

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICAS

**OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO
DE CONSORCIOS BACTERIANOS SULFATO
REDUCTORES EN LA BIOPRECIPITACIÓN DE FE (II)
DEL AFLUENTE ANTEQUERA, DEPARTAMENTO DE
ORURO, BOLIVIA.**

Elaborado por:

Divia Guardia Zurita

Asesores:

María Teresa Alvarez Aliaga Ph.D

Enrique Terrazas Ph.D

Area:

Biotecnología Microbiana

Tesina para acceder al grado de licenciatura

LA PAZ - BOLIVIA
2010

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción	1
2. Antecedentes	2
3. Marco Teórico	3
1.1 Origen del Drenaje Acido de mina (DAM)	3
1.2 Toxicidad de metales pesados en DAM	4
1.3 Toxicidad de Hierro (II)	6
1.4 Sistemas de Remoción Química	7
1.5 Sistema de Remoción Biológica	8
1.5.1 Material vegetal	8
1.5.2 Diversidad microbiana	10
1.5.2.1 Bioadsorción	11
1.5.2.2 Bioacumulación	12
1.5.2.3 Biomineralización	12
1.5.2.4 Biotransformación	13
1.5.2.5 Quimiosorción mediada por microorganismos	14
1.6 Precipitación de metales pesados por SRBs	14
1.7 Bacterias Sulfato Reductoras	15
1.8 Diversidad de SRB –Taxonomía	16
1.9 Ciclo de azufre	16
1.10 Metabolismo	18
1.11 Sistema de cultivo para producción de H ₂ S	19
1.11.1 Discontinuo (batch)	19
1.11.2 Semicontinuo (feedbatch)	19
1.11.3 Continuo (continuos)	19

1.12	Cultivo continuo en reactor de lecho empacado	21
2	OBJETIVOS	22
2.1	General	22
2.2	Específicos	22
3	Materiales y Métodos	22
3.1	Material Biológico	22
3.2	Material de Desecho	23
3.3	Metodología	23
3.3.1	Determinación de la capacidad de producción de hidrógeno	23
3.3.2	Establecimiento del biorreactor de lecho empacado	23
3.3.3	Sistema de bioprecipitación de Hierro (II)	25
3.4	Determinaciones analíticas	27
3.4.1	Determinación de sulfuro de hidrogeno	27
3.4.1.1	Ensayo en acetato de plomo (Método cualitativo)	27
3.4.1.2	Método Turbidimétrico (Método cuantitativo)	27
3.4.2	Determinación de la concentración de sulfatos (Método cuantitativo)	27
3.4.3	Determinación de metales pesados	27
4	Resultados y Discusiones	28
4.1	Determinación de la capacidad de producción de hidrógeno	28
4.2	Establecimiento del biorreactor de lecho empacado	31
4.3	Sistema de bioprecipitación de Hierro (II)	36
5	Conclusión	37
6	Biliografía	38

TABLA DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras vegetales en las cuales se realizan los procesos de fitoremediación.	8
Figura 2. Humedales artificiales de plantas acuáticas (totora).	10
Figura 3. Mecanismo de interacción entre metales pesados y Microorganismos.	11
Figura 4. Biotransformación en el ciclo biogeoquímico del Mercurio.	13
Figura 5. Ciclo de Azufre.	17
Figura 6. Metabolismo de las Bacterias Sulfato Reductoras	18
Figura 7. Biorreactor vertical de lecho empacado de flujo ascendente.	24
Figura 8. Biorreactor horizontal de lecho empacado.	25
Figura 9. Producción de sulfuro de hidrogeno por el consorcio MM1-08 con las 3 fuentes de carbono y soporte de material celulósico/ hemicelulósico.	29
Figura 10. Producción de sulfuro de hidrogeno por el consorcio MM3-08 Con las 3 fuentes de carbono y soporte de material celulósico/ hemicelulósico.	30
Figura 11. Producción de sulfuro de hidrogeno por el consorcio MM1-X Con las 3 fuentes de carbono y soporte de material celulósico/ hemicelulósico.	30
Figura 12. Producción de Sulfuro de hidrogeno por los diferentes consorcios bacterianos MM1-08; MM3-08; MM1-X.	31
Figura 13. Biorreactor vertical de lecho empacado.	32
Figura 14. Produccion de sulfuro y consumo de sulfato en el biorreactor vertical en medio Postgate C modificado.	33
Figura 15. Producción de sulfuro y consuma de sulfato en el biorreactor vertical con medio Postgate C modificado y el afluente del DAM de Antequera.	34
Figura 16. Biorreactor horizontal de lecho empacado.	34
Figura 17. Produccion de sulfuro y consumo de sulfato del biorreactor de lecho empacado en sentido horizontal.	35

TABLAS

Tabla 1.	Estándares de reglamento primario de agua potable.	5
Tabla 2.	Concentración de hierro (mg / kg) tóxico para la salud humana.	7
Tabla 3.	Procesos utilizados por las plantas para asimilar contaminantes.	9
Tabla 4.	Producción de sulfuro en sistemas de cultivo establecidos con diferentes materiales crudos usados como sustratos	20
Tabla 5.	Producción de Sulfuro de hidrógeno, con sustrato de papel en desuso a pH 4.	28
Tabla 6.	Condiciones de cultivo para el biorreactor de lecho empacado	31
Tabla 7.	Composición del afluente del DAM del río Antequera	36
Tabla 8.	Concentración de hierro en el biorreactor vertical de lecho empacado.	37

***El presente trabajo quiero dedicarlo con mucho
cariño a mi familia especialmente a mis padres por su
apoyo en todo momento, a mi esposo e hija
por estar a mi lado y brindarme todo su amor.***

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Ph.D María Teresa Álvarez Aliaga por su apoyo y enseñanza, y mi eterna gratitud por permitirme realizar este trabajo en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas en el área Biotecnología Microbiana.

Un reconocimiento al Ph.D Enrique Terrazas por su asesoría, dedicación y sus consejos

También quiero agradecer a todos mis compañeros del IIFB quienes me apoyaron y me dieron entusiasmo para seguir adelante.

Resumen

Los Drenajes Ácidos de Mina (DAM) se caracterizan por presentar 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 hidrógeno y bicarbonato. La biorremediación consiste en la precipitación insoluble del sulfuro de hidrógeno con los metales pesados y la alcalinización del medio por el bicarbonato.

En el presente trabajo de investigación, se realizó la optimización de cultivos de consorcios bacterianos sulfatos reductores provenientes de la región altiplánica de Bolivia; con el propósito de producir sulfuro de hidrogeno usado en la precipitación de Hierro II presente en el efluente de Antequera en el departamento de Oruro; Estos fueron inoculados en condiciones anaerobias a un pH4, con distintas fuentes de carbono (material celulósico/hemicelulósico). Se seleccionó el mejor consorcio bacteriano sulfato reductor a ser aplicado en un biorreactor para la producción de sulfuro de hidrógeno.

Posteriormente se realizó una comparación entre un sistema de biorremediación de forma horizontal y otro de forma vertical, establecidas en las mismas condiciones fisicoquímicas que permitió evaluar el mejor sistema de producción de sulfuro de hidrógeno a ser empleado en la descontaminación de metales pesados en el efluente del río Antequera.

1 Introducción

Uno de los problemas ambientales más apremiantes de la industria minera es la generación de drenajes ácidos con contenidos elevados de sulfatos y metales pesados. Existen numerosos métodos para el tratamiento del Drenaje Acido de Mina (DAM); entre ellos tenemos los métodos fisicoquímicos, térmicos y los biológicos.

La efectividad de un método depende de las condiciones hidrológicas, geológicas, solubilidad y especiación de los metales en el sitio de estudio de los procesos de atenuación, inmovilización o migración. Los métodos más comunes son los químicos, como la neutralización usando oxido de calcio (cal), u otros componentes alcalinos causando la precipitación de metales en forma de óxidos e hidróxidos. Sin embargo, este es un proceso caro y la remoción de los contaminantes no es constante; luego de un corto tiempo el problema aparece de nuevo (Chávez, 2006).

Por otro lado, es posible la remoción de los metales pesados presentes en los Drenajes Ácidos de Minas (DAM) mediante procesos biológicos; entre ellos, la precipitación de metales por sulfuro de hidrógeno y la remoción de sulfatos, procesos que son llevados a cabo por bacterias reductoras de sulfato (BSR). El metabolismo de las BSR resulta en la conversión de sulfato a sulfuro, la generación de alcalinidad y la precipitación química de los metales.

Otros 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 extracelular (Kaksonen, 2004). Este último está dado por consorcios de Bacterias Sulfato Reductoras, las cuales llegan a producir en su metabolismo sulfuro de hidrógeno 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 disueltos.

La presente investigación se enfocó en encontrar el mejor consorcio bacteriano productor de sulfuro de hidrógeno para la remoción de metales de soluciones acuosas, utilizando como fuente de carbono y soporte al material celulósico/hemicelulósico que llega a soportar la acidez extrema del efluente y dar una solución a la contaminación con Fe (II).

2 Antecedentes

A mediados de los años 70 nuevos géneros y especies de BRS son mencionados por F.Widdel & N.P.Pfennig en la Universidad de Konstanz (Alemania), describiendo la utilización de nuevas fuentes de carbono, posibles de ser utilizadas por estas bacterias.

También hay que recordar los primeros trabajos de R.L.Starkey (1935) de la Universidad de Rutgers en USA, los realizados por D.D.Mara & D.J.Williams (1971) de la Universidad de Dundee en Escocia, referidos a los diferentes medios de cultivo usados para aislamiento y enumeración de las bacterias.

Procesos de remediación ambiental basados en la producción de sulfuro de hidrógeno por BSR, constituyen una alternativa para la remoción de sulfato y la precipitación de metales pesados (Alvarez, 2005). Este bioproceso anaeróbico, conocido en biotecnología

ambiental, se basa en la interacción entre donadores de electrones tales como compuestos orgánicos (fuentes de carbono), y como aceptor final de electrones al sulfato, para la producción de sulfuro a través de la ruta desasimilatoria de sulfato (Alvarez, 2005).

El uso de bacterias sulfato reductoras acidófilas es de gran interés para realizar este tipo de proceso, ya que los drenajes ácidos de mina tienen un pH entre 2-4 (Bechard *et al.*, 1994). Por lo que, para poder realizar la precipitación en estas condiciones se debe obtener consorcios de bacterias sulfato reductoras capaces de soportar acidez extrema, ya que cuando se introduce DAM de pH 3.5 en el reactor, la actividad metabólica de las BSR decrece (Lyew *et al.*, 1994).

Syutsuo *et al.* (1997) han realizado experimentos exitosos bajo condiciones mesofílicas y termofílicas, obteniendo una eficaz remoción de materia orgánica del 85%. Los UASB "Upflow Anaerobic Sludge Blanket" (Manto de Lodo Anaerobio de Flujo Ascendente), pueden actuar a la vez como tratamiento primario y secundario para manejo de aguas residuales (Lettinga *et al.* 1983).

Lettinga & Hulshoff (1991) describen la formación de un lodo estratificado, en el cual se desarrollan diferentes tipos de poblaciones microbianas que degradan la materia orgánica y generan metano, así como el diseño y operación del reactor que permite la eliminación del gas metano y la recirculación de la biomasa, estos factores han permitido la difusión de los reactores UASB en América Latina desde 1988.

3 Marco Teórico

3.1 Origen del Drenaje Acido de Mina (DAM)

El Drenaje Acido de Mina (DAM) es considerado un problema medioambiental por ser el principal factor contaminante de ríos y lagunas adyacentes a las minas, al contener metales pesados, además el grado de acidez de estas aguas hace que el proceso de oxidación continúe mucho tiempo después de haber finalizado los procesos de lixiviación.

La formación de aguas ácidas en las minas subterráneas, descritas por Nordstrom & Alpers (1999) describen el proceso de oxidación de la pirita; debido a la facilidad con la que el aire entra en contacto con los sulfuros a través de las labores mineras, por los

poros existentes en las Canchas de Desmonte y el contacto de los depósitos de relave con la atmósfera. Los factores que más afectan a la generación ácida son el volumen, la concentración, el tamaño de grano y la distribución espacial de la pirita.

La oxidación de la pirita da lugar a la formación de Fe^{2+} , SO_4^{2-} e H^+ . Esta reacción provoca un incremento de la acidez. Si el ambiente circundante es lo suficientemente oxidante, muchos iones ferrosos se oxidarán a iones férricos. Por encima de un pH 3, el ión férrico formado se precipita mediante hidrólisis como hidróxido, disminuyendo por tanto el Fe^{3+} en solución, mientras que el pH baja simultáneamente. (Estanislao De la Cruz Carrasco, 2006).

3.2 Toxicidad de metales pesados en DAM

La minería vierte una serie de desechos, principalmente aguas residuales no tratadas que llegan a los ríos y sus afluentes, los cuales presentan metales pesados como plomo, mercurio, cadmio, arsénico y cromo que son dañinos para la salud humana, vegetal, animal y para el medio ambiente (Chávez, 2006). Estos metales tienen un elevado peso molecular que se encuentra por encima de los 5 g/cm^3 (Yamamoto & Montero, 2004), los cuales se acumulan en los tejidos dado que no son químicamente ni biológicamente degradables, de ahí su toxicidad.

Como consecuencia de esta bioacumulación, la cadena trófica queda afectada debido a la alta persistencia de metales pesados en el entorno. Según la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos, los rangos de concentración límite de metales pesados son los siguientes: (tabla 1).

Tabla 1. Estándares de reglamento primario de agua potable.

Contaminante	MNMC (mg/L)	NMC (mg/L)	Posibles efectos sobre la salud por exposición que supere el NMC	Fuentes de contaminantes de agua potable
Antimonio	0.006	0.006	Aumenta el colesterol en sangre; descenso de azúcar en sangre	Efluentes de refinerías de petróleo; retardadores de fuego; cerámicas; productos electrónicos; soldaduras.
Arsénico	ninguno	0.05	Lesiones en la piel; trastornos circulatorios; alto riesgo de cáncer.	Erosión de depósitos naturales; aguas de escorrentía de huertos; aguas con residuos de fabricación de vidrio y productos electrónicos.
Bario	2	2	Aumento de presión arterial	Aguas con residuos de perforaciones; efluentes de refinerías de metales; erosión de depósitos naturales
Cadmio	0.005	0.005	Lesiones renales	Corrosión de tubos galvanizados; erosión de depósitos naturales; efluentes de refinerías de metales; líquidos de escorrentía de baterías usadas y de pinturas.
Cromo	0.1	0.1	Dermatitis alérgica	Efluentes de fábricas de acero y papel; erosión de depósitos naturales.
Cobre	1.3	1.3	Exposición a corto plazo; molestias gastrointestinales. Exposición a largo plazo; lesiones hepáticas o renales; aquellos con enfermedad de Wilson deben consultar a su médico si la cantidad de cobre en el agua superara el nivel de acción	Corrección de cañerías en el hogar; erosión de depósitos naturales; percolado de conservantes de madera.
Cianuro	0.2	0.2	Lesiones del sistema nervioso o problemas de tiroides inhibición de la	Efluentes de fábricas de acero y metales; de fábricas de plásticos y

			cadena respiratoria.	fertilizantes.
Hierro	0.35	0.5	Pérdida de líquidos a través del tracto gastrointestinal; Disfunción celular con acidosis láctica y necrosis hemorrágica y perforación.	Aguas con residuos de perforaciones; efluentes de refineries de metales;
Plomo	0	0.0015	Bebes y niños; retardo en desarrollo físico o mental; los niños podrán sufrir leve déficit de atención y de capacidad de aprendizaje. Adultos; trastornos renales; hipertensión	Corrosión de cañerías en el hogar; erosión de depósitos naturales.
Mercurio	0.002	0.002	Lesiones renales	Erosión de depósitos naturales; afluentes de refineries y fábricas; lixiviados de vertederos de tierras de cultivo.

1. Nivel Máximo del Metal Contaminante (MNMC). Es el nivel de un contaminante en el agua potable por debajo del cual no se conoce o no se esperan riesgos para la salud
2. Nivel Máximo del Contaminante (NMC). Es el máximo nivel permitido de un contaminante en agua potable.

Fuente: Agencia de Protección Ambiental, Estados Unidos, Oficina de Agua (4606) EPA 815-f-00-007; 2001

3.3 Toxicidad del Hierro (II)

El hierro es el oligoelemento más abundante en el cuerpo humano. Se halla de 4 a 5 g, distribuidos entre el hierro de reserva (1-1,5 g), hierro funcional (3 g) y hierro circulante, unido a la transferrina (3 mg) (www.estrucplan.com).

A diferencia de otros metales, el exceso de hierro puede ser dañino, porque los iones ferrosos reaccionan con los peróxidos para producir radicales libres, que son muy reactivos y pueden dañar el ADN, las proteínas, los lípidos y otros componentes celulares (Robertson, A. & Tenenbein, 2005). Por lo tanto, la toxicidad se produce cuando hay hierro libre en la célula que no se ha unido a la transferrina. El grado de daño está dado por la dosis tóxica que se encuentra en la sangre (tabla 2).

Tabla 2. Concentración de hierro en mg / kg, tóxico para la salud humana.

	Toxicidad	Dosis tóxica mg / Kg	Lesión
Animales		150 – 200 hierro elemental	Muerte celular
Humanos	Leve	20 mg hierro elemental/kg.	Pérdida de líquidos a través del tracto gastrointestinal
	Moderada	20 – 40 mg hierro elemental	Severa hipovolemia
	Severa	40 – 60 mg hierro elemental	Disfunción celular con acidosis láctica y necrosis.
	Letal	60 mg hierro elemental	Necrosis hemorrágica y perforación

Fuente: Barranco F. *et al*

3.4 Sistemas de Remoción Química

Para el tratamiento de DAM, el proceso convencional es normalmente dividido en dos etapas: neutralización del agua ácida con cal y precipitación de los iones metálicos. La adición de una base es esencial en la formación del hidróxido precipitado y sales de metales.

El ablandamiento con óxido de calcio (cal) es un proceso similar a la coagulación con sales metálicas. La cal (CaO) se hidroliza y reacciona con el ácido carbónico para formar carbonato de calcio, el cual actúa como el agente adsorbente en la remoción de metales (Johnston *et al.*, 2001).

La disposición de residuos sólidos es uno de los mayores problemas que enfrentan los países industrializados. Cientos de miles de toneladas de residuos sólidos se generan anualmente como resultado de la manufactura de diferentes bienes y servicios. Las cenizas volantes pertenecen a este género de contaminantes sólidos, los cuales constituyen un subproducto de los hornos de combustión del carbón. Se ha utilizado una parte de las cenizas de carbón para producir cemento y asfalto y la otra como material de relleno. Sin embargo, estudios recientes hablan sobre las características y virtudes que presenta este tipo de materiales, como adsorbentes e intercambiadores iónicos, a partir de los cuales se pueden sintetizar zeolitas, y emplearlas para la remoción de metales potencialmente tóxicos, como el cromo (John H, 1989).

3.5 Sistema de Remoción Biológica

La industria, y principalmente la minería, ha provocado una gran contaminación de los suelos, ríos y lagunas. Esto afecta de manera drástica al medio ambiente por ello se están buscando formas de eliminar los desechos tóxicos y en especial la remoción de los metales pesados. Actualmente se cuenta con dos tipos de remoción biológica: 1) utilización de material vegetal y 2) utilización de diversidad microbiana.

3.5.1 Material vegetal

Las plantas pueden absorber sustancias contaminantes mediante distintos procesos que se representan en la Figura 1 y se explican en la Tabla 3.

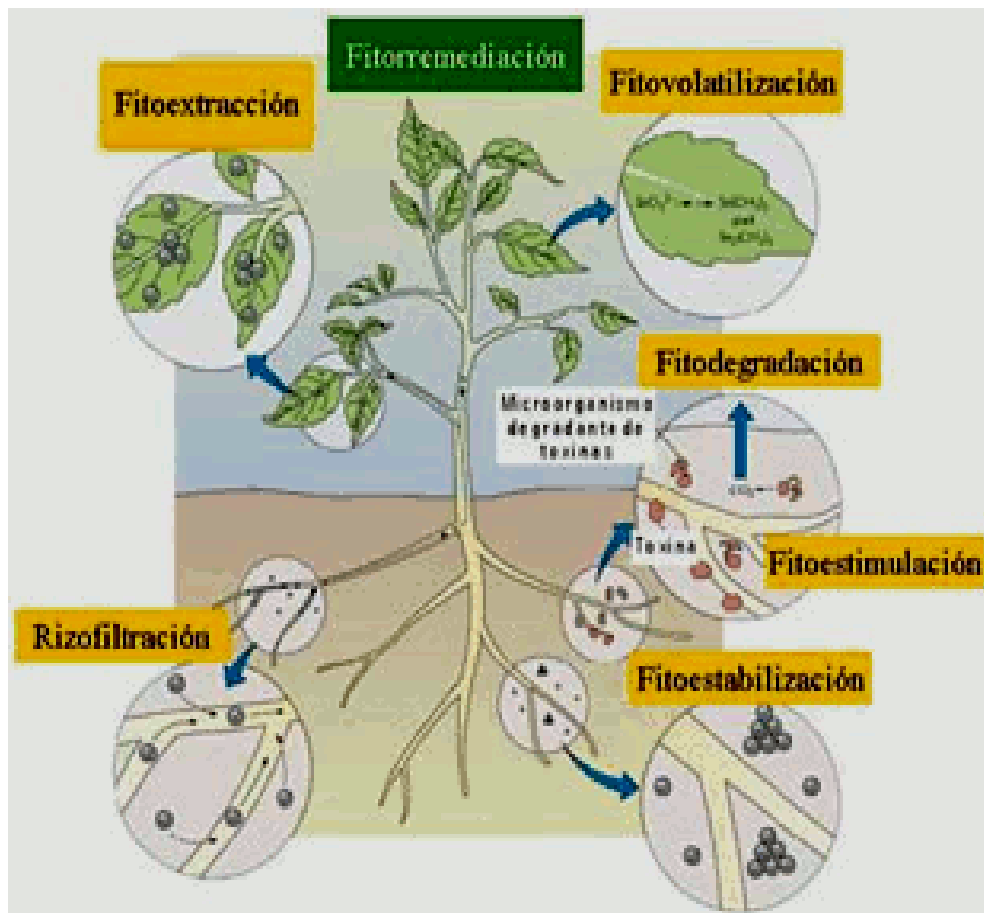


Figura 1. Regiones de las plantas en las cuales se realizan los procesos de fitorremediación.

Fuente: Frers C. 2008

Tabla 3. Procesos utilizados por las plantas para asimilar contaminantes

Tipo	Proceso Involucrado	Contaminación Tratada
Fitoextracción	Las plantas se usan para concentrar metales en las partes cosechables (hojas y raíces)	Cadmio, cobalto, cromo, níquel, mercurio, plomo, plomo selenio, zinc
Rizofiltración	Las raíces de las plantas se usan para absorber, precipitar y concentrar metales pesados a partir de efluentes líquidos contaminados y degradar compuestos orgánicos	Cadmio, cobalto, cromo, níquel, mercurio, plomo, plomo selenio, zinc isótopos radioactivos, compuestos fenólicos
Fitoestabilización	Las plantas tolerantes a metales se usan para reducir la movilidad de los mismos y evitar el pasaje a capas subterráneas o al aire.	Lagunas de deshecho de yacimientos mineros. Propuesto para fenólicos y compuestos clorados.
Fitoestimulación	Se usan los exudados radiculares para promover el desarrollo de microorganismos degradativos (bacterias y hongos)	Hidrocarburos derivados del petróleo y poliaromáticos, benceno, tolueno, atrazina, etc.
Fitovolatilización	Las plantas captan y modifican metales pesados o compuestos orgánicos y los liberan a la atmósfera con la transpiración.	Mercurio, selenio y solventes clorados (tetraclorometano y triclorometano)
Fitodegradación	Las plantas acuáticas y terrestres captan, almacenan y degradan compuestos orgánicos para dar subproductos menos tóxicos o no tóxicos.	Municiones (<u>TNT</u> , <u>DNT</u> , <u>RDX</u> , nitrobenzono, nitrotolueno), atrazina, solventes clorados, <u>DDT</u> , pesticidas fosfatados, fenoles y nitrilos, etc.

En la actualidad se emplean sistemas de remoción con plantas acuáticas, como la lenteja de agua y la totora (Figura 2). Estas plantas se distinguen por la habilidad para derivar el dióxido de carbono y las necesidades de oxígeno de la atmósfera directamente. Las plantas reciben sus nutrientes minerales desde el agua.

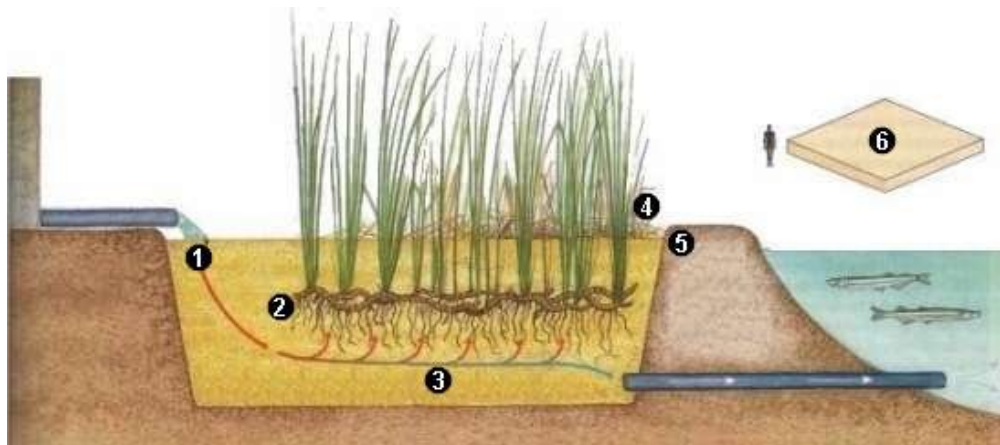


Figura 2. Humedales artificiales de plantas acuáticas (totora)

1. Los desechos cloacales desembocan en el humedal, que es un hueco lleno de arena que funciona como aislante para que los olores no salgan a la superficie.
2. El filtro del humedal consiste en una gran plantación, en este caso de juncos con sus raíces dentro de la arena, que se alimentan del agua.
3. Los nutrientes del agua son absorbidos por los juncos, que los atrapan en sus tejidos y los utilizan para su crecimiento.
4. Los nutrientes absorbidos se eliminan con el cambio de tallo del junco. Esos restos forman una capa aislante.
5. El agua, ya libre de nutrientes, desemboca desde el humedal hacia la laguna.
6. El tamaño del humedal: La superficie necesaria se calcula en base a la cantidad de habitantes de la ciudad que produce los desechos, según la siguiente relación: 1 persona = alrededor de 5 m². (Frers C, 2008)

3.5.2 Diversidad microbiana

La biorremediación utiliza la diversidad genética y la versatilidad metabólica de los microorganismos, para la transformación de contaminantes en productos finales menos peligrosos, los que son incorporados a los ciclos biogeoquímicos naturales.

Se ha encontrado microorganismos resistentes y microorganismos tolerantes a metales. Los resistentes se caracterizan por poseer mecanismos de detoxificación codificados genéticamente, inducidos por la presencia del metal. En cambio, los tolerantes son indiferentes a la presencia o ausencia de metal. (Silver S. & Misra T., 1988)

La resistencia o tolerancia experimentada por microorganismos es posible gracias a la acción de diferentes mecanismos (Figura 3). Estos son la bioadsorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimiosorción mediada por microorganismos.

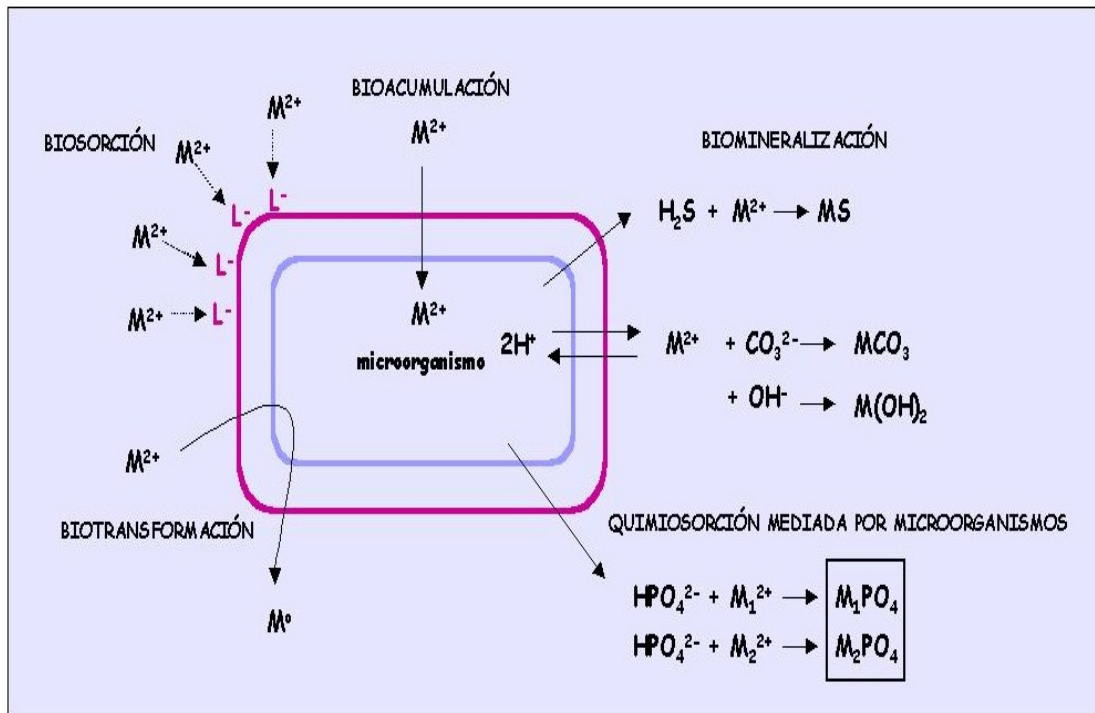


Figura 3. Mecanismo de interacción entre metales pesados y microorganismo

Fuente: Lovley, D.R. (2000).

3.5.2.1 Bioadsorción

Los microorganismos utilizados como bioadsorbentes, retienen los metales pesados a intervalos de tiempo relativamente cortos al entrar en contacto con soluciones de dichos metales.

Los fenómenos de bioadsorción se caracterizan por la retención del metal mediante una interacción fisicoquímica del metal con ligandos pertenecientes a la superficie celular. Esta interacción se produce con grupos funcionales expuestos hacia el exterior celular pertenecientes a partes de moléculas componentes de las paredes celulares (Lebeau T. *et al.*, 2002)

3.5.2.2 Bioacumulación

Este mecanismo celular involucra un sistema de transporte de membrana que internaliza al metal pesado presente en el entorno celular con gasto de energía.

Este consumo energético se genera a través del sistema H⁺-ATPasa. Una vez incorporado el metal pesado al citoplasma, éste es secuestrado por la presencia de proteínas ricas en grupos sulfhídricos llamadas metalotioneínas que pueden ser compartimentalizado dentro de una vacuola, como ocurre en hongos.

Algunos ejemplos de este proceso son muy interesantes, como el caso de acumulación de uranio por la bacteria *Pseudomonas aeruginosa*, el cual fue detectado íntegramente en el citoplasma, al igual que en la levadura *Saccaromyces cerevisiae* (Silver S. & Misra T., 1988).

3.5.2.3 Biomineralización

Los microorganismos son capaces de precipitar metales como carbonatos e hidróxidos, mediante un mecanismo de resistencia codificado en plásmidos. Este mecanismo aparece por el funcionamiento de una bomba que expulsa el metal tóxico presente en el citoplasma hacia el exterior celular en contracorriente a un flujo de H⁺ hacia el interior celular (Gadd G.M., 2000). Esto produce una alcalinización localizada sobre la superficie celular externa y por lo tanto la precipitación del metal pesado (Figura 3.).

Otra forma de precipitar los metales es a través de la formación de sulfuros o fosfatos, como resultado de alguna actividad enzimática celular. Un ejemplo de ello es la precipitación de sulfuros metálicos en reactores con cultivos mixtos de bacterias reductoras de sulfato o la acumulación de CdS en la pared celular de las bacterias *Klebsiella planticola* y *Pseudomonas aeruginosa* (Wang C.L, *et al.*, 1997).

3.5.2.4 Biotransformación

Este es un proceso que involucra un cambio químico sobre el metal pesado, como por ejemplo en el estado de oxidación o metilación. Esta transformación biológica de los metales pesados que resultan tóxicos mediada por enzimas microbianas puede dar como resultado compuestos poco solubles en agua o bien compuestos volátiles (Srinath, T. *et al*, 2002). El ejemplo más claro es el ciclo del Mercurio en la naturaleza, donde la bacteria *Pseudomonas aeruginosa* puede reducir el catión Hg_2^+ a Hg^0 , y otros organismos pueden luego metilarlo dando como producto el CH_3Hg^+ y $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$, que son volátiles y aún más tóxicos que el propio mercurio (Figura 4).

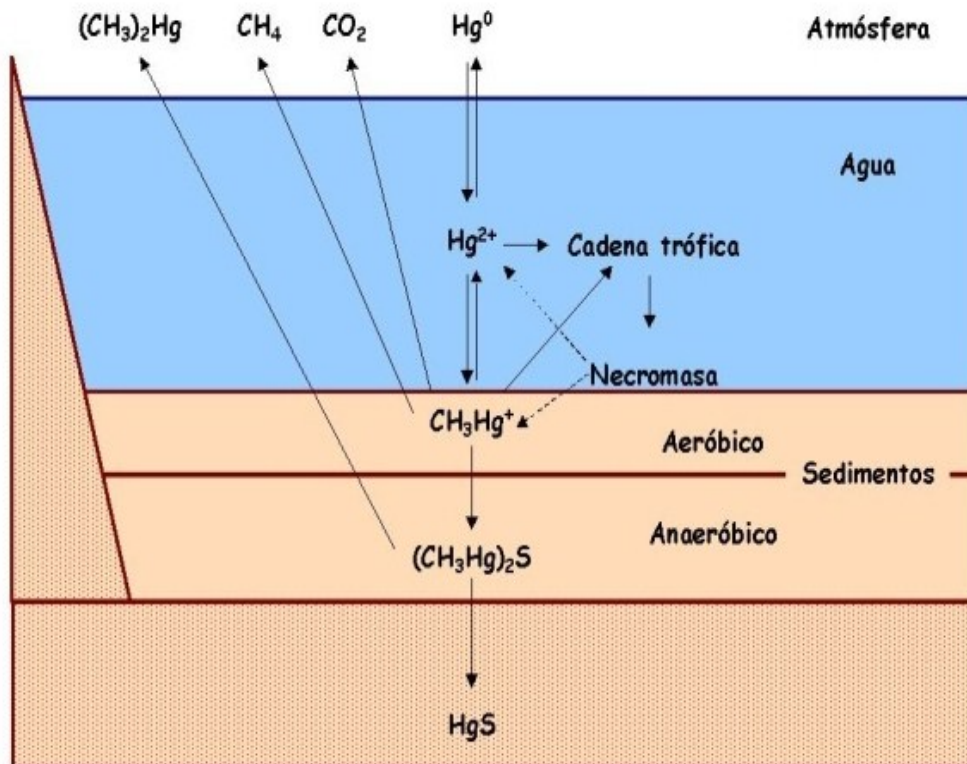


Figura 4. Biotransformación en el ciclo biogeoquímico del Mercurio

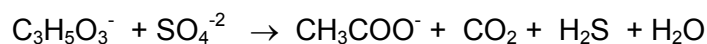
Extraído de: Lovley, D.R. (2000)

3.5.2.5 Quimioabsorción mediada por microorganismos

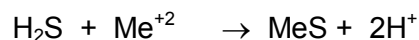
Dentro de este término se pueden describir aquella clase de reacciones en donde los microorganismos biomineralizan un metal, formando un depósito primario. Este depósito primario funciona como núcleo de cristalización, con la subsecuente deposición del metal de interés, promoviendo y acelerando así el mecanismo de mineralización (Figura 3).

Un ejemplo de este proceso es el agregado de Fe (II) en un afluente a tratar, en presencia de bacterias reductoras del sulfato. Estos microorganismos producen sulfuros que precipitan en forma de FeS, sobre la superficie celular. Los otros metales contaminantes utilizan el FeS formado como soporte y cristalizan sobre sus cristales. Luego, aprovechando las propiedades magnéticas del Fe, pueden separarse fácilmente de la fase soluble, descontaminando así el material (Lovley, D.R., 2000)

Para soluciones contaminadas con altas concentraciones de sulfato, se utilizan bacterias anaeróbicas vivas, las que utilizan el sulfato metabólicamente reduciéndolo a sulfuro y precipitando en forma de algún sulfuro metálico. Se utilizan “bacterias sulfato reductoras”, BSR



Sulfuro resultante finalmente es precipitado como sulfuro metálico y separado del sistema.



3.6 Precipitación de metales pesados por SRBs

Durante los últimos años se ha estudiado el uso de bacterias sulfato reductoras como una alternativa para precipitar metales pesados. Estas son capaces de reducir el sulfato a sulfuro (Lens *et al.*, 1998, Lovley & Coates 1997, Barkay & Schaefer 2001).

Las Bacterias Sulfato Reductoras (BSR) son responsables de la producción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) en anaerobiosis a partir de sulfatos y un donador de electrones. El

sulfuro producido se puede utilizar para precipitar metales catiónicos divalentes, permitiendo la biorremediación de efluentes contaminados.

Los sulfuros formados biológicamente forman precipitados altamente insolubles con metales pesados tales como cobre o zinc. Si los iones metálicos de estos precipitados están presentes en una alta concentración, ellos pueden ser recuperados para su reutilización en la industria.

3.7 Bacterias Sulfato Reductoras

Las bacterias sulfato reductoras fueron descubiertas en 1895 por Beijerinck y constituyen un grupo diverso de procariotas, son mayoritariamente microorganismos anoxigénicos estrictos y se consideran los principales agentes productores de sulfuro y degradadores de materia orgánica. La mayoría de las BSR se tiñen como Gram negativas como *desulfovibrio*, siendo el género más encontrado (Boopathy *et al.*, 1998a)

Las BSRs emplean el anión sulfato como aceptor final de electrones y lo biotransforman, por vía desasimilatoria, en sulfuro de hidrógeno. El sulfuro de hidrógeno es un gas ácido soluble en agua, donde se comporta como un ácido fuerte. Este compuesto precipita al combinarse con metales pesados y forma, en la mayoría de los casos, una película negra de sulfuro de hierro (FeS) este es un agente reductor fuerte capaz de inhibir el crecimiento de bacterias aerobias como anaerobias (Gibson, 1990).

Las BSRs además de participar en el ciclo del azufre están involucradas en al biodegradación de hidrocarburos, remoción de metales pesados, tratamientos de aguas residuales, son de interés económico como provocador de corrosión y esencialmente participan en la biorremediación.

3.8 Diversidad de SRB - Taxonomía

Las bacterias reductoras de sulfatos (BRS), constituyen un grupo taxonómicamente muy diversificado aunque con estrechas relaciones fisiológicas y ecológicas.

Las BSR son microorganismos anoxigénicos estrictos y se consideran los principales agentes productores de biocorrosión. Poseen una amplia diversidad filogenética que incluye: bacterias gramnegativas mesofílicas pertenecientes a la división δ -*Proteobacteria*, bacterias gram-positivas formadoras de esporas (bajo contenido G+C), bacterias termofílicas y *Archaea* termofílicas. Dentro de las δ *Proteobacterias* se destacan géneros tales como *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfonema*, *Desulfovibrio*, *Desulfobaculum* y *Desulfosporosinus* (Okabe S., 2003)

Estos microorganismos emplean como fuente de carbono alquilbencenos, *n*-alcanos, xantanos, ácidos grasos y productos orgánicos polares formados por bacterias oxigénicas a partir de hidrocarburos. Otras fuentes de carbono, energía y electrones las constituyen los ácidos grasos volátiles como el lactato y el acetato, hallados naturalmente en pozos de gas natural y petróleo. (J. R. Torrado Rincón, 2008)

3.9 Ciclo de azufre

El azufre se encuentra distribuido en el suelo, aire y en el agua, además es uno de los componentes de las proteínas y vitaminas, este circula a través de la biosfera por los diversos seres vivos como ser las plantas, animales tanto terrestres como acuáticos. (Figura 5). (Brock, 2000)

La mayor parte del azufre en la tierra está ligado a rocas y sales o en las profundidades del océano en sedimentos oceánicos. También puede ser encontrado en la atmósfera. Los recursos naturales como las erupciones volcánicas, procesos bacterianos, evaporación del agua u organismos en deterioro. Cuando el azufre ingresa a la atmósfera a través de la actividad del hombre, esta es principalmente una consecuencia del proceso industrial, donde el dióxido de azufre (SO₂) y sulfuro de hidrogeno (H₂S) como gases se emiten en una escala amplia. (Germán, 1998).

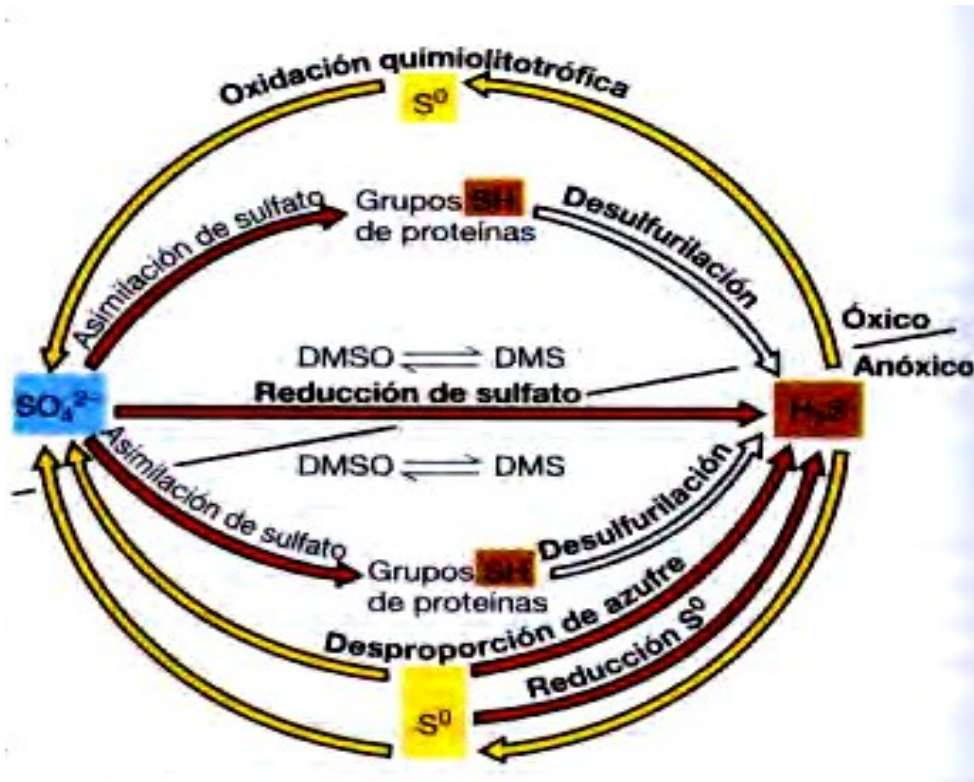


Figura 5. Ciclo del azufre

Fuente: Brock,(2000).

El azufre es absorbido por las plantas en su forma sulfatada, SO₄, es decir en forma aniónica perteneciente a las distintas sales (SO₄ Ca, SO₄ Na₂). El azufre no solo ingresa a la planta a través del sistema radicular sino también por las hojas en forma de gas de SO₂, que se encuentra en la atmósfera, donde se concentra debido a los procesos naturales de descomposición de la materia orgánica, combustión de carburantes y fundición de metales.

Todas estas partículas vuelven a la tierra, o reaccionan con la lluvia y vuelven a la tierra como depósitos ácidos. Las partículas son absorbidas por las plantas nuevamente y el azufre es liberado en la atmósfera, así el ciclo del azufre puede empezar otra vez. (Lenntech, 1998)

3.10 Metabolismo de las SRB

Las BSR son anaerobias estrictas, ampliamente distribuidas en ambientes acuáticos y terrestres, cumplen un importante papel en las etapas finales de la degradación de la materia orgánica, especialmente en la remoción de los sulfatos presentes en el afluente. Pueden crecer en presencia o ausencia de sulfatos, utilizando vías metabólicas diferentes; una fermentativa y la otra oxidativa (Figura 6).

En presencia de sulfatos las BSR compiten con las bacterias metanogénicas (BM) por sustratos comunes como: formiato e hidrógeno, con las bacterias acetogénicas componentes como propionato y butirato. Esto no significa que la metanogénesis y la sulfato reducción sean excluyentes, pues pueden ocurrir simultáneamente cuando el metano se genera a partir del metanol y/o aminas metiladas, sustratos por los cuales las BSR tienen poca afinidad.

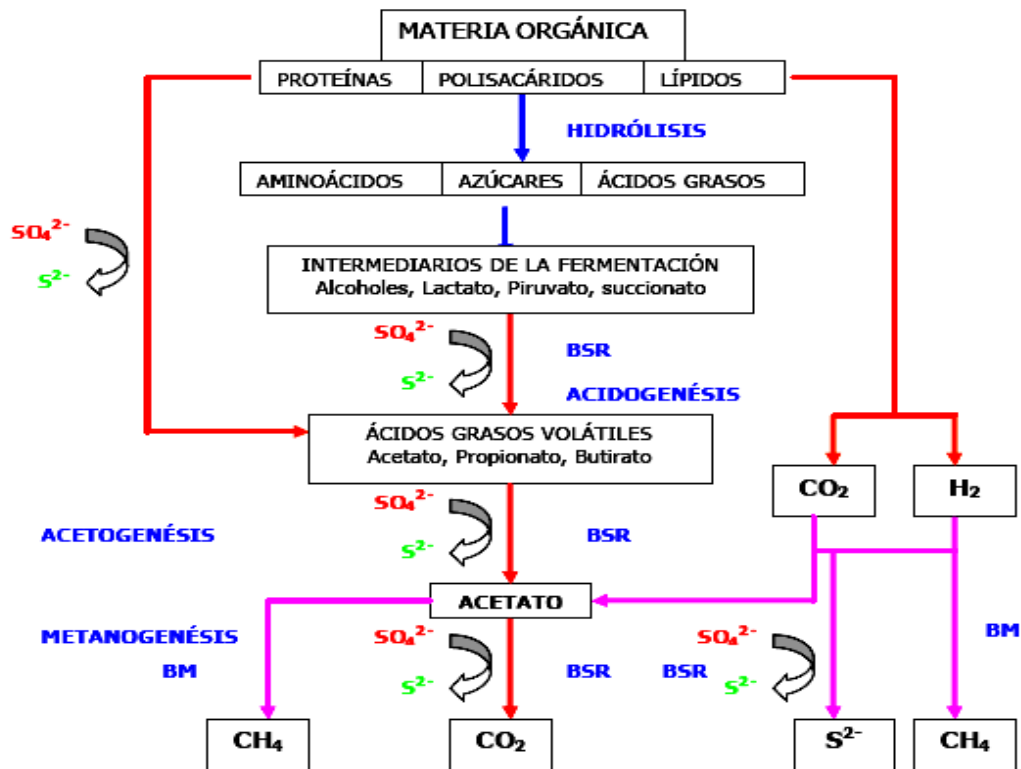


Figura 6. Metabolismo de las Bacterias Sulfato Reductoras

Extraído de : Gibson, 1990

3.11 Sistema de cultivo para producción de H₂S

Un biorreactor es un recipiente donde existe un sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo. Este proceso puede ser aeróbico o anaeróbico. Estos biorreactores son comúnmente cilíndricos, variando en tamaño desde algunos mililitros hasta metros cúbicos.

La finalidad de este es mantener ciertas condiciones ambientales propicias (pH, temperatura, etc.) al elemento que se cultiva (tabla 4). En función de los flujos de entrada y salida, la operación del sistema de un biorreactor puede ser de tres modos distintos:

3.11.1 Discontinuo (batch)

Por lotes o tandas, sin alimentación (F); se coloca dentro del biorreactor la carga total de cada proceso (tanda o lote) de cultivo o fermentación donde se lleva a cabo el proceso productivo o la fermentación por el tiempo que sea necesario; el cual se denomina tiempo de retención.

3.11.2 Semicontinuo (feed batch)

Por lotes alimentados, con alimentación de entrada (F1); se alimenta una línea de entrada o alimentación (F1) para que el sistema de cultivo tenga un producto (biomasa) con máximo de crecimiento (exponencial) y aumente la productividad.

3.11.3 Continuo (continuos)

Por quimioestato, se alimenta una línea de entrada F1 o alimentación y se drena una línea de salida F2 o lavado; de manera que los flujos o caudales de ambas líneas sean iguales y la producción sea continua.

Tabla 4. Producción de sulfuro en sistemas de cultivo establecidos con diferentes materiales crudos usados como sustratos (Álvarez, 2005)

Sistema	Material	SO₄⁺² inicial mM	SO₄⁺² Removido mM	Sulfuro mM	Referencia
Batch	Papel Filtro/ consorcio L1a	31	18	5.4	Álvarez, 2005
Batch	Periódico/ consorcio L1a	31	4	1.6	Álvarez, 2005
Batch	Hojas/ consorcio L1a	31	6	2.7	Álvarez, 2005
Batch	Paja de trigo/ consorcio L1a	31	16	5.1	Álvarez, 2005
Batch	Paja Brava/ consorcio L1a	31	7	2.6	Álvarez, 2005
Batch	Papel Filtro/ consorcio A10 a	31	14	3.7	Álvarez, 2005
Batch	Periódico/ consorcio A 10 a	31	2	0.8	Álvarez, 2005
Batch	Hojas/ consorcio A 10 a	31	5	2.2	Álvarez, 2005
Batch	Paja de trigo/ consorcio A10a	31	18	5.9	Álvarez, 2005
Batch	Paja Brava/ consorcio A 10 a	31	11	2.6	Álvarez, 2005
Biorreactor	Paja de trigo/ consorcio A 10 a	31	5	5	Álvarez, 2005
Biorreactor	Paja de trigo / consorcio A 10 b	46	10	2	Álvarez, 2005
Batch	Aguas residuales, hojas, trozos de madera, excremento de oveja, aserrín, celulosa, sedimento de ríos, piedra caliza, arena	12.5 – 47.9	28.9-30.2	n.a	Waybrant et al 1998
Biorreactor	Abono de champiñones, estiércol, paja, heno, mazorcas de maíz, piedra calizo, yeso	10.4	10.2	0.13	Dvorak et al. 1992
Biorreactor	Alfalfa fresca	10.3	8.6-10	n.a.	Bechard et al. 1994
Columna	Pedazos de roble, abono de hongos, papel y lodo	26.9	26	n.a.	Chang, et al. 2000

^a Pfenning médium ^b Postgate médium n.a : not available.

Los sistemas de los biorreactores pueden ser de una fase o de dos fases. En los de dos fases es necesario diseñar un sistema donde: 1) en la primera parte se produzca el sulfuro de hidrógeno el cual vaya a ser liberado del biorreactor y posteriormente 2) en una segunda fase se una con el afluente contaminado con metales pesados el cual vaya a desembocar en una trampa de precipitación y se obtenga un efluente libre de metales pesados.

En cuanto a sistemas de una sola fase el afluente ingresa al biorreactor donde se encuentran las BSR y se produce un sistema de producción de sulfuro de hidrógeno en contacto directo con el DAM.

3.12 Cultivo continuo en reactor de lecho empacado

Un lecho empacado es una matriz de soporte sólido que retiene las bacterias, bien por geometría (dentro de los intersticios o espacios huecos de la matriz), bien por afinidad (paso o adherencia selectiva).

El empaquetamiento es una forma de aumentar la concentración y la densidad celular; pero al no estar enclaustradas las bacterias, la transferencia de masa es mayor, aunque siempre limitada ya que la inmovilización es parcial.

El sistema del biorreactor de lecho fijo de flujo ascendente anaerobio también recibe la denominación de biofiltro anaerobio de flujo ascendente, consiste básicamente en una columna de relleno sobre la cual se desarrollan y fijan las bacterias anaeróbicas. El desarrollo de los microorganismos sobre un medio sólido hace que se logren tiempos de retención celular muy elevados con bajos tiempos de retención hidráulica. (Angulo F, 2008)

En general, los biorreactores se clasifican según el diseño de construcción; entonces encontramos digestores horizontales que se caracterizan por su forma alargada horizontalmente, su alimentación se realiza por los extremos y digestores verticales que el agua a tratar pasa de abajo hacia arriba por el interior de la columna, donde los microorganismos realizan la depuración. Por la parte inferior entra el agua contaminada a tratar. En el interior de la columna están las bacterias que realizan la depuración. Por

la parte superior se obtiene biogás y un afluente con menos carga orgánica, de esta forma se realiza la depuración. Hay una recirculación de microorganismos para evitar que gran cantidad de ellos salga a través del efluente. (Rincon A, 2008)

4 OBJETIVOS

4.1 General

Optimizar las condiciones de cultivo de consorcios bacterianos sulfato reductores en la bioprecipitación de Fe (II) del efluente Antequera del Departamento de Oruro, con sulfuro de hidrógeno biogénicamente producido por la utilización de diferentes fuentes de carbono (celulosa).

4.2 Específicos

- Determinar la capacidad de producción de H₂S por consorcios bacterianos seleccionados previamente capaces de utilizar material celulósico/hemicelulósico en desuso.
- Establecer un biorreactor de lecho empacado con papel como sustrato y soporte de la biomasa para la producción de H₂S.
- Establecer un sistema de Bioprecipitación de Fe (II) presente en el DAM con H₂S de las bacterias sulfato reductoras y determinar el porcentaje de su remoción.

5 Materiales y Métodos

5.1 Material Biológico

Para la realización del presente trabajo se emplearon los consorcios MM1-X, MM3-08 y MM1-08 proporcionados por el laboratorio del Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas de la ciudad de La Paz; que fueron aislados de columnas de Winogradsky de muestras biológicas de la región altiplánica del país.

5.2 Material de Deshecho

Como fuente de carbono y soporte para las bacterias sulfato reductoras se usó material celulósico/hemicelulósico proveniente del papel bond, papel higiénico blanco sin perfume y papel periódico impreso.

5.3 Metodología

5.3.1 Determinación de la capacidad de producción de hidrogeno

Para la producción de sulfuro de hidrogeno se realizó la reactivación de los 3 consorcios bacterianos en estudio. Estos se sembraron en medio Postgate C modificado cuya composición es en g/L : 0.5 KH_2PO_4 , 4.5 Na_2SO_4 , 1 NH_4Cl , 0.06 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.06 $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0.3 citrato de sodio, 0.004 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, H_2O destilada c.s.p. 1L. (Widdel *et al*, 1992)

Con la finalidad de determinar la mejor fuente de celulosa para producir H_2S se evaluaron diferentes fuentes de carbono (papel bond, papel higiénico y mix de papel higiénico/papel periódico 2:1) a una concentración de 1,5 g. Los experimentos se realizaron en viales de 100 mL, a los cuales se le adicionó 80 mL de medio Postgate C modificado a pH final de 4 ajustado con ácido clorhídrico 1 N. Los cultivos se establecieron en condiciones anaeróbicas utilizando nitrógeno libre de oxígeno, cerrados con tapones de goma y anillas de aluminio, estos se mantuvieron a temperatura ambiente durante 15 días de experimentación.

5.3.2 Establecimiento del biorreactor de lecho empacado

Para el establecimiento del biorreactor de forma vertical se tomaron ciertas consideraciones de cultivo. En una botella de plástico de 600 mL de capacidad se vertió 400 mL de medio Postgate C modificado a pH 4 y se colocó el soporte seleccionado (papel bond en desuso), este se hallaba contenido en un cilindro cerrado de yute para evitar el taponamiento del sistema de recirculación. (Figura 7)

El cultivo continuo se realizó con un flujo de 240 mL / día y un tiempo de retención hidráulica de 1.66 día. El biorreactor se conectó a una trampa de precipitación de vidrio de dos compartimientos. Se inoculó 10 mL de cultivo en batch del consorcio bacteriano seleccionado como mejor productor de H_2S , se dejó en reposo por 2 días para la adaptación de las bacterias.

En la segunda fase de experimentación se realizó una mezcla del medio Postgate C modificado y el efluente del DAM de Antequera en una relación 1:1 y se prosiguió con la experimentación con estos 400 mL de mix en las mismas condiciones que en la primera fase.

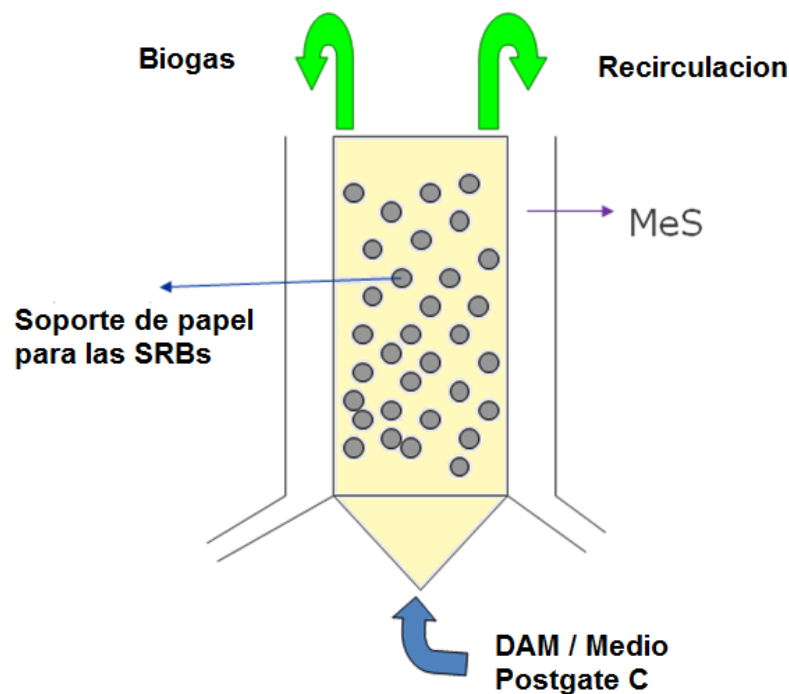


Figura 7. Biorreactor vertical de lecho empacado de flujo ascendente

En el establecimiento del biorreactor horizontal se usó una botella de plástico de 1500 mL de capacidad, donde el volumen de llenado fue de 1400 mL de la mezcla del medio Postgate C modificado y el afluente del DAM de Antequera y se inoculó 30 mL de cultivo de batch del consorcio bacteriano seleccionado como mejor productor de H_2S , las demás consideraciones de cultivo fueron similares al biorreactor vertical. (Figura 8).

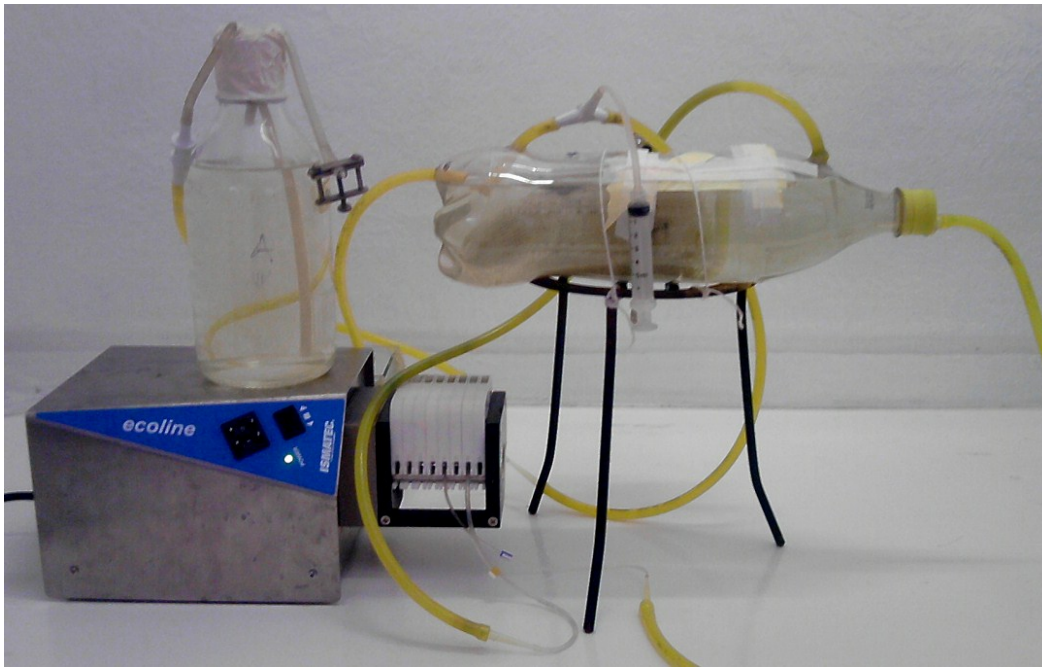
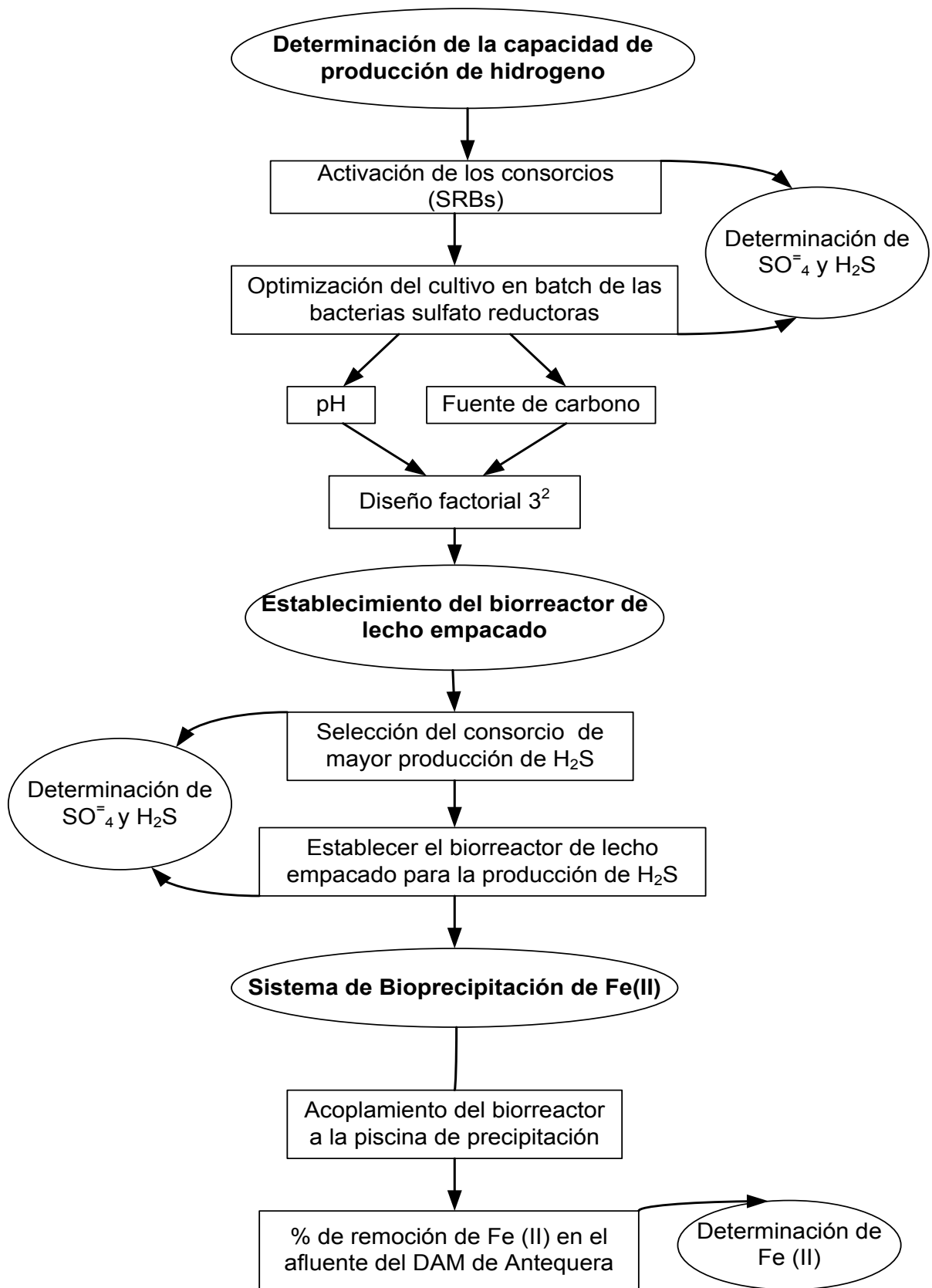


Figura 8. Biorreactor horizontal de lecho empacado

5.3.3 Sistema de bioprecipitación de Hierro (II)

Se utilizó una trampa de precipitación de vidrio de capacidad de 300 mL, este fue construido con láminas de vidrio de grosor mediano. Está dividido en dos compartimientos que permite la separación del agua libre de metal y la precipitación del sulfuro metálico.

Se realizó el control de pH al iniciar el experimento y al finalizar, luego de los 20 días de experimentación se recolectó 10 mL de muestra de la trampa de precipitación para la determinación de metal removido.



5.4 Determinaciones analíticas

5.4.1 Determinación de sulfuro de hidrógeno

5.4.1.1 Ensayo en acetato de plomo (Método cualitativo)

Se recogió una fracción de fase gaseosa en una jeringa de 5 ml y se esparció sobre una tira de papel filtro embebida en acetato de plomo al 10%. La coloración marrón que aparece es indicativo de la producción de sulfuro de hidrogeno por parte de las bacterias presentes en el medio de cultivo.

5.4.1.2 Método Turbidimétrico (Método cuantitativo)

Se determinó la concentración de sulfuro disuelto en el medio de cultivo mediante el método turbidimétrico descrito por Cord-Rudwisch (1995). En una cubeta se colocan 1950 μ L de reactivo de cobre y se añade 50 μ L de muestra filtrada (por 0.45 μ m) se agita y se leyó en el espectrofotómetro () a 480 nm, el blanco se realizó con 1950 μ L de reactivo de cobre y 50 μ L de ácido clorhídrico 50 mM.

5.4.2 Determinación de la concentración de sulfatos (Método cuantitativo)

Se determinó la concentración de sulfato empleando el método turbidimétrico descrito por Kolmert et. al (2000). El método consistió en mezclar 1 mL de Reactivo Condicionante y 1 mL de la muestra (filtrada por 0.45 μ m y diluida 1/20), en un tubo de ensayo; luego se añadió aproximadamente 60 mg de cloruro de bario, se mezcló en vortex por 30 segundos. Inmediatamente se realizó la lectura en una cubeta a 420nm. Se utilizó como blanco 2 mL de reactivo condicionante con 60 mg de cloruro de bario.

5.4.3 Determinación de metales pesados

La determinación de la concentración de metales pesados se realizó mediante la técnica de Pott y Mattiasson (2004) de Espectroscopía de absorción atómica a la llama FAAS (Flame Atomic Absorption Spectrometry).

Se tomaron 10 mL de muestra de la trampa de precipitación, se filtraron las muestras usando filtros millipore de poro de 45 μm . El filtrado se trató con peróxido de hidrogeno al 3,5% v/v para oxidar el sulfuro remanente y detener la reacción de precipitación, luego se dejó reposar toda la noche añadiendo ácido nítrico concentrado y se almacenó a 4 °C hasta el día de análisis.

6 Resultados y Discusiones

6.1 Determinación de la capacidad de producción de hidrógeno

Para la reactivación de los consorcios bacterianos se tomó en cuenta varios factores, principalmente el pH; ya que a pH ligeramente alcalino se favorece el desarrollo de los microorganismos reductores de sulfatos puesto que estos proliferan en un pH de 7.4 aunque pueden sobrevivir en pH bajos (Lapage *et al.* 1970). Debido a esta capacidad que presentan las bacterias sulfato reductoras fue posible la adaptación de los consorcios bacterianos a pH 4 al cual se hallan los DAM.

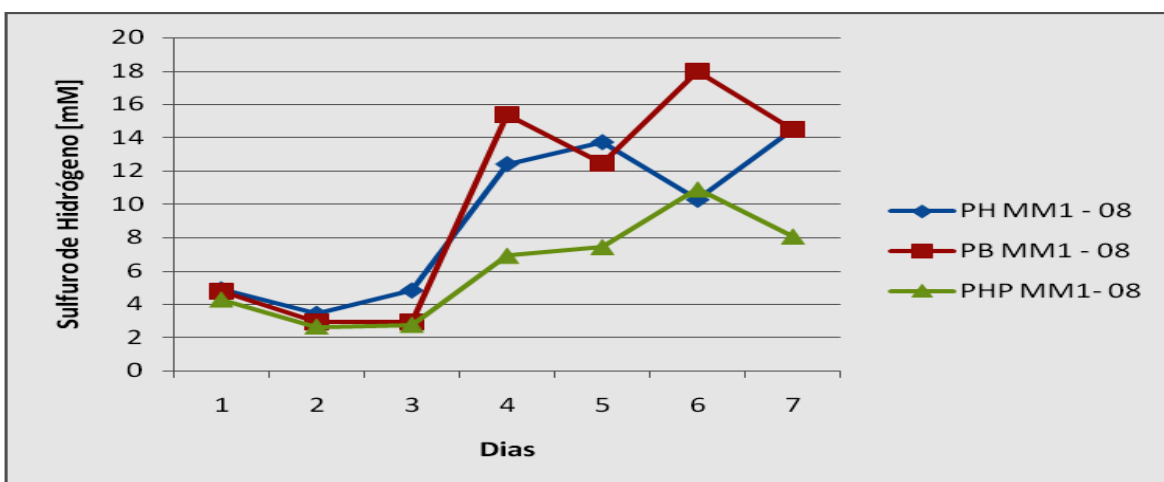
Luego de la reactivación de los tres consorcios bacterianos y la adaptación a pH 4 con las distintas fuentes de carbono (papel bond, papel higiénico, mix papel higiénico/papel periódico) podemos evidenciar que la producción de H_2S es mayor al cuarto día de experimentación, como se observa en la tabla 5.

Tabla 5. Producción de Sulfuro de hidrógeno, con sustrato de papel en desuso a pH 4

MUESTRA	FUENTE DE CARBONO	H_2S [mM]
MM1-08	Papel bond	13,63
MM1-08	Papel higiénico	8,94
MM1-08	Papel higiénico - periódico	10,91
MM3-08	Papel bond	13,17
MM3-08	Papel higiénico	13,19
MM3-08	Papel higiénico - periódico	17,14
MM1-X	Papel bond	19,05
MM1-X	Papel higiénico	13,07
MM1-X	Papel higiénico - periódico	15,71

Los reportes de Sosa *et al.* (1995), indican que los microorganismos reductores de sulfatos forman parte del consorcio microbiano anaerobio que incluye microorganismos hidrolíticos y fermentativos, acetogénicos, homoacetogénicos y metanogénicos. Es de esta manera que los consorcios bacterianos en estudio pudieron utilizar el material celulósico/hemicelulósico como fuente de carbono y soporte porque, como tal, las bacterias sulfatoreductoras no degradan el papel, son otros microorganismos que incorporan éste a sus ciclos biogeoquímicos, es decir hay una relación simbiótica en los consorcios.

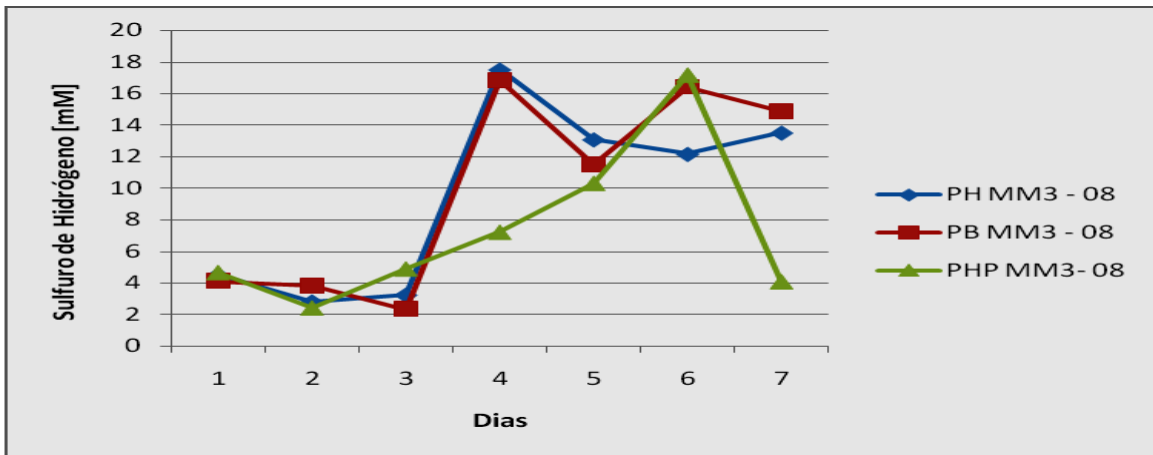
Como se observa en la figura 9 del consorcio MM1-08 tenemos un producción de H₂S constante hasta el cuarto día donde se obtiene una concentración de 13,63 mM con la fuente de carbono de papel bond que es mayor en comparación a las otras 2 fuentes de carbono, aunque la producción de H₂S de la fuente de carbono de papel higiénico es constante y tiene una elevación drástica entre el 3 al 5 día de experimentación.



*PH: papel higiénico; PB: papel bond; PHP: papel higiénico/ papel periódico.

Figura 9. Producción de sulfuro de hidrógeno por el consorcio MM1-08 con las 3 fuentes de carbono y soporte de material celulósico/ hemicelulósico.

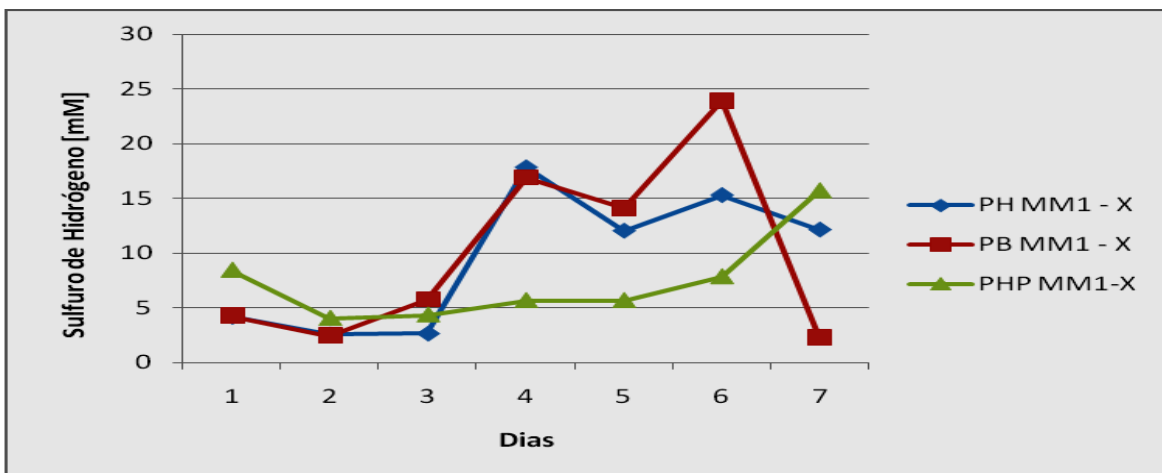
Se observa que el consorcio MM3-08 tuvo una concentración de 13,19 mM de H₂S con la fuente de carbono de papel higiénico, entonces podemos afirmar que con este consorcio la mejor producción de H₂S se obtiene con la fuente carbono de papel higiénico aunque la diferencia con el papel bond no es significativa.



*PH: papel higiénico; PB: papel bond; PHP: papel higiénico/ papel periódico

Figura 10. Producción de sulfuro de hidrógeno por el consorcio MM3-08 con las 3 fuentes de carbono y soporte de material celulósico/ hemicelulósico.

Al cuarto día de experimentación, se evidenció una mayor producción por parte del consorcio MM1-X en comparación con los otros dos consorcios (Figura 11). Con este se observó una producción de H₂S elevada con las distintas fuentes de carbono sin existir diferencia con el papel higiénico y el papel bond pero tenemos que destacar que la mejor fuente de carbono para este consorcio está dada por el papel bond en desuso con el que se obtuvo una concentración máxima de 19,05 mM de H₂S.



*PH: papel higiénico; PB: papel bond; PHP: papel higiénico/ papel periódico

Figura 11. Producción de sulfuro de hidrógeno por el consorcio MM1-X con las 3 fuentes de carbono y soporte de material celulósico/ hemicelulósico.

De acuerdo con la literatura (Kaksonen et al. 2004; Beyoumy et al. 1999), los sistemas de remoción de metales pesados con BSR, deben mantener una concentración de sulfuro suficiente (100 mg/L) para prevenir y/o asegurar la precipitación de los metales pesados; por ello, la selección del consorcio bacteriano se realizó mediante la comparación de estos en relación a la producción de sulfuro de hidrógeno, como se observa en la figura 12.

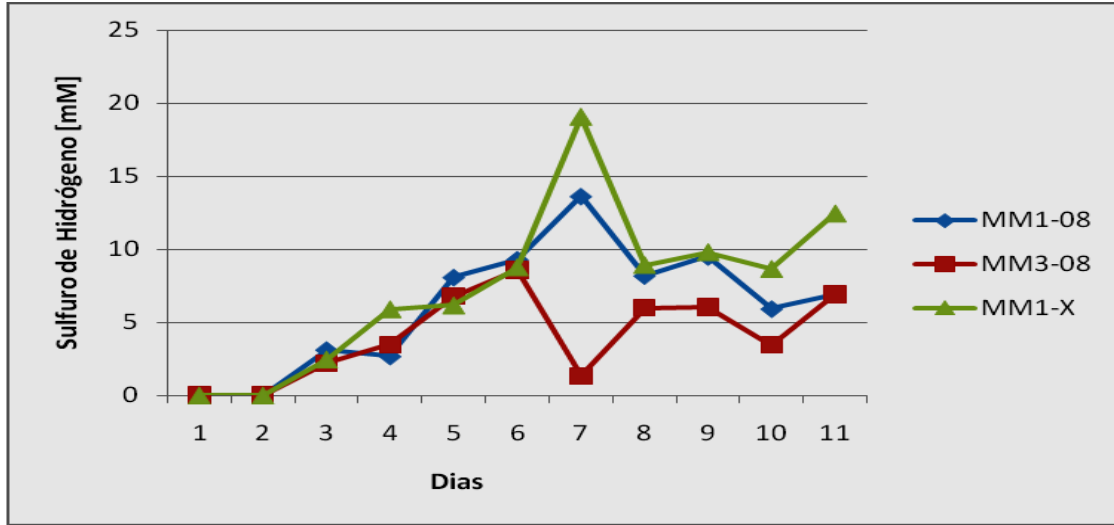


Figura 12. Producción de Sulfuro de hidrógeno por los diferentes consorcios bacterianos MM1-08; MM3-08; MM1-X.

6.2 Establecimiento del biorreactor de lecho empacado

Se realizó un análisis de los datos obtenidos del cultivo en batch que permitió determinar las condiciones en las cuales se establecería el biorreactor; las que se presentan en la tabla 6. En esta tabla, se encuentran detallados las concentraciones de producción de sulfuro, remoción del metal, tiempo de cultivo, volumen de circulación y el inculo.

Tabla 6. Condiciones de cultivo para el biorreactor de lecho empacado

Biorreactor	TRH	μ	SO ₄ inicial	H ₂ S producción	Remoción Fe+2
Vertical	1.66d	0.6d ⁻¹	31mM	13,79 mM	0,734
Horizontal	1.66d	0.6d ⁻¹	31 mM	14 mM	nd

THR= Tiempo de retención hidráulica; nd=no determinado; μ =tiempo de duplicación

El biorreactor vertical fue armado tomando en cuenta el tiempo de retención hidráulica del consorcio MM1_X que fue de 1,66 días, donde se usó el papel bond en desuso como fuente de carbono y soporte para el consorcio bacteriano como se observa en la figura 13.

Según González P. (Tesis, 2005) se logró la producción de sulfuro de hidrógeno a partir de papel en desuso, porque el papel reciclado, en comparación con las otras fuentes que contienen celulosa tuvo una mejor degradación, muy probablemente debido a que este material ha sido sometido a procesos químicos para su reciclado, los cuales ocasionan la disolución de la lignina y la pérdida de resistencia de las fibras presentes en el mismo, lo cual favorece su degradación. Es por ello que se observa mayor producción de sulfuro de hidrogeno con el papel bond en comparación a los otros papeles usados.



Figura 13. Biorreactor vertical de lecho empacado

Una vez establecido el biorreactor se tomó en cuenta dos fases de experimentación. En la primera fase, en la cual se utilizó el medio Postgate C modificado donde la producción de sulfuro de hidrogeno (Figura 14), se observó que la producción se

inicia al séptimo día y se logra una fase exponencial hasta el día 17, donde se encuentra la mayor producción que es de 13.79 mM que es optima para el proceso de remoción. También se tomó en cuenta el consumo de sulfato en relación a la producción de sulfuro presenta una relación equimolar donde por cada mol de sulfato reducido se produce un mol de sulfuro

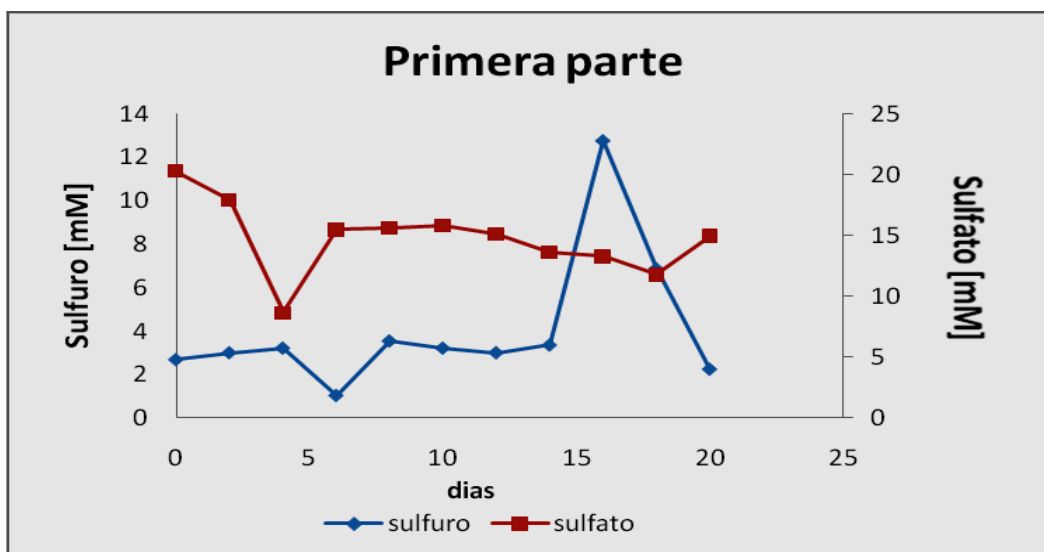


Figura 14. Producción de sulfuro y consumo de sulfato del biorreactor vertical en medio Postgate C modificado.

El sulfuro de hierro (FeS) formado en el sistema al ser prácticamente insoluble, tiende a precipitarse y acumularse en el fondo del reactor. Kaksonen *et al.* (2003), señala que la acumulación de los metales precipitados como sulfuros metálicos dentro del reactor, contribuye a retener biomasa en el sistema, ya que esta se adhiere al compuesto, por lo cual las partículas de FeS formadas actúan como un soporte bacteriano lo cual favorece el incremento de la biomasa en el sistema.

En la segunda fase de experimentación se realizó un mix entre el medio Postgate C modificado y el DAM de Antequera en una relación 1:1, en la cual se pudo observar una producción de sulfuro que fue 13.79 mM, en relación a la primera fase de experimentación que fue entre 13 – 14 mM (figura 15), con lo que se comprueba que el consorcio de BSR llegó a adaptarse.

Kitada *et al.* (2000) han reportado que los procesos anaerobios de degradación que se llevan a cabo en los reactores UASB favorecen la proliferación de

microorganismos oxidadores del azufre elemental. Su principal función es la remoción de metales pesados, empleando el ácido sulfúrico producido por este grupo microbiano.

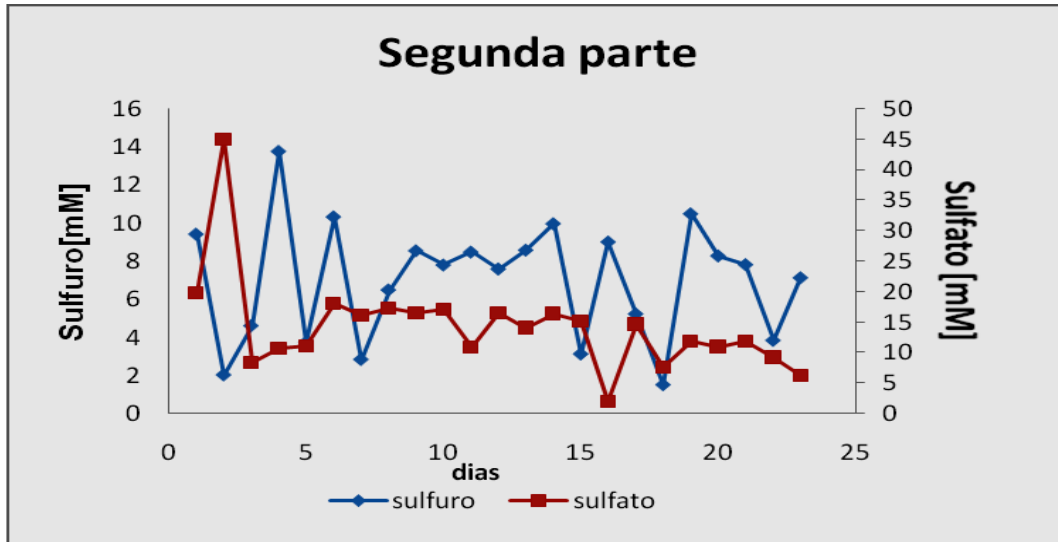


Figura 15. Producción de sulfuro y consumo de sulfato del biorreactor vertical con medio Postgate C modificado y el afluente del DAM de Antequera.

Para mejorar la producción de sulfuro de hidrógeno se ha empleado un biorreactor de forma horizontal (figura 16) de tal manera que el flujo sea óptimo, ya que en el biorreactor vertical se produjeron fallas del sistema al haber taponamientos de los sistemas de recirculación y la entrada de medio o del afluente del DAM.

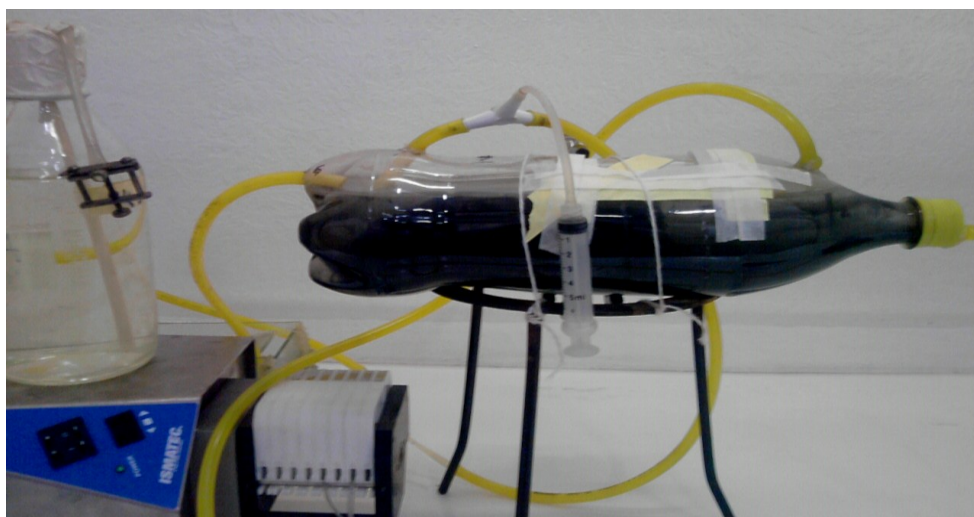


Figura 16. Biorreactor horizontal de lecho empacado

La debilidad del sistema se encuentra en el recambio de material celulósico y el aumento de medio. Esto se observa en la figura 17, donde en el séptimo día de experimentación se realizó el recambio de medio de cultivo incorporándose sustratos nuevos, que luego del periodo de adaptación, presentaron una elevación en la producción de sulfuro de hidrógeno. En el día 14 de experimentación se realizó el primer recambio de sustrato; donde la estabilidad del sistema se pierde por la pérdida de biomasa, y el poco tiempo de adaptación que se tiene; a pesar de esta condición es vital el recambio de material celulítico como señala (Velasco J. *et. al*, 2005).

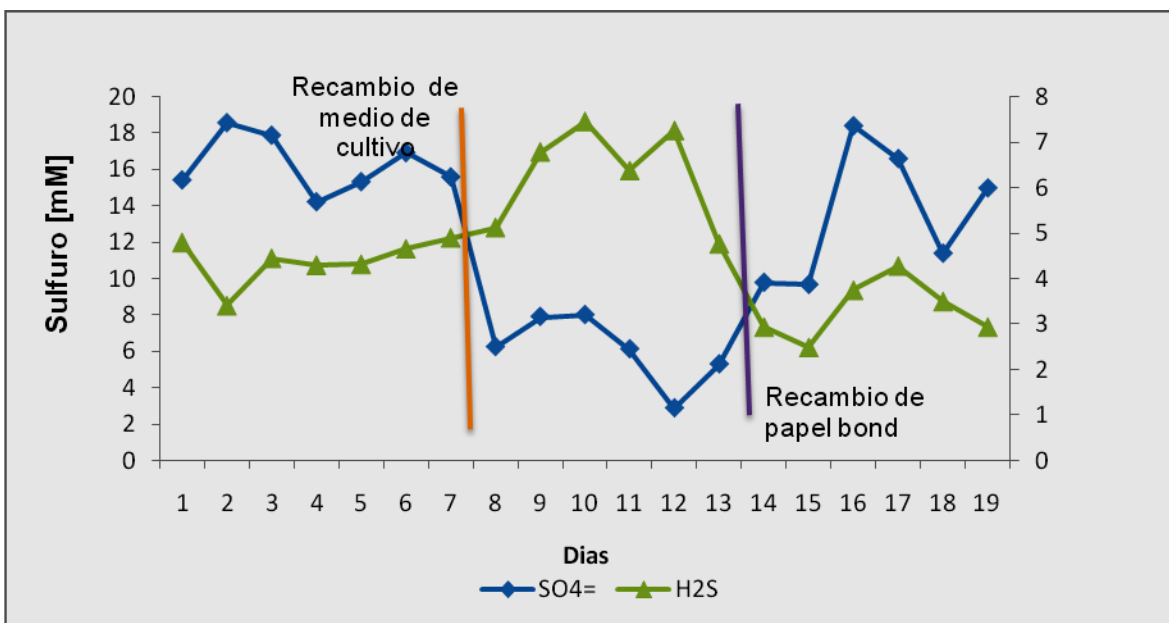


Figura 17. Producción de sulfuro y consumo de sulfato del biorreactor de lecho empacado en sentido horizontal

De acuerdo a la revisión bibliográfica, el sistema de remoción de forma vertical permite una producción de sulfuro de hidrógeno apta para la remoción de metales, debido a un flujo y un tiempo de retención que permite la degradación de la celulosa. Hemsí *et. al.* (2005) estos señalaron que a medida que se incrementa la velocidad de descomposición de la celulosa se favorecerá la formación de sulfuro y, por lo tanto, la precipitación de metales pesados, pero en esta ocasión se comprobó que el biorreactor de forma horizontal tiene una estabilidad de cultivo mayor que la vertical, dado que el flujo es continuo y no se ve observado el taponamiento de las mangueras.

6.3 Sistema de bioprecipitación de Hierro (II)

Previamente a la experimentación se realizó el análisis del efluente del Drenaje Acido de Mina de Antequera, las concentraciones de los metales presentes en ella se detallan en la tabla 7.

Tabla 7. Composición del afluente del DAM de Antequera

Metal	Concentración mg / L
Fluoruros	7.0 mg/L
Cloruros	74.0 mg/L
Fosfatos	0.5 mg/L
Sulfatos	310 mg/L
Calcio	115 mg/L
Magnesio	20.5 mg/L
Sodio	215 mg/L
Potasio	25.5 mg/L
Arsénico	64.0 ug/L
Plomo	115 ug/L
Cadmio	Menor al límite de detección
Cobre	40 ug/L
Hierro	Menor al límite de detección
Zinc	Menor al límite de detección

Se realizó la determinación de hierro utilizando la técnica por espectroscopia de absorción atómica (Tabla 8), en la cual se observa los resultados obtenidos a partir de una concentración constante de hierro de 15.4 ppm.

El biorreactor llegó a obtener una concentración final de hierro en reactor de 2.342 ppm y en piscina de sedimentación de 0.734 ppm lo que indica una remoción de metal del 95%.

Tabla 8. Concentración de hierro en el biorreactor vertical de lecho empacado

Muestra	Dilución	[C] ppm ini	[C] ppm final
Concentración Inicial	1:10	1,541	15,41
Papel/Piscina		0,734	0,734
Papel/Biorreactor		2,342	2,342

La remoción de metal presente en el drenaje ácido de mina está relacionado estequiométricamente, ya que sabemos que un mol de metal reacciona con un mol de H_2S ; por ello el H_2S disuelto en el medio permitió la remoción del 95 % de hierro presente en este. La misma relación se observó en la remoción de cobre en el trabajo de González P. *et al*, 2005 que logró un 74,8 % de remoción de cobre, debiéndose este resultado a la concentración de sulfuro producido, ya que en este caso fue mucho menor que en el presente trabajo; es por ello que podemos decir que el sistema tiene un mayor rendimiento en la remoción de metal pesado presente en agua.

7 Conclusión

Las condiciones de cultivo para los consorcios bacterianos sulfato reductores fue optimizada mediante la experimentación en cultivos Batch donde se tomaron las variables de pH ácido y fuente de carbono de material celulósico que permitió la producción de sulfuro de hidrogeno empleados en la bioprecipitación de Fe (II) del Drenaje Acido de Mina del efluente Antequera y del medio de cultivo Postgate C modificado.

- La capacidad de producción de H_2S de los 3 consorcios bacterianos fue determinada en función a la degradación del material celulósico/hemicelulosico, donde se obtuvo una producción máxima de 19,05 mM de H_2S con el papel bond en desuso, permitiendo la selección del material que favorecería las condiciones de producción de sulfuro.

- Mediante la experimentación previa en cultivos batch se obtuvieron las condiciones para el establecimiento del biorreactor de lecho empacado en posición vertical y horizontal con papel bond como sustrato y soporte para la producción de H₂S, donde el consorcio seleccionado para la experimentación fue el MM1-X. Por razones técnicas el biorreactor horizontal fue seleccionado como el mejor sistema de remoción de metales por presentar una producción de sulfuro de hidrogeno de 14 mM al decimo día.
- Se logró establecer un sistema de precipitación de Fe (II) del DAM mediante la utilización de trampas de precipitación de vidrio, el metal precipita en condiciones de acides extrema al utilizar soporte de material celulítico (papel bond), y se determino que el porcentaje de remoción de Fe (II) es del 95%.

8 Bibliografía

1. Alvarez M. T., Microbial Treatment of heavy metal leachates. Doctoral thesis. Suecia, 2005.
2. Bechard, G., Yamazaki, H., Gould, W.D., Bedard, P., 1994. Use of cellulosic substrates for the microbial treatment of acid-mine drainage. *J. Environ. Qual.* 23 (1), 111–116.
3. Berghorn, G.H., and G.R. Hunzeker. 2001. Passive treatment alternatives for remediation abandoned-mine drainage. p. 111–127. John Wiley & Sons, New York.
4. Bocangel D. 2001 Bolivia Estudio Regional/Nacional sobre Pequeña Minería y Artesanal Proyecto MMSD, Minería minerales y desarrollo sostenible agosto N° 71
5. Boonstra J, van Lier R, Janssen G, Dijkman H & Buisman CJN (1999) Biological treatment of acid mine drainage. In: Amils, R. & Ballester, A. (eds) Biohydrometallurgy and the environment toward the mining of the 21st century. Proceedings of the International Biohydrometallurgy Symposium IBS'99, San Lorenzo de El Escorial, Madrid, Spain, June 20-23. Part B: Molecular biology, biosorption, bioremediation. Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp. 559-567.
6. Brown, M., B. Barley, and H. Wood. 2002. Mine water treatment. p. 1–31. In M. Brown, B. Barley, and H.Wood. The minewater problem. IWA Pub. Alliance House, London

7. Buchauer K, 1998, A comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste-water and sludge treatment processes, *Water SA*, ISSN 0378-4738, Vol. 24; 1: 49-56.
8. Chambi E., Optimización de las condiciones mas favorables para la producción de biogas mediante digention anaerobia de la paja de quinua (*Chenopodium quinua willdenow*) y cascarilla de arroz (*Oryza sativa*) como residuos agrícolas. Tesina de licenciatura, 2007.
9. Cord R, A, 1985 Quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfates-reducing bacteria, *J. Microbial Method*; 4: 33-36.
10. Cowardin, L.M., Carter, V., Golet, F.C., and LaRoe, E.T. (1979): Classification of wetlands and deepwater habitats of the United States.
11. <http://www.nwi.fws.gov/classman.html>.
12. Dvorak, D.H., R.S. Hedin, H.M. Edenborn, and P.E. McIntire. 1992. Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate reduction: Results from pilot-scale reactors. *Biotechnol. Bioeng.* 40: 609-616.
13. Escobari, J., 2003. Problemática ambiental en Bolivia. UDAPE – Unidad de análisis de políticas sociales y económicas, 1–26.
14. Fowler, T.A., Holmes, P.R., Crundwell, F.K., 1999. Mechanism of pyrite dissolution in the presence of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2987–5292
15. Gagliano W., Biogeochemical Characterization of a Constructed Wetland for Acid Mine Drainage Treatment. Doctoral Thesis. Ohio, 2004.
16. García C, Moreno DA, Ballester A, Blázquez ML & González F (2001). Bioremediation of an industrial acid mine water by metal-tolerant sulphate-reducing bacteria. *Minerals Engineering* 14, 997-1008.

17. Giblin, A.E. (1985): Comparisons of the processing of elements by ecosystems, II: metals. In: Godfrey, P.J., Kaynor, E.R., Pelczarski, S., and Benforado, J. (Eds.) Ecological considerations in wetlands treatment of municipal wastewaters. Van Nostrand Reinhold Company, New York, NY, pp. 158-179.
18. Barranco F. et.al Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados críticos, SAMIUC Uni-net, España, web sitio, tratado.uninet.edu.
19. Perry, John H., "Chemical Engineers Handbook", McGraw-Hill Company, New York, fourth edition, pag. 2-77, 1963. 5. APHA, AWWA, WPCF, "Standard methods for the examination of water and wastewater", 1989.
20. Gutierrez A. V., Enriquecimiento de bacterias sulfato red
21. <http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/entrega.asp?IdEntrega=43>
22. <http://www.estrucplan.com.ar/Producciones/entrega.asp?IdEntrega=43>
23. Okabe S, Ito T, Satoh H. Sulfate-reducing bacterial community structure and their contribution to carbon mineralization in a wastewater biofilm growing under microaerophilic conditions. Appl Microbiol Biotechnol 2003; 63: 322-34.
24. Rol Fisiológico de los nutrientes en la vida de las plantas" Ing. M. Sc. Germán E. Matos; La Paz-Bolivia; 1998.
25. Barranco, F. et ál. Principios de Urgencias, Emergencias y Cuidados Críticos. SAMIUC. Uni-net, España. Web site: tratado.uninet.edu. 5. Baranwal, A. and Singhi, S. "Acute iron poisoning: Management Guidelines". Indian Pediatrics 2003; 40: 534 – 540.
26. Robertson, A. and Tenenbein, M. Hepatotoxicity in acute iron poisoning. Human & Experimental Toxicology 2005; 24: 559 – 562.
27. Lovley, D.R., (ed.). Environmental Microbe-Metal Interactions, 2000, American Society for Microbiology, Washington D.

28. Silver, S. And Misra, T., 1988. Plasmid-mediated Heavy Metal Resistances. Annual Reviews on Microbiology 42: 717-43.
29. Lebeau, T., Bagot, D., Jézéquel, K. y Fabre, B., 2002. Cadmium biosorption by free and immobilised microorganisms cultivated in a liquid soil extract medium: effects of Cd, pH and techniques of culture. The Science of the Total Environment 291: 73-83.
30. Gadd, G.M., 2000. Bioremedial potential of microbial mechanisms of metal mobilization and immobilization. Current Opinion in Biotechnology 11: 271-279.
31. Wang, C.L., Michels, P.C., Dawson, S.C., Kitisakkul, S., Baross, J.A., Keasling, J.D. and Clark, D.S., 1997. Cadmium Removal by a new strain of *Pseudomonas aeruginosa* in Aerobic Culture. Applied and Environmental Microbiology 63(10): 4075-4078.
32. Srinath, T., Verma, T., Ramteke, P.W., Garg, S.K., 2002. Chromium (VI) biosorption and bioaccumulation by chromate resistant bacteria. Chemosphere 48: 427-435.
33. Lapage R. Shelton S. A. y Mitchell R. J. (1970). Isolation of dissimilatory sulfate-reducing bacteria. En: *The prokaryotes*. Edited by M. P. Starr y H. Stolp. pp 920-926.
34. Sosa R. Chao R. y del Río J. (1995). *Aspectos bioquímicos y tecnológicos del tratamiento de residuales agrícolas con producción de biogás*. Instituto de Investigaciones Porcinas. La Habana, Cuba.
35. Kaksonen A. H; Riekkola-Vanhanen M. L; Puhakka, J. A. 2003. Optimization of Metal Sulphide Precipitation in Fluidized-Bed Treatment of Acidic Wastewater. *Water Research*. 37:255- 266.
36. Kaksonen, A. H; Franzmann, P. D. y Puhakka, J. A. 2004. Effect oh hydraulic retention time and sulfide toxicity on ethanol and acetate oxidation in sulfate-reducing metal-precipitating fluidized-bed reactor. *Biotechnol. Bioeng*. 86 (3): 332-343.

37. Lettinga G. y Hulshoff Pol L.U.U. (1991). UASB process design for various types of wastewaters. *Wat. Sci. Tech.* 24 (8): 84-107.

38. Starkey R. L. (1935). Isolation of some bacteria which oxide thiosulfate. *Soil Science* 39:197-219.

39. Syutsuo K., Harada H., Ohashi A. y Susuki H. (1997). An effective start-up thermophilic UASB reactor by seeding mesophilically-grown granular sludge. *Wat. Sci. Tech.* 36 (6/7): 391-396.