



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE
CIENCIAS DE LA VIDA Y DE LA
NATURALEZA (ILACVN)**

**CIENCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGÍA Y
BIODIVERSIDAD**

**BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA MEDIANTE HONGOS DEL PARQUE
NACIONAL DO IGUAÇU**

SAMANTHA BEATRÍZ ESPARZA NARANJO

Foz do Iguaçu
2018



**INSTITUTO LATINOAMERICANO DE CIENCIAS
DE LA VIDA Y DE LA NATURALEZA (ILACVN)**

**CIENCIAS BIOLÓGICAS – ECOLOGÍA Y
BIODIVERSIDAD**

**BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA MEDIANTE HONGOS DEL PARQUE
NACIONAL DO IGUAÇU**

SAMANTHA BEATRÍZ ESPARZA NARANJO

Trabajo de Conclusión de Curso II presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana como requisito parcial para la obtención del título de grado en Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad.

Orientadora: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
Co-orientadora: Profa. Dra. Marcela Boroski

Foz do Iguaçu
2018

SAMANTHA BEATRÍZ ESPARZA NARANJO

**BIODEGRADACIÓN DE LA ATRAZINA MEDIANTE HONGOS DEL PARQUE
NACIONAL DO IGUAÇU**

Trabajo de Conclusión de Curso presentado al Instituto Latinoamericano de Ciencias de la Vida y de la Naturaleza de la Universidad Federal de la Integración Latinoamericana como requisito parcial para la obtención del título de grado en Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad.

BANCA EXAMINADORA

Orientador: Profa. Dra. Rafaella Costa Bonugli Santos
UNILA

Profa. Dra. Aline Theodoro Toci
UNILA

Prof. Dr. Michel Passarini
UNILA

Foz do Iguaçu, 12 de dezembro de 2018.

Dedico mi TCC a mis
padres, Lucía y Ángel, mis
amores más profundos y a
mi tesoro y fuerza, Leo.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradezco a mi profesora orientadora, Rafaella, por todos estos años de trabajo juntas. Mucha de mi formación la he recibido de usted y estoy muy agradecida por todo su apoyo en varios momentos de mi carrera académica, ya que siempre me extendió la mano para crecer y formarme en microbiología.

Agradezco a Cleto por la ayuda incondicional que he recibido. Cleto es una inspiración, ejemplo y modelo de investigador y profesor, siempre tendrá mi máxima admiración, respeto y gratitud. Además, Cleto es responsable por haber hecho realidad gran parte de este trabajo y, nuevamente, le agradezco por su ayuda.

Estoy inmensamente agradecida con Marcela por haberme permitido ser parte de su grupo de trabajo durante la ejecución de este proyecto, trabajar con usted me permitió crecer científicamente en un área de estudio completamente desconocida hasta entonces. Le agradezco por su paciencia, ayuda, orientación y por los buenos momentos compartidos.

Agradezco a la profesora Aline Toci y al profesor Michel Passarini por haber aceptado constituir parte de la banca examinadora.

Agradezco a mis familia, Lucía, Ángel, Anita y Paúl por permitirme crecer y dejarme volar hace cinco años. La persona que vuelve a casa no es la misma de hace cinco años y eso se los debo a ustedes, por su apoyo y amor incondicional. Gracias por permitirme descubrir de lo que soy hecha y de lo que soy capaz.

Estoy eternamente agradecida con Leonardo por todo su apoyo. Mi mejor amigo, mi familia en Foz, mi soporte, mi psicólogo y mi compañero de todas las batallas. Considero que gran parte de mis triunfos son suyos, así como este que se presenta a continuación. Le doy las gracias porque el día en que me gradúe como bióloga está por llegar y, sin duda, el es tan responsable como yo de eso.

Agradezco a mis amigos del curso, BIO 2014, sobre todo a Marina, Kristhy, Jair, Hemanueli y Mariana. Un inmenso gracias a todos por todos los buenos momentos compartidos, por todo lo que aprendimos juntos (académica y personalmente) y por hacer que la UNILA rompa fronteras cada día. Todo lo que nos llevamos de aquí es invaluable, comenzando por los fuertes lazos humanos que nos unen y que van a perdurar por siempre. La UNILA me permitió conocer gente maravillosa como ustedes y abrir los ojos hacia la realidad latinoamericana, solo me queda agradecer por eso.

Estoy agradecida con mis compañeros y amigos de laboratorio: Will (¡mi maestro!), Ana (mi compañera de batallas), Cristian, Aldo, Martha, Anabel, Jaque y João por todas las enseñanzas, ayuda, solidaridad y apoyo durante estos años en el caso de Will y, sobre todo, durante la ejecución de mi TCC. Fue placentero compartir y trabajar con gente talentosa y chévere.

Agradezco a todos el equipo DELABEN por siempre estar prestos a brindarme su ayuda, sobre todo Amanda, Gilson, Meiri y Priscila que fueron mis ángeles guardianes en varias ocasiones. Un

agradecimiento especial a Priscila por la ayuda en la manipulación del GC – MS, al inyectar las muestras y obtener los resultados.

Estoy agradecida con mis compatriotas Darwin, Jose, Shury, Pili, Angelito, Jonathan y Mafer, por la linda amistad que construimos y por todos los momentos amenos.

También quiero agradecer a toda la gente linda del Elenco Folclórico Latinoamericano, sobre todo a Diego, Pau, Mariana, Miguel, Anto, Gloria, Jackie, Dani y Liz, por toda la diversión en medio de tormentas académicas. Mi paso por el elenco fue la realización de un sueño de vida y ustedes fueron parte de eso, gracias. ¡¡Larga vida al elenco!!

*“La vida cotidiana en América Latina nos demuestra
que la realidad está llena de cosas extraordinarias”*
Gabriel García Márquez

ESPARZA - NARANJO, Samantha Beatríz. **Biodegradación de la atrazina mediante hongos del Parque Nacional do Iguaçu**. 2018. 65 Trabajo de Conclusión de Carrera (Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad) – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2018.

RESUMO

A lo largo de las últimas décadas, el uso indiscriminado de agrotóxicos en actividades agrícolas ha provocado que una gran porción de las cantidades aplicadas permanezca o se disemine en el suelo, agua superficial y subterránea de los ecosistemas asociados a los campos de cultivo, comprometiendo la salud de microorganismos, plantas, animales y el ser humano. La atrazina, un herbicida ampliamente utilizado para el control de maleza, presenta moderada persistencia ambiental y alta toxicidad, siendo necesaria la búsqueda de linajes microbianos para la biorremediación de ambientes contaminados por este agrotóxico. A pesar de que el alto contenido de hierro (Fe) presente en los suelos del Parque Nacional do Iguaçu (PNI) puede haber seleccionado microorganismos con potencial de biodegradación de agrotóxicos diferentes a los ya descritos, la diversidad microbiana del PNI es prácticamente desconocida. Así, este trabajo tiene como objetivo evaluar el potencial de biodegradación de atrazina por hongos del PNI, al definir un método de selección eficiente de hongos en base a su producción de biomasa y de lacasa en presencia de la atrazina, además de su capacidad para degradar el herbicida. Además, se buscó seleccionar a los aislados con el mayor potencial de degradación del herbicida y caracterizarlos usando técnicas morfológicas y moleculares. Para definir el método de selección, se determinó el peso seco del micelio, la cantidad de lacasa producida, midiendo el cambio de coloración provocado por la oxidación del sustrato enzimático ABTS en el espectrofotómetro y se cuantificó la atrazina (ATZ) y los metabolitos desisopropilatrazina (DIA) y desetilatrazina (DEA). Como método de preparo de muestra y análisis se utilizó la Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME), en conjunto con Cromatografía Gaseosa acoplada al Espectrómetro de Masas (GC - MS). No se pudo establecer un método de selección de hongos con potencial de degradar atrazina al no existir una relación entre degradación de la ATZ, producción de biomasa y producción de lacasa. Por tanto, se sometió a análisis cromatográficas a todos los hongos. En este estudio, el potencial de degradación de ATZ fue analizado en términos de formación de DEA, al conseguir diferenciar aislados con y sin esta capacidad. No obstante, se determinó que los hongos tienen capacidad para degradar ATZ y producir DIA, con un porcentaje que no difiere significativamente entre los aislados. Tampoco existe diferencia significativa entre los productores de DEA (aislados DF, IB, GW y GU). Estos cuatro fueron identificados usando características morfológicas, por la observación de estructuras reproductivas, y moleculares, al realizar el análisis filogenético con las secuencias de ADN ribosomal, de la región ITS-1 e ITS-4. GU y DF pertenecen al género *Fusarium*, GW presenta proximidad filogenética con el género *Fusarium* y *Aschersonia*, e IB no fue considerado para el análisis filogenético por la baja calidad de la secuenciación. Los organismos del género *Fusarium* se destacan por ser fitopatógenos y catalizan la ATZ a través de la retirada de los terminales n-alquilo, en este caso evidenciado por la formación de DEA. Con base en estos resultados, nuevos análisis cromatográficos serán realizadas para obtener el perfil metabólico, así como análisis de toxicidad de los productos generados, ya que los aislados son candidatos para consorcios microbianos que permitan alcanzar el objetivo de la biorremediación.

Palabras clave: biodegradación de pesticidas, lacasa, PNI, DIA, DEA

ESPARZA - NARANJO, Samantha Beatríz. **Atrazine Biodegradation by Fungi from Iguaçu National Park**. 2018. 65 Trabajo de Conclusión de Carrera (Ciencias Biológicas – Ecología y Biodiversidad) – Universidad Federal de la Integración Latinoamericana, Foz do Iguaçu, 2018

ABSTRACT

Over the last decades, the indiscriminate use of pesticides in agricultural activities has caused a large accumulation of these components in soil, surface water and groundwater of the ecosystems associated to crop fields, compromising the health of microorganisms, plants, animals and human beings. Atrazine, an herbicide widely used for weed control, has moderate environmental persistence and high toxicity, making it necessary to search for microbial strains for bioremediation of environments contaminated by this herbicide. Although the high iron (Fe) content associated with Iguaçu National Park (PNI) soils may have selected microorganisms with herbicide biodegradation potential different from those already described, PNI's microbial diversity is practically unknown. Thus, this work aimed to evaluate the potential of atrazine biodegradation by fungi from PNI, by using an efficient method of selection of fungi based on its biomass and laccase production in presence of atrazine, as well as, their herbicide degradation potential. Also, the isolates with the greatest herbicide degradation potential were selected, and they were characterized by morphological and molecular approaches. In the selection method, mycelium dry weight and laccase production amount were determined. The enzymatic production was measured by change in coloration caused by the oxidation of the ABTS enzyme substrate in a spectrophotometer. To quantify atrazine (ATZ) and its metabolites (deisopropylatrazine (DIA) and deethylatrazine (DEA)), Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME), associated to Gas Chromatography coupled to the Mass Spectrometer (GC-MS), was used as sample preparation and analysis method. It was not possible to establish a selection method of fungi with the potential to degrade atrazine since there is no relationship between ATZ degradation, biomass production, and laccase production. Therefore, chromatographic analyses were carried out in all fungi. In this study, the degradation potential of ATZ was analyzed by DEA formation, since it was possible to differentiate isolates with and without this capacity. However, fungi have the capacity to degrade ATZ and produce DIA, in a quantity that does not differ significantly among isolates. Also, there is no significant difference between DEA producers (isolates DF, IB, GW, and GU). These four were identified at the genus level using morphological (observation of reproductive structures) and molecular characteristics (phylogenetic analysis using ribosomal DNA sequences of ITS-1 and ITS-4 region). GU and DF belong to genus *Fusarium*, GW presents phylogenetic proximity to genus *Fusarium* and *Aschersonia*, and IB was not considered in the phylogenetic analysis due to low-quality sequence. The genus *Fusarium* strains stand out for being phytopathogens, and they catalyze ATZ through the removal of N-alkyl terminals, in this case, evidenced by DEA formation. Based on these results, new chromatographic analyzes will be carried out aiming at obtaining the metabolic profile, as well as toxic analyses of generated products. The isolates are candidates for microbial consortia that allow achieving the goal of bioremediation.

Key words: pesticide biodegradation, laccase, PNI, DIA, DEA.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN	12
2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 ATRAZINA	13
2.1.1 Degradación, biodegradación y enzimas ligninolíticas	21
2.2 DIVERSIDAD FÚNGICA DEL PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU.....	27
3 OBJETIVO	30
3.1 GENERAL:	30
3.2 ESPECÍFICOS:	30
4 METODOLOGÍA	31
4.1 OBJETO DE ESTUDIO – HONGOS	31
4.2 ETAPA 1: DEFINICIÓN DEL MÉTODO DE SELECCIÓN DE DEGRADADORES DE ATRAZINA	31
4.2.1 Análisis de la degradación de atrazina y producción de sus principales metabolitos por GC-MS	33
4.2.2 Evaluación confirmativa de la actividad de la lacasa	34
4.2.3 Evaluación de la producción de biomasa	36
4.3 ETAPA 2: SELECCIÓN DE LOS MEJORES DEGRADADORES DE ATRAZINA..	36
4.3.1 Análisis cromatográficos.....	36
4.3.2 Análisis estadísticos	37
4.4 ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LOS MEJORES DEGRADADORES	37
4.4.1 Caracterización morfológica	37
4.4.2 Caracterización molecular.....	38
5 RESULTADOS	39
5.1 ETAPA 1: DEFINICIÓN DEL MÉTODO DE SELECCIÓN DE DEGRADADORES DE ATRAZINA	39
5.2 ETAPA 2: SELECCIÓN DE LOS MEJORES DEGRADADORES DE ATRAZINA..	40
5.3 ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LOS MEJORES DEGRADADORES	45
6 DISCUSIÓN	48
6.1 ETAPA 1: DEFINICIÓN DEL MÉTODO DE SELECCIÓN DE DEGRADADORES DE ATRAZINA	48
6.2 ETAPA 2: SELECCIÓN DE LOS MEJORES DEGRADADORES DE ATRAZINA..	49
6.3 ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LOS MEJORES DEGRADADORES	51
7 CONCLUSIÓN	54
ANEXOS	55
REFERENCIAS	60

ÍNDICE DE SIGLAS

ATZ: atrazina

ABTS: 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)

CAS: Sociedad Americana de Química

CBS: Centro para el Análisis de Secuencias Biológicas

DEA: desetilatrizina

DEDIA: desetildeisopropilatrizina

DEHA: desetilhidroxiatrazina

DIHA: deisopropilhidroxiatrazina

DIA: desisopropilatrizina

DLLME: microextracción líquido-líquido dispersiva

EUA: Estados Unidos

EMBL-EBI: Instituto Europeo de Bioinformática

GC – MS: cromatografía gaseosa acoplada a la espectrofotometría de masas

HA: hidroxiatrazina

HPLC: cromatografía líquida de alto rendimiento

LiP: lignina peroxidasa

LM: límite máximo

MnP: manganeso peroxidasa

MA₂: medio de cultivo de malta y agar al 2%

NCBI: Centro Nacional para la Información Biotecnológica

PNI: Parque Nacional do Iguaçu

RA: área relativa

rpm: rotaciones por minuto

U: unidad de actividad enzimática

UE: Unión Europea

1 INTRODUCCIÓN

A lo largo de las últimas décadas, el uso indiscriminado de agrotóxicos en la agricultura ha provocado que una gran porción de las cantidades aplicadas permanezcan o se diseminen en el suelo, agua superficial y subterránea de los ecosistemas asociados, comprometiendo la salud de microorganismos, plantas, animales y el ser humano (MAQBOOL et al., 2016; SINGH et al., 2018).

La preocupación por la moderada persistencia ambiental y elevada toxicidad en bajas concentraciones de la atrazina (ATZ), un herbicida ampliamente utilizado en la agricultura para el control de malezas, ha impulsado estudios que aceleran su degradación en ambientes contaminados (SINGH; SINGH, 2016). De hecho, “la búsqueda de organismos degradadores de atrazina ha sido direccionada al aislamiento y caracterización de linajes [microbianos] de ocurrencia natural en medioambientes contaminados con el pesticida” (SENE *et al.*, 2010, v. 53, p. 488), en función de las características adaptativas de esos microorganismos frente a la presencia del pesticida. Sin embargo, ambientes donde la comunidad microbiana es prácticamente desconocida, como en el Parque Nacional do Iguaçu (PNI), una búsqueda por nuevos recursos genéticos es necesaria.

El PNI, el mayor remanente forestal del Bosque Atlántico, está básicamente formado por suelos arcillosos con alto contenido de hierro (Schobbenhaus et al, 2002). Esta variable ambiental puede haber propiciado la adaptación de microorganismos que puedan proporcionar ventajas biotecnológicas en relación a otros ya descritos.

De este modo, el estudio busco evaluar el potencial de biodegradación de atrazina por hongos del PNI, al definir un método de selección eficiente de hongos en base a su producción de biomasa y de lacasa en presencia de la atrazina, así como de su potencial para degradar el herbicida. Además, se busca seleccionar los aislados con el mayor potencial de degradación y caracterizarlos mediante técnicas morfológicas y moleculares.

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1 ATRAZINA

La atrazina (Figura 1) es un herbicida ampliamente utilizado en el cultivo de maíz (*Zea mays*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), sorgo (*Sorghum bicolor*), entre otras culturas, para combatir a la maleza de hoja ancha y otras hierbas en sus etapas de pre y, en varios casos, post-emergencia (HANSEN *et al.*, 2013; MOORE *et al.*, 2017; POTTER *et al.*, 2013). La molécula presenta baja solubilidad en agua, persistencia moderada a nula, baja volatilidad, alto potencial de lixiviación, moderada movilidad en suelos y bajo potencial de bioacumulación (Tabla 1) (HANSEN *et al.*, 2013; IUPAC, 2018).

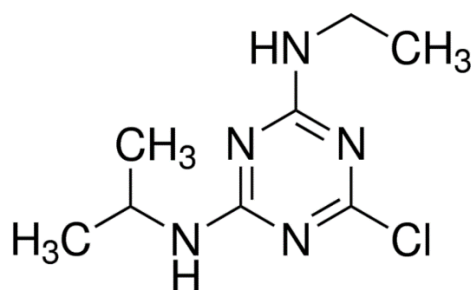


Figura 1: Representación molecular de la atrazina

Tabla 1: Propiedades físico-químicas de la atrazina

Parámetro	Especificación	Referencia
Nombre según IUPAC	2-Chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-1,3,5-triazine	(SINGH <i>et al.</i> , 2018)
CAS n°	1912-24-9	(HANSEN <i>et al.</i> , 2013)
Formula química	C ₈ H ₁₄ ClN ₅	(SINGH <i>et al.</i> , 2018)
Peso molecular (g mol ⁻¹)	215.69	(SINGH <i>et al.</i> , 2018)
Densidad (g cm ⁻³)	1.19	(SINGH <i>et al.</i> , 2018)
Punto de ebullición (°C)	Se descompone después de hervir	(IUPAC, 2018)
Presión de vapor (Pa)	3.8x10 ⁻⁵	(IUPAC, 2018)
Solubilidad (mg L ⁻¹) en agua a 25°C	35	(ROJAS <i>et al.</i> , 2013)
Constante de la ley de Henry (Pa m ³ mol ⁻¹)	1.09x10 ⁻⁷	(SINGH <i>et al.</i> , 2018)
Constante de disociación (Pka)	1.85	(NAM <i>et al.</i> , 2014)
Índice de potencial de lixiviación de Gus	3.20	(IUPAC, 2018)
Log k _{ow}	2.67	(NAM <i>et al.</i> , 2014)

Este herbicida, de la clase química de las triazinas, inhibe el proceso fotosintético (fotosistema II) en las plantas al ser absorbida por las raíces y hojas (HANSEN *et al.*, 2013;

HRAC, 2010; WSSA, 2017). Su efectividad para eliminar la maleza depende del tipo de maleza y de la resistencia asociada a ellas, siendo que registros de resistencia surgen a partir de los años 70 en todo el mundo, sobre todo en Estados Unidos (EUA) (ACKERMAN; WHITED; KNIGHT, 2014; HEAP, [2018?]).

La atrazina ha sido producida y comercializado globalmente a partir de los años 50, en una variedad de productos fabricados en base a este ingrediente activo, incluyendo fluidos, polvos y líquidos, y aplicada en combinación con otros herbicidas para mejorar su efectividad (ADAPAR, 2018; INOUE *et al.*, 2003; SALAZAR-LEDESMA *et al.*, 2018). La cantidad suministrada del ingrediente activo (atrazina) es establecida según el cultivo de interés y el tipo de suelo asociado (Tabla 2); sin embargo, en algunas ocasiones, la cantidad realmente aplicada está asociada al consumo total del producto adquirido, evitando dejar restos en los embalajes (NORTOX S/A, 2017; BRAUNS *et al.*, 2018). La aplicación de la atrazina se realiza posteriormente a la siembra o la cosecha (en plantas con más de una periodo de cosecha) del cultivo, en la época de pre y, en varios casos, post-crecimiento de la maleza alcanzando un volumen final de 200-400 L y de 400-800 L, respectivamente (NORTOX S/A, 2017). SALAZAR-LEDESMA *et al.* (2018) aplicaron el herbicida 2 días después de la siembra (inmediatamente antes de la primera irrigación) y aproximadamente 17 días posteriormente a la siembra, sugiriendo el tratamiento en pre y post-emergencia de la maleza.

Tabla 2: Cantidad de atrazina aplicada en diferentes cultivos según recomendaciones agronómicas

Cultivo	Dosis/Hectárea							
	Suelo Leve ^{a*}		Suelo Medio ^{a*}		Suelo Pesado ^{a*}		Suelo No Especificado ^b	
	I.A.** (kg)	P.C.** (L)	I.A. (kg)	P.C. (L)	I.A. (kg)	P.C. (L)	I.A. (kg)	P.C. (L)
Caña de azúcar	2,50	5,00	3,25	6,50	4,00	8,00	2,50 a 4,00	5,00 a 8,00
Maíz y sorgo	1,50	3,00	2,50	5,00	3,25	6,50	1,50 a 3,25	3,00 a 6,50

*El suelo leve es más arenoso, mientras el suelo pesado es más arcilloso.

**I.A.: ingrediente activo, P.C.: producto comercial.

Fuente: ATRAZINA, 2017^a; MAPA, 2014^b

Según IBAMA (2017a-f), en Brasil existe una tendencia al aumento del consumo de agrotóxicos entre el 2000 – 2016, siendo que el consumo del último año aproximadamente triplica al del primero. Además, la mayor cantidad de productos formulados vendidos a nivel de Brasil y Paraná fueron los herbicidas, con 322755,10 y 37803,82 toneladas de ingrediente activo, respectivamente. Entre ellos, la atrazina fue el cuarto ingrediente más vendido a nivel de país y de Paraná con 28615,69 y 3832,65 toneladas, respectivamente.

En base a que la presencia de atrazina en el medio ambiente representa un peligro

a la biodiversidad y a la salud humana, esta constituye una de las sustancias prioritarias en la política de aguas de EUA y la Unión Europea (EU) sobre la cual se realizaron la mayor cantidad de estudios científicos entre 2012-2017 y se identificó como el contaminante con la segunda mayor concentración en aguas superficiales y subterráneas a nivel mundial, con detección de hasta $136 \mu\text{g L}^{-1}$ (LERCH; BLANCHARD; THURMAN, 1998; UNIÓN EUROPEA, 2013; SOUSA et al., 2018). La atrazina también es detectada en el suelo, donde su comportamiento depende de una serie de factores como composición, características físico/químicas y afinidad (adsorción) a los componentes del sustrato, además de la influencia de la degradación, flujo de agua, etc. (Figura 2) (ANDLEEB *et al.*, 2016; HANSEN *et al.*, 2013; SALAZAR-LEDESMA *et al.*, 2018).

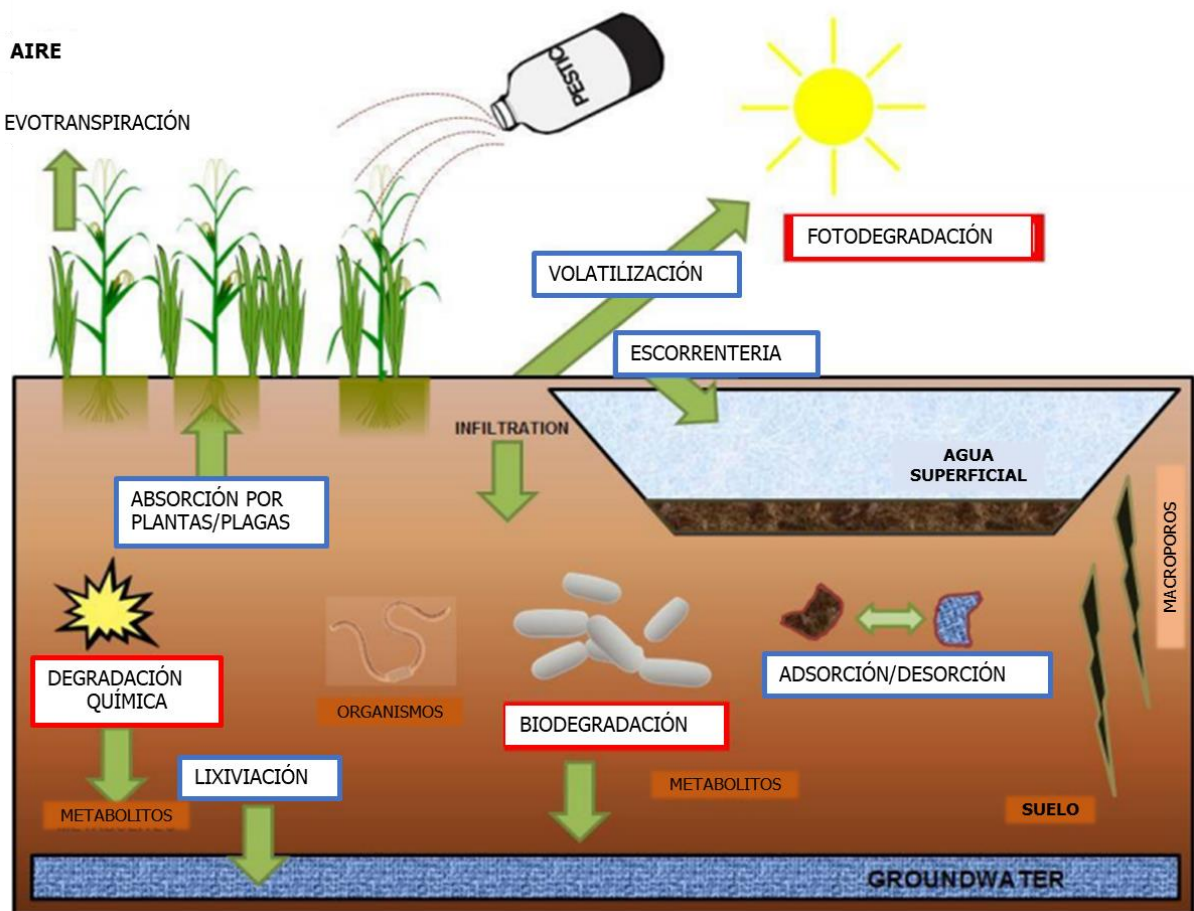


Figura 2: Ciclo de la atrazina en el medio ambiente

La vida media del agrotóxico en el suelo depende principalmente de la presencia de organismos degradadores, aunque también es influenciada por la disponibilidad de oxígeno, contenido de agua, tipo de suelo, profundidad, temperatura, concentración de atrazina, historia de aplicación y prácticas agrícolas (Figura 2); “en general, a medida que aumenta la temperatura

del suelo, aumenta la disponibilidad de oxígeno y cuando el contenido de agua se acerca a la capacidad del campo, se optimizan las condiciones de degradación de la atrazina” (KOSKINEN; CLAY, 1998, p 123)¹. Por ejemplo, en un suelo de superficie (70% de arcilla, 25% de limo y 5% de arena) sometido a 2 µg g⁻¹ de atrazina, 8% humedad y 20°C la vida media fue de 338 días (SMITH; WALKER, 1989).

Actualmente, la atrazina se clasifica como medianamente tóxica para el ser humano y muy peligrosa para el medio ambiente (NORTOX S/A, 2017), siendo que algunos de sus efectos sobre los seres vivos son conocidos (Tabla 3) y considerados en la elaboración de políticas públicas (SINGH *et al.*, 2018; WHO, 1996). “El uso del herbicida es restringido y prohibido en países de Europa, EUA y Australia, mientras que [...] en la mayoría de los países de Latinoamérica y El Caribe, su aplicación está permitida sin restricción alguna” (HANSEN *et al.*, 2013, v. 29, p. 68).

En este sentido, organizaciones mundiales, así como 28 países, han establecido límites máximos (LM) de su concentración en cuerpos de agua superficiales y, en algunos casos, subterráneos destinados al consumo humano; inclusive se establecen LM permisibles en sedimentos y para la remediación de suelos (HANSEN *et al.*, 2013; WHO, 2018). El LM del agua destinada al consumo humano es de los 0,1 µg L⁻¹ en UE y 3 µg L⁻¹ en EUA (UNIÓN EUROPEA, 1998; 2006; USEPA, 2009). En Costa Rica, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Perú, República Dominicana es de 2 µg L⁻¹, mientras que es de 3 µg L⁻¹ en Uruguay (DRPSA, 2003; CAPRE, 1994; COSTA RICA, 2005; MINISTERIO DE SALUD, 2011; HONDURAS *et al.*, 1995; REPUBLICA DOMINICANA, 2001; UNIT, 2010). Ecuador, al igual la World Health Organization (WHO), establece un LM de 100 µg L⁻¹ de atrazina y sus metabolitos (INEN, 2014; WHO, 2018). En Brasil, el LM de atrazina es de 2 µg L⁻¹ en aguas destinadas al consumo humano después de tratamiento simplificado/avanzado (CONAMA, 2005; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2011). Con respecto a las aguas subterráneas, el LM es de 2, 5 y 10 µg L⁻¹ en aguas destinadas al consumo humano, consumo animal e irrigación, respectivamente (CONAMA, 2008). Así, dependiendo de la legislación en cuestión el LM del agrotóxico permitido varia.

¹ KOSKINEN, W. C.; CLAY, S.A. Factors affecting atrazine fate in north central U.S. soils. **Rev. Environ. Contam. Toxicol.** 151, 1998. p. 123 (Traducción del autor).

Tabla 3: Toxicidad y efectos adversos de la atrazina en humanos, invertebrados acuáticos inferiores, vertebrados superiores y microorganismos del suelo

Grupo	Nombre científico	Nombre/categoría común	Mecanismo de toxicidad	Referencias
	-	Microbiota del suelo	Disminución de la biomasa microbiana hasta 63 días después de su aplicación	Bonfleur, et al. (2015)
Hongos	<i>Pluteus cubensis</i> , <i>Polyporus sp.</i> , <i>Gloeophyllum striatum</i> , <i>Pycnoporus sanguineus</i> .	Hongos basidiomicetos	Inhibición del crecimiento (43% <i>Pluteus cubensis</i> y 71,9% <i>Polyporus sp.</i>), clareamiento de las colonias (<i>Gloeophyllum striatum</i>), reducción del adensamiento micelial (<i>Pycnoporus sanguineus</i>).	Henn (2009)
	<i>Raphidocelis subcapitata</i>	Micro alga	Disminución en el rendimiento de PSII	Baxter et al. (2016)
Algas	<i>Selenastrum capricornutum</i>	Alga verde	Inhibición del crecimiento poblacional de algas (Recuentos de células IC50), porcentaje de letalidad (citometría de flujo derivada LC50) e inhibición del transporte de electrones fotosintéticos	Caux et al. (1996)
	<i>Diporeia sp.</i>	Micro alga	El proceso fotosintético, la división celular, la síntesis de lípidos fueron los más afectados	Ma et al. (2006)
	<i>Eisenia fétida</i>	Gusano rojo	La atrazina era más tóxica para la lombriz que para el clorotolurón. La combinación mostró un efecto sinérgico. La actividad de SOD mostró incremento.	Xu et al. (2006)
Anélidos	<i>Nsukkadrilus funmie</i>	Lombriz de tierra nigeriana	Daño de la capa clológica y del tejido epitelial; vacuolaciones prominentes y células picnóticas	Oluah et al. (2016)
	<i>Corbicula fluminea</i>	Almeja de agua dulce	Llevando a la peroxidación de lípidos	Dos-Santos; Martinez (2014)
Moluscos	<i>Crassostrea gigas</i>	Ostra japonesa	Efectos perjudiciales sobre la glándula digestiva mediante la modulación de parámetros moleculares y bioquímicos importantes	Lee et al. (2017)
	<i>Chironomus tentans</i>	Mosquito	No es muy tóxico en niveles aún más altos, pero la combinación con clorpirifos, metilparatión, malatión disminuye la CE50	Belden and Lydy (2001)

Grupo	Nombre científico	Nombre/categoría común	Mecanismo de toxicidad	Referencias
Artrópodos	<i>Daphnia magna</i>	Pulgas de agua	El efecto interactivo de los tres pesticidas fue sinérgico y tiene un efecto negativo sobre el hígado, los riñones, etc.	Kungolos et al. (1999)
	<i>Neohelice granulata</i>	Cangrejo estuarino	Disminución significativa del contenido de glucógeno y disminución significativa del contenido de proteínas vitelogeninas en el ovario	Silveyra et al. (2017)
	<i>Drosophila melanogaster</i>	Mosca de la fruta	Reduce la tasa de apareamiento, el número de progenie y la capacidad de fertilización competitiva; también altera la expresión génica y la producción de proteínas	Vogel et al. (2015)
	<i>D. melanogaster</i>	Mosca de la fruta	La exposición a la atrazina reduce la tasa de pupación, la tasa de emergencia y la longevidad del adulto	Marcus; Fiumera (2016)
	<i>Hyalella azteca</i>	Scud	La mortalidad significativa de H. azteca 96 h ocurrió dentro de las primeras 2 h de enmienda en el sitio de enmienda aguas arriba	Ralston-Hooper et al. (2009)
Anfibios	<i>Rana pipiens; Bufo americanus</i>	Rana leopardo; sapos americanos	Las larvas de anfibios mayores eran más sensibles. La toxicidad de la mezcla 50:50 de atrazina y alaclor fue mayor que la del aditivo	Howe et al. (1998)
	<i>Lithobates catesbeianus</i>	Rana toro	Efecto pesimista sobre los parámetros bioquímicos, la peroxidación lipídica y la supervivencia en renacuajos	Dornelles; Oliveira (2014)
	<i>Xenopus. Laevis</i>	Rana africana de uñas	Disminución de los niveles de lípidos séricos y enzimas hepáticas	Hayes et al. (2002)
Reptiles	<i>Trachemys scripta</i>	Jicotea elegante	Reducción del complemento sérico y actividades de la lisozima, reducción del número de leucocitos y de su actividad fagocítica	Soltanian (2016)
	<i>Rhamdia quelen</i>	Cascudo	Los cambios histopatológicos en el hígado revelaron infiltración de leucocitos, vacuolización de hepatocitos como áreas de esteatosis y necrosis, lo que llevó a los niveles de índice de lesión elevados en todas las concentraciones probadas;	Mela et al. (2013)

Grupo	Nombre científico	Nombre/categoría común	Mecanismo de toxicidad	Referencias
Peces	<i>Channa punctatus</i>	Cabeza de Serpiente	el proceso de osmorregulación se alteró y las branquias mostraron cambios en las células pavimentosas y las células de cloruro Tasa significativa de micronúcleos y anomalías nucleares	Nwani et al. (2011)
	<i>Tor grypus</i>	Shabout	Los parámetros hematológicos como hemoglobina, hematocrito y glóbulos rojos se redujeron significativamente	Zadeh et al. (2016)
	<i>Plotosus lineatus</i>	Chipiron	Inhibidor de la enzima, afecta el metabolismo hepático y produce daño genotóxico a diferentes tipos de células	Santos; Martinez (2012)
	<i>Ctenopharyngodon</i>	Carpa herbívora	Disminución en los niveles de proteína total y albúmina sérica	Khan et al. (2016a, b)
	<i>Oreochromis niloticus</i>	Tilapia	Tasa significativa de micronúcleos y anomalías nucleares	De Campos et al. (2008)
	<i>Cyprinus carpio</i>	Carpa común	Efecto de atrazina y clorpirifos sobre los niveles de ARNm de HSP70 y HSC70 en hígado, cerebro, riñón y branquias de la carpa común	Xing et al. (2013)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Trucha arcoiris	La trucha arcoiris parece ser menos sensible que las larvas de anfibios	Howe et al. (1998)
	<i>Ictalurus punctatus</i>	Pez gato americano	El bagre de canal parecía ser menos sensible que las larvas de anfibios	Howe et al. (1998)
	<i>Danio rerio</i>	Pez zebra	Influencia sobre los marcadores de estrés oxidativo y la enzima desintoxicante	Blahová et al. (2013)
	<i>Prochilodus lineatus</i>	Madrilla	Inhibidor enzimático, que altera el metabolismo hepático y produce daño genotóxico a diferentes tipos de células	Santos; Martinez (2012)
	<i>Danio rerio</i>	Pez zebra	Altera las redes de hormonas a través de la convergencia de la actividad de NR5A y la señalización de AMPc, para alterar potencialmente el desarrollo y funcionamiento endocrinos normales en vertebrados inferiores y superiores	Suzawa; Ingraham (2008)
<i>Caspian kutum</i>	Pescado blanco de Caspio	Función de respiración de las branquias y regulación iónica de los alevines afectados por tejido dañino, células pavimentosas e ionocitos	Khoshnood et al. (2015)	

Grupo	Nombre científico	Nombre/categoría común	Mecanismo de toxicidad	Referencias
Roedores	<i>Rattus norvegicus</i>	ratas Wistar machos	Afecta a ambas células germinales ya que reduce la motilidad y el recuento de espermatozoides en ratas macho	Victor-Costa et al. (2010). Pogrmic et al. (2009)
			Inhibe la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), que disminuye la secreción de LH que puede conducir a un aumento de los abortos en machos	Stoker et al. (2002)
	<i>Mus musculus</i>	Ratones machos	La atrazina interfiere con la meiosis normal, que afecta la producción de espermatozoides	Gely-Pernot et al. (2015)
	<i>Mus musculus</i>	Ratones	La atrazina conduce al estrés oxidativo y alteraciones en la homeostasis del calcio que induce inmunotoxicidad	Gao et al. (2016)
	<i>Rattus norvegicus</i>	Ratas Sprague-Dawley machos	Las células no dopaminérgicas responden y el efecto inductor de la hipoactividad	Rodriguez et al. (2017)
		Mujeres posmenopáusicas	Efectos disruptivos endocrinos	Inoue-Choi et al. (2016)
Primates	<i>Homo sapiens</i>	Hepatocitos primarios humanos	Exposiciones cortas y crónicas conducen a un impacto celular en hepatocitos primarios humanos y células HepaRG	Nawaz et al. (2014)
			Induce la apoptosis de células de neuroblastoma humano SH-SY5Y a través de la regulación de la relación Bax / Bcl-2 y vía dependiente de caspasa-3	Abarikwu; Farombi (2015)
		Neuroblastoma humano	Induce que la expresión de la aromatasa es dependiente de SF-1 y disruptor endocrino	Fan et al. (2007)
			Interrumpe el control hipotalámico de la función pituitaria-ovárica	Cooper et al. (2000)
			Induce células de neuroblastoma dopaminérgico humano SH-SY5Y a través de la activación microglial	Ma et al. (2015)

Adaptado de: SINGH *et al.*, 2018

Se han detectado agrotóxicos y sus productos de degradación en agua potable, ya que los procesos de potabilización convencionales no remueven ninguna de estas moléculas eficientemente (COELHO; BERNARDO, 2017). En varios municipios de Paraná, así como en otros estados, la atrazina supera el LM permitido en los sistemas de abastecimiento de agua, siendo necesario adoptar medidas que garanticen la calidad del agua bajo los estándares brasileños de potabilidad (MACHADO *et al.*, 2016; MONTAGNER; VIDAL; ACAYABA, 2017; SODRÉ *et al.*, 2018).

2.1.1 Degradación, biodegradación y enzimas ligninolíticas

En condiciones de campo, la atrazina es degradada mediante procesos químicos y biológicos (SALAZAR-LEDESMA *et al.*, 2018). La degradación química sucede por hidrólisis o fotólisis (radiación ultravioleta, visible o infrarroja), mientras que la biodegradación (procesos biológicos) está asociada a bacterias, hongos y plantas, cuando el metabolismo de estos seres vivos promueve la descomposición parcial o mineralización total del herbicida (FAN; SONG, 2014). A pesar de que varios estudios revelan que la fitodegradación (biodegradación mediada por plantas) es un mecanismo independiente para la catálisis de la atrazina, la actividad microbiana es el mecanismo más importante para su descomposición en el suelo (FAN; SONG, 2014; SINGH; SINGH, 2016).

La utilización de la capacidad degradativa de organismos, en este caso microorganismos, o sus enzimas derivadas, al convertir compuestos recalcitrantes en productos no tóxicos, durante procesos de recuperación de ambientes contaminados es considerada como biorremediación (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016). El empleo de la microbiota como estrategia para la biorremediación de suelos contaminados con atrazina es impulsado debido a la gran cantidad de microbios degradadores descritos, bajo costo en relación a otras técnicas e inocuidad medioambiental (KARIGAR; RAO, 2011; SINGH; SINGH, 2016).

La tolerancia de los microorganismos a altas concentraciones del xenobiótico es un prerrequisito esencial y una medida indirecta de su capacidad degradativa, así se ha buscado aislar y caracterizar linajes capaces de metabolizar la atrazina en ambientes contaminados con este agrotóxico (SENE *et al.*, 2010). Aún más, el empleo de organismos en procesos de biorremediación requiere comprobar su capacidad para disminuir la concentración inicial del contaminante y producir elevada cantidad de enzimas de interés, así como evaluar los metabolitos producidos, a fin de asegurar la disminución de toxicidad mediante la

biorremediación (MORENO et al., 2004; HENN, 2009).

Procariotas como eucariotas encuentran en la atrazina una fuente de nutrientes, especialmente como fuente de nitrógeno (ENTRY; MATTSON; EMMINGHAM, 1993; SENE et al., 2010) y carbono (SHAPIR *et al.*, 2007), consecuentemente la disponibilidad de fuentes preferenciales de estos compuestos puede afectar negativamente la utilización del agrotóxico (SENE et al., 2010). Además de la propia presencia de los degradadores (CRAWFORD; SIMS; RADOSEVICH, 1998), entre otros factores que influyen la biodegradación se pueden mencionar la dosis aplicada del herbicida (MORENO et al., 2007) y las condiciones fisicoquímicas del suelo (ANDLEEB et al., 2016).

La degradación microbiana de la atrazina, formando diferentes metabolitos (Tabla 4), puede ser dividida en dos etapas (Figura 3) (HANSEN *et al.*, 2013; SINGH *et al.*, 2018; ZENG *et al.*, 2017). En la primera la atrazina se transforma en ácido cianúrico, mediante vías hidrolíticas u oxidantes-hidrolíticas que remueven el cloruro y las cadenas laterales N-alquilo de la molécula (SINGH; SINGH, 2016; SINGH et al., 2018). En esta vía I, los productos intermediarios hidroxiatrazina (HA), deisopropilatrazina (DIA) y desetilatrazina (DEA) son producidas por especies fúngicas y bacterianas (SINGH et al., 2018). En la segunda etapa, principalmente catalizada por bacterias, el anillo del ácido cianúrico es quebrado por hidrólisis consecutiva en biuret, alofanato y amonio y dióxido de carbono (SINGH; SINGH, 2016).

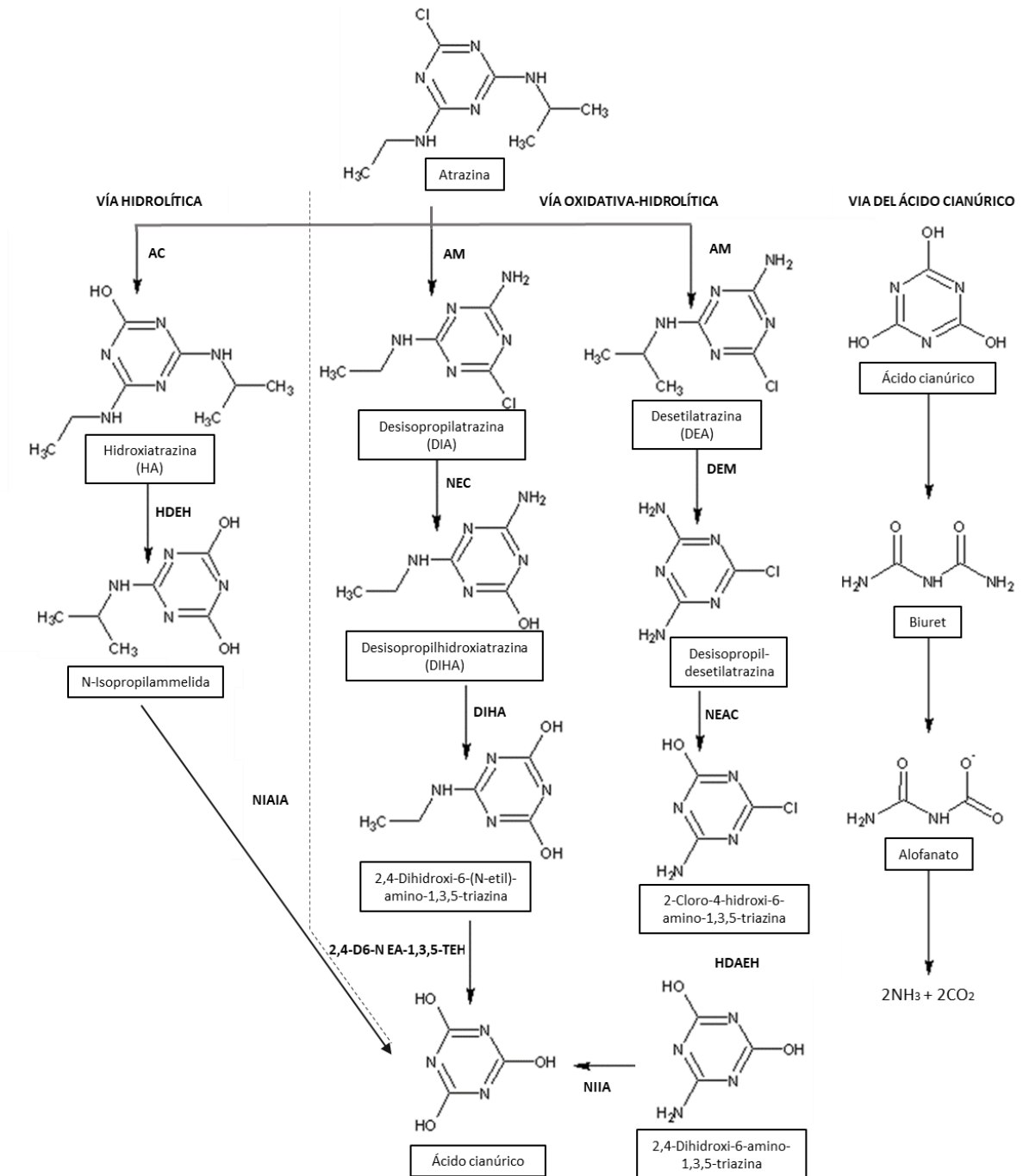
La mayor parte de vías metabólicas de mineralización de la atrazina se han elucidado a partir de bacterias y a pesar de que especies fúngicas han demostrado aptitud para degradarla - al producir ligeras transformaciones en la molécula mediante el complejo enzimático extracelular-, su actividad catalítica aún no es claramente comprendida (GIANFREDA; RAO, 2004; FAN; SONG, 2014). Esto se debe a que a partir de 1994 la degradación de atrazina se ha investigado ampliamente en bacterias (YANZE-KONTCHOU; GSCHWIND, 1994), entre ellas *Pseudomonas sp.* cepa ADP es capaz de mineralizar el agrotóxico al utilizarlo como única fuente de nitrógeno, mediante las enzimas codificadas por los genes *atzABCDEF* del plásmido pADP-1 (MARTINEZ et al., 2001; SINGH; SINGH, 2016). De modo general, los genes codificantes de enzimas catalíticas de la atrazina (*atzABCDEF* y *trzNDF*), revelan un origen único y reciente al ser altamente conservados y su dispersión transferencia horizontal, al situarse en plásmidos autotransmisibles, ha permitido su amplia distribución a nivel mundial y su identificación en especies de los filos Actinobacteria, Proteobacteria, Firmicutes y Bacteroidetes (KRUTZ et al., 2010); aún más, combinaciones

enzimáticas diferentes diversifican las estrategias microbianas para la degradación del herbicida (DEVERS; ROUARD; MARTIN-LAURENT, 2007).

Tabla 4: Propiedades físicas y químicas de los principales metabolitos de degradación de la atrazina

Nombre general	Nombre de IUPAC	Fórmula química	Solubilidad en agua (mg L ⁻¹)	Log P (25 °C)	Densidad (g cm ⁻³)	Ley de Henry (Pa m ⁻³ mol ⁻¹)
Desetilatrastina (DEA)	2-Amino-4-isopropylamino-6-chloro-s-triazine	C ₆ H ₁₀ ClN ₅	2700	1.90	1.38	3.55 x 10 ⁻⁷
Desisopropilatrastina (DIA)	6-chloro-N-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine	C ₅ H ₈ ClN ₅	-	1.19320	1.455	-
Hidroxiatrastina (HA)	4-(Ethylamino)-2-hydroxy-6-(isopropylamino)-1,3,5-triazine	C ₈ H ₁₅ N ₅ O	5.9	2.09	1.3	6.36 x 10 ⁻⁸
N-Isopropylammelide	6-(Propan-2-ylamino)-1H-1,3,5-triazine-2,4-dione	C ₆ H ₁₀ N ₄ O ₂	33	-0.47500	1.51	-
Biuret	Imidodicarbonic diamide	C ₂ H ₅ N ₃ O ₂	20	0.52490	1.432	-
Allophanate	Urea-1-carboxylate	C ₂ H ₃ N ₂ O ₃ ⁻	Insoluble	0.23740	1.581	-
Ammelide	6-Amino-1,3,5-triazine-2	C ₃ H ₄ N ₄ O ₂	Insoluble	-0.55380	1.573	-
2-Chloro-4-hydroxy-6-amino-1,3,5-triazine	2-Chloro-4-hydroxy-6-amino-1,3,5-triazine	C ₃ H ₃ Cl ₄ O	-	-0.01830	2.1	-
Ácido cianúrico	1,3,5-Triazine-2,4,6(1H,3H,5H)-trione	C ₃ H ₃ N ₃ O ₃	2000	-2.24850	2.5	8.7 X 10 ⁻¹⁵

Fuente: SINGH *et al.*, 2018

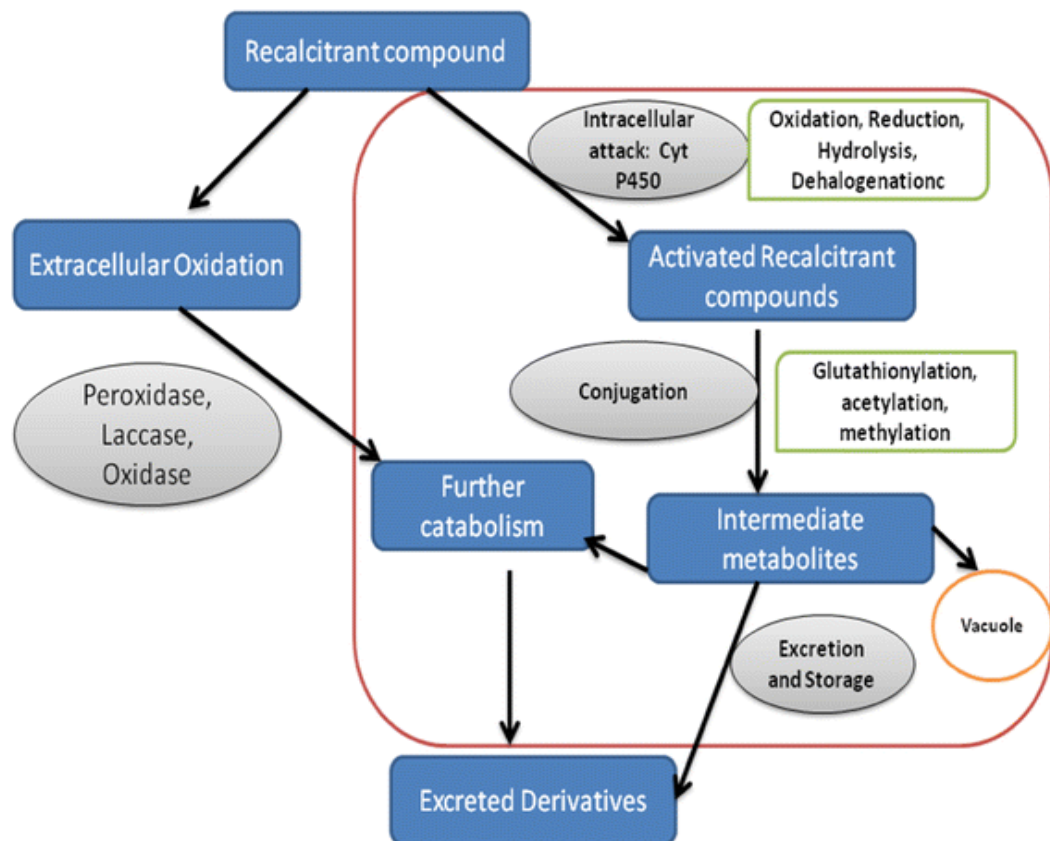


Adaptado de: HANSEN et al., 2013; SINGH et al., 2018; ZENG et al., 2017

Figura 3: Vías de mineralización de la atrazina. Izquierda. Pasos enzimáticos que catalizan la conversión de atrazina al intermediario común ácido cianúrico. Derecha: vía de degradación del ácido cianúrico. Enzimas que participan en las vías: AC atrazina clorohidrolasa, AM atrazina monooxigenasa, HDEH hidroxil decloroatrizona etilaminohidrolasa, NEC N-etilamino clorohidrolasa, DEM desetilatrizona monooxigenasa, NIAIA N-isopropilammelida isopropilaminohidrolasa, DIHA deisopropilhidroxiatrizona aminohidrolasa, NEAC N-etilammelina chlorohidrolasa, 2, 4 D6 NEA 1, 3, 5 TEH = 2, 4-dihidroxi-6- (N'-etil) amino-1, 3, 5-triazina etilaminohidrolasa, HDAEH hidroxidecloro atrizona etilaminohidrolasa, IAIA N-isopropilammelida isopropilamidohidrolasa.

Se considera que los hongos son responsables por la N-dealquilación de las cadenas laterales de la atrazina, abriendo camino para la degradación bacteriana del anillo heterocíclico

(KAUFMAN; BLAKE, 1970; LEVANON, 1993; MARINHO et al., 2017; SINGH et al., 2018). A pesar de que los principales productos de transformación producidos por hongos fueron desisopropilatrazina (DIA) y desetilatrazina (DEA), diferencias cualitativas y cuantitativas están asociadas a los degradadores (KAUFMAN; BLAKE, 1970; MASAPHY et al., 1993), quienes emplean diversas enzimas catalíticas, por ejemplo peroxidasa (Figura 4), y cofactores asociados (RABINOVICH; BOLOBOVA; VASIL, 2004).



Fuente: DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016

Figura 4: Mecanismos adoptados por hongos para la biorremediación de compuestos tóxicos y recalcitrantes. La lacasa, peroxidasa y oxidasa representan el sistema enzimático extracelular, mientras que el citocromo P450 monooxigenasa es parte del complejo enzimático intracelular.

En comparación a las bacterias, los hongos filamentosos sobresalen como agentes de biorremediación por su alto potencial de degradación asociado a la gran área superficial que llegan a cubrir las redes miceliales, en donde se translocan factores esenciales para el crecimiento y catálisis de sustancias recalcitrantes, la producción extracelular de enzimas catabólicas con amplia especificidad de sustrato, la alta supervivencia de esporos bajo condiciones ambientales desfavorables y la independencia de usar contaminantes como sustratos de crecimiento (HARMS; SCHLOSSER; WICK, 2011; FAN; SONG, 2014). A pesar

de que los hongos tienen la capacidad de degradar pesticidas empleando sistemas enzimáticos intra y extracelulares (Figura 4) (DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016), el mayor potencial para la biorremediación de los hongos de la pudrición blanca está asociado a las enzimas del complejo ligninolítico extracelular, o enzimas ligninolíticas, constituyéndose como moléculas de importancia biotecnológica e industrial (GAGO-FERRERO et al., 2012; DURAIRAJ et al., 2015). Inclusive la asociación de hongos y bacterias en consorcios microbianos es otra estrategia para la degradación de los pesticidas (MAQBOOL et al., 2016).

El complejo ligninolítico extracelular de amplia especificidad de sustrato, compuesto principalmente por lacasa, lignina peroxidasa (LiP) y manganeso peroxidasa (MnP), permite que su actividad degradativa no sea exclusiva sobre residuos lignocelulósicos de ocurrencia natural, sino que cataliza una serie de compuestos recalcitrantes, como la atrazina (GAGO-FERRERO et al., 2012; FAN; SONG, 2014; DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016). Estas enzimas son ampliamente encontradas en la naturaleza, en animales, plantas, hongos y bacterias (SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018).

Las lacasas son denominadas multicobroxidasas por poseer 4 átomos de cobre distribuidos en su sitio activo, el cobre funciona como cofactor enzimático y el oxígeno molecular como cosustrato, al oxidar compuestos fenólicos, no fenólicos y aromáticos, con la concomitante reducción de O₂ en H₂O (MINUSSI; PASTORE; DURA, 2007; HENN, 2009; DESHMUKH; KHARDENAVIS; PUROHIT, 2016; SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018). Estas enzimas, producidas intra y extracelularmente (YAROPLOV et al., 1994), son las mayores responsables por la catálisis de lignina en la materia orgánica en descomposición y, gracias a su actividad enzimática no específica, se registra su acción sobre hidrocarburos aromáticos policíclicos (PHAs) (WU et al., 2013), pesticidas (REZENDE et al., 2005), colorantes (BONUGLI-SANTOS; DURRANT; SETTE, 2010), entre otros tipos de compuestos. Además, las lacasas son consideradas como agentes de biorremediación por su estabilidad en medio extracelular y la facilidad de producirlas en gran escala (BALDRIAN, 2006; HENN, 2009).

La LiP y MnP son hemoproteínas que requieren de los cosustratos peróxido de hidrógeno y manganeso, respectivamente, además de mediadores en el caso de las LiP, para oxidar compuestos xenobióticos en radicales fenólicos poco solubles y fácilmente precipitables (SHARMA; DANGI; SHUKLA, 2018). Las LiP resaltan entre las peroxidases por su elevado potencial de oxidorreducción, en función de su relativa inespecificidad de sustrato

(GIANFREDA; RAO, 2004).

A pesar de que autores sostienen que la producción de las enzimas ligninolíticas sucede durante el metabolismo secundario bajo condiciones de limitación de nutrientes (BUMPUS; BROCK, 1988; MIR-TUTUSAUS et al., 2018), otros estudios revelan que la producción enzimática es influenciada por factores distintos e independientes (HENN, 2009). Entre estos factores se pueden mencionar: composición del medio de cultivo (YUECHUN et al., 2010), temperatura (IKEHATA; BUCHANAN; SMITH, 2004), pH (YUECHUN et al., 2010), presencia de sustrato o inductores específicos (IKEHATA; BUCHANAN; SMITH, 2004) y humedad del suelo (BASTOS; MAGAN, 2009).

La introducción de potenciales biorremediadores requiere su adaptación a los componentes bióticos y abióticos presentes en el nuevo local (KULSHRESHTHA; MATHUR; BHATNAGAR, 2014). En este sentido, es necesario comprender la relación entre la degradación fúngica de pesticidas y los cambios en las características físico químicas del ambiente, así como distinguir cuando se afectan las propiedades del contaminante o a la fisiología del hongo (MAQBOOL et al., 2016). Por ejemplo, la baja biodisponibilidad o accesibilidad al contaminante y preferencia de los hongos por fuentes de nutrientes diferentes al herbicida conllevan a una limitada biodegradación del contaminante (MAQBOOL et al., 2016). En los últimos años, la aplicación de enzimas libres, en lugar de la microbiota, y las transformaciones genéticas de hongos buscan mejorar los procesos de biorremediación basados en hongos (SUTHERLAND et al., 2004; HE et al., 2014).

2.2 DIVERSIDAD FÚNGICA DEL PARQUE NACIONAL DO IGUAÇU

El PNI, creado en 1939 por el Decreto-Ley Federal nº 1.035, abarca un perímetro de 420 km y un área de 185262,5 ha entre las coordenadas 25°05' hasta 25°40' S y 54°30' hasta 54°40' O (SALAMUNI *et al.*, 2002). Su gestión está a cargo del Instituto Chico Mendes de Conservación de la Biodiversidad. A partir de 1986, es considerado Patrimonio Natural de la Humanidad por la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), en base a la gran dimensión y excepcional belleza escénica de las Cascadas de Iguazu y su rica biodiversidad en el remanente forestal protegido más grande del Bosque Atlántico, junto con el área del Parque Nacional Iguazú de Argentina (UNESCO, 2018).

Según SALAMUNI *et al.* (2002) el área de PNI presenta dos dominios geotectónicos: dominio de las efusivas volcánicas y dominio de las coberturas recientes. El primero está constituido de litotipos volcánicos basálticos generalmente de composición básica, asociados a esporádicas efusivas ácidas e intermediarias, que cubren prácticamente toda la extensión del PNI, originando suelos argilosos y ferralíticos; mientras que las coberturas recientes, de distribución restringida, corresponden al substrato volcánico propiamente dicho (material aluvionar, coluvionar y material de alteración *in situ*) (SALAMUNI *et al.*, 2002). Los suelos derivados de rocas eruptivas identificados en el área del PNI son latosol morado, tierra morada, suelos hidromórficos y suelos litolíticos, siendo que el alto contenido de minerales está asociado a latosol morado (hierro, aluminio, titanio y manganeso) y a la tierra roja (hierro, aluminio y magnesio) (EMBRAPA, 1984; IBAMA, 1999).

El clima de la región del PNI, en base a la clasificación de clima global de Koppen, es subtropical húmedo o mesotermico (Cfa), caracterizado por una pluviosidad superior a 900 mm durante todo el año, sin una estación seca típicamente definida, y temperatura media anual entre 21 °C y 22 °C (CAVIGLIONE *et al.*, 2000; IBAMA, 1999). En respuesta a las características del clima, suelos y temperatura, las formaciones vegetales presentes en el PNI son Bosque Estacional Semidecidual con el 20% - 50% de árboles que pierden las hojas durante el invierno, Bosque Ombrófilo Mixto con presencia de araucaria y Formaciones Pioneras de Influencia Fluvial en zonas periódicamente saturadas de agua en las épocas de mayor índice pluviométrico (IBAMA, 1999).

La diversidad morfológica y funcional de hongos del PNI es prácticamente desconocida. WRIGHT y WRIGHT (2005) identificaron 375 especies fúngicas, contenidas en siete géneros en el Parque Nacional Iguazú de Argentina. DUQUE CASTAÑO (2016) en el Trabajo de Conclusión de Curso titulado “Efecto De Borde En Hongos De Un Bosque Atlántico Semideciduo” determinó que el efecto de borde artificial es negativo sobre la riqueza y neutro sobre la composición de hongos del PNI, al aislar y preservar 366 morfotipos, de los cuales 50 fueron identificados a nivel de división, familia o género. De los 366 morfotipos, 69, 48 exclusivos de interior del parque (500 metros) y 21 exclusivos del borde, se catalogaron como potenciales degradadores de lignina - en el ensayo cualitativo que usó el reactivo Guayacol (2-methoxyphenol) como inductor enzimático y como indicador de la capacidad ligninolítica de los hongos -, al evidenciar un cambio de coloración (marrón oscuro) en el medio de cultivo (Figura 5). Entre los aislados, muchos se caracterizaron como pertenecientes a los géneros

Trichoderma y *Fusarium*. A pesar de la diferencia numérica de potenciales degradadores, no existió diferencia significativa sobre la riqueza de hongos con potencial ligninolítico entre el borde y el interior forestal estudiado (DUQUE CASTAÑO, 2016). Con base en estos resultados, en el presente estudio se evaluó el potencial de degradación de atrazina por los hongos del borde que presentaron potencial ligninolítico.



Fuente: DUQUE (2016)

Figura 5: Verso de placa de un hongo del género *Fusarium* reactivo en etapas avanzadas de crecimiento.

3 OBJETIVO

3.1 GENERAL:

Evaluar el potencial de biodegradación de atrazina por hongos del Parque Nacional do Iguaçu

3.2 ESPECÍFICOS:

- Definir un método de selección eficiente de hongos con potencial de degradación de atrazina a través de la evaluación del crecimiento micelial de los hongos y la producción de lacasa en presencia del herbicida
- Determinar la biodegradación del herbicida mediante Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME), en conjunto con el Análisis Cromatográfico en Fase Gaseosa acoplado al Espectrómetro de Masas (GC - MS), además de evaluar la formación de los principales productos de degradación de la atrazina generados (DIA y DEA).
- Seleccionar los hongos con potencial de degradación de la atrazina y caracterizarlos mediante técnicas morfológicas y moleculares.

4 METODOLOGÍA

El esquema metodológico completo de la investigación es ilustrado en la Figura 6.

4.1 OBJETO DE ESTUDIO – HONGOS

Se trabajó con aislados que presentaron potencial ligninolítico y que fueron colectados en la región del borde del Parque Nacional do Iguaçu (PNI) por DUQUE (2016), a 8 m desde el asfaltado hacia el interior del bosque. Dicho borde está separado de una matriz agrícola de diferentes cultivos por el asfalto, el mismo que cuenta con 7 metros de ancho aproximadamente. Los hongos se encontraban depositados en la Colección Fúngica del Laboratorio de Microbiología de la UNILA. Considerando que los aislados tienen potencial de degradación de lignina y que fueron muestreados de una zona donde la microbiota puede haber tenido algún tipo de contacto con agrotóxicos, se decidió evaluar su capacidad para degradar la atrazina.

4.2 ETAPA 1: DEFINICIÓN DEL MÉTODO DE SELECCIÓN DE DEGRADADORES DE ATRAZINA

Se establecieron tres tratamientos - sin ATZ (control), con ATZ esterilizada en autoclave y con ATZ sin esterilizar – y se consideró 2 hongos para los análisis tal como muestra la Figura 6 – Etapa 1. Los hongos fueron reactivados en el mismo medio de cultivo sólido donde fueron aislados, Extracto de Malta y Agar 2% (MA₂) compuesto por 2g de malta y 2g de agar en cada 100 ml de agua destilada, por 7 días a 28°C. Al haber crecido en la placa, fueron sometidos a una concentración de 10 mg L⁻¹ de atrazina (BENDING; FRILLOUX; WALKER, 2002; PEREIRA, 2011).

La atrazina PESTANAL® (Sigma-Aldrich) fue disuelta en agua ultrapura con resistividad controlada de 18.2 Ω, usando baño ultrasonido a temperatura ambiente hasta asegurar la completa disolución de la molécula y fue almacenada en un frasco ámbar. El medio de cultivo MA₂ líquido (sin adición de agar) fue preparado en la solución de atrazina y 25mL fueron distribuidos en cada erlenmayer de 125 mL, los mismos que fueron cubiertos con aluminio para evitar su exposición a la luz.

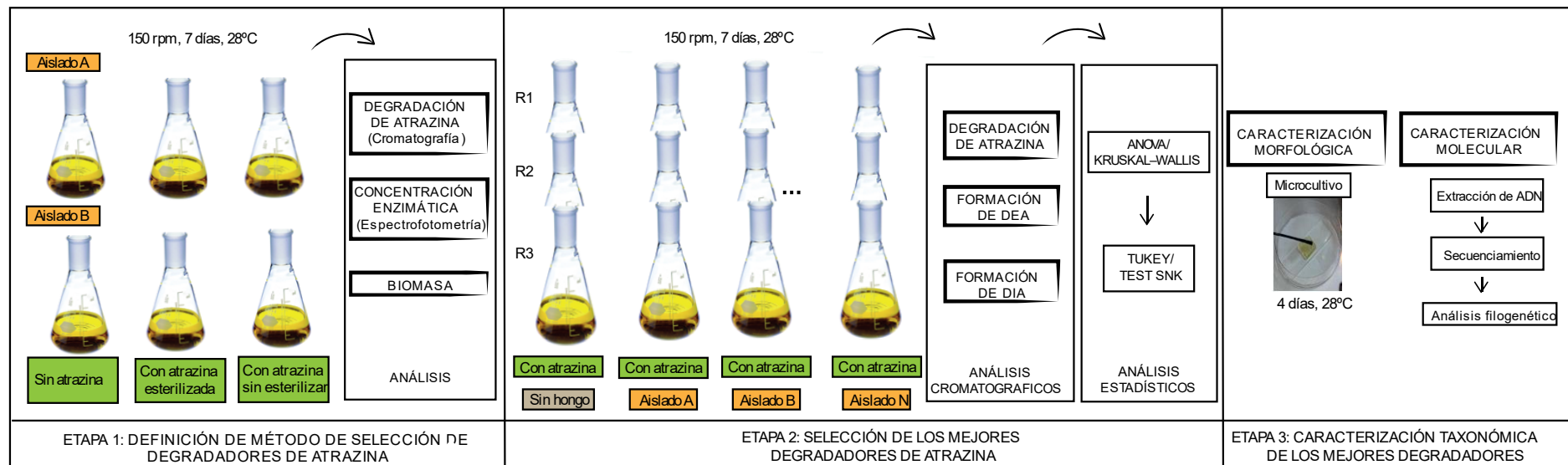


Figura 6: La investigación se condujo en tres etapas. 1) En la definición del método de selección de degradadores de atrazina se establecieron tres tratamientos (sin atrazina (control), con atrazina esterilizada y con atrazina sin esterilizar), entre los cuales se comparó la degradación de atrazina, la producción de la enzima lacasa y la producción de biomasa. Los aislados crecieron en erlenmeyers con medio líquido en las condiciones de cultivo especificadas en la parte superior. 2) Selección de los mejores degradadores de atrazina en base a análisis cromatográficos (degradación de atrazina y formación de DEA y DIA) y estadísticos (análisis de variancia y análisis a posteriori). Los tratamientos correspondieron al control (medio sin hongo) y a cada uno de los aislados, todos en presencia de atrazina y por triplicado (R1, R2 y R3). 3) Caracterización taxonómica de los mejores degradadores utilizando caracteres morfológicos e información molecular. Se especifica las condiciones de microcultivo y el procedimiento efectuado para realizar el análisis filogenético.

Después de esterilizar el material en la autoclave, en cada erlenmayer se inocularon tres discos de micelio periférico de 6mm de diámetro (KOENIG; MAGNOLON; ECOLE, 2015). Los vidrios fueron aleatoriamente colocados en una incubadora shaker a 28°C y 150 rpm por 7 días. Al final del período de incubación, se filtró el cultivo en un sistema de filtración al vacío usando papel filtro y se conservó la parte líquida en frascos ámbar en freezer a -4°C, para los análisis cromatográficos (ítem 4.2.1) y enzimáticos (ítem 4.2.2), y el micelio fúngico (parte sólida) para determinar el peso seco (ítem 4.2.3).

4.2.1 Análisis de la degradación de atrazina y producción de sus principales metabolitos por GC-MS

El método de preparación de muestra y análisis cromatográfico se basó en el trabajo de FLORA (2018). En ese trabajo se cuantificaron la ATZ, DIA y DEA en muestras de aguas superficiales de ríos mediante Microextracción Líquido-Líquido Dispersiva (DLLME) optimizada por el diseño experimental Doehlert, seguida de Cromatografía en Fase Gaseosa acoplada al Espectrómetro de Masas (GC - MS). La robustez del método fue evaluada por Flora en diferentes muestras de agua. En base a los resultados obtenidos, se escogió este método de preparación para aplicarlo en muestras de medio de cultivo con hongo y de controles.

En la técnica de extracción, la concentración final de atrazina y del padrón interno, etión, fue ajustada a 2 $\mu\text{g L}^{-1}$, transfiriendo 10 μL de la muestra de atrazina con concentración inicial de 10 mg L^{-1} y 200 μL de etión con concentración inicial de 0,5 mg L^{-1} a un volumen final de 50 mL de agua ultrapura, al que previamente fue añadido 0,10 g mL^{-1} de NaCl. La solución fue ajustada a pH 7 y alícuotas de 5 ml se dispusieron en tubos de centrifugación de vidrio con base cónica de 15 mL, donde 163 μL de diclorometano grado HPLC (solvente extractor) y 550 μL de acetona grado HPLC (solvente dispersor) fueron rápidamente añadidos. La emulsión formada se centrifugó a 2000 rpm por 5 min. Se retiró aproximadamente 150 μL de la fase de abajo, evitando la contaminación entre las fases, y se almacenó en inserts de 300 μL .

El cromatógrafo GC-MS contó con un sistema TRACE 1300 GC-MS equipado con un sistema de muestreo automático TriPlus RSH y un analizador de masas ISQ Single Quadrupole MS, que separó los analitos en la columna capilar TR-5MS (30 m \times 0,25 mm \times 0,25 μm), todos los componentes de la marca ThermoScientific. La temperatura del inyector se ajustó a 250 °C y las muestras se inyectaron (2 μL) en modo splitless, usando Helio como gas de corrida con un flujo constante de 1 ml min^{-1} . La temperatura inicial se fijó a 50 °C (por 2 min) incrementada

a 140 °C a 10 °C min⁻¹, aumentada a 158 °C a 1 °C min⁻¹, aumentado a 250 °C a 10 °C min⁻¹, finalmente incrementada a 290 °C a 7 °C min⁻¹ (Figura 8).

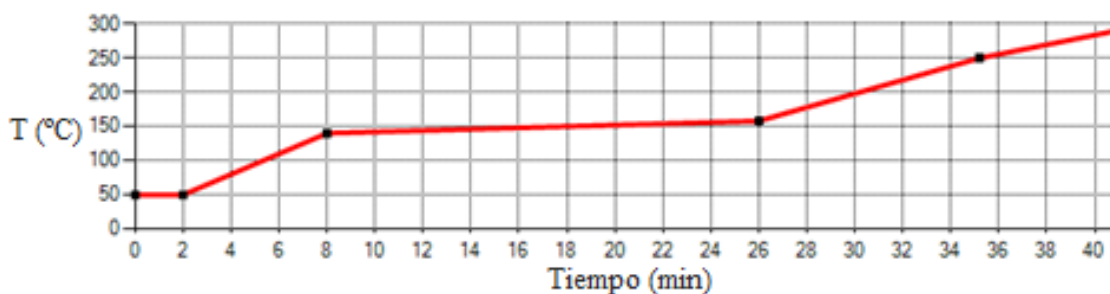


Figura 7: Representación gráfica del gradiente de temperatura usado en la separación cromatográfica de ATZ, DEA, DIA y el patrón interno (etión).

En el sistema de espectrofotometría se ajustó la temperatura de la fuente de iones y de la línea de transferencia a 300°C y 250°C, respectivamente, y se configuró en modo de monitoreo selectivo de iones usando un ion más intenso y dos iones calificadoros (Tabla 5). El procesamiento de datos se realizó con el software ThermoXcalibur, versión 2.2 (Thermo Scientific).

Tabla 5: Tiempos de retención e iones más intensos para analitos y patrón interno

Analito	Tiempo de retención (min)	Iones (m/z)
DIA	20.76	173*, 158 y 145
DEA	21.21	172, 187* y 145
ATZ	26.3	200, 215* y 173
Etion	35.73	231*, 153 y 97

*ion más intenso

Fuente: Flora (2018)

A partir de estos se obtuvo la razón del área de la ATZ, DEA y DIA con respecto al patrón interno etión, mediante la Ecuación 1. Los valores se expresaron en términos de razón del área % dividiendo el valor obtenido en 100.

$$Razón\ del\ área\ (RA) = \frac{área\ del\ analito}{área\ del\ patrón\ interno}$$

Ecuación 1

4.2.2 Evaluación confirmativa de la actividad de la lacasa

La actividad de la lacasa fue determinada usando la metodología descrita por BOURBONNAIS y PAICE (1988) y BUSWELL et al (1995) para evaluar la actividad de la

lacasa extracelular sobre el sustrato sintético 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) - ABTS. La mezcla de reacción para el análisis tuvo un volumen final de 2 mL constituida por 0.1 mL de ABTS 0,03% (p/v), 0.3 mL de tampón acetato de sodio 0,1M (pH 0,5) y 0.6 mL de solución enzimática (BONUGLI-SANTOS *et al*, 2016). La medición de la absorbancia de la mezcla de reacción, antes y después de 10 min de incubación en baño María a 37°C, fue realizada mediante el espectrofotómetro a 420 nm. El control negativo fue realizado usando el extracto enzimático desnaturalizado (obtenido al hervir el ensayo a 100 °C por 5 min), mientras que el blanco contuvo extracto enzimático y agua.

La unidad de actividad enzimática por litro ($U L^{-1}$), calculada mediante la Ecuación 2 (BALTIERRA-TREJO; MÁRQUEZ-BENAVIDES; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, 2015), corresponde a la cantidad de enzima capaz de oxidar 1 μ mol de ABTS por minuto, considerando un valor de ϵ , a 420 nm, igual a $3.6 \times 10^4 M^{-1} cm^{-1}$ para el ABTS oxidado (BUSWELL *et al*, 1995). Este procedimiento fue realizado con dos repeticiones para cada una de las réplicas de cada aislado, incluyendo las réplicas del control.

$$U L^{-1} = \Delta Abs \cdot V_t \cdot D_f \cdot 10^6 / \epsilon \cdot V_s \cdot t \cdot d \quad \text{Ecuación 2}$$

Donde:

U : Actividad enzimática (μ mol $min^{-1} L^{-1}$)

ΔAbs : absorbancia final – absorbancia inicial

V_t : volumen total (mL)

D_f : Factor de dilución

10^6 : Factor de corrección (μ mol L^{-1})

ϵ : coeficiente de absorción molar ($M^{-1} cm^{-1}$ o $L mol^{-1} cm^{-1}$)

V_s : volumen de solución enzimática (mL)

t : tiempo

d : recorrido óptico (1 cm)

La evaluación confirmativa de la lacasa se denomina de esta forma porque mediante este ensayo se determina la presencia de dicha enzima en el medio de cultivo mediante datos cuantitativos, a diferencia de ellos ensayos cualitativos.

4.2.3 Evaluación de la producción de biomasa

Para determinar la biomasa producida por cada aislado, el micelio colectado en el papel filtro, de peso conocido, fue secado en la incubadora a 90°C hasta verificar peso constante por un período máximo de 24 horas. La biomasa fue calculada mediante la Ecuación 3.

$$P_S = P_F - P_{PF} \quad \text{Ecuación 3}$$

Donde:

P_S : peso seco

P_F : peso final

P_{PF} : peso del papel filtro

4.3 ETAPA 2: SELECCIÓN DE LOS MEJORES DEGRADADORES DE ATRAZINA

Se realizó en lotes conformados de un control sin hongo inoculado y tres hongos, con un total de 9 hongos. Cada tratamiento (hongo o control) fue realizado por triplicado, tal como muestra la Figura 6 -Etapa 2. A partir de los resultados obtenidos, se realizó los análisis estadísticos.

4.3.1 Análisis cromatográficos

Se realizó el análisis de la degradación de atrazina y producción de sus principales metabolitos por GC-MS, como se especifica en el ítem 4.2.1. Además de obtener la razón del área de la ATZ, DEA y DIA con respecto al padrón interno Etión, mediante la Ecuación 1, se calculó, a partir de esos resultados, la degradación de la ATZ y la formación de DIA y DEA mediante la Ecuación 4 (WANG *et al.*, 2018).

$$\text{Degradación/Formación (\%)} = \frac{RA_{control} - RA_{hongo}}{RA_{control}} \times 100 \quad \text{Ecuación 4}$$

Donde:

$RA_{control}$: Razón del área del control

RA_{hongo} : Razón del área de los analitos en el medio de cultivo de los hongos

4.3.2 Análisis estadísticos

Se estableció un abordaje cuantitativo para evaluar el potencial de biodegradación de la atrazina, ítem 4.3.1, donde la variable independiente correspondió a cada aislado fúngico y las variables respuestas fueron la degradación de ATZ, la formación de DEA y la formación de DIA.

Los datos fueron procesados en Microsoft Excel® 2016. En BioEstat 5.3 fueron realizados varios análisis. El test Shapiro-Wilk fue utilizado para determinar si los datos se encuadraban dentro de la distribución normal. Al observar datos discrepantes dentro de las mediciones, se realizó el test de extremos para determinar los outliers. Este test se aplicó considerando el promedio y desvío padrón cuando los datos eran paramétricos y el test considerando la mediana y cuartiles cuando eran datos no paramétricos. Se realizó el test ANOVA one-way o Kruskal–Wallis, dependiendo si los datos eran paramétricos o no, para determinar si existía diferencia promedio significativa entre tratamientos. El Test de Tukey o el Test SNK (Student-Newman-Keuls) fueron realizados a posteriori, para datos paramétricos y no paramétricos respectivamente. Estos análisis permitieron determinar los mejores degradadores de ATZ o formadores de DEA y DIA. En todos los análisis se consideró un nivel de significancia de $p < 0.05$. Se utilizó el software RStudio, version 1.1.456, para plotar los gráficos.

4.4 ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LOS MEJORES DEGRADADORES

La caracterización se basó en análisis morfológicos y moleculares (Figura 6 – Etapa 3).

4.4.1 Caracterización morfológica

Para la caracterización morfológica, con el intuito de observar las estructuras de reproducción de los aislados se realizó la técnica de microcultivo descrita por (WEBER; PITT, 2000), con ligeras modificaciones. Una vez que todo el material aquí mencionado fue esterilizado, se colocó gasa dentro de una placa y se la humedeció con 2 mL de agua destilada, sobre esta se colocó dos palillos de madera como soporte para el porta objetos que fue colocado encima. Un cuadrado de medio de cultivo MA₂ se colocó en la base del porta objetos, fue inoculado en las 4 extremidades con micelio fresco proveniente de un cultivo previo y se cubrió con cubre objetos. Las placas se incubaron a 28°C de 2 a 4 días, siendo observadas a partir del

segundo día.

Al terminar el período de cultivo, se retiró el cubre objetos y se lo colocó sobre otro porta objetos limpio y se tinto con azul de metileno 2% antes de ser observadas al microscopio óptico. Al enfocar adecuadamente los porta objetos, se realizó un registro fotográfico de las estructuras fúngicas.

4.4.2 Caracterización molecular

El ADN genómico de cada linaje seleccionado fue extraído de acuerdo con el protocolo descrito por RAEDER y BRODA (1985), para lo cual se cultivó los hongos en MA₂ sólido para reactivación de los organismos y en medio líquido para la obtención del micelio del cual se extrajo el ADN. La región ITS1-5,8S-ITS2 del ADN ribosómico fue amplificada con los primers universales para el reino Fungi, ITS-1 (5`TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3`) y ITS-4 (5`TCCTCCGCTTATTGATATGG-3`) (WHITE *et al*, 1990). Las muestras fueron enviadas para secuenciación al Laboratorio de Biología Molecular y Ecología Microbiana – LABMEM del Prof. Welington Luiz de Araújo, Departamento de Microbiología de la Universidad de São Paulo. Se utilizó el método de SANGER, que permite obtener muchas copias de la secuencia de interés.

La comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias depositadas en bancos de datos (técnica denominada “blast”) fue realizada usando las páginas web del Centro Nacional para la Información Biológica (NCBI) y del Centro de Análisis de Secuencias Biológicas (CBS). Se consideró las secuencias de organismos con 99% de similitud a las secuencias de interés y mayoritariamente descritos a nivel de especie, procurando abarcar toda la diversidad encontrada. Se recopiló las secuencias de los hongos de interés y de los organismos similares en un bloque de notas y se las alineó en el sitio web Clustal Omega del Instituto Europeo de Bioinformática (EMBL-EBI). Se utilizó el programa BioEdit (HALL, 1999), versión 7.0.5.3, para igualar el tamaño de las secuencias, eliminando el inicio y el final de todas las secuencias tomando como referencia el tamaño de las secuencias de interés más corta (de los hongos considerados en el presente estudio). El programa Mega 7, versión 7.0.26, fue utilizado para realizar el análisis filogenético siguiendo los siguientes parámetros: las relaciones evolutivas se analizaron mediante el método Neighbor-Joining, se utilizó 500 repeticiones de bootstrap y el método de distancias evolutivas Kimura 2 parámetros.

5 RESULTADOS

5.1 ETAPA 1: DEFINICIÓN DEL MÉTODO DE SELECCIÓN DE DEGRADADORES DE ATRAZINA

Para las pruebas iniciales fueron seleccionados dos aislados (GW y BO) que presentaron resultados cualitativos eficientes en la actividad enzimática (DUQUE CASTAÑO, 2016). Considerando los 3 tratamientos con respecto a la degradación de la atrazina - sin ATZ (T1), con ATZ esterilizada en autoclave (T2) y con ATZ sin esterilizar (T3) -, la Tabla 6 muestra que ambos aislados tienen la capacidad de producir el metabolito DEA según el análisis cromatográfico (Ecuación 1), al observar que la razón del área % de DEA para ambos hongos en los tratamientos con presencia de atrazina (T2 y T3) es notablemente más alta que en el control (T1), por ejemplo, BO asume valores de 30.61% en T1 y 187.01 y 232.38 % en T2 y T3, respectivamente. El valor registrado para atrazina en los tratamientos sin atrazina fue atribuída a presencia de ATZ en la vidriería utilizada, mediante ensayos cromatográficos adicionales, por ello un procedimiento más riguroso para limpieza de vidriería fue adoptado en las próximas etapas.

Tabla 6: Biodegradación de ATZ por los hongos BO y GW (razón del área de los analitos con respecto al etión %)

Condición Analito	BO			GW		
	Sin atrazina	Con atrazina esterilizada	Con atrazina sin esterilizar	Sin atrazina	Con atrazina esterilizada	Con atrazina sin esterilizar
Atrazina	446.87*	21562.91	20853.23	617.65*	17260.77	16420.00
DEA	30.61	187.01	232.38	38.16	359.42	315.15

*Presencia de atrazina proveniente de contaminación en los vidrios

La actividad enzimática fue cuantificada en GW (Ecuación 2), siendo que la producción de la enzima fue comparativamente mayor en presencia de atrazina, independiente de la condición de esterilización (T2) o ausencia de esterilización (T3) (Tabla 7), con valores de 0.046 y 0.025 UL⁻¹, respectivamente. En el caso de ausencia de atrazina, la producción enzimática fue de 0.005 UL⁻¹.

Tabla 7: Producción de lacasa (U L⁻¹) por el hongo GW.

Condición Hongo	Sin atrazina	Con atrazina esterilizada	Con atrazina sin esterilizar
GW	0.005	0.046	0.025

En los tres tratamientos, la masa micelial de los hongos GW y BO difiere sin existir una tendencia en ambos aislados hacia mayor o menor producción de biomasa al comparar el

tratamiento sin atrazina, con los tratamientos que presentan atrazina, (Ecuación 3) tal como se observa en la Tabla 8.

Tabla 8: Biomasa de los hongos BO y GW (g L^{-1})

Hongo \ Condición	Sin atrazina	Con atrazina esterilizada	Con atrazina sin esterilizar
GW	3.93	4.48	3.69
BO	3.98	2.75	2.95

5.2 ETAPA 2: SELECCIÓN DE LOS MEJORES DEGRADADORES DE ATRAZINA

Se trabajó con 9 aislados fúngicos – GW, GU, IB, NH, IC, DF, BP, BO y AD - viables a la reactivación a partir de los preservados en H_2O o de glicerol (almacenados a -4 o a -80°C) de un total de 21 aislados, provenientes del área de borde del PNI y positivos para la producción de la lacasa, que son parte de la Colección Fúngica del Laboratorio de Microbiología.

En el análisis cromatográfico (Anexo 2), cada réplica de los tratamientos se convirtió en dos o máximo tres subréplicas, como consta en el Anexo 1, de las cuales se realizó promedios aritméticos que se presentan en la Tabla 9, resaltando que ningún dato fue desconsiderado al analizar los resultados por el test de outliers para los datos. Es importante notar que antes de ejecutar los análisis estadísticos, como el test de outliers en este caso, se evaluó y se determinó que los datos no eran paramétricos ($p < 0.05$) o que tenían variancias desiguales ($p < 0.05$), por ello se aplicó logaritmo ($\log X + 1$) a todos los datos antes de ejecutar los análisis estadísticos, para tratar que los valores se encuadren dentro de la distribución normal, no obstante, no fue posible en todos los casos, por ello se aplicó test de varianza paramétricos y test no paramétricos a los datos obtenidos por cromatografía.

En la Tabla 9 se presenta la razón del área de ATZ, DEA y DIA con respecto al padrón interno etión (Ecuación 2), separadas por lotes y asociadas al tratamiento en cuestión, ya sean tratamientos control o tratamientos con hongos. Los hongos son nombrados por dos letras mayúsculas. En la tabla 10, para cada hongo se presentan el porcentaje de la degradación de ATZ y formación de DEA y DIA calculado según la Ecuación 4, acompañado del promedio aritmético (\bar{x}) y desvío padrón (σ). En el caso de degradación de ATZ, valores positivos representan mayor degradación y en el caso de formación de los productos de degradación, mientras más negativo sea el valor, mayor la formación de esos compuestos. Además, es posible distinguir entre hongos con capacidad para formar DEA y hongos sin esa capacidad (NH, IC, BP, BO y AD).

Tabla 9: Razón del área de la ATZ, DEA y DIA con respecto al padrón interno etión, dispuestas en función del lote y tratamiento.

Lote	Tratamiento	Réplica	Razón del área*		
			ATZ	DEA	DIA
1	Control	1	1.69	0.06	0.12
		2	1.69	0.03	0.06
		3	1.69	0.03	0.06
	GW***	1	1.78	0.03	2.37
		2	1.27	0.07	0.07
		3	1.60	0.77	0.08
	GU	1	2.09	0.96	0.11
		2	1.50	0.28	0.06
		3	1.56	0.06	0.06
IB	1	1.91	0.04	0.09	
	2	1.49	0.26	0.07	
	3	1.55	ND**	0.12	
2	Control	1	3.44	ND	0.10
		2	3.85	0.01	0.13
		3	2.77	ND	0.08
	NH	1	4.13	ND	0.11
		2	2.13	ND	0.06
		3	1.85	ND	0.05
	IC	1	2.48	ND	0.09
		2	2.88	ND	0.44
		3	3.09	ND	0.10
	DF	1	2.62	0.03	0.14
		2	3.44	0.02	0.16
		3	3.42	0.06	0.25
3	Control	1	4.37	ND	0.10
		2	3.18	ND	0.06
		3	2.75	ND	0.09
	BP	1	3.50	ND	0.13
		2	2.55	ND	0.05
		3	3.27	ND	0.06
	BO	1	2.96	ND	0.28
		2	2.99	ND	0.10
		3	4.84	ND	0.11
	AD	1	3.45	ND	0.10
		2	4.11	ND	0.42
		3	3.08	ND	0.35

*La razón del área resulta el área del analito dividida por el área del etión (padrón interno).

**ND se refiere a analito no detectado por el GC – MS

***Los hogos son nombrados por dos letras mayúsculas

Tabla 10: Degradación (%) de ATZ y formación (%) de DEA y DIA. Se muestran las 3 réplicas consideradas para cada hongo, utilizadas en los análisis estadísticos, junto al promedio (\bar{X}), desvío padrón (σ) y coeficiente de variación (CV).

Hongo	Degradación ATZ (%)	\bar{X}	σ	CV (%)	Formación DEA (%)	\bar{X}	σ	CV (%)	Formación DIA (%)	\bar{X}	σ	CV (%)
GW	-5.20	8.36	15.17	181.54	33.70	-528.99	903.08	-170.72	-2465.95	-808.83	1435.11	-177.43
	24.74				-50.00				23.24			
	5.52				-1570.65				16.22			
GU	-23.56	-1.56	19.13	-1222.68	-1989.13	-845.65	1017.98	-120.38	-15.68	17.66	28.87	163.49
	11.22				-509.78				34.59			
	7.65				-38.04				34.05			
IB	-13.02	2.51	13.58	541.02	8.70	-229.35	336.64	-146.78	8.11	-0.36	25.15	-6978.36
	12.13				-467.39				19.46			
	8.41				-				-28.65			
NH	-23.16	19.33	37.04	191.63	-	-	-	-	-10.68	25.08	31.24	124.57
	36.35				-				38.83			
	44.80				-				47.09			
IC	25.95	16.06	9.13	56.86	-	-	-	-	16.02	-100.81	194.42	-192.86
	14.26				-				-325.24			
	7.96				-				6.80			
DF	21.93	5.81	13.96	240.35	-307.69	-448.72	356.21	-79.38	-40.29	-77.99	55.52	-71.18
	-2.64				-184.62				-51.94			
	-1.85				-853.85				-141.75			
BP	-1.93	9.55	14.43	151.22	-	-	-	-	-55.12	5.77	52.76	913.78
	25.75				-				37.99			
	4.82				-				34.45			
BO	13.86	-4.77	31.48	-660.40	-	-	-	-	-232.48	-90.75	122.95	-135.48
	12.95				-				-12.80			
	-41.11				-				-26.97			
AD	-0.49	-3.34	15.30	-458.63	-	-	-	-	-19.88	-245.08	199.57	-81.43
	-19.86				-				-400.00			
	10.34				-				-315.35			

Al aplicar el test ANOVA, no existió diferencia significativa para ATZ y DIA con valor $p > 0.05$ (Tabla 11), mostrando que los hongos tienen capacidad para degradar ATZ y producir DIA, con un porcentaje que no difiere entre los aislados. El porcentaje promedio de ATZ es 5.77 y el de DIA es -141.7%. Tampoco existió diferencia significativa entre los cuatro hongos productores de DEA, en este caso GU, DF, GW e IB tienen una producción de -845, -449, -528 y -229%, respectivamente (Tabla 10), que resulta en un promedio de -513%.

Tabla 11: Resultados de ANOVA/Kruskal-Wallis para la degradación de ATZ y formación de DEA y DIA

Resultado Analito	Test	Valor p
ATZ	ANOVA	0.84
DEA	ANOVA	0.84
DIA	Kruskal-Wallis	0.15

En las Figuras 8, 9 y 10, se ilustra el potencial de degradación de ATZ (%), producción de DEA (%) y producción de DIA (%), respectivamente, utilizando los datos de la Tabla 10. En estos gráficos, se relaciona el porcentual de degradación o formación de cada analito para los 9 hongos.

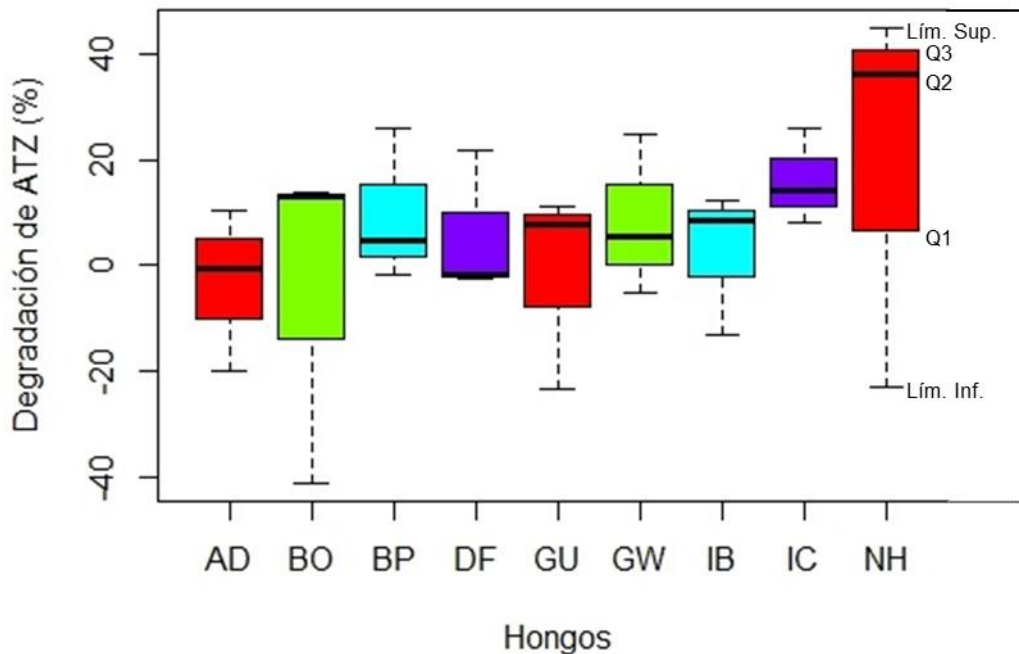


Figura 8: Degradación (%) de ATZ por los hongos AD, BO, BP, DF, GU, GW, IB, IC y NH del borde del PNI. Los datos son representados en boxplots que presentan los tres cuartiles (Q1, Q2, Q3) y los límites superiores (Lím. Sup.) e inferiores (Lím. Inf.).

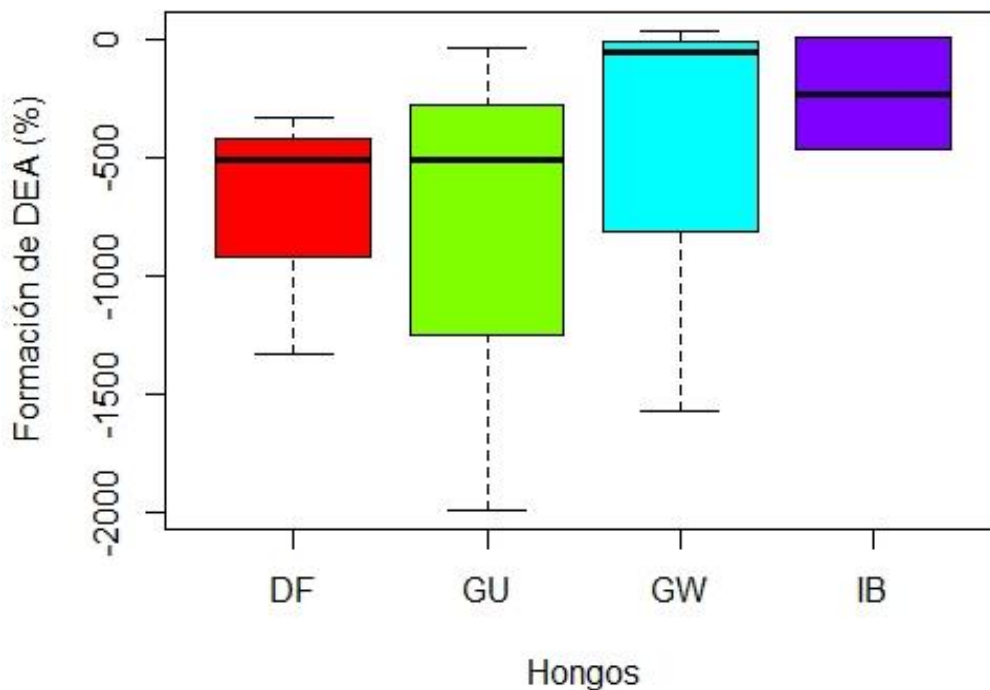


Figura 9. Formación de DEA (%) a partir de la degradación de ATZ por los hongos DF, GU, GW e IB del borde del PNI.

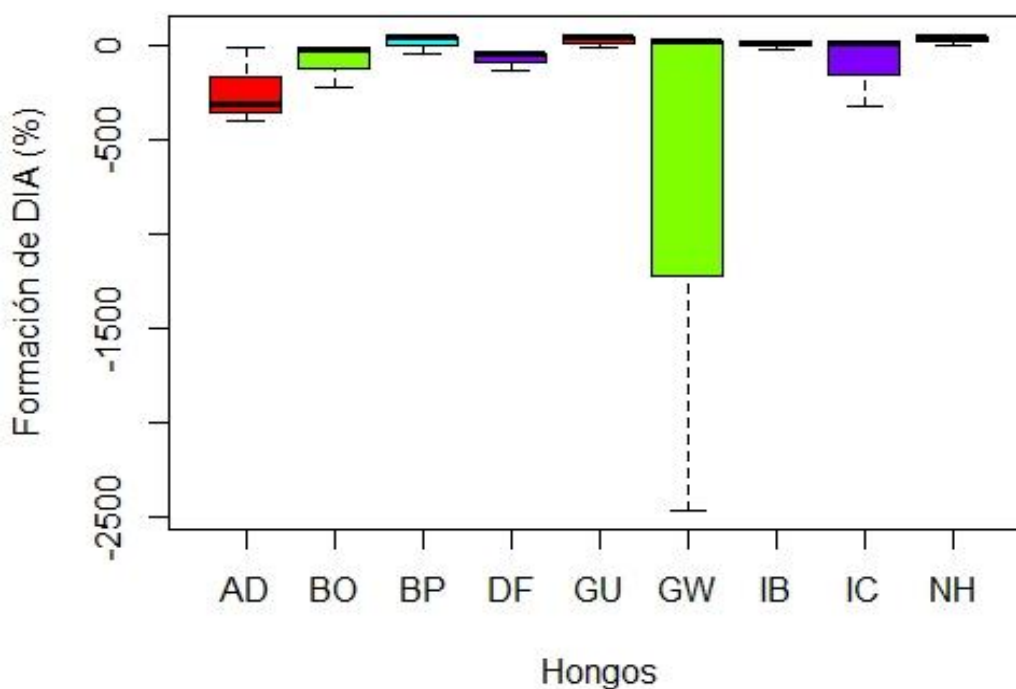


Figura 10: Formación de DIA (%) a partir de la degradación de ATZ por los hongos AD, BO, BP, DF, GU, GW, IB, IC y NH del borde del PNI.

En la Figura 9 y 10, los valores más negativos representan un mayor potencial de degradación. En el Figura 9, se ilustra el potencial de producción de DEA (%) solamente para los hongos que tuvieron un potencial de degradación diferente de cero (DF, IB, GW y GU). GU

es el hongo que abarca la mayor amplitud de valores encontrados, que reflejan ensayos con poca formación de DEA y otros con una notable formación. En el caso de la Figura 10, GW se destaca con valores de formación notablemente superiores a los de los otros hongos, alcanzando un valor de -2465 %, no obstante, existe un amplio espectro de variación en su potencial de formación de DIA en base a los valores obtenidos (Tabla 10).

5.3 ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LOS MEJORES DEGRADADORES

Los hongos DF, GU, IB y GW fueron escogidos para caracterización taxonómica debido a que poseen capacidad para formar DEA, al considerar que la degradación de ATZ es evidenciada por la producción de DEA (Figura 9). De acuerdo con los análisis moleculares, los aislados DF y GU pertenecen a al género *Fusarium*, con 99% de probabilidad de compatibilidad con este género. GW presenta 99% de similaridad con los géneros *Fusarium* y *Aschersonia*. La cualidad de la secuencia de IB no fue suficientemente buena para el análisis filogenético, ya que la similaridad de la secuencia de interés con las secuencias depositadas en los bancos de datos del CBS y del NCBI no superan el 97%, además el valor E-value fue diferente de cero (Anexo 3 y 4). Así, se consideraron las secuencias de ADN ribosomal de GU, GW y DF para elaborar el árbol filogenético (Figura 11).

La Figura 11 muestra que GW es una especie diferente de DF y GU. Estos últimos presentaron alta proximidad filogenética con *F. equiseti*, *F. incamatum*, *F. chlamydosporum*, *F. solani*, *F. camptoceras* y *F. verticillioides*. Además, se observa que el aislado GW se encuentra estrechamente relacionado con los géneros *Aschesonia* o *Fusarium*, tal como se mostró en la comparación de compatibilidad de secuencias.

Los aislados considerados para análisis moleculares también fueron utilizados en la caracterización morfológica mediante microcultivo. Las estructuras de reproducción asexuadas en forma de “foice” o fusiformes de los conidios, características especialmente del género *Fusarium*, pero que también pueden ocurrir en otros géneros, fueron observadas en los cuatro aislados - DF, IB, GW y GU – al visualizar las láminas en el microscopio óptico (Figura 12).

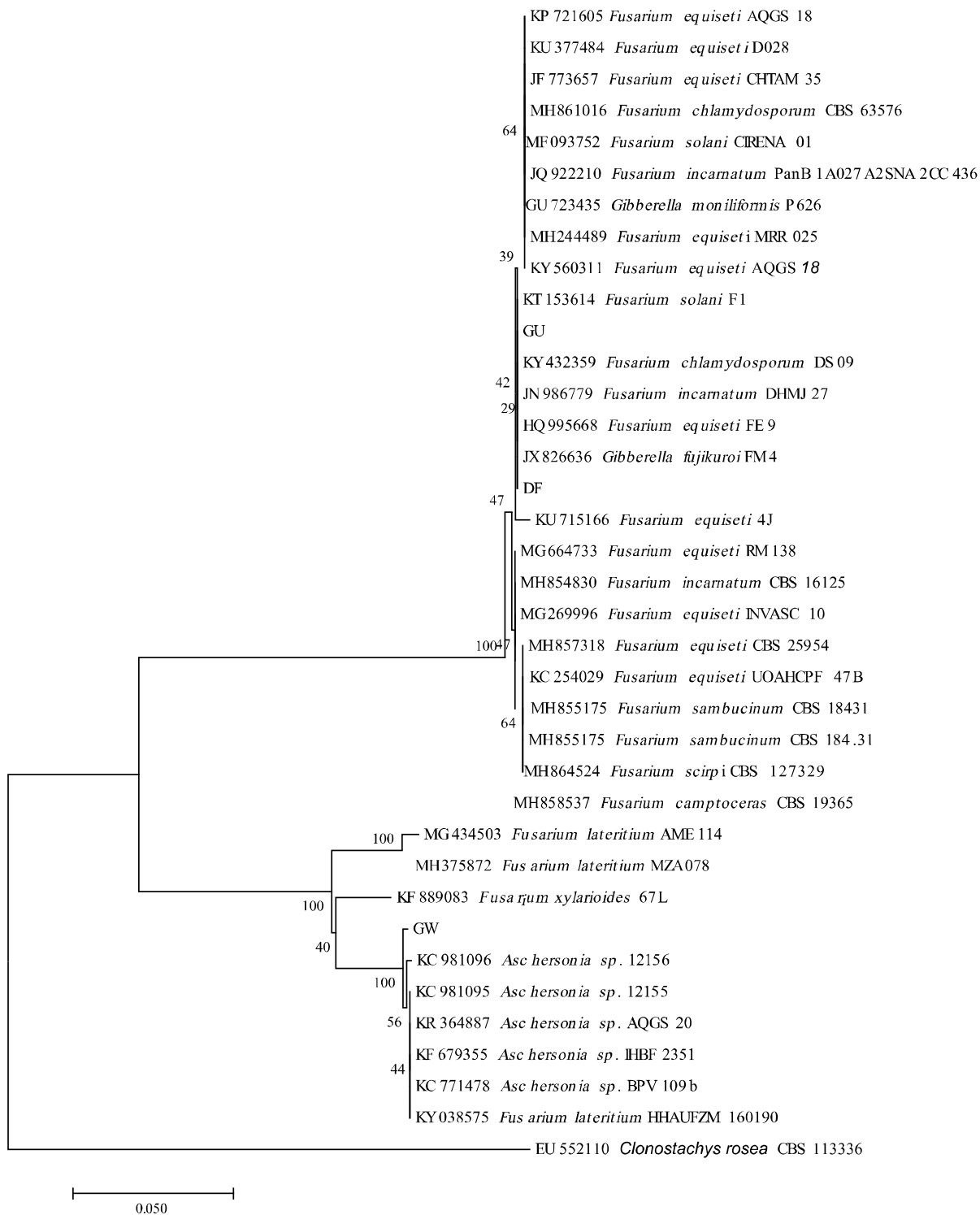


Figura 11: La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987). Se muestra el árbol óptimo con la suma de la longitud de rama = 0.46745438. El porcentaje de árboles replicados en los que los taxones asociados son agrupados en el Bootstrap (500 repeticiones) se muestran junto a las ramas (FELSENSTEIN, 1985). El árbol se dibuja a escala, con longitudes de rama en las mismas unidades que las distancias evolutivas utilizadas para inferir el árbol filogenético. Las distancias evolutivas se calcularon utilizando el método de 2 parámetros de Kimura (KIMURA, 1980) y están en las unidades del número de sustituciones de bases por sitio. El análisis involucró 37 secuencias de nucleótidos. Se eliminaron todas las posiciones que contienen huecos y datos faltantes. Hubo un total de 404 posiciones en el conjunto de datos final. Los análisis evolutivos se realizaron en MEGA7 (KUMAR; STECHER; TAMURA, 2016). *Clonostachys rosea* es utilizado como grupo externo.

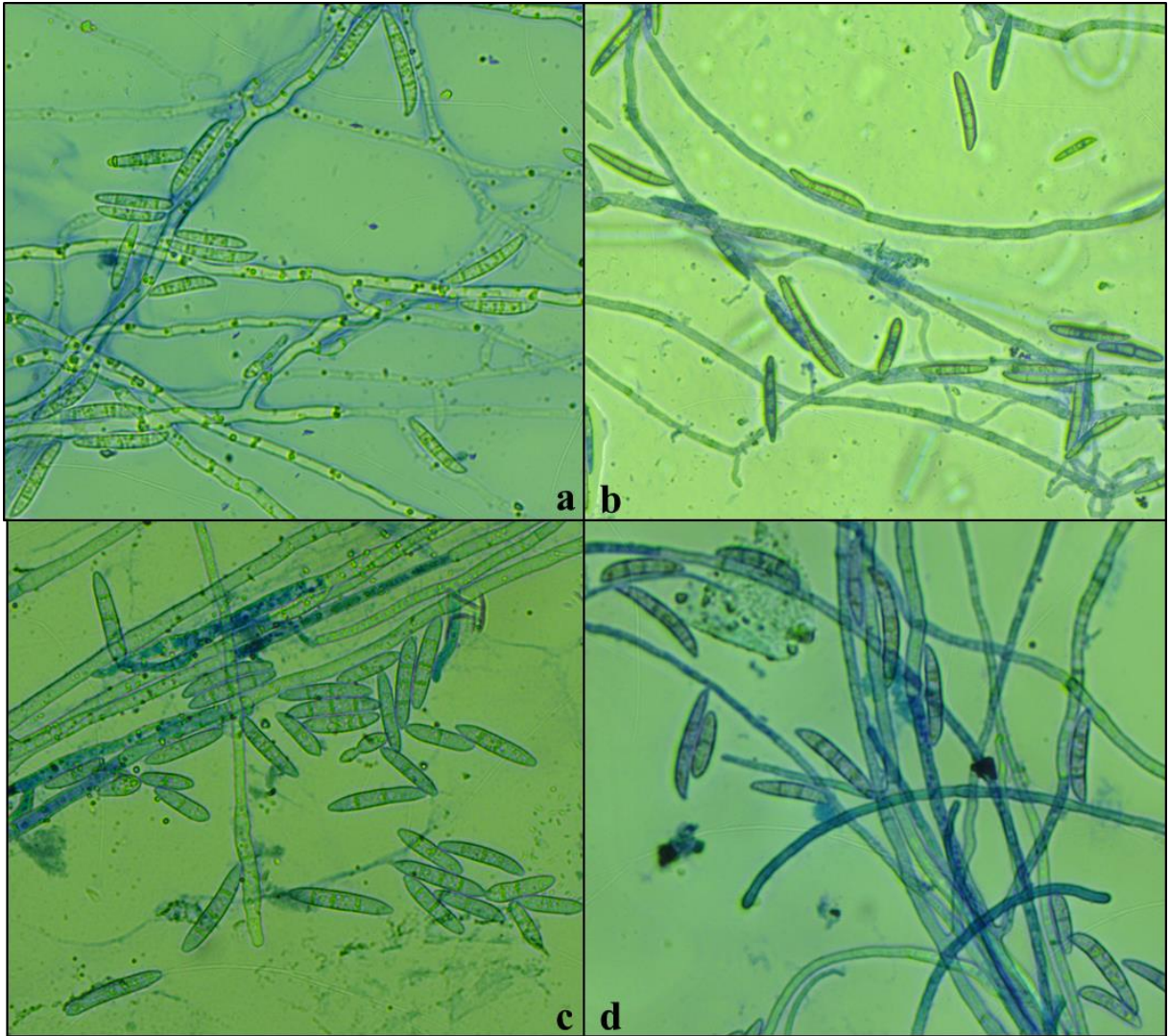


Figura 12: Microcultivo de los hongos DF (a), GU(b), GW(c) e IB (d), usando azul de metileno 2%.

6 DISCUSIÓN

6.1 ETAPA 1: DEFINICIÓN DEL MÉTODO DE SELECCIÓN DE DEGRADADORES DE ATRAZINA

Es importante destacar que los hongos utilizados en el estudio son tolerantes a la preservación, independientemente de la solución y temperatura empleadas, ya que continúan viables después de dos años de haber sido almacenado en la colección de la UNILA.

En la etapa de definición del método de selección de degradadores de atrazina, BO y GW se constituyen como tolerantes y con potencial de degradación de ATZ formando DEA, al considerar los resultados obtenidos en la Tabla 6. Para el hongo GW posiblemente la atrazina induce la expresión de lacasa como muestra la Tabla 7 (RABINOVICH; BOLOBOVA; VASIL, 2004), con valores de producción enzimática comparativamente superiores en el tratamiento con atrazina esterilizada (T2) y sin esterilizar (T3) con respecto al tratamiento sin atrazina (T1). Además, la producción enzimática fue numéricamente mayor en T2 en relación a T3, a la vez que existe una mayor formación de DEA en T2 que en T3. Este hecho refuerza la idea de la actuación de enzimas extracelulares, específicamente la lacasa, en la degradación de la ATZ, tal como sucede en otros trabajos de la literatura (CHAN-CUPUL; HEREDIA-ABARCA; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, 2016; HUANG *et al.*, 2016). No obstante, no fue posible establecer este análisis para BO. Además, se determinó que la esterilización no afecta a la degradación de atrazina, al comparar los valores de ATZ en T2 y T3 (Tabla 6), por tanto, la esterilización no interfiere en el proceso de degradación del herbicida.

En base a los datos obtenidos para BO y GW, no se estableció una relación entre la biomasa, producción enzimática y formación de DEA, al no ser posible relacionar mediante un padrón la producción de biomasa y la formación de DEA. En el caso de BO, el valor de biomasa en T2 y T3 es menor que en T1, sin embargo, existe producción de DEA, mientras que sucede lo contrario con GW, aislado que también produce DEA. Este resultado es importante porque muchos trabajos usan la biomasa como método de selección de potenciales degradadores (MARINHO *et al.*, 2017). Basado en este perfil, no fue posible definir ningún método específico para una selección inicial mientras que el análisis cuantitativo de la degradación de atrazina mostró resultados claros de degradación, por ello todos los hongos fueron sometidos a análisis cromatográficos.

6.2 ETAPA 2: SELECCIÓN DE LOS MEJORES DEGRADADORES DE ATRAZINA

Con respecto a la selección de los mejores degradadores de atrazina, los resultados estadísticos muestran que no existe diferencia significativa para la degradación de ATZ (Tabla 10). Al considerar que el coeficiente de variación calculado para los datos abarca valores desde 56.86%, el promedio no es una buena medida para representar los datos. De esta forma, la estadística revela que existe una alta variabilidad asociada a los datos brutos y, considerando que los análisis de varianza relacionan la variedad dentro y entre los grupos en análisis, este puede ser un factor que provoque la ausencia de diferencias significativas para la degradación de ATZ, formación de DEA y formación de DIA. Como uno de los objetivos del presente trabajo es seleccionar los hongos con potencial de degradación de la atrazina, se consideró la diferencia de producción de DEA como variable indicadora de la degradación de la ATZ, al haber encontrado hongos con (DF, GW, IB y GU) y sin esta capacidad (Tabla 9).

Experimentalmente, la alta variabilidad o error experimental pudo estar asociado con la absorción de atrazina por el micelio de los hongos, condición que es claramente mencionada en la literatura (PEREIRA, 2011), la ausencia del ajuste del volumen de la muestra líquida al final del período de incubación, antes del almacenamiento del medio líquido para los análisis cromatográficos, además de que la aplicación del padrón interno en el momento de la preparación del medio líquido, y no al preparar la muestra para la extracción de los analitos, pudo haber permitido establecer una relación más adecuada de ese padrón con la atrazina y sus productos de degradación.

Varios estudios evalúan el potencial de hongos para degradar la ATZ, tanto en medio sólido, usando el diámetro del micelio como variable respuesta, como en medio líquido, evaluando la disminución de ATZ y/o la presencia de sus productos de transformación (HENN, 2009; FAN; SONG, 2014; MARINHO et al., 2017; PEREIRA, 2011). La concentración inicial del herbicida, el tiempo de incubación de los hongos, mayoritariamente superando los 7 días, y el porcentaje de degradación de ATZ son variables en los estudios (JEFFERY; BURGESS, 1990; BENDING; FRILLOUX; WALKER, 2002; OLIVEIRA et al., 2015), siendo que con una concentración inicial de 10 mg L⁻¹ se obtuvo un 65% de degradación a los 15 días (PEREIRA, 2011) y 86,2% después de 42 días (BENDING; FRILLOUX; WALKER, 2002) para diferentes cepas fúngicas. En este estudio se obtuvo una producción de DEA de 229 a 529% de razón del área, en valores absolutos, después de 7 días, por tanto, es necesario traducir estos valores en términos de concentración para comparar el potencial de biodegradación GW, DF, GU e IB con

respecto a otros estudios.

Para efectuar la transformación de los datos, de área relativa a concentración (mg L^{-1}), están siendo realizadas curvas de calibración de ATZ, DIA y DEA. Al alcanzar un coeficiente de correlación (R^2) superior a 99%, la ecuación de la recta será utilizada para calcular las concentraciones de los datos obtenidos en este estudio.

Al analizar los productos de degradación de la atrazina, desde 1965 hasta la actualidad existen registros de que uno de los principales mecanismos de degradación de herbicidas s-triazina por hongos de suelo es a través de la remoción de las cadenas laterales N-alquilo, originando DEA y DIA, sin evidencias de quiebre del anillo s-triazina (KAUFMAN; KEARNEY; SHEETS, 1965; MARINHO et al., 2017; SINGH et al., 2018), tal como sucedió en el presente estudio. No obstante, otros analitos también son encontrados como HA, Deisopropilhidroxiatrazina (DIHA), desetildeisopropilatrazina (DEDIA), desetilhidroxiatrazina (DEHA), entre otros (PEREIRA, 2011). Esto revela la necesidad de analizar todos los compuestos formados en la degradación de atrazina para establecer comparaciones con otros estudios, e inclusive para desventar la ruta metabólica de degradación de hongos escasamente detallada en la literatura (SINGH et al., 2018). Las muestras de GU, GW, DF e IB están siendo nuevamente analizadas utilizando el sistema de espectrofotometría en modo de monitoreo “scan” de iones, que realiza una barradura de todos los compuestos presentes en la muestra, en lugar del modo de monitoreo selectivo de iones utilizado para detectar ATZ, DIA, DEA y etión (Tabla 5).

Con respecto a la diferencia de producción de DIA y DEA (Tabla 10), es necesario analizar todos los compuestos originados de la degradación de la atrazina para evaluar el destino molecular de estos metabolitos. Por otro lado, es claro que DEA es más frecuentemente detectado con la ATZ que DIA e inclusive es el principal metabolito presente en aguas subterráneas, hecho asociado a que DIA presenta alta solubilidad en agua y, por lo tanto, una rápida movilidad en el ambiente (GOBIERNO AUSTRALIANO, 2018), es por ello que las concentraciones de DIA son bajas en agua subterránea.

Algunos ensayos realizados con seres vivos (DELLA-FLORA et al., 2018) revelan que los productos microbianos generados por la dealquilación de la atrazina, como DIA y DEA, son más tóxicos que la ATZ, por tanto, la degradación no significa necesariamente detoxificación (KAUFMAN; BLAKE, 1970), mientras que otros afirman la disminución de la toxicidad

(MARINHO et al., 2017). Siendo necesaria la ejecución de pruebas de toxicidad que permitan evaluar esta variable en los productos generados por GU, GW, DF e IB. Por otro lado, considerando la capacidad de formar DEA por estos hongos, la biorremediación de atrazina utilizando hongos como agentes degradadores podría ser trabajada en consorcios microbianos que permitan una mayor degradación de la atrazina o su mineralización en compuestos amigables con el medio ambiente (MAQBOOL et al., 2016).

A pesar de la capacidad ligninolítica asociada a los hongos NH, IC, BP, BO y AD y su potencial para degradar ATZ, estudios que revelan que la actividad ligninolítica no está necesariamente correlacionada con la capacidad de degradar pesticidas aromáticos (RABINOVICH; BOLOBOVA; VASIL, 2004), en este caso, la lacasa podría no estaría actuando al no evidenciar la formación de DEA. No obstante, es necesario evaluar la producción de lacasa cuando los aislados están bajo la presencia de atrazina para confirmar si la actuación de esta enzima provoca la formación de DEA evidenciada por cromatografía.

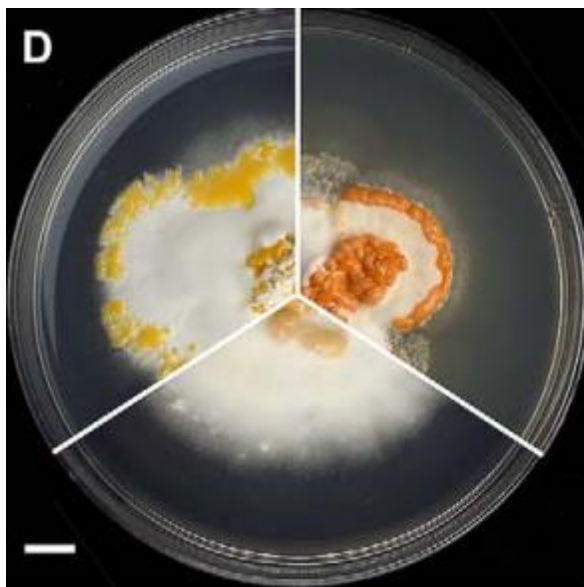
6.3 ETAPA 3: CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE LOS MEJORES DEGRADADORES

El análisis taxonómico de los aislados GU, DF, GW e IB fue realizado por métodos moleculares (Figura 11) y morfológicos (Figura 12). Todos los hongos presentaron una alta similitud con el género *Fusarium* del filo *Ascomycota* (clase Sordariomycetes), el clado con mayor riqueza en los trópicos y uno de los tres géneros más estudiados para la transformación de aminas aromáticas, que son sinónimos intermediarios para la producción de herbicidas (TEDERSOO et al., 2014; LIMA et al., 2018). Sin embargo, no fue posible determinar al género que pertenecía GW, ya que, como muestra la Figura 11, presentó proximidad filogenética con los géneros *Fusarium* y *Aschersonia*, ambos pertenecen a orden Hypocreales, pero a la familia Nectriaceae y Clavicipitaceae, respectivamente. Además, por la posición en el análisis filogenético, el hongo GW podría ser una especie aún no descrita.

El género *Fusarium* presenta grandes dificultades taxonómicas debido a la gran variabilidad e incluso a la inestabilidad de ciertas características usadas en su clasificación por ciertos autores como es el caso de tamaño de conidios y septación de conidios (Figura 12). En general, se puede decir que *Fusarium* es un género de hifomiceto moniliáceo con las siguientes características principales: micelio y conidióforos hialinos, pudiendo éstos ser ramificados y terminando en mechones o esporodóquios de fialides, las cuales dan origen a varios tipos de conidios: macroconidios con uno o varios septos transversales, hialinos, fusoides, acrógenos y

frecuentemente pedicelados; microconidios también hialinos, generalmente sin septos, producidos aisladamente, formando cabezas húmedas o en cadenas; y, clamidósporas terminales o intercalares, unicelulares o con septo y paredes gruesas (TOTORA; FUNKE; CASE, 2005).

El género *Aschersonia* se encuentra predominantemente en hábitats tropicales y subtropicales e infecta moscas blancas o insectos, presumiblemente por la germinación y penetración directa de conidios adheridos a la cutícula del huésped (MEEKES; FRANSEN; VAN-LENTEREN, 2002). El carácter más distintivo de este género puede ser el estroma tuberculado naranja rojizo (Figura 13), sin embargo, según LIU, CHAVERRI y HODGE (2006) pueden presentar diferentes formas conidiales, incluyendo la forma fusoloide. El aislado GW, en las condiciones cultivadas, no presentó la presencia de estroma, pero cultivos en condiciones específicas para la caracterización morfológica deben ser realizados.



Fuente: LIU; CHAVERRI; HODGE (2006)

Figura 13: Estroma tuberculado naranja rojizo característico del género *Aschersonia*. (Cultivo de *Hypocrella liberia/A. aleyrodis*)

Con respecto a los análisis moleculares, la región ITS forma parte del gen del ADN ribosómico y corresponde a la región más estudiada para identificación de hongos a nivel de género y, a menudo, a nivel de especie porque tiene una tasa de evolución rápida en eucariotas (BRIEN et al., 1987), no obstante la secuencia de esta región no fue suficiente para la identificación a nivel de especie en GU, DF y GW (Figura 11). WAALWIJK *et al.* (1996) destacan que la región ITS puede no ser eficaz para la identificación del género *Fusarium*, debido a la presencia de dos copias no homologas dentro de la región, causando divergencia en

los resultados. La región más utilizada para ese género es factor de elongación 1- α o TEF-1 α .

El género *Fusarium* abarca una gran proporción hongos filamentosos, que están ampliamente distribuidos en el suelo y asociados con plantas en todo el mundo (SRIVASTAVA; KADOOKA; UCHIDA, 2018). En estas relaciones simbióticas, los hongos se destacan como patógenos de cultivos ornamentales y agrícolas de importancia económica, con alta sobrevivencia en el ambiente. Los hongos de este género secretan enzimas homologas a las arilamina N-acetiltransferasa (NAT) de humanos, responsables por detoxificar el compuesto de defensa 2-benzoxazolinona producida por las plantas (KARAGIANNI et al., 2015). Al estar presentes en los hongos de este género, estas enzimas extracelulares pueden actuar en la N-acetilación fúngica, que permite la detoxificación de las aminas aromáticas de la ATZ (KUBIAK et al., 2013; LIMA et al., 2018).

7 CONCLUSIÓN

No fue posible establecer un método de selección eficiente para hongos con potencial de degradar atrazina al no existir una relación entre degradación de la ATZ, producción de biomasa y producción de lacase, no obstante, el análisis cuantitativo de la degradación de atrazina mostró resultados claros de degradación, por ello todos los hongos fueron sometidos a análisis cromatográficos. Además, este primer ensayo permitió conocer otros factores tal como la ausencia de la influencia del proceso de esterilización sobre la degradación del herbicida y la necesidad de adoptar un protocolo de limpieza más riguroso para realizar los análisis cromatográficos.

En este estudio, el potencial de degradación de ATZ fue analizado en términos de formación de DEA. Se realizó el análisis taxonómico de los hongos productores de DEA – DF, IB, GW y GU –, usando características morfológicas, como la presencia de estructuras tipo “foice”, y moleculares, al analizar la similaridad de las especies de interés con las depositadas en los bancos de datos, considerando la información proporcionada por la secuencia de ADN ribosomal ITS1 e ITS4. Los aislados GU y DF pertenecen al género *Fusarium*, GW presentó proximidad filogenética con el género *Fusarium* y *Aschersonia*, pudiendo tratarse de una especie aún no descrita, e IB no fue considerado para el análisis filogenético por la baja calidad de la secuenciación. Los aislados son candidatos a asociación en consorcios microbianos para lograr la mineralización de la atrazina, alcanzando el objetivo de biorremediación.

ANEXOS

Anexo 1: Valores de la razón del área de ATZ, DIA y DEA obtenidos en el GC-MS

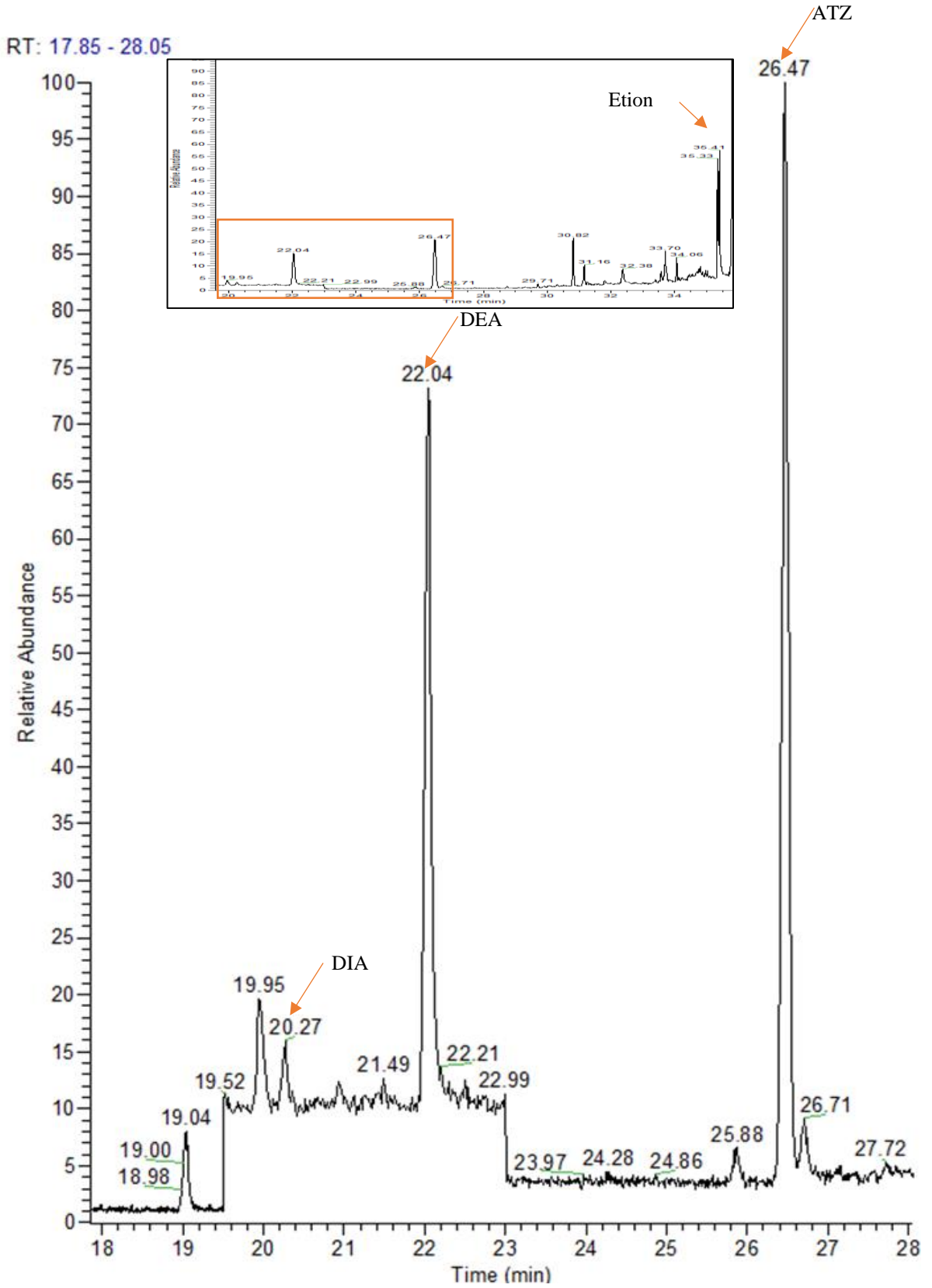
Tratamiento	Réplica	Subréplica	ATZ		DEA		DIA	
			Área Ratio	\bar{X}	Área Ratio	\bar{X}	Área Ratio	\bar{X}
Control	1	A	1.69		0.06		0.12	
	2	A	1.69		0.03		0.06	
GW	1	A	1.89	1.78	0.03	0.03	1.51	2.37
		B	1.67		0.04		3.24	
	2	A	0.71	1.27	0.04	0.07	0.04	0.07
		B	1.84		0.10		0.10	
	3	A	1.31	1.60	0.64	0.77	0.06	0.08
		B	1.89		0.90		0.09	
GU	1	A	1.93	2.09	0.81	0.96	0.09	0.11
		B	2.26		1.11		0.12	
	2	A	1.66	1.50	0.42	0.28	0.06	0.06
		B	1.35		0.14		0.06	
	3	A	1.61	1.56	0.08	0.06	0.06	0.06
		B	1.51		0.05		0.06	
IB	1	A	1.99	1.91	0.05	0.04	0.09	0.09
		B	1.84		0.04		0.08	
	2	A	1.14	1.49	0.20	0.26	0.06	0.07
		B	1.84		0.32		0.09	
	3	A	1.74	1.55	ND		0.15	0.12
		B	1.36		ND		0.09	
Control	1	A	3.44	3.35	ND		0.10	0.10
	2	A	3.85		0.01		0.13	
	3	A	2.77		ND		0.08	
	1	A	4.14	4.13	ND		0.11	0.11
		B	4.12		ND		0.12	
	NH	2	A	2.15	2.13	ND		0.07
B			2.12		ND		0.06	
3		A	1.21	1.85	ND		0.04	0.05
		B	2.50		ND		0.07	
1		A	2.78	2.48	ND		0.10	0.09
		B	2.18		ND		0.07	
IC	2	A	3.02	2.88	ND		0.10	0.44
		B	2.74		ND		0.78	
	3	A	2.98	3.09	ND		0.09	0.10
		B	3.19		ND		0.10	
	1	A	2.07	2.62	0.05	0.05	0.12	0.14
		B	3.16		ND		0.17	
DF	2	A	3.31	3.44	0.04	0.04	0.16	0.16
		B	3.57		ND		0.16	
	3	A	3.30	3.42	ND	0.12	0.24	0.25
		B	3.53		0.12		0.26	

Tratamiento	Réplica	Subréplica	ATZ		DEA		DIA	
			Área Ratio	\bar{X}	Área Ratio	\bar{X}	Área Ratio	\bar{X}
Control	1	A	4.37	3.43	ND		0.10	0.08
	2	A	3.18		ND		0.06	
	3	A	2.75		ND		0.09	
BP	1	A	3.92	3.50	ND		0.15	0.13
		B	2.98		ND		0.11	
		C	3.59		ND		0.13	
	2	A	2.42	2.55	ND		0.04	0.05
		B	2.67		ND		0.06	
		3	A	3.33	3.27	ND		0.06
BO	1	B	3.20		ND		0.06	
		A	3.16	2.96	ND		0.13	0.28
		B	2.75		ND		0.43	
	2	A	2.85	2.99	ND		0.10	0.10
		B	3.12		ND		0.09	
		3	A	5.03	4.84	ND		0.11
AD	1	B	4.65		ND		0.11	
		A	3.02	3.45	ND		0.10	0.10
		B	3.87		ND		0.10	
	2	A	3.37	4.11	ND		0.18	0.42
		B	3.17		ND		0.15	
		C	5.79		ND		0.94	
3	A	3.67	3.08	ND		0.23	0.35	
	B	2.46		ND		0.17		
	C	3.10		ND		0.66		

*La razón del área resulta el área del analito dividida por el área del etion (patrón interno).

*ND se refiere a analito no detectado por el GC - MS

Anexo 2: Cromatogramas mostrando la DIA, DEA, ATZ y etion a los 20.27, 22.04, 26.46 y 35.41 min (recuadro superior), respectivamente.



Anexo 3: Blast de la secuencias de IB en la base de datos del CBS. La similaridad de la secuencia de interés con las secuencias en el banco de datos no supera el 97%.

Pairwise Results		Clustering results							
#	Reference description	Score	Probability	Similarity%	Fragments	Overlap%	Direction	Rating	
▶ 1	CBS 633.76 >gb - AF310982 - BBA 63665 - Fusarium lateritium strain BBA 63665 18S ribosomal RNA gene partial sequence; internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene partial sequence Fusarium lateritium var. longum, New Zealand, n3; rDNA sequences ITS FunCBS	409.042	4.33176E-113	97.193	1	97.27	+/+	***	
▶ 2	CBS 633.76 CBS 633.76_ex24394_14004_ITS Fusarium lateritium var. longum, New Zealand, nlink4056; publicly available rDNA ITS sequences FunCBS	409.042	4.33176E-113	97.193	1	97.27	+/+	***	
▶ 3	CBS 633.76 >gb - AF310982 - BBA 63665 - Fusarium lateritium strain BBA 63665 18S ribosomal RNA gene partial sequence; internal transcribed spacer 1 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2 complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene partial sequence Fusarium lateritium var. longum, New Zealand, n1; rDNA sequences 26S FunCBS	409.042	4.33176E-113	97.193	1	97.27	+/+	***	
▶ 4	CBS 633.76 AF310982 Fusarium lateritium var. longum, New Zealand, n1; rDNA sequences 26S FunCBS	409.042	4.33176E-113	97.193	1	97.27	+/+	***	

Anexo 3: Blast de la secuencias de IB en la base de datos del NCBI. La similaridad de la secuencia de interés con las secuencias en el banco de datos no supera el 97%, además el valor E-value es diferente de cero.

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Uncultured fungus clone TH82 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	483	483	100%	2e-132	97%	JF300445.1
<input type="checkbox"/>	Fungal sp. P25E5 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	483	483	100%	2e-132	97%	JN207306.1
<input type="checkbox"/>	Fungal sp. P17E2 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	483	483	100%	2e-132	97%	JN207292.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium sp. strain MRC 35 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	481	481	100%	6e-132	97%	MH582472.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium oxysporum isolate FusAD internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	481	481	100%	6e-132	97%	MH938065.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium lateritium var. longum strain CBS 633.76 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	481	481	100%	6e-132	97%	MH861014.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium chlamydosporum isolate M29 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	481	481	100%	6e-132	97%	MG748660.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium chlamydosporum strain AY998 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	481	481	100%	6e-132	97%	MG250447.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium chlamydosporum isolate CA116F1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	481	481	100%	6e-132	97%	KX421423.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium chlamydosporum isolate CA219F1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	481	481	100%	6e-132	97%	KX421422.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium chlamydosporum isolate CA113F1 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	481	481	100%	6e-132	97%	KX421421.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium sp. FSSC isolate F112 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	481	481	100%	6e-132	97%	KU950737.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium chlamydosporum strain UFSM-F7 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	481	481	100%	6e-132	97%	KC778406.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium chlamydosporum strain UFSM-F6 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	481	481	100%	6e-132	97%	KC778405.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium chlamydosporum isolate UFSM - F5 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	481	481	100%	6e-132	97%	KC758963.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium chlamydosporum strain UFSM-F1 internal transcribed spacer 1, partial sequence; 5.8S ribosomal RNA gene and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and large subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	481	481	100%	6e-132	97%	KC662466.1
<input type="checkbox"/>	Sporothrix sp. SS-2011a 5.8S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	481	481	100%	6e-132	97%	JF332144.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium sp. NSC-12 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	481	481	100%	6e-132	97%	GU257905.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium sp. NRRL 43631 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	481	481	100%	6e-132	97%	GQ505459.1
<input type="checkbox"/>	Fusarium sp. NRRL 28578 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence	481	481	100%	6e-132	97%	GQ505437.1

REFERENCIAS

- ADAPAR. AGÊNCIA DE DEFESA AGROPECUÁRIA DO PARANÁ. **Lista de agrotóxicos aptos para comércio e uso no Paraná**. 15 mayo 2018. Disponible en: <<http://www.adapar.pr.gov.br/arquivos/File/GAT/lista.pdf>>. Acceso en: 22 de mayo 2018
- ACKERMAN, F.; WHITED, M.; KNIGHT, P. Would banning atrazine benefit farmers? **International Journal of Occupational and Environmental Health**, v. 20, n. 1, p. 61–70, 2014.
- ANDLEEB, S.; JIANG, Z.; REHMAN, K. ur; OLAJIDE, E. K.; YING, Z. Influence of Soil pH and Temperature on Atrazine Bioremediation. **Journal of Northeast Agricultural University**, v. 23, n. 2, p. 12-19, 2016.
- ATRAZINA, Nortox 500 SC. **Prescripción de agrotóxico**. 2017. Disponible en: <<http://www.nortox.com.br/wp-content/uploads/2017/05/Atrazina-Nortox-500-SC-BulaVER-04-17.08.2017.pdf>>. Acceso en: 20 mayo 2018.
- BALDRIAN, P. Fungal laccases - occurrence and properties. **FEMS Microbiol Rev**, v. 30, p. 215–242, 2006.
- BALTIERRA-TREJO, E.; MÁRQUEZ-BENAVIDES, L.; SÁNCHEZ-YÁÑEZ, J. M. Inconsistencies and ambiguities in calculating enzyme activity : The case of laccase. **Journal of Microbiological Methods**, v. 119, p. 126-131, 2015.
- BASTOS, A. C.; MAGAN, N. International Biodeterioration & Biodegradation Trametes versicolor : Potential for atrazine bioremediation in calcareous clay soil , under low water availability conditions. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v. 63, p. 389–394, 2009.
- BENDING, G. D.; FRILLOUX, M.; WALKER, A. Degradation of contrasting pesticides by white rot fungi and its relationship with ligninolytic potential. **FEMS Microbiology Letters**, v. 212, n. 1, p. 59–63, 2002.
- BONUGLI-SANTOS *et al*, 2016. Enhanced textile dye decolorization by marine-derived basidiomycete *Peniophora* sp. CBMAI 1063 using integrated statistical design. **Environmental Science and Pollution Research.**, 2016.
- BONUGLI-SANTOS, R. C.; DURRANT, L. R.; SETTE, L. D. Laccase activity and putative laccase genes in marine-derived basidiomycetes. **Fungal biology**, v. 114, n. 10, p. 863-872, 2010
- BOURBONNAIS, R.; PAICE, M. G. Veratryl alcohol oxidases from the lignin-degrading basidiomycete *Pleurotus sajor-caju*. **Biochem. J.**, 255, 445-450, Gran Bretaña, 1988
- BRAUNS, B. et al. Pesticide use in the wheat-maize double cropping systems of the North China Plain: Assessment, field study, and implications. **Science of the Total Environment**, v. 616–617, p. 1307–1316, 2018.
- BRIEN, H. E. O. et al. St. Louis' battle of the vans. **Profiles in hospital marketing**, v. 71, n. 28, p. 68–71, 1987.
- BUMPUS, J. A.; BROCK, B. J. Biodegradation of Crystal Violet by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 54, n. 5, p.

1143–1150, 1988.

BUSWELL, J. K. et al. Effect of nutrient nitrogen on manganese peroxidase and lacase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. **FEMS Microbiology Letters**, 128, 81–88, 1995.

CAPRE. COMITÉ COORDINADOR REGIONAL DE INSTITUCIONES DE AGUA POTABLE Y SANEAMIENTO DE CENTROAMÉRICA, PANAMÁ Y REPÚBLICA DOMINICANA. **Normas de Calidad del Agua para consumo humano**. 1. ed., San Jose Costa Rica, 1994. 27 p. Disponible en: <http://biblioteca.enacal.com.ni/bibliotec%5CLibros%5Cpdf%5CCAPRE_Normas_Regional.pdf>. Acceso en: 9 mayo 2018

CAVIGLIONE, J. H. et al. **Cartas climáticas do Paraná**. Londrina, IAPAR, 2000. Disponible en: <<http://www.iapar.br/pagina-677.html>>. Acceso en: 3 jul. 2018.

CHAN-CUPUL, W.; HEREDIA-ABARCA, G.; RODRÍGUEZ-VÁZQUEZ, R. Atrazine degradation by fungal co-culture enzyme extracts under different soil conditions. **JOURNAL OF ENVIRONMENTAL SCIENCE AND HEALTH, PART B**, v. 0, n. 0, p. 1–11, 2016.

COELHO, E. R. C.; BERNARDO, L. Di. Presença e remoção de atrazina, desetilatrizona, desisopropilatrizona e desetilhidroxiatrizona em instalação piloto de ozonização e filtração lenta. **Engenharia Sanitaria e Ambiental**, v. 22, n. 4, p. 789–796, 2017.

CONAMA. CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE. Resolução n° 357, 18 de março de 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, n. 053, 18 mar. 2005. p. 58-63. Disponible en: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=459>>. Acceso en: 22 mayo 2018.

CONAMA. Resolução n° 396, 3 de abril de 2008. Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, n. 66, 7 abr. 2008. p. 64-68. Disponible en: <<http://www.mma.gov.br/port/conama/legiabre.cfm?codlegi=562>>. Acceso en: 22 mayo 2018.

COSTA RICA. Decretos N° 32327-S, del 3 de mayo del 2005. Se decreta: Reglamento para la Calidad del Agua Potable. **La Gaceta No. 84**, 2005. Disponible en: <http://www.ministeriodesalud.go.cr/gestores_en_salud/comision_agua_segura/legislacion/CAS_reglamento_calidad_agua_potable.pdf>. Acceso en: 20 mayo 2018.

CRAWFORD, J. J.; SIMS, G. K.; RADOSEVICH, M. Biodegradation of atrazine under denitrifying conditions. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 49, p. 618–623, 1998.

DELLA-FLORA, A. et al. Fast, cheap and easy routine quantification method for atrazine and its transformation products in water matrixes using a DLLME-GC/MS method. **Analytical Methods**, 2018. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018.

DESHMUKH, R.; KHARDENAVIS, A. A.; PUROHIT, H. J. Diverse Metabolic Capacities of Fungi for Bioremediation. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 3, p. 247–264, 2016.

DEVERS, M.; ROUARD, N.; MARTIN-LAURENT, F. Genetic rearrangement of the atzAB atrazine-degrading gene cassette from pADP1 :: Tn 5 to the chromosome of *Variovorax* sp. MD1 and MD2. **Gene**, v. 392, p. 1–6, 2007.

DRPSA. DEPARTAMENTO DE REGULACIÓN DE LOS PROGRAMAS DE SALUD Y

AMBIENTE. **Norma Guatemalteca Obligatoria Agua Potable**. 1. ed. Guatemala, sep. 2003. 20 p. Disponible en: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/e/normas2/Norma-Gua.pdf>>. Acceso en: 9 mayo 2018.

DUQUE, C. D. C. **Efeito de borda em fungos da Mata Atlântica Semidecidual**. 2016. 52 páginas. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas – Ecologia e Biodiversidade) – Universidade Federal da Integração Latino-Americana, Foz do Iguaçu, 2016. 49 p.

DURAIRAJ, P. et al. Fungal cytochrome P450 monooxygenases of *Fusarium oxysporum* for the synthesis of ω -hydroxy fatty acids in engineered *Saccharomyces cerevisiae*. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 45, p. 1–16, 2015.

ENTRY, J. A.; MATTSON, K. G.; EMMINGHAM, W. H. The influence of nitrogen on atrazine and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid mineralization in grassland soils. **Biology and Fertility of Soils**, v. 16, p. 179–182, 1993.

FAN, X.; SONG, F. Bioremediation of atrazine: recent advances and promises. **Journal of Soils and Sediments**, v. 14, p. 1727–1737, 2014.

FELSENSTEIN, J. Límites de confianza en las filogenias: una aproximación utilizando el bootstrap. *Evolución* 39: 783-791., 1985.

FLORA, A. DELLA. **Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de atrazina e seus principais produtos de transformação nas águas superficiais da Bacia Hidrográfica do Paraná 3**. Dissertação De Mestrado, Porto Alegre, 2018. 118 p.

GAGO-FERRERO, P. et al. Science of the Total Environment Evaluation of fungal- and photo-degradation as potential treatments for the removal of sunscreens BP3 and BP1. **Science of the Total Environment**, v. 427–428, p. 355–363, 2012.

GAZZIERO, D. L. P. et al. **Tabela periódica dos herbicidas**. Embrapa soja 2004. Disponible en: <<https://www.embrapa.br/soja/busca-de-publicacoes/-/publicacao/466653/tabelaperiodica-dos-herbicidas> Revisado en 08/05/2017>. Acceso en: 08 mayo 2017

GIANFREDA, L.; RAO, M. A. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils : a review. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 35, p. 339-354, 2004

GOBIERNO AUSTRALIANO, Revisión de atrazina - Informe técnico: Evaluación ambiental. Disponible en: <<https://apvma.gov.au/node/14356>>. Acceso en: 30 nov 2018.

HALL, T.A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucl. Acids. Symp. Ser.* 41:95-98.

HANSEN, A. M. et al. Atrazina: Un herbicida polémico. **Revista Internacional de Contaminacion Ambiental**, v. 29, n. SPEC.ISSUE, p. 65–84, 2013.

HARMS, H.; SCHLOSSER, D.; WICK, L. Y. Untapped potential: exploiting fungi in bioremediation of hazardous chemicals. **Nature Reviews | Microbiology**, v. 9, p. 177–192, 2011.

HE, X. et al. Chemosphere Biodegradation of neonicotinoid insecticide, imidacloprid by restriction enzyme mediated integration (REMI) generated *Trichoderma mutants*. **Chemosphere**, v. 112, p. 526–530, 2014.

HEAP, I. The International Survey of Herbicide Resistant Weeds. [2018?] Disponible en: <<http://www.weedscience.org/Summary/ResistByActive.aspx>>. Acceso en: 8 de mayo 2018

HENN, C. **Seleção de linhagens de basidiomicetos resistentes aos herbicidas atrazina e diurom– produção de enzimas ligninolíticas e degradação dos compostos.** São José do Rio Preto – SP, 2009. 115 p.

HONDURAS et al. **Norma Técnica Nacional para la Calidad del Agua Potable.** Tegucigalpa, 1995. 42p. Disponible en: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsacg/e/cdcagua/normas/lac/11.HON/01.norma.pdf>>. Acceso en: 9 mayo 2018.

HRAC. HERBICIDE RESISTANCE ACTION COMITE. **The World of Herbicides According to HRAC classification on mode of action.** 2010. Disponible en: <<http://hracglobal.com/tools/world-of-herbicides-map>>. Acceso en: 8 de mayo 2018.

HUANG, M. T. et al. Rice (*Oryza sativa*) Laccases Involved in Modification and Detoxification of Herbicides Atrazine and Isoproturon Residues in Plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, p. 6397–6406, 2016.

IBAMA. INSTITUTO BRASILEIRO DO MEDIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURALES RENOVÁVEIS. **Consumo de agrotóxicos e afins (2000 - 2016).** 17 oct. 2017a. Disponible en: <<http://www.ibama.gov.br/phocadownload/qualidadeambiental/relatorios/2016/graficoconsumo-agrotoxicos-2000-2016.pdf>>. Acceso en: 8 mayo 2018.

IBAMA. **Plano de Manejo do Parque Nacional do Iguaçu.** 1999. Disponible en: http://www.cataratasdoiguacu.com.br/manejo/siuc/planos_de_manejo/pni/html/index.htm. Acceso en: 3 jul. 2018.

IBAMA. **Os 10 ingredientes ativos mais vendidos – 2016.** 16 nov. 2017b. Disponible en: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acceso en: 8 mayo 2018.

IBAMA. **Vendas de agrotóxicos e afins no Brasil no período de 2000 a 2016.** 16 nov. 2017c. Disponible en: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acceso en: 8 mayo 2018.

IBAMA. **Vendas por classes de usos dos produtos formulados – 2016.** 16 nov. 2017d. Disponible en: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acceso en: 8 mayo 2018.

IBAMA. **Vendas por classes de uso dos produtos formulados – 2016 (por unidade federativa).** 16 nov. 2017e. Disponible en: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatoriosde-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acceso en: 8 mayo 2018.

IBAMA. **Vendas de ingredientes ativos por unidade da federação – 2016.** 16 nov. 2017f. Disponible en: <<http://www.ibama.gov.br/agrotoxicos/relatorios-de-comercializacao-de-agrotoxicos>>. Acceso en: 8 mayo 2018.

IKEHATA, K.; BUCHANAN, I. D.; SMITH, D. W. REVIEW / SYNTHÈSE Recent developments in the production of extracellular fungal peroxidases and laccases for waste treatment. **J. Environ. Eng. Sci.**, v. 3, p. 1–19, 2004.

INEN. INSTITUTO ECUATORIANO DE NORMALIZACIÓN. Agua Potable. Requisitos. 5 ed. Quito, 2014. 10 p. Disponible en: <<http://www.pudeleco.com/files/a16057d.pdf>>. Acceso en: 9 mayo 2018.

- INOUE, M. H. et al. Critérios para avaliação do potencial de lixiviação dos herbicidas comercializados no estado do Paraná. **Planta Daninha**, v. 21, n. 2, p. 313–323, 2003.
- IUPAC. INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY. PPDB: Pesticide Properties DataBase. Atrazina (Ref: G 30027). 28 mar. 2018. Disponible en: <<http://sitem.herts.ac.uk/aeru/footprint/es/Reports/43.htm>>. Acceso en: 18 may. 2018.
- JEFFERY, S.; BURGESS, L. W. Growth of *Fusarium graminearum* Schwabe group 1 on media amended with atrazine, chlorsulfuron or glyphosate in relation to temperature and osmotic potential. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 22, n. 5, p. 665–670, 1990.
- KARAGIANNI, E. P. et al. Homologues of xenobiotic metabolizing N-acetyltransferases in plant-associated fungi: Novel functions for an old enzyme family. **Scientific Reports**, v. 5, n. August, p. 1–14, 2015.
- KARIGAR, C. S.; RAO, S. S. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants : A Review. **Enzyme Research**, p. 11, 2011.
- KAUFMAN, D. D.; BLAKE, J. Degradation of atrazine by soil fungi. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 2, n. 2, p. 73–80, 1970.
- KAUFMAN, D. D.; KEARNEY, P. C.; SHEETS, T. J. Microbial Degradation of Simazine Microbial. **J. Agr. Food Chem.**, v. 13, n. 3, p. 238–242, 1965.
- KIMURA, M. Un método simple para estimar la tasa evolutiva de sustituciones de bases a través de estudios comparativos de secuencias de nucleótidos. **Diario de la evolución molecular** 16: 111-120p., 1980.
- KOENIG, A.; MAGNOLON, S.; ECOLE, C. W. A comparative study of ballpoint ink ageing parameters using GC / MS. **Forensic Science International**, v. 252, p. 93–106, 2015.
- KOSKINEN, W. C.; CLAY, S.A. Factors affecting atrazine fate in north central U.S. soils. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 151, p. 118–165, 1998.
- KRUTZ, L. J. et al. Agronomic and environmental implications of enhanced s -triazine degradation. **PestManag Sci**, v. 66, n. February, p. 461–481, 2010.
- KUBIAK, X. et al. Crystal structure of arylamine N -acetyltransferases : insights into the mechanisms of action and substrate selectivity. **Expert Opin. Drug Metab. Toxicol**, v. 9, n.3, p. 349–362, 2013.
- KULSHRESHTHA, S.; MATHUR, N.; BHATNAGAR, P. Mushroom as a product and their role in mycoremediation. **AMB Express**, v. 4, n. 29, p. 1–7, 2014.
- KUMAR, S.; STECHER G.; TAMURA K. MEGA7: Análisis de genética evolutiva molecular versión 7.0 para conjuntos de datos más grandes. **Biología molecular y evolución** 33: 1870-1874p., 2016.
- LERCH, R. N.; BLANCHARD, P. E.; THURMAN, E. M. Contribution of Hydroxylated Atrazine Degradation Products to the Total Atrazine Load in Midwestern Streams. v. 32, n. 1, p. 40–48, 1998.
- LEVANON, D. Roles of fungi and bacteria in the mineralization of the pesticides atrazine, alachlor, malathion and carbofuran in soil. **Soil Biology and Biochemistry**, v. 25, n. 8, p. 1097–1105, 1993.
- LIMA, D. P. De et al. AC SC. Fungal Bioremediation of Pollutant Aromatic Amines. **Current**

Opinion in Green and Sustainable Chemistry, 2018.

LIU, M.; CHAVERRI, P.; HODGE, K. T. A taxonomic revision of the insect biocontrol fungus *Aschersonia aleyrodis*, its allies with white stromata and their *Hypocrella* sexual states. **Mycological Research**, v. 110, n. 5, p. 537–554, 2006.

MACHADO, K. C. et al. A preliminary nationwide survey of the presence of emerging contaminants in drinking and source waters in Brazil. **Science of the Total Environment**, v. 572, p. 138–146, 2016.

MAPA. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA PECUÁRIA Y ABASTECIMENTO. Relatório de Produtos Formulados Marca Comercial Titular do Registro - VIVATAX THIRAM. p. 1-8, 2014.

MAQBOOL, Z. et al. Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 23, p. 16904–16925, 2016.

MARTINEZ, B. et al. Complete Nucleotide Sequence and Organization of the Atrazine Catabolic Plasmid pADP-1 from *Pseudomonas sp.* Strain ADP. **Journal of Bacteriology**, v. 183, n. 19, p. 5684-5697, 2001

MARINHO, G. et al. Potential of the filamentous fungus *Aspergillus niger* AN 400 to degrade Atrazine in wastewaters. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 9, n. October 2016, p. 162–167, 2017.

MARTINEZ, B. et al. Complete Nucleotide Sequence and Organization of the Atrazine Catabolic Plasmid pADP-1 from *Pseudomonas sp.* Strain ADP. **JOURNAL OF BACTERIOLOGY**, v. 183, n. 19, p. 5684–5697, 2001.

MASAPHY, S. et al. Isolation and Characterization of a Novel Atrazine Metabolite Produced by the Fungus Isolation and Characterization of a Novel Atrazine Metabolite Produced by the Fungus *Pleurotus pulmonarius*. **Bioresource Technology**. v. 59, n. 12, p. 6–11, 1993.

MEEKES, E. T. M., FRANSEN J. J., VAN-LENTEREN J. C. Pathogenicity of *Aschersonia* spp. against whiteflies *Bemisia argentifolii* and *Trialeurodes vaporariorum*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v. 81, p. 1–11, 2002.

MINISTERIO DE SALUD. **Reglamento de la Calidad del Agua para Consumo Humano**: DS N° 031-2010-SA. 1. ed., Lima, Dirección General de Salud Ambiental, feb. 2011. 44 p. Disponible en: http://www.digesa.minsa.gob.pe/publicaciones/descargas/Reglamento_Calidad_Agua.pdf. Acceso en: 9 mayo 2018.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Portaria No 2.914,12 de dezembro de 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. **Diário Oficial da União**, 12 dez. 2011. Disponible en: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt2914_12_12_2011.html. Acceso en: 22 mayo 2018.

MINUSSI, R. C.; PASTORE, M.; DURA, N. Laccase induction in fungi and laccase / N – OH mediator systems applied in paper mill effluent. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 158–164, 2007.

MIR-TUTUSAUS, J. A. et al. Can white-rot fungi be a real wastewater treatment alternative for organic micropollutants removal? A review. **Water Research**, v. 138, p. 137–151, 2018.

- MONTAGNER, C. C.; VIDAL, C.; ACAYABA, R. D. Contaminantes emergentes em matrizes aquáticas do Brasil: Cenário atual e aspectos analíticos, ecotoxicológicos e regulatórios. **Química Nova**, v. 40, n. 9, p. 1094–1110, 2017.
- MOORE, D. R. et al. A weight-of-evidence approach for deriving a level of concern for atrazine that is protective of aquatic plant communities. **Integrated Environmental Assessment and Management**, v. 13, n. 4, p. 686–701, 2017.
- MORENO, C. M. et al. Tratamientos biológicos de suelos contaminados : contaminación por hidrocarburos . Aplicaciones de hongos en tratamientos de biorrecuperación. **Rev Iberoam Micol**, v. 21, p. 103–120, 2004.
- MORENO, J. L. et al. Effects of atrazine on microbial activity in semiarid soil. v. 35, p. 120–127, 2007.
- NAM, S. W. et al. Adsorption characteristics of selected hydrophilic and hydrophobic micropollutants in water using activated carbon. **Journal of Hazardous Materials**, v. 270, p. 144–152, 2014.
- OLIVEIRA, B. R. et al. Biodegradation of pesticides using fungi species found in the aquatic environment. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 22, n. 15, p. 11781–11791, 2015.
- PEREIRA, P. M. Avaliação do potencial de fungos na degradação do herbicida atrazina. **Journal of Strategic Studies**, v. 34, n. 2, p. 281–293, 2011.
- POTTER, T. L. et al. Atrazine fate and transport within the coastal zone in southeastern Puerto Rico. **Marine Pollution Bulletin**, v. 67, n. 1–2, p. 36–44, 2013.
- RABINOVICH, M. L.; BOLOBOVA, A. V; VASIL, L. G. Fungal Decomposition of Natural Aromatic Structures and Xenobiotics: A Review. **Applied Biochemistry and Microbiology**. v. 40, n. 1, p. 1–17, 2004.
- RAEDER, U.; BRODA, P. Rapid preparation of DNA from filamentous fungi. **Letters in Applied Microbiology**, v. 1, p. 17–20, 1985.
- REPUBLICA DOMINICANA. Dec. No. 42-05. **Establece: Reglamento de Aguas para Consumo Humano**. 2005. Disponible en: <http://www.msp.gob.do/oai/Documentos/Decretos/DECR_4205_EstableceRegAguasConsumoHumano_20130127.pdf>. Acceso en: 9 mayo 2018.
- REZENDE, M. A. I. R. et al. Growth and production of laccases by the ligninolytic fungi , *Pleurotus ostreatus* and *Botryosphaeria rhodina* , cultured on basal medium containing the herbicide , Scepter ® (imazaquin). **J. Basic Microbiol.**, v. 45, n. 6, p. 460–469, 2005.
- ROJAS, R. et al. Enhancing soil sorption capacity of an agricultural soil by addition of three different organic wastes. **Science of the Total Environment**, v. 458–460, p. 614–623, 2013.
- SALAMUNI, R. et al. Parque Nacional do Iguaçu, PR - Cataratas de fama mundial. In: SCHOBENHAUS, C. et al. **C. Sítios Geológicos e Paleontológicos do Brasil**. 1. ed. Brasília, DNPM/CPRM - Comissão Brasileira de Sítios Geológicos e Paleobiológicos (SIGEP), 2002. p. 313-321. Disponible en: <<http://sigep.cprm.gov.br/sitio011/sitio011.htm>>. Acceso en: 2 jul. 2018
- SALAZAR-LEDESMA, M. et al. Mobility of atrazine in soils of a wastewater irrigated maize field. **Agriculture, Ecosystems and Environment**, v. 255, p. 73–83, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.agee.2017.12.018>>.

SAITOU, N.; NEI, M. El método de unión de vecinos: un nuevo método para reconstruir árboles filogenéticos. **Biología Molecular y Evolución** 4: 406-425p., 1987.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE. Monitoramento de agrotóxicos na água para consumo humano no Brasil, 2011. **Boletim Epidemiológico**, v. 44, n. 10, 2013. 24 p. Disponible en: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/periodicos/boletim_epidemiologico_numero_10_2013.pdf>. Acceso en: 22 mayo 2018.

SENE, L. et al. New aspects on atrazine biodegradation. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 2, p. 487–496, 2010.

SHAPIR, N. et al. MINIREVIEW Evolution of Catabolic Pathways : Genomic Insights into Microbial s -Triazine Metabolism. **Journal of Bacteriology**, v. 189, n. 3, p. 674–682, 2007.

SHARMA, B.; DANGI, A. K.; SHUKLA, P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. **Journal of Environmental Management**, v. 210, p. 10–22, 2018.

SINGH, B.; SINGH, K. Microbial degradation of herbicides. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 245–261, 2016.

SINGH, S. et al. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine. **Environmental Chemistry Letters**, v. 16, p. 211–237, 2018.

SODRÉ, F. F. et al. Seasonal and spatial distribution of caffeine, atrazine, atenolol and deet in surface and drinking waters from the brazilian federal district. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 29, n. 9, p. 1854–1865, 2018.

SOUSA, J. C. G. et al. A review on environmental monitoring of water organic pollutants identified by EU guidelines. **Journal of Hazardous Materials**, v. 344, p. 146–162, 2018.

SRIVASTAVA, S.; KADOOKA, C.; UCHIDA, J. Y. Fusarium species as pathogen on orchids. **Microbiological Research**, v. 207, n. December 2017, p. 188–195, 2018.

SUTHERLAND, T. D. et al. ENZYMATIC BIOREMEDIATION: FROM ENZYME DISCOVERY TO APPLICATIONS. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 31, p. 817–821, 2004.

TEDERSOO, L. et al. Global diversity and geography of soil fungi. **Science**, v. 346, n. 6213, 2014.

TORTORA, G. J. ; FUNKE, B. R. ; CASE, C. L. **Microbiologia**, 8ª ed. , Porto Alegre; Artemed, 2005.

UNESCO. ORGANIZACIÓN DE LAS NACIONES UNIDAS PARA LA EDUCACIÓN, LA CIENCIA Y LA CULTURA. **World Heritage List-Iguaçu National Park**. World Heritage Centre. 2018. Disponible en: <<http://whc.unesco.org/en/list/355/>>. Acceso en: 2 jul. 2018.

UNIÓN EUROPEA. Directiva 98/83/CE del Consejo, 3 de noviembre de 1998. Relativa a la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. Diario Oficial de la Unión Europea, 1998. p. 32. Disponible en: <<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:31998L0083&from=EN>>. Acceso en: 9 mayo 2018.

UNIÓN EUROPEA. Directiva 2006/118/CE del Parlamento Europeo y del Consejo, 12 de

Diciembre de 2006. Relativa a la protección de las aguas subterráneas contra la contaminación y el deterioro. **Diario Oficial de la Unión Europea**, 27 dic. 2006. p. 19. Disponible en: <<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32006L0118&from=ES>>. Acceso en: 9 mayo 2018.

UNIÓN EUROPEA. Modificación de las Directivas 2000/60/CE y 2008/105/CE en cuanto a las sustancias prioritarias en el ámbito de la política de aguas. Directiva 2013/39/UE del Parlamento Europeo y del Consejo, 12 de agosto de 2013. **Diario Oficial de la Unión Europea**. 24 ago. 2013. Disponible en: <<https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32013L0039&from=ES>>. Acceso en: 9 mayo 2018.

UNIT. INSTITUTO URUGUAYO DE NORMAS TÉCNICAS. **Agua potable** – Requisitos. Montevideo, 2008 (impresión corregida en 2010). 15p. Disponible en: <http://www.ose.com.uy/descargas/clientes/reglamentos/unit_833_2008_.pdf>. Acceso en: 9 mayo 2018.

USEPA. UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. **National primary drinking water regulations**. mayo 2009. Disponible en: <https://www.epa.gov/sites/production/files/201606/documents/npwdr_complete_table.pdf>. Acceso en: 9 mayo 2018

WAALWIJK *et al.* (1996)

WANG, H. et al. Ecotoxicology and Environmental Safety Augmenting atrazine and hexachlorobenzene degradation under different soil redox conditions in a bioelectrochemistry system and an analysis of the relevant microorganisms. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 147, n. September 2017, p. 735–741, 2018.

WEBER, R. W. S.; PITT, D. Teaching techniques for mycology: 11. Riddell's slide cultures. **Mycologist**, v. 14, n. 3, p. 118–120, 2000.

WHITE, T.J. et al. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In PCR Protocols: A guide to Methods and Applications (ed. M. A. Innis, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky & T. J. White), pp. 322. Academic Press: San Diego, U.S.A, 1990.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Atrazine in Drinking-water**. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. Health criteria and other supporting information, 2 ed., v. 2, 1996. 5p. WHO. A global overview of national regulations and standards for drinking-water quality. Geneva, 2018.

WHO. A global overview of national regulations and standards for drinking-water quality. Geneva, 2018.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). Atrazine in Drinking-water Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality. **Health criteria and other supporting information**, v. 2, p. 1–5, 1996.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION). A global overview of national regulations and standards for drinking-water quality. n. Geneva, 2018.

WRIGHT, J. E.; WRIGHT, A. M. Checklist of the Mycobiota of Iguazú National Park (Misiones , Argentina). **Bol. Soc. Argent. Bot.**, v. 40, p. 1–22, 2005.

WSSA. WEED SCIENCE SOCIETY OF AMERICA. **Herbicide Site of Action (SOA) Classification List**. 16 ago. 2017. Disponible en: <<http://wssa.net/wssa/weed/herbicides/>>.

Acceso en: 8 mayo 2018

WU, J. et al. Remediation of soil contaminated with decabrominated diphenyl ether using white rot fungi. **Journal of Environmental Engineering and Landscape Management**, v. 21, n. 3, p. 171–179, 2013.

YANZE-KONTCHOU, C.; GSCHWIND, N. Mineralization of the Herbicide Atrazine as by a *Pseudomonas* Strain. **Applied and Environmental Microbiolog.** v. 60, n. 12, p. 4297–4302, 1994.

YAROLOV, A. I. et al. La cease. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 49, p. 257–280, 1994.

YUECHUN, Z. et al. Biodegradation Kinetics of DDT in Soil under Different Environmental Conditions by Laccase Extract from White Rot Fungi. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 18, n. 3, p. 486–492, 2010. Disponible em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1004-9541\(10\)60247-9](http://dx.doi.org/10.1016/S1004-9541(10)60247-9)>.

ZENG et al. **Atrazine Pathway Map**. 2017. Disponible en: <http://eawag-bbd.ethz.ch/atr/atr_map.html>. Acceso en: 17 mayo 2018.