
This is the **published version** of the master thesis:

Sanchez Altabas, Víctor Rodrigo; Blánquez, Paqui (tut.); Fernandez Verderjo, David Juan (tut.). *Biodegradación de lindano y clorobencenos en aguas subterráneas del vertedero de Sardas mediante un biorreactor secuencial anaerobio-aerobio*. (Universitat Autònoma de Barcelona), 2026 (Enginyeria Biològica i Ambiental)

This version is available at <https://ddd.uab.cat/record/336447>

under the terms of the  license.



BIODEGRADACIÓN DE LINDANO Y CLOROBENCENOS EN AGUAS SUBTERRÁNEAS DEL VERTEDERO DE SARDAS MEDIANTE UN BIOREACTOR SECUENCIAL ANAEROBIO- AEROBIO

VÍCTOR RODRIGO SÁNCHEZ ALTABÁS

MÀSTER EN ENGINYERIA BIOLÒGICA I AMBIENTAL

**FRANCISCA BLÁNQUEZ CANO Y JUAN DAVID
FÉRNANDEZ VERDEJO**

11/02/2025

Resumen

La contaminación por residuos de hexaclorociclohexano (HCH) y clorobencenos en el acuífero del vertedero de Sardas (Sabiñánigo, Huesca) constituye uno de los problemas ambientales más relevantes asociados a la producción histórica de lindano. En este trabajo se evalúa el potencial de bioestimulación de las comunidades microbianas autóctonas del pozo 14S mediante un biorreactor secuencial anaerobio-aerobio de 7,5 L alimentado con agua real del acuífero, complementado con ensayos en microcosmos.

Puntos clave

- Las bacterias autóctonas del agua subterránea degradaron el lindano bajo condiciones anaerobias.
- El tratamiento secuencial anaerobio-aerobio permitió la eliminación completa de los clorobencenos en el reactor.
- Los microcosmos permitieron comparar y validar los resultados obtenidos en el reactor en cierta medida.
- El lactato y el fósforo actuaron como factores clave en la activación de la actividad microbiana.
- No fue necesaria la bioaumentación para alcanzar una degradación significativa.

Palabras clave

Hexaclorociclohexano, Lindano, Clorobenceno, Bioremediación, Bioestimulación, Biorreactor, Tratamiento Secuencial.

Introducción

El hexaclorociclohexano fue sintetizado por primera vez por Michael Faraday en 1825, aunque no fue hasta 1942 cuando se descubrieron las propiedades insecticidas del isómero γ -HCH, posteriormente denominado lindano [1]. A partir de ese momento, el lindano se convirtió en uno de los insecticidas organoclorados más utilizados a escala global [2, 3].

La contaminación de suelos y aguas subterráneas por residuos de lindano y otros isómeros de hexaclorociclohexano (HCH) constituye actualmente un problema ambiental de primer orden a escala global debido a su elevada persistencia, bioacumulación y toxicidad carcinogénica y disruptora endocrina. Durante la producción industrial de lindano solo el isómero γ -HCH (lindano) presenta actividad insecticida, mientras que el proceso de purificación genera entre 6 y 10 toneladas de isómeros residuales de HCH por cada tonelada de producto [4, 5].

Su proceso de síntesis industrial se basa en la foto-cloración del benceno mediante Cl_2 y radiación ultravioleta, una reacción en cadena que incrementa progresivamente el grado de cloración del anillo y genera una mezcla de isómeros conocida como HCH técnico. Durante este proceso también se forman compuestos asociados, como el heptaclorociclohexeno, identificado posteriormente en los residuos industriales de la fabricación de lindano [6, 7]. Entre los isómeros generados, los α , β y γ -HCH fueron incluidos en el Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes debido a su elevada persistencia, bioacumulación y toxicidad, así como a su capacidad de transporte a larga distancia [8, 9]. En Europa, diversos informes recientes han subrayado la magnitud del problema asociado a los residuos históricos de HCH y la necesidad de desarrollar estrategias de remediación eficaces para los emplazamientos contaminados [10].

El complejo de vertederos de Sabiñánigo (Huesca) es un caso paradigmático de esta contaminación a gran escala (Figura 1). Entre 1975 y 1988, la empresa INQUINOSA vertió aproximadamente 115.000 toneladas de subproductos de HCHs en los vertederos de Sardas y Bailín [3, 7]. Esta disposición incontrolada ha generado zonas fuente de fase densa no acuosa (DNAPL), estimadas en unas 6.000 toneladas, que migran por gravedad a través de las fracturas de las margas y contaminan el acuífero aluvial con mezclas complejas de isómeros de HCH, benceno y clorobencenos (Clorobenceno (MCB), Diclorobencenos (DCBs) y triclorobencenos (TCBs)) y más de un millón de toneladas de suelos contaminados [3, 11, 12]. La proximidad de estos vertederos al río Gállego supone un riesgo constante de contaminación superficial, lo que ha llevado a las autoridades a priorizar el tratamiento de las plumas de contaminación disuelta [3, 13]. Desde el año 2009, la inversión media para la gestión y control del vertedero de Sardas se

estima en 500.000 euros anuales [7, 10]. Estas actuaciones, junto con la monitorización permanente del acuífero, reflejan la magnitud del problema y la necesidad de desarrollar estrategias de remediación más eficaces que permitan reducir la carga contaminante de forma sostenible.

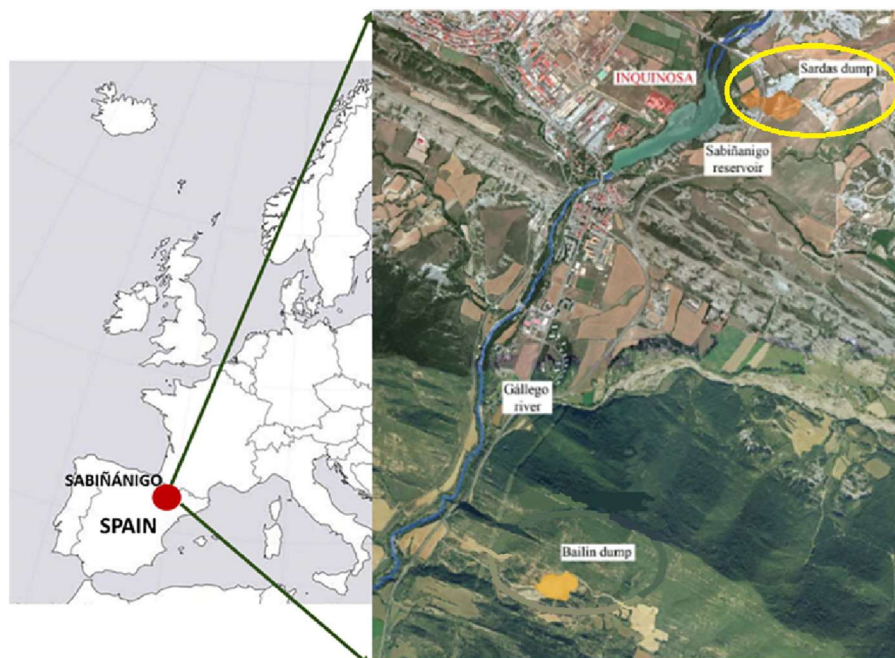


Figura 1. Localización del área de estudio en Sabiñánigo (Huesca, España), incluyendo el vertedero de Bailín, el vertedero de Sardas (remarcado en amarillo), la fábrica Inquinosa y el río Gállego. [11].

La biodegradación microbiana constituye una de las estrategias más prometedoras para la remediación de acuíferos contaminados con compuestos organoclorados, ya que permite transformar estos contaminantes mediante rutas reductivas bajo condiciones anaerobias o mediante oxidación en condiciones aerobias. La biorremediación de acuíferos contaminados con mezclas de organoclorados se basa en la capacidad metabólica de microorganismos para utilizar estos compuestos como sustratos o aceptores de electrones [14, 15]. En condiciones anaerobias, los compuestos con un elevado número de sustituyentes clorados, como los HCHs y los TCBs, que necesitan de condiciones altamente reductoras, son susceptibles de sufrir deshalogenación reductiva, proceso catalizado por bacterias dehalorespiradoras de géneros como *Dehalococcoides*, *Dehalobacter* y *Shewanella*, que los transforman en metabolitos menos clorados como el MCB y el benceno [16, 17]. Sin embargo, estos productos finales suelen persistir en ambientes reductores, siendo preferible la aplicación en condiciones aerobias para su completa eliminación [15].

Estos bencenos poco clorados pueden mineralizarse eficazmente en presencia de oxígeno mediante rutas oxidativas aerobias. Estas rutas suelen iniciarse con la hidroxilación del anillo aromático catalizada por monooxigenasas o dioxigenasas,

seguida de la apertura del anillo a través de las vías catecol-orto o catecol-meta, generando finalmente CO₂, biomasa y energía [18, 19]. Diversos estudios han demostrado que géneros como *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Burkholderia* y *Sphingomonas* desempeñan un papel clave en la degradación aerobia de clorobencenos y benceno, e incluso pueden mineralizar determinados di o triclorobencenos en suelos o acuíferos con historial de contaminación prolongado [20–24]. Esta dualidad impulsa y da la necesidad al desarrollo de tratamientos secuenciales anaerobio–aerobios capaces de abordar la complejidad química de estos emplazamientos [15, 24, 25].

La eficacia de los procesos de biodegradación *in situ* en el acuífero de Sardas está condicionada por la geoquímica del medio y la disponibilidad de nutrientes. Estudios previos han identificado que el fósforo es un factor limitante en la actividad degradadora bacteriana de estas aguas subterráneas, su suplementación incrementa de forma importante las tasas de degradación tanto en rutas aerobias como anaerobias [15, 19, 24]. Para potenciar la fase anaerobia inicial, se requiere la adición de donadores de electrones fermentables como el lactato o el piruvato [26–28]. Desde una perspectiva bioquímica, la fermentación del lactato constituye el motor metabólico del sistema al generar hidrógeno molecular (H₂), acetato y otros ácidos orgánicos de cadena corta. El H₂ actúa como el donador de electrones esencial para las bacterias dehalorespiradoras, las cuales emplean enzimas llamadas dehalogenasas reductoras (RDases) para romper los enlaces carbono-cloro de los contaminantes como los HCH y usarlos como aceptores terminales de electrones en su ciclo respiratorio [17, 27, 29, 30].

Por otro lado, la degradación aerobia del benceno o de los bencenos poco clorados producto de la dechloración de los HCH requiere del bombeo de aire o la adición de compuestos liberadores de oxígeno (como el CaO₂) para garantizar la presencia de condiciones óxicas en la zona contaminada [17, 19].

Paralelamente, la utilización de biorreactores de laboratorio constituye una herramienta esencial para estudiar la dinámica de degradación, evaluar la respuesta microbiana del emplazamiento a distintos estímulos y generar información clave para el diseño de tratamientos *in situ*. Representa un paso intermedio crítico entre los estudios en microcosmos de pequeño volumen y la implementación final de dichas estrategias de biorremediación *in situ*. Experiencias previas del grupo de investigación BioremUAB con reactores anaerobios de 5 L operando en modo fed-batch, han demostrado su utilidad para reproducir condiciones ambientales controladas, monitorizar la fermentación de sustratos como el lactato y estudiar la acumulación o desaparición de los contaminantes clorados o sus productos intermedios de degradación, proporcionando un marco experimental robusto para interpretar procesos de biodegradación complejos [31].

En este contexto, el presente trabajo tiene como objetivo evaluar el potencial de bioestimulación de las bacterias autóctonas del pozo 14S del vertedero de Sardas mediante un biorreactor secuencial anaerobio-aerobio alimentado con 7,5 L de agua real del acuífero. El estudio analiza la respuesta microbiana a la bioestimulación con lactato y fósforo para promover condiciones anaerobias, y la adición de oxígeno en el caso de las aerobias. También se contempla la posible necesidad de bioaumentación con cultivos específicos enriquecidos por el grupo de investigación BioremUAB en caso de detectar incapacidad de las comunidades nativas para transformar el lindano u otros compuestos aromáticos clorados. Los resultados obtenidos pretenden aportar información clave para el diseño de una futura prueba piloto *in situ* y contribuir al desarrollo de estrategias de biorremediación más eficaces para acuíferos contaminados con mezclas complejas de compuestos organoclorados y/o aromáticos.

Materiales y métodos:

Características de la zona de contaminación

El emplazamiento de estudio se sitúa en la llanura aluvial del río Gállego, limitada al oeste por el embalse de Sabiñánigo y al este por la carretera que lo separa del vaso de vertido del vertedero de Sardas (Figuras A1, A2). Geológicamente, la zona se asienta sobre el Anticlinal de Yebra de Basa, cuyo núcleo está constituido por las Margas de Larrés, una formación de varios centenares de metros de potencia que actúa como base impermeable del sistema (Figura A3). Sobre este sustrato se disponen discordantemente materiales cuaternarios que conforman el acuífero, integrados por niveles de limos arcillosos, gravas y arenas, con un espesor total aproximado de 15 metros, coronados por una capa de rellenos antrópicos de unos 4 metros (Figura 2 y Figura A4). Esta formación se apoya sobre un sustrato de margas de Larrés de baja permeabilidad (10^{-6} m/d), aunque su zona superior está intensamente fracturada y alterada, lo que eleva su permeabilidad local hasta los 0.04 m/d y permite la infiltración de contaminantes en fase densa [32]. Hidrogeológicamente, el acuífero se comporta como un sistema semiconfinado debido a la presencia de niveles de limos arcillosos a techo, los cuales amortiguan el flujo de agua y el transporte de solutos hacia el receptor superficial (Figura A5). El nivel freático en los pozos situados en las parcelas al pie del vertedero se sitúa habitualmente a profundidades que oscilan entre los 2,0 y los 9,7 metros bajo la superficie del terreno. Específicamente, en el sector de estudio PS14, el nivel freático se localiza a una profundidad media de aproximadamente 9,7 metros, coincidiendo con el tramo de gravas del acuífero. La dinámica del agua subterránea está definida por un esquema de flujo donde el río Gállego y el embalse de

Sabiñánigo actúan como la principal zona de descarga de los sedimentos que conforman el acuífero [33].



Figura 2. Materiales cortados en las excavaciones realizadas para las pilas del viaducto de la autovía A-23. (Fotografía cedida por la Demarcación de Carreteras del Estado en Aragón) [33].

La zona con mayor presencia de contaminación parece hallarse en los sondeos de los grupos PS-14 y PS-29 (Figura 3). En ellos apareció lindano (HCH) en polvo, fase densa libre (DNAPL) y lixiviados en el contacto con el nivel infrayacente de limos arcillosos. Esta zona se encuentra en la vaguada a pie del vertedero descrito (Figura 4). El sector específico del pozo PS-14 representa la zona de mayor complejidad técnica del emplazamiento, al situarse sobre una antigua vaguada natural donde los rellenos industriales se vertieron directamente sobre el terreno sin medidas de impermeabilización. Los reconocimientos mediante sondeos confirman la presencia masiva de fase libre densa (DNAPL) en forma de gotas abundantes a lo largo de todo el tramo de gravas y una penetración profunda en las discontinuidades de las margas, habiéndose detectado indicios de contaminantes hasta los 37,5 metros de profundidad [34].

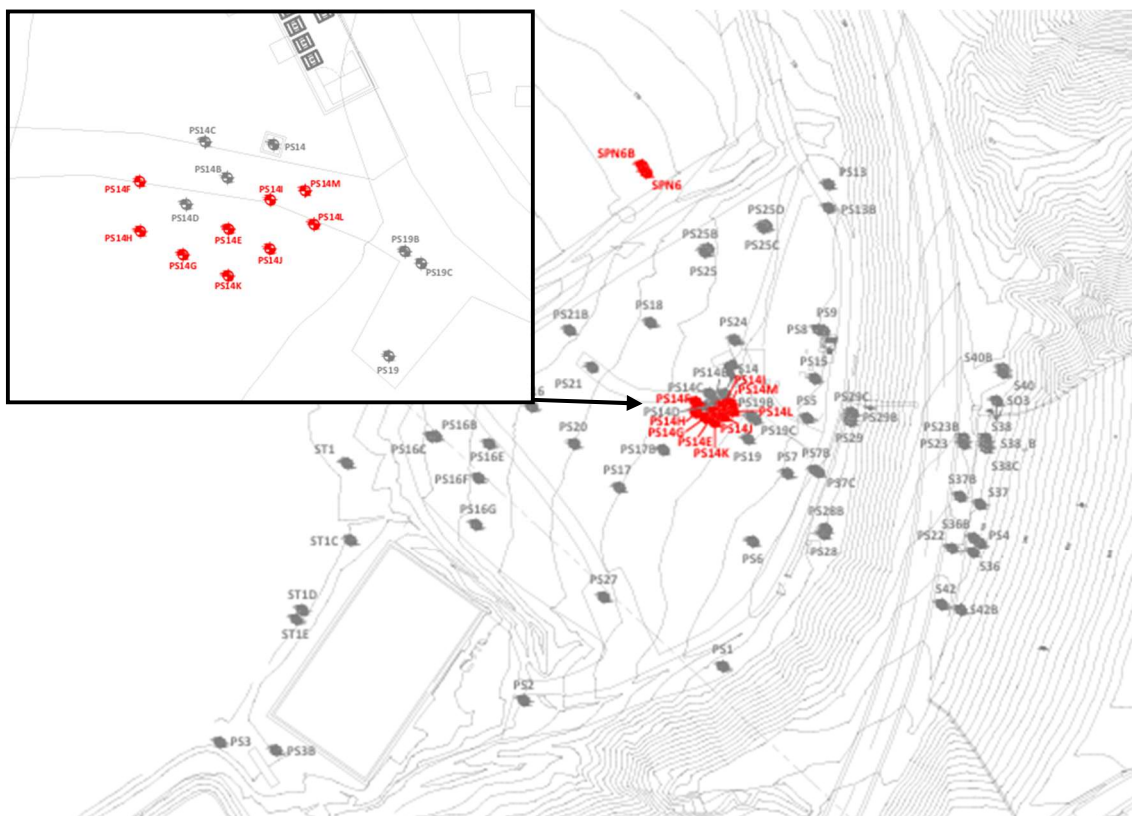


Figura 3. Puntos de la red piezométrica del embalse de Sardas. Imagen ampliada en los puntos de PS14's [34].

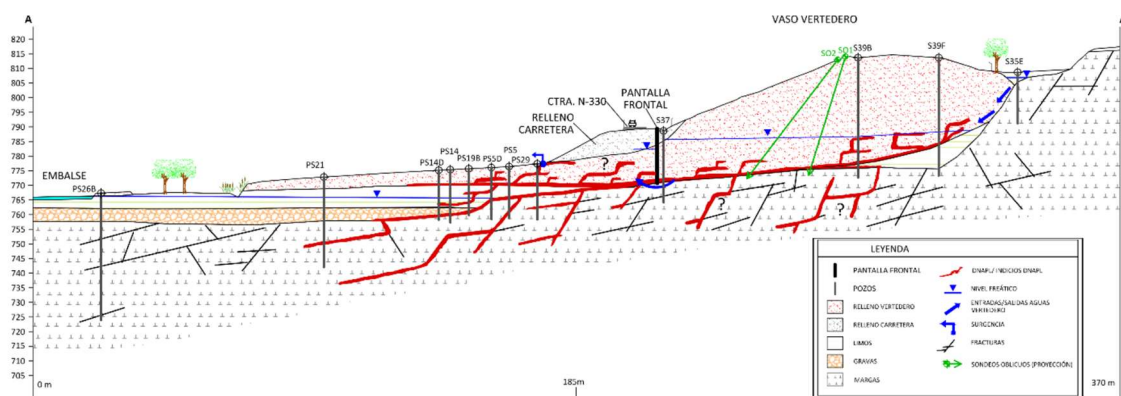


Figura 4. Modelo conceptual hidrogeológico del emplazamiento de vertedero de Sardas (Modificado de EMGRISA 2021) [33].

Las propiedades del agua en los pozos de la pluma de contaminación presentan una estabilidad notable que condiciona la actividad microbiológica. El pH promedio se sitúa en $6,8 \pm 0,1$, aunque en sectores específicos del vertedero donde se depositaron residuos de sosa y potasa, los valores pueden ser superiores a 9, favoreciendo procesos de hidrólisis alcalina del lindano. La temperatura media anual es de $12,7 \pm 0,6$ °C, un parámetro crítico ya que la solubilidad de los isómeros de HCH es altamente termosensible; un incremento térmico estacional puede

duplicar la movilidad de los contaminantes en el acuífero. En cuanto al estado de oxidación-reducción, el sistema es predominantemente anóxico y reductor, operando bajo un régimen de reducción de manganeso e hierro. Los potenciales redox (EhSTD) medidos en campo ratifican estas condiciones, estableciendo las condiciones termodinámicas para las rutas de deshalogenación microbiana [34].

Otro parámetro relevante es la presencia de compuestos orgánicos volátiles (COV), como el benceno y el monoclorobenceno, que actúan como co-disolventes de los isómeros de HCH. Estos compuestos pueden incrementar la solubilidad del lindano hasta 30 veces en comparación con el agua pura, facilitando su transporte y biodisponibilidad para las bacterias descloradoras. La estrecha conexión del agua subterránea con el río Gállego plantea un riesgo de afección rápida a los usos del agua aguas abajo, como el abastecimiento y el regadío [34].

Montaje del reactor

Se empleó un reactor de vidrio, con tapa metálica hermética equipada con múltiples puertos funcionales (Figura 5). El sistema incluía un agitador vertical acoplado a un motor externo. El reactor disponía de tres líneas independientes de muestreo y operación, cada una de ellas equipada con una válvula manual para permitir su apertura y cierre de forma controlada.



Figura 5. Imagen del biorreactor de 7,5 L empleado para la bioestimulación secuencial anaerobia-aerobia del agua subterránea del pozo 14S.

La primera línea correspondía a un tubo corto, sin llegar a entrar en contacto con la fase líquida, utilizado para extraer muestras de gas. La segunda línea consistía en un tubo sumergido en la fase líquida, destinado a la extracción de muestras líquidas para el análisis de contaminantes, metabolitos y parámetros fisicoquímicos. La tercera línea estaba conectada directamente al sistema de aireación tipo *sprinkler*, empleado durante la fase aerobia para introducir oxígeno de forma uniforme en el reactor. Este diseño permitió operar el reactor en condiciones controladas, facilitando la transición entre las fases anaerobia y aerobia, así como la monitorización periódica de gases y líquidos manteniendo condiciones inertes en el sistema.

Antes de utilizar el agua del pozo, se realizó una puesta en marcha del reactor llenándolo con 7.5 L de agua con contaminantes dopados, 80 y 130 mM de benceno y MCB respectivamente, para medir la eliminación abiótica de ambos compuestos volátiles en el sistema.

El día 0 de operación, el reactor se cargó con 7.5 L de agua subterránea procedente del acuífero del vertedero de Sardas, concretamente del pozo 14 S. El agua fue transportada en una garrafa refrigerada desde el emplazamiento hasta el laboratorio y bombeada directamente al reactor. Este volumen se eligió para minimizar la fase gas inicial y así evitar la presencia de oxígeno y la volatilización de compuestos de la fase líquida del sistema. Con el objetivo de inducir condiciones reductoras y promover la fermentación, se añadió lactato de sodio a una concentración final de 80 mg/L, utilizada como fuente de carbono e hidrógeno en el sistema.

El reactor se mantuvo en condiciones anaerobias durante los primeros 29 días, permitiendo el establecimiento de rutas fermentativas y reductoras asociadas a la degradación de compuestos organoclorados. El día 14, con el fin de evaluar el posible efecto de la limitación por nutrientes inorgánicos, se añadió NaH_2PO_4 hasta alcanzar una concentración final de 20 mg P- PO_4^{3-} /L. Esta suplementación buscó asegurar que la cinética observada no estuviera condicionada por restricciones nutricionales.

El día 29 se inició la fase aerobia, introduciendo 200 mL de oxígeno a través del sistema de aireación tipo *sprinkler*. A partir de ese momento, se añadieron 200 mL adicionales cada 7 días con el objetivo de mantener el reactor en condiciones aerobias y favorecer la transición hacia rutas metabólicas aerobias responsables de la mineralización final de los compuestos parcialmente transformados durante la etapa anaerobia. Este enfoque secuencial anaerobio-aerobio es coherente con estrategias descritas en estudios previos, donde la combinación de ambas fases mejora la eliminación de mezclas complejas de clorobenzenos y HCH's en sistemas naturales y de laboratorio [15, 17].

Ensayos en microcosmos

De forma paralela al experimento en el reactor, se prepararon seis microcosmos de 100 mL, cada uno con 75 mL de agua del acuífero procedente del mismo pozo (14S), con el objetivo de evaluar la biodegradación en un sistema de menor escala y comparar la respuesta microbiana con la observada en el reactor. Tres de los microcosmos fueron suplementados con 0,7 mL de la misma solución de lactato 1 mM empleada en el reactor, alcanzando una concentración final de 230 mg/L y actuando como tratamiento de bioestimulación. Los otros tres se mantuvieron sin adición de lactato, representando condiciones de atenuación natural y funcionando como controles.

Los microcosmos se incubaron en condiciones estáticas y en ausencia de luz, para reproducir un entorno más cercano al comportamiento del acuífero y permitir la comparación con trabajos previos que emplearon configuraciones similares [15, 19, 27]. Se realizaron muestreos semanales, realizando los mismos análisis fisicoquímicos y de contaminantes que en el reactor, con el fin de evaluar la evolución paralela de los procesos en ambos sistemas.

Muestras y análisis químicos

Para el análisis de clorobencenos y benceno se tomaron muestras cada 4 días aproximadamente. Para el reactor se tomaron 15 mL de muestra líquida y se analizaron en triplicado mediante un autosampler CTC CombiPAL acoplado al cromatógrafo de gases Agilent 6890N. En el caso de los microcosmos se tomaron 0,5 mL de gas del headspace de cada botella utilizando una jeringa analítica hermética de 1,0 mL con sistema pressure-lock (Vici, EE. UU.). La identificación de los compuestos se realizó comparando los tiempos de retención con los de estándares químicos comerciales.

El análisis instrumental se llevó a cabo en un cromatógrafo de gases Agilent 6890N equipado con una columna DB-624 (30 m × 0,32 mm × 0,25 µm) y un detector de ionización de llama (FID). Se empleó helio como gas portador a un caudal de 0,9 mL/min. Las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 250 °C y 300 °C, respectivamente. Tras la inyección de la muestra (relación de split 1:2), el horno se mantuvo a 35 °C durante 3 min y posteriormente se programó un incremento de 10 °C/min hasta 240 °C, temperatura que se mantuvo durante 4 min. Las áreas de los picos cromatográficos se integraron mediante el software Millennium/Empower (Waters).

Se analizaron semanalmente H₂, O₂ y CO₂ tanto en el reactor como en los microcosmos. Para ello se inyectaron 100 µL de gas de fase gas en un cromatógrafo

de gases Agilent 7820A equipado con un detector de conductividad térmica (TCD). La separación de los gases se realizó empleando dos columnas en serie: una MolSieve 5A 60/80 SS (1,82 m × 2 mm) y una Porapak Q 60/80 UM (1,82 m × 2 mm), ambas de Agilent. Se utilizó nitrógeno como gas portador a una presión de 138 kPa. El horno se mantuvo isoterma a 40 °C, mientras que las temperaturas del inyector y del detector se fijaron en 200 °C y 250 °C, respectivamente. El tiempo total de análisis fue de 5 minutos. Las áreas de los picos se integraron mediante el software Chromeleon (Thermo Scientific), y la cuantificación se realizó a partir de patrones acuosos preparados bajo las mismas condiciones de volumen, temperatura y presión que los microcosmos.

El análisis de lindano requirió una extracción en fase orgánica. Para cada muestra, se agitaron 1,0 mL de fase acuosa con 2,0 mL de una mezcla hexano/acetona (1:1, v/v) durante 10 minutos a máxima agitación en el vortex. A continuación, las muestras se centrifugaron durante 10 minutos a 2500 rpm. La fase orgánica sobrenadante se filtró y se transfirió a viales de vidrio para su análisis instrumental. La fase orgánica resultante se analizó mediante cromatografía de gases (GC) utilizando un equipo Agilent 6890N acoplado a un detector de captura de electrones (ECD). La separación cromatográfica se llevó a cabo en una columna HP-5MS (30 m × 0,25 mm × 0,25 µm). Las inyecciones se realizaron en modo *splitless* a 280 °C. El programa de temperatura del horno inició a 90 °C, con un incremento de 18 °C·min⁻¹ hasta 250 °C, temperatura que se mantuvo durante 15 minutos. El gas portador empleado fue helio, con un caudal constante de 0,5 mL·min⁻¹.

Para el análisis de ácidos orgánicos y aniones, se filtró aproximadamente 1 mL de muestra líquida del reactor a través de un filtro de 0,22 µm. Los ácidos orgánicos (lactato o acetato) se cuantificaron mediante cromatografía líquida de alta presión (HPLC) utilizando un sistema Dionex Ultimate 3000 equipado con un detector UV-Vis UVD 170S ajustado a 210 nm y un autosampler con un volumen de inyección de 20 µL. El eluyente empleado fue una disolución acuosa de H₂SO₄ 6 mM, bombeada a un caudal de 0,5 mL/min a través de una columna Transgenomic ICSep ICE-COREGEL 87H3 (300 × 4,6 mm).

Adicionalmente cada semana se extrajeron aproximadamente 45 mL del reactor, se transfirieron a microcosmos correctamente sellados y se enviaron al laboratorio del emplazamiento de Sabiñanigo, que dispone de métodos analíticos más sensibles para validar los resultados obtenidos en el laboratorio.

Análisis microbiológicos

Semanalmente se filtraron 5 mL de muestra del reactor a través de filtros adecuados para retener biomasa microbiana. Los filtros se almacenaron y enviaron para análisis de qPCR en los laboratorios del Departamento de Genética, Microbiología y Estadística de la Universidad de Barcelona siguiendo un protocolo interno ya preestablecido con el fin de cuantificar los géneros bacterianos vinculados a la degradación de los contaminantes (*Shewanella* y *Pseudomonas*).

La microbiota presente se separó mediante filtración por filtros Sterivex™ (0,22 µm) y, a continuación, se obtuvo el DNA total mediante el kit comercial DNAeasy PowerSoil Pro-Kit (Qiagen). La cuantificación de los biomarcadores analizados se llevó a cabo mediante qPCR en un equipo QuantStudio 1 (Applied Biosystems), utilizando como estándares de referencia diluciones decimales de plásmidos recombinantes conteniendo el inserto con el marcador correspondiente.

Resultados y discusión

Puesta en marcha del reactor

Antes de iniciar el experimento biológico, se llevó a cabo una fase de control abiótico cargando el reactor de 7,5 L únicamente con agua destilada y los compuestos volátiles modelo: benceno y MCB. Durante este periodo de 2 semanas se registró una disminución del 37,15 % en la concentración de benceno y del 22,81 % en la de MCB en la fase líquida (Figura 6). Dado que el sistema carecía de biomasa activa, estas pérdidas se atribuyen exclusivamente a procesos físicos y químicos de naturaleza abiótica, los cuales son críticos para establecer una línea base que permita diferenciar la eliminación física de la degradación biológica real en las etapas posteriores del estudio.

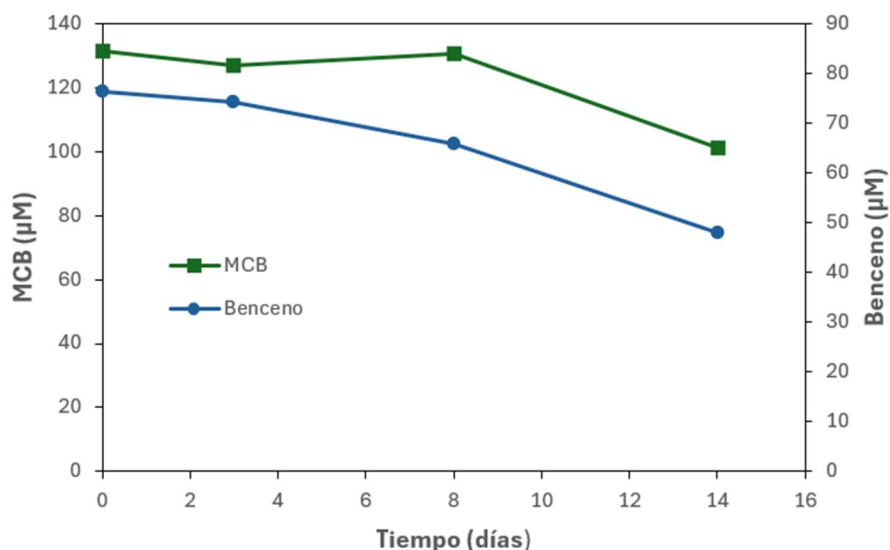


Figura 6. Perfil de evolución de las concentraciones (μM) de Benceno y MCB a lo largo del tiempo en la 'puesta en marcha del reactor'.

La disminución observada responde, en primer lugar, a que las propiedades fisicoquímicas del benceno y MCB caracterizadas por una marcada hidrofobicidad, pueden promover su adsorción sobre las superficies internas del sistema, incluyendo el vidrio y los componentes poliméricos como juntas o tuberías de PTFE y silicona [19]. En segundo lugar, a la elevada volatilidad intrínseca de estos compuestos. Tanto el benceno como el MCB poseen constantes de Henry significativamente altas, lo que favorece su partición y transferencia de masa desde la fase acuosa hacia el *headspace* del reactor [17]. Este fenómeno de transferencia de fase es común en sistemas de laboratorio, incluso en ausencia de aireación forzada, y puede verse potenciado por la agitación intermitente del reactor [35]

Pequeñas pérdidas durante el muestreo especialmente en sistemas sin control de estanqueidad pueden contribuir a la disminución aparente de concentración [36]. Adicionalmente, pequeñas pérdidas asociadas a la falta de estanqueidad del sistema incluyendo microfugas en conexiones, juntas o válvulas, pueden contribuir a la disminución aparente de concentración [36]. Por tanto, la disminución de contaminantes en el reactor durante la fase experimental debe interpretarse considerando los procesos abióticos de eliminación.

Estudios de bioremediación de agua subterránea en microcosmos

En los microcosmos, la degradación de benceno y MCB durante la fase anaerobia fue similar entre los sistemas bioestimulados con lactato y los de atenuación natural, se observó disminución en la concentración de ambos compuestos aromáticos (50% aproximadamente para ambos) (Figuras 7 y 8). Este comportamiento puede ser coherente con literatura que ha demostrado la degradación anaerobia de benceno y MCB en sedimentos contaminados sin necesidad de una bioestimulación intensa [37]. Estos estudios demostraron que en determinadas circunstancias pueden biodegradarse estos compuestos mediante deshalogenación reductiva y mineralizarse completamente hasta CO_2 [27, 37].

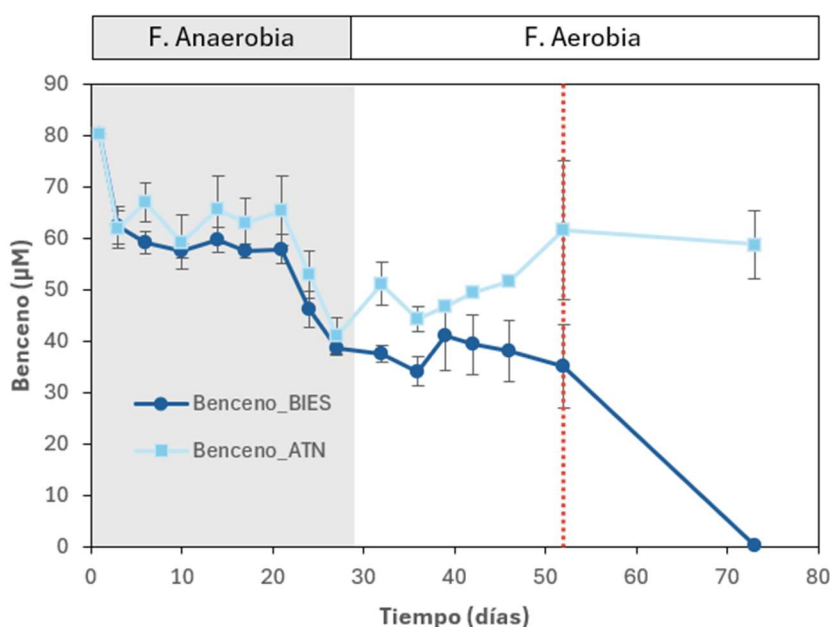


Figura 7. Evolución de la concentración de benceno en microcosmos bioestimulados (BIES) y de atenuación natural (ATN) durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P) en el día 52.

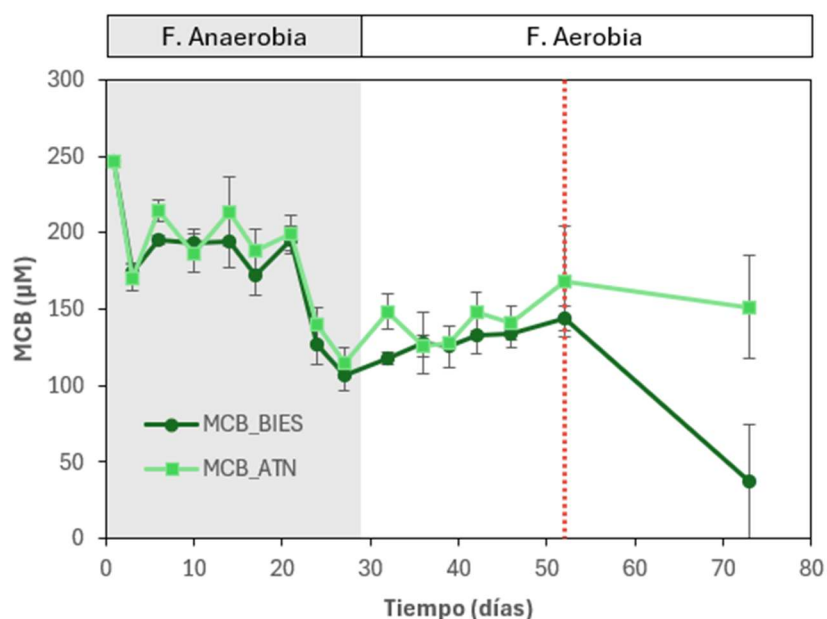


Figura 8. Evolución de la concentración de MCB en microcosmos bioestimulados (BIES) y de atenuación natural (ATN) durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P).

Sin embargo, la respuesta del lindano fue marcadamente distinta: en los microcosmos con lactato se observó una desaparición casi completa en aproximadamente tres semanas, mientras que en los de atenuación natural la degradación fue muy limitada (Figura 9), lo que indica que la deshalogenación de HCH es mucho más dependiente de la disponibilidad de donadores de electrones y de consorcios especializados, en línea con lo descrito en literatura para otros sistemas contaminados con lindano [15, 28, 38]. Aunque se observó degradación del lindano, no se detectó una formación clara de clorobenzenos u otros intermediarios específicos, por lo que no es posible determinar con certeza las rutas metabólicas implicadas. Es probable que existan metabolitos no detectados que contribuyan a la dinámica observada, pero los datos disponibles no permiten confirmarlo.

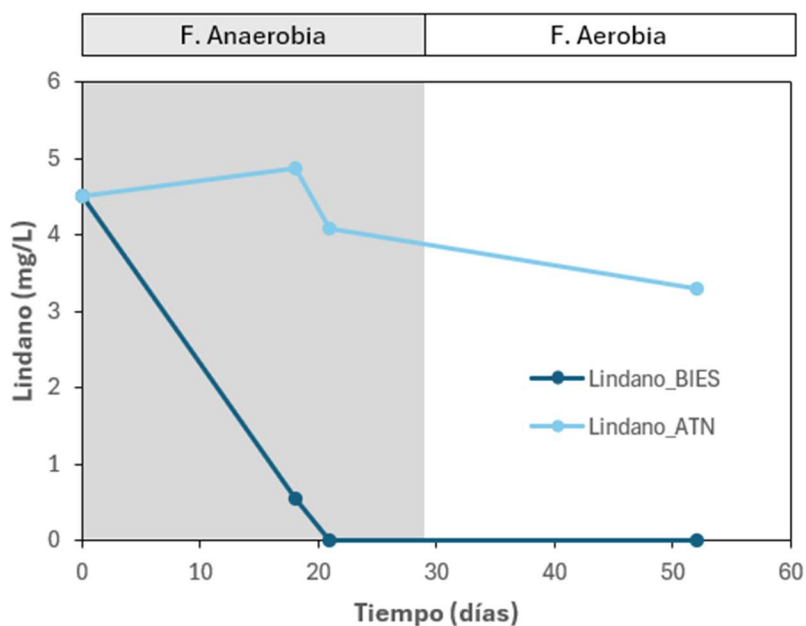


Figura 9. Evolución de la concentración de Lindano (γ -HCH) en microcosmos bioestimulados (BIES) y de atenuación natural (ATN) durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia.

Durante la fase aerobia, el comportamiento del benceno y el MCB mostró una desviación respecto a la cinética de degradación convencional, ya que sus concentraciones no disminuyeron inmediatamente e incluso presentaron ligeros repuntes antes de la adición de nutrientes (Figuras 7 y 8). Este fenómeno sugiere que la comunidad microbiana aerobia, a pesar de la presencia de oxígeno, se encontraba en un estado de limitación nutricional severa. Solo tras la adición de fosfato de sodio en el día 52, se observó una disminución de estos contaminantes en un intervalo de apenas dos semanas [15].

La influencia de la adición de fósforo es muy evidente en la dinámica de los microcosmos bioestimulados, ya que a partir de ese momento se observa una reactivación metabólica clara.

Al igual que para benceno y MCB, la evolución de los diclorobencenos (DCBs) resultó muy similar entre los tratamientos de atenuación natural (ATN) y los bioestimulados con lactato (Figura 10). Esta convergencia puede venir explicada por una restricción nutricional. Por otro lado, no se han detectado evidencias de que la degradación del lindano genere triclorobencenos o diclorobencenos como productos intermedios [15, 19].

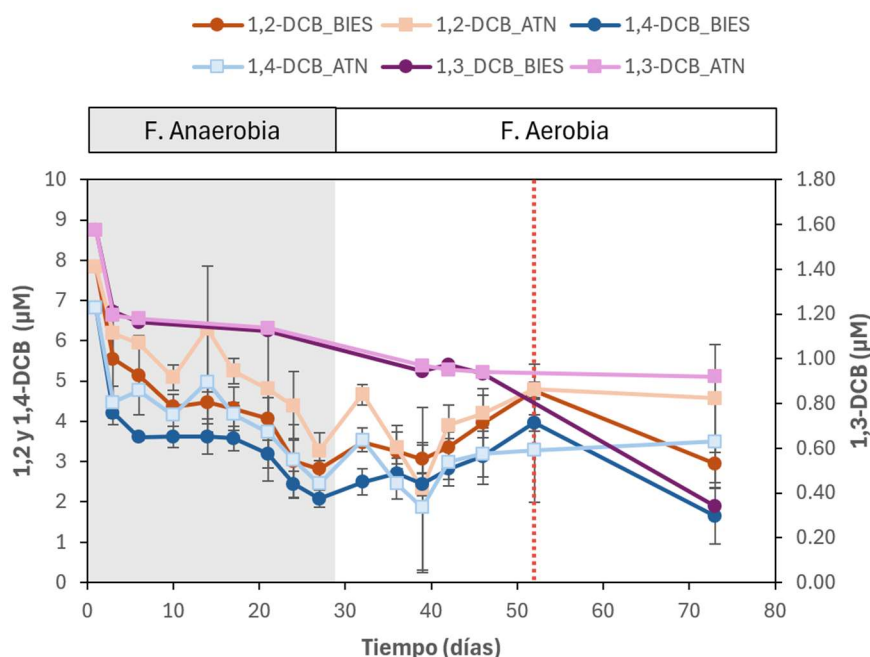


Figura 10. Evolución de la concentración de DCB's en microcosmos bioestimulados (BIES) y de atenuación natural (ATN) durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P).

Es fundamental matizar estos resultados debido a las limitaciones analíticas existentes. La ausencia de datos detallados sobre triclorobencenos (TCBs) y otros intermedios más clorados dificulta la definición de rutas metabólicas de degradación y cuadrar los balances de masa. Herramientas como el análisis isotópico específico de compuestos (CSIA) son esenciales en este contexto [37, 39], ya que permiten distinguir si los DCBs detectados proceden del acuífero original o de la degradación reciente del lindano. Además, el CSIA ayuda a cuantificar tasas de degradación *in situ* y a diferenciar los mecanismos de transformación, discriminando entre procesos de deshalogenación reductiva y mineralización oxidativa [19, 37]. Su incorporación en investigaciones futuras proporcionaría evidencias para atribuir con certeza el origen y las rutas de eliminación de los contaminantes en el acuífero.

Durante la fase anaerobia, se produjo una disminución rápida del lactato, pasando de concentraciones iniciales cercanas a 240 mg/L a valores en torno a 80 mg/L en menos de cuatro semanas (Figura 11). Esta caída refleja una fermentación activa, en la que el lactato se utilizó como fuente de carbono y donador de electrones para impulsar rutas reductoras, incluyendo la deshalogenación de compuestos clorados como el lindano [19, 28, 39]. La desaparición rápida del lindano en los microcosmos bioestimulados respalda esta interpretación, ya que su transformación requiere condiciones reductoras sostenidas y disponibilidad de electrones [29]. Cabe destacar que, al finalizar la fase anaerobia, aún quedaba una cantidad significativa

de lactato disponible, lo que sugiere que una prolongación de esta fase o el aporte de fósforo, podría haber favorecido una mayor degradación de los contaminantes clorados, especialmente en los sistemas bioestimulados. Esta hipótesis es coherente con estudios que muestran que la eficiencia de la deshalogenación reductiva depende tanto de la disponibilidad de donadores de electrones, como de la disponibilidad de nutrientes o como del tiempo de residencia bajo condiciones estrictamente anaerobias [15, 29].

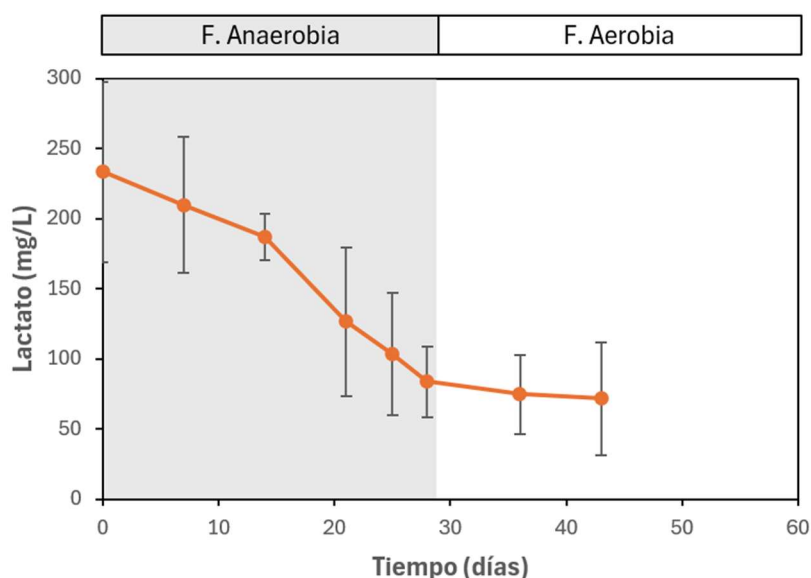


Figura 11. Evolución de la concentración de Lactato en los microcosmos bioestimulados durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia.

En la fase aerobia, el lactato mostró muy pocos cambios, manteniéndose relativamente estable a lo largo del periodo monitorizado. Este comportamiento es coherente con la transición metabólica del sistema. Una vez introducido el oxígeno, la comunidad microbiana tiende a utilizar preferentemente otros compuestos más fácilmente oxidables presentes en la mezcla, mientras que el lactato residual puede permanecer sin ser consumido de forma significativa [18].

La evolución de los gases en los microcosmos refleja con claridad la transición entre fases anaerobia y aerobia (Figura 12), así como las limitaciones metabólicas asociadas a la disponibilidad de nutrientes. Durante la fase anaerobia, los niveles de CO_2 se mantuvieron estables en torno al 4–5 %, mientras que la presencia de O_2 fue prácticamente nula, lo que indica una actividad fermentativa activa y condiciones reductoras sostenidas.

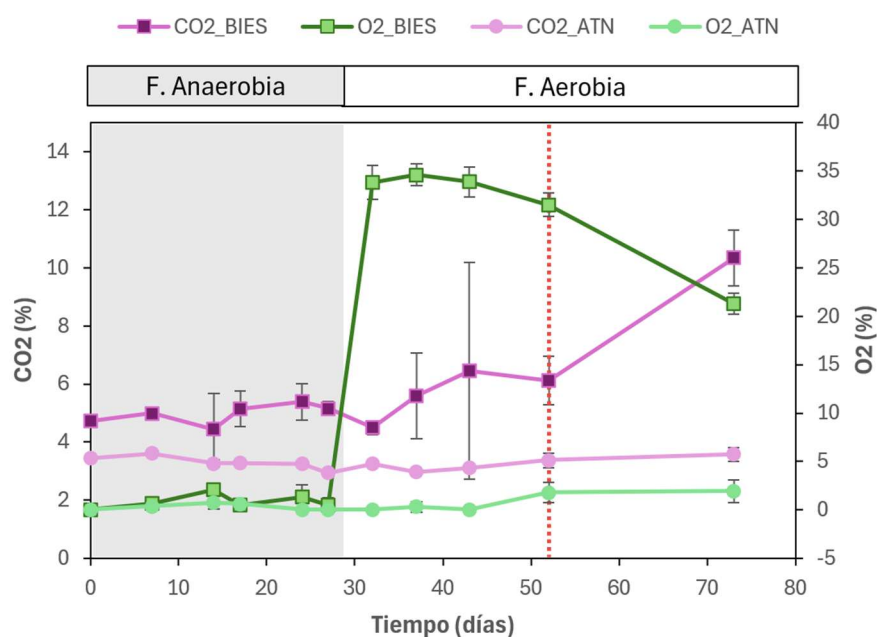


Figura 12. Evolución de la concentración de O_2 (%) y CO_2 (%) en microcosmos bioestimulados (BIES) y de atenuación natural (ATN) durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P).

Tras el inicio de la fase aerobia en los microcosmos bioestimulados, se observó un incremento de O_2 , alcanzando valores cercanos al 35 %, mientras que el CO_2 mostró una ligera subida. Sin embargo, esta acumulación de oxígeno no se tradujo en una degradación inmediata de los contaminantes durante los 20 primeros días de etapa aerobia, lo que sugiere una limitación funcional de la comunidad aerobia [15].

Tras la adición de fósforo los microcosmos bioestimulados experimentaron una disminución progresiva del O_2 acompañada de un aumento del CO_2 , lo que indica la activación de la respiración aerobia y la mineralización de los compuestos orgánicos presentes [15, 22]. Esta limitación ha podido inhibir la actividad de las bacterias oxidativas incluso en presencia de oxígeno. En conjunto, la dinámica observada confirma que la fase aerobia estaba inicialmente limitada por nutrientes y que la suplementación con fósforo permitió la transición hacia un metabolismo respiratorio activo, degradando rápidamente los contaminantes clorados.

En los microcosmos de atenuación natural, tanto el CO_2 como el O_2 se mantuvieron bajos y estables durante todo el experimento, lo que refleja una baja actividad microbiana y una capacidad reducida para transformar los contaminantes en ausencia de bioestimulación ni aporte de nutrientes. Este contraste refuerza la idea de que la combinación de bioestimulación anaerobia, aeración controlada y suplementación con fósforo constituye una estrategia eficaz para activar rutas

metabólicas complementarias y mejorar la eliminación de contaminantes en el emplazamiento de Sardas.

Estudios de bioremediación de agua subterránea en reactor

La evolución de los contaminantes en el reactor secuencial anaerobio-aerobio mostró un comportamiento coherente con las rutas metabólicas descritas en la literatura y con el funcionamiento esperado de un sistema bioestimulado. Antes de analizar la dinámica de cada compuesto, es importante considerar que la puesta en marcha del reactor evidenció pérdidas abióticas de benceno y monoclorobenceno (MCB). Este comportamiento inicial obliga a interpretar con cautela los descensos observados durante los primeros días, distinguiendo entre pérdidas físicas y transformaciones biológicas.

Durante la fase anaerobia (0–29 días), benceno, MCB y los tres isómeros de diclorobenceno (1,2-DCB, 1,3-DCB y 1,4-DCB) mostraron una disminución marcada en su concentración (Figuras 13 y 14). En el caso de los compuestos más volátiles, como benceno y MCB, una fracción de esta reducción puede atribuirse a volatilización u otras pérdidas abióticas. Sin embargo, la magnitud, consistencia y continuidad del descenso observado en todos los compuestos, incluidos los DCBs, cuya volatilidad es mucho menor a la de los aromáticos menos clorados, indican que la biodegradación desempeñó un papel predominante en esta etapa. La bioestimulación con lactato favoreció rutas de deshalogenación reductiva, responsables de la transformación de los compuestos clorados hacia derivados menos clorados, [17, 29, 30]. La adición de fósforo el día 14 parece haber reforzado esta tendencia de degradación, probablemente al desbloquear rutas metabólicas dependientes de nutrientes, como se ha visto en el caso de los microcosmos [15].

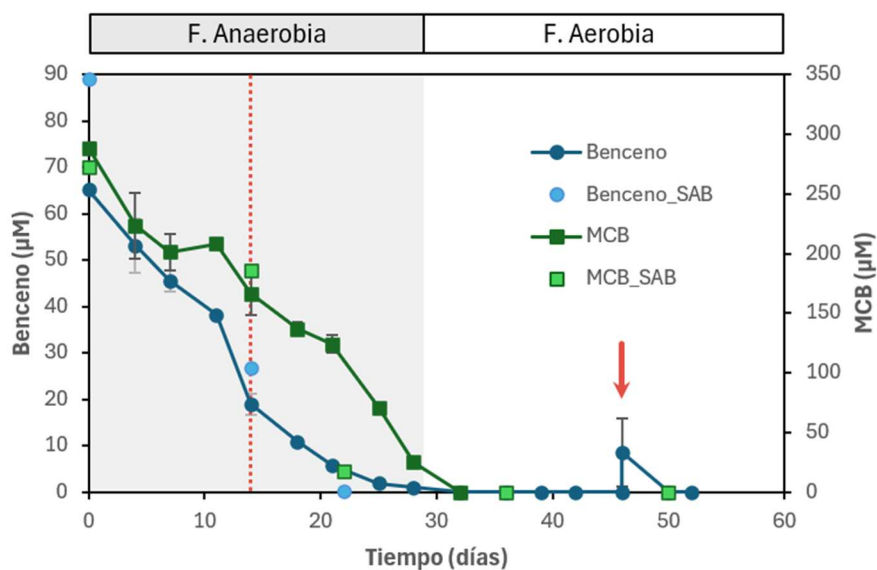


Figura 13. Evolución de la concentración de benceno y MCB en el reactor y en los resultados obtenidos en el laboratorio de Pirenarium, en Sabiñanigo (SAB), durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P) y la flecha roja señala la adición de benceno.

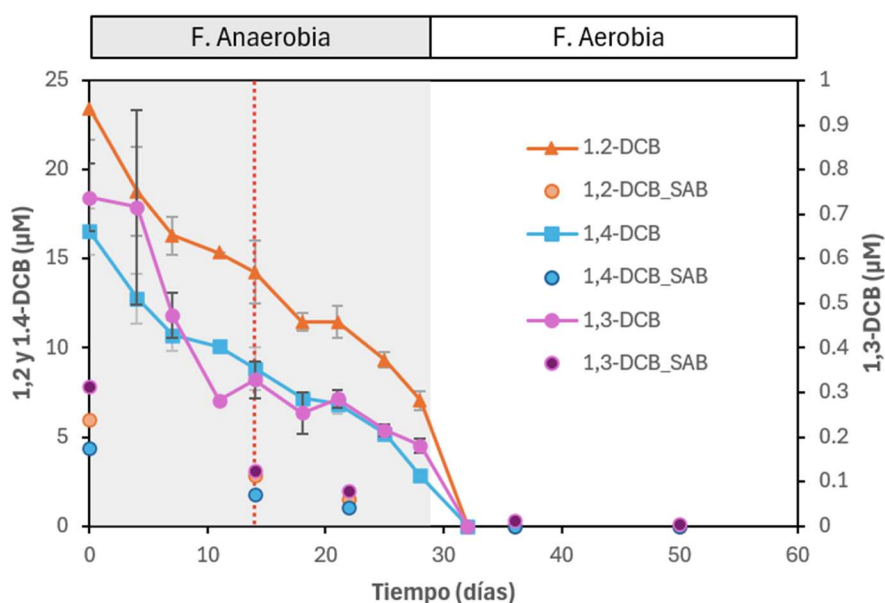


Figura 14. Evolución de la concentración de 1,2-DCB, 1,4-DCB y 1,3-DCB en el reactor y en los resultados obtenidos en el laboratorio de Pirenarium, en Sabiñanigo (SAB), durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P).

Al finalizar la fase anaerobia, las concentraciones de benceno y MCB eran prácticamente no detectables y los DCBs se encontraban en niveles muy bajos. La transición a condiciones aerobias (día 30) permitió completar la eliminación de los compuestos residuales en pocos días. La rápida desaparición de benceno y MCB bajo aireación es coherente con rutas oxidativas aerobias ampliamente descritas

para estos compuestos, mediadas por monooxigenasas presentes en géneros como *Pseudomonas*, *Rhodococcus* o *Burkholderia* [18, 20, 22]. Para confirmar que esta eliminación no se debía únicamente a volatilización durante la aireación, se añadió una cantidad conocida de benceno el día 46. Su desaparición en menos de una semana confirmó que el reactor mantenía una actividad degradativa aerobia efectiva. Los DCBs también se mineralizaron completamente durante esta etapa, en coherencia con la activación de rutas oxidativas aerobias que hidroxilan y abren el anillo aromático [17, 19, 22]. La coherencia entre compuestos con volatilidades muy distintas, la desaparición sostenida y la respuesta a la adición de nutrientes refuerzan que la biodegradación fue el mecanismo dominante en el reactor.

Al observar detalladamente el gráfico de degradación de benceno y MCB, se aprecia que los resultados del laboratorio de Pirenarium (SAB) muestran una cinética de desaparición más acelerada que los registrados en el del grupo BioRemUAB en ciertos intervalos críticos. En el caso del MCB, el contraste es muy marcado hacia el final de la fase anaerobia. Mientras que los análisis internos muestran que en el día 22 todavía resta una concentración significativa de aproximadamente 125 μM , los resultados de Sabiñánigo para ese mismo día sitúan al contaminante en niveles prácticamente residuales, cercanos a 20 μM . Esto indica que, según las mediciones de Pirenarium, el porcentaje de degradación o eliminación del MCB fue considerablemente superior y más rápido en ese periodo.

Para el benceno se observa una tendencia similar en cuanto a la velocidad de degradación completa. Hay discrepancias notables entre los resultados del primer día, 65 μM frente a 90 μM en Sabiñánigo, aunque en el día 14 los resultados se igualan, siendo el de Sabiñánigo ligeramente superior (~27 μM frente a ~19 μM). Para el día 22 los puntos de Sabiñánigo ya marcan una concentración de cero, mientras que los análisis internos todavía registran una presencia de aproximadamente 6 μM . Por tanto, los resultados de Sabiñánigo validan una mayor eficiencia en la eliminación del benceno, al alcanzar el valor nulo antes que el analizado en la UAB.

Para el caso de los DCB's, a pesar de la diferencia inicial, la pendiente de degradación entre los días 14 y 22 es coherente en ambos conjuntos de datos. Para el 1,4-DCB, los puntos de Pirenarium siguen de forma paralela la curva descendente de los resultados internos, situándose en valores ligeramente inferiores (~1,8 μM vs ~9 μM en el día 14). En el caso del 1,3-DCB, los resultados de Pirenarium son casi residuales desde el día 14 (~0,12 μM).

Es importante señalar que las discrepancias en la velocidad y los porcentajes de degradación entre laboratorios son habituales en estudios de este tipo. Fuentes bibliográficas mencionan que las variaciones interlaboratorio para los parámetros principales (benceno, MCB y HCH) oscilaban entre un 20 % y un 30 % [7]. Estas

diferencias pueden deberse a la heterogeneidad de las matrices de muestreo o a ligeras variaciones en los protocolos analíticos aplicados por cada centro, aunque ambos confirman la tendencia general de que el sistema secuencial es efectivo para la eliminación de estos compuestos aromáticos.

La concentración de lindano mostró una disminución sostenida durante la fase anaerobia, alcanzando aproximadamente un 50 % de reducción en las tres primeras semanas (Figura 15). Este comportamiento indica que la bioestimulación anaerobia fue suficiente para activar la degradación del lindano, lo que confirma la presencia de actividad biológica bajo condiciones reductoras [15, 40].

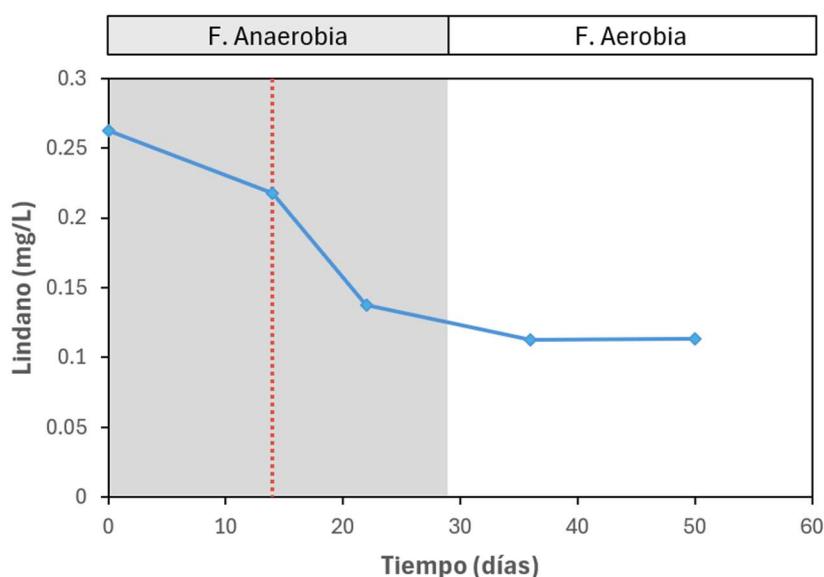


Figura 15. Evolución de la concentración de Lindano (γ -HCH) en el reactor (resultados Pirenarium) durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P).

No obstante, los 29 días de operación anaerobia no permitieron su eliminación completa, lo que sugiere que esta fase podría haberse prolongado para favorecer una mayor degradación. Tras el paso a condiciones aerobias, la concentración de lindano permaneció estable, coherente con la literatura, que describe una degradación aerobia limitada y dependiente de consorcios microbianos altamente especializados, capaces de expresar las enzimas LinA y LinB que inician la ruta catabólica del lindano [40, 41]. Este patrón refleja la naturaleza recalcitrante del γ -HCH y los otros isómeros (Figura A6) en presencia de oxígeno y la importancia de las condiciones reductoras y del aporte de donadores de electrones para promover su degradación.

La solidez de esta interpretación se ve reforzada por la elevada fiabilidad del sistema analítico empleado en Pirenarium (laboratorio del emplazamiento de

Sabiñánigo), que dispone de un equipamiento de medida altamente preciso y protocolos de control de calidad estrictos.

La concentración inicial de lactato en el reactor de aproximadamente 80 mg/L (Figura 16) es coherente con los protocolos de bioestimulación aplicados en estudios previos de microcosmos realizados con aguas del acuífero de Sabiñánigo, donde adiciones de magnitud equivalente resultaron efectivas para desencadenar procesos de transformación reductiva [15].

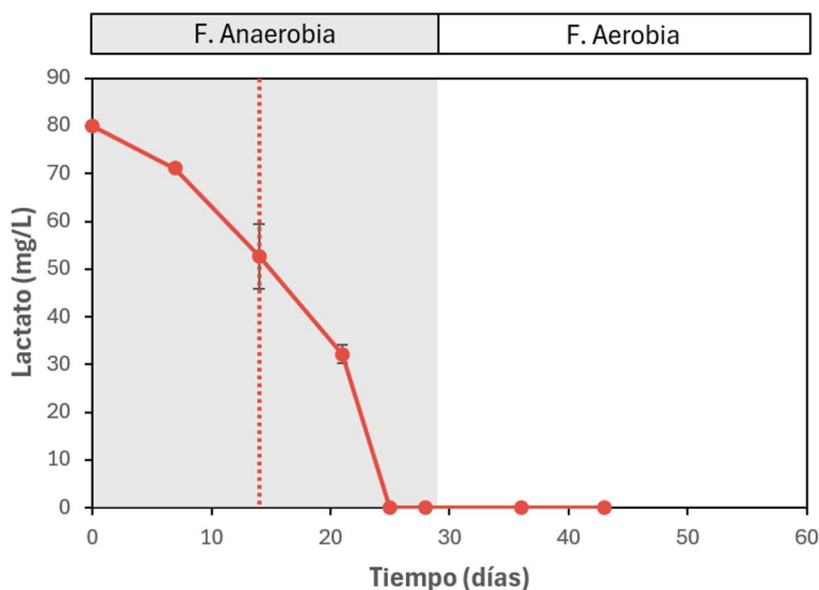


Figura 16. Evolución de la concentración de Lactato en el reactor durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P).

Durante la fase anaerobia (0–25 días), la concentración de lactato disminuyó de forma rápida, continua y completa, alcanzando valores no detectables al final de este periodo. Esta cinética indica que el lactato fue consumido de manera eficiente, actuando como sustrato fermentable y confirma la activación de las rutas de deshalogenación reductiva, como se ha comentado previamente [17, 19, 29].

La desaparición completa del lactato antes del inicio de la fase aerobia confirma que el reactor funcionó como un sistema bioestimulado durante la etapa anaerobia. Sin embargo, la mayor velocidad de consumo de lactato registrada en el biorreactor respecto a los microcosmos puede atribuirse a factores propios del escalado que favorecen la actividad microbiana. Entre ellos destacan la mayor disponibilidad de superficies internas para la colonización bacteriana, la presencia de una biomasa más densa y diversa, y una mayor estabilidad físico-química del sistema, que reduce las fluctuaciones de pH, potencial redox y concentración de nutrientes, que sí afectan a los microcosmos de pequeño volumen [42, 43]. A ello se suma que, a diferencia de los microcosmos en la fase anaerobia, el reactor

recibió una aportación explícita de fósforo, cuya disponibilidad ya ha demostrado ser esencial para sostener la actividad metabólica y el crecimiento microbiano[31].

En el reactor no se detectaron acumulaciones apreciables de acetato ni de hidrógeno durante la fase anaerobia, a diferencia de lo descrito en estudios previos del emplazamiento, donde ambos metabolitos aparecían de forma transitoria entre los días 15 y 30 [15]. La ausencia de estos productos intermedios puede explicarse por el escalado del sistema, ya que un mayor volumen permite mantener una biomasa más densa y diversa capaz de formar y consumir rápidamente los productos de la fermentación del lactato, evitando que alcancen niveles detectables [31]. El hidrógeno, en particular, suele mantenerse a concentraciones muy bajas debido a su utilización inmediata por microorganismos reductores o dehalorespiradores [29]. En este contexto, la desaparición completa del lactato junto con la degradación de los compuestos clorados constituye una evidencia indirecta de que las rutas de acidogénesis y transferencia de electrones estuvieron activas, y que la microbiota autóctona reutilizó eficientemente los metabolitos generados, optimizando el proceso en comparación con los microcosmos de menor escala.

Con relación a los resultados de las mediciones de O_2 y CO_2 (Figura 17), la presencia de O_2 durante la fase anaerobia sugiere la existencia de oxígeno residual en el agua subterránea con la que se llenó el reactor, y posibles entradas difusivas a través de las conexiones. Por lo que la degradación de benceno y MCB observada durante la fase anaerobia podría atribuirse a la presencia de oxígeno detectada en el reactor, suficiente para activar rutas oxidativas en microorganismos aerobios o del agua del acuífero [44]. Estas condiciones aerobias permiten la actividad de enzimas oxidativas capaces de transformar compuestos aromáticos incluso cuando el sistema se considera globalmente reductor.

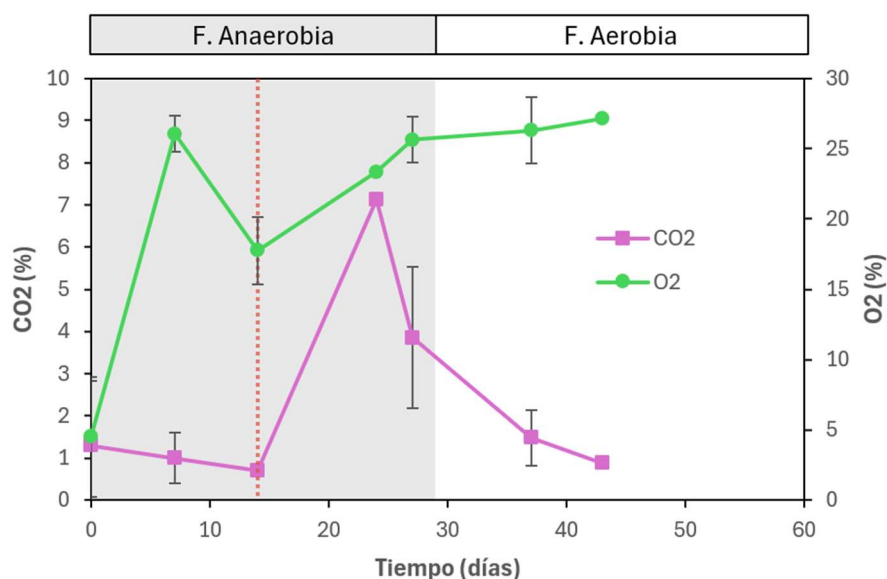


Figura 17. Evolución de la concentración de O_2 (%) y CO_2 (%) en el reactor durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P).

Tras la adición de fosfato, el aumento simultáneo de O_2 y CO_2 refleja una combinación de mayor actividad microbiana y cambios en el equilibrio gaseoso del sistema. Mientras que los picos de CO_2 observados en los primeros días, pueden reflejar una combinación de fermentación del lactato, respiración aerobia parcial y posible mineralización de compuestos fácilmente degradables como benceno y MCB. En la fase aerobia, la relativa estabilidad del O_2 y la ausencia de un incremento marcado de CO_2 se explican por la baja concentración de contaminantes.

Los resultados de las qPCR respaldan las interpretaciones previamente discutidas (Figura 18). En el día 0, *Pseudomonas* y *Shewanella* presentan abundancias del mismo orden de magnitud. Durante la fase previa a la adición de fósforo, *Pseudomonas* se mantiene relativamente estable, mientras que *Shewanella* experimenta un descenso. Tras la incorporación de nutrientes, ambas poblaciones aumentan 3 órdenes de magnitud, reflejando una clara respuesta a la disponibilidad de nutrientes. La predominancia del género *Pseudomona* durante la supuesta fase anaerobia y su impulso tras la adición de fósforo, confirma condiciones parcialmente aerobias y fundamenta, juntamente con los análisis de gas, la degradación de benceno y MCB observada durante esta etapa [17, 19]. Por otro lado, el incremento de *Shewanella* después del día 14 indica que sí se generaron condiciones parcialmente reductoras, compatibles con la actividad de microorganismos capaces de transformar compuestos más clorados, explicando la rápida desaparición del lactato [30], [29]. No obstante, la coexistencia y posible competencia entre ambos géneros, junto con la falta de condiciones fuertemente

reductoras, podría explicar la degradación más lenta respecto a los microcosmos de los compuestos altamente clorados, como el lindano y los isómeros HCH, cuyas concentraciones únicamente se redujeron parcialmente y no llegaron a eliminarse durante la anaerobiosis.

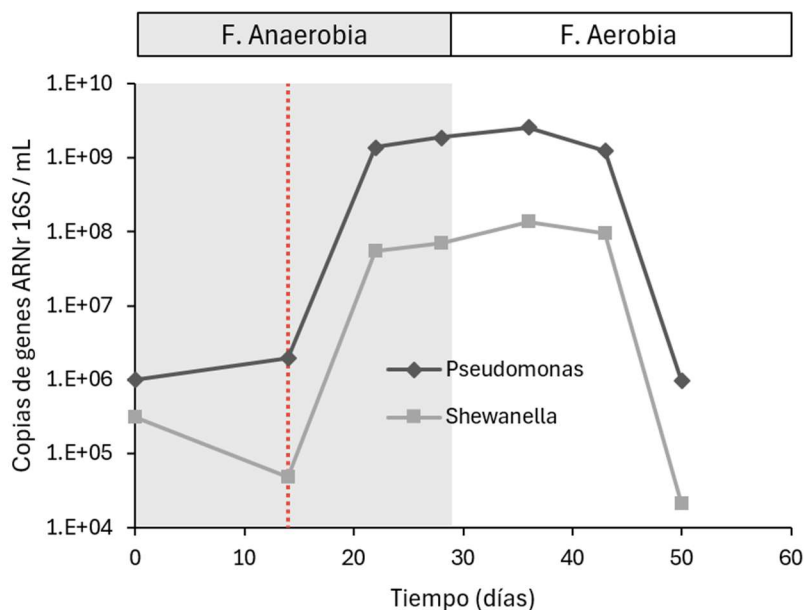


Figura 18. Evolución temporal de la abundancia de *Pseudomonas* y *Shewanella* en el reactor durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. Las concentraciones se expresan como copias de genes ARNr 16S por mililitro (escala logarítmica). La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P).

Los resultados obtenidos indican que el reactor no operó como un sistema estrictamente anaerobio-aerobio, sino como un proceso inicialmente competitivo, seguido de una fase claramente aerobia. En conjunto, los resultados muestran que en el reactor coexistieron procesos de deshalogenación reductiva, evidenciados por la transformación parcial de los compuestos más clorados, junto con rutas oxidativas, responsables de la degradación de MCB y benceno. Esta combinación de mecanismos, respaldada por los análisis químicos, de gases y qPCR, permitió la transformación de una mezcla compleja de contaminantes (Tabla A1 y A2) sin necesidad de bioaumentación.

Aunque los valores absolutos de Pirenarium tienden a ser ligeramente diferentes, en algunos casos superiores para MCB y benceno, e inferiores para DCBs, validan la tendencia biológica observada en los resultados internos. Ambos laboratorios confirman que el reactor funciona como un sistema eficaz de eliminación secuencial, logrando concentraciones prácticamente nulas de todos los compuestos aromáticos clorados al entrar en la fase aerobia.

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran que los microorganismos autóctonos del acuífero del pozo 14S poseen un potencial degradador significativo frente a las mezclas complejas de compuestos organoclorados presentes en el vertedero de Sardas. La bioestimulación con lactato y fósforo permitió activar de forma eficaz las rutas reductivas responsables de la transformación del lindano y de los compuestos más clorados, sin necesidad de recurrir a bioaumentación. Este hecho confirma que las comunidades microbianas nativas están adaptadas al emplazamiento y pueden responder rápidamente cuando se modifican las condiciones redox y nutricionales del medio.

La fase anaerobia del reactor fue determinante para la degradación del γ -HCH, alcanzándose una reducción cercana al 50 % en las tres primeras semanas. Sin embargo, los 29 días de operación en condiciones reductoras no fueron suficientes para lograr su eliminación completa, lo que sugiere que una fase anaerobia más prolongada o suplementada con fósforo, podría incrementar la transformación del lindano y mejorar la eficiencia global del proceso. La transición a condiciones aerobias permitió completar la degradación de benceno y clorobencenos, prácticamente degradados durante la fase anaerobia, probablemente debido por la presencia de oxígeno detectada en el sistema. Sin embargo, esta etapa no produjo una reducción adicional de lindano, en coherencia con su conocida recalcitrancia en ambientes oxidativos.

Los ensayos en microcosmos permitieron contextualizar el comportamiento observado en el reactor, mostrando tendencias coherentes con las rutas metabólicas esperadas bajo condiciones reductoras. Aunque la magnitud de la degradación fue menor que en el reactor, estos sistemas de menor escala sirvieron para confirmar la respuesta general de los microorganismos frente a la bioestimulación y para descartar procesos abióticos como causa principal de los cambios observados.

En conjunto, este estudio muestra que en el reactor coexistieron procesos oxidativos, responsables de la degradación de benceno y MCB, junto con transformaciones reductivas parciales en los compuestos más clorados, como DCB's y HCH's. Esta combinación de mecanismos, activada mediante bioestimulación, permitió reducir de forma significativa la carga contaminante sin necesidad de bioaumentación, validando en cierta manera un tratamiento secuencial anaerobio-aerobio. Los resultados proporcionan una base técnica sólida para futuras pruebas piloto *in situ* y subrayan la importancia de controlar la disponibilidad de donadores de electrones, nutrientes y oxígeno para optimizar la degradación de las distintas familias de contaminantes presentes en el emplazamiento.

Declaración de conflicto de intereses

El autor declara no tener conflictos de interés.

Agradecimientos

El autor agradece el apoyo del equipo de BioREM UAB, así como la supervisión y orientación recibidas durante el desarrollo de este trabajo.

Disponibilidad de datos

Los datos utilizados en este estudio están disponibles previa solicitud al autor.

Referencias

- [1] Metcalf RL, 1956. *Organic Insecticides*. Their chemistry and mode of action. Robert L. Metcalf. Interscience, New York-London, 1955. Science 123, 420–420. <https://doi.org/10.1126/science.123.3193.420.a>
- [2] Li YF, 1999. Global technical hexachlorocyclohexane usage and its contamination consequences in the environment: from 1948 to 1997. Science of The Total Environment 232, 121–158. [https://doi.org/10.1016/S0048-9697\(99\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0048-9697(99)00114-X)
- [3] Santos A, Fernández J, Guadaño J, Lorenzo D, Romero A, 2018. Chlorinated organic compounds in liquid wastes (DNAPL) from lindane production dumped in landfills in Sabiñanigo (Spain). Environmental Pollution 242, 1616–1624. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2018.07.117>
- [4] Vijgen J, Abhilash PC, Li YF, Lal R, Forter M, Torres J, Singh N, Yunus M, Tian C, Schäffer A, Weber R, 2011. Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. Environ Sci Pollut Res 18, 152–162. <https://doi.org/10.1007/s11356-010-0417-9>
- [5] Vijgen J, Yi LF, Forter M, Lal R, Weber R, Hch I, 2006. The legacy of lindane and technical production. 68
- [6] Bala K, Geueke B, Miska ME, Rentsch D, Poiger T, Dadhwal M, Lal R, Holliger C, Kohler H-PE, 2012. Enzymatic Conversion of ϵ -Hexachlorocyclohexane and a Heptachlorocyclohexane Isomer, Two Neglected Components of Technical

Hexachlorocyclohexane. *Environ Sci Technol* 46, 4051–4058.
<https://doi.org/10.1021/es204143x>

- [7] Fernández J, Arjol MA, Cacho C, 2013. POP-contaminated sites from HCH production in Sabiñánigo, Spain. *Environ Sci Pollut Res* 20, 1937–1950.
<https://doi.org/10.1007/s11356-012-1433-8>
- [8] UNEP. (2023). Texto y anexos revisado del Convenio de Estocolmo sobre Contaminantes Orgánicos Persistentes. Programa de las Naciones Unidas para el Medio Ambiente.
- [9] Dorsey, 2005. Toxicological Profile for Alpha-, Beta-, Gamma, and Delta-hexachlorocyclohexane. Agency for Toxic Substances and Disease Registry
- [10] Vega M, Romano D, Uotila E, 2016. Lindane (persistent organic pollutant) in the EU
- [11] Gómez-Lavín S, San Román MF, Ortiz I, Fernández J, De Miguel P, Urtiaga A, 2018. Dioxins and furans legacy of lindane manufacture in Sabiñánigo (Spain). The Bailín landfill site case study. *Science of The Total Environment* 624, 955–962. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.12.162>
- [12] Muñiz S, Gonzalvo P, Valdehita A, Molina-Molina JM, Navas JM, Olea N, Fernández-Cascán J, Navarro E, 2017. Ecotoxicological assessment of soils polluted with chemical waste from lindane production: Use of bacterial communities and earthworms as bioremediation tools. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 145, 539–548.
<https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2017.07.070>
- [13] Lacruz B, Cuchí JA, Fernández-Cascán J, 2016. Manejo de residuos en Sabiñánigo (Huesca) y sus efectos en el río Gállego en el período final de 201. 18, 179–192
- [14] Parales RE, Bruce NC, Schmid A, Wackett LP, 2002. Biodegradation, Biotransformation, and Biocatalysis (B3). *Appl Environ Microbiol* 68, 4699–4709. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.10.4699-4709.2002>
- [15] Soder-Walz JM, Salom D, Granados-Rigol E, Fernández-Verdejo D, Vicent T, Marco-Urrea E, Blánquez P, 2025. Enhanced aerobic bioremediation of an aquifer heavily contaminated with a mixture of chlorobenzenes and hexachlorocyclohexanes at the Sardas landfill (Spain). *Journal of Hazardous Materials* 484, 136717. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2024.136717>
- [16] Fung JM, Weisenstein BP, Mack EE, Vidumsky JE, Ei TA, Zinder SH, 2009. Reductive Dehalogenation of Dichlorobenzenes and Monochlorobenzene to Benzene in Microcosms. *Environ Sci Technol* 43, 2302–2307.
<https://doi.org/10.1021/es802131d>

- [17] Field JA, Sierra-Alvarez R, 2008. Microbial degradation of chlorinated benzenes. *Biodegradation* 19, 463–480. <https://doi.org/10.1007/s10532-007-9155-1>
- [18] Fuchs G, Boll M, Heider J, 2011. Microbial degradation of aromatic compounds — from one strategy to four. *Nat Rev Microbiol* 9, 803–816. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2652>
- [19] Trueba-Santiso A, Palau J, Soder-Walz JM, Vicent T, Marco-Urrea E, 2022. Assessment of aerobic biodegradation of lower-chlorinated benzenes in contaminated groundwater using field-derived microcosms and compound-specific carbon isotope fractionation. *Journal of Environmental Sciences* 118, 204–213. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2021.12.025>
- [20] Reineke W, Knackmuss J, 1998. Microbial degradation of haloaromatics. 42:263–287
- [21] Harwood CS, Parales RE, 1996. The β -ketoadipate pathway and the biology of self-identity. *Annu Rev Microbiol* 50, 553–590. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.50.1.553>
- [22] Nishino SF, Spain JC, Belcher LA, Litchfield CD, 1992. Chlorobenzene degradation by bacteria isolated from contaminated groundwater. *Appl Environ Microbiol* 58, 1719–1726. <https://doi.org/10.1128/aem.58.5.1719-1726.1992>
- [23] Schroll R, Brahusi F, Dörfler U, Kühn S, Fekete J, Munch JC, 2004. Biomineralisation of 1,2,4-trichlorobenzene in soils by an adapted microbial population. *Environmental Pollution* 127, 395–401. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2003.08.012>
- [24] Vieth JD Andrea, 2002. Chloroaromatics in groundwater: chances of bioremediation. *Environmental Geology* 41, 683–689. <https://doi.org/10.1007/s00254-001-0451-5>
- [25] Fathepure BZ, Vogel TM, 1991. Complete degradation of polychlorinated hydrocarbons by a two-stage biofilm reactor. *Appl Environ Microbiol* 57, 3418–3422. <https://doi.org/10.1128/aem.57.12.3418-3422.1991>
- [26] Ramanand K, Balba MT, Duffy J, 1993. Reductive dehalogenation of chlorinated benzenes and toluenes under methanogenic conditions. *Appl Environ Microbiol* 59, 3266–3272. <https://doi.org/10.1128/aem.59.10.3266-3272.1993>
- [27] Liang X, Devine CE, Nelson J, Sherwood Lollar B, Zinder S, Edwards EA, 2013. Anaerobic Conversion of Chlorobenzene and Benzene to CH₄ and CO₂ in Bioaugmented Microcosms. *Environ Sci Technol* 47, 2378–2385. <https://doi.org/10.1021/es3043092>

- [28] Cao S, Tang D, Tian Y, Lu L, Qiao W, Long T, Jiang J, 2025. Anaerobic reductive dechlorination of chlorobenzenes by an enrichment culture containing Dehalobacter species. *International Biodeterioration & Biodegradation* 201, 106062. <https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2025.106062>
- [29] Adrian L, Löffler FE, 2016. *Organohalide-Respiring Bacteria*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg
- [30] Holliger C, Wohlfarth G, Diekert G, 1998. Reductive dechlorination in the energy metabolism of anaerobic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 22, 383–398. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1998.tb00377.x>
- [31] Mortan SH, Martín-González L, Vicent T, Caminal G, Nijenhuis I, Adrian L, Marco-Urrea E, 2017. Detoxification of 1,1,2-trichloroethane to ethene in a bioreactor co-culture of Dehalogenimonas and Dehalococcoides mccartyi strains. *Journal of Hazardous Materials* 331, 218–225. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2017.02.043>
- [32] CEDEX. (2022). Análisis del impacto de la contaminación por lindano del vertedero de Sardas (Sabiñánigo) en el río Gállego. Informe final, tomo único. Centro de Estudios de Técnicas Aplicadas – Laboratorio de Geotecnia, Ministerio de Transportes, Movilidad y Agenda Urbana / Ministerio para la Transición Ecológica y el Reto Demográfico
- [33] Emgrisa. (2019). Memoria anual 2019. Servicio de seguimiento hidrogeológico de Sardas, Sabiñánigo (Huesca) 2017–2018. Gobierno de Aragón / Unión Europea – Fondo Europeo de Desarrollo Regional.
- [34] Emgrisa. (2020). Memoria anual 2019. Servicio de seguimiento hidrogeológico de Sardas, Sabiñánigo (Huesca) 2017–2018. Gobierno de Aragón / Unión Europea – Fondo Europeo de Desarrollo Regional.
- [35] Mackay, D., Shiu, W. Y., Ma, K.-C., & Lee, S. C. (2006). *Handbook of physical-chemical properties and environmental fate for organic chemicals* (2nd ed., Vol. 1). CRC Press.
- [36] EPA, 2002. Method 5035A: Closed-system purge-and-trap and extraction for volatile organics in soil and waste samples. EPA, Washington DC
- [37] Gilevska T, Sullivan Ojeda A, Kümmel S, Gehre M, Seger E, West K, Morgan SA, Mack EE, Sherwood Lollar B, 2021. Multi-element isotopic evidence for monochlorobenzene and benzene degradation under anaerobic conditions in contaminated sediments. *Water Research* 207, 117809. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117809>
- [38] Bashir S, Kuntze K, Vogt C, Nijenhuis I, 2018. Anaerobic biotransformation of hexachlorocyclohexane isomers by Dehalococcoides species and an enrichment culture. *Biodegradation* 29, 409–418. <https://doi.org/10.1007/s10532-018-9838-9>

- [39] Blázquez-Pallí N, Rosell M, Varias J, Bosch M, Soler A, Vicent T, Marco-Urrea E, 2019. Integrative isotopic and molecular approach for the diagnosis and implementation of an efficient in-situ enhanced biological reductive dechlorination of chlorinated ethenes. *Water Research* 167, 115106. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2019.115106>
- [40] Zhang W, Lin Z, Pang S, Bhatt P, Chen S, 2020. Insights Into the Biodegradation of Lindane (γ -Hexachlorocyclohexane) Using a Microbial System. *Front Microbiol* 11, 522. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00522>
- [41] Lal R, Pandey G, Sharma P, Kumari K, Malhotra S, Pandey R, Raina V, Kohler H-PE, Holliger C, Jackson C, Oakeshott JG, 2010. Biochemistry of Microbial Degradation of Hexachlorocyclohexane and Prospects for Bioremediation. *Microbiol Mol Biol Rev* 74, 58–80. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00029-09>
- [42] Rittmann BE, McCarty PL, 2018. *Environmental Biotechnology: Principles and Applications*. McGraw-Hill Education, New York, N.Y
- [43] Bitton G, 2010. *Wastewater Microbiology*, 1st ed. Wiley
- [44] Gossett JM, 2010. Sustained Aerobic Oxidation of Vinyl Chloride at Low Oxygen Concentrations. *Environ Sci Technol* 44, 1405–1411. <https://doi.org/10.1021/es9033974>

Anexos

Figuras Anexo

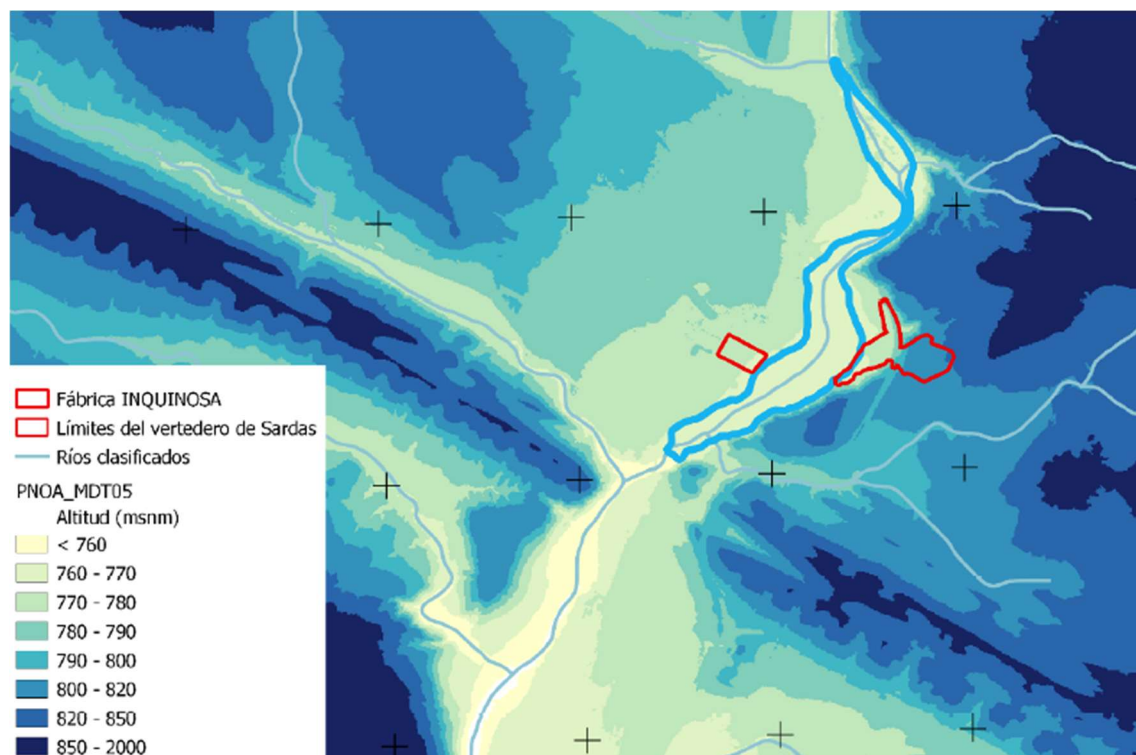


Figura A1. Modelo digital de elevación (IGN, 2021) de 5 m de resolución en el área del embalse de Sabinánigo.

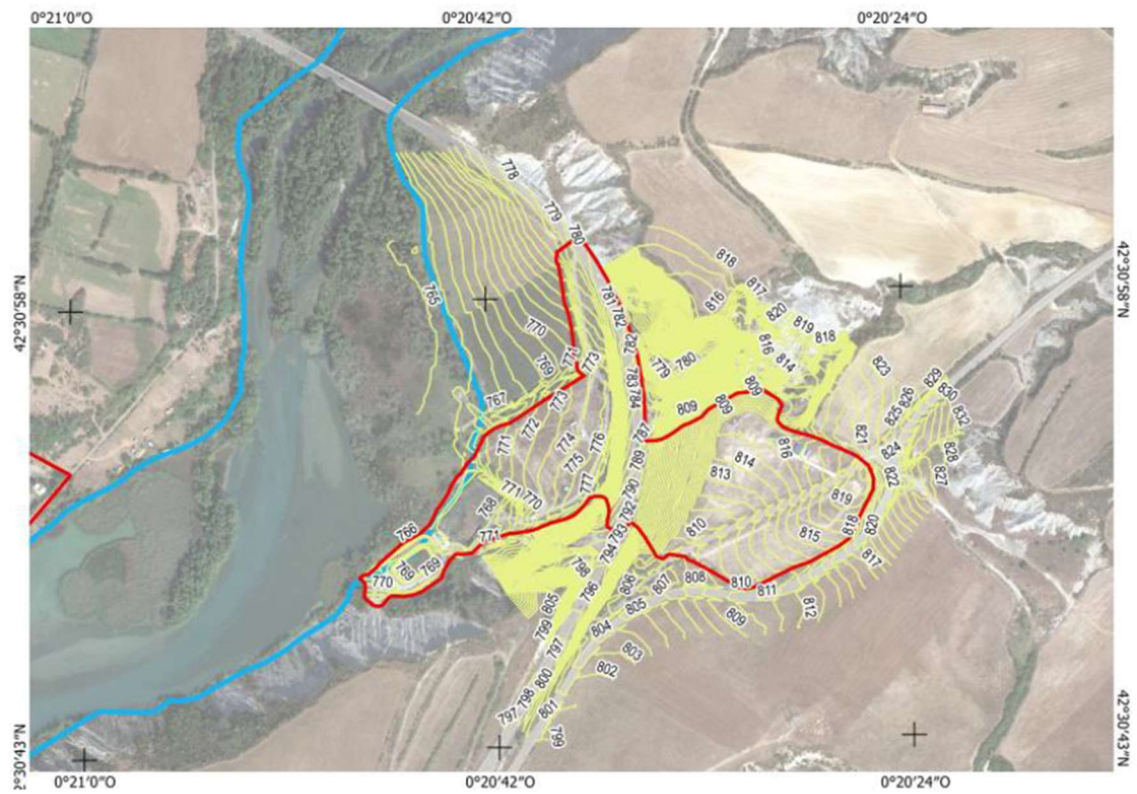


Figura A2. Curvas del nivel del área del vertedero de Sardas. Estado actual.



Figura A3. Anticlinal tumbado de Yebra de Basa. La línea amarilla marca el eje axial del anticlinal. Las flechas rojas indican la dirección de compresión (σ_1).

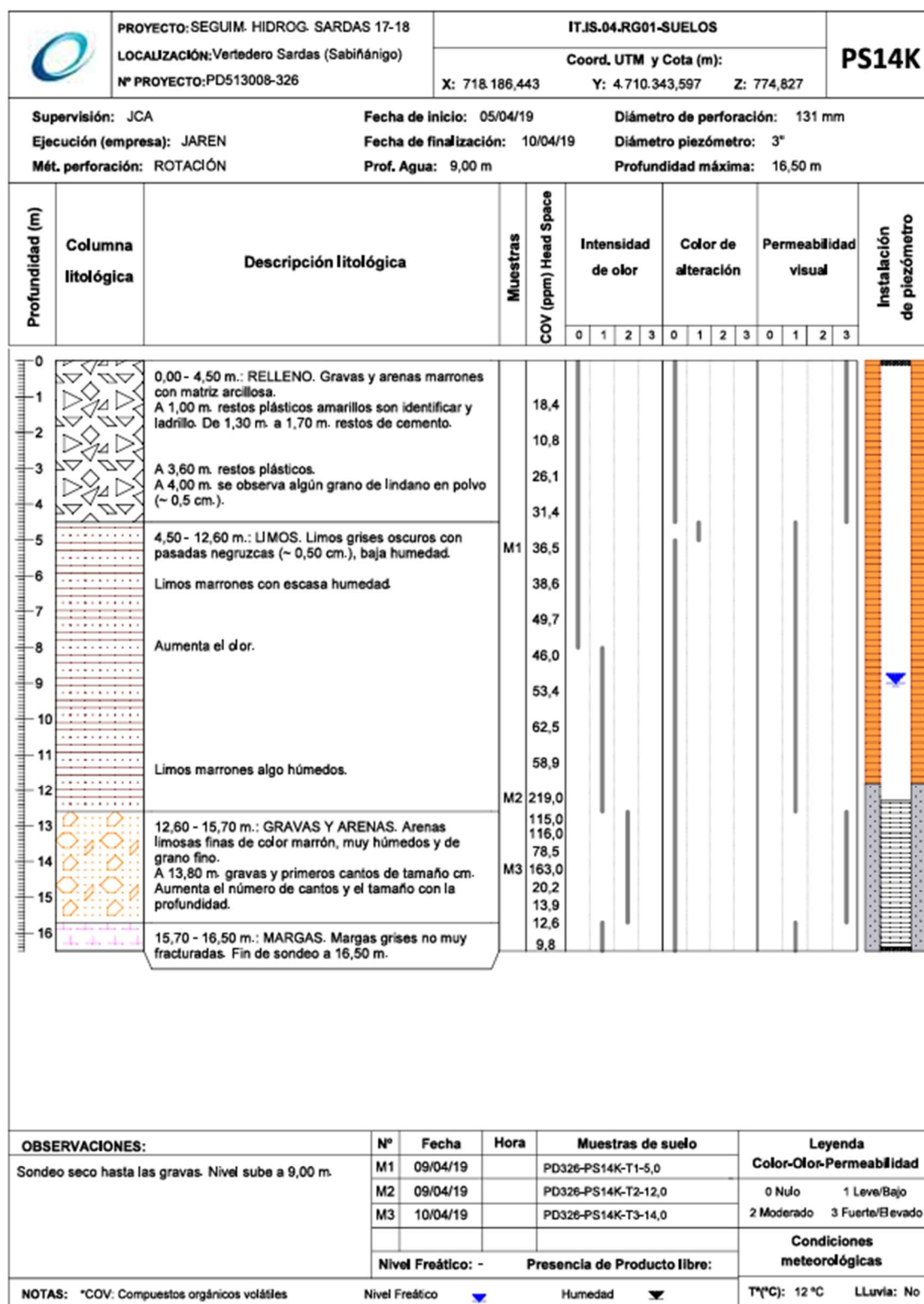


Figura A4. Columna litológica y datos geotécnicos del sondeo PS14K en el vertedero de Sardas (Sabiñánigo), incluyendo descripción de materiales, profundidad del nivel freático.

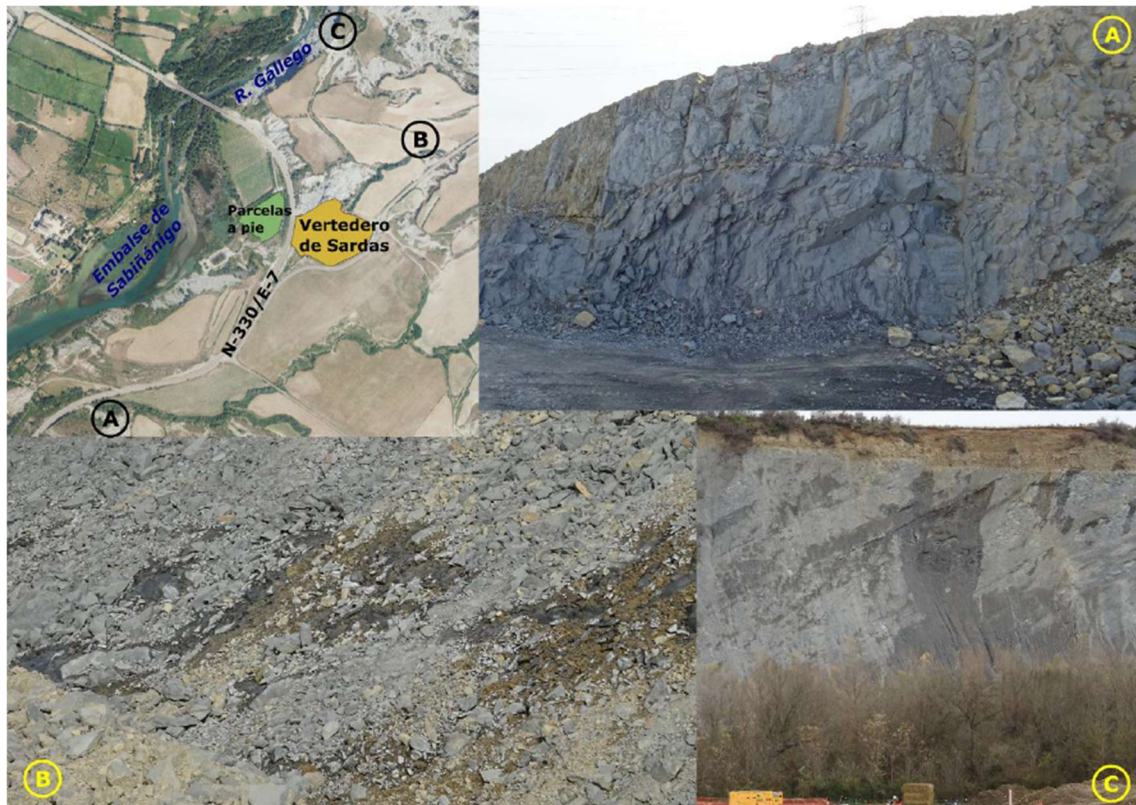


Figura A5. Fotografías de las discontinuidades y los flujos de agua observados en las margas de Larrés a varias profundidades en los taludes de construcción de la autovía A-23 al N del vertedero y en los taludes de erosión del río Gállego (noviembre de 2021).

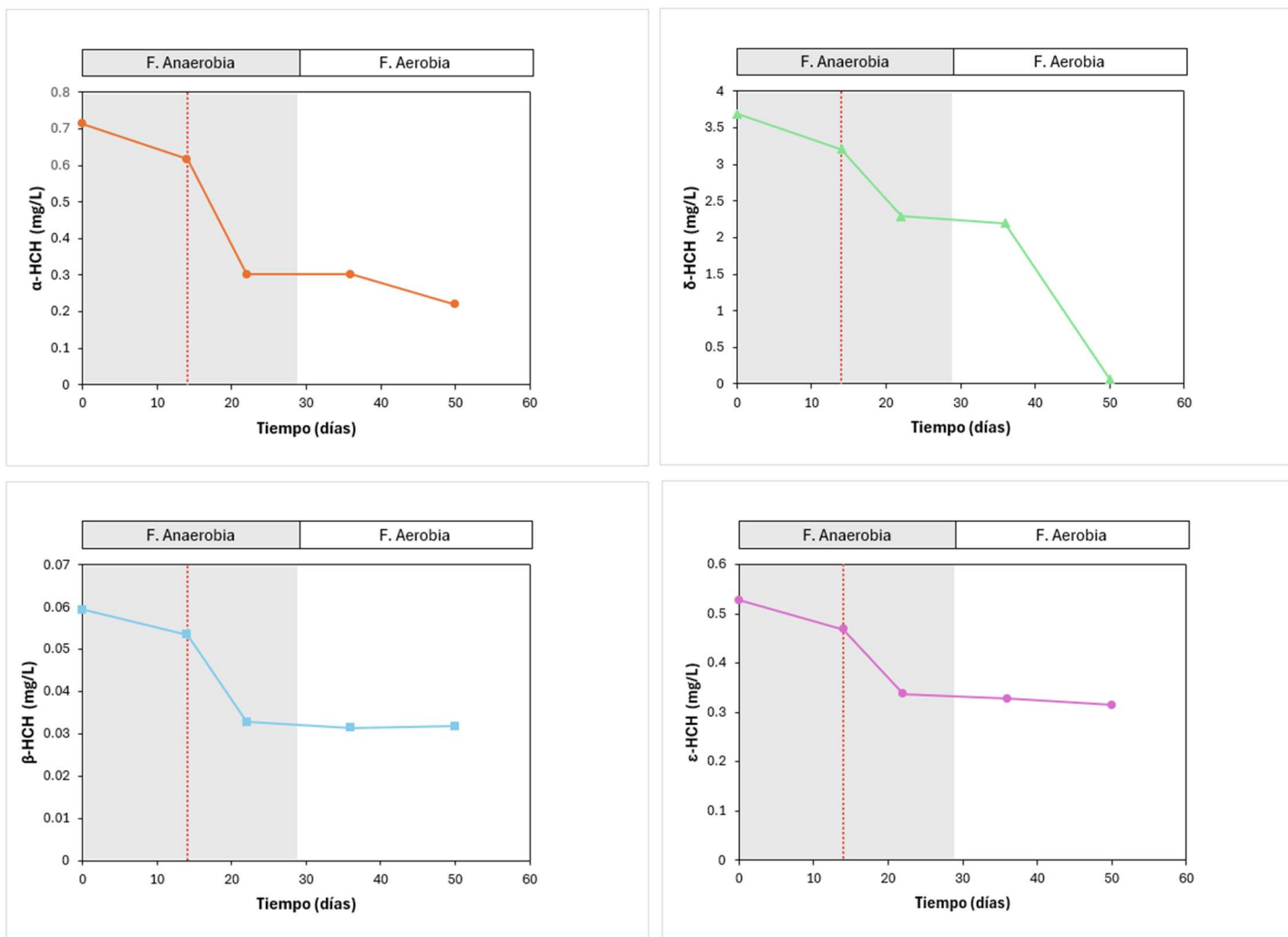


Figura A6. Evolución de la concentración de isómeros HCH (α , β , δ y ϵ -HCH) en el reactor (resultados Pirenarium) durante las fases anaerobia (área sombreada) y aerobia. La línea roja discontinua indica la adición de fósforo (P).

Tablas anexo

(Fenoles-clorofenoles µg/L)					
tiempo	Fenol	2-Clorofenol	3-Clorofenol	4-Clorofenol	2,6-Diclorofenol
0	93.98	48.06	408	155.93	1.38
14	1.72	40.61	155.99	4.47	1.39
22	1.65	30.46	29.04	3.23	0.98
36	0.49	15.36	<0.1	<0.1	0.86
50	0.3	4.69	<0.1	<0.1	0.59
tiempo	2,4-Diclorofenol	2,4,6-Triclorofenol	2,3,5,6-Tetraclorofenol	2,3,4,6-Tetraclorofenol	2,3,4,5-Tetraclorofenol
0	61.81	48.14	<0,1	4.99	<0,1
14	57.8	52.23	<0,1	5.6	<0,1
22	58.61	55.01	<0,1	6.64	<0,1
36	43.18	39.92	<0.1	4.72	<0.1
50	1.05	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1

Tabla A1. Concentración a lo largo del tiempo de fenoles-clorofenoles (µg/L) en el reactor (resultados Pirenarium).

Compuestos volátiles (µg/L)				
tiempo (d)	1,1-Dicloroetano	Benceno	Tricloroetileno	Tetracloroetileno
0	10.54	6953.34	4.29	2.2
14	5.17	2099.77	2.34	1.77
22	<2.5	11.21	<2.5	<2.5
36	1.01	<0.1	0.3	<0.1
50	0.89	<0.1	<0.1	<0.1
tiempo (d)	Tolueno	Etilbenceno	m y p-xileno	o-xileno
0	17.02	<0,1	<0,1	0.76
14	7.87	<0,1	<0,1	0.31
22	<2.5	<2.5	<2.5	<2.5
36	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
50	<0.1	<0.1	<0.1	<0.1
tiempo (d)	Clorobenceno	1,3-Diclorobenceno	1,4-Diclorobenceno	1,2-Diclorobenceno
0	30672.88	46	645.16	879.48
14	20874.83	18.16	259.85	418.4
22	1939.93	11.59	157.74	218.78
36	<0.1	1.73	<0.1	0.91
50	<0.1	0.76	<0.1	0.53
tiempo (d)	1,3,5-Triclorobenceno	1,2,4-Triclorobenceno	1,2,3-Triclorobenceno	1,2,3,5+1,2,4,5-Tetraclorobencenos
0	1.14	73.36	25.33	2.07
14	0.28	51.66	14.38	3.62
22	<2.5	45.57	6.4	5.05
36	<0.1	0.64	1.51	<0.1
50	<0.1	0.69	2.33	1.9

Tabla A2. Concentración a lo largo de los compuestos volátiles (µg/L) en el reactor (resultados Pirenarium).