Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la Producción de Sulfuro Biogénico para la precipitación de metales pesados

GUTIERREZ R. Alvaro Victor,
TERRAZAS S. Luis Enrique,
ÁLVAREZ A. Maria Teresa

Area de Biotecnología - Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Avda Saavedra 2224,

Universidad Mayor de San Andrés, La Paz - Bolivia

alvarogutierrezrojas@gmail.com

Palabras Clave:
drenajes ácidos de mina, bacterias sulfato reductoras, biorremediación, acidófilas.

Key words:
acid mine drainage, sulfide reducing bacteria, bioremediation, acidophilic.

RESUMEN

Los drenajes ácidos de mina (DAM) están caracterizados por acidez extrema y altas concentraciones de metales pesados y sulfatos. Las bacterias sulfato reductoras (BSR) reducen sulfatos oxidando la materia orgánica para la producción de sulfuro de hidrogeno y bicarbonato. La biorremediación consiste en la precipitación insoluble del sulfuro con los metales pesados y la alcalinización del medio por el bicarbonato.

Se estudiaron muestras de lodo en condiciones acidas provenientes de la región altiplánica a través del establecimiento de columnas de Winogradsky. La zona sulfato reductora fue inoculada en condiciones anaerobias y pH 4 con distintas fuentes de carbono, entre ellas residuos agrícolas. Se establecieron 2 consorcios sulfato reductores acidófilos, capaces de ser aplicados a biorreactores para la producción de sulfuro de hidrogeno en condiciones acidas. El establecimiento de sistemas de biorremediación en dichas condiciones permitirá el tratamiento directo de drenajes ácidos de mina utilizando residuos agrícolas como materia orgánica oxidable.

ABSTRACT

The acid mine drainage (AMD) are characterized for extreme acid and high concentration of heavy metals and sulfate. Sulfate reducing bacteria (SRB) reduce sulfate oxidizing organic matter for production of hydrogen sulfide and bicarbonate. Bioremediation consist in insoluble heavy metal precipitation with sulfide and alkalinizing the environment due to the formation of bicarbonate.

Several sludge samples taken from Bolivian Andean region were studied in acid conditions through the establishment of the Winogradsky column. Sulfate-reducing zone was inoculated in anaerobic conditions and pH 4 with different carbon sources, agricultural wastes among them. Two acidophilic sulphate-reducing consortia were established to be applied in bioreactors for hydrogen sulfide production in

acid conditions. The establishment of bioremediation system in these conditions allows the direct treatment of acid mine drainage using agricultural wastes as oxidized matter.

INTRODUCCION

Durante las actividades mineras y metalurgicas, la generacion de Drenajes Acidos de Mina es extensa en algunos paises del mundo. Los DAM se caracterizan por un pH bajo, grandes concentraciones de metales pesados y sulfatos; afectando el medioambiente severamente[1]. La contaminación por DAM es un problema de gran magnitud. La acidificación y altas concentraciones de metales disueltos en DAM pueden tener un efecto devastador en ecosistemas acuáticos como terrestres por la disminución de diversas especies.

Procesos de remediacion ambiental basados en la produccion de sulfuro de hidrogeno por BSR, constituyen una alternativa para la remocion de sulfato y la precipitacion de metales pesados [2]. Este bioproceso anaerobico, bien conocido en biotecnologia ambiental, esta basado en la interaccion entre donadores de electrones tales como compuestos organicos (fuentes de carbono), y como aceptor final de electrones al sulfato, para la produccion de sulfuro atraves de la ruta desasimilatoria de sulfato[2]. El sulfuro reacciona con los metales disueltos formando precipitados de sulfuro de metal, y logrando tambien la neutralizacion del agua por produccion alcalina de la oxidacion del donador de electrones en bicarbonato [2].

Las BSR son anaerobias y utilizan iones de sulfato como un aceptor final de electrones para el metabolismo de sustratos orgánicos (Ecuación No. 1). Aunque una pequeña cantidad de azufre en forma reducida es asimilada por la bacteria, pero en mayor cantidad es liberado como ión sulfuro, el mismo que se combina con metales pesados divalentes presentes en el (Ecuación No. 2) [3].

$$2CH3CHOHCOO\text{-} + SO4 \longrightarrow 2CH3COO\text{-} + 2CHOO\text{-} + H2S$$

$$Me + H2S \longrightarrow Me + 2H \qquad (2)$$

En la actualidad, tiene mayor interés el uso de piscinas de precipitación naturales o artificiales que utilizan el proceso biológico de la reducción de sulfatos, debido a que este método es generalmente de bajo costo y de bajo mantenimiento técnico [4]. Sin embargo se precisa tener consorcios microbianos capaces de soportar condiciones acidas (acidófilos), presentes en los DAM.

Bacterias capaces de producir sulfuro pueden utilizar macromoléculas o productos de fermentación de materia orgánica como donador de electrones. Los residuos celulosicos/hemicelulosicos y ácidos grasos volátiles resultan de la degradación de materia orgánica sólida y constituyen en una alternativa para la donación de electrones tradicionalmente empleados. (ej. Etanol, metanol, glicerol, ácido láctico, ácido acético). [2]

La columna de Winogradsky ha sido usada para enriquecer diversos procariotas, tanto aerobios como anaerobios, observando el proceso evolutivo y de adaptación a diferentes ambientes y nutrientes. Una vez establecida la columna se facilita el desarrollo de una serie de comunidades relacionadas con la concentración de oxigeno, nutrientes, pH y luz; comunidades bien visibles por sus diferentes colores. De esta manera se obtienen inóculos listos para cultivo de enriquecimiento y posterior establecimiento de cultivos puros, dependientes de diversos factores tanto físicos (temperatura, pH) como químicos (nutrientes) [5].

El presente trabajo fue llevado a cabo con la finalidad de:

1) Enriquecer las muestras mediante el establecimiento de columnas de Winogradsky, en las cuales se obtuvo una región sulfato reductora en condiciones ácidas.

2) Establecer cultivos batch de consorcios de BSR utilizando diferentes fuentes de carbono en condiciones ácidas para la producción de sulfuro biogénico capaz de precipitar metales pesados.

MATERIALES Y METODOS

Toma de Muestras

Las muestras fueron colectadas de diferentes regiones del altiplano Boliviano, tal y como están descritas en la Tabla No. 1. Estas consistieron en lodo negro o agua, que fueron colectadas en envases plásticos de 200 mL llenados por completo para mantener bajos niveles de oxigeno.

Cultivo de Bacterias Sulfato Reductoras

Columnas de Winogradsky

Para este proceso se utilizo una columna transparente de plástico de 2 L de capacidad. Se

TABLA No. 1

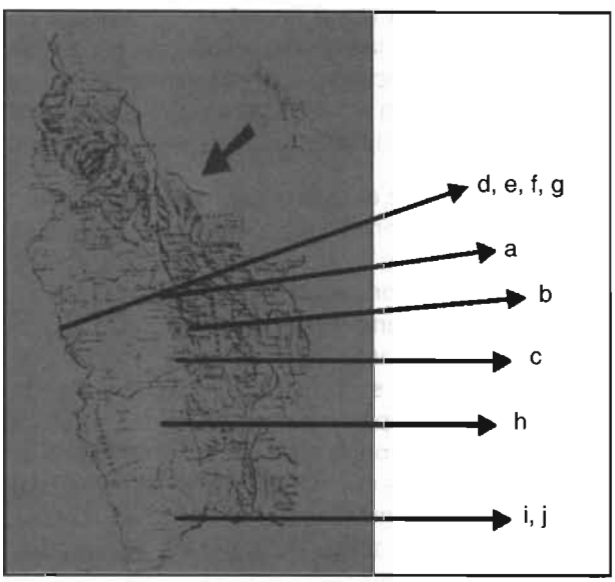
PRODUCCIÓN DE SULFURO DE HIDROGENO POR CONSORCIOS SULFUROGENICOS INOCULADOS A DIFERENTES PH, TEMPERATURAS Y DISTINTAS FUENTES DE CARBONO

Oruro					
Codific Mapa	**Código Muestra**	**Coordenadas**	**Lugar**	**Tipo de muestra**	**pH**
a	LP5	S18º22.792'/W66º57.530'	Pueblo Poopó	agua termal	4
b	CL9	S18º55.889'/W66º46.803'	Challapata	agua termal	4
c	CAF3		Toma Toma	lodo	7
d	SA7	S18º05.330'/W68º58.614'	Sajama	agua - geiser	4
e	MM10	S18º05.840'/W69•01.737'	Sajama	agua - geiser	4
F	SB11	S18º05.330'/W68º58.614'	Sajama	agua - geiser	4
G	LG12	S19º37.469'/W69º34.302;	Sajama	agua - geiser	4
Potosí					
Codific Mapa	**Código Muestra**	**Coordenadas**	**Lugar**	**Tipo de muestra**	**pH**
h	S2	S19º10'31.11"/W67º05'57.03"	Jayukhota	lodo	7
i	Go 1	S20º54'42.71"/W66º13'02.64"	Atocha	agua	9
j	Go 2	S20º54'42.71"/W66º13'02.64"	Atocha	lodo	9

añadió papel higienico como fuente de celulosa en el fondo de la columna para permitir la hidrólisis anaerobia. Posteriormente, se añadió lodo muestra o agua (10 cm), sobrenadante de la centrifugacion de lodo mezclado con una fuente de azufre (sulfato de sodio 32 mM) hasta llenar la columna 5 cm antes del borde, para permitir la transferencia de oxigeno. Finalmente, la columna fue sellada con un film plastico transparente y fue colocada en una zona fresca bien iluminada. El establecimiento de las columnas fue durante un periodo de 5 semanas (Figura No. 2).

FIGURA No. 1

LOCALIZACIÓN GEOGRÁFICA DE LOS PUNTOS DE MUESTREO. REGIÓN ALTIPLÁNICA DE BOLIVIA. CULTIVO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS



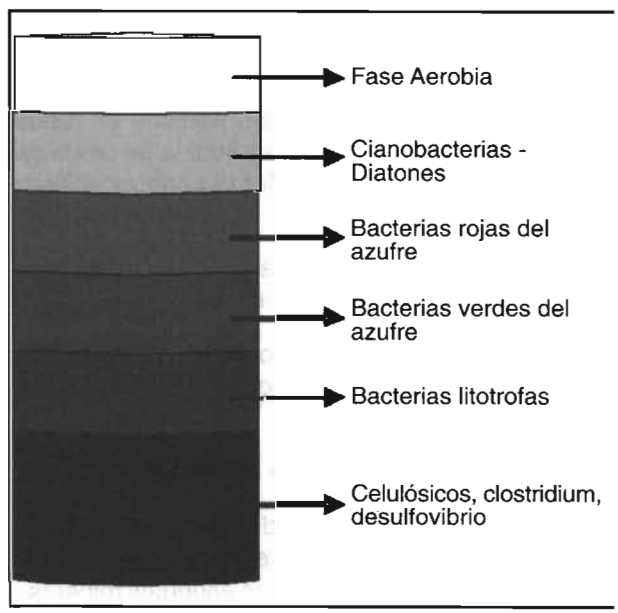
Medios de Cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo para Bacterias Sulfato Reductoras.

Postgate C modificado: 0.5 g KH_2PO_4, 4.5 g Na_2SO_4, 1 g NH_4Cl, 0.06 g $MgSO^4•7H_2O$, 0.06 g $CaCl_2•6H_2O$, 0.3 g citrato de sodio, 0.004 g $FeSO_4•7H_2O$, H_2O destilada c.s.p. 1L [10].

FIGURA No. 2

DISTRIBUCIÓN DE ESTRATOS MICROBIANOS EN LA COLUMNA DE WINOGRADSKY. LA PARTE PROFUNDA CORRESPONDE AL DESARROLLO DE ECOSISTEMAS SULFATO REDUCTORES



Pfennig modificado: Solucion 1: 3 g Na SO_4, 1.2 g NaCl, 0.3 g KCl, 0.4 g MgCl, 0.3 g NH_4Cl, 0.2 g KH_2PO_4, 0.15 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, H_2O destilada 970mL. Solucion 2: 1.5 g $FeCl_2 \cdot 4H_2O$, 60 mg H_3BO_3, HCl (25%) 6.5 mL, 120 mg $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 70 mg $ZnCl^2$, 15 mg $CuCl^2 \cdot 2H_2O$, H_2O destilada 993mL. Solucion 3: 3 mg Na^2SeO_3, 0.5 g NaOH, H_2O destilada 1L. Solucion 4: 8.5 g $NaHCO_3$, H_2O destilada 100 mL. El medio consiste en 970mL de la solucion 1, 1mL de solucion 2, 1mL de solucion 3 y 30mL de solucion 4 [10].

Tanto al medio Pfennig como al Postgate se añadio solucion de vitaminas al 0,1% y cisteina 0,1% en condiciones anoxicas.

Aislamiento Primario

Cultivos batch en viales de 100 ml fueron establecidos en condiciones anaerobicas utilizando nitrógeno libre de oxigeno, cerradas con tapones de goma y anillas de aluminio. Se probaron diferentes fuentes de carbono, a diferente pH con cada una de las muestras.

Se utilizó celulosa (papel higienico 28,5 g/L), metanol (1%), etanol (1%), glicerol (1%), ac lactico (1%), ac acetico (1%) y acidos grasos volatiles totales (AGVTs, 1.5 mM), como fuentes de carbono para cada una de las muestras ensayadas (inoculadas al 2 %) y se establecieron los cultivos anaerobicos a temperatura ambiente (14-19 ºC) y 37 ºC por el lapso de 1 mes.

Aislamiento Secundario

Cultivo en tubos Roller - Cultivo bifásico - Aislamiento en placa

Se establecieron cultivos sólidos en tubos Roller, donde el agar contiene al inoculo y se solidifica en las paredes del tubo.

Los cultivos bifasicos fueron preparados en tubos con un lecho de agar y una fase liquida de caldo de cultivo, este ultimo para facilitar el enriquecimiento de la muestra.

El aislamiento en placa fue establecido en jarras Gas Pack con atmosfera saturada de CO_2.

En todos los casos se utilizo el medio Postgate modificado con la correspondiente fuente de carbono.

Encapsulacion en perlas de agar-agar

La Encapsulación en perlas de agar-agar permite proteger a las bacterias del pH extremo (condiciones acidas) que puedan presentar los efluentes mineros. Se procedió a mezclar una dilucion de la suspensión bacteria con agar-agar (3.3% mantenido a 45 ºC) en una proporcion de 4:6. La mezcla fue dispersada con una jeringa (aguja 27G) sobre vaselina liquida en baño de hielo.

Determinaciones analíticas

Determinación de sulfuro

La determinación de sulfuro se realizo por dos métodos uno cualitativo y otro cuantitativo:

Ensayo en acetato de plomo. Es un ensayo cualitativo para la producción de sulfuro. Papel filtro fue humedecido en una solución de acetato de plomo, la fase gaseosa fue tomada empleando una jeringa y esparcida sobre el papel filtro embebido en acetato de plomo, en el cual presenta una coloración marrón metálica que nos indica la presencia de sulfuro de plomo [2].

Método Turbidimetrico. El sulfuro disuelto en el medio de cultivo fue medido empleando el metodo turbidimetrico reportado por Cord Ruwisch [9], que se basa en la precipitación de sulfuro de cobre.

RESULTADOS Y DISCUSION

Para las columnas de Winogradsky se utilizaron muestras provenientes de la región de Poopo, estas columnas fueron incubadas a temperatura ambiente por un periodo de cinco semanas aproximadamente, en las cuales se observó la separación por fases, en la que la parte inferior pertenece a la región sulfato reductora (color negro). De ésta última se tomo una muestra y se la repico en los medios Postgate y Pfennig con diferentes fuentes de carbono. La Figura No. 3 muestra el desarrollo de los micro-ecosistemas en las columnas. Se puede evidenciar la diferencia de color y claramente la parte profunda demuestra actividad sulfato reductora por la formación de precipitado negro de sulfuro ferroso.

En la Tabla No. 1 se detalla la produccion de sulfuro de hidrogeno por consorcios crecidos en diferentes medios de cultivo. Los consorcios SA7 y Go2 presentaron una concentración alta de sulfuro en etanol y glicerol como fuentes de carbono a pHs extremos. Sin embargo es importante resaltar que la produccion de sulfuro de hidrogeno por el consorcio MM10 a partir de la utilización de AGVs como fuente de carbono a un pH de 4, favoreceria el futuro establecimiento de sistemas de remediación de metales pesados en DAMs aprovechando el proceso de digestión anaerobica

FIGURA No. 3
ENRIQUECIMIENTO EN COLUMNAS DE WINOGRASKY, DIA 1 (ARRIBA), HASTA SU CRECIMIENTO DIA 32 (ABAJO)

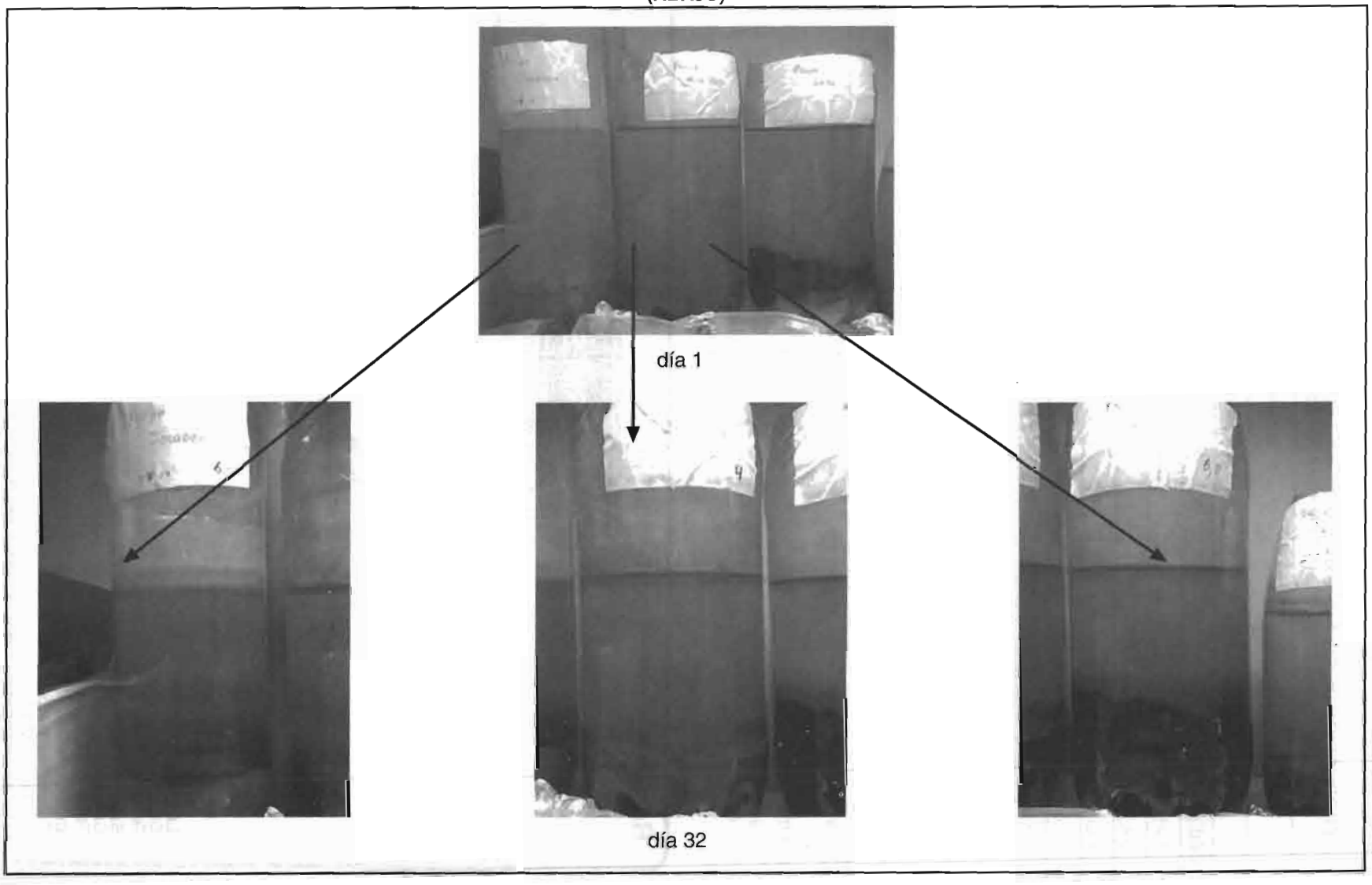


TABLA No. 2
PRODUCCION DE SULFURO DE HIDROGENO POR CONSORCIOS SULFUREGENICOS INOCULADOS A DIFERENTES pH, TEMPERATURAS Y DISTINTAS FUENTES DE CARBONO.

			Producción de Sulfuro de hidrógeno mM						
			Condiciones de cultivo						
Código	pH	Tº	Etanol	Metanol	Glicerol	AGVs	A. Láctico	A. Acético	Celulosa
LP5	4	Amb	1.48	1.37	1.62	1.19	-	-	-
SA7	4	Amb	20.44	-	4.48	1.81	-	-	-
CL9	4	Amb	3	1.16	1.02	1.61	1.74	0.76	-
M10	4	Amb	1.48	3.55	2.25	4.52	0.80	0.68	-
SB11	4	Amb	0.33	0.53	0.23	0.71	-	-	-
LG12	4	Amb	3.95	3.34	0.58	-	-	-	-
Go1	9	Amb	8.70	1.16	1.08	-	-	-	-
Go2	9	Amb	17.24	1.59	-	3.93	-	-	-
S2	7	30º C	-	1.56	-	-	-	-	-
CAF3	7	30º C	-	1.74	-	-	-	-	-

(*) Los consorcios fueron crecidos en medio Postgate C modificado con solución de vitaminas.

de la materia organica (residuos solidos municipales y/o agrícolas) [2]. Sin embargo el hecho de utilizar vitaminas en el medio encareceria el sistema de biorremediacion.

En la Tabla No. 2 se muestra que en el medio Pfennig se presenta concentraciones de sulfuro de hidrogeno que pueden ser aprovechadas principalmente en celulosa por los consorcios Soc

Representantes para Bolivia:

CORMESA LTDA.
CORPORACION MERCANTIL SUDAMERICANA LTDA.

Opsohn Therapeutics Ltda.
ROTTAPHARM S.p.A.
LABORATORIOS OPHIA Excelencia en Oftálmicos
Abeefe Bristol-Myers Squibb
CRAVERI
AMEUPlus Jeringas y Cánulas de Easy Grip
novo nordisk
Pharmacia
Le Roy Especialista en vendajes
MEDITEC S.A. Equipos Médico - Quirurgicos
seca Precisión para la salud
inmed

LA PAZ: CORMESA LTDA.
Calle Montevideo No. 130 - Edif. Requima 3er. y 4to. Piso
Teléfonos: 2440425 - 2442481 - 2440536 • Fax: 2440446

SANTA CRUZ: CORMESA LTDA.
Calle Bolívar No. 27 Shopping Bolívar Local No. 216 2do. Piso
Telf. Fax: 3398530

COCHABAMBA: CORMESA LTDA.
Calle Ismael Céspedes No. 1138 Zona Norte - Hipódromo
Teléfono 4422201

TARIJA: Dist. Antonio Palma
Calle Ingavi No. 455 • Teléfono 6642146

SUCRE: Dist. León
Av. Germán Mendoza No. 12
Barrio Bancario esq. Fernando Mercy • Teléfono 6455506

ORURO: ...

POTOSI: ...

TABLA No. 3

PRODUCCION DE SULFURO DE HIDROGENO A PARTIR DE REPIQUES EFECTUADOS DE COLUMNAS WINOGRADSKY EN MEDIO PFENNIG Y POSTGATE CON DIFERENTES FUENTES DE CARBONO.

			Producción de Sulfuro de hidrógeno mM						
			Condiciones de cultivo/ Medio Pfennig						
Código	pH	Tº	Etanol	Metanol	Glicerol	AGVs	A. Láctico	A. Acético	Celulosa
Soc	6	Amb	1.33	1.13	5.06	3.04	1.19	1.09	3.87
Lodo	6	Amb	10.35	1.26	-	2.18	-	-	1.74
Mr	4	Amb	1.58	1.92	1.22	2.28	1.20	1.20	6.61
			Producción de Sulfuro de hidrógeno mM						
			Condiciones de cultivo/ Medio Postgate						
Código	pH	Tº	Etanol	Metanol	Glicerol	AGVs	A. Láctico	A. Acético	Celulosa
Soc	6	Amb	6.42	0.75	3.01	3.37	0.58	1.82	1.82
Lodo	6	Amb	5.93	1.00	1.25	4.13	0.56	3.32	3.33
Mr	4	Amb	0.42	0.45	0.42	2.43	0.84	3.02	3.02

(*) Soc, Lodo Y Mr son muestras colectadas del pueblo Poopó, Oruro.

a pH 6 y Mr a pH 4, ya que representa una fuente de carbono económica para el proceso de biorremediación, pero teniendo como desventaja que la composición de este medio por si solo encarece el proceso. De igual manera pueden ser aprovechables los AGVs, los mismos que pueden ser obtenidos a partir de la digestión anaeróbica de la materia orgánica. En este sentido, el consorcio Soc crecido a pH 4 constituye una excelente alternativa para el establecimiento de procesos de remediación en un solo paso.

Por otra parte en el medio Postgate que presenta una menor cantidad de sales puede llegar a abaratar el proceso de biorremediación, así podemos decir que seria muy bien aprovechados los consorcios Lodo (pH6) y Mr (pH4) con celulosa, y Soc y lodo (ambos a pH6) para AGVs, respectivamente.

En ambos medios de cultivo se obtuvo muy buenas concentraciones de sulfuro utilizando como fuente de carbono etanol, pero debemos tomar en cuenta que esta fuente de carbono elevaría los costos para la biorremediación.

Trabajos anteriores muestran concentraciones de 1mM [6] hasta 18mM [2], por lo que nuestra producción de sulfuro se encuentra dentro de concentraciones óptimas para la precipitación de metales pesados.

No se llegaron a aislar cepas de BSR, por lo que se utilizaron directamente los consorcios de BSR, y tomando en cuenta las concentraciones mas altas en cuanto a la producción de sulfuro para proceder a encapsular en perlas de agar-agar.

Conociendo ya estos resultados, se pretende obtener concentraciones mas adecuadas y a la vez optimizar el crecimiento bacteriano. De esta manera se podrían establecer biorreactores en un solo paso que permitan la precipitación eficiente de metales pesados, alcalinizar el pH del efluente y disminuir la concentración de sulfatos del mismo. Asi también se dará protección al consorcio frente a la acidez extrema del DAM, atraves de la encapsulación en perlas de agar-agar, las cuales se encontrarán al interior del biorreactor.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen especialmente el soporte económico recibido de ASDI/SAREC - Suecia en el desarrollo del Proyecto Biodiversidad Microbiana del Lago Poopo y Rio Desaguadero.

Internacional Foundation for Science es también reconocida con gratitud apoyo financiero en la ejecución del presente trabajo.

El apoyo financiero en la formación de "Jóvenes Equipos" del instituto para el desarrollo de la investigación I.R.D (Institut de recherche pour le développement) es también especialmente reconocido.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Barrie J, Biohydrometallurgy and the enviroment: Intimate and important interplay. Hydrometallurgy, 2006; 83: 153-166.

2. Alvarez M. T., Microbial Treatment of heavy metal leachates. Doctoral thesis. Suecia, 2005.

3. Morales T., Dopson M., Athar R., Hertbert R., Analysis of Bacterial Diversity in Acidic Pond Water and Compost After Treatment of Artificial Acid Mine Drainage for Metal Removal. Wiley InterScience, 2005

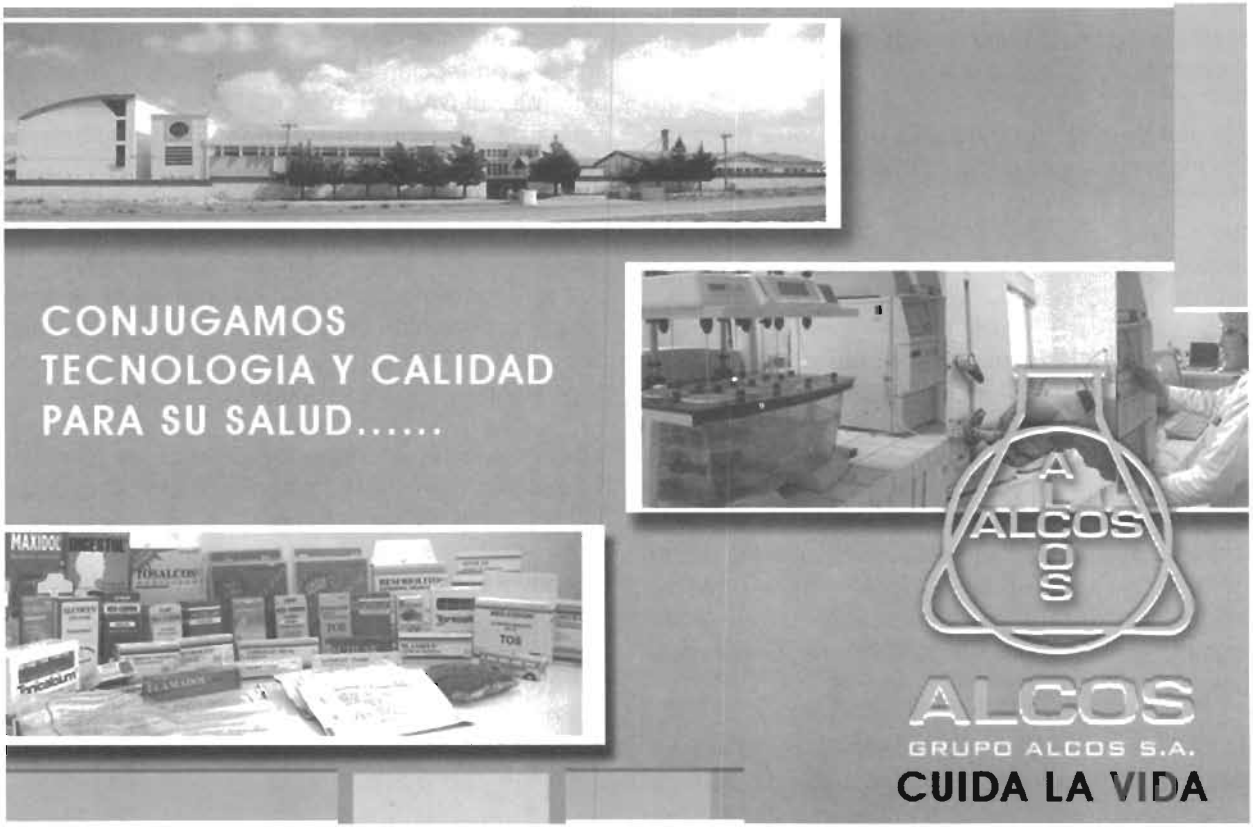
4. Kaksonen A., Plumb J., Franzmann P., Puhakka J., Simple organic electron donors support diverse sulfate-reducing communities in fluidized-bed reactors treating acid metal-and sulfate-containing wastewater, FEMS Micribiology Ecology, 2004; 47: 279-289.

5. Madigan, Martinko, Parker, Biology of Microorganisms, 9ª edicion, ED. Prentice Hall, USA, 2000.

6. Phillip E, Santo R., David C., Growth of Sulfate-Reducing Bacteria Under Acidic Conditions in an Upflow Anaerobic Bioreactor as a Treatment System for Acid Mine Drainage. Wat. Res., 1998; 32 (12): 3724 -3730.

7. Hallberg K, Johnson B, Novel Acidophiles isolated from moderately acidic mine drainage waters, Hydrometallurgy, 2003;71: 139-148.

8. Pruden A., Messner N., Pereyra L., Hanson R.E., Hiibel S.R., Reardon K.F., The effect of inoculum on the performance of sulfate-reducing columns treating heavy metal contaminated water, Water Research, 2007; 41: 901-911.

9. Cord R, A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfates-reducing bacteria, J. Microbial Method, 1985; 4: 33-36.

10. Widdel F., Bak F., The prokariotes, 2a ed. New York, Springer-Verlag, 1992.