

SOLUCIONES TECNOLÓGICAS PARA LA BIORREMEDIACIÓN DE EFLUENTES SÓLIDOS PROVENIENTES DE PLANTAS DE HIGIENE URBANA CONTAMINADOS CON METALES PESADOS

Bournissent, Sofía¹

¹Instituto de Desarrollo Tecnológico para la Industria Química (INTEC-UNL-CONICET)
Directora: Lovato, María Eugenia - Codirector: Manzo, Ricardo Martín

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Microbiología, Eficacia depurativa, Metales Pesados.

INTRODUCCIÓN

A diferencia de los compuestos orgánicos, los metales pesados son indestructibles y no pueden ser degradados por ningún proceso. Sin embargo, los (micro)organismos influyen en la solubilidad y especiación de dichos metales, por lo que pueden alterar sus características en el ambiente en el que se encuentren por remoción, recuperación, precipitación y detoxificación (Rahman y Singh, 2020). De esta manera, la biorremediación de sistemas contaminados con metales pesados puede presentarse como una alternativa tecnológica viable para la solución de esta problemática compleja. El empleo de rellenos sanitarios (RS) es un procedimiento habitual para la disposición final de residuos, que intenta minimizar el impacto ambiental, al permitir la descomposición de los mismos bajo condiciones controladas. Los lodos provenientes del tratamiento de lixiviados generados en los RS presentan un alto contenido de humedad, baja biodegradabilidad, altos valores de DBO y DQO, alta conductividad eléctrica y grandes cantidades de materia orgánica disuelta, principalmente sustancias húmicas, además de metales pesados. En relación a ello es de relevancia estudiar la adaptabilidad de los grupos microbianos involucrados en los procesos de depuración de los ambientes contaminados a las diversas condiciones fisicoquímicas impuestas. Por otro lado, luego de un tratamiento depurativo, químico o biológico, es preciso evaluar la habilidad de saneamiento del mismo a la hora de proyectar aplicarlo en estudios depurativos *in situ* o *ex situ* a gran escala. Para ello, se propone realizar ensayos utilizando diferentes organismos **bioindicadores**, con evidentes diferencias metabólicas y resistencia relativa a los contaminantes en estudio, de manera de evaluar la efectividad del tratamiento remediador. Con el objetivo de brindar una alternativa de tratamiento que permita cerrar un círculo virtuoso, se proyecta estudiar diferentes opciones para la disposición final de los lodos tratados, como así también de la biomasa generada.

Título del proyecto: Evaluación de estrategias biológicas de remediación para el tratamiento y disposición de contaminantes persistentes presentes en lodos activados del relleno sanitario de la ciudad de Santa Fe
Instrumento: PICT 2020 Serie A GRF tipo D 00780
Año convocatoria: 2020
Organismo financiador: ANPCyT
Director: Dr. Ricardo M. Manzo



OBJETIVOS

- Estudiar la capacidad de los diferentes microorganismos aislados del lodo de crecer en medios líquidos tanto en ausencia como en presencia de metales pesados.
- Ejecutar ensayos de biorremediación de metales pesados en medios líquidos empleando las cepas aisladas de los sistemas sólidos contaminados.
- Diseñar y optimizar las técnicas analíticas que permitan detectar las diferentes especiaciones de los metales estudiados, con énfasis en el cromo.
- Evaluar la efectividad de los tratamientos aplicados utilizando bioensayos ecotoxicológicos empleando semillas de *Lactuca sativa* (lechuga).

METODOLOGÍA

Ensayos de habilidad de crecimiento en medios líquidos: En primer lugar es necesario señalar que no todos los microorganismos aislados mostraron habilidad de crecimiento en los medios líquidos estudiados. Esto, aunque resulta ser un fenómeno metabólico bastante común, indica la imposibilidad de utilizar dichas cepas para la depuración de efluentes líquidos contaminados con metales pesados. De esta forma, para evaluar el crecimiento de los microorganismos en medios líquidos, se utilizaron 25 aislados de mohos y bacterias provenientes del lodo del RS de Santa Fe. Esta experiencia se realizó en ausencia de metales pesados. Los medios líquidos utilizados fueron aquellos en los cuales se efectuaron los aislamientos iniciales y que mostraron un buen crecimiento en ellos. Así, para mohos se utilizó caldo Czapek, caldo extracto de malta y caldo caseína-almidón, mientras que para bacterias (y actinobacterias), se emplearon caldo ácidos húmicos simple (HVAS), caldo ácidos húmicos con vitaminas, caldo ISP-2 y caldo soya-tripticasa. Finalmente, se evaluó el crecimiento durante 15 días a 25 y 30°C mediante recuento microbiano para bacterias, gravimetría para mohos y medida de la turbidez de los cultivos a 600 nm por espectrofotometría, para ambos grupos microbianos.

Ensayos en medios líquidos: Para evaluar la tolerancia a los metales en medio líquido de las cepas seleccionadas, se llevó a cabo un análisis del crecimiento y la capacidad de remoción o cambio de especiación de los metales en sus correspondientes medios de cultivo. Para ello, se establecieron concentraciones medias de tolerancia a cada metal, las cuales consistieron en 5 mM de cromo, 10 mM de plomo y 10 mM de arsénico. Se emplearon matraces de Erlenmeyer de 150 y 250 ml, a los cuales se les añadió 100 ml de medio de cultivo MEA o HVAS, según la correspondiente cepa a ensayar. Se evaluó una cepa por metal, con una duración del ensayo de 14 días, empleando agitación continua orbital a 140 rpm a 25°C en aerobiosis. Se asignó un matraz de Erlenmeyer por día y por cepa para los mohos, realizando la medida de la biomasa obtenida a los 0, 3, 5, 7, 10, 12 y 14 días. Se conservó también el sobrenadante del medio de cultivo del ensayo de biorremediación de cada cepa desde el día 0 hasta el día final del ensayo, de forma de poder realizar las determinaciones analíticas de los metales estudiados. Para esto, cada muestra se centrifugó durante 5 min a 6000 rpm y luego se filtró con jeringa utilizando filtros estériles de 0,45 µm de diámetro de poro (Dayub, 2024).

Para evaluar el crecimiento de las bacterias, se realizó un recuento microbiológico en los días 0, 3, 5, 7, 10, 12 y 14 días a partir de cada uno de los Erlenmeyers para cada microorganismo, realizándose las diluciones correspondientes a los diferentes tiempos del ensayo. Un volumen de 1 ml de cada dilución se sembró en placa y se adicionó el medio de cultivo apropiado para cada cepa. Seguidamente, las placas se incubaron a 25°C por 24-72 horas y se realizó el recuento de

las UFC/ml de cultivo para microorganismo ensayado (tanto para el ensayo con los metales como con los controles).

Tanto para los ensayos con mohos como con bacterias, se realizaron controles abióticos constituidos por el medio de cultivo sin inocular pero con el agregado de la solución de metal (de manera de verificar que ningún compuesto del medio provocara la transformación no deseada del metal en estudio). Asimismo, se realizaron controles positivos conformados por el medio de cultivo sin la adición de la solución de metal y con cada microorganismo estudiado (evaluándose el crecimiento en el tiempo del ensayo en condiciones “normales”).

Quantificación de cromo: para evaluar la proporción de Cr^{6+}/Cr^{3+} a lo largo de los ensayos de crecimiento/tolerancia a dicho metal, se decidió poner a punto una técnica espectrofotométrica que permita cuantificar dicha especiación. Esta razón se fundamenta en que, dada la toxicidad de este metal, el mismo no se acumula o adsorbe sobre los microorganismos, sino que los mismos pueden reducirlo a una forma menos tóxica, dentro de un rango de tolerancia determinado. La técnica propuesta es una modificación a la de Shigematsu *et al.* (1977) e involucra el uso de difenilcarbazida como agente desarrollador de la reacción.

Quantificación de arsénico y plomo: los sobrenadantes de cultivo de los ensayos y de los controles tanto al comienzo como al final de los estudios de tolerancia fueron analizados en cuanto a la concentración de cada metal mediante la técnica ICP-MS.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Del análisis de la **Tabla 1** puede apreciarse que de las 25 cepas analizadas, 5 de ellas no lograron crecer en los medios de cultivo seleccionados, por lo que no se continuó trabajando con las mismas. Para el caso de las cepas que crecieron en medio líquido y desarrollaron turbidez en sus cultivos en relación al medio control, se los ensayó únicamente con los metales a los cuales demostraron ser tolerantes en los estudios cualitativos en medios sólidos.

Tabla 1. Resultados preliminares obtenidos con las diferentes cepas ensayadas.

Cepa	Crecimiento en medio líquido+	Turbidez (600 nm)*	Arsénico (10 mM)	Plomo (10 mM)	Cromo (5 mM)
A1	+++	0,947	Sí	Sí	Sí
A2	+	0,474	No	No	Sí
A3	++	0,655	No	No	Sí
A4	++	0,707	No	No	Sí
A5	-	0,125	NE	NE	NE
A6	+++	1,206	Sí	Sí	Sí
A7	++	0,841	No	Sí	Sí
A8	-	0,135	NE	NE	NE
A9	+++	1,238	Sí	Sí	Sí
A10	++	0,891	Sí	Sí	No
A11	-	0,130	NE	NE	NE
A12	+++	1,358	Sí	Sí	Sí
A13	-	0,130	NE	NE	NE

A15	++	0,729	Sí	Sí	No
A16	++	0,695	Sí	Sí	No
A18	+	0,374	Sí	No	No
A20	+++	0,989	Sí	Sí	Sí
A22	-	0,125	NE	NE	NE
A23	+++	1,174	Sí	Sí	Sí
A24	++	0,561	Sí	Sí	No
A25	+++	0,946	Sí	Sí	Sí
A26	+++	0,874	Sí	Sí	Sí
A27	+++	1,098	Sí	Sí	Sí
A28	+++	1,348	Sí	Sí	Sí
A29	+++	1,013	Sí	Sí	Sí
Medio control	-	0,125	NE	NE	NE

NE: no ensayado; * evaluada a las 72 h a 25°C; + la positividad del crecimiento se definió de acuerdo a los turbidez observada en los cultivos.

Con los resultados obtenidos se proyecta ejecutar los ensayos de biorremediación empleando el lodo en estudio y tierras contaminadas artificialmente con los metales; asimismo, se ejecutarán pruebas ecotoxicológicas que permitan evaluar la eficacia depurativa del tratamiento.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Dayub, S. 2024. Evaluación de estrategias biológicas de remediación de metales pesados recalcitrantes presentes en efluentes de alto impacto ambiental. Tesina Final de Licenciatura en Biotecnología . UNL. Director: Ricardo Manzo; co-director: Ma. Eugenia Lovato. Jul 2024. 135 p.

Rahman, Z., Singh, V. P. (2020). Bioremediation of toxic heavy metals (THMs) contaminated sites: concepts, applications and challenges. *Environmental Science and Pollution Research*, 27(22), 27563-27581.

Shigematsu, T., Gohda, S., Yamazaki, H., & Nishikawa, Y. (1978). Spectrophotometric determination of chromium (III) and chromium (VI) in sea water. *Bulletin of the Institute for Chemical Research, Kyoto University*, 55(5), 429-440.

