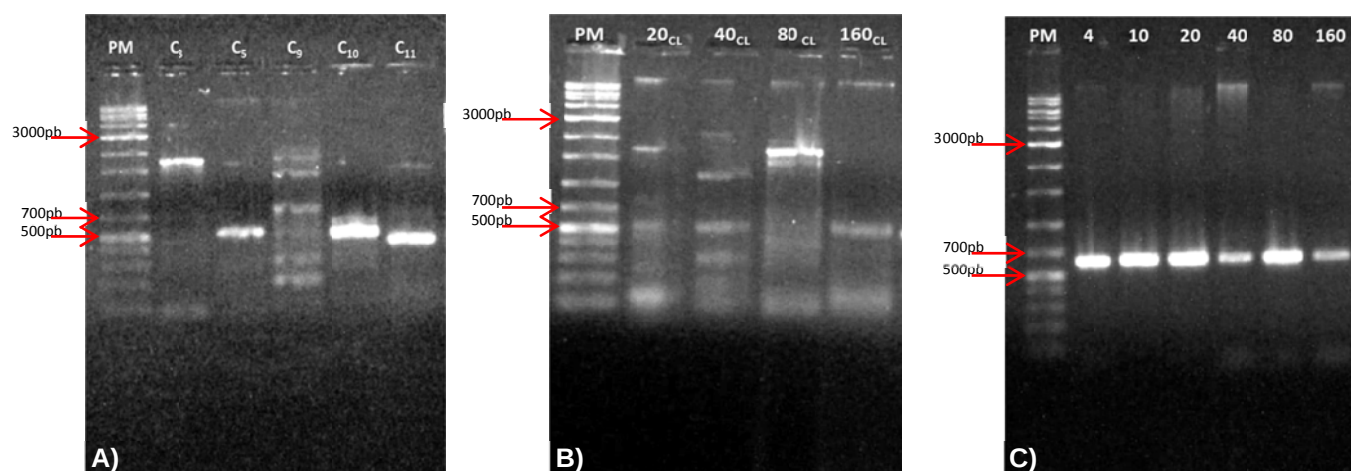


Figura 40. Geles de agarosa con el amplificado del gen *atz B* para cada una de las muestras tomadas, A) cepas puras, B) células libres y C) células inmovilizadas.

PM= Marcador de peso molecular

C₃, C₅, C₉, C₁₀ y C₁₁. Fuente de DNA: cepas puras

20_{CL}, 40_{CL}, 80_{CL}, 160_{CL} (mL/h). Fuente de DNA: células libres del reactor en distintas condiciones de operación.

4, 10, 20, 40, 80 y 160. Fuente de DNA: Células inmovilizadas del reactor en distintas condiciones de operación.

atz C

La presencia de este gen es más específica y sólo se encuentra en *Pseudonocardia* (C₅) y *Arthrobacter* (C₁₀), de las cepas puras (Figura 41).

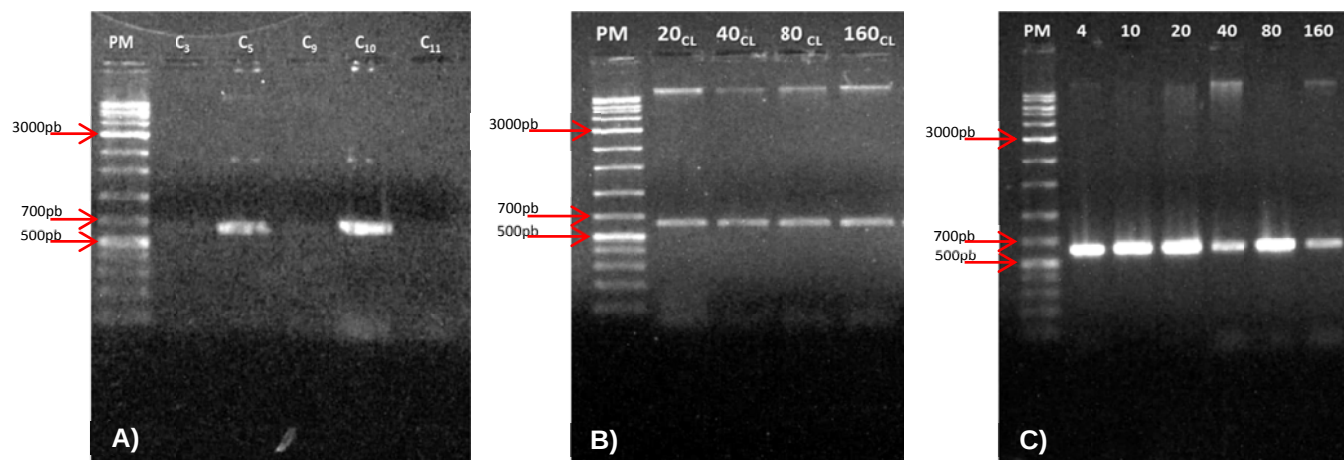


Figura 41. Geles de agarosa con el amplificado del gen *atz C* para cada una de las muestras tomadas, A) cepas puras, B) células libres y C) células inmovilizadas.

PM= Marcador de peso molecular

C₃, C₅, C₉, C₁₀ y C₁₁. Fuente de DNA: cepas puras

20_{CL}, 40_{CL}, 80_{CL}, 160_{CL} (mL/h). Fuente de DNA: células libres del reactor en distintas condiciones de operación.

4, 10, 20, 40, 80 y 160. Fuente de DNA: Células inmovilizadas del reactor en distintas condiciones de operación.

atz D

Este gen codifica a la enzima que hidroliza el intermediario más recalcitrante de la vía de degradación. No se logró amplificar en ninguna de las muestras tomadas. Sin embargo dado que hay degradación del ácido cianúrico, se puede presumir que éste es degradado por una cianúrico hidrolasa codificada por un gen diferente, o no se amplificó porque los iniciadores se alinearon, debido a cambios nucleotídicos, en el gen blanco.

10. CONCLUSIONES

- Se construyó una comunidad artificial capaz de degradar la mezcla de herbicidas atrazina-simazina (50:10 ppm) como única fuente de carbono y nitrógeno en un reactor de lecho empacado.
- Las cepas aisladas de la comunidad proveniente de medio con simazina no fueron capaces de degradar la mezcla de herbicidas (atrazina y simazina) en medio líquido; pero cuando se complementaron con las cepas más activas de la comunidad aislada en atrazina, fueron capaces de degradar la mezcla de herbicidas satisfactoriamente.
- La comunidad seleccionada, tiene la capacidad de degradar algunos intermediarios de la degradación y en menor medida a aquellos que presentan una estructura muy similar a la del ácido cianúrico. Cuando se adicionó glucosa al medio conteniendo intermediarios metabólicos, se aumentó la eficiencia de degradación de algunos de ellos.
- La eficiencia de remoción de los herbicidas para las diferentes cargas volumétricas probadas en el reactor fue elevada, pero se acumulan los intermediarios de la ruta de degradación (principalmente ácido cianúrico) conforme aumentan las cargas. A la máxima carga de herbicidas probada, la comunidad presentó una acumulación importante intracelular de ácido cianúrico; aproximadamente la mitad de la eficiencia de remoción se debió a la retención del compuesto en el interior de las células.
- Por morfología colonial se observa que la cepa de *S. maltophilia*, comienza a disminuir conforme aumenta la carga de herbicidas, lo que coincide con la acumulación de intermediarios metabólicos.

- Se detectó la presencia de los genes que codifican a las enzimas que intervienen en la vía de degradación de los herbicidas: *atzA*, *atzB* y *atzC*. El gen *atzD* que codifica a la cianúrico hidrolasa no fue detectada. Sin embargo como hay degradación del ácido cianúrico se presume que existe en la comunidad otra enzima diferente a la reportada.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR), Division Toxicologia. 2003. Atlanta GA. Departamento de salud y servicios humanos de los EEUU. Servicios de salud publica.
- Alvares, M.C.; Fuiman, L.A. 2005. Environmental levels of atrazine and its degradation products impair survival skills and growth of red drum larvae. *Aquat. Toxicol.* **74**:229-241.
- Beynon, K.I.; Stoydin, G.; Wright, A.N.; 2004. A comparison of the breakdown of the triazine herbicides cyanazine, atrazine and simazine in soils in maize. *Pesticide Biochem. Physiology.* Abstract.
- Beytul, A.; Nihal, O.; Cherrier, R.; Mehmet, A.O. 2009. Degradation of atrazine in aqueous médium by electrocatalytically generated hydroxyl radicals. A kinetic and mechanistic study. *Water Research.* **43**:1924-1934.
- Birkhoj, M.; Nellemann, C.; Jarfelt, K.; Jacobsen, H.; Andersen, R.H.; Dalgaard, M.; Vinggaard, A.M. 2004. Te combined antiandrogenic effects of five commonly used pesticides. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **201**:10-20.
- Bohinski, R.C. 1998. Bioquímica. 5ª edición. México. Ed. Addison Wesley Longman.
- Cantemir, C.; Cozmei, C.; Scutaru, B.; Nicora, S.; Carasevici, E. 1997. p53 protein expression in peripheral lymphocytes from atrazine chronically intoxicated rats. *Toxicol. Lett.* **93**:87-94.
- Carabias, R.; Rodríguez, E.; Herrero, E.; Sánchez, F.J. & Prado, M.G. 2002. Determination of herbicides and metabolites by soild-phase extraction and liquid chromatography evaluation of pollution due to herbicides in surface and grouwndwaters. *J. Chromatogr.* **950**:157:166.
- Catalkaya, E.C.; Kargi, F. 2009. Advanced oxidation and mineralization of simazine using Fenton`s reagent. *Hazard. Mater.* **95**:10-16.
- De Souza, M.; Seffernick, J.; Martinez, B.; Sadowsky, M.J. & Wackett, L.P. 1998. The atrazine catabolism genes *atzABC* are widespread and highly conserved. *J. Bacteriol.* **180**:1951-1954
- Donaldson, D.; Kiely, T.; Grube, A. 2002. Pesticides Industry Sales and Usage, 1998 and 1999 Market Estimates. *US EPA*, Washington, DC. EPA-733-R-02-001, 34 pp.
- Ellis, M. D.; Baxendale, F.P. & Keith, D.L. 1998. G98-1347 Protecting Bees When Using Insecticides, Historical Materials from University of Nebraska-Lincoln Extension, 9 p.
- Erickson, L.E. & Lee, K.H. 1989. Degradation of atrazine and related s-triazines. *Crit. Rev. Environ. Control.* **19**:1-14.
- Ewald, A.J. & Aebischer, N.J. 2000. Trends in pesticide use and efficacy during 26 years of changing agriculture in Souther England. *Environ. Monit. Assess.* **64**:493-529.

- Fatima, M.; Mandiki S.M.N.; Douxfils, J.; Silvestre, F.; Coppe, P.; Kestemont, P. 2007. Combined effects of herbicides on biomarkers reflecting immune-endocrine interactions in goldfish immune antioxidant effects. *Aquat. Toxicol.* **81**:159-167.
- Fava, F.; Di Gioia, D.; Romagnoli, C.; Marchetti, L. & Mares, D. 1993. Biosynthesis and cytoplasmatic accumulation of a chlorinated catechol pigment during 3-chlorobenzoate aerobic co-metabolism in *Pseudomonas fluorescens*. *Arch. Microbiol.* **160**:350-357.
- Felske, A., Engelen, B., Nubel, U. & Backhaus, H. 1996. Direct ribosome isolation from soil to extract bacterial rRNA for community analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4162-67.
- 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. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**:3653-3657.
- Galíndez, S.P.; Ramos, O.; Ruiz, N.; Salmeron, A.; Juárez, C.; Ahuatzi, D.; Curiel, E. & Galíndez, J. 2011. Simultaneous degradation of atrazine and simazine by a binary culture of *Stenotrophomonas maltophilia* and *Arthrobacter* sp. in a two-stage biofilm reactor. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **86**:554-561.
- Gebendinger, N.; Radosevich, M. 1999. Inhibition of atrazine degradation by cyanazine and exogenous nitrogen in a bacterial isolate M91-3. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**:375-383.
- Guang Gu, J.; Fan, Y.; Don Gu, J. 2003. Biodegradability of atrazine, cyanazine and dicamba under methanogenic condition in three soils of China. *Chemosphere.* **52**:1515-1521.
- Grcic, I.; Muzic, M.; Vujevic, D.; Koprivanac, N. 2009. Evaluation of atrazine degradation in UV/EZSM-5/H₂O₂ system using factorial experimental design. *Chem. Engineerin.* **150**:476-484.
- Grigg, B.C.; Bishoff, M.; Turco, R.F. 1997. Co-contaminated effects on degradation of triazine herbicides by a mixed microbial cultura. *Agric. Food Chem.* **45**:995-1000.
- 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**:5476-5480
- Hunter, W. J. & Shaner, D. L. 2009. Nitrogen limited biobarriers remove atrazine from contaminated water: laboratory studies. *Contaminant Hydrology.* **103**:29-37.
- (IARC) International Agency for Research on Cancer (1999) Evaluating carcinogenic risks in humans. Some chemicals that cause tumours of the kidney or urinary bladder in rodents and some other substances. World Health Organization, Lyon **73**:59-113
- Karthikeyan, R.; Davis, C.; Erickson, E.; Al-Khatib, K.; Kulakow, P.; Barnes, L. P.; Hutchinson, L.; Nurzhanova, A. 2003. Studies on responses of non-target plants to pesticides. Review Hazardous Substance Research Centre. Kansas State University.

- Kettles, M.A.; Browning, S.R.; Prince, T.S. & Horstman, S.W. 1997. Triazine herbicide exposure and breast cancer incidence: an ecologic study of Kentucky counties. *Environ Health Perspect* **105**:1222–1227
- Kontchou, Y.C.; Gschwind, N. 1994. Mineralization of the herbicide atrazine as a carbón source by a *Pseudomonas* strain. *Agric. Food Chem.* **43**:2291-2294.
- Kontchou, Y. & Gschwind, N. 1999. Biodegradation of s-Triazine compounds by a stable mixed bacterial community. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* **43**:47-56.
- Lerch, R.N.; Blanchard, P.E.; Turman, E.M. 1998. Contribution hydroxylated atrazine degradation products to the total atrazine load in midwestern streams. *Environ. Sci. Technol.* **32**:40-48.
- Macías, A.; Tafoya, A.; Ruiz, N.; Salmerón, A.; Juárez, C.; Ahuatzi, D; Mondragón, M. E.; Galíndez, J. 2009. Atrazine biodegradation by a bacterial community immobilized in two types of packed-bed biofilm reactors. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **25**:2195-2204.
- Markwell, J.; Namuth, D.; Hernández, I. 2007. Introducción a los herbicidas que actúan a través de la fotosíntesis. *Department of Agronomy and Horticulture at University of Nebraska-Lincoln, USA.*
- Martin, M.; Casassus, L.; Garbi, C.; Nande, M.; Vargas, R.; Robla, J.I.; Sanchez, M.; Allende, J.L. 2008a. A new mathematical model to evaluate simazine removal in three different immobilized-biomass reactors. *Water Research.* **42**:1035-1042.
- Martin, M.; Gibello, A.; Lobo, C.; Nande, M.; Garbi, C.; Fajardo, C.; Barra-caracciolo, A.; Grenni, P.; Martinez-Iñigo, M.J. 2008.b Application of fluorescence in situ hybridization technique to detect simazine-degrading bacteria in soil samples. *Chemosphere.* **71**:703-710.
- Mondragón, M.E; Ruiz, N.; Tafoya, A.; Juárez, C.; Curiel, E.; Galíndez, J. 2008. Chemostat selection of a bacterial community able to degrade s-triazinic compounds: continuous simazine biodegradation an a multi-stage packed bed biofilm reactor. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **35**:767-776.
- Montalvo, D.M.; Mengs, G.; Ferrer, J.; Allende, J.L.; Alonso, R. & Martin, M. 1998. Simazine degradation by immobilized and suspended soil bacterium. *Inter. Biodegradation and Biodeg.* **40**:93-99.
- Moore, A.; Lower, N. 2001. The impact of two pesticides on olfactory-mediated endocrine function in mature male Atlantic salmon (*Salmo solar*) parr. *Comp. Biochem. Physiol.* **129**:269-276
- Moran, A.C.; Muller, A.; Manzano, M.; González, B. 2008. Simazine treatment history determines a significant herbicide degradation potential in soils that is not improved by bioaugmentation with *Pseudomonas* sp. ADP. *Appl. Microbiol.* **101**:26-35.

- Pranab, K. & Ligy, P. 2004. Atrazine degradation in anaerobic environmental by mixed microbial consortium. *Water Research*. **38**:2277-2284.
- Radosevich, M.; Traina, S.J.; Touvinen, O.H.; 1995. Degradation of binary and ternary mixtures of s-triazines by a soil bacterial isolated. *Environ. Sci. and Health*. **30**:457-477.
- Ralebitso, K.T.; Senior, E.; Van Versveld, H.W. 2002. Microbial aspects of atrazine degradation in natural environments. *Biodegradation*. **13**:11-19.
- Russo, J. & Lagidick, L. 2004. Effects of enviromental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity of pond snails *Lymnea stagnalis*. *Enviro.n Pollut*. **127**:303-311.
- Sanger, F. 1981. Determination of nucleotide sequences in ADN. *Science*, **214**: 1205-1210.
- Salgio, P.; Trijasse, S. 1998. Behaivoral responses to atrazine and durion in goldfish. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. **35**:484-491.
- Satsuma, K. 2009. Complete biodegradation of atrazine by a microbial community isolated from a naturally derive driver ecosystem (microcosm). *Chemosphere*. **10**:10-16.
- Seema, J.; Ramesh, Y.; Jayaram, R.V. 2009. Photolytic and photocatalytic degradation of atrazine in the presence of activated carbón. *Chem. Engineerin*. **148**:342-347.
- Siripattanakul, P.; Wirojanagud, W.; McEvoy, J. 2009.a A feasibility study of immobilized and free mixed cultura bioaugmentation for treating atrazine in infiltrate. *Hazard. Mater*. **168**:1373-1379.
- Siripattanakul, P.; Wirojanagud, W.; McEvoy, J.; Limpiyakorn, T.; Khan, E. 2009.b Atrazine degradation by stable mixed cultures enriched from agricultural soil and their characterization. *Appl. Microbiol*. **106**:988-992.
- Smith, D.; Alvey, S.; Crowley, D. E. 2005. Cooperative catabolic phatways within an atrazine-degrading enrichment cultura isolated from soil. *Microbiol. Ecol*. **53**:265-273.
- Snedeker, M.S. 1998. Program on Breast Cancer and Environmental Risk Factors. (BCERF). Cornell University.
- Stevens, J.; Breckenridge, C.B. & Wetzel, L. 1999. A risk characterization for atrazine: oncogenicity profile. *J Toxicol Environ Health* **56**:69–109
- Sullivan, C.L. & Spence K.M. 2003. Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog. *Environ. Toxicol. Chem*. **22**:627-635.
- Tafoya A. 2008. Biodegradación del herbicida triazínico, atrazina, por una comunidad bacteriana, seleccionada en quimiostato, inmovilizada en reactores de lecho empacado; Tesis de Doctorado. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. IPN

- Tafoya, A.; Macías, A.; Ruiz, N.; Juárez, C.; Galíndez, J. 2009. Kinetics of atrazine biodegradation by suspended and immobilized mixed microbial cell cultivated in continuous systems. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **84**:982-991.
- Taiwo, L.B. & Oso, B.A. 1997. The influence of some pesticides on soil microbial flora in relation to changes in nutrient level, rock phosphate solubilization and P release under laboratory conditions. *Agric Ecosyst Environ* **65**:59–68
- Tran, N.P.; Park, J.K.; Hong, S.J. & Lee, C.G. 2009. Proteomics of proteins associated with astaxanthin accumulation in the green algae *Haematococcus lacustris* under the influence of sodium orthovanadate. *Biotechnol Lett.* **31**:1917-1922.
- Toop, E.M.; Zhu, H.; Nour, M.S.; Houot, S.; Lewis, M.; Cuppels, D. 2000. Characterization of an Atrazine-Degrading *Pseudomonas* sp. Isolated from Canadian and French agricultural soils. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**:2773-2782.
- Ware, G. W. 2000. The pesticide Book. 5th ed. Thomson Publications. Fresno, California. 123-145.
- Whitacre, D.M. & Ware, G.W. 2004. Una introducción a los herbicidas. University of Minnesota. <http://ipmworld.umn.edu/ipmsite.htm>
- Zaviska, F.; Drogui, P.; Blais, J.F.; Mercier, G. & Lafrance, P. 2011. Experimental design methodology applied to electrochemical oxidation of the herbicide atrazine using Ti/IrO₂ and Ti/SnO₂ circular anode electrodes. *J. Hazard. Mater.* **185**:1499-1509.
- Zhang, C.; Wang, L.; Pan, G.; Wu, F.; Deng, N.; Milhot, G.; Mestankova, H.; Bolte, M. 2009. Degradation of atrazine photoinduced by Fe (III) – pyruvate complex in the aqueous solution. *Hazar. Mater.* **169**:772-779.

10.1. Consultas en internet

- ✓ <http://dicc.hegoa.efaber.net/listar/mostrar/7>
- ✓ <http://edafologia.urg.es/conta/tema13/imagenes/interac.gif/2008>
- ✓ <http://www.acsmedioambiente.com/lonuevo/> junio 2009
- ✓ <http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/atrazina.pdf>. Septiembre 2009.
- ✓ <http://www2.ine.gob.mx/sistemas/plaguicidas/pdf/simazina.pdf>. Septiembre 2009.
- ✓ <http://edafologia.urg.es/conta/tema13/clasif.htm>
- ✓ USEPA (U. S. Environmental Protection Agency). 2004. EPA Ground wáter & drinking wáter. Consumer factsheet on: Simazine. Version electrónica:
http://www.epa.gov/safewater/contaminants/dw_contaminats/dw_contamfs/simazine.html