

“INVESTIGACIÓN DE TÉCNICAS BIOLÓGICAS PARA LA DEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE LA FABRICACIÓN DEL LINDANO, MEDIANTE AISLAMIENTO Y CULTIVO DE CONSORCIOS BACTERIANOS EN REACTORES”. 2017-2018

Calleja E¹, Fernandez J¹, Velilla S¹; E. Navarro²; F. Macías³; De Miguel P⁴, Arjol MA⁴, personal y equipo del Laboratorio Pirenarium (Sabiñánigo)⁴

¹ Departamento de Agricultura, Ganadería y Medio Ambiente, Gobierno de Aragón, Zaragoza, España, 50071 “Unidad de descontaminación Integral del Lindano”.

² Instituto Pirenaico de Ecología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas

³ Dept. Edafología y Química Agrícola, Fac. de Biología, Universidad de Santiago de Compostela

⁴ Sociedad Aragonesa de Gestión Agroambiental SARGA, Zaragoza, España, 50018;

Introducción - Síntesis:

La contaminación ocasionada por la actividad de una fábrica de lindano (γ -HCH, gamma hexaclorociclohexano) en el entorno de Sabiñánigo, ha dejado una serie de espacios afectados por residuos de su actividad y otros residuos que son compuestos intermedios generados durante el proceso de fabricación (organoclorados de la familia los “clorobencenos”, clorofenoles, “alcanos”, etc.). Los espacios degradados son principalmente el Emplazamiento de Bailín, el Vertedero de Sardas, la antigua fábrica. Las condiciones meteorológicas de la zona y las características de los materiales geológicos en los emplazamientos generan la formación de sedimentos, lodos y suelos con distintos grados de afección por estos compuestos.

Se abordó el trabajo en cuatro etapas con el objetivo general de establecer un protocolo de búsqueda, aislamiento y caracterización de consorcios microbianos autóctonos (encontrados en los emplazamientos) para degradación de los residuos de la fabricación del lindano, ensayando en una matriz sólida formada con lodos, sedimentos y suelos del entorno de los lugares afectados. Así se establecieron los diversos objetivos por etapas:

- Etapa-1. Caracterizar los sustratos del entorno de la antigua fábrica de Inquinosa y de los vertederos de Sardas y Bailín afectados por la contaminación de residuos de la fabricación de lindano –HCH–.
- Etapa-2 Seleccionar consorcios bacterianos nativos que hayan tenido contacto con los contaminantes objetivo y puedan usarse en la biorremediación de los sustratos contaminados.
- Etapa-3 Obtener inóculos microbianos mediante cultivo celular en biorreactores con aditivos de fácil adquisición y bajo coste para la bioaumentación de las biopilas en etapas posteriores del proyecto.
- Etapa-4 Realizar una prueba piloto de bioremediación de suelos, lodos y sedimentos contaminados con residuos de lindano, mediante consorcios bacterianos autóctonos y aportes de nutrientes y estructurantes inocuos, baratos y cercanos, que permita conocer las condiciones óptimas de funcionamiento para su posterior aplicación a mayor escala

El desarrollo de los trabajos se monitorizó en todas sus etapas con la toma de muestras, la realización de análisis y caracterizaciones correspondientes. Observándose, que los rendimientos en la reducción de alguno de los isómeros y compuestos organoclorados (pesticida lindano, γ -HCH, e isómeros α , δ , del hexaclorociclohexano) se situó en torno al 90%-95%, con menor efectividad en el caso de los isómeros beta (β) y épsilon (ϵ) del 43% a 55%. Sin grandes diferencias en la actividad metabólica microbiana, y en la que se vio que las condiciones óptimas se desarrollaron con $10^6 - 10^7$ (bacterias por milímetro)

Se comprueba y verifica que el tiempo ideal de desarrollo de los tratamientos es de tres meses, manteniendo condiciones de aireación en la “pila” adecuadas, utilizando materiales estructurantes que faciliten la aireación y homogeneizando con volteos, así como añadiendo nutrientes (nitrógeno, fósforo y potasio, NPK). Observando una limitación en la distribución de los contaminantes (si estos están en forma granulada-particulada) se dificulta su eliminación.

MÉTODO Y DESARROLLO

Etapa-1, como punto de partida se determinó la necesidad de conocer las características físico-químicas de los materiales a tratar, procediendo a identificar las tipologías principales de los sustratos minerales presentes.

Así, por parte del departamento de Edafología y Química Agrícola de la Facultad de Biología de la Universidad de Santiago de Compostela, se analizaron sustratos en el emplazamiento de Inquinosa, Sardas y Bailín, procediéndose a determinación mineralógica y los parámetros de granulometría, humedad, pH, conductividad, potencial redox, carbono y nutrientes principales, cationes mayoritarios y metales, y capacidad de intercambio catiónico.

La concentración de referencia que se utilizó en los sustratos se consideró situada en torno a los 500 mg/kg de sumatorio de HCH, con un 83% de isómero α (alfa), un 12% de isómero β (beta), un 2 % de isómero γ (gamma), δ (delta) y el 1% restante de isómero ϵ (épsilon).

Etapa-2, de caracterización y selección de los consorcios bacterianos, para elegir las bacterias nativas (del sitio) que estuvieran presentes y pudieran usarse para la remediación.

Para ello se tomaron muestras (17 ud) en los emplazamientos de Bailín, Sardas e Inquinosa, con las condiciones físico-químicas conocidas de la etapa anterior y estableciendo en esta ocasión las complementarias de actividad metabólica heterótrofa (Biolog-Eco MicroPlates), y valorando qué bacterias estaban vivas y cuáles muertas (método LIVE/DEAD).

Con ello se seleccionaron seis sustratos y se verificó en ellos la tolerancia a lixiviados cargados con contaminantes y otros disueltos en metanol (BIOLOG ECO MicroPlates), y con ello cuál era la capacidad microbiana para degradarlo (BIOLOG MT2 MicroPlates). Tras lo cual se volvieron a seleccionar tres sustratos, y en ellos se evaluó la tolerancia de la comunidad microbiana heterótrofa al lixiviado artificial tratado, en este caso con nanopartículas de Fe cerivalente (mediante BIOLOG ECO MicroPlates y respirometrías).

Etapa-3: se probaron y ensayaron los sustratos en reactores, para lo ello se obtuvieron inóculos microbianos con cultivos celulares en biorreactores para bioaumentación posterior de las biopilas en la prueba piloto de campo. En ésta y comprobada la mejor viabilidad de un sustrato frente a otro, se seleccionaron como los más apropiados los de Bailín en la posición muestreo 6 (BAI6) y los de Inquinosa en la posición 1 (INQ1). Se realizaron pruebas respirométricas para evaluar el origen y composición óptimas de los nutrientes a añadir en los reactores. Poniendo a posteriori en marcha los dos seleccionados y monitorizando en ellos los parámetros físico-químicos, la cantidad y tipo de nutrientes y realizando contajes celulares (LIVE/DEAD) y su actividad metabólica (BIOLOG ECO MicroPlates).

Etapa 4, se fabricaron estructuras para montaje de las biopilas, a partir de cubículos de hormigón sobre superficie impermeable, con un sistema de tuberías para aireación, lecho de grava para recoger los lixiviados, cobertura de sombreado para evitar la insolación. Cada Biopila tenía unas dimensiones de 0,5 m de altura x 2 m de longitud x 1,5 m de anchura. Estas se conformaron y prepararon de forma homogénea, con una base de sedimentos, lodos y tierras a las que se añadieron los nutrientes e inóculos en riegos preparados.

Las técnicas de descontaminación mediante biopilas se basan en la potenciación de los microorganismos como degradadores de los compuestos de HCH y sus derivados. Estudiando en este caso las condiciones idóneas que permiten el adecuado desarrollo de la población bacteriana, y monitorizando la temperatura, pH, condiciones de oxidoreducción, aireación, contenido en nutrientes y tiempos necesarios para degradar los compuestos.

RESULTADOS

ETAPA-1

En los sustratos dominan el cuarzo y la calcita.

En general, estos muestran una granulometría heterogénea, escasa retención de humedad, pH alcalino, conductividad baja y condiciones oxidantes. Además, sufren una gran deficiencia de los nutrientes esenciales y una escasa biodisponibilidad de oligoelementos y materia orgánica, lo que limitaría la actividad metabólica microbiana.

Las concentraciones de HCH de los suelos analizados, superan con frecuencia los límites para su uso industrial o agrícola y otros usos. En otros casos las concentraciones halladas de HCH suponen que el suelo sea catalogado como residuo. Los isómeros más resistentes a la degradación -el beta y el épsilon- predominan en las zonas con contaminación histórica, mientras que los isómeros alfa, gamma y delta presentan mayores concentraciones en los sustratos más contaminados.



Fig. 1. Calicatas de muestreo y caracterización de sustratos (izq. Marga, dech. Limos-Arenas)



Fig. 2. Izquierda cata en lodos de balsa, derecha equipo determinación nutrientes en suelo

ETAPA-2

En general, los sustratos de Bailín, Sardas e Inquinosa se caracterizan por una granulometría fina, humedad baja, pH alcalino, conductividad escasa y condiciones oxidantes. Los lodos se distinguen por tener una mayor humedad, mayor conductividad y condiciones anaerobias o anaerobio-facultativas.

Las concentraciones de HCH y otros contaminantes son bajas o moderadas, excepto en la balsa de lixiviados de Sardas, cuyos niveles de contaminación son muy altos debido al aporte histórico de lixiviados. Los isómeros más abundantes son β -HCH y γ -HCH. El enriquecimiento en β -HCH en los sustratos menos contaminados, refleja la menor degradabilidad de este isómero frente a la actividad biológica y su mayor fotoestabilidad.

Los sustratos con mayor actividad metabólica microbiana fueron BAI6, BAI7, BAI8, INQ1, INQ2 y SAR3, lo que no puede explicarse por un mayor número de células bacterianas. Las comunidades bacterianas del suelo control (BAI0) y del sustrato con un pH muy elevado (SAR2) mostraron la menor actividad metabólica. El comportamiento de BAI0 podría sugerir que un cierto nivel de contaminación del suelo favorece el desarrollo de comunidades microbianas con mayor capacidad degradativa.

Las comunidades microbianas de BAI6 e INQ1 destacaron por tener una elevada actividad metabólica, una elevada diversidad metabólica y tolerancia al lixiviado artificial, ya que no sufrieron efectos negativos al ser expuestas a 1000 $\mu\text{g/l}$ de SUMA HCH, además de una gran capacidad para degradar metanol. Además, mostraron una importante actividad degradativa de los compuestos orgánicos presentes en el suelo del que proceden, en ausencia de otras fuentes de carbono.

La toxicidad de las nanopartículas de ZVI para las bacterias depende de su concentración y del sustrato y su comunidad bacteriana. Si se pretende reducir las concentraciones de compuestos organoclorados en el suelo mediante su degradación biológica, podría no ser recomendable utilizar al mismo tiempo NP de ZVI. En el caso de hacerlo, deberían usarse bajas concentraciones, posiblemente inferiores a 0,1 g/l, para evitar dañar a las comunidades bacterianas más sensibles.

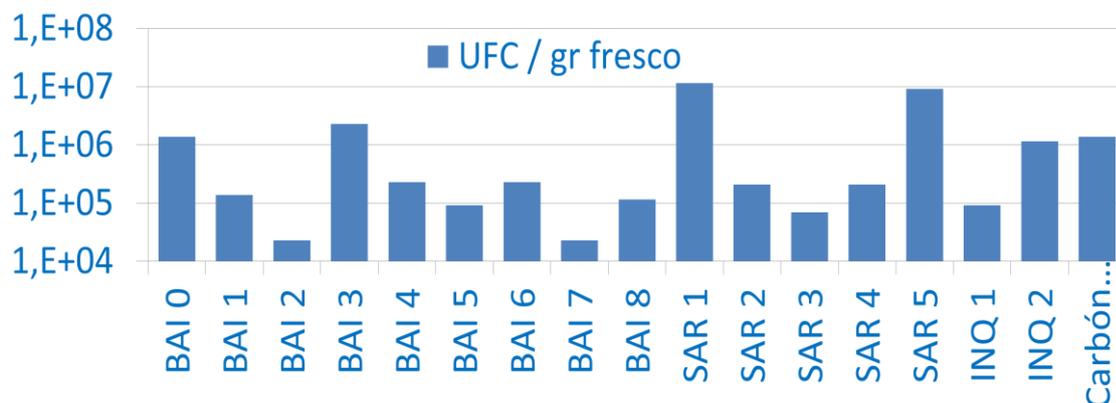


Fig.3. Contajes de unidades formadoras de colonias –UFC- presentes en las diferentes muestras de suelo, representadas por gramo de suelo fresco

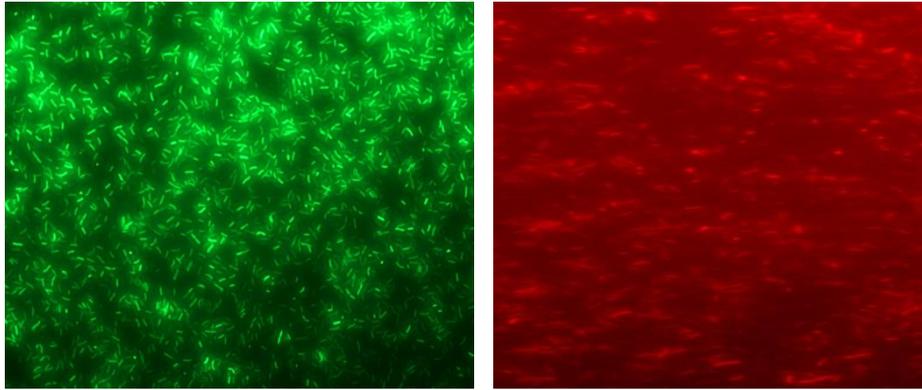


Fig.4. Fotografías con microscopio de fluorescencia de bacterias vivas (tinción verde) y bacterias muertas (tinción rojo) utilizando el método live/dead

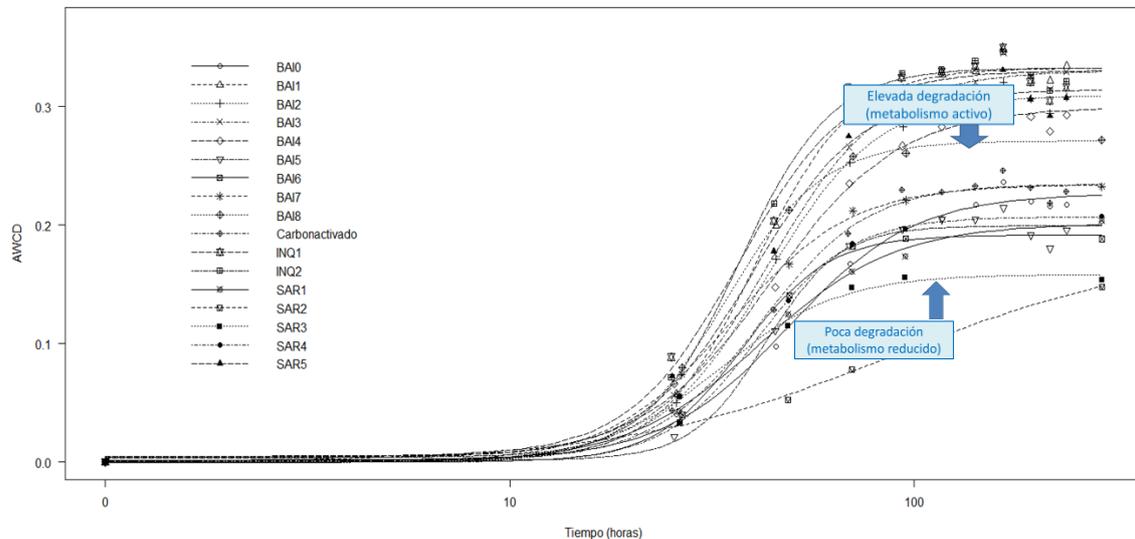


Fig.5. Incremento temporal (eje X) de la degradación de sustratos de carbono (AWCD en el eje Y) por parte de las diferentes comunidades bacterianas muestreadas y caracterizadas.

ETAPA-3

Las fuentes de nutrientes evaluadas inicialmente fueron glucosa, levadura de cerveza, pienso de perro y gato. Las respirometrías aconsejaron el uso de pienso de perro como fuente lenta de carbono y nutrientes. Se determinó mantener una relación C6:N1, N2:P1 y N1:K1.

Los biorreactores se iniciaron el 22 de mayo de 2018 y consistieron en tanques de 1000 l, con aireación y control de temperatura (a 30°C). Se añadió el sustrato correspondiente, agua sin cloro y lixiviados de las balsas de tormentas. Cada varios días se realizó un sangrado, reponiendo agua sin cloro y lixiviado, y adicionando nutrientes.

La bioaumentación se consigue en un plazo muy corto de tiempo en los biorreactores. La glucosa es el aporte más sencillo y barato de carbono pero tiende a acidificar el medio. La forma amoniacal del nitrógeno evita la formación de amoníaco en exceso y el desarrollo de bacterias desnitrificantes autótrofas. El consumo de P y K es menor del considerado y las relaciones frente al nitrógeno y al carbono deben ser menores. Los procesos de bulking (espumas) podrían deberse al exceso de fósforo, déficit de nitrógeno, conductividad, o grasas en los nutrientes. Las harinas de soja pueden ser una fuente adecuada de carbono y potasio. Para favorecer su asimilación es necesario realizar una predigestión por vías enzimáticas.

ETAPA-4

Las biopilas (1 m³ y espesor medio de 0,5 m) se montaron en cubículos de hormigón (2 x 1,5 m) dotados de sistemas de aireación, calefacción, humectación y sombreado. Se aportó arlita como estructurante para facilitar la aireación, cascarilla de arroz como estructurante y fuente lenta de C y nutrientes: pulpa de manzana como fuente rápida de C y nutrientes (NPK como abonos). En dos biopilas se aportó estiércol seco de vaca. Como sustrato a descontaminar se utilizó el sedimento acumulado en el pie del antiguo vertedero de Bailín. Además, se añadió HCH molido procedente del desmantelamiento del vertedero ("petrolindano"). En dos biopilas (SAR1 A1 y A2) se añadió lodo de Sardas en

lugar de “petrolindano” y no se aportaron inóculos microbianos. Estos inóculos se añadieron al inicio y una vez a la semana.

El ensayo se prolongó durante 2 meses con riegos diarios, aportes quincenales de inóculos, control diario de humedad y temperatura, muestreo quincenal de gases, lixiviados y sólidos para análisis. Las condiciones de humedad y temperatura en las biopilas se han mantenido en rangos adecuados. La generación de lixiviados ha sido reducida y la fase gaseosa alcanza concentraciones significativas de compuestos volátiles y semi-volátiles. Los rendimientos en la reducción de HCH han sido elevados en todos los casos, lo que es indicador de una degradación cometabólica que requiere poca especialización bacteriana. La reducción global de HCH se ha situado entre el 90 y 95 %, aunque solo se ha bajado en la concentración final de 5 mg/Kg en las biopilas con menor cantidad de HCH e inóculos de Bailín. Por Isómeros alfa, gamma y delta presentan valores medios de reducción entre el 91,5 y 94 % con máximos del 99,4 % (ver la Figura 1); mientras beta y épsilon sitúan su media entre 43 y 55 %.

No hubo diferencias significativas en la actividad metabólica microbiana entre las biopilas en la primera medición (27 junio), con densidades óptimas entre 106 y 107 bacterias por mililitro. En la medición final (11 julio) tampoco hubo diferencias importantes en la actividad metabólica o en la intensidad y tasa de degradación. Aunque la actividad metabólica fue menor en la última entre 105 y 106 bacterias por mililitro. **D)** Los tests de viabilidad demostraron que las bacterias sobreviven tras una criogenización de dos semanas a -80°C .



Fig. 6. Reactor físico de la biopila. Imagen izquierda tuberías aireación. Derecha mallas de sombreo sobre los reactores.



Fig. 7 Izquierda con estructura de protección y tuberías de riego, derecha lecho de grava e hilo radiante para calentamiento



Fig. 8 Abajo mezcla en pala-cazo mezcladora, a la derecha adición de componentes a la mezcla.

CONCLUSIONES

El uso de consorcios bacterianos autóctonos bioaumentados procedentes de zonas contaminadas con HCH es una técnica viable para descontaminar sustratos sólidos con residuos de lindano, mediante biopilas utilizando materiales y residuos de bajo coste como estructurantes y fuentes de carbono, para concentraciones de contaminantes superiores a 500 mg/Kg.

Los tiempos de tratamiento deben prolongarse en torno a 3 meses, siendo necesario airear, mantener la humedad por encima del 20 %, realizar algún volteo periódico para homogeneizar y aportar nutrientes (NPK) a lo largo del proceso.

Los resultados están condicionados por la distribución de los contaminantes, siendo necesario mejorar su biodisponibilidad si están en forma particulada.

Se aprecia un bajo rendimiento de remediación global por la necesidad de aportar en torno a un 50% de material esponjante limpio. Puede haber dificultades de mantener las condiciones aerobias y de temperatura al trasladar este procedimiento de esta biopilas de mediana escala a gran escala de cientos de metros cúbicos

El presente estudio se realizó con participación económica de la CAIXA