

CONAMA 2022

CONGRESO NACIONAL DEL MEDIO AMBIENTE

SUSTRATEC

Nuevos sustratos tecnológicos con capacidad auto-fertilizante y de captación de contaminantes atmosféricos



Autor Principal: Silvia Gómez Valle (CARTIF)

Otros autores: José María Sanz (CARTIF), Jose Feroso (CARTIF), Esther San José (CARTIF), Raquel Marijuán (CARTIF), Raúl Sánchez (CARTIF), María González (CARTIF), Jorge Calvo (CARTIF).

ÍNDICE

1. Título
2. Resumen
3. Metodología y Resultados
4. Conclusiones
5. Bibliografía

SUSTRATEC

Nuevos sustratos tecnológicos con capacidad autofertilizante y de captación de contaminantes atmosféricos.

Resumen.

Los tecnosuelos o tecnosoles, según la Base referencial mundial del recurso suelo [1], son un grupo de suelos que combinan su origen técnico y una cantidad significativa de residuos derivados de actividades antropogénicas y que pueden actuar como material original a través de los procesos de formación del suelo, es decir, los tecnosuelos son suelos artificiales elaborados a base de mezclas de diferentes residuos no peligrosos, productos y subproductos que, por la similitud con las propiedades de un suelo natural, pueden llegar a formar parte de los procesos de pedogénesis o de formación de un suelo.

Sus aplicaciones son variadas. Las más usuales y con mayor interés económico y ambiental son la mejora de suelos agrícolas agotados o la restauración de zonas degradadas, como pueden ser zonas que hayan sufrido incendios forestales o aquellas en la que se ha llevado a cabo una intensa actividad minera.

Dentro del proyecto SUSTRATEC se han desarrollado, elaborado e implantado 8 tipos de tecnosuelos, 4 de ellos en Dueñas, Palencia y otros 4 en El puerto de Santa María, Cádiz.

La formulación de estos nuevos sustratos se realizó *ad hoc* para cada una de las dos ubicaciones, teniendo en cuenta su composición inicial, mediante la adición de diferentes porcentajes de varios subproductos para que, una vez añadidos, tuvieran las características agronómicas deseadas.

Los componentes principales de todos los tecnosuelos han sido:

- Residuos orgánicos procedentes de lodos de depuradoras urbanas o industriales, como lodos de papelera o de industrias agroalimentarias. La composición de estos lodos es muy variable, pero todos ellos tienen un gran valor agronómico por su alto contenido en materia orgánica, nitrógeno, fósforo y potasio, pero también en otros macro y micronutrientes.
- Adsorbentes y estructurantes, como espumas de azucarera o cenizas de madera. Este tipo de subproductos son capaces de modificar en gran medida la textura, aireación, capacidad de retención de agua, la permeabilidad, la conductividad y la salinidad del suelo, provocando una estimulación de la actividad microbiana del suelo y aportando al mismo tiempo cantidades variables de diferentes micronutrientes. También se incluyen aquí residuos de biomasa (como restos de poda, paja de cereal o restos hortofrutícolas, entre otros) que dan consistencia al tecnosuelo y le aportan materia orgánica.
- Aditivos, como sulfatos, cal o reductores de pH. Se utilizan para conseguir los pH deseados y unas concentraciones de nutrientes que abarquen todas las necesidades de los cultivos sin tener que recurrir con posterioridad a la fertilización.

Las plantas son incapaces de captar el nitrógeno ambiental (N_2) y solo pueden absorberlo cuando está en forma de nitrato en el suelo. Este nitrato puede proceder de procesos naturales gracias a la presencia de bacterias nitrificantes, que son capaces de fijar los óxidos de nitrógeno en nitratos, o bien a partir de fertilización mineral artificial.

La innovación del proyecto SUSTRATEC, y lo que le confiere a los tecnosuelos la capacidad autofertilizante y de captación de contaminantes, es la adición de bacterias fijadoras de nitrógeno encapsuladas. En concreto, se han seleccionado microorganismos que de forma natural están en algunos suelos, como son las bacterias nitrificantes del género *Azotobacter* o *Rizhobium*. Al añadir estas bacterias, se consigue fijar más nitrógeno, dejando un excedente de nitratos en el suelo que permitirá reducir la fertilización mineral en años posteriores.

Las formulaciones de bacterias encapsuladas para usos agrícolas tienen dos objetivos. Por una parte, se persigue proteger de manera temporal a los microorganismos encapsulados de las condiciones ambientales del suelo y de la competencia microbiana. Y, por otra parte, se busca liberarlos gradualmente, de manera que colonicen eficientemente el sistema radicular de las plantas.

Metodología y Resultados

En el marco de la investigación, el primer paso fue realizar una selección de bacterias con capacidad de crecimiento en suelos, eligiéndose finalmente dos cepas concretas:

- *Rhizobium laguerreae* (simbiótica de fabáceas)
- *Azotobacter vinelandii* (de vida libre)

Las bacterias del género *Rhizobium*, son bacterias Gram negativas que forman nódulos en las raíces de las leguminosas y establecen relaciones simbióticas con los huéspedes para reducir el

nitrógeno atmosférico en amonio, que será posteriormente metabolizado a nitrato, disminuyendo de esta forma la cantidad de nitrógeno que se debe aportar como fertilizante.

Azotobacter, en cambio, son proteobacterias que viven comúnmente en todos los ecosistemas, suelo, agua y sedimentos. Estas bacterias se identifican como la especie más eficiente para producir múltiples sustancias que estimulan el crecimiento en la rizosfera y, lo que es más importante, puede fijar de forma libre (no necesita relación simbiótica con ninguna planta) el nitrógeno libre atmosférico.

Proceso de encapsulación

Tras la selección de los microorganismos, se estudiaron diferentes técnicas de encapsulación para conseguir que los suelos cumplieran los objetivos de autofertilizantes y captadores de NOx, determinando que la tecnología que mejor se adaptaba a las bacterias y a las características de los tecnosuelos era la encapsulación por gelificación iónica externa, en la que se forman pequeñas cápsulas de gel de alginato en las que las bacterias quedan atrapadas.

El proceso de encapsulación parte de realizar un crecimiento de ambas cepas de bacterias en medios de cultivo específicos para cada una de ellas. Posteriormente, en una disolución de alginato sódico se añaden una mezcla de ambos géneros, formándose una suspensión de alginato con bacterias. Esta suspensión se agrega gota a gota sobre una solución de cloruro cálcico. En el momento que entran en contacto ambas soluciones, se produce un intercambio iónico que hace que se formen las cápsulas de alginato cálcico en la que las bacterias quedan retenidas. El tamaño de las gotas, determinará el tamaño de las cápsulas, así como otras de sus propiedades. Posteriormente las cápsulas se separan de la solución, se lavan y se secan, quedando pequeñas esferas con textura gomosa

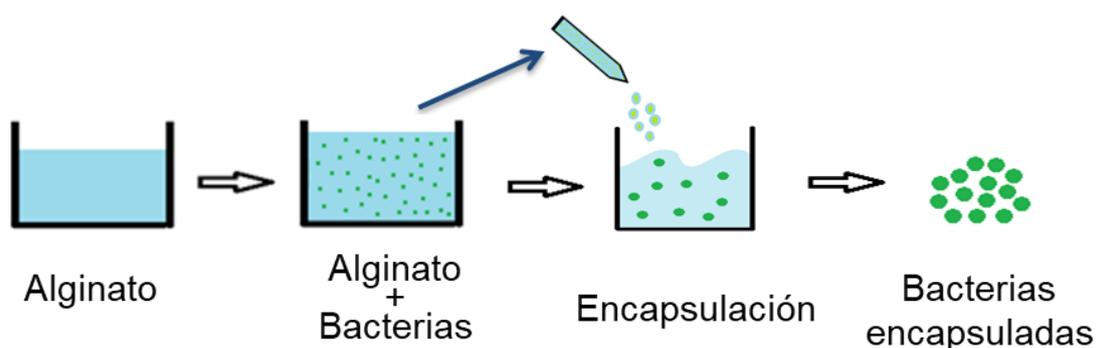


Figura 1. Proceso teórico de encapsulación de las bacterias.

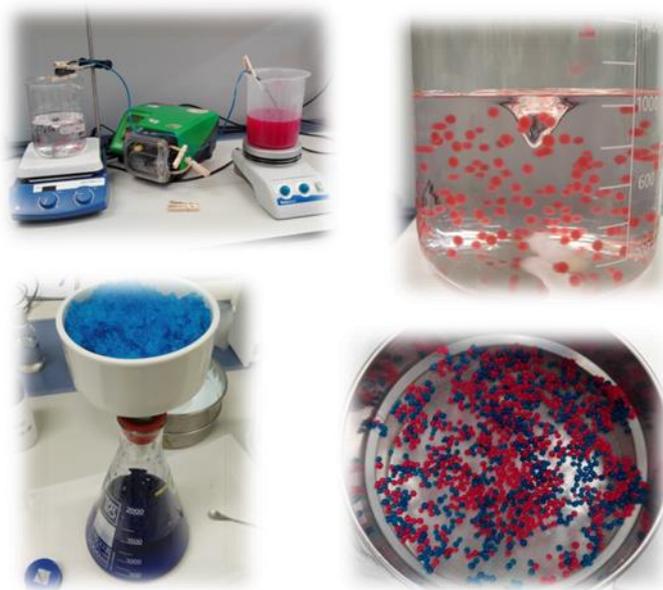


Figura 2. Imágenes del proceso de encapsulación realizado.

Tras la elaboración de las cápsulas, se realizaron diferentes ensayos de viabilidad y funcionalidad de las bacterias encapsuladas a nivel de laboratorio. Así, se verificó que podían añadirse al sustrato y sobrevivir en diferentes ambientes a lo largo del tiempo. Se comprobó que tras añadir las cápsulas al suelo, su comportamiento era el esperado, es decir, que las bacterias se iban liberando de forma progresiva para colonizar el suelo, y se estudió cómo era el proceso de biodegradación en un ambiente controlado.

Los ensayos realizados, fueron:

- Supervivencia de bacterias encapsuladas
- Liberación lenta de bacterias encapsuladas
- Viabilidad de las cápsulas frente a la temperatura
- Viabilidad de las cápsulas frente al pH
- Biodegradación y viabilidad de cápsulas en suelo:
 - Sin planta
 - Con planta

Supervivencia de bacterias encapsuladas:

Para determinar la supervivencia de las bacterias encapsuladas, se tomaron 10 cápsulas y se incubaron en un medio líquido en la que las bacterias no se reproducen. Posteriormente, se realizó la siembra en un medio de crecimiento general, en el que se contaron las colonias formadas dando un resultado de 1,24 por 10 a la 8 UFC (unidades formadoras de colonias) por ml. También en este ensayo, se identificaron dos tipos de colonias bacterianas bien diferenciadas y típicas de las especies encapsuladas.

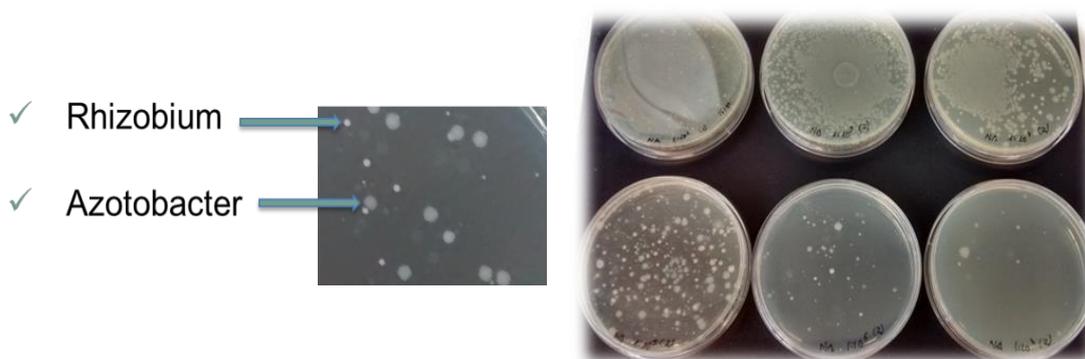


Figura 3. Izquierda: Imágenes de colonias típicas de *Rhizobium* y *Azotobacter*. Derecha: Placas de agar nutritivo con disoluciones seriadas

Liberación lenta de bacterias encapsuladas

En otro de los ensayos realizados, se verificó la liberación lenta de las bacterias. Para ello se estudió cómo las bacterias se liberaban de las cápsulas a diferentes tiempos y pH, ya que este último es un factor clave en la degradación del alginato.

La forma de trabajo fue similar a la anterior: se tomaron 10 cápsulas y se suspendieron en una solución salina a 3 pH diferentes de 6, 7 y 8. Estos valores se tomaron teniendo en cuenta los pH medios de los suelos. Se tomaron muestras cada 24 horas durante 4 días consecutivos y se analizaron las UFC por ml. Como se puede observar en la tabla, la cantidad de bacterias liberadas se reduce de forma progresiva.

Cuadro 1. UFC viables/ml a diferentes tiempos y pH

	pH6	pH7	pH8
24 horas	1,50E+07	1,75E+07	4,80E+06
48 horas	2,80E+07	3,30E+07	6,50E+06
72 horas	6,50E+06	3,50E+06	4,00E+06
96 horas	2,70E+06	2,85E+06	3,10E+06

Fuente: CARTIF

Viabilidad de las cápsulas frente a la temperatura

Para determinar la viabilidad de las cápsulas frente a la temperatura se hicieron dos ensayos.

El primero de ellos fue ver cómo la temperatura influía en el peso de las cápsulas. Para ello, se tomaron 10 cápsulas y se las sometió a 4 temperaturas diferentes variando de 4 a 37 °C durante 7 días y se calculó la pérdida de peso frente a unos controles a los que no se les sometió a ningún estrés térmico. Los porcentajes de reducción de peso se incrementan a medida que aumenta la temperatura de exposición, llegando hasta un 92 % de reducción del peso en las cápsulas sometidas a mayor temperatura.

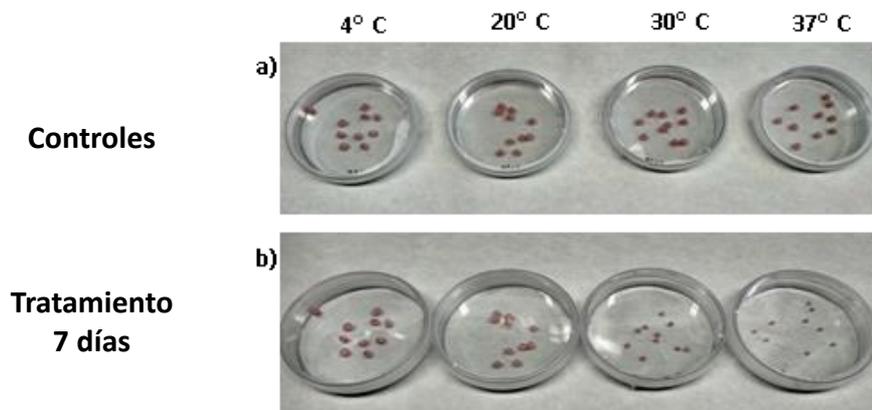


Figura 4. Imagen de las cápsulas sometidas a estrés térmico.

Cuadro 2. Porcentaje de reducción de peso de las cápsulas.

Tª (°C)	Reducción peso %
4	4,1
20	14
30	88
37	92

Fuente: CARTIF

El segundo ensayo era complementario y posterior al anterior y en el que se tenía que evaluar si las bacterias una vez sometidas a esas temperaturas seguían siendo viables. Para ello, se tomaron las cápsulas tras la incubación durante 7 días y se incubaron en su medio de cultivo específico durante 12 horas, observándose una turbidez indicativa de crecimiento bacteriano. La siembra posterior para conteo de UFC demostró que las bacterias resisten un amplio rango de temperaturas y que no influye de manera drástica en el número de células viables.

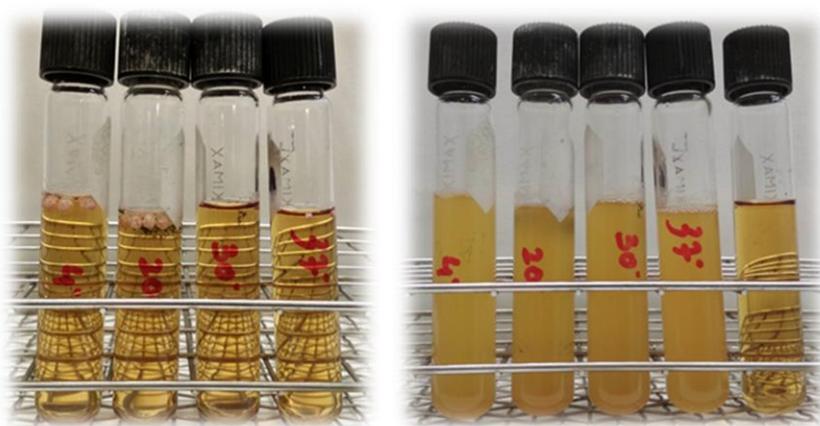


Figura 5. Tubos con medio de cultivo al inicio (izda) y tras la incubación (dcha).

Cuadro 3. UFC viables/ml a diferentes temperaturas.

Tª (°C)	UFC/ml
4	$2,3 \times 10^{10}$
20	$3,99 \times 10^{10}$
30	$4,18 \times 10^{10}$
37	$2,4 \times 10^9$

Fuente: CARTIF

Viabilidad de las cápsulas frente al pH

Al igual que en los anteriores ensayos, se tomaron 10 cápsulas y se incubaron 7 días, en agua destilada a diferentes pH (4, 6 y 8), simulando suelos ácidos, neutros y básicos.

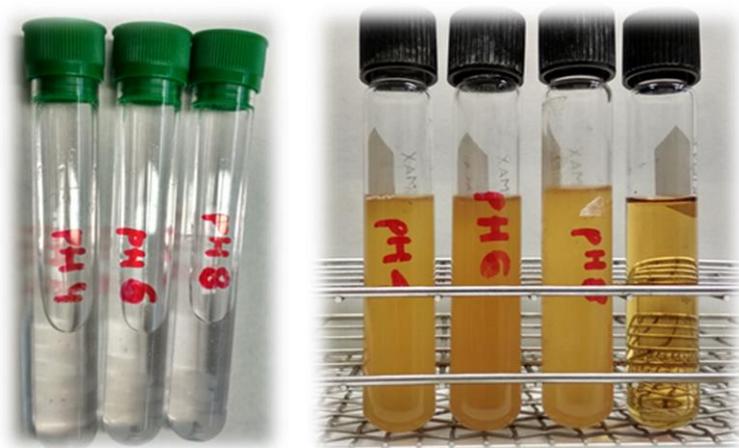


Figura 6. Tubos con las cápsulas a diferentes pH y tras la incubación.

Pasados los 7 días, se realizó una inspección visual de las cápsulas, de forma que en ninguna de ellas se observó degradación. Se traspasó a su medio de cultivo, se incubó y se realizó el conteo de UFC/ml, demostrándose que los diversos valores de pH no afectan a la supervivencia de las bacterias y que los mayores valores de UFC/ml se obtienen a pH 6 y 8, tal y como cabía esperar por ser más cercanos al pH de crecimiento óptimo de los microorganismos del estudio.

Cuadro 4. UFC viables/ml a diferentes temperaturas.

pH	UFC/ml
4	$2,5 \times 10^9$
6	$7,6 \times 10^9$
8	$1,28 \times 10^{10}$

Fuente: CARTIF

Biodegradación y viabilidad de cápsulas en suelo:

Una vez demostrado que las bacterias son viables en ambientes muy variados, se abordó el estudio del comportamiento en los sustratos desarrollados para determinar las propiedades de liberación de las cápsulas en suelos con distintas humedades.

- Sin planta

Se ensayó en tubos estériles con los 4 tipos de sustratos elaborados para las parcelas de Dueñas con diferentes porcentajes de humedad, 20, 40, 55 y 75% y se tomaron medidas semanalmente de la altura de suelo y cápsulas para comprobar cómo las cápsulas se iban degradando y reduciendo su tamaño, hasta pasados un total de 42 días que se calculó la tasa de degradación final. Se comprobó la viabilidad de las mismas como en los estudios anteriores, comprobando que se detectaban las colonias típicas de ambas bacterias.

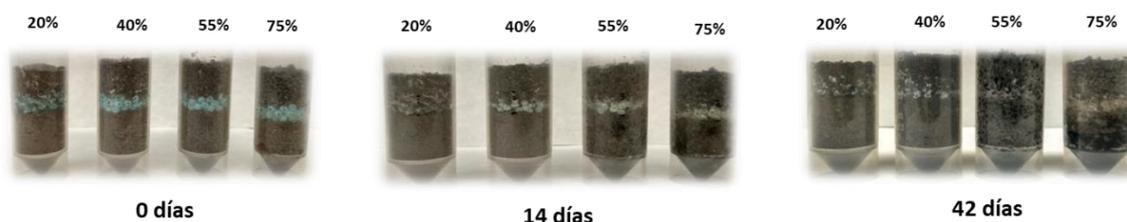


Figura 7. Ensayo de degradación de las cápsulas en entorno edáfico.

Como podemos observar en la figura 7 y en las gráficas de la figura 8, las cápsulas son estables en la mayoría de suelos. Cuanto mayor sea el nivel de humedad de los suelos, mejor se conservarán las cápsulas.

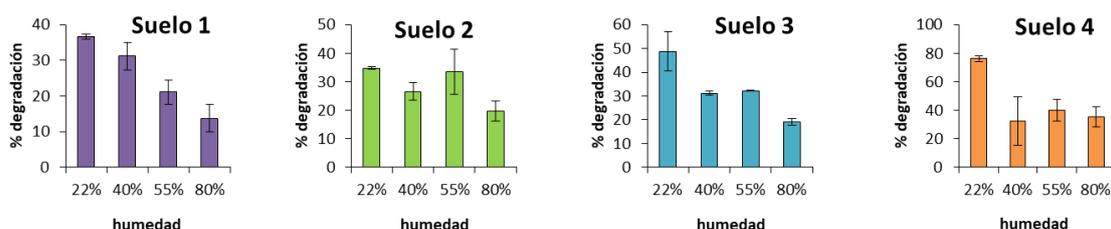


Figura 8. Gráficas de degradación de los 4 suelos a diferentes humedades.

- Con planta

El siguiente paso fue estudiar el comportamiento de las bacterias y de las plantas a nivel de laboratorio. Para ello, se prepararon semilleros en alveolo con los 4 tipos de suelos y 2 tipos de planta diferentes (maíz y judía) y sobre los que se aplicaron las bacterias encapsuladas. A su vez, se realizó un ensayo en las mismas condiciones pero sin las bacterias, lo que permitió comparar distintas variables de crecimiento de las plantas (como altura, peso fresco, longitud de raíz y diámetro del hipocotilo o parte subterránea del tallo).



Figura 9. Imágenes de siembra e inoculación de bacterias y crecimiento de las plantas.

Tanto las judías como los maíces inoculados con las bacterias encapsuladas, presentaron un crecimiento en altura mayor, en las gráficas tenemos en azul los resultados obtenidos con bacterias y en rojo los que no tenían bacterias.

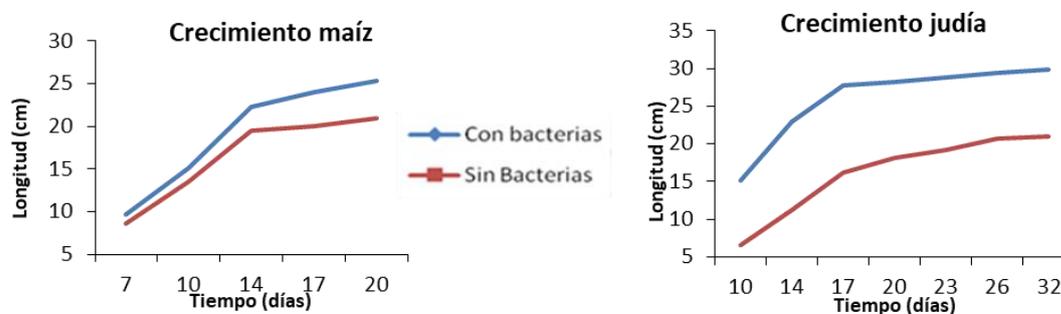


Figura 10. Gráficas de crecimiento de maíz y judía con y sin aplicación de bacterias encapsuladas.

Evaluación de la capacidad autofertilizante

Gracias a los ensayos anteriores, se pudo comprobar que las bacterias encapsuladas son funcionales en diferentes condiciones. Pero se debía evaluar también tanto la capacidad autofertilizante como la de captación de contaminantes atmosféricos.

Para ello, se realizaron dos ensayos paralelos, uno de viabilidad de las bacterias y crecimiento de plantas en vivero laboratorio y otro de crecimiento de plantas en campo.

- Ensayos en vivero-laboratorio

En el ensayo de vivero se implantaron 4 especies de plantas (maíz, pino, retama y esparceta) en maceta con cada uno de los 4 sustratos desarrollados para Dueñas más un blanco (suelo original de las parcelas) y un sustrato comercial.



Figura 11. Imágenes de las macetas con las bacterias encapsuladas

Para comprobar la colonización de las bacterias en los suelos, se recogieron muestras de suelo a diferentes tiempos después de la inoculación y se extrajo el ADN bacteriano del suelo a 4 tiempos diferentes, T0= 0 días dpi (después del inóculo), T1=7 días dpi, T2=21 días dpi y T3=42 días dpi, se cuantificó con un espectrofotómetro y se comprobó su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa, obteniendo en todos ellos una concentración medible de ADN bacteriano, posteriormente se confirmó que eran de las bacterias inoculadas. Por lo que en condiciones ambientales de campo, las bacterias se reproducen y sobreviven

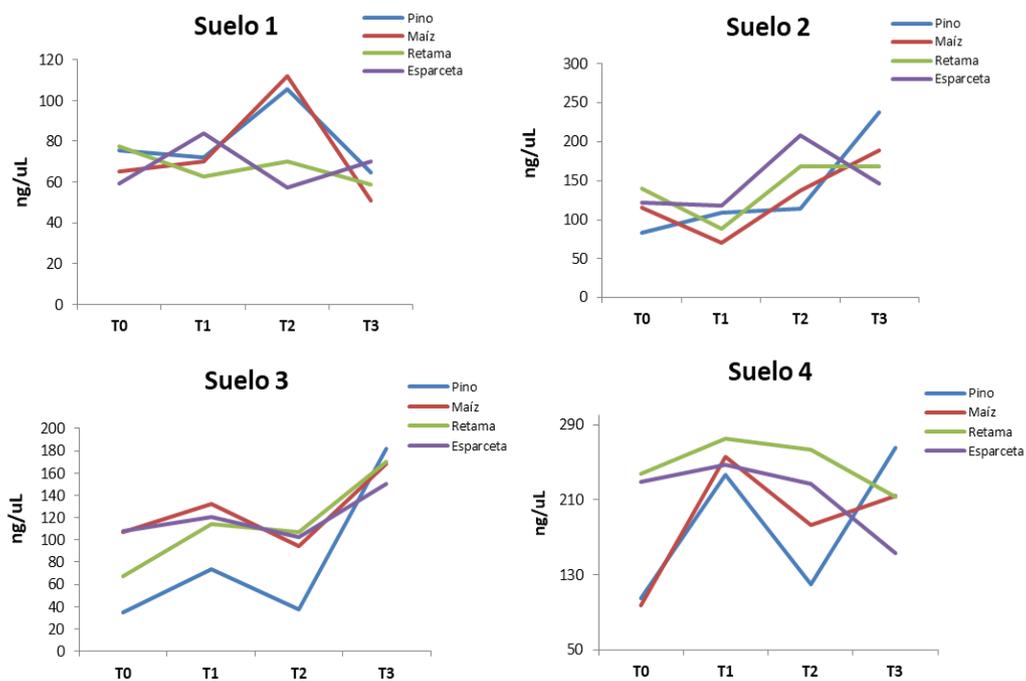


Figura 12. Concentración de ADN (ng/μL) en cada tipo de suelo.



Figura 13. Crecimiento de bacterias 42 días después de la inoculación

Durante un año tras la inoculación de las bacterias, se evaluó el crecimiento en las 4 especies de plantas comparándolas con el suelo original y el sustrato comercial. Ya que la composición de los sustratos es diferente y unas plantas son más afines que otras a las diferentes concentraciones de nutrientes, hubo variación en el crecimiento de las distintas especies, pero el crecimiento en los sustratos desarrollados fue más destacado.



Figura 14. Imágenes del crecimiento de las diferentes especies ensayadas

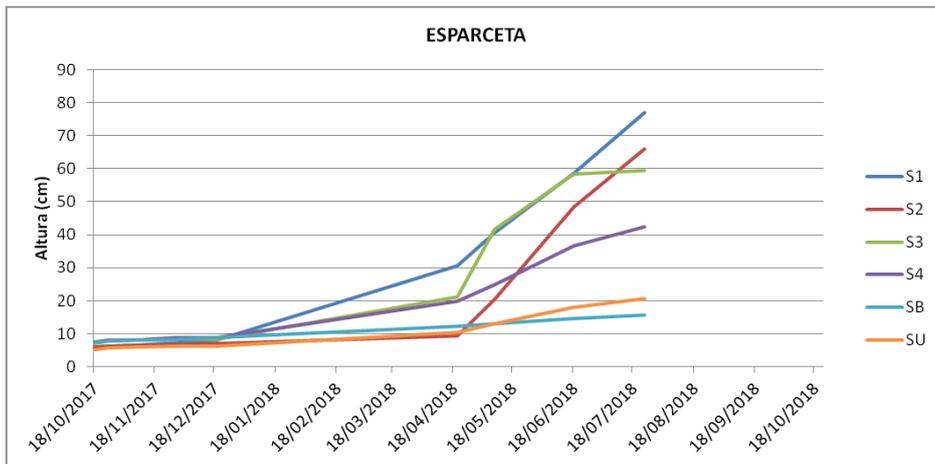


Figura 15. Gráfica de crecimiento esparceta en el tiempo

- Ensayos en campo

Así mismo, en los ensayos en campo, se implantaron 2 especies, acacias y retamas.

Al igual que en vivero se realizaron medidas de seguimiento durante un ciclo estacional completo después de la adición de las bacterias.



Figura 16. Imágenes de la inoculación y crecimiento de las especies en campo.

Tras el análisis de los datos se determinó que el crecimiento en los sustratos con bacterias era superior al blanco también inoculado.

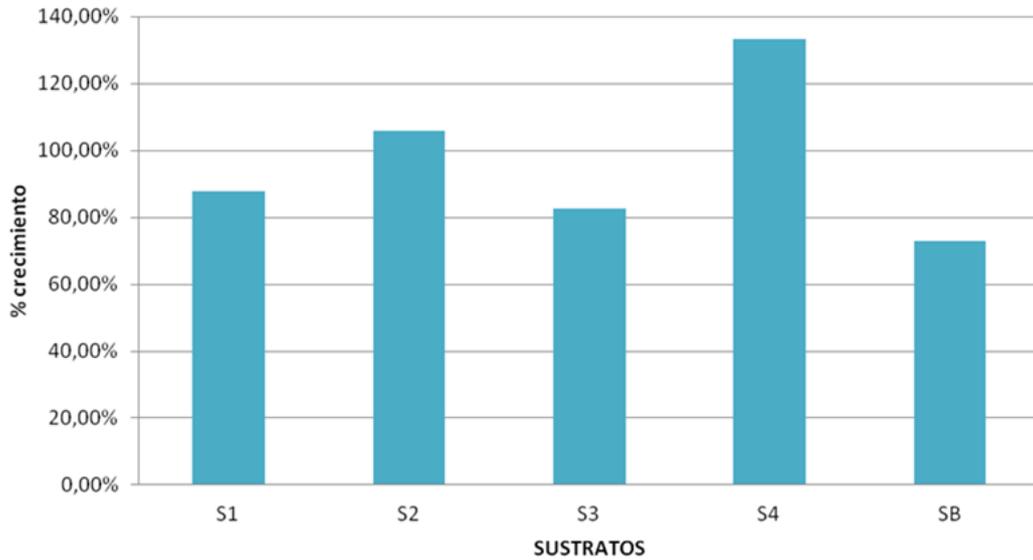


Figura 17. Promedio de crecimiento relativo de individuos

En todas las parcelas, se inoculó solo a la mitad de las retamas para comprobar el crecimiento con y sin bacterias, obteniéndose una mayor altura en aquellas que habían recibido bacterias.

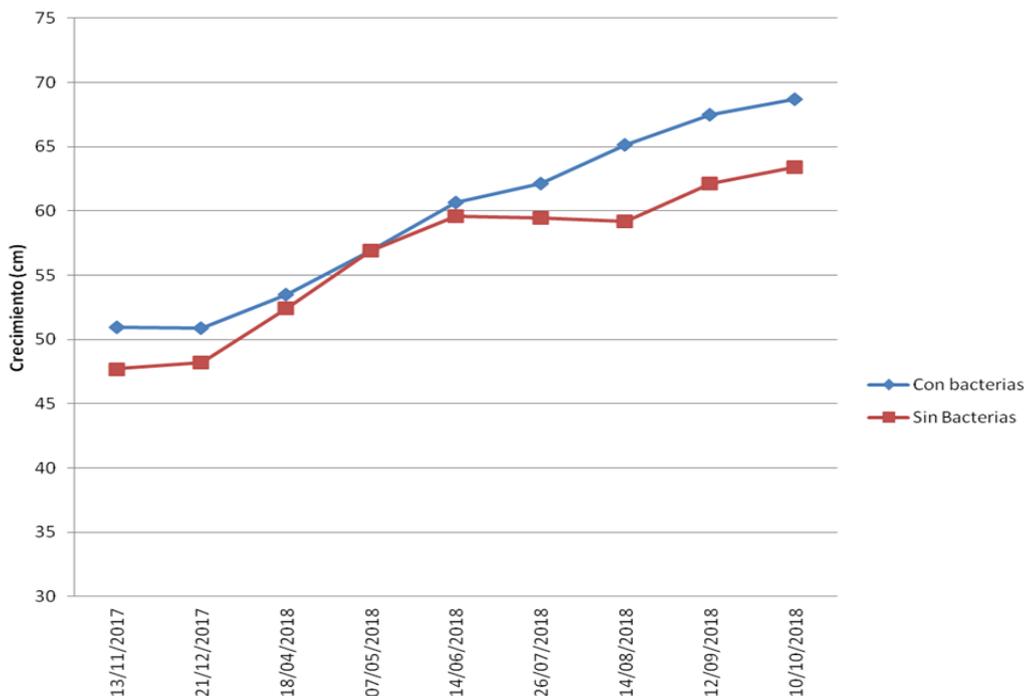


Figura 18. Comparativa crecimiento con y sin bacterias

Confirmando con todas estas pruebas que las bacterias son capaces de sobrevivir en el tiempo y que aumentan el crecimiento de las plantas, y validando la hipótesis inicial de capacidad autofertilizante.

Evaluación de captación de NOx

En cuanto los ensayos de captación de contaminantes, se plantearon para identificar cual era la capacidad de absorber óxidos de nitrógeno por parte de los componentes del suelo. Esta absorción permitiría su oxidación por parte de las bacterias o las condiciones del suelo de forma que se formaran nitratos que serían fertilizantes utilizables por la vegetación del suelo.

Inicialmente se diseñó una cámara para que el contacto del suelo con el aire contaminado fuese superficial como ocurriría en la aplicación convencional. Sin embargo, se comprobó que la capacidad de captación de esta forma era tan baja (para la unidad de superficie de ensayo) que el equipo de medida no tenía sensibilidad suficiente para hacer los ensayos en continuo, ralentizando su caracterización.



Figura 19. Cámara de ensayo inicial de absorción superficial.

Por ello, se diseñó un nuevo ensayo en el que se hacía pasar el aire contaminado a través del suelo maximizando la superficie de contacto entre el suelo y el aire contaminado. De esta manera el ensayo tiene una sensibilidad muy alta permitiendo identificar las diferencias entre los distintos tipos de suelos.



Figura 20. Prototipo de absorción a través del suelo (izda) y equipo de medida de NOx (dcha).

En la siguiente imagen, se pueden ver la gráfica resultante de la captación en el tiempo de los diferentes gases al atravesar el suelo.

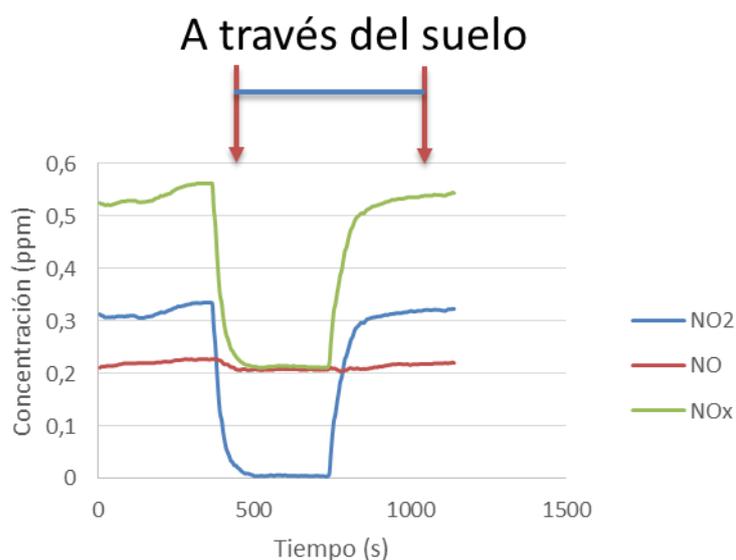


Figura 21. Gráfica de concentración de gases a lo largo del tiempo tras atravesar el prototipo.

Este ensayo se realizó con los 4 sustratos diseñados para Dueñas así como con el suelo de la parcela original sin y con bacterias añadidas. Obteniéndose los resultados siguientes de captación de NOx:

Cuadro 5. Grado de captación de NOx por los suelos.

Suelo	% de absorción de NOx
Blanco sin bacterias	59,86%
Blanco con bacterias	63,85%
Suelo 1	78,86%
Suelo 2	84,12%
Suelo 3	76,88%
Suelo 4	71,28%

Fuente: CARTIF

Como se ve en los resultados, el suelo de partida ya tiene una buena captación de NOx, aunque tanto las bacterias como los sustratos desarrollados resultan con una mayor capacidad de retención.

Por otro lado, se planteó un procedimiento acelerado para evaluar la evolución del suelo en contacto con aire contaminado a través de su capacidad de captación de óxidos de nitrógeno y también a través de la concentración de nitratos en el suelo. Para ello se diseñaron varios contenedores en los que se situaron los distintos tipos de sustratos desarrollados junto con el blanco con y sin bacterias y se ubicaron en un aparcamiento para simular el aire urbano, este sistema incluía un equipamiento que forzaba el paso de aire del interior del aparcamiento. Se realizó seguimiento mensual de su capacidad de captación de captación de NOx así como de la concentración de nitratos en el suelo.



Figura 22. Imagen de contenedores en aparcamiento subterráneo.

Cuadro 6. Grado de captación de NOx por los suelos en el aparcamiento.

Suelo	% de absorción de NOx
Blanco sin bacterias	55,94%
Blanco con bacterias	68,32%
Suelo 1	84,96%
Suelo 2	81,25%
Suelo 3	87,33%
Suelo 4	83,90%

Fuente: CARTIF

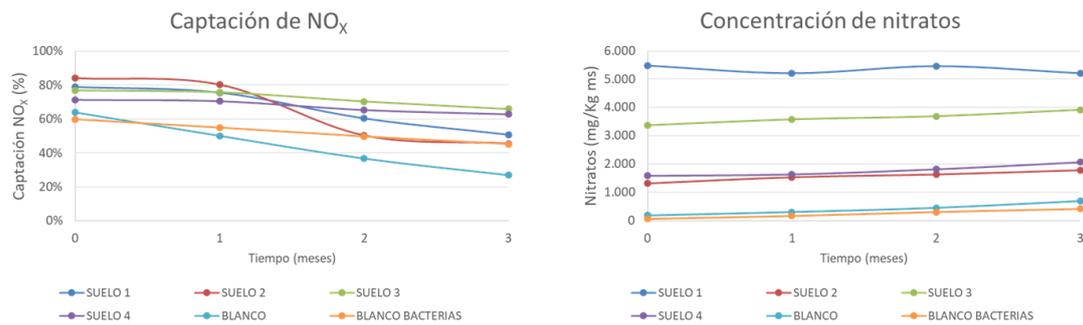


Figura 23. Gráficas de absorción de NO_x y de concentración de nitratos en los diferentes suelos.

Conclusiones

Tras todos estos ensayos, se comprobó que las dos especies de bacterias eran viables tras la encapsulación, que se liberaban de forma progresiva a pH habituales en el suelo, que el peso de las cápsulas se reducía según se incrementaba la temperatura, pero que las bacterias resisten un amplio rango de temperatura sin influir de forma drástica en el número de células viables, que el pH no afecta a la supervivencia por lo que podrían inocularse en suelos a diferentes pH, siendo estables en la mayoría de suelos, aunque la humedad afecta a la conservación de las mismas.

Todo esto unido al mayor crecimiento de las plantas sin necesidad de fertilización y al incremento de retención de óxidos de nitrógeno, concluye que los sustratos desarrollados son viables, funcionales y efectivos.

BIBLIOGRAFIA

- [1] IUSS Working Group WRB: World Reference Base for Soil Resources 2014, Update 2015. World Soil Resources Reports 106, FAO, Rome 2015 World Reference Base for Soil Resources – WRB