

Degradación de bromacil mediante la cepa IT-01 de *Penicillium* spp. y su aplicación en un biofiltro a escala laboratorio

Bromacil degradation by IT-01 strain *Penicillium* spp. and its application in a laboratory scale biofilter

Emmanuel Campos-Vargas¹, Kenia Calvo-Romero²,
Virginia Montero-Campos³

Fecha de recepción: 8 de febrero de 2016
Fecha de aprobación: 2 de junio de 2016

Campos-Vargas, E; Calvo-Romero, K; Montero-Campos, V. Degradación de bromacil mediante la cepa IT-01 de *Penicillium* spp. y su aplicación en un biofiltro a escala laboratorio. *Tecnología en Marcha*. Vol. 29-4. Octubre-Diciembre 2016. Pág 47-56.

DOI: 10.18845/tm.v29i4.3036



- 1 Ingeniero Ambiental. Ambientica Consulting, Costa Rica. Correo electrónico: ecampos@ambienticacr.com
- 2 Estudiante del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: tau_ke17@hotmail.com
- 3 Microbióloga, Ph.D en Ciencias Naturales. Docente en Instituto Tecnológico de Costa Rica. Costa Rica. Correo electrónico: vmontero@itcr.ac.cr

Palabras clave

Bromacil; biofiltro; esponja; *Penicillium* spp.

Resumen

El bromacil es un pesticida que se ha encontrado en fuentes de abastecimiento de agua en Costa Rica. Se ha estudiado su degradación en matriz acuosa, principalmente con métodos fotoquímicos. En este artículo se presentan los resultados de un estudio que evaluó la degradación de bromacil *por un hongo filamentoso identificado como cepa IT-01 del género Penicillium spp*, aislado de suelo contaminado con el herbicida. Se estudió y valoró la eficiencia de remoción del bromacil en un biofiltro a escala laboratorio. Las pruebas se realizaron en el laboratorio de Ingeniería Aplicada de la carrera de Ingeniería Ambiental y el Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos (CEQIATEC) del Tecnológico de Costa Rica. La eficiencia de remoción del pesticida al utilizar el microorganismo en un medio acuoso suspendido fue del 50% en 72 horas; sin embargo, al fijarse el hongo en esponja marina y utilizarse en un biofiltro, se obtuvo una eficiencia promedio del 80%, en un tiempo de 18 a 39 segundos. Durante los ensayos del biofiltro se evaluó el tipo de esponja marina como medio de soporte, el efecto de la inoculación del medio filtrante y el tiempo de retención hidráulico. Utilizando el *software* Minitab, se determinó, con un 95% de confianza, que la inoculación del medio fue el único parámetro que afectó significativamente la eficiencia de remoción del bromacil.

Keywords

Bromacil; biofilter; sponge; *Penicillium* spp.

Abstract

Bromacil is a pesticide that has been found in water sources in Costa Rica and its degradation in aqueous matrix has been studied mainly by photochemical methods. This article exposes the Bromacil degradation by a filamentous fungus identified as strain IT-01 *Penicillium* spp, isolated from contaminated soil and its application in a laboratory scale biofilter. The tests were made at Applied Environmental Engineering laboratories and the Center for Research and Chemical-Microbiological Services at Costa Rican Institute of Technology. The removal efficiency using the microorganism in an aqueous suspended medium was 50% in 72 hours; however, adhering the fungus and used in a marine sponge in biofilter it was obtained a removal efficiency of 80% with retention times from 18 to 39 seconds. During the biofilter tests: the type of marine sponge as a supporting mean, the effect of inoculation of the filter medium and the hydraulic retention time were evaluated. Through Minitab software, it was determined at 95% confidence that the inoculation of the medium was the only parameter that significantly affects the efficiency of removal for this pollutant.

Introducción

La contaminación del recurso hídrico se ha relacionado a nivel mundial con el uso agrícola extensivo de plaguicidas (Anju, Ravi & Bechan, 2010). En Costa Rica, el servicio de agua potable para 6000 personas se vio afectado por la presencia del herbicida bromacil en acuíferos del Caribe (Boeglin, 2010; Ruepert et al., 2005). Ante esto, el Servicio Nacional de Acueductos y Alcantarillados debió solventar la problemática llevando cisternas con agua potable al lugar afectado durante un tiempo indeterminado (Agüero, 2007), lo que implicó un alto costo para

la institución. En otras partes del mundo, como Estados Unidos (Pfeuffer, 2011; Zhang et al., 1997), Holanda (Schipper & Vissers, 2008) y España (Hernández et al., 2008) también se han detectado trazas de este pesticida en aguas de potencial consumo humano.

El bromacil se caracteriza por su alta solubilidad en agua, una bioacumulación ligera, alta movilidad ambiental y una vida media en el ambiente de 60 días. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) lo considera ligeramente tóxico y se han evidenciado efectos crónicos –como daño en los testículos, hígado y tiroides– en animales de laboratorio. En algunos países existen límites máximos recomendados para la presencia de bromacil en las aguas de consumo humano: 90 µg/L en Estados Unidos, 0,1 µg/L en la Unión Europea y 300 µg/L en Australia (Cruz, 2010).

Debido a la importancia de este herbicida como contaminante ambiental, se han realizado estudios con el objetivo de evaluar su degradación, tales como los de Kalyani (Kalyani, 1993) se logró la fotodegradación a partir de la irradiación con luz ultravioleta del 90% de bromacil en una disolución acuosa de 25 mg/L. Por otra parte, su degradación usando métodos biológicos únicamente se ha estudiado en suelo mediante la aplicación de bacterias (Carl, 1973; Rasul & Cortez, 1988), por lo que la biodegradación de este contaminante en agua resulta un proceso innovador.

La biorremediación es una técnica que involucra el uso de microorganismos vivos con el fin de descomponer sustancias químicas presentes en el ambiente (Crawford & Rosenberg, 2013). La biofiltración está relacionada con estos procesos de biorremediación y consiste en el uso de organismos metabólicamente activos, que se fijan en medios de soporte con el fin de tratar aguas de consumo humano, mostrándose como una opción efectiva (Benner et al., 2013; Yu, Shi, Wei, Ye & Shuting, 2009). Esta tecnología se ha estudiado con biofiltros de carbón activado para remover compuestos orgánicos y subproductos de la cloración (Carlson & Amy, 2000; Liao et al., 2015; Norton & LeChevallier, 2000; Young-Song, Yoon-Jin & Sang-ho, 2007).

Aspectos de diseño como la carga hidráulica (CH) y el tiempo de retención (TR) resultan importantes en la remoción de contaminantes. Carlson y Amy (2000) reportan que la CH no afecta significativamente la remoción de compuestos orgánicos pero el TR sí. Sin embargo, Young-Song et al. (2007) determinaron que existe una mayor eficiencia en la remoción de compuestos orgánicos en biofiltros con bajas CH y altos TR.

En la literatura no existe evidencia de que se hayan utilizado procesos de biofiltración para remover el bromacil de aguas para consumo humano. El objetivo de esta investigación fue evaluar la utilización de una cepa de hongo escogida, ambiental altamente eficiente en un prototipo de biofiltro a escala para la remoción de bromacil en disoluciones de este contaminante en agua. La remoción fue valorada en aspectos como medio de soporte y TR.

Metodología

La investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Ingeniería Aplicada de la Carrera de Ingeniería Ambiental y el Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos de la Escuela de Química (CEQIATEC) del Tecnológico de Costa Rica (TEC).

Aislamiento y evaluación de un microorganismo para la remoción de bromacil

Se recolectó una muestra de tierra contaminada con plaguicidas de una finca piñera localizada en la zona Sur del país, la cual se mezcló al 10% m/v en agua peptonada.

Se preparó agar recuento estándar y una disolución de bromacil de 800 mg/L en agua destilada estéril. Se inocularon ocho placas de Petri con la solución de tierra y se les vertió 0,10 ml de

la disolución del plaguicida. Se probaron dos tratamientos, las primeras cuatro réplicas se mantuvieron a temperatura ambiente y las restantes se incubaron a 35 °C por cinco días.

Luego de la determinación de la resistencia del hongo al plaguicida se traspasó el microorganismo obtenido de los cultivos a un medio sin bromacil para luego identificarlo en el microscopio. Se preparó un medio agar papa dextrosa acidificado y se mantuvo el hongo por pasajes en un medio nuevo cada tres meses.

Se preparó un inóculo de esporas en agua esterilizada en un rango de (4,0-8,0) x10⁵ esporas/mL, las cuales se cultivaron en un caldo enriquecido con los nutrientes descritos en el Cuadro 1. A partir de este se realizaron medios por duplicado con concentraciones de 20,0, 30,0 y 40,0 µg/L de bromacil y se agregó 1,00 mL de inóculo a cada uno.

Cuadro 1. Medio de cultivo para el hongo.

Nutrientes	Concentración (g/L)
KH ₂ PO ₄	2,0
MgSO ₄	2,0
NH ₄ NO ₃	2,0
FeSO ₄	1,0
ZnSO ₄	5,0
NaCl	2,0
Extracto de levadura	2,0

Se colocaron caldos inoculados con el hongo en una incubadora con agitación a 35 °C y 100 rpm durante tres días, con el objetivo de permitir la formación de pellets. Se tomó una muestra diaria de cada medio y se analizó la variación de la concentración del contaminante.

Selección del medio de soporte

Se realizó la valoración de dos medios, para lo cual se estableció un diseño factorial de 2², cuyos factores eran tipo de esponja (sintética y natural) e inóculo (presencia y ausencia de pellets del hongo) con seis réplicas, siendo la variable de respuesta el porcentaje de remoción de bromacil.

Los tratamientos se prepararon en buretas de 50 mL, llenando un volumen de 23 mL. Para el primer tratamiento se utilizaron (4.23±0.01) g de esponja natural sin inocular, en el segundo se requirieron (6.50±0.01) g de esponja sintética sin inocular. Para el tercero y cuarto tratamiento se utilizaron (4.18±0.01) g de esponja natural y (6.58±0.01) g de esponja sintética, respectivamente, y se adicionaron 46 pellets distribuidos de manera uniforme en cada esponja.

Se llenaron las buretas con el caldo descrito en el cuadro 1 hasta su máxima capacidad y se mantuvieron a temperatura ambiente por catorce días, con el fin de permitir el crecimiento de biomasa. Posteriormente, se pasó agua destilada en la bureta, luego se pasó una disolución con las condiciones descritas en el cuadro 2 y se tomaron seis réplicas para cada tratamiento.

Cuadro 2. Condiciones de la disolución de bromacil

Parámetro	Promedio	Mínimo	Máximo
Turbiedad (NTU)	*ND	*ND	*ND
pH	6,42	5,98	6,78
Concentración de bromacil ($\pm 0,9 \mu\text{g/L}$)	71,9	53,9	79,6
Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	22,5	21,0	23,1

*ND: No detectable por el equipo utilizado.

Ensayos en biofiltro de laboratorio

El biofiltro consiste de un tanque de almacenamiento de 20 L, un tubo de desagüe, una carcasa de material acrílico transparente, dos lechos filtrantes distribuidos en recipientes cilíndricos metálicos, válvulas y un dispersor para una distribución de caudal influente constante y homogéneo. En la figura 1 se muestra un esquema de la planta utilizada y en el cuadro 3 los parámetros de diseño asociados a ella.

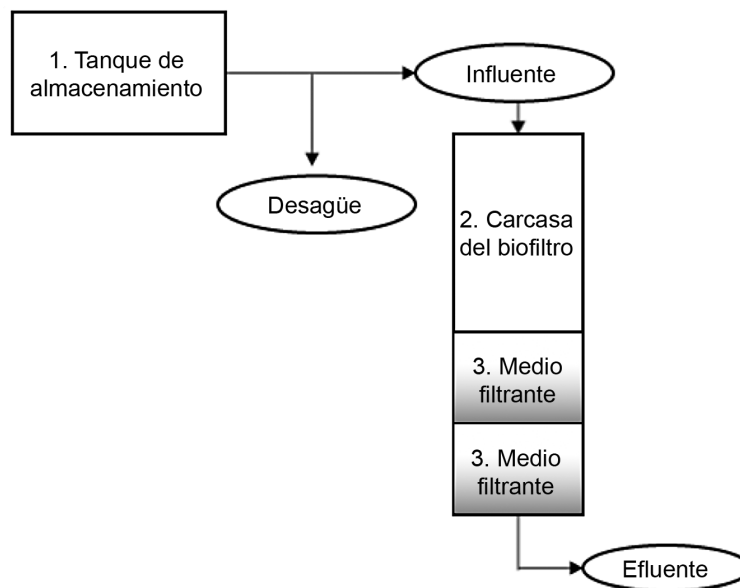


Figura 1. Esquema del biofiltro.

Se prepararon dos medios filtrantes –L1 y L2– con una relación de volumen 2:1 esponja marina natural inoculada y arena. Para cada medio se utilizaron $(61,00 \pm 0,01)$ g y $(60,90 \pm 0,01)$ g de esponja, respectivamente; cada esponja se inoculó con pellets y se mantuvo en un recipiente con el caldo descrito en el cuadro 1 hasta su máxima capacidad a temperatura ambiente durante 14 días. La arena utilizada presentó las siguientes características: solubilidad en ácido clorhídrico menor al 5%, tamaño efectivo de 0,5 mm y una gravedad específica de 0,4.

Se pasó un caudal de $0,25 \text{ m}^3/\text{h}$ constante de una disolución con las características del cuadro 2 para cada lecho y se midió el porcentaje de remoción de bromacil, el tiempo de retención y la velocidad de filtración. Se obtuvieron seis réplicas para cada lecho filtrante. En el cuadro 3 se observan algunos parámetros de diseño aplicados en el experimento.

Cuadro 3. Parámetros de diseño del biofiltro.

	L1	L2
Diámetro del filtro (m)	0,190	0,190
Largo del filtro (m)	0,800	0,800
Diámetro del lecho filtrante (m)	0,187	0,187
Largo del lecho filtrante (m)	0,110	0,220
Tiempo de retención (s)	18,04	39,64
Velocidad de filtración (m/h)	22	20
Carga hidráulica (m ³ /m ² h)	8,8	8,8

Para determinar la eficiencia del sistema, se llevó a cabo la cuantificación del bromacil mediante un equipo de cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) marca Agilent Technologies, modelo 1260 Infinity, con un límite de cuantificación de 7.7 µg/L y un límite de detección de 2.3 µg/L. Se utilizó una columna de cromatografía de fase reversa marca Aligent, modelo Eclipse Plus C18, a una temperatura constante de 25 °C. La fase móvil consistió en un flujo de 0,7 mL/min de una disolución de acetonitrilo al 10% y 0,3 mL/min de acetonitrilo grado HPLC. Se inyectaron muestras de 50 µL prefiltradas con membranas de 0.45 µm. Se utilizó un detector de arreglo de diodos a 215 nm de longitud de onda.

Los análisis de turbiedad se efectuaron mediante un turbidímetro portátil marca Orbeco, modelo TB200, y el pH se determinó mediante un pHmetro marca Hanna, modelo HI 98128. Estos análisis se realizaron posteriormente a la preparación de disoluciones.

Para la identificación del hongo del microorganismo se utilizó un microscopio de barrido electrónico marca Hitachi, modelo TM-300 del laboratorio Institucional de Microscopia.

Resultados y discusión

Aislamiento y evaluación de un microorganismo para la remoción de bromacil

Se observó el crecimiento de un solo tipo de hongo a partir del quinto día en las ocho placas cultivadas. Se evidenció que la temperatura fue un factor de poca importancia durante el aislamiento, ya que para ambos tratamientos (con una temperatura ambiente de 17-23 °C y una temperatura constante de 35 °C) aparecieron colonias del hongo simultáneamente al quinto día. Para identificar el hongo se observó un conidióforo ramificado típico del género *Penicillium* spp., tal y como se muestra en la figura 2.



Figura 2. Conidióforo de *Penicillium* spp. observado por microscopía electrónica de escaneo.

Se evaluó la capacidad de remoción de bromacil por parte del hongo aislado en tres medios acuosos con concentraciones de 20, 30 y 40 µg/L. En la figura 3 se muestra la variación en la eficiencia de remoción respecto al tiempo. Cuando se alcanzaron las 72 horas, se evidenció una degradación superior al 50% del contaminante en el medio, lo cual hizo posible valorar su uso en un biofiltro.

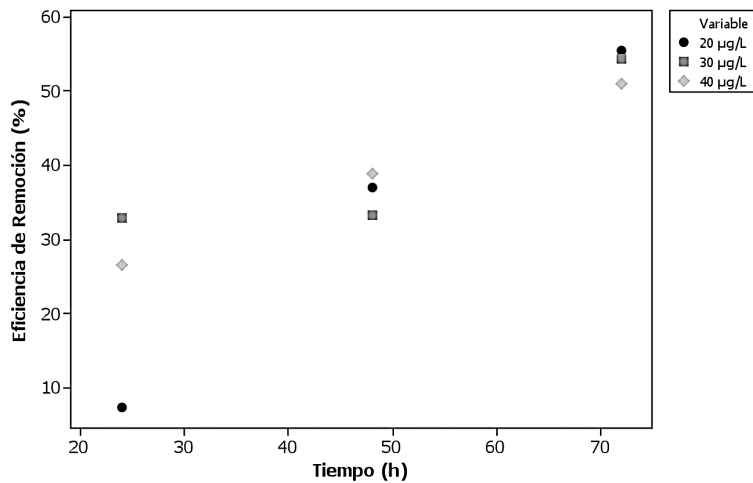


Figura 3. Variación de la eficiencia de remoción de bromacil en tres medios acuosos de diferente concentración.

Selección del medio de soporte

Se evaluaron dos medios de soporte en buretas: esponja marina de origen natural y esponja marina de origen sintético. Ambas esponjas inoculadas removieron entre 95-97% de bromacil al pasar una disolución preparada con las características físicoquímicas presentadas en el cuadro 2; la figura 4 muestra la eficiencia promedio de remoción para cada tratamiento. Se determinó que las esponjas que no fueron inoculadas removieron por simple adsorción en promedio menos del 50% del contaminante. El tiempo de retención en las buretas varió entre 8.50 y 10.25 minutos para la esponja sintética y entre 2.30 y 6.20 minutos para la esponja natural. Estas variaciones se debieron a las condiciones de empaquetamiento presentadas por las buretas.

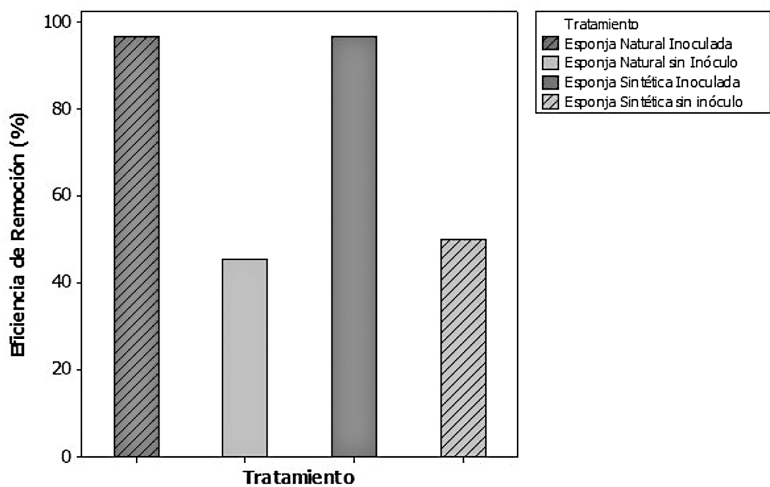


Figura 4. Eficiencia de remoción para cada tipo medio filtrante.

En la figura 5 se muestra el gráfico de Pareto estandarizado con un 95% de confianza para este experimento. Este demuestra que tanto el tipo de esponja como su interacción con el inóculo no producen un efecto significativo en la remoción. Además, se determinó que la presencia del inóculo es el único factor que genera un aumento significativo en la remoción del herbicida.

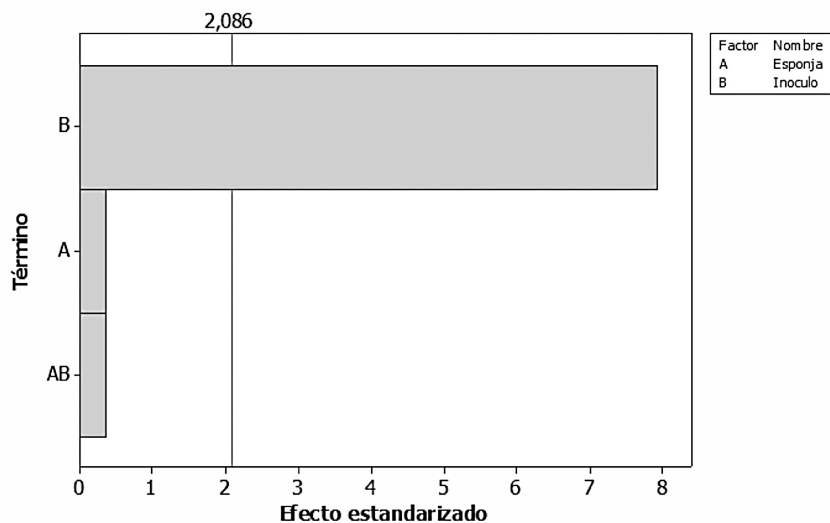


Figura 5. Gráfico de Pareto estandarizado para el experimento con medios de soporte.

Ensayos en biofiltro de laboratorio

Se realizaron pruebas de remoción de bromacil en un prototipo de biofiltro para dos lechos filtrantes –L1 y L2– con las características de diseño que se muestran en el cuadro 3. En el primer lecho se determinó una eficiencia de remoción promedio del 80% y para el segundo lecho la eficiencia promedio fue del 81%. Por lo tanto, se comprobó que los tiempos de retención asociados a cada lecho no causaron una variación significativa en la eficiencia de remoción.

Conclusiones

Se demostró que el hongo filamentoso *Penicillium* spp. es capaz de degradar más del 50% de bromacil de medios acuosos con concentraciones de entre 20.0 y 40.0 µg/L en periodos de 72 horas. Esta degradación resulta rápida al compararse con la vida media del contaminante en el ambiente, pero poco efectiva al utilizarse como sistema de tratamiento en un medio suspendido.

Se determinó que la eficiencia de remoción del contaminante aumenta al fijarse a un medio de soporte y el tiempo requerido es menor al compararse con la remoción producida por el microorganismo suspendido en un caldo.

Se comprobó que el tipo de esponja marina –natural o sintética– tiene poca importancia como medio de soporte en la eficiencia de remoción del plaguicida. Sin embargo, su inoculación es fundamental para el aumento de la eficiencia de remoción.

Durante la experimentación en el prototipo de biofiltro se comprobó que los tiempos de retención y longitudes de los lechos filtrantes utilizados son factores poco significativos en las eficiencias de remoción; lo realmente importante en la eficiencia de remoción es su inoculación o sea el trabajo realizado por el microorganismo.

Agradecimientos

A la Vicerrectoría de Investigación y Extensión por el financiamiento como proyecto estudiantil

Al personal del Centro de Investigación y de Servicios Químicos y Microbiológicos- CEQIATEC: Master Noemí Quirós, Sr Humberto Meza del Laboratorio de Cromatografía.

Al Ing Luis Fernando Alvarado del Laboratorio Institucional de Microscopia Electrónica.

Referencias

- Agüero, M. (15 agosto, 2007). AyA repartirá agua a pueblos afectados por contaminación. San José. Obtenido de http://www.nacion.com/nacional/servicios-publicos/AyA-repartira-pueblos-afectados-contaminacion_0_921707963.html
- Anju, A., Ravi, S.P. & Bechan, S. (2010). Water Pollution with Special Reference to Pesticide Contamination in India. *Scientific Research*, 2, 432-448. <http://doi.org/10.4236/jwarp.2010.25050>
- Benner, J., Helbling, D., Kohler, H.-P., Wittebol, J., Kaiser, E., Prasse, C. & Boon, N. (2013). Is biological treatment a viable alternative for micropollutant removal in drinking water treatment processes? *Water Research*, 47, 5955-5976. <http://doi.org/doi:10.1016/j.watres.2013.07.015>
- Boeglin, N. (2010). *Nivel de cumplimiento de decisiones judiciales en materia ambiental relativas a la protección del recurso hídrico* (p. 26). San José. Obtenido de http://www.estadonacion.or.cr/files/biblioteca_virtual/016/nicolas_boeglin.pdf
- Carl, D. (1973). *Degradation of Bromacil Terbacil, 2,4d and Antrazine and Antrazinein soil and pure culture and their effect on microbial activity*. University of California Riverside.
- Carlson, K. & Amy, G. (2000). The Importance of Soluble Microbial Products (SMPS) in Biological Drinking Water Treatment. *Water Research*, 34(4), 1386-1396. Obtenido de [http://www.researchgate.net/profile/Ken_Carlson4/publication/248329084_The_importance_of_soluble_microbial_products_\(SMPs\)_in_biological_drinking_water_treatment/links/546df4b90cf2bc99c21504bb.pdf](http://www.researchgate.net/profile/Ken_Carlson4/publication/248329084_The_importance_of_soluble_microbial_products_(SMPs)_in_biological_drinking_water_treatment/links/546df4b90cf2bc99c21504bb.pdf)
- Crawford, R. & Rosenberg, E. (2013). Bioremediation. En *The Prokaryotes* (4 ed. (pp. 295-304). Berlin. http://doi.org/DOI 10.1007/978-3-642-31331-8_30
- Cruz, E. (2010). BROMACIL. Obtenido de <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-datos-menu/78-bromacil>
- Hernández, F., Marín, J., Pozo, Ó., Sancho, J., López, F. & Morell, I. (2008). Pesticide residues and transformation products in groundwater from a Spanish agricultural region on the Mediterranean Coast. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 88, 409-424. <http://doi.org/DOI: 10.1080/0306731070124772>



- Kalyani, H. (1993). *Photodegradation of Bromacil and Terbacil by Ultraviolet Radiation*. Florida Atlantic University.
- Liao, X., Chen, C., Zhang, J., Dai, Y., Zhang, X. & Xie, S. (2015). Operational performance, biomass and microbial community structure: impacts of backwashing on drinking water biofilter. *Environmental Science Pollution Research*, 22, 546-554. <http://doi.org/10.1007/s11356-014-3393-7>
- Norton, C. & LeChevallier, M. (2000). A Pilot Study of Bacteriological Population Changes through Potable Water Treatment and Distribution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 268-276. Obtenido de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC91817/>
- Pfeuffer, R. (2011). South Florida Water Management District ambient pesticide monitoring network: 1992 to 2007. *Environmental Monitoring Assessment*, 182, 485-508. <http://doi.org/DOI 10.1007/s10661-011-1892-2>
- Rasul, G. & Cortez, L. (1988). Degradation of Bromacil by a *Pseudomonas* sp. *Applied and Environmental Microbiology*, 53(9), 2203-2207.
- Ruepert, C., Castillo, L.E., Bravo, V. & Fallas, J. (2005). *Vulnerabilidad de las aguas subterráneas a la contaminación por plaguicidas en Costa Rica* (p. 57). Heredia, C.R.: Obtenido de http://kioscosambientales.ucr.ac.cr/index.php?option=com_remository&Itemid=68&func=fileinfo&id=52
- Schipper, P. & Vissers, M. (2008). Pesticides in groundwater and drinking water wells; overview of the situation in the Netherlands. *Water Science Technology*, 57(8), 1277-1286. <http://doi.org/10.2166/wst.2008.255>.
- Young-Song, K., Yoon-Jin, L. & Sang-ho, N. (2007). Evaluation of a pilot scale dual media biological activated carbon process for drinking water. *Korean Journal of Chemical Engineering*, 24(253-260).
- Yu, X., Shi, X., Wei, B., Ye, L. & Shuting, Z. (2009). PLFA profiles of drinking water biofilters with different acetate and glucose loadings. *Ecotoxicology*, 18, 700-706. <http://doi.org/DOI 10.1007/s10646-009-0346-x>
- Zhang, M., Geng, S., Ustin, S. & Tanji, K. (1997). Pesticide occurrence in groundwater in Tulare County, California. *Environmental Monitoring and Assessment*, 45, 101-127.