



X Congreso Ibérico de Agroingeniería X Congresso Ibérico de Agroengenharia

Huesca, 3-6 septiembre 2019



Estrategias para la búsqueda de bacterias degradadoras de atrazina en la laguna salada de Pétrola (SE Albacete)

Y. Espín¹, G. Sanz¹, N. Valiente¹, A. Menchén¹, M. Álvarez-Ortí¹, J.J. Gómez-Alday¹

¹ Grupo de Hidrogeología, Sección de Biotecnología y Recursos Naturales del Instituto de Desarrollo Regional, Albacete (UCLM); manuel.alvarez@uclm.es

Resumen: El humedal salino de Pétrola, situado en un ambiente semiárido en el sureste de la provincia de Albacete (España), está sometida a múltiples entradas de contaminación entre las que destacan el nitrato, y la atrazina, un herbicida usado ampliamente en las prácticas agrícolas. Estas condiciones dan lugar a un ambiente extremo que propicia condiciones exclusivas capaces de albergar ciertos procesos redox mediados por extremófilos adaptados que ejercen un papel fundamental en la atenuación de la contaminación de origen urbano y agrícola existente. El objetivo de este trabajo es la búsqueda de microorganismos extremófilos implicados en la atenuación de contaminantes en la laguna de Pétrola, con especial atención en aquellos que puedan estar implicados en la biodegradación de la atrazina. El primer enfoque ha consistido en un análisis metagenómico de muestras de ADN extraídas de sedimentos de 7 puntos de la laguna. El segundo enfoque ha consistido en la búsqueda de bacterias degradadoras de atrazina, mediante la amplificación por PCR con cebadores complementarios a los genes involucrados en la ruta de degradación de este contaminante organoclorado. Como resultado, se ha detectado una gran diversidad de microorganismos extremófilos. Entre ellos, destaca el grupo relacionado con procesos de desnitrificación fototrófica.

Palabras clave: Atenuación de contaminantes; metagenómica; desnitrificación

1. Introducción

La atrazina (2-cloro-4-etilamina-6-isopropilamina-s-triazina) ha sido uno de los herbicidas más usados para el control de malas hierbas en muchos cultivos agrícolas, así como en ambientes urbanos y áreas recreativas [1-2]. La atrazina está clasificada como un disruptor endocrino que origina problemas reproductivos [3] y que puede afectar potencialmente a la salud humana, por lo que en algunos países europeos ya se ha prohibido su uso. Sin embargo, debido a su elevada movilidad y su larga vida media en los suelos, es posible encontrar atrazina y sus metabolitos tanto en aguas superficiales como aguas subterráneas y suelos incluso años después de su aplicación [4]. La Unión Europea establece un límite de atrazina en agua potable de 0,1 µg/L, por lo que es de vital importancia encontrar métodos para eliminar la atrazina de los ambientes acuáticos [5].

La laguna salada de Pétrola (SE Albacete) es uno de los ambientes salinos más representativos de la comunidad de Castilla-La Mancha. Esta laguna es el punto de descarga de una cuenca endorreica de alrededor de 42 km², ubicada en un ambiente semiárido, sujeta a una elevada presión antrópica originada por la actividad agrícola, ganadera y el vertido de aguas residuales que dan lugar a la acumulación de contaminantes [6]. Estos aportes, junto con la elevada salinidad de la laguna en la que se puede encontrar una conductividad de hasta 123.000

$\mu\text{S}/\text{cm}$, da lugar a la aparición de ambientes extremos propicios para albergar microorganismos adaptados que puedan llevar a cabo procesos redox relacionados con la atenuación de contaminantes.

La laguna de Pétrola ya se ha caracterizado en trabajos previos desde un punto de vista físico-químico y multi-isotópico [7-8]. Sin embargo, no existen datos en relación a los microorganismos que pueden estar involucrados en los procesos de atenuación de contaminantes, y en concreto de la atrazina que pueda permanecer de forma residual en los sedimentos de la laguna. Por lo tanto, el objetivo de este trabajo es la búsqueda de bacterias que puedan contribuir a la degradación de atrazina mediante dos estrategias distintas: una primera búsqueda mediante un análisis metagenómico que ofrezca una visión de las comunidades bacterianas presentes en los sedimentos de la laguna de Pétrola, y una segunda estrategia consistente en la amplificación mediante PCR de los genes involucrados en la ruta metabólica de degradación de la atrazina, que ofrezcan la evidencia de la existencia de microorganismos capaces de llevar a cabo esta ruta metabólica.

2. Materiales y métodos

2.1. Selección de muestras

La laguna de Pétrola ocupa la zona de descarga de una cuenca endorreica, con varios pequeños arroyos que descargan en la laguna con un patrón radial (Figura 1). En función de la presión de los distintos contaminantes y de las características de la laguna, se seleccionaron 7 puntos para la recogida de sedimentos (Tabla 1).



Figura 1. Esquema de los puntos de muestreo de sedimentos.

Tabla 1. Características de los puntos seleccionados para el muestreo

Punto	Principal fuente de contaminación
2635	Aislado de la laguna. Lugar usado como salina
2643	Aguas residuales, después de pasar por filtro verde
2648	Residuos de la agricultura, y de industria ganadera
2649	Residuos de la agricultura
2650	Aguas residuales sin tratamiento
2651	Punto control, alejado de las principales fuentes de contaminación
2652	Residuos de la agricultura

Los sedimentos se recogieron en tubos estériles, y se transportaron en condiciones de refrigeración hasta el laboratorio para la extracción inmediata del ADN genómico.

2.2. Extracción de ADN y análisis metagenómico

El ADN genómico se extrajo de los sedimentos mediante el kit NucleoSpin® Soil (Macherey-Nagel, Düren, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Posteriormente, el ADN genómico obtenido de los diferentes sedimentos se sometió a un análisis metagenómico mediante la amplificación y secuenciación de alto rendimiento de las regiones V3 y V4 del gen 16SrRNA (StabVida). Los resultados obtenidos se sometieron a un análisis mediante el software de análisis bioinformático QIIME2.

2.3. Amplificación mediante PCR

Para evaluar la presencia de bacterias degradadoras de atrazina, se realizó una PCR con el ADN genómico extraído de los diferentes sedimentos, con cebadores específicos para los genes involucrados en la degradación de atrazina [9]: Atrazina clorohidrolasa (AtzA), Hidroxicloroatrazina etilaminohidrolasa (AtzB), N-Isopropilamela Isopropilaminohidrolasa (AtzC). Las secuencias de estos cebadores fueron: AtzAF 5'-CCATGTGAACCAGATCCT-3'; AtzAR 5'-TGAAGCGTCCACATTACC-3'; AtzBF 5'-TCACCGGGGATGTGCGGGC-3'; AtzBR 5'-CTCTCCCGCATGGCATCGGG-3'; AtzCF 5'-GCTCACATGCAGGTACTION-3'; AtzCR 5'-GTACCATATCACCGTTTGCCA-3'. Las condiciones de la PCR se variaron para optimizar el resultado. Los resultados de la amplificación se resolvieron en geles de agarosa al 2% teñidos con Red Safe.

3. Resultados y discusión

3.1. Análisis metagenómico

El análisis metagenómico de las muestras obtenidas permite la identificación y la caracterización de las comunidades bacterianas que habitan en los distintos sedimentos recogidos en la laguna de Pétrola. En los 7 sedimentos muestreados, se obtuvo una media de 633.902 lecturas de secuencias con una longitud de 300 pb. El análisis de estas secuencias dio como resultado la identificación de un número variable de OTUs (unidad taxonómica operativa) en función de la muestra de sedimento. El más variable fue el punto 2635, con 3024 OTUs, mientras que el menos variable fue el punto 2651, donde se identificaron únicamente 1393 OTUs.

En los resultados obtenidos se observa una amplia representación de microorganismos extremófilos, con patrones diferentes en función del punto seleccionado para el análisis (Figura 2).

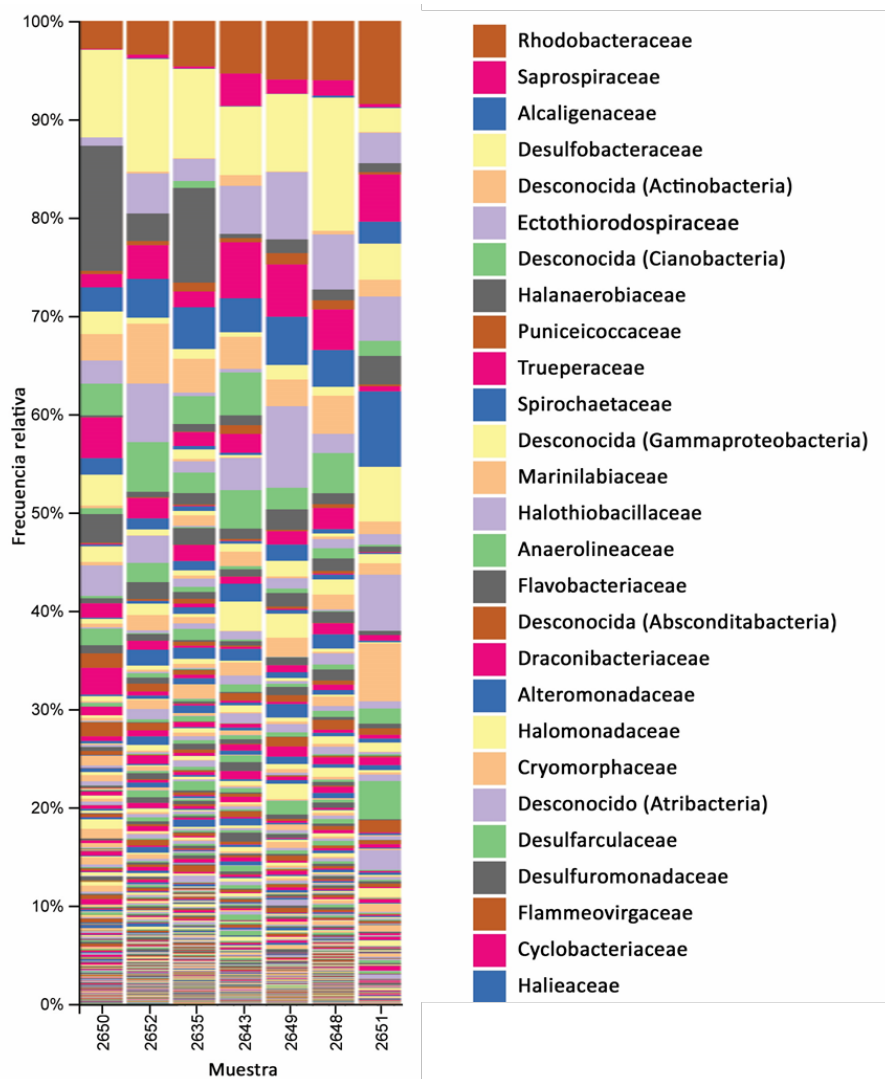


Figura 2. Distribución de familias en los sedimentos analizados. Se muestran los nombres de las familias que aparecen de forma mayoritaria.

En general, se aprecia la presencia de bacterias relacionadas con el reciclaje de nitrógeno, como es la familia *Ectothiorhodospiraceae*, que produce la desnitrificación autotrófica completa bajo condiciones halófilas [10]. Dentro de esta familia, es especialmente remarcable la presencia de bacterias del género *Thioalkalivibrio*, que suman el 7% del total de bacterias identificadas. Además, otros microorganismos como algunos miembros de la familia *Halomonadaceae*, presentes en todos los puntos analizados, pueden crecer anaeróbicamente usando el nitrato como aceptor de electrones y convirtiéndolo en nitrito. Otras familias relacionadas con el ciclo del nitrógeno aparecen en menor proporción, como pueden ser las familias *Nitrospiraceae* o *Pseudomonadaceae*. Dentro de estas últimas se encuadran bacterias del género *Pseudomonas*, en el que algunas cepas se han encontrado asociadas a la degradación de atrazina [9].

El análisis metagenómico mediante la secuenciación del gen 16S rRNA ofrece una visión descriptiva de las comunidades bacterianas presentes en los diferentes sedimentos analizados, que puede dar indicios sobre la presencia de microorganismos que estén desarrollando procesos metabólicos de atenuación de contaminantes, aunque para la búsqueda de microorganismos concretos será necesario emplear otro tipo de técnicas más resolutivas.

3.2. Amplificación mediante PCR

Para la búsqueda de microorganismos relacionados con la degradación de atrazina se puede intentar realizar una amplificación mediante PCR de los genes involucrados en la ruta de degradación de atrazina (Figura 3). En este caso se emplearon 3 juegos de cebadores, complementarios a los genes AtzA (atrazina clorohidrolasa), AtzB (Hidroxidecloroatrazina etilaminohidrolasa) y AtzC (N-Isopropilamelida Isopropilaminohidrolasa), que son los primeros pasos en la ruta de degradación, hasta la formación de cianurato.

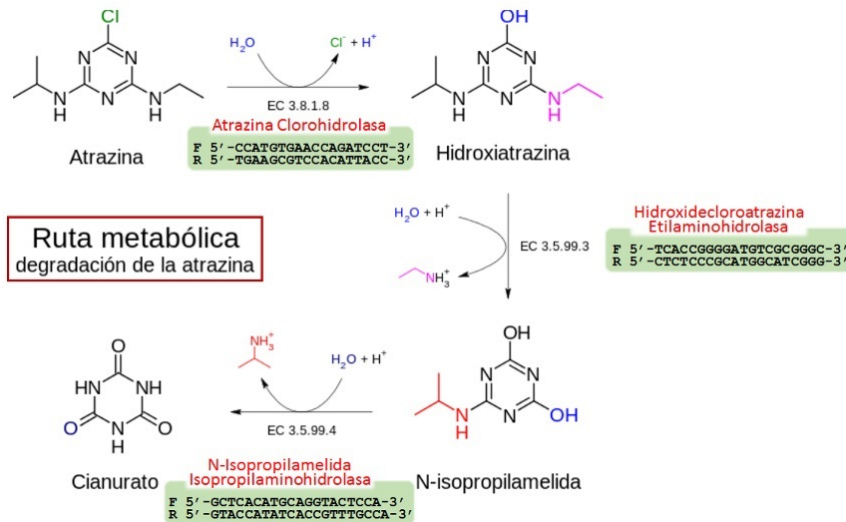


Figura 3. Ruta metabólica de degradación de la atrazina, con los cebadores empleados para la amplificación por PCR.

Los resultados obtenidos de la amplificación muestran distintos patrones en los sedimentos analizados (Figura 4). En algunos casos se observan bandas del tamaño adecuado, aunque deben ser verificadas mediante secuenciación, para asegurar que corresponden a los genes amplificados. En estos casos, será posible identificar la presencia de genes implicados en la degradación de la atrazina, si bien, será complicado la identificación del microorganismo debido a la alta conservación que presentan estos genes, por lo que no existen diferencias en la secuencia de ADN entre diferentes microorganismos.

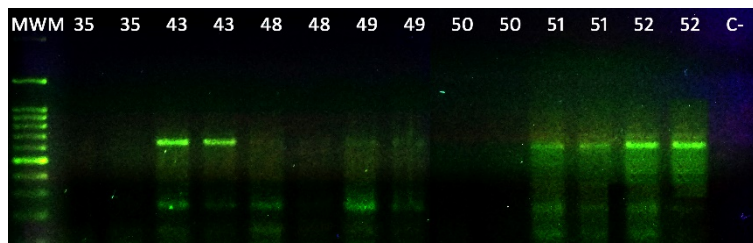


Figura 4. Ejemplo de amplificación con cebadores de AtzA. Las muestras se realizaron por duplicado.

En cualquier caso, los resultados obtenidos de la amplificación tampoco fueron concluyentes, puesto que no se observó el mismo patrón de bandas cuando se emplearon juegos diferentes de cebadores. Esto puede ser debido a la baja concentración de bacterias degradadoras de atrazina, que origina resultados poco repetitivos o ausencia de bandas amplificadas cuando se realiza la PCR. Para tener un resultado más concluyente será necesario

incrementar la concentración de bacterias degradadoras de atrazina mediante el crecimiento en medios de cultivo suplementados con atrazina.

4. Conclusiones

Los resultados obtenidos en relación al análisis metagenómico de las muestras de sedimentos de la Laguna de Pétrola analizados ofrecen información acerca de la presencia de organismos extremófilos que pueden participar en procesos de atenuación de contaminantes. Muchos de ellos están relacionados con el ciclo del nitrógeno, con algunos casos que pueden ser candidatos a realizar procesos de degradación de atrazina.

La amplificación por PCR de los genes implicados en la ruta metabólica de la atrazina ofreció resultados poco concluyentes debido a la falta de un patrón similar en los sedimentos analizados cuando se emplearon juegos diferentes de cebadores. En cualquier caso, será necesario confirmar los resultados obtenidos y profundizar en la búsqueda de microorganismos relacionados con estos procesos de degradación de contaminantes.

5. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos de investigación CGL2017-87216-C4-2-R del Programa Estatal de I+D+i (MINECO) y SBPLY/17/180501/000296 del Programa Regional de I+D+i de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha.

Referencias

1. Mahía J., Martín A., Carballas T., Raviña M.D. Atrazine degradation and enzyme activities in an agricultural soil under two tillage systems. *Science of the Total Environment*. 2007, 378, 187-194.
2. Bastos A.C., Magan N. *Trametes versicolor*: potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation*. 2009, 63, 389-394.
3. Vimal D., Saini S., Kristipati R.R., Chowdhuri D.K. Atrazine or bisphenol A mediated negative modulation of mismatch repair gene, *mlh1* leads to defective oogenesis and reduced female fertility in *Drosophila melanogaster*. *Chemosphere*. 2019, 225, 247-258.
4. Jiang Z., Zhang X., Wang Z., Cao B., Deng S., Bi M., Zhang Y. Enhanced biodegradation of atrazine by *Arthrobacter* sp. DNS10 during co-culture with a phosphorus solubilizing bacteria: *Enterobacter* sp. P1. *Ecotoxicology and Environmental Safety*. 2019, 172, 159-166.
5. Hong Y., Peng J., Zhao X., Yan Y., Lai B., Yao G. Efficient degradation of atrazine by CoMgAl layered double oxides catalyzed peroxy monosulfate: Optimization, degradation pathways and mechanism. *Chemical Engineering Journal*. 2019, 370, 354-363.
6. Valiente N., Menchen A., Carrey R., Otero N., Soler A., Sanz D., Gómez-Alday J.J. Sulfur recycling processes in a eutrophic hypersaline system: Pétrola Lake (SE, Spain). *Procedia Earth and Planetary Science*. 2017, 17, 201-204.
7. Valiente N., Carrey R., Otero N., Gutiérrez-Villanueva M.A., Soler A., Sanz D., Castaño S., Gómez-Alday J.J. Tracing sulfate recycling in the hypersaline Pétrola Lake (SE Spain): A combined isotopic and microbiological approach. *Chemical Geology*. 2017, 473, 74-89.
8. Valiente N., Carrey R., Otero N., Soler A., Sanz D., Muñoz-Martín A., Jirsa F., Wanek W., Gómez-Alday J.J. A multi-isotopic approach to investigate the influence of land use on nitrate removal in a highly saline lake-aquifer system. *Science of the Total Environment*. 2018, 631-632, 649-659.
9. De Souza M.L., Wackett L.P., Boundy-Mills K.L., Mandelbaum R.T., Sadowsky M.J. Cloning, characterization, and expression of a gene region from *Pseudomonas* sp. strain ADP involved in the dechlorination of atrazine. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995, 61, 3373-3378.
10. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Sjollem T.P., Kuenen J.G. *Thi alkalivibrio nitratireducens* sp. nov., a nitrate-reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from a soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2003, 53, 1779-1783.