

Comparación de procesos de biorremediación para degradación de una mezcla de Boscalid, Bifentrina y Fenvalerato.

Comparison of bioremediation processes to degradate a mixture of Boscalid, Bifentrine and Fenvalerate.

§¹María Alexandra Zambrano Vargas, ²Adriana Saldaña Robles, ³César Díaz Pérez, ²Rogelio Costilla Salazar, ²Graciela M.L. Ruiz Aguilar.

¹Estudiante de Maestría en Biociencias.

²Profesores, División de Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, Universidad de Guanajuato. Carretera Irapuato-Silao Km. 9, Irapuato, Gto.

³División de Ciencias de la Salud e Ingenierías, Campus Celaya-Salvatierra, Universidad de Guanajuato. Privada de Arteaga S/N, Col. Centro, Salvatierra, Gto. §Autor Responsable ing.alexandrazv@gmail.com *Autor para correspondencia gracielar@ugto.mx

RESUMEN. La degradación del suelo es uno de los mayores problemas en la agricultura debido a sus malas prácticas, sobrexplotación y el uso constante de productos agroquímicos para acelerar la producción y eliminar las plagas que los atacan. Existen técnicas de biorremediación (bioestimulación y bioaumentación) las cuales se han aplicado para la reducción de diferentes compuestos orgánicos tóxicos. Esta investigación se enfoca en la biorremediación de un suelo contaminado aplicando los procesos de bioestimulación y de la combinación de los procesos de bioestimulación-bioaumentación. Los experimentos se llevaron a cabo en charolas de 2 Kg con suelo arcilloso, el cual se contaminó con boscalid, bifentrina y fenvalerato. Para la bioaumentación se utilizó un consorcio microbiano aislado de la presa El Bote, en el estado de Zacatecas, el cual se encuentra contaminado con metales pesados. Para el proceso de bioestimulación los factores se eligieron basándose en las funciones de los macronutrientes y la relación óptima carbono, nitrógeno y fosforo (C/N/P) para suelo. Se determinó el porcentaje de remoción de estos plaguicidas a partir al diseño experimental factorial fraccionado 2^{3-1} establecido. El proceso de biorremediación duró 30 días y se ajustó la humedad entre el 20 al 25% durante todo este tiempo. Los resultados indican que la combinación de los procesos de bioestimulación-bioaumentación generan una remoción del 7% para bifentrina, 16% para boscalid y 11% para fenvalerato, en el tratamiento con la concentración baja de contaminantes y con la adición de microorganismos.

Palabras claves: Bioestimulación, Bioaumentación, Plaguicidas.

INTRODUCCIÓN

El suelo, a través de su poder de amortiguación o desactivación natural de la contaminación, filtra, almacena, degrada, neutraliza e inmoviliza sustancias orgánicas e inorgánicas tóxicas, impidiendo que alcancen las aguas subterráneas, el aire o que entren en la cadena alimenticia, sin embargo, los procesos que contribuyen a su degradación, deterioro y destrucción son más rápidos puesto que su velocidad de formación y regeneración es muy lenta. El uso de plaguicidas permite controlar la proliferación de plagas y enfermedades de los cultivos y del ganado, pero es necesario destacar que su aplicación indiscriminada y sin control puede ocasionar daños al ambiente; por ejemplo, deterioro de la flora y fauna silvestre, contaminación de suelo, mantos freáticos, aguas continentales y costeras (Eden y col., 2016). El empleo en la agricultura de fungicidas como el boscalid y de insecticidas/acaricidas como la bifentrina y el fenvalerato, se ha incrementado notablemente debido a la resistencia que generan algunas plagas (Álvarez-Medina y col., 2017; Landeros y col., 2010). Para equilibrar el daño que estos ocasionan al suelo existen diferentes técnicas de biorremediación (bioestimulación y bioaumentación) los cuales han demostrado un alto porcentaje de reducción de diferentes compuestos orgánicos tóxicos (Betancur y col., 2015; Pimmata y col., 2013; Wang y col., 2013)

Por esta razón se tiene la necesidad de buscar alternativas amigables con el medio ambiente que nos permita la recuperación de este recurso y una de estas alternativas es la biorremediación mediante el proceso de bioestimulación que consiste en la estimulación de la actividad microbiana natural, se realiza mediante el control de parámetros como el potencial redox, las condiciones de humedad y la adición de oxígeno u otros aceptores de electrones (como nitrato o sulfato) y nutrientes (nitrógeno y el fósforo) y el proceso de bioaumentación que consiste en la introducción de microorganismos específicos con potencial degradadores (indígenas o no indígenas) permitiendo que su selección se realice en base a los compuestos que deseamos degradar.

En consecuencia, este estudio investigó los efectos de dos técnicas de biorremediación, es decir, bioestimulación y bioaumentación combinada con bioestimulación en la degradación de bifentrina, boscalid y fenvalerato en suelos contaminados.

METODOLOGÍA

1. *Diseño del experimento, establecimiento de tratamientos y monitoreo.*

Todos los análisis fisicoquímicos se realizaron en el Laboratorio de Tecnologías para la Sustentabilidad de la División Ciencias de la Vida, Campus Irapuato-Salamanca, de la Universidad de Guanajuato y la cromatografía de gases en el Laboratorio de Plaguicidas y sus Residuos (LAPyR), perteneciente al Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Guanajuato, CESAPEG.

1.1. *Suelo*

Para la degradación de estos plaguicidas, se utilizó un suelo de tipo arcilloso libre de contaminantes el cual fue proporcionado por el Centro de Riego, de la División Ciencias de la Vida (DICIVA), de la Universidad de Guanajuato. Para cada tratamiento se necesitó una muestra de suelo de 2 Kg, las cuales se depositaron en charolas de plástico y se ubicaron en el Área Experimental para la Sustentabilidad de la Universidad de Guanajuato en la DICIVA.

1.2. *Preparación del suelo contaminado*

Para contaminar el suelo se disolvió el contaminante previamente en agua y luego se aplicó al suelo mediante un atomizador moviendo manualmente el suelo, de esta manera se asegura que la mezcla de los plaguicidas penetre homogéneamente a toda la muestra. Se trabajó con dos tipos de mezcla de contaminantes que son:

M1: concentración de plaguicidas será el límite máximo de residuo permitido LMR, boscalid 1,2 ppm, bifentrina 3 ppm y fenvalerato 2ppm (Eden y col., 2016).

M2: concentración de plaguicida será el 20% más de lo permitido en LMR, boscalid 1,44 ppm , bifentrina 3,6 ppm y fenvalerato 2,4 ppm.

Los productos comerciales utilizados contenían como ingrediente activo a los compuestos estudiados, por ejemplo: boscalid: Cantus®, bifentrina: Starion® 20 ME y fenvalerato: Fenvalerato®300 CE.

1.3. *Preparación de los microorganismos*

Se hicieron dos cultivos de 120 ml de cada cepa. Se crecieron por 20 h, y se contaron el número de células por ml, obteniendo los siguientes valores (Tabla 1).

Tabla 1. Número de células de cepas de los microorganismos.

Cepa	cel/ml	120 mL
S114 - 1A	1.68E+07	2.02E+09
S103	1.44E+07	1.73E+09
S404 - 2	2.24E+07	2.68E+09
S114 - 2	3.20E+07	3.84E+09

Se unieron los dos cultivos para asegurar un número suficiente de células para el experimento. Se centrifugaron y la pastilla se resuspendió en 10 ml de glicerol al 10%, manteniendo una temperatura de 4°C para su conservación (Vázquez, 2017).

Antes de adicionar las cepas se realiza el proceso de centrifugado a 4000 rpm, para la eliminación del glicerol, lavando 2 veces con la solución salina 0.9% estéril, se adicionó 1E+8 células de cada cepa por tratamiento, por lo que se diluye las muestras en solución salina 0.9% estéril hasta el volumen indicado, (tabla 2) y se agrega 1 ml de cada solución celular a cada muestra (Vázquez, 2017).

Tabla 2. Volumen de dilución de cepas de microorganismo

Cepa	mL
S114 - 1A	40.32
S103	34.56
S404 - 2	53.76
S114 - 2	76.8

1.4. *Diseño del experimento*

Para saber el porcentaje de degradación de los procesos de bioestimulación y de bioestimulación combinada con bioaumentación, se trabajó con diferentes mezclas de

plaguicidas (M1 y M2), relaciones de nutrientes baja (100:10:1) y alta (100:20:1) y con la aplicación de microorganismos (Sin m.o: sin microorganismos y m.o: con microorganismos) se utilizó un porcentaje de humedad constante para los diferentes tratamientos del 20 al 25%, la humedad se ajusta agregando agua estéril y corroborando su contenido con ayuda de una balanza por diferencia de peso todos los días durante el tratamiento. Se colocaron 2kg de suelo en cada charola y se aplicó 4 tratamientos en base al diseño experimental factorial fraccionado 2^{3-1} ver tabla 3.

Tabla 3. Tratamientos para evaluar el porcentaje degradación de la mezcla compuesta por bifentrina, boscalid y fenvalerato en suelo.

Tratamientos	Relación C-N-P	Microorganismos	Mezcla de plaguicidas
C:N:P (100:10:1)+ m.o + M1.	(100:10:1)	Adición de microorganismos	M1: Boscalid 1,2 ppm, bifentrina 3 ppm y fenvalerato 2 ppm.
C:N:P (100:20:1)+ Sin m.o + M1	100:20:1	Sin adición de microorganismos.	M1: Boscalid 1,2 ppm, bifentrina 3 ppm y fenvalerato 2 ppm
C:N:P (100:20:1)+ m.o + M2.	100:20:1	Adición de microorganismos	M2: Boscalid 1,44 ppm, bifentrina 3,6 ppm y fenvalerato 2,4 ppm.
C:N:P (100:10:1)+ Sin m.o + M2.	100:10:1.	Sin adición de microorganismos	M2: Boscalid 1,44 ppm, bifentrina 3,6 ppm y fenvalerato 2,4 ppm.

A continuación, se describe las especificaciones de cada control.

- C1: Este control se define para simular las condiciones de un proceso de atenuación natural. Se contaminó el suelo con la mezcla 2, se mantuvo bajo las mismas condiciones

ambientales y no se adiciono ninguna fuente de nutrientes. La humedad se mantuvo igual a los demás tratamientos

- C2: Control abiótico. Se esterilizó 14kg de suelo en autoclave operando a una temperatura de 125°C durante 1 hora por 3 días alternados, para eliminar cualquier microorganismo vivo. Adicionalmente se agregó una dosis de quinoline como inhibidor microbiano, se tomó como referencia la máxima concentración efectiva (CE 50: 29 mg/kg).
- C3: Para este control, se contaminó el suelo con la mezcla 2 y se adicionó 1ml de cada solución celular de las 4 cepas bacterianas, se mantuvo bajo las mismas condiciones ambientales y no se adicionó ninguna fuente de nutrientes. La humedad se mantuvo igual a los tratamientos.

Se evaluó en 2 tiempos (t), inicial (1 días) y final (30 días). Cada tratamiento se hizo por triplicado para obtener datos estadísticos confiables. Los resultados se analizaron de forma estadística con ayuda del software Statgraphics Centurion XV, considerando un valor de $p=95\%$. La dosificación de nutrientes fue calculada mediante relaciones de molalidad de C:N:P, partiendo que el suelo ya posee la cantidad de carbono orgánico necesario, adicionando la cantidad de nitrógeno (urea) y fosforo (KH_2PO_4) requeridos para cada relación. Los análisis fisicoquímicos y cromatográfico se evaluaron para cada tratamiento al inicio y final del periodo de incubación.

1.5. *Análisis fisicoquímico del suelo contaminado*

Se realizó análisis fisicoquímicos del suelo antes de ser contaminado y después de cada tratamiento establecido para la degradación de los plaguicidas en el tiempo inicial y tiempo final, nitrógeno (N), fosforo (P), potencial hidrógeno (pH), conductividad eléctrica (CE), porcentaje de humedad (%humedad), contenido carbono orgánico (CO), materia orgánica (MO), y textura del suelo. Siguiendo lo propuesto por la norma NOM-021-SEMARNAT-2000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

- *Caracterización fisicoquímica y determinación de textura antes de la contaminación.*

Se realizó la caracterización fisicoquímica antes de contaminar el suelo y se clasificó de acuerdo con la norma NOM-021-SEMARNAT-2000, como un suelo con características agrícola. Los valores de los parámetros fueron los siguientes: pH 7.18, C.E. 0.19 mS (no significativa), %N 0.05 (muy bajo), contenido de fósforo 7.63 ppm (medio), contenido de carbono orgánico 2.37 % (alto), materia orgánica 4.08% (alto), hidrógeno 15%. Además, se

determinó la textura del suelo donde se obtuvo un contenido del 25.62 % de arena, 57,8% de arcilla y 16,58% de limo, clasificando el suelo de tipo arcilloso de acuerdo con el triángulo de textura. La textura del suelo determina la capacidad de almacenamiento de agua del suelo, lo que afecta el oxígeno disponible, el potencial redox y la actividad microbiana. Por lo tanto, la composición de especies microbianas en un suelo depende de la disponibilidad de agua. De manera similar, la biodisponibilidad de un contaminante afectado por la textura del suelo determina la naturaleza de la población que degrada los contaminantes (Friedrich y col., 2000), por lo tanto, la adsorción de un plaguicida por el suelo puede extenderse desde poco o nada, hasta una inactivación total, dependiendo de la naturaleza de la fracción coloidal y de la estructura química del compuesto. Así, estudios experimentales han demostrado que de los plaguicidas de uso más frecuente (clorados, fosforados, carbamatos), han permitido establecer el mecanismo de interacción entre estos compuestos y los minerales de la arcilla que tiene una gran capacidad de adsorción (Eguizábal y col., 2013).

- *Conductividad en tratamientos y controles*

En la figura 1 se puede observar que la conductividad aumento tanto en los tratamientos como controles. Se considera que al aumentar la conductividad se podría estar evidenciando un proceso de salinización, por lo tanto, un aumento en la conductividad puede sugerir una interacción importante entre las partículas del suelo con la adsorción de sustancias orgánicas (Agudelo y col., 2013).

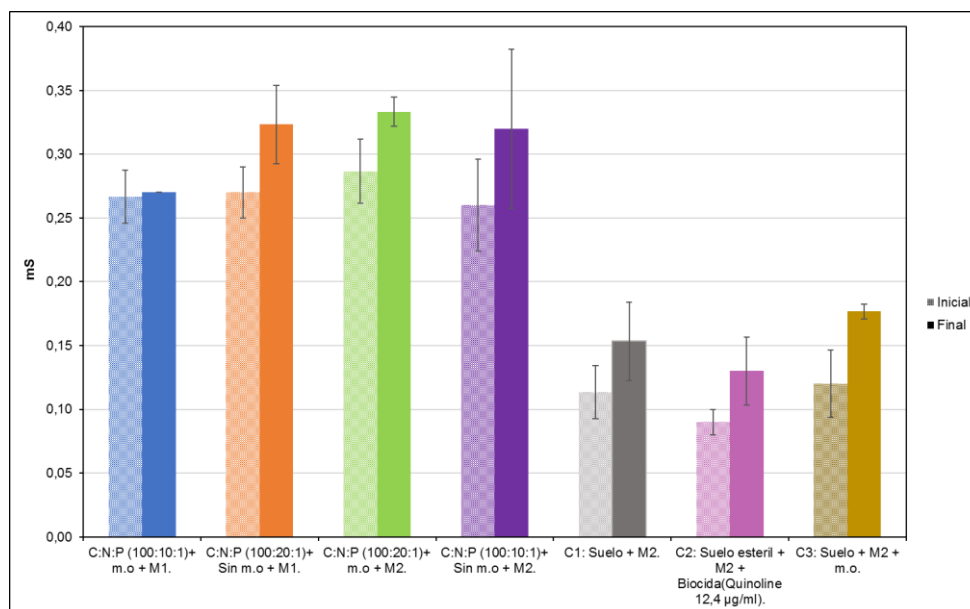


Figura 1. Variación de la conductividad en los diferentes tratamientos y controles

- *pH en tratamientos y controles*

El pH por lo general al aplicar un proceso de remediación disminuye por la formación de ácidos, los cuales pueden ser por la degradación de la materia orgánica (Figura 2), al disminuir estos posteriormente aumenta los compuestos nitrogenados cuando se liberan como metano (Martínez y col., 2008).

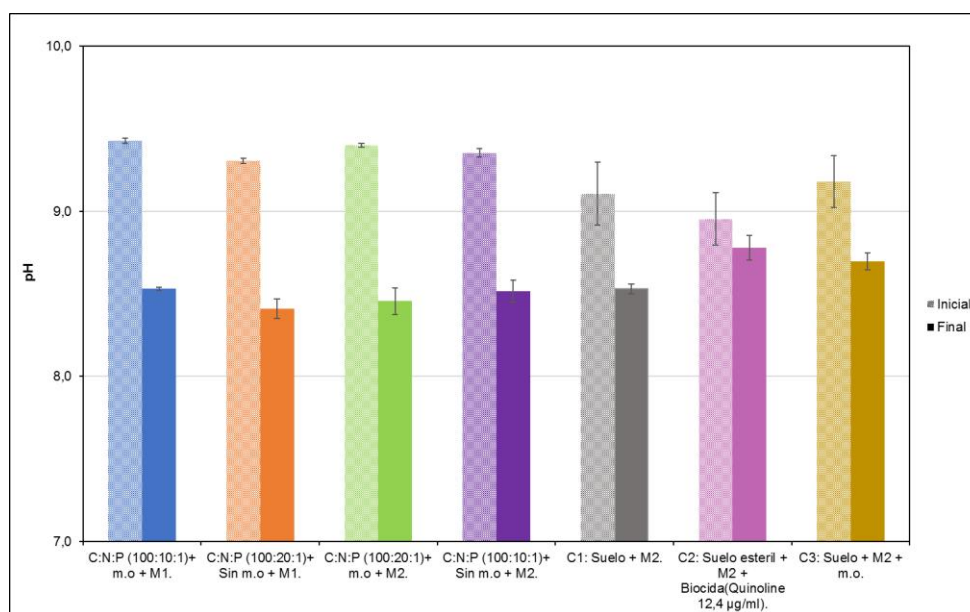


Figura 2. Variación de pH en los diferentes tratamientos y controles

- *Nitrógeno en tratamientos y controles*

En la figura 3. Podemos observar que el nitrógeno aumenta para el tratamiento C:N:P (100:10:1)+ m.o + M1 y el control C3: Suelo + M2 + m.o. El nitrógeno es un elemento fundamental en el metabolismo de los microorganismos debido a que es incorporado en las células bacterianas con el fin de producir aminoácidos, proteínas y ácidos nucleicos, al aumentar el nitrógeno se le atribuye a que tiene una alta actividad microbiana. Sin embargo, en los demás tratamientos y controles, se evidencia una disminución de éste. La concentración de nitrógeno puede disminuir en mayor proporción que la del fósforo durante la aplicación de tratamientos, debido a que los microorganismos necesitan una proporción

de nitrógeno y fósforo de 10:1 para la asimilación y la síntesis del nuevo material celular (Metcalf y col., 1996).

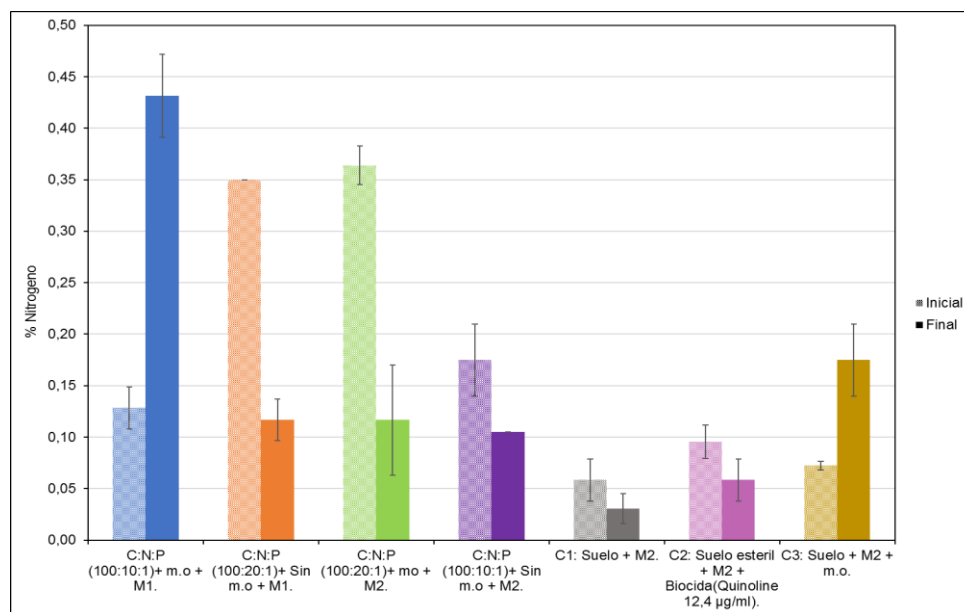


Figura 3. Variación de nitrógeno en los diferentes tratamientos y controles

- *Fósforo en tratamientos y controles*

El fósforo aumento en los cuatro tratamientos y en el control C2 (figura 4). Este aumento se puede atribuir a la liberación de fosfatos por medio del proceso de actividad microbiana y la muerte inicial de la población de microorganismos (Yaohui y col., 2010).

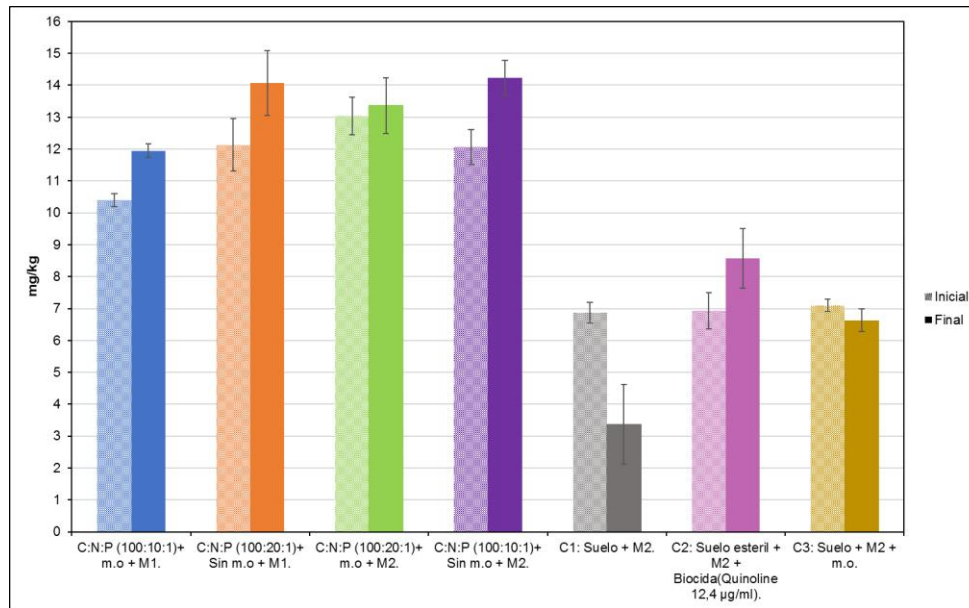


Figura 4. Variación de fosforo en los diferentes tratamientos y controles

- *Carbono orgánico y materia orgánica en tratamientos y controles*

En la figura 5 y 6 se observa que obtuvimos un aumento significativo del contenido de carbono y materia orgánica lo cual muestra evidencia que la adición de nitrógeno y fósforo a suelos contaminados con compuestos orgánicos, estimula la biodegradación y aumenta la diversidad de especies microbianas (Betancur y col., 2015). La cantidad de nitrógeno y fósforo necesaria para la biodegradación, refleja la cantidad de estos elementos que deben ser incorporados por microorganismos para usar el contaminante como fuente de carbono para el crecimiento (Atagana y col., 2003).

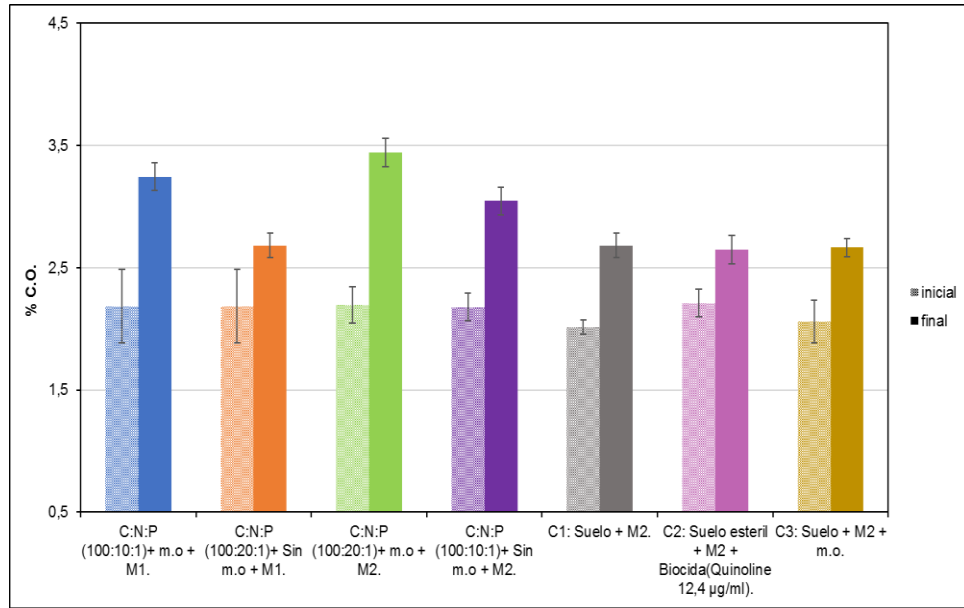


Figura 5. Variación de carbono orgánico en los diferentes tratamientos y controles

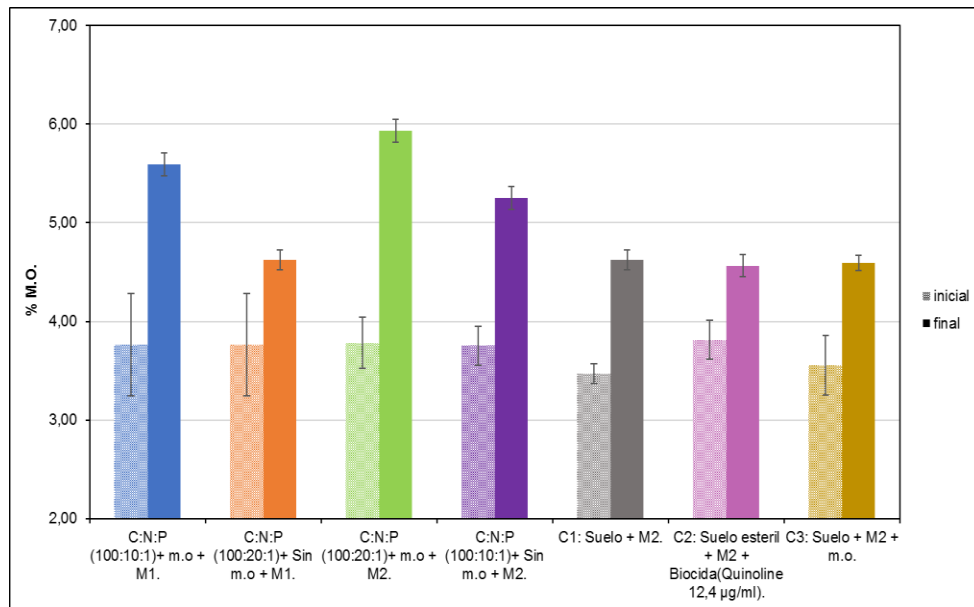


Figura 6. Variación de materia orgánica en los diferentes tratamientos y controles

- *Degradación de los contaminantes*

En la figura 7 podemos observar que la combinación de los procesos de bioestimulación-bioaumentación para el tratamiento con la concentración baja de contaminantes y con la adición de microorganismos, se generó una remoción del 16% boscalid y 11% fenvalerato. Sin embargo, la remoción de la bifentrina fue igual a nuestro control abiótico. A pesar de ello, se considera que este porcentaje de degradación para estos contaminantes en suelo arcilloso y en un tiempo de 30 días es bueno.

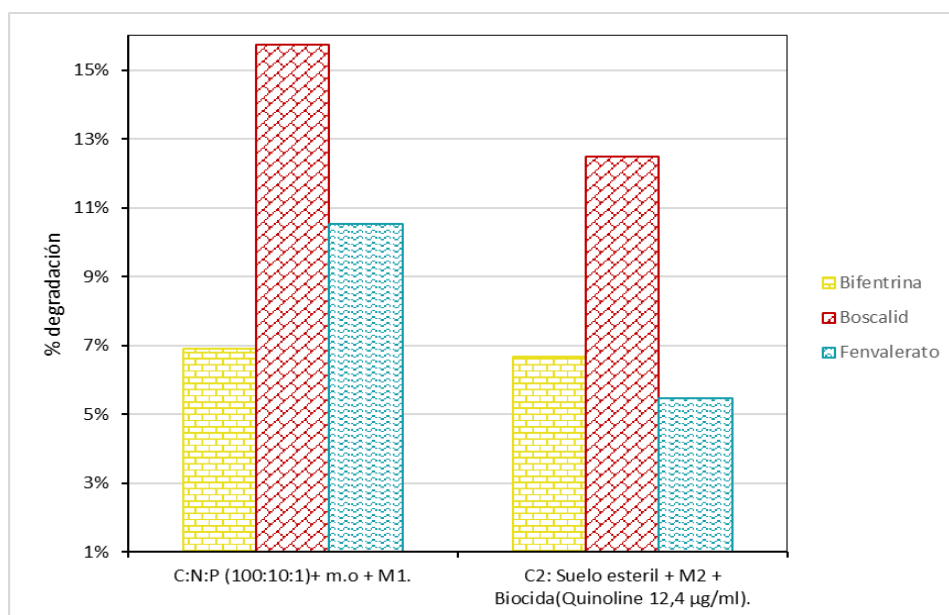


Figura 7. Degradación de los plaguicidas en tratamiento y control.

CONCLUSIONES

Se logró establecer un proceso de biorremediación combinando dos técnicas (bioestimulación y bioaumentación), el cual es efectivo para la degradación de una mezcla compuesta por boscalid, bifentrina y fenvalerato bajo condiciones muy cercanas a los

procesos reales, durante un periodo de 30 días. Es importante tener en cuenta que los factores bióticos y abióticos influyen para el éxito de recuperación de suelos contaminados.

BIBLIOGRAFÍA

Agudelo, D.M., Flórez, M.T., López, C., Palacio, J. (2013). Influencia de las condiciones fisicoquímicas del sedimento y la interfase agua-sedimento en la transferencia experimental del o,o-dietil o?- 3,5,6 triclora-2-piridinil fosforotato (clorpirifos) y el 3,5,6 triclora-2-piridinol (tcp), en el embalse riogrande ii. Revista Ingenierías Universidad de Medellín, 12(23), 13-22. Retrieved March 12, 2018, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1692-33242013000200002&lng=en&tlng=es.

Álvarez-Medina, A., Silva-Rojas, H., Leyva-Mir, S., Marbán-Mendoza, N., Rebollar-Alviter, Á. (2017). Resistance of *Botrytis cinerea* from strawberry (*Fragaria x ananassa Duch.*) to fungicides in Michoacán Mexico. *Agrociencia*, 51 (7), 783-798.

Atagana, H.I., Haynes, R.J., Wallis, F.M. (2003). Optimization of soil physical and chemical conditions for the bioremediation of creosote-contaminated soil. *Biodegradation* 14 (4), 297–307.

Betancur Corredor, B., Pino, N.J., Cardona, S., Peñuela, G.A. (2015). Evaluation of biostimulation and Tween 80 addition for the bioremediation of long-term DDT-contaminated soil. *Journal of Environmental Sciences*, 28: 101-109.

DOF. 2002. Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, “Que establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis” Diario Oficial de la Federación. México D.F.

Eden Wynter, R.C.A., Gallaga Solórzano, J.C., Conde Moo, P.C., Rosales Castillo, J.A. (2016). Catalogo de plaguicidas. COFEPRIS.

Eguizábal R. A., Martínez S. M. T. y Sanz A. J. 2013. Actuación de los fungicidas Piraclostrobín y Boscalid en procesos de sorción/desorción en suelo. Comportamiento en campo de cultivo de vid. Tesis profesional. Universidad de la Rioja, Facultad de ciencias, estudios agroalimentarios e informática. La rioja. España.

Friedrich, M., Grosser, R.J., Kern, E.A., Inskeep, W.P., Ward, D.M. (2000). Effect of model sorptive phases on phenanthrene biodegradation: molecular analysis of enrichments

and isolates suggests selection based on bioavailability. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (7), 2703–2712.

Landeros, J., Ail, C. E., Cerna, E., Ochoa, Y., Guevara, L., & Aguirre, L. A. (2010). Susceptibilidad y mecanismos de resistencia de *Tetranychus urticae* (Acariformes: Tetranychidae) en rosal de invernaderos. *Revista Colombiana de Entomología*, 36(1): 5-9. Retrieved April 10, 2018, from http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-04882010000100002&lng=en&tlng=pt.

Martínez, H.E., Fuentes E.J., Acevedo, H.E. (2008). Carbono orgánico y propiedades del suelo. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*, 8(1), 68-96. <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-27912008000100006>

Metcalf & Eddy (1996). Ingeniería de aguas residuales. Tratamiento y reutilización. Ed. McGraw Hill. México.

Pimmata, P., Reungsang, A., Plangklang, P. (2013). Comparative bioremediation of carbofuran contaminated soil by natural attenuation, bioaugmentation and biostimulation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 85 (2013): 196-204.

Vázquez Banda, M.R., Sánchez Calderón, L., Díaz Pérez, C. (2017). Aislamiento y caracterización filogenética de bacterias resistentes a metales pesados del estado de zacatecas. *Jóvenes en la ciencia*, 3(2): 12-16

Wang, Q., Xie, S., Hu, R. (2013). Bioaugmentation with *Arthrobacter* sp. strain DAT1 for remediation of heavily atrazine-contaminated soil. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 77 (2013): 63-67.

Yaohui, X., Mang, L. (2010). Bioremediation of crude oil-contaminated soil: Comparison of different biostimulation and bioaugmentation treatments. *Journal of Hazardous Materials*. 183(1-3):395-401.