

Cultivo a escala de laboratorio de bacterias sulfato reductoras acidófilas y su aplicación en procesos de biorremediación utilizadas para la precipitación de metales pesados

Lab-scale culture of acidophilic sulfate reducing bacteria and applications for heavy metal precipitation

Alvaro Victor Gutierrez Rojas¹, Luis Enrique Terrazas Siles¹, Maria Teresa Álvarez Aliaga^{1,2}

¹Área de Biotecnología, Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. La Paz, Bolivia.

²Department of Biotechnology, Lund University. SE-221 00 Lund, Sweden.

Dirección para correspondencia: Alvaro Gutierrez Rojas. Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés. Av. Saavedra N° 2224, Miraflores. La Paz, Bolivia.

E mail: alvarogutierrezrojas@gmail.com

Recibido para publicación en 31/07/09

Aceptado en 15/10/09

RESUMEN

En el mundo uno de los mayores contaminantes para el medio ambiente son los drenajes ácidos de mina (DAM), los cuales están caracterizados por presentar elevadas concentraciones de metales pesados, sulfatos que contribuyen a la acidez del efluente. El presente trabajo está enfocado a la remediación de dichos efluentes, empleando bacterias sulfato reductoras (BSR), que utilizan como fuente de carbono papel en desuso y ácidos grasos volátiles (AGV). Cultivos en batch presentaron concentraciones de sulfuro de hidrogeno mayores a 10mM, de los cuales se utilizó la mejor concentración para cada soporte, llevando estos a cultivo continuo y obteniendo concentraciones de sulfuro de hidrógeno constantes, cercanas a 3mM para una primera etapa que consistió en la utilización de medio Postgate C modificado. En una segunda etapa se utilizó un mix 1:1 de medio Postgate C

modificado y el efluente a tratar, obteniendo una producción de sulfuro de hidrogeno alrededor de 7mM para el mejor soporte que resultó ser papel.

Palabras Clave: bacterias sulfato reductoras, drenajes ácidos de mina, biorreactores, bioprecipitación.

ABSTRACT

Around the world one of the most environmental pollutants are the acid mine drainage (AMD), characterized by high heavy metals and sulfate concentrations. Our focusing in this work was the effluent remediation, using sulfate reducing bacteria (SRB) that use recycled paper and volatile fatty acids (VFA) like carbon sources. The batch cultures showed over 10mM of hydrogen sulfide production. The best batch concentration for each support were selected, carrying this cultures to bioreactors. In the first step using a modified Postgate C media near 3mM of hydrogen sulfide

was achieved. In a second step a mixed of the modified Postgate C media with the effluent to treat (1:1), the production of hydrogen sulfide was improved around 7mM. Showing that the best support it was letter paper.

Key Words: sulfate reducing bacteria, acid mine drainage, bioreactor, bioprecipitation.

INTRODUCCIÓN

Desde los tiempos de la colonia, Bolivia ha sido un país minero. Por décadas, el cerro rico de Potosí ha sido el yacimiento de minerales de plata más importante del mundo. Su descubrimiento en 1545 inicia el ciclo de la minería en el territorio que hoy constituye Bolivia. La minería colonial inicia un circuito económico en el cual el transporte y el comercio asumen un rol determinante¹. El grado de contaminación minera en Bolivia puede ser clasificado en mediana y pequeña escala. Los compuestos inorgánicos extraídos son zinc, oro, plata, estaño, plomo y boratos.

Los Drenajes Ácidos de Mina (DAM) son producidos por la oxidación de sulfuros metálicos, tales como pirita (FeS_2), calcopirita (CuFeS_2). Esta es una reacción química natural la cual puede ocurrir cuando los minerales están expuestos al aire y agua². La oxidación de sulfuros metálicos causa la liberación de los metales y la consiguiente producción de ácido sulfúrico. Este proceso puede ocurrir como un proceso climatológico natural de los minerales³.

Existen numerosos métodos para el tratamiento de DAM, pero pocos han sido aplicados⁴. Los métodos más comunes son métodos químicos, como la neutralización, usando cal u otros componentes alcalinos causando la precipitación de metales en forma de óxidos e hidróxidos⁵. Sin embargo estos son procesos caros y los resultados desaparecen a corto tiempo. Aunque la remoción de metales tóxicos de industrias en aguas de desecho ha sido practicada por varias décadas, éstas tienen sus limitaciones debido al costo en el proceso físico-químico comúnmente usado. Otra

desventaja es el uso de reactivos agresivos y contaminantes, siendo ente un proceso enemigo del medio ambiente. Esto especialmente cuando la remediación de DAM y otras industrias contaminantes son el blanco de estos procesos⁶.

Los tratamientos biológicos utilizados para la remoción de metales en aguas de desecho son: Bioadsorción, Captación y Acumulación Intracelular, Complejación, Oxidación, Reducción, Metilación, Volatilización y Precipitación extracelular⁷. Este último está dado por consorcios de Bacterias Sulfato Reductoras (BSR), las cuales llegan a producir en su metabolismo sulfuro de hidrogeno (H_2S) a través de la reducción de sulfatos presentes en DAM, que tienen la característica de presentar una acidez extrema y una gran cantidad de metales pesados disueltos⁸.

El presente trabajo constituye una propuesta en el tratamiento de drenajes ácido de mina, mediante la bioprecipitación, utilizando consorcios de bacterias sulfato reductoras acidófilas, las cuales llegan a soportar la acidez extrema del efluente. Para proporcionar una mayor resistencia a esta acidez se han utilizado diferentes soportes, los cuales proporcionan una protección aun mayor a los consorcios de BSR, cuando éstas son expuestas a un pH inferior al cual crecen normalmente.

MATERIAL Y MÉTODOS

Toma de muestras. Las muestras fueron colectadas de la región altiplánica de Bolivia, departamento de Oruro, mina Machacamarquita. Las cuales consistieron de lodo y agua del mismo efluente, manteniéndolos en envases de plástico llenas hasta el tope para evitar el ingreso de aire.

Cultivo de Bacteria Sulfato Reductoras. Enriquecimiento y cultivo. Dichos consorcios de BSR fueron enriquecidos previamente en columnas de Winogradsky⁹, y posteriormente cultivados en viales en diferentes soportes y fuentes de carbono (Tabla 1).

Tabla 1. Distribución de soportes y fuentes de carbono

Soporte	Fuente de Carbono			
	PB	PH	PHP	AGV
PB	X	X	X	
PH	X	X	X	
PHP	X	X	X	
Piedra pomes				X
Ceramica				X
Yute				X
Agar_Agar				X

PB : papel bond; **PH** :papel higiénico; **PHP**: papel higiénico/periódico; **AGV**: ácidos grasos volátiles

Medios de cultivo. Los consorcios de bacterias sulfato reductoras fueron cultivadas en medio mineral Postgate C modificado 0.5g KH_2PO_4 , 4.5g Na_2SO_4 , 1g NH_4Cl , 0.06g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.06g $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.3g citrato de sodio, 0.004 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2O destilada c.s.p. 1L¹⁰, utilizando como fuente de carbono papel higiénico, papel bond, y un mix de papel higiénico/periódico relación 2:1 (3g/80mL de medio), además de ácidos grasos volátiles (5.96 g/L) obtenidos a partir del consorcio hidrolítico TACANA (muestra colectada del norte del departamento de La Paz habitada por la etnia Tacana) a partir de frutas, llegando a utilizar 15.1mL/L¹¹.

Perlas de agar-agar. Para la encapsulación en perlas de agar-agar, se puso un recipiente de vidrio con hielo sobre un agitador magnético, dentro de este recipiente se encontraba un vaso de precipitado que contenía vaselina líquida con el consorcio de BSR en agitación constante, se utilizó agar-agar al 3% y por goteo se formaron las perlas de agar-agar, posteriormente se procedió a retirar las perlas de agar-agar y realizar un lavado con agua destilada hasta remover el exceso de vaselina líquida presente¹².

Cultivo en Batch. El cultivo en batch se realizó en viales de 100mL, los cuales fueron establecidos en condiciones anaeróbicas utilizando nitrógeno libre de oxígeno, cerradas con tapones de goma y anillas de aluminio, todas las muestras se cultivaron a pH 4.

Biorreactores. El armado de biorreactores se realizó utilizando botellas de plástico de 600mL, las cuales fueron llenadas con los soportes ya

mencionados (ver Tabla 1) y se procedió a llenarlos con cultivos en batch que se encontraban en fase logarítmica de la curva de crecimiento bacteriano.

Determinaciones analíticas. Determinación de sulfuro. La determinación de sulfuro se realizó cualitativamente y cuantitativamente:

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 plomo⁶.

Método Turbidimétrico. El sulfuro disuelto en el medio de cultivo fue medido empleando el método turbidimétrico reportado por Cord Rudwisch¹³, que se basa en la precipitación de sulfuro de cobre.

Determinación de sulfatos (Método cuantitativo). En un tubo de hemólisis se mezcló 1mL de Reactivo Condicionante y 1mL de la muestra (dilución 1/20), luego se añadió aproximadamente 60mg de cloruro de bario, se mezcló en vortex por 30s, inmediatamente se realizó la lectura en una cubeta a 420nm. Se utilizó como blanco 1mL de Reactivo Condicionante mas 1mL de agua¹⁴.

RESULTADOS

Se llegó a realizar el enriquecimiento en columnas de Winogradsky de los consorcios MM1_08, MM3_08 y MM1_X, los cuales se llevaron a cultivar a partir de la zona sulfato reductora en medio mineral Postgate C modificado, utilizando como fuente de carbono papel higiénico y AGV, llegando a observar y cuantificar el crecimiento de BSR en papel, pero no así cuando se utilizó AGV ambos a pH 4, lo

que indica la necesidad de utilizar soportes, teniendo en cuenta que el papel además de ser fuente de carbono tiene la característica de proteger a los consorcios, se optó por utilizar soportes (Tabla 1). En los cuales se obtuvo producción de sulfuro de hidrógeno, pero no en un mismo lapso de tiempo (Tablas 2, 3, 4), ya que solo el consorcio MM1_X tuvo crecimiento a los 5 días, prolongándose este tiempo para los consorcios MM1_08 y MM3_08.

Tabla 2. Producción de Sulfuro de hidrogeno, utilizando papel como fuente de carbono y soporte.

Muestra	Soporte y fuente de carbono	Sulfuro [mM]
MM1_08	Papel higiénico	8,94
MM3_08	Papel higiénico	13,19
MM1_X	Papel higienico	13,07
MM1_08	Papel bond	13,63
MM3_08	Papel bond	13,17
MM1_X	Papel bond	19,05
MM1_08	Mix	10,91
MM3_08	Mix	17,14
MM1_X	Mix	15,71

Tabla 3. Producción de Sulfuro de hidrogeno, utilizando AGV como fuente de carbono.

Muestra	Soporte	Sufuro [mM]
MM1_08	Ceramica	3,1
MM3_08	Ceramica	7,51
MM1_X	Ceramica	9,51
MM1_08	Piedra pomes	0,7
MM3_08	Piedra pomes	0,61
MM1_X	Piedra pomes	0,9
MM1_08	Yute	0,26
MM3_08	Yute	0,87
MM1_X	Yute	0,61

Tabla 4. Producción de Sulfuro de hidrogeno, utilizando AGV como fuente de carbono.

Muestra	Soporte	Sulfuro[mM]
MM10	Agar-Agar	1,37

Se llegó a utilizar la concentración más alta de sulfuro en cada uno de los experimentos donde se generó concentraciones de sulfuro de hidrogeno de 19.05mM papel bond, 9.51mM cerámica y 1.37mM agar-agar. Seleccionados como mejores soportes y llevados a cultivo continuo en biorreactores.

Los biorreactores utilizados fueron armados calculando el tiempo de duplicación del consorcio bacteriano (MM1_X), el cual se utilizó para los tres biorreactores, por presentar mejor producción de sulfuro y menor tiempo de duplicación (Figura 1).



Figura 1. Biorreactores. Papel como soporte y fuente de carbono (izquierda), cerámica como soporte + AGV como fuente de carbono (centro) y agar-agar como soporte + AGV como fuente de carbono (derecha).

Una vez armados los biorreactores se determinó

la producción de sulfuro y consumo de sulfato (Gráfico 1).

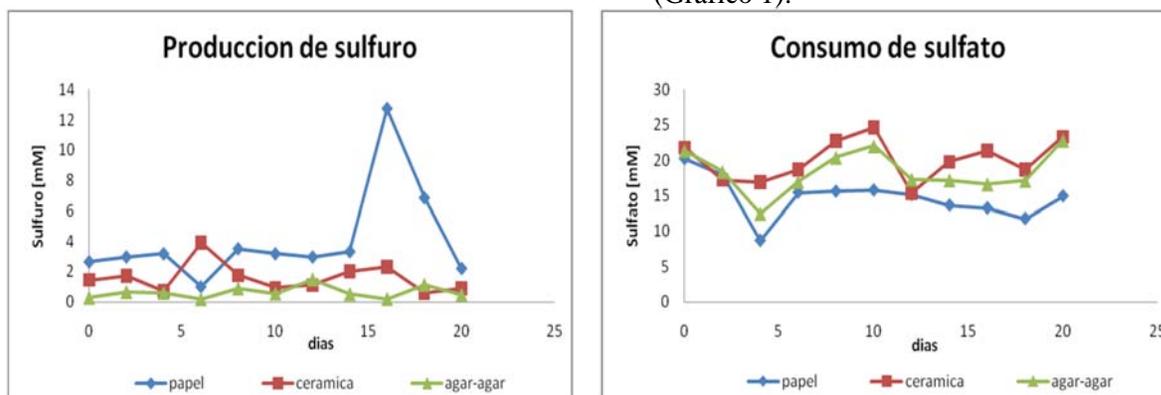


Gráfico 1. Producción de sulfuro y consumo de sulfato en medio Postgate C modificado.

Los niveles de sulfuro presentes en cada uno de los reactores se mantiene constante, mostrando concentraciones mas altas en papel, ésto puede deberse a que tanto la fuente de carbono y el soporte se encuentra juntos, y la bacteria tiene disponibilidad completa de la fuente de carbono. El consumo de sulfato se encuentra correlacionado con la producción de sulfuro teniendo el mayor consumo de sulfato cuando se utiliza como soporte papel.

En una segunda instancia se realizó un mix entre el medio mineral Postgate C modificado y el efluente a tratar 1:1 (recolectado de la región de Antequera-Oruro), en el cual se pudo observar una mejor producción de sulfuro que fue 13.79mM en papel, en relación al primer experimento que fue alrededor de 4-8mM para papel (Grafico 1), con lo que se comprueba que el consorcio de BSR llegó a adaptarse a las condiciones del efluente (Gráfico 2).

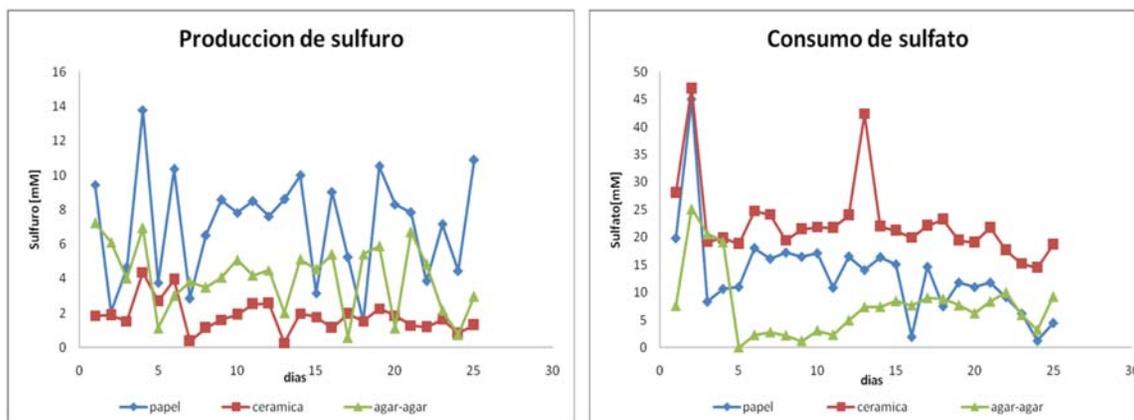
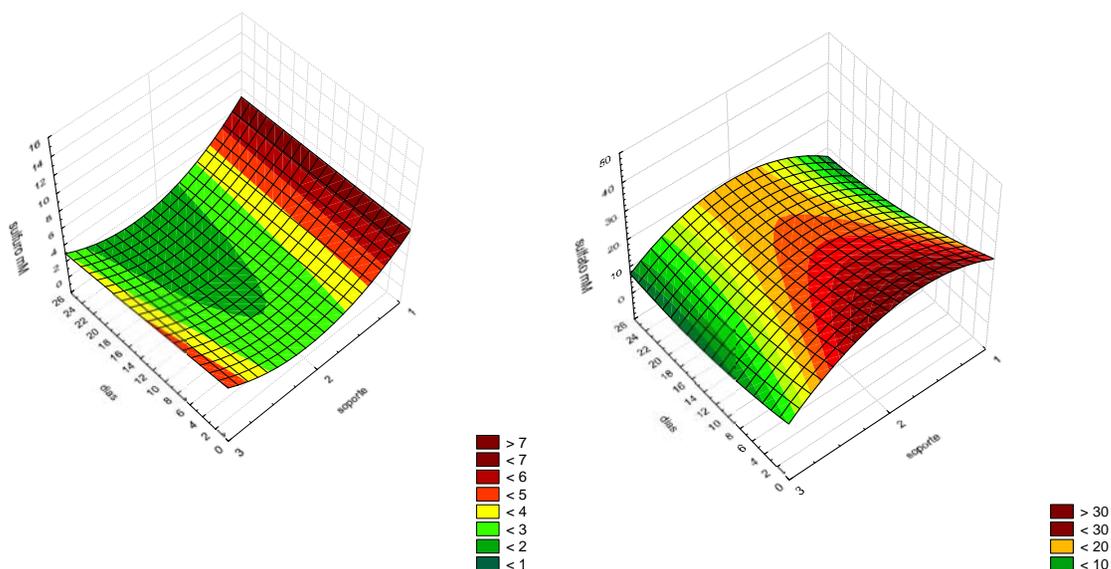


Grafico 2. Produccion de sulfuro y consumo de sulfato en medio Postgate C modificado mezclado con el efluente minero de Antequera.

Los resultados obtenidos mostraron una producción máxima de sulfuro en papel y un consumo mayor de sulfato en agar-agar, demostrando así que el tipo de soporte utilizado llegó a proporcionar protección a los consorcios de BSR.

Así también, como se demuestra en los gráficos estadísticos (Gráfica 3), se encontró una diferencia significativa con un $p < 0.001$ tanto para la producción de sulfuro como para el consumo de sulfato.



Gráfica 3. Resultados estadísticos para sulfuro (izquierda) y sulfato (derecha).

Lo cual nos indica que existe una diferencia significativa entre la producción de sulfuro y consumo de sulfato entre los diferentes tipos de soportes utilizados, teniendo una mayor producción de sulfuro con el soporte papel.

DISCUSIÓN

El crecimiento de Bacteria Sulfato Reductoras está muy limitada a pH bajo ya que se pudo evidenciar el crecimiento de éstas en papel (establecido como soporte), pero no así cuando se utilizó AGV, el cual no presentaba soporte, ambos a pH 4, lo que indica la necesidad de utilizar soportes para proteger BSR en condiciones extremas de pH¹⁵.

La concentración de sulfuro presente en condiciones batch definieron al consorcio y el tipo de soporte a utilizar para el armado de los biorreactores, en los cuales la producción de sulfuro y consumo de sulfato se mantienen en condiciones constantes, y siempre presentándose mejores concentraciones cuando se utiliza papel tanto para la primera etapa como en la segunda etapa donde las concentraciones de sulfuro son mayores, pero encontrándose similares a los niveles ya descritos⁶.

Se pudo notar que la precipitación de metales pesados en condiciones de acidez extrema es posible cuando se utilizan soportes, los cuales proporcionaron protección a consorcios de bacterias sulfato reductoras, notándose que la efectividad en la producción de sulfuro fue mayor cuando se utilizó papel bond tanto para cultivos en batch (19.05mM), como para cultivo continuo (al rededor de 7mM).

AGRADECIMIENTOS

A la cooperación Sueca ASDI/SAREC por el apoyo económico que representa en el proyecto biodiversidad microbiana; a International Foundation for Science (IFS) también por el soporte económico en la ejecución del presente trabajo; al Institut de Recherche pour Developpement (IRD) por el apoyo económico en la Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas.

REERENCIAS

1. Equipo MMSD. Minería, minerales y desarrollo sustentable en América del sur. 2002; International Institute for Environment and Sustainable Development (IIED), World Business

- Council for sustainable Development (WBCSD). Capítulo 4: 137-214.
- Jennings SR, Neuman DR, Blicher PS. Acid Mine Drainage and Effects on Fish Health and Ecology: A Review. Reclamation Research Group Publication, Bozeman, MT, 2008.
 - Gagliano W. Biogeochemical Characterization of a Constructed Wetland for Acid Mine Drainage Treatment. [Doctoral Thesis]. Ohio: The Ohio State University; 2004.
 - Chavez G. Precipitación de metales pesados con sulfuro de hidrogeno biogénico producido a partir de la degradación anaeróbica de material celulósico y xilanósico. [Tesis de Maestría]. La Paz: Universidad Mayor de San Andrés; 2006.
 - Zipper C, Jage C, Passive Treatment of Acid-Mine Drainage with Vertical-Flow Systems. Powell river project . Virginia: Virginia Polytechnic Institute and State University, Virginia Cooperative Extension; 2001. Publication Number 460-133, 1-16.
 - Alvarez MT. Microbial Treatment of heavy metal leachates. [Doctoral Thesis]. Suecia: Media-Tryck; 2005.
 - 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 Microbiology Ecology*, 2004; 47(3): 279-289
 - Koschorreck M. Microbial sulphate reduction at a low pH, *FEMS. Microbiology Ecology*. 2008; 64(3): 329-342.
 - Gutierrez AV, Terrazas E, Alvarez MT. Aislamiento y cultivo de bacterias sulfato reductoras acidófilas para la producción de sulfuro biogénico para la precipitación de metales pesados. *BIOFARBO*, 2007; 15: 5-12.
 - Widdel F. Microbiology and ecology of sulphate-reducing bacteria. In: Zehnder AJB, editor. *Biology of anaerobic microorganisms*. New York: John Wiley & Sons, 1988; 469-585.
 - Buchauer KA. Comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste-water and sludge treatment processes. *Water SA*, 1998; 24(1): 49-56.
 - Gutierrez AV. Enriquecimiento de bacterias sulfato reductoras, aisladas de la región altiplánica de Bolivia, para la producción de sulfuro biogénico en la precipitación de metales pesados. [Tesina de licenciatura]. La Paz: Universidad Mayor e San Andrés; 2008.
 - Cord RA. Quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfates-reducing bacteria. *J. Microbial Method*. 1985; 4: 33-36.
 - Kolmert A, Wikstorm P, Hallberg KB. A fast and simple turbidimetric method for the determination of sulfate in sulfate reducing bacteria cultures. *J of Microbiol Meth*. 2000; 41(3): 179-184.
 - Neculita CM, Zagury GJ, Bussiére B. Passive Treatment of Acid Mine Drainage in Bioreactors using Sulfate-Reducing Bacteria: Critical Review and Research Needs. *J Environ Qual*. 2007; 36: 1-1.