

## DISEÑO DE CAMAS BIOLÓGICAS PARA DEGRADAR AGROQUÍMICOS: ESTRATEGIAS DE BIOAUMENTACIÓN

Valentina Luna

*Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química INTEC-UNL*

Director/a: Lescano, Maia R.

Codirector/a: Zacarías, Silvia M.

Área: Ciencias Naturales

Palabras claves: Camas biológicas, Agroquímicos, Bioaumentación.

### INTRODUCCIÓN

Las camas biológicas, o *biobeds*, son sistemas de biopurificación de bajo costo utilizadas para la recolección y descontaminación de residuos líquidos con alta concentración de agroquímicos. Estos sistemas consisten en espacios impermeabilizados (que pueden ser excavaciones o contenedores) que incluyen una matriz biológicamente activa, llamada biomezcla (Castillo et al., 2008).

Numerosos estudios muestran la capacidad de esta tecnología para degradar una amplia variedad de contaminantes empleando diferentes sustratos para el armado de las biomezclas. Sin embargo, se presentan ciertas limitaciones cuando se pretende mineralizar compuestos recalcitrantes, persistentes o muy tóxicos, en períodos cortos de tiempo (Pinto et al., 2020).

Teniendo en cuenta que el corazón de este sistema es la degradación biológica, en los últimos años se comenzaron a estudiar estrategias de bioaumentación para optimizar el proceso de descontaminación de agroquímicos recalcitrantes (Pinto et al., 2020). El objetivo de la bioaumentación es aumentar el número de microorganismos capaces de metabolizar contaminantes en los sistemas de biopurificación (Xu et al., 2019).

Es importante destacar que la técnica de bioaumentación está estrechamente relacionada con los materiales con los que se construye la cama biológica, ya que van a actuar también como fuente de carbono y nitrógeno para los microorganismos que se desarrollen (Pinto et al., 2020). Resultan de gran interés los residuos de la industrialización del maní (cáscaras) y de la soja (cascarillas), que representan más de un millón de toneladas al año para cáscaras de maní (CM) y 56 millones de toneladas para cascarilla de soja (CS) (Bolsa de Comercio de Córdoba, 2016; FAOSTAT, 2018, USDA Foreign Agricultural Service, 2020).

Es por eso que en este trabajo se diseñaron camas biológicas bioaumentadas para la degradación de agroquímicos recalcitrantes tales como imidacloprid y tiametoxam (neocotinoideos), y atrazina empleando biomezclas que contienen suelo con historial de aplicaciones de agroquímicos, y cascaras de maní y soja como materiales lignocelulósicos.

### OBJETIVOS

- Diseñar y construir camas biológicas compuestas por residuos de la industrialización de la soja y el maní
- Desarrollar técnicas analíticas para la determinación simultánea de atrazina, imidacloprid y tiametoxam en medio líquido y en biomezclas
- Preparar inóculos bacterianos y/o fúngicos para evaluar la estrategia de bioaumentación.

Título del proyecto: Diseño de camas biológicas para degradar efluentes con agroquímicos: estrategias de bioaumentación y empleo de materiales agrícolas residuales.

Instrumento: Proyecto de Investigación Orientada (IO). Código: IO-2019-00186.

Año convocatorio: 2019.

Organismo financiador: Agencia Santafesina de Ciencia, Tecnología e Innovación.

Director/a: Dra. Maia R. Lescano.

## METODOLOGÍA

### **Caracterización y acondicionamiento de los materiales empleados.**

El suelo empleado consistió en un suelo agrícola con historial de aplicaciones de atrazina, proveniente de la localidad de Campo Andino (Santa Fe). Por otro lado, las CM y las CS fueron provistas por empresas productoras de la zona. Para ser empleados en las camas biológicas, se trituraron finamente en un tamaño aproximado de 3-4 mm. Se tercerizó la caracterización del suelo (en cuanto a contenido de carbono orgánico y materia orgánica), y de los materiales celulósicos (en cuanto a contenido de proteína y fibra bruta), al Laboratorio Cámara Arbitral de Cereales de la Bolsa de Comercio de Santa Fe.

### **Diseño y construcción de camas biológicas a pequeña escala.**

Se construyeron por duplicado camas biológicas en cajas de vidrio de 6 litros con diferente composición: Suelo-Cáscara de maní (S:CM) 50:50; y Suelo-Cascarilla de soja (S:SC) 50:50. Las biomezclas preparadas se maduraron durante 3 meses controlando la humedad diariamente para alcanzar valores de entre el 60-70%. En este punto se pretendió alcanzar una alta actividad microbiana. Paralelamente se registró el pH de las mismas durante todo este proceso, el cual es un parámetro importante a tener en cuenta para el crecimiento de microorganismos.

### **Determinación de concentraciones de agroquímicos mediante HPLC-DAD.**

Para la selección de programa de Cromatografía Líquida de Alta Presión acoplado a un detector de arreglo de diodos (HPLC-DAD), se evaluaron diferentes relaciones de solventes de acetonitrilo (ACN) y agua (W) como fase móvil. El criterio de selección del programa fue obtener picos resueltos y bien separados para la determinación simultánea de atrazina, tiametoxam e imidacloprid. Se realizaron las curvas de calibrado correspondientes teniendo en cuenta la longitud de onda de máxima absorción de cada agroquímico.

Para evaluar la performance de las camas biológicas es necesario poder extraer los agroquímicos seleccionados de las biomezclas y así determinar por HPLC-DAD la degradación de los mismos. Es así que se evaluaron diferentes solventes de extracción tales como ACN (100%) y ACN-W (80-20%) acidificada con ácido acético (2,5%). Además, se evaluaron relaciones de 1:2 y 1:4 de masa de muestra:solvente de extracción respectivamente, calculando la recuperación (%) en todos los casos, evaluando diferentes concentraciones de agroquímicos. Las muestras se analizaron por triplicado.

### **Aislamiento de microorganismos.**

Se tomaron muestras a partir de la biomezcla contaminada con imidacloprid y tiametoxam con 1 mes de maduración. Se extrajeron todos los microorganismos presentes en esta muestra y se realizaron ensayos de crecimiento durante 30 días para evaluar la degradación de los contaminantes.

El medio de cultivo líquido utilizado fue el descrito por Castillo-Dias et al., en 2016 (medio MSM). La muestra contenía como fuente de carbono y nitrógeno 20 mg/L de cada contaminante. En paralelo se evaluó una muestra control que contenía glucosa y cloruro de amonio como fuente de carbono y fuente de nitrógeno respectivamente.

La degradación de los agroquímicos se siguió en el tiempo mediante medición en HPLC-DAD. Además, se midieron la turbidez (NTU) y densidad óptica a 620 nm (D.O.) de las muestras, y se realizó recuento en placa de los microorganismos viables.

Luego de 30 días de cultivo, se seleccionaron y aislaron en el medio Agar Nutritivo (AN) y Hongos y Levaduras (HyL) las bacterias y hongos, respectivamente, adaptadas a altas concentraciones de los contaminantes.

### **Preparación del inóculo.**

La bioaumentación de las camas biológicas se realizará a partir de una muestra líquida de microorganismos aislados en fase exponencial de crecimiento. Para ello se pusieron a punto las condiciones de crecimiento óptimas (tiempo y temperatura) para obtener la concentración deseada de los microorganismos a inocular.

El crecimiento microbiano se realizó en el medio MSM suplementado con glucosa y cloruro de amonio como fuente de carbono y nitrógeno.

### Análisis de datos.

Los resultados obtenidos se analizaron mediante análisis de varianza ANOVA empleando un software libre (Programa R versión 2.3.3.3). Se calcularon los parámetros Linealidad, Sensibilidad (S), Límite de Detección (LOD) y Límite de cuantificación (LOQ), los cuales se evaluaron de acuerdo a los criterios de la guía SANTE (2019) para análisis de agroquímicos.

## RESULTADOS

### Caracterización de los materiales empleados.

Se determinó que los materiales lignocelulósicos empleados para construir la biomezclas presentan un contenido de proteína del 6% para CM y 10,3% para CS, y fibra bruta del 73% CM y 33,5% CS, lo que es fundamental para el crecimiento microbiano. El suelo empleado contiene materia orgánica en un 5,8% y carbono orgánico en un 10,4%.

Luego de 3 meses de maduración se obtuvo un promedio de pH de 8,7 para CM:S y un pH de 4,5 para CS:S.

### Determinación de concentraciones de agroquímicos mediante HPLC-DAD.

Para la determinación simultánea de los tres agroquímicos en estudio se seleccionó un programa de HPLC descrito en Tabla 1, a temperatura ambiente, empleando ACN y W como solventes. La columna utilizada fue Nova-Pak C18, 60A, (4 $\mu$ m, 3,9mm x 150 mm).

Se realizaron curvas de calibrado correspondiente a los 3 contaminantes seleccionados a partir del programa de elución resuelto. Las determinaciones se realizaron a longitud de onda 221nm para detectar atrazina, 250nm para tiametoxam y 270nm para imidacloprid.

Los parámetros de validación, tales como LOD, LOQ y S, se muestran en la Tabla 2.

La linealidad obtenida por el análisis de regresión de las curvas de calibrado realizadas fue satisfactoria, alcanzando un coeficiente de correlación mayor 0,999 para cada curva. Además, los p-valores obtenidos ( $\leq 0,05$ ) mediante el test ANOVA demuestran una relación estadística significativa entre las concentraciones de los estándares y la respuesta (área) en cada curva de calibrado.

**Tabla 1.** Programa de HPLC-DAD.

<b>Fase móvil</b>	ACN:W
<b>Flujo</b>	1 ml.min <sup>-1</sup>
<b>Programa de elución</b>	0' 20:80 Isocrático
	3' 20:80 Gradiente
	6' 60:40 Isocrático
	10' 60:40 Gradiente
	12' 20:80 Isocrático
	14' 20:80.

**Tabla 2.** Parámetros analíticos de curvas de calibrado.

	Atrazina	Tiametoxam	Imidacloprid
<b>R<sup>2</sup></b>	0,9994	0,9971	0,9981
<b>S<sub>x/y</sub></b>	38151,2	24520,82	33801,85
<b>LOD (mg/l)</b>	0,688	1,30	1,096
<b>LOD (mg/kg)</b>	1,376	2,6	2,192
<b>LOQ (mg/l)</b>	2,29	4,34	3,65
<b>LOQ (mg/kg)</b>	4,58	8,68	7,3
<b>S</b>	166358	56542	92843

### Extracción de agroquímicos en muestra sólida.

La relación biomezcla:solvente elegida fue 1:2 y el solvente de extracción ACN-W 80-20%, acidificada con ácido acético al 2,5%, ya que ambas condiciones presentaron mayores valores de recuperación y mayor sensibilidad para la detección de los analitos de interés en las dos biomezclas (S:CS y S:CM). Los valores de recuperación obtenidos para estas condiciones variaron entre 80 y 110% para todas las muestras ensayadas. Las muestras se analizaron por triplicado y los valores de RDS% (Desviación estándar relativa) estuvieron siempre por debajo del 15%. Finalmente, los mismos se compararon con los valores que se describen en la guía SANTE (2019) para análisis de agroquímicos. Los criterios que adopta esta guía son valores de RSD menores al 20% y recuperaciones medias entre el 70 y 120%. Sin embargo, teniendo en cuenta la heterogeneidad de las muestras, el rango de recuperaciones puede oscilar entre el 30 y el 140% siempre y cuando los valores de RSD no superen el 20%. En este sentido, los valores obtenidos son satisfactorios.

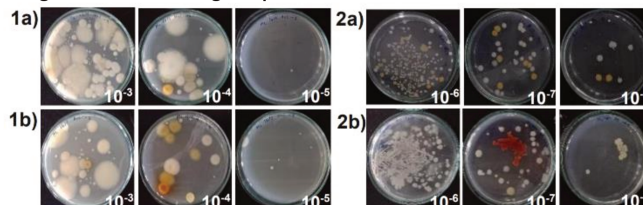
### Aislamiento de microorganismos adaptados.

Se obtuvo una gran diversidad de microorganismos (Figura 1) a partir de las muestras de biomezcla analizadas. Se diferenciaron y seleccionaron las colonias bacterianas y fúngicas presentes en los recuentos realizados para muestra de cultivo de 30 días de incubación, que contiene como fuente de carbono y nitrógenos los agroquímicos seleccionados. Los aislamientos se conservaron en heladera a 4°C hasta la preparación del inóculo.

### Preparación de inóculo.

Los cultivos correspondientes a los aislamientos de bacterias presentaron un máximo de crecimiento en el día 2 de incubación, donde se obtuvo una concentración de  $2 \times 10^8$  UFC ml<sup>-1</sup>. En cuanto al cultivo de hongos filamentosos se alcanzó una concentración máxima de  $4 \times 10^7$  UFC ml<sup>-1</sup> al día 6.

Se realizaron las diluciones correspondientes para bioaumentar las camas biológicas en  $10^8$  UFC/g de bacterias y  $10^5$  UFC/g de hongos.



**Figura 1:** Recuento en placa de hongos (1) y bacterias (2) incubados en el medio HyL y AN respectivamente, durante 48hs. 1a)-2a) fuente de carbono y nitrógeno control y 1b)-2b) ensayada con agroquímicos. Las diluciones ensayadas se describen al pie de foto correspondiente.

### CONCLUSIONES

En este trabajo se desarrolló satisfactoriamente un método analítico confiable de extracción y cuantificación simultánea de atrazina, tiametoxam e imidacloprid para diferentes biomezclas con la finalidad de monitorear la degradación de cada uno de estos analitos en camas biológicas a escala laboratorio. Los aislamientos obtenidos de los microorganismos se adaptan a concentraciones altas de atrazina, tiametoxam e imidacloprid, potenciales para degradar contaminantes recalcitrantes. Las biomezclas maduras proporcionarán la matriz necesaria para promover el crecimiento microbiano, esperando que el crecimiento bacteriano se favorezca en biomezclas con pH neutros (6,5-7,5) y el crecimiento fúngico en biomezclas con pH levemente ácido (5-6,5).

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Bolsa de Comercio de Córdoba, 2006.** Encadenamiento productivo del maní. En: el Balance de la Economía Argentina 2006. Una nueva oportunidad. Bolsa de Comercio de Córdoba, Córdoba, 531–548.

**Castillo, M. d. P.; Torstensson, L.; Stenström, J., 2008.** Biobeds for environmental protection from pesticide use. A review. *J. agric. food chem.* 56, 6206-6219

**Castillo Diaz, J. M.; Delgado-Moreno, L.; Núñez, R.; Nogales, R.; Romero, E., 2016.** Enhancing pesticide degradation using indigenous microorganisms isolated under high pesticide load in bioremediation systems with vermicomposts. *Bioresource Technology* 214, 234–241.

**FAOSTAT, 2018.** Food and Agricultural Organization of the United Nations, Browse Data, Publication, Crops. <http://www.fao.org/faostat/es/#data/QC>.

**Pinto, A.P., Lopes, M.E., Dordio, A., Castanheiro, J.E.F., 2020.** Bioaugmentation an effective strategy to improve the performance of biobeds: a review. *Agrochemicals Detection, Treatment and Remediation*, Butterworth-Heinemann. 207-240.

**SANTE/11945/2015., 2019.** Guidance document on analytical quality control and method validation procedures for pesticides residues analysis in food and feed. European Commission Reference Laboratories for Residues of Pesticides. Recuperado [https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance\\_SANTE\\_2015\\_11945.pdf](https://www.eurl-pesticides.eu/library/docs/allcrl/AqcGuidance_SANTE_2015_11945.pdf)

**USDA Foreign Agricultural Service. 2020.** Oilseeds: world markets and trade. Retrieved November 9, 2020, from <https://www.fas.usda.gov/commodities/soybeans>

**Xu, X., Zarecki, R., Medina, S., Ofaim, S., Liu, X., Chen, C., et al., 2019.** Modeling microbial communities from atrazine contaminated soils promotes the development of biostimulation solutions. *ISME J.* 13, 494–508.