

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



**BIOGÉNESIS DE SULFURO DE HIDRÓGENO
EMPLEANDO ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES
PRODUCIDOS POR LA HIDRÓLISIS DE VEGETALES Y
FRUTAS EN DESCOMPOSICIÓN**

ELABORADO POR:

Univ. CARLA FABIANA CRESPO MELGAR

(Tesina elaborada para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica).

LA PAZ - BOLIVIA

2005

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



**BIOGÉNESIS DE SULFURO DE HIDRÓGENO
EMPLEANDO ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES
PRODUCIDOS POR LA HIDRÓLISIS DE VEGETALES Y
FRUTAS EN DESCOMPOSICIÓN**

ELABORADO POR:

Univ. CARLA FABIANA CRESPO MELGAR

ASESORES:

MARÍA TERESA ÁLVAREZ ALIAGA MSc

ALBERTO GIMENEZ TURBA PhD

(Tesina elaborada para optar al grado de Licenciatura en Bioquímica).

LA PAZ - BOLIVIA

2005

Ser excelente es comprender que la vida
no es algo
que se nos da hecho, sino que tenemos
que producir las oportunidades para
alcanzar el éxito, explotando al máximo
todas nuestras potencialidades.

AGRADECIMIENTOS

A la Agencia Internacional de Cooperación de Suecia, por incentivar el programa ASDI-SAREC/UMSA, para el desarrollo del proyecto Biodiversidad Microbiana, que se ejecuta en el Área de Biotecnología del IIFB.

A todos los miembros del IIFB, por recibirme en su grupo de trabajo y brindarme la gran oportunidad de conocerlos y vivir gratos momentos junto a ellos.

A los doctores Alberto Gimenez, Enrique Udaeta, y Pablo Irahola por su apoyo, incentivo, y sus valiosos consejos.

A mi querida jefa, María Teresa Álvarez, mi asesora, amiga y mi ejemplo a seguir, por darme su apoyo incondicional, creer siempre en mi capacidad, y enseñarme a desarrollar mi pasión por la investigación,

A mis queridos amigos, las de abajo: Moni-k, Delina, Pame y Georgia, por los bellos momentos vividos, y los de arriba: Dra Grace, Crispin, Jimbo, Paulina, Efra, Katty Noemia, Maggy, Juanquis, Marco, por ofrecerme siempre su amistad; a Lauris por brindarme una amistad sin barreras.

A mi mejor amiga, mi madre por enseñarme a dar siempre lo mejor de mi, a mi padre por su gran apoyo incondicional y a mis hermanitos por su cariño.

A Dios, por permitirme dar estos agradecimientos a las personas que mas quiero, y por dejarme cumplir los deseos de mi corazón.

ÍNDICE

RESUMEN	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	3
III. JUSTIFICACIÓN	5
IV. DISEÑO TEÓRICO	7
A. MARCO CONCEPTUAL	7
1. La contaminación por residuos sólidos	7
2. La biotecnología ambiental y la utilización de residuos sólidos	8
a. Bioremediación	8
3. Digestión anaeróbica	9
a. Proceso microbiológico y bioquímico de la digestión anaeróbica	11
1) Productos de la fermentación - AGVs	13
4. La contaminación por efluentes mineros en Bolivia	15
5. Drenaje ácido de mina (DAM)	15
a. Origen del DAM	17
6. Contaminación por metales pesados	18
a. Estándares del reglamento nacional de agua potable	20
7. Bioremediación de la contaminación por DAM utilizando sistemas biológicos (BSR)	23
a. Precipitación de metales pesados contaminantes con sulfuro de hidrógeno biogénico	23
8. Bacterias sulfato reductoras (BSR)	24
a. Clasificación de las bacterias sulfato reductoras	25
b. Metabolismo de las BSR	26
1) Ciclo del azufre	27
2) Reducción microbiana de sulfato	28
9. Sistemas de cultivo	29
a. Cultivo continuo	31
V. OBJETIVOS	32
A. OBJETIVO GENERAL	32
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32

VI. DISEÑO METODOLÓGICO	33
A. MATERIAL BIOLÓGICO	33
B. ACTIVACIÓN DE CONSORCIOS - PREPARACIÓN DE INÓCULOS	33
1. Condiciones de cultivo batch	33
a. Consorcio microbiano hidrolítico	34
b. Consorcio de bacterias sulfato reductoras (BSR)	35
C. CONDICIONES DE CULTIVO CONTINUO	35
1. Construcción del sistema de bioreactores-Componentes del sistema de bioreactores	35
a. Bioreactor de hidrólisis	37
b. Bioreactor de sulfidogénesis	38
c. Trampa de precipitación de metales pesados	38
2. Monitoreo de bioreactores de hidrólisis y sulfidogénesis	39
a. Toma de muestras	41
D. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO	41
1. Diseño factorial N° 1	41
2. Diseño factorial N° 2	43
E. DETERMINACIONES ANALÍTICAS	44
1. Determinación de sulfuro de hidrógeno (H ₂ S)	44
a. Método cualitativo	44
b. Método cuantitativo	44
2. Determinación de sulfato remanente no reducido	45
3. Determinación de las actividades enzimáticas	45
4. Análisis de AGVs	47
5. Determinación de la concentración de metales pesados	47
VII. RESULTADOS	49
VIII. DISCUSIONES	65
IX. CONCLUSIONES	69
X. BIBLIOGRAFÍA	71

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1: Grupos microbianos componentes de Consorcios hidrolíticos.	14
TABLA 2: Factores de contaminación causada por el drenaje ácido de mina.	16
TABLA 3: Cargas de metales en el agua evacuada de la mina Bolivar.	17
TABLA 4: Límites de concentración recomendados en el agua potable: Agencia de Protección Ambiental EPA.	20
TABLA 5: Límites de concentración recomendados en las aguas de riego: Agencia de Protección Ambiental EPA.	22
TABLA 6: Algunos géneros comunes de BSR, según la utilización de fuente de carbono.	29
TABLA 7: Esquema del Diseño factorial Nº1.	45
TABLA 8: Esquema del Diseño factorial Nº 2.	46
TABLA 9: Esquema del procedimiento para la determinación de Sulfuro de Hidrógeno disuelto.	47
TABLA 10: Esquema del procedimiento para la determinación de la concentración de Sulfato remanente no reducido.	48
TABLA 11: Esquema del procedimiento para la determinación de las actividades enzimáticas.	49
TABLA 12: Esquema del procedimiento para la determinación de Ácido Grasos Volátiles, por el método de titulación.	50
TABLA 13: Diseño Factorial Nº 1, Producción de Sulfuro de Hidrógeno y concentración de Sulfato remanente no reducido en el medio.	57
TABLA 14: Diseño Factorial Nº 2, Producción de Sulfuro de Hidrógeno y concentración de Sulfato remanente en el medio.	60

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Esquema de reacciones de la digestión anaerobia	12
FIGURA 2: Esquema del proceso de degradación.	13
FIGURA 3: Proporción molar de AGVs producidos durante la digestión anaeróbica.	14
FIGURA 4: Formación de una vesícula gelatinosa en un proceso electroquímico de corrosión.	25
FIGURA 5: Interacciones principales de las bacterias sulfato reductoras.	27
FIGURA 6: Ciclo del azufre.	31
FIGURA 7: Esquema de un bioreactor.	33
FIGURA 8: Bioreactor para cultivo anaeróbico Batch.	37
FIGURA 9: Sistema de bioreactores en cultivo continuo.	39
FIGURA 10: Sistema de bioreactores en cultivo continuo.	40
FIGURA 11: Trampa de precipitación.	42
FIGURA 12: Relación entre la Actividad Enzimática. y la producción de Ácidos Grasos Volátiles, durante la hidrólisis de vegetales y fruta (BIOREACTOR DE HIDRÓLISIS).	51
FIGURA 13: Concentración de Sulfuro de Hidrógeno y Concentración de Sulfato remanente no reducido en el medio (BIOREACTOR DE SULFIDOGÉNESIS).	54
FIGURA 14: Relación directa entre la producción de Ácidos Grasos Volátiles y la producción de Sulfuro de Hidrógeno.	55
FIGURA 15: Relación directa entre la producción de Sulfuro de Hidrógeno el pH en el Bioreactor de Sulfidogénesis.	56
FIGURA 16: Diseño Factorial Nº 1, Superficie de Respuesta.	58
FIGURA 17: Diseño Factorial Nº 2, Superficie de Respuesta.	61
FIGURA 18: Concentraciones de Zinc, Cobre y Plomo, antes y después de su precipitación.	63
FIGURA 19: (a, b y c) Porcentaje de precipitación de Zinc, Cobre y Plomo.	64
FIGURA 20: Variación del potencial redox, durante la precipitación de metales.	65
FIGURA 21: Variación del pH, durante la precipitación de metales.	66

ÍNDICE DE ANEXOS

- ANEXO # 1:** Esquema del procedimiento realizado en el trabajo de investigación.
- ANEXO # 2:** MEDIO 11 - CONSORCIO MICROBIANO HIDROLÍTICO
- ANEXO # 3:** MEDIO POSTGATE C MODIFICADO - CONSORCIO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS
- ANEXO # 4:** Curva de Calibración de Sulfuro
- ANEXO # 5:** Curva de Calibración de Sulfatos
- ANEXO # 6:** Curva de Calibración de Glucosa
- ANEXO # 7:** Curva de Calibración de Xilosa
- ANEXO # 8:** Curva de Calibración de AGVs
- ANEXO # 9:** Tabla 1: Diseño Factorial N° 1 (final del experimento) Producción de Sulfuro de Hidrógeno y concentración de Sulfato remanente en el medio (Cultivo Batch).
- ANEXO #10:** Figura 1: Diseño Factorial N° 1 (Final del experimento) Superficie de Respuesta Variables Independientes [mM SO_4] y [g/L Ác. Acético] Variable dependiente (mM H_2S).

BIOGENIC HYDROGEN SULFIDE PRODUCTION EMPLOYING VFAS PRODUCED FROM VEGETABLES AND FRUITS HYDROLYSIS

ABSTRACT

This study is part of the Microbial Diversity project developed at the Area of Environment Biotechnology of Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas, with cooperation of Environmental biotechnology department of Lund University as part of SIDA-SAREC/UMSA program, supported by Swedish International Cooperation Agency. The goal of this research was to determinate and to check the hydrogen sulfide production employing volatile fatty acids (as electron donors and carbon source) produced by enzyme hydrolysis of vegetables and fruits, biochemist procedures were measured by analytical and instrumental methods.

A Bioreactor system was established, consisting in one hydrolysis bioreactor where the enzyme hydrolysis of vegetables and fruits (tomato, papaya, apple and banana) was done by microbial consortia, the second one was employed for hydrogen sulfide production by a SRB consortium, employing sulfate salts and metabolites as VFAs obtained from the first bioreactor. The hydrogen sulfide produced was directed to a precipitation trap with an artificial effluent mimiting the heavy metal concentrations of Bolivar mine located in Oruro department (Zn= 8.94 mg/L, Cu= 7.84 mg/L y Pb= 3.68 mg/L) the data of heavy metals of this mine were used as an example of acid mine drainage.

The best and constant concentration of hydrogen sulfide produced around 17mM (or 578 mg/L), which was employed for the heavy metals removal and the capability of precipitation was zinc 96.75%, cooper 98.45%, and lead 100%, measures was carried out by absorption atomic spectrophotometer for every cation.

Optimization of hydrogen sulfide production was done by factorial designs (3^2), using as independent variable three different concentration of VFAs and also Sulfate, showing concentration of 32 mM of Sulfate and 0.35 g/L of VFAs are suitable concentrations for an optimum Hydrogen Sulfide process.

BIOGÉNESIS DE SULFURO DE HIDRÓGENO EMPLEANDO ÁCIDOS GRASOS VOLÁTILES PRODUCIDOS POR LA HIDRÓLISIS DE VEGETALES Y FRUTAS EN DESCOMPOSICIÓN

RESUMEN

El presente trabajo de investigación forma parte del proyecto: “Biodiversidad Microbiana del programa UMSA-SAREC”, desarrollado en el Área de Biotecnología Ambiental del Instituto de Investigaciones Fármaco-Bioquímicas, con la cooperación del departamento de Biotecnología Ambiental de la Universidad de Lund como parte del programa ASDI-SAREC/UMSA, apoyado por la Agencia Internacional de Cooperación y Desarrollo de Suecia. Dicha investigación pretende establecer y controlar la producción biogénica de sulfuro de hidrógeno a partir de la utilización de ácidos grasos volátiles (donador de electrones y fuente de carbono), obtenidos de la hidrólisis enzimática de vegetales y fruta en descomposición; los procesos bioquímicos fueron cuantificados mediante técnicas analíticas e instrumentales.

Se estableció un sistema de dos bioreactores, conectados a una trampa de precipitación de metales pesados, en el primero se llevó a cabo la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) mediante la hidrólisis enzimática de vegetales y frutas, efectuada por un consorcio microbiano aerobio-anaeróbico; en el segundo bioreactor se llevó a cabo el proceso de sulfidogénesis con un consorcio anaerobio de bacterias sulfato reductoras (BSR), alimentado por AGVs y sales de sulfato; el sulfuro de hidrógeno producido fue dirigido a una trampa de precipitación con un efluente artificial, simulando las concentraciones de metales de la mina Bolívar del departamento de Oruro (Zn= 8.94 mg/L, Cu= 7.84 mg/L y Pb= 3.68 mg/L), como modelo de precipitación en drenaje ácido de mina. Se empleó la mayor concentración constante de sulfuro de hidrogeno producido biogénicamente, alrededor de 17mM (ó 578 mg/L), cuya capacidad precipitante fue: zinc 96.75%, cobre 98.45% y plomo 100%, de acuerdo a mediciones en el equipo de absorción atómica, para cada uno de los cationes.

Para la optimización de la producción de Sulfuro de Hidrógeno (H_2S), se aplicaron diseños factoriales (3^2), utilizando como variables independientes tres concentraciones diferentes de AGVs y Sulfato; se demostró que las concentraciones adecuadas para la óptima producción de H_2S , son 32 mM de Sulfato y 0.35 g/L de AGVs.

I. INTRODUCCIÓN

Durante varios siglos, la industria minera y el procesamiento de minerales ha sido la base de la economía boliviana, evidenciando aún en nuestros días el funcionamiento de algunas empresas mineras. Si bien los nuevos proyectos de minería se desarrollan con la debida consideración a los aspectos ambientales, las labores antiguas han causado a lo largo de varios años perjuicio al medio ambiente; una considerable parte del daño puede atribuirse a los continuos procesos de formación de efluente ácido cargado de metales, (generado en los desechos mineros abandonados y las minas inactivas), conocido como drenaje ácido de mina, contaminante de cursos de agua, lagos y aguas subterráneas, eliminando la flora y fauna acuática en grandes tramos de ríos, degradando la calidad del agua por encima de los niveles de seguridad.

En los últimos años la biotecnología a través de la bioremediación emerge como una opción interesante para la remoción y recuperación de metales pesados contaminantes de efluentes industriales y drenajes ácidos de mina.

Otro gran problema de contaminación ambiental, es la eliminación de residuos sólidos sin utilidad, generados por las actividades humanas y animales, constituyendo una significativa amenaza contra el ecosistema y la salud humana. Según estudios relacionados al respecto, en Bolivia, cada persona produce aproximadamente 350 gramos diarios de basura doméstica, y entre ésta, residuos municipales tales como los productos remanentes de origen vegetal, que sufren un proceso de descomposición (La Patria, 2004). Sin embargo, la mayor parte son compuestos orgánicos rápidamente biodegradables, que pueden ser utilizados por microorganismos, transformándose en un valioso recurso mediante la digestión anaeróbica.

Existen muchas ventajas en la utilización de sistemas biológicos contra los no biológicos, estos implican procesos que generan menos residuos, emplean menos recursos no renovables y menos energía, son menos peligrosos para el medio ambiente por la producción de compuestos altamente biodegradables y no tóxicos, los procesos tienen una gran eficacia y funcionan mejor a temperaturas moderadas y en condiciones poco

rigurosas, tienen menos efectos colaterales que los métodos tradicionales porque son muy específicos.

Los procesos biológicos también coadyuvan a la producción de nuevos materiales con menor impacto medioambiental. Sin embargo en un inicio los procesos biológicos se llevan a cabo con lentitud, hasta alcanzar el establecimiento del sistema pero una vez dadas las condiciones adecuadas, el proceso biológico se desarrolla con mejor eficacia que otros (Federación Europea de Biotecnología, 1999).

El presente trabajo plantea una solución, mediante el uso de sistemas biológicos, para estos dos grandes problemas de contaminación ambiental, recuperar metales pesados contaminantes de cuerpos de agua mediante la precipitación con sulfuro de hidrógeno producido por bacterias sulfato reductoras; y reducir la proporción de residuos municipales orgánicos mediante la digestión anaeróbica realizada por un consorcio microbiano hidrolítico; conjunciando ambos procesos y contribuyendo de esta forma al proceso de bioremediación.

II. ANTECEDENTES

Desde 1980 el tratamiento anaeróbico de aguas de desecho, ha demostrado ser una atractiva alternativa al tratamiento aeróbico. A finales de los años ochenta, se desarrolló un nuevo proceso biotecnológico, produciendo azufre elemental a partir de sulfuro, con esta tecnología se estableció la primera planta piloto para el tratamiento biológico de aguas de desechos de origen industrial (Buissman, C. et al., 1995).

En el año 1990 se estableció una planta piloto de tratamiento de aguas contaminadas para la remoción de sulfato y metales pesados de lodos acuosos en Buldeco, una refinería de zinc, ubicada en Pasminco - Australia; basados en los experimentos de esta planta piloto se estableció la instalación de una planta a gran escala, dos años después.

Tres años después se estableció una nueva planta piloto para el tratamiento de biológico, mediante la remoción de sulfatos de gases producidos por la desulfurización, que fue instalada en Boeldershoek, en Hengelo - Suiza (Buisman, C. et al., 1993).

En los siguientes años, y hasta nuestros días se han desarrollado otros estudios para el tratamiento de aguas contaminadas con metales pesados tanto a escala de laboratorio como a escala piloto a campo, utilizando bacterias sulfato reductoras en cultivos estacionarios y continuos, mediante la instalación de bioreactores; a continuación se describe brevemente algunos de los estudios más sobresalientes:

En 1991, se desarrolló un nuevo proceso para la remoción microbiana de sulfatos y metales pesados de aguas contaminadas extraídas por un sistema de control geohidrológico (Barnes, L. et al., 1991); posteriormente se desarrollaron estudios en el aislamiento de bacterias sulfato reductoras a partir de diversos microambientes (Hilgsmann, S. et al., 1998); en el año 1999, se realizaron estudios para la optimización de sulfuro de hidrógeno en un proceso anaeróbico continuo utilizando consorcios de bacterias sulfato reductoras inmovilizadas, para la remediación de aguas ácidas (Kolmert, A. et al., 1999), en el año 2004 se desarrolló un estudio para el desarrollo de un proceso robusto y de baja tecnología para la producción de sulfuro como componente integral en

el tratamiento de la contaminación por metales pesados en el ambiente (Álvarez, et al., 2004). Existen muchos estudios que no son mencionados debido a la similitud en el desarrollo de sus procesos.

En Bolivia se han realizado estudios moleculares basados en el gen 16s rRNA caracterizando la biodiversidad de géneros, de bacterias sulfato reductoras, de la laguna La Granja (parte de la llanura de inundación del Río Beni) y lagunas de la población de Milluni, las cuales constituyen microambientes favorables para el desarrollo de estas bacterias (Achá, D. 2004 ; Luna, R. 2004; Sacaca, S. 2004).

A partir de la gestión 2001, en el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas (I.I.F.B.), surge una nueva línea de investigación en el Área de Biotecnología Ambiental para el aislamiento y desarrollo de consorcios bacterianos sulfato reductores (SRB), provenientes de la región altiplánica de Bolivia determinando la producción biogénica de Sulfuro de Hidrógeno (H_2S); en dicha investigación se cuantificó la capacidad de producción de H_2S mediante diseños factoriales, cuyas variables fueron el pH y la concentración de sulfatos en forma de sales en el medio de cultivo, para obtener un mayor rendimiento en la producción de H_2S biogénico en condiciones óptimas (Mendieta, J, et al., 2002).

En este sentido el presente trabajo pretende seguir esta línea de investigación, con el propósito fundamental de servir de aporte teórico y práctico en el proceso de bioremediación, mediante la producción biogénica de Sulfuro de Hidrógeno como componente integral del tratamiento biológico en la contaminación de aguas por metales pesados.

III. JUSTIFICACIÓN

Durante varios siglos, la industria minera y el procesamiento de minerales fueron la base de la economía boliviana, Si bien los nuevos proyectos de minería se desarrollan con la debida consideración a los aspectos ambientales, las labores antiguas han causado a lo largo de varios años perjuicio al medio ambiente; una considerable parte del daño puede atribuirse a los continuos procesos de formación de efluente ácido cargado de metales, conocido como drenaje ácido de mina, que contamina cursos de agua, lagos y aguas subterráneas, afectando de sobremanera a la flora y fauna acuática en grandes tramos de ríos, ocasionando grandes pérdidas de nichos ecológicos importantes, y degradando la calidad del agua por debajo de los niveles de seguridad.

Si bien la biolixiviación es una técnica ampliamente utilizada, la misma no ha podido dar respuesta efectiva en cuanto a la bioremediación de suelos, ríos y lagos que se han visto afectados por décadas, debido al drenaje ácido de las minas eliminando en los mismos grandes cantidades de compuestos químicos utilizados en la minería tradicional.

Otro de los grandes problemas de contaminación por los que atraviesa nuestro país, es la eliminación de residuos sólidos sin utilidad, y entre ellos una alta proporción de residuos orgánicos municipales, la mayor parte compuestos orgánicos rápidamente biodegradables. En Bolivia, como en la mayoría de los países latinoamericanos, no existe la clasificación de la basura, ni el tratamiento de los residuos orgánicos, que están siendo acumulados constituyendo una significativa amenaza contra el ecosistema y la salud humana.

Ambos problemas, llegan a provocar un grave perjuicio a todas las formas de vida presentes en nuestro país, por tanto existe la necesidad de hallar un mecanismo que conjuncione ambos problemas de contaminación y determine una solución, que permita reducir y controlar estos dos problemas de impacto ambiental.

Una de las soluciones para el tratamiento de los drenajes ácidos de mina es la utilización de bacterias sulfato reductoras para producción de Sulfuro de Hidrógeno de origen

biogénico, que tiene la capacidad de combinarse con cationes divalentes presentes en aguas de desecho contaminadas, logrando su precipitación, y liberando de esta forma la contaminación por metales pesados de ríos, lagos y suelos; otra solución propuesta para el problema de la contaminación por residuos municipales orgánicos biodegradables, es la utilización de microorganismos como un valioso recurso mediante la digestión anaeróbica.

Debido a esto, en el presente trabajo se pretende determinar la producción biogénica de H_2S por un consorcio de bacterias sulfato reductoras, a partir de la utilización de Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) como única fuente de carbono y energía, obtenidos de la hidrólisis enzimática de residuos municipales como vegetales y fruta en descomposición mediante digestión anaeróbica.

En este sentido, se establece un sistema de bioreactores de metales pesados y de precipitación; en el primer bioreactor se lleva a cabo la degradación de residuos municipales orgánicos (frutas y vegetales de temporada) por hidrólisis enzimática de un consorcio microbiano aerobio-anaeróbico, en el segundo se lleva a cabo la sulfidogénesis realizada por un consorcio anaeróbico de bacterias sulfato reductoras, capaces de utilizar AGVs (producto obtenido del primer bioreactor); y por último, el sulfuro de hidrógeno de origen biogénico se conjuga con metales catiónicos divalentes de un efluente contaminado, para su precipitación y posterior cuantificación.

IV. DISEÑO TEÓRICO

A. MARCO CONCEPTUAL

1. LA CONTAMINACIÓN POR RESIDUOS SÓLIDOS

Un gran problema de contaminación atmosférica, es la eliminación de residuos sólidos o semisólidos sin utilidad, generados por las actividades humanas y animales, constituyendo una significativa amenaza contra el ecosistema y la salud humana.

La basura, conocida también como residuo sólido, es todo material resultante de la actividad humana, de los procesos de fabricación, transformación, utilización, consumo o limpieza, cuyo productor destina al abandono. Un habitante de una ciudad en un país industrializado y rico puede producir hasta 875 kg de basura doméstica por año; según estudios relacionados al respecto, en Bolivia, cada persona produce aproximadamente 350 gramos diarios de basura doméstica, considerando zonas urbanas y rurales (La Patria, 2004).

Los residuos sólidos se separan en categorías: residuos agrícolas, industriales, comerciales, domésticos y municipales; los residuos comerciales y domésticos suelen ser materiales orgánicos, ya sean combustibles, como papel, madera y tela, o no combustibles, como metales, vidrio y cerámica; los residuos industriales pueden ser cenizas procedentes de combustibles sólidos, escombros de la demolición de edificios, productos químicos, pinturas y derivados (Vázquez. et al., 2000).

Los residuos municipales suelen ser los productos remanentes de origen vegetal no aprovechados por el hombre, tales como las frutas y los vegetales, que sufren un proceso de descomposición; y los residuos agrícolas suelen ser estiércol de animales y restos de la cosecha.

Los residuos sólidos domésticos son un problema importante en nuestra sociedad, su eliminación es económicamente costosa y hace necesaria una vigilancia constante de la contaminación atmosférica y las aguas subterráneas. Sin embargo, la mayor parte son compuestos orgánicos, que pueden ser utilizados por sistemas biológicos para la

reducción de la contaminación del aire o de sistemas acuáticos o terrestres. “En la actualidad se desarrollan mecanismos para la prevención y reducción de la contaminación por residuos orgánicos entre ellos los residuos municipales y agrícolas, que pueden ser logrados mediante el tratamiento biotecnológico” (Vázquez. et al., 2000).

2. LA BIOTECNOLOGÍA AMBIENTAL Y LA UTILIZACIÓN DE RESIDUOS SÓLIDOS

La biotecnología ambiental, es la aplicación de los procesos para la protección y restauración de la calidad del medio ambiente. Se han empleado procesos biotecnológicos para la protección del medio ambiente durante casi un siglo, incluso antes de que existiera el término biotecnología. La biotecnología también puede utilizarse para desarrollar productos y procesos que generen menos residuos y empleen menos recursos no renovables y menos energía. A este respecto, la biotecnología está bien posicionada para contribuir a una sociedad más sostenible (Federación Europea de Biotecnología, 1999).

Uno de los grandes problemas de nuestra sociedad son los residuos sólidos domésticos, necesariamente, éstos deben ser eliminados realizando una vigilancia constante de la contaminación ambiental, la mayor parte de los residuos son compuestos orgánicos rápidamente biodegradables, que pueden convertirse en un valioso recurso mediante el compostaje y/o la digestión anaeróbica. Las técnicas biotecnológicas para tratar los residuos antes o después de hacerlos llegar al medio ambiente se basan en la bioremediación.

a. BIOREMEDIACIÓN

La Bioremediación, es la utilización de sistemas biológicos para la reducción de la contaminación del aire o de sistemas acuáticos o terrestres; los sistemas biológicos que se emplean generalmente son los microorganismos y la biodegradación más frecuente es la que tiene lugar con éstos.

Los microorganismos pueden descomponer la mayoría de los compuestos para su crecimiento y/o sus necesidades energéticas. Estos procesos de biodegradación pueden necesitar o no aire (procesos aeróbicos o anaeróbicos); en algunos casos, los procesos metabólicos que los microorganismos realizan normalmente para el crecimiento y la obtención de energía, también pueden utilizarse para descomponer moléculas contaminantes; esta conjunción de procesos es conocida como co-metabolismo donde los microorganismos no se benefician directamente, los investigadores han sacado partido de este fenómeno y lo utilizan para la Bioremediación (Federación Europea de Biotecnología, 1999).

El resultado de una biodegradación completa es la desintoxicación por la mineralización de los agentes contaminantes en dióxido de carbono, agua y sales inorgánicas inocuas; a diferencia de una biodegradación incompleta que dejará productos descompuestos que pueden ser, o no, menos tóxicos que el contaminante original, por ejemplo, de una biodegradación incompleta del tri- o tetracloroetileno puede resultar vinilcloruro, que es más tóxico y carcinógeno que el compuesto original.

La biodegradación puede tener lugar de forma espontánea, en cuyo caso, a menudo se emplean expresiones como "Bioremediación intrínseca" o "atenuación natural"; sin embargo, en muchos casos las circunstancias naturales no son lo suficientemente favorables para que ello tenga lugar, debido a la ausencia de los nutrientes necesarios, oxígeno o bacterias adecuadas; tales situaciones pueden mejorarse suministrando como suplemento uno o más de estos prerequisites (Gomec CY. Et al., 2003).

3. DIGESTIÓN ANAERÓBICA

La digestión anaeróbica es una fermentación microbiana en ausencia de oxígeno, da lugar a una mezcla de gases (principalmente metano y dióxido de carbono), conocida como "biogás", y una suspensión acuosa o "lodo" que contiene los componentes difíciles de degradar y los minerales inicialmente presentes en la biomasa.

El proceso anaerobio ocurre de forma espontánea en la naturaleza para degradar la materia orgánica, produciendo, por ejemplo, el gas de los pantanos, el gas natural de

yacimientos subterráneos o incluso el gas metabólico producido en el estómago de los rumiantes.

La materia prima preferentemente utilizable para someterla a este tratamiento es la biomasa residual, con alto contenido en humedad, especialmente los residuos orgánicos municipales, agrícolas y ganaderos.

Aunque la digestión anaeróbica es un proceso ampliamente conocido en la práctica, se posee en la actualidad una información muy limitada sobre su química y su microbiología. Sin embargo, se puede afirmar en líneas generales que la digestión anaeróbica se desarrolla en tres etapas, durante las cuáles la biomasa se descompone en moléculas más pequeñas para dar biogás como producto final, por la acción de diferentes tipos de bacterias.

Las variables que influyen en el proceso son las siguientes:

- *Temperatura:* se encuentra un óptimo de funcionamiento alrededor de los 35 °C
- *Acidez:* determina la cantidad y el porcentaje de metano en el biogás, habiéndose encontrado que el valor óptimo de pH oscila entre 6,6 y 7,6
- *Contenido en sólidos:* se suele operar en mejores condiciones con menos de un 10% en sólidos, lo que explica que la biomasa más adecuada es la de alto contenido en humedad
- *Nutrientes:* para el crecimiento y la actividad de las bacterias, éstas tienen que disponer de carbono, nitrógeno, fósforo, azufre y sales minerales
- *Tóxicos:* aparte del oxígeno; inhiben la digestión, concentraciones elevadas de amoníaco, sales minerales a alta concentración y algunas sustancias orgánicas como detergentes y pesticidas (Ghosh, S. et al., 1988).

En los últimos años el proceso de digestión anaeróbica ha tenido notables desarrollos en términos de diseño del proceso y control, particularmente la digestión anaeróbica de residuos sólidos, en digestores anaeróbicos de alto rendimiento se ha ido ganando progresivamente la aceptación pública, porque, permite la recuperación de importantes cantidades no sólo de biogás sino también de residuo orgánico estable de alta calidad, y todo ello sin ocasionar daño al medio ambiente.

Durante el proceso de digestión anaeróbica, la materia orgánica es transformada en los gases metano y dióxido de carbono; este proceso biológico natural, es realizado por grupos o comunidades de bacterias en recipientes cerrados (reactores). Esta conversión biológica del sustrato complejo, en el que se encuentra materia orgánica en suspensión o disuelta, se realiza a través de una serie de reacciones bioquímicas que transcurren tanto consecutiva como simultáneamente, y cuyo proceso podemos dividir en cuatro etapas: hidrólisis, fermentación acidogénica, acetogénica, y finalmente, la metanogénica.

a. PROCESO MICROBIOLÓGICO Y BIOQUÍMICO DE LA DIGESTIÓN ANAERÓBICA

Los modelos tradicionales de digestión anaeróbica, dividen las reacciones que ocurren durante el proceso de mineralización de la materia orgánica en varias fases, llevadas a cabo por diferentes grupos de bacterias, relacionados entre ellos. De hecho, muchas de estas reacciones ocurren simultáneamente sin una separación clara de fases.

La primera fase es la hidrólisis de partículas y moléculas complejas, que son degradadas por enzimas extracelulares producidas por los microorganismos fermentativos; como resultado de este proceso se producen compuestos solubles, que serán metabolizados por las bacterias anaerobias en el interior de las células. Los compuestos solubles, básicamente son diferentes tipos de oligosacáridos, alcoholes, aminoácidos y ácidos grasos; estos son fermentados por los microorganismos acidogénicos que producen, principalmente, ácidos grasos de cadena corta, alcoholes, dióxido de carbono e hidrógeno. Los ácidos grasos volátiles de cadena corta (AGVs) son transformados en ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, mediante la acción de los microorganismos acetogénicos. Finalmente ocurre la metanogénesis, que produce metano principalmente a partir de ácido acético, hidrógeno y dióxido de carbono, siempre y cuando se cuente con una población microbiana metanogénica, en cambio se produce Sulfuro de Hidrógeno si la población microbiana está compuesta en un gran porcentaje por bacterias sulfato reductoras (BSR).

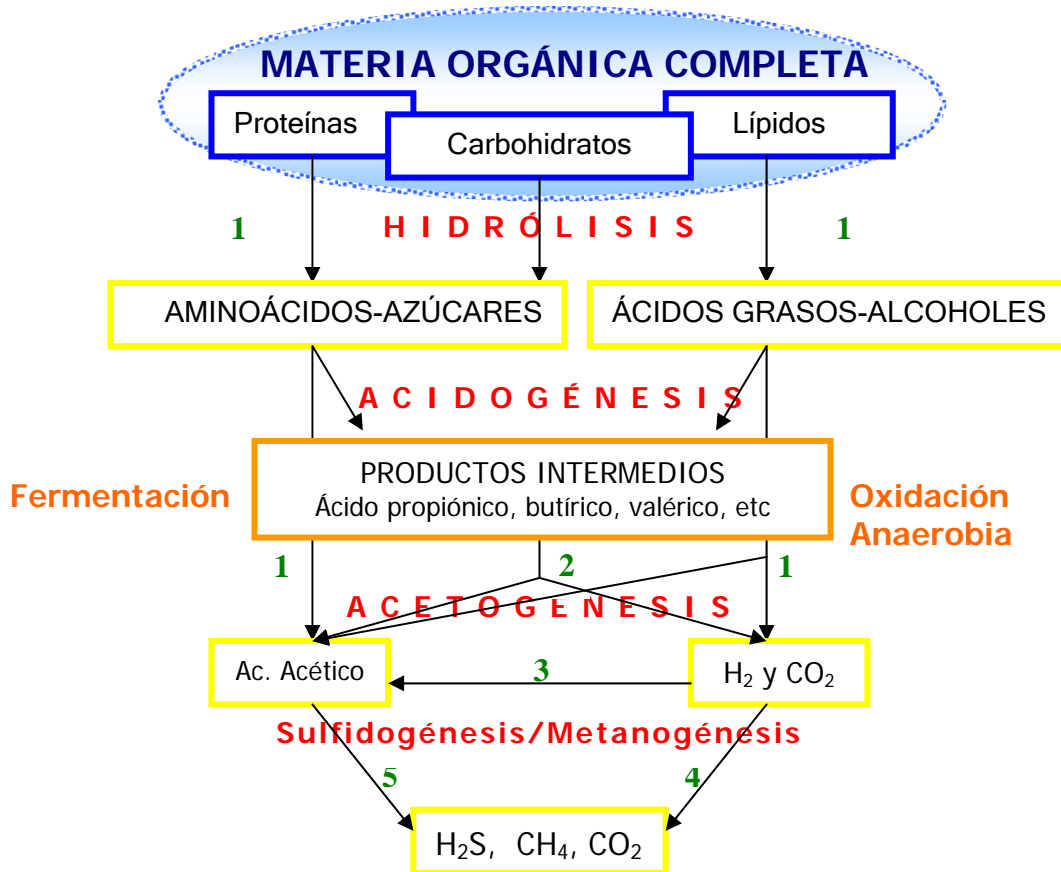


Figura 1. Esquema de reacciones de la digestión anaerobia de materiales poliméricos. (Pavlostathis y Giraldo-Gómez, 1991). Los números indican la población bacteriana responsable del proceso: 1: bacterias fermentativas; 2: bacterias acetogénicas que producen AGVs; 3: bacterias homoacetogénicas; 4: bacterias metanogénicas hidrogenotróficas y acetoclásticas; 5: bacterias sulfato reductoras (Ghosh, S. et al., 1988).

Uno de los principales retos en procesos de digestión anaeróbica, es el de poder evitar acumulaciones indeseables de compuestos químicos intermedios, de carácter tóxico o inhibitorio para la interfase biológica.

1) PRODUCTOS DE LA FERMENTACIÓN - AGVs

La fermentación ocurre bajo condiciones anaeróbicas, como consecuencia, los azúcares se metabolizan predominantemente a *Ácidos Grasos Volátiles* (AGVs), los productos más comunes incluyen al ácido acético, dióxido de carbono y metano. Los principales AGVs

son ácido acético ($\text{CH}_3\text{-COOH}$), propiónico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-COOH}$), butírico ($\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-COOH}$), y se forman pequeñas cantidades de ácido acetoacético ($\text{CH}_3\text{-CO-CH}_2\text{COOH}$), y ácido láctico ($\text{CH}_3\text{-COH-COOH}$).

Los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs) son producidos durante la primera fase de la digestión anaeróbica; esta primera fase está constituida por dos procesos; la hidrólisis y acidogénesis, la segunda fase esta constituida también por dos procesos, la acetogénesis y la metanogénesis y/o sulfidogénesis, y es la etapa en la cual los Ácidos Volátiles de cadena corta (AGVs) son consumidos, y oxidados para formar ácido acético y dióxido de carbono. El proceso mencionado se describe en la siguiente esquema.

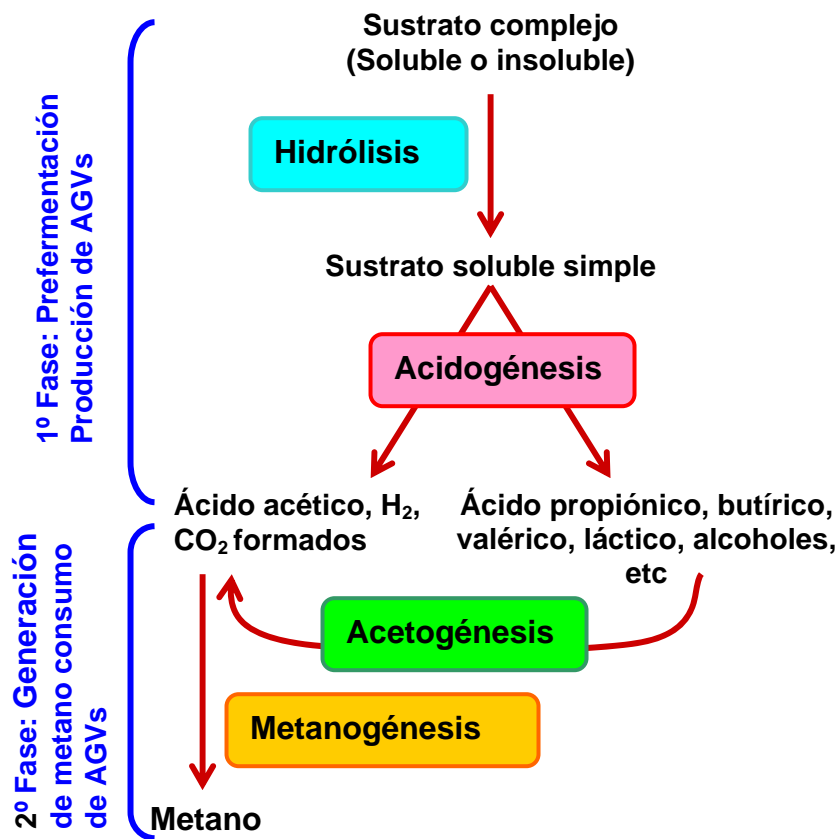


Figura 2: Esquema del proceso de degradación anaerobia (Adaptado de Fox y Pohland, 1994), los Ácidos acético y propiónico son los principales productos de la primera fase de degradación.

La proporción de AGVs producidos varía con el sustrato metabolizado, aunque el producto más abundante es casi siempre el ácido acético. En la digestión anaerobia de un sustrato con alto contenido de fibra, la proporción molar del ácido acético al ácido propiónico y ácido butírico es aproximadamente 70:20:10.

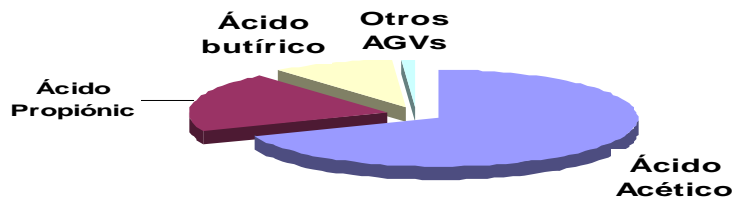


Figura 3: Proporción molar de AGVs producidos durante la digestión anaeróbica

Los microorganismos fermentativos pertenecen a muchos géneros y proporcionan una batería comprensiva de capacidad digestiva; estos microorganismos son a menudo clasificados por sus preferencias de sustrato, o por los productos finales de su metabolismo; aunque hay alguna especificación muchas bacterias utilizan múltiples sustratos, algunos de los grupos más importantes que comprenden múltiples géneros y especies son detallados a continuación (Six, W. et al., 1999).

Tabla 1: Grupos microbianos componentes de Consorcios hidrolíticos.

GRUPO	CARACTERÍSTICA
Celulolíticos	Degradan celulosa
Hemicelulolíticos	Degradan hemicelulosa (xilano)
Amilolíticos	Degradan almidón
Proteolíticos	Degradan proteínas
Utilizadores de Azúcares	Degradan monosacárido y disacáridos
Utilizadores de Ácidos	Asimilan ácidos: láctico, succínico y málico
Productores de Amoníaco	Síntesis a partir de la degradación de Aminoácidos
Sintetizadores de Vitaminas	Síntesis por productos intermedarios
Metanogénicos	Productores de Metano

4. LA CONTAMINACIÓN POR EFLUENTES MINEROS EN BOLIVIA

La generación de drenaje ácido de mina (DAM) en las actividades mineras es y será un problema ambiental muy preocupante; a finales del siglo pasado y particularmente después de la Cumbre Mundial de Río de Janeiro en 1992, Bolivia ha dado pasos importantes en la consolidación de políticas relacionadas con el desarrollo y el medio ambiente; el anterior gobierno incorporó el principio de desarrollo sostenible en nuestro país. Las políticas medioambientales actualmente están regidas por políticas de prevención y control dirigidas a problemas de deterioro ambiental apremiantes que se presentan en diversas regiones del territorio boliviano.

La contaminación minera proviene de más de 120 minas estatales y privadas, que explotan: plomo, estaño, oro, wólfram y otros metales, que desembocan sus desechos directamente al lago Poopó, dejando concentraciones altas de metales pesados, con daños irreversibles para la vida en el lago (Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, 1996). El drenaje ácido es uno de los focos de contaminación ambiental de las cuencas nacionales y por ello es preciso buscar las tecnologías apropiadas para su abatimiento a las condiciones ambientales convenientes.

5. DRENAJE ÁCIDO DE MINA (DAM)

En una operación minera es importante considerar todos los posibles impactos ambientales que se pueden producir a futuro, debido a los desechos que quedan de toda actividad minera (relaves, desmontes, etc.). Una posible causa de contaminación de aguas y suelos, es el llamado Drenaje Ácido de Mina (DAM).

De todas las causas de contaminación de los cursos fluviales el DAM es una de las más graves, por su naturaleza, extensión y dificultad de resolución.

El Drenaje Ácido de Mina se debe a la contaminación inorgánica de múltiples factores, producida por cierto tipo de minerales que se encuentran expuestos al aire y al agua; ocurre frecuentemente a partir de desechos de carbón o de diferentes sulfuros metálicos de minas abandonadas y en el interior de los relaves mineros (Partículas de mineral que el agua del lave arrastra y mezcla con barro estéril). Se conoce como DAM (Acid Mine

Drainage, término técnico), a la contaminación de un efluente caracterizado por la acidez, el alto contenido en sulfatos y metales pesados en el agua, y por el contenido metálico del sedimento (Cotoras, D. et al., 1996).

Tabla 2. Factores de contaminación causada por el drenaje ácido de mina.

CARACTERÍSTICAS DE CONTAMINACIÓN	ORIGEN
Fuente del ácido	Oxidación de pirita.
Principal ácido presente	Ácido sulfúrico.
pH	1,5 - 3,0
Acidez	110 - 64000 mg/L de CaCO ₃
Precipitados	Hidróxidos férricos.
Otros elementos presentes	Cobre, níquel, zinc, plomo y otros.

A continuación se detallan las principales características de un DAM, proveniente de un efluente minero activo, como ejemplo de la contaminación por metales pesados en Bolivia

En el presente trabajo se caracteriza el DAM del Centro Minero Bolívar del departamento de Oruro - Bolivia, debido a los parámetros definidos de contaminación, utilizables en la preparación de un efluente artificial para el proceso de bioprecipitación.

La mina Bolívar actualmente ha estado en funcionamiento desde 1995, en cuyos efluentes existe un flujo regular de bombeo de agua de mina de aproximadamente 40 L/s, el efluente de esta mina se caracteriza principalmente por las elevadas cargas de zinc y cadmio que alcanzan 500 a 4.5 toneladas por año respectivamente (Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente, 1996).

Tabla 3: Cargas de metales en el agua evacuada de la mina Bolivar. Estación de monitoreo BSC-1. Análisis por Svensk Grundämnesanalys, Suecia, 1996.

	Nº Muestras	Concentración (mg / L)	Flujo mina (Kg / día)	Descarga en el río (Kg / día)
Sulfato	3	820 - 1300	4100	1000
Zinc	7	5.3 - 1300	1400	360
Cobre	7	1.6 - 6.6	12	3
Cadmio	7	0.1 - 0.9	1	0.2
Arsénico	7	2 - 17	28	7
Plomo	7	0.2 - 0.4	0.9	0.2

pH = 3.2 - 3.9

a. ORIGEN DEL DAM

Cuando las rocas con minerales sulfurosos, como piritita, calcopiritita, pirrotita, marcasita, galena, arsenopiritita, etc. son expuestas a la acción del aire y del agua, comienza en su superficie, un complejo mecanismo que engloba en su desarrollo fenómenos químicos, físicos y biológicos, este mecanismo puede resumirse en los siguientes puntos:

- Procesos de oxidación, que transforman los sulfuros en sulfatos con producción de ácido sulfúrico; estos procesos pueden ser químicos o "catalizados" por bacterias como *Thiobacillus ferrooxidans*, *T. thiooxidans*, *T. thioparus*, etc.
- Reacciones secundarias, en los productos de las reacciones anteriores y los restantes minerales presentes en la roca; así, el ácido generado disuelve metales pesados tales como plomo, zinc, cobre, arsénico, mercurio, cadmio, etc.
- Disolución y arrastre de estos productos por el agua de lluvia o de escorrentía, produciéndose un caudal líquido contaminante que se caracterizara por su acidez y por las altas concentraciones en sulfatos y metales pesados (Cotoras, D. et al., 1996).

Los principales focos productores de DAM en las explotaciones mineras, son los drenajes de las minas subterráneas, por bombeo en las minas activas y por gravedad en las abandonadas; en algunos casos, el agua que sale de estos focos lleva tan altas concentraciones metálicas, que algunos investigadores se cuestionan si el problema

debería enfocarse como la recuperación de un recurso que se pierde en lugar de la eliminación de un efluente contaminante.

Cuando el DAM formado en estos focos alcanza las aguas limpias de la red hidrográfica las contamina en acidez, sulfatos y metales pesados. Sin embargo, el grado de acidez y las concentraciones en contaminantes de las aguas, río abajo, estarán en función del aporte contaminante de DAM recibido, así como del caudal diluyente que traiga el curso de agua. De igual forma, la infiltración de DAM puede contaminar suelos y aguas subterráneas (Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente., 1996).

6. CONTAMINACIÓN POR METALES PESADOS

La actividad industrial y minera, arroja al ambiente metales tóxicos como plomo, mercurio, cadmio, arsénico y cromo, muy dañinos para la salud humana y para la mayoría de formas de vida; además, los metales originados en las fuentes de emisión generadas por el hombre (antropogénicas), incluyendo la combustión de nafta con plomo, se encuentran en la atmósfera como material suspendido que respiramos. Por otro lado, las aguas residuales no tratadas, provenientes de minas y fábricas, llegan a los ríos, mientras los desechos contaminan las aguas subterráneas. Cuando se abandonan metales tóxicos en el ambiente, contaminan el suelo y se acumulan en las plantas y los tejidos orgánicos.

La peligrosidad de los metales pesados es mayor debido a que no son química ni biológicamente degradables; una vez emitidos pueden permanecer en el ambiente durante cientos de años, además, su concentración en los seres vivos aumenta a medida que son ingeridos por otros, por lo que la ingesta de plantas o animales contaminados puede provocar síntomas de intoxicación. De hecho, la toxicidad de estos metales ha quedado documentada a lo largo de la historia: los médicos griegos y romanos ya diagnosticaban síntomas de envenenamientos agudos por plomo mucho antes de que la toxicología se convirtiera en ciencia (Lovera, D. et al., 2001).

Estudios muy recientes se han ocupado de la repercusión negativa de los metales pesados en la situación del ecosistema y la salud del ser humano; hoy en día se conoce mucho más sobre los efectos de estos elementos, cuya exposición está relacionada con problemas de salud como retrasos en el desarrollo, varios tipos de cáncer, daños en el riñón, e incluso, casos de muerte; la relación con niveles elevados de mercurio, oro y

plomo ha estado asociada al desarrollo de la autoinmunidad (el sistema inmunológico ataca a sus propias células tomándolas por invasoras).

La Agencia de Protección Ambiental (EPA) de los Estados Unidos ha determinado una serie de rangos límite para las concentraciones de metales pesados; por encima de éstos los metales pueden causar graves trastornos en los seres vivos, y finalmente ocasionar la muerte.

a. ESTÁNDARES DEL REGLAMENTO NACIONAL DE AGUA POTABLE

Tabla 4: Límites de concentración recomendados en el agua potable: Agencia de Protección Ambiental EPA 815-F-00-007 (Abril del 2000).

Contaminante	MNMC ¹ (mg/l)	NMC ² (mg/l)	Posibles efectos sobre la salud por exposición que supere el NMC	Fuentes de contaminación comunes en agua potable
Antimonio	0.006	0.006	Aumento de colesterol en sangre; descenso de azúcar en sangre (aumento de colesterolemia; hipoglucemia).	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; agua 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 (total)	0.1	0.1	Dermatitis alérgica.	Efluentes de fábricas de acero y papel; erosión de depósitos naturales.

Cobre	1.3	Nivel de acción= 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.	Corrosión de cañerías en el hogar; erosión de depósitos naturales; percolado de conservantes de madera.
Plomo	cero	Nivel de acción= 0.015	Bebés y niños: retardo en desarrollo físico o mental; los niños podrían 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 Inorgánico	0.002	0.002	Lesiones renales, cerebrales, neoplásicos, alteraciones del desarrollo.	Erosión de depósitos naturales; efluentes de refinерías y fábricas; lixiviados de vertederos y tierras de cultivo.

¹ Meta del Nivel Máximo del Contaminante (MNMC) Es el nivel de un contaminante en el agua potable por debajo del cual no se conocen o no se esperan riesgos para la salud. Los MNMC permiten contar con un margen de seguridad y no son objetivos de salud pública obligatorios.

² Nivel Máximo del Contaminante (NMC) - Es el máximo nivel permitido de un contaminante en agua potable. Los NMC se establecen tan próximos a los MNMC como sea posible, usando para ello la mejor tecnología de tratamiento disponible y teniendo en cuenta también los costos. Los NMC son normas obligatorias.

Tabla 5: Límites de concentración recomendados en las aguas de riego: Agencia de

Límite de Concentración recomendado en las aguas de riego (mg/L)			
Elemento	Conc. Max. *PLR (mg/L)	Conc. Max. *PCT (mg/L)	Observaciones
Aluminio (Al)	5.0	20	Puede producir improductividad de suelos ácidos, pero en suelos de pH entre 5 y 8 puede precipitar, eliminando así su toxicidad
Arsénico (As)	0.10	2.0	Tóxico para las plantas, varia desde niveles de 12 a 0.05 mg/L según el cultivo
Berilio (Be)	0.75	2.0	Tóxico para las plantas, varia desde niveles de 5 a 0.5 mg/L según el cultivo
Cadmio (Cd)	0.01	0.05	Tóxico para remolacha, habas y nabos a conc inferiores a 0.1mg/L
Cromo (Cr)	0.1	1.0	No incluido como elemento esencial para el crecimiento vegetal. Se recomienda estos límites dada la falta de conocimiento de toxicidad en cultivos
Cobalto (Co)	0.05	5	Tóxico para el tomate en conc de 1mg/L en soluciones nutritivas. Tiene la tendencia a neutralizarse en suelos alcalinos
Cobre (Cu)	0.2	5.0	Tóxico para numerosos cultivos, en conc de 0.1 a 1 mg/L en soluciones nutritivas. Inactivado por suelos neutros y alcalinos
Fluoruros	1.0	15.0	Inactivado en suelos alcalinos
Hierro (Fe)	5.0	20.0	No tóxico en suelos bien aireados, pero puede contribuir a la acidificación del suelo y a la inactivación de factores esenciales como el fósforo y el Molibdeno
Plomo (Pb)	5.0	10.0	Puede inhibir el crecimiento celular de plantas a conc muy altas
Vanadio (V)	0.1	1.0	Tóxico para muchos cultivos a inclusive a conc bajas
Zinc (Zn)	2.0	10.0	Tóxico para muchos cultivos, su toxicidad puede ser reducida con el incremento de pH (superior a 6)

Protección Ambiental EPA 815-F-00-007 (Abril del 2000)

***PLT= Períodos largos de tiempo; PCT= Períodos cortos de tiempo**

Límite de concentración recomendado para distintos elementos en las aguas de riego (Rowe et Abdel - Magid, 1995)

1) CARACTERÍSTICAS Y COMPORTAMIENTO DE LOS METALES PESADOS

Los metales pesados son elementos con elevados pesos atómicos, superiores a 44,956 y una densidad superior a 5 gr/cm³, excluyendo a los grupos Alcalino y Alcalinotérreo. Aunque algunos son imprescindibles para el desarrollo de las funciones vitales de los seres vivos, los denominados esenciales como cobalto, cobre, hierro, manganeso, molibdeno, zinc, vanadio y estroncio, en cantidades excesivas son perjudiciales e incluso letales para los seres vivos. Los metales pesados no esenciales comúnmente implicados en problemas de contaminación de las aguas subterráneas son: cromo, cadmio, mercurio, plomo, arsénico y antimonio (Kennish, 1992).

En las aguas superficiales, los metales pesados existen en forma de coloides, partículas, y como fases disueltas, aunque debido a su baja solubilidad estas últimas suelen presentar concentraciones muy bajas en forma iónica o complejos organometálicos. En las formas coloidales y partículas aparecen como hidróxidos, óxidos, silicatos, sulfuros, o adsorbidos en minerales del grupo de las arcillas, sílice y materia orgánica.

La solubilidad de los metales pesados en las aguas superficiales está controlada por el pH, el tipo de ligantes en los que se encuentran adsorbidos, el estado de oxidación de las fases minerales y el ambiente redox del sistema (Connell et al, 1984).

La química del agua controla la tasa de adsorción/desorción de los metales hacia y desde el acuífero. La adsorción elimina el metal del agua y lo almacena en el acuífero, mientras que la desorción devuelve los metales al agua, favoreciendo su movilización. La desorción de los metales suele producirse debido a los siguientes cambios físico-químicos en el agua:

- *Aumento de la salinidad.* Se produce una competitividad entre los metales y los cationes
- *Disminución del potencial redox.* Normalmente bajo condiciones deficitarias de oxígeno
- *Disminución del pH.* Se produce un incremento de la competitividad entre los metales y los iones de hidrógeno, además de producirse una disolución de los complejos metal-carbonato, liberándose los iones del metal en el agua.

Las principales transformaciones de los metales pueden ser directas, por medio de cambios en el estado de valencia cuando actúan como donantes o receptores de electrones, e indirectas, por medio de agentes oxidantes y reductores producidos por los microorganismos y que son responsables de cambios en el pH y del potencial redox (McCullough et al, 1999).

2) FACTORES QUE DETERMINAN LA MOVILIDAD DE LOS METALES PESADOS EN EL SUELO

pH, A menor pH (suelos ácidos) mayor solubilidad de los metales, y por tanto mayor movilidad de éstos, con lo que se incrementa la toxicidad para las plantas. Un buen remedio para evitar el problema consiste en el control del pH, evitando la aplicación del lodo a suelos ácidos susceptibles de recibir vertidos ácidos.

Contenido de materia orgánica. Los suelos que presentan contenidos de materia orgánica superiores al 5%, exhiben un nivel relativamente bajo de captura de metales por las plantas, debido a la alta capacidad de asociación de las moléculas orgánicas. No obstante, a medida que la materia orgánica se degrada, las formas moleculares resultan ser más sencillas, con lo que el proceso de retención de metales disminuye, favoreciendo la lixiviación de los mismos y permitiendo su movilización.

Potencial redox. Las condiciones reductoras favorecen la solubilización de los metales presentes en los suelos.

3) POTENCIAL DE OXIDO-REDUCCIÓN

La medida del potencial redox, tiene gran importancia en estudios de medio ambiente y de corrosión; muy a menudo, la búsqueda de métodos elaborados para estudiar las especies complejas presentes en el medio ambiente ha hecho que no se preste la suficiente atención a parámetros básicos que, por su metodología, requieren de equipo sencillo pero son capaces de proporcionar datos importantes sobre las condiciones en que se encuentra el medio natural, así como sobre el efecto de agentes contaminantes. Uno de estos parámetros es el potencial redox, E_H . La medida del potencial redox en medios

naturales demuestra la capacidad de óxido-reducción del sistema, causada directamente por las condiciones químicas de éste, que muy a menudo son inducidas por actividades microbiológicas (por ejemplo, bacterias sulfato-reductoras y ferrobacterias).

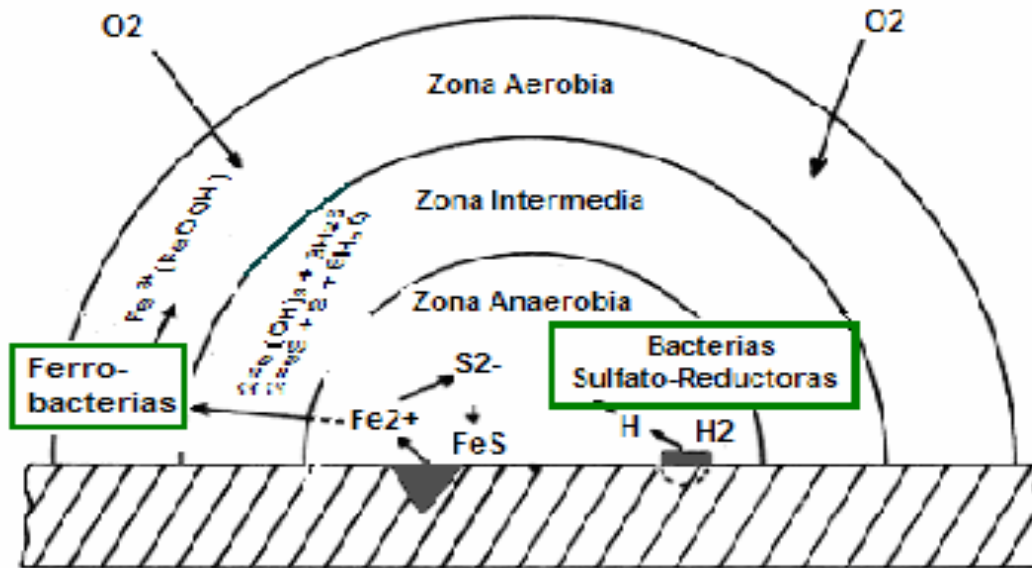


Figura 4: Formación de una vesícula gelatinosa en un proceso electroquímico de corrosión.

El potencial de oxidación-reducción es responsable de que el metal se encuentre en estado oxidado o reducido. A continuación se describe el comportamiento de los metales pesados frente a un de cambio en las condiciones ambientales. (1) Cambio directo en la valencia de ciertos metales; por ejemplo, en condiciones reductoras el Fe^{3+} se transforma en Fe^{2+} , los iones reducidos son mucho más solubles. (2) Las condiciones redox pueden afectar indirectamente la movilidad de metales. Así muchos metales están asociados o adsorbidos a hidróxidos de Fe y Mn, no son estables a Eh bajos y se convierten en FeS o $FeCO_3$ dependiendo de las condiciones químicas, cuando esto ocurre los metales que estaban asociados con los hidróxidos de Fe y Mn se movilizan. (3) En ambientes muy reductores el Fe se puede combinar con el S^{2-} hasta convertirse en pirita. Cuando los suelos y sedimentos contienen cantidades significantes de pirita y aumenta el Eh (creación de condiciones mas oxidantes) el S^{2-} se oxida a SO_4^- liberando cantidades de H_2SO_4 , el suelo se acidifica fuertemente y los metales se hacen muy solubles (Kennish, 1992).

7. BIO-REMEDIACIÓN DE LA CONTAMINACIÓN POR DAM UTILIZANDO SISTEMAS BIOLÓGICOS (BSR)

Los tratamientos de remediación utilizando microorganismos son en general más económicos, específicos y adecuados a concentraciones variables de contaminantes, cuando se los compara con otro tipo de tratamientos. Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre para compuestos orgánicos, los metales no pueden ser degradado; por esta razón, la bioremediación de los metales implica la precipitación de los mismos utilizando sistemas biológicos de bacterias sulfatoreductoras, capaces de producir sulfuro de hidrógeno, de capacidad precipitante. Esta capacidad permite utilizar los sistemas biológicos en la remoción de metales presentes en aguas, sedimentos industriales o tierras contaminadas con metales pesados.

a. PRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS CONTAMINANTES CON SULFURO DE HIDRÓGENO BIOGÉNICO

La bioprecipitación (biomineralización) sigue el proceso inicial de conjunción de iones metálicos a metabolitos generados por la célula (creando ambientes sobresaturados), los compuestos metálicos insolubles precipitan (y cristalizan) como iones metálicos combinados con aniones específicos producidos por el metabolismo celular. El proceso es lento e irreversible y depende de factores como la temperatura, el pH y el metabolismo celular.

La bioprecipitación es generalmente no específica dependiendo particularmente de la solubilidad del compuesto metálico. Los grandes beneficios del proceso son; (a) una elevada proporción de metal a biomasa; (b) la proporción de material altamente cristalino fácil de separar, y (c) el hecho de que el precipitado resultante tiene un bajo contenido de materia orgánica; todas ellas son las posibles ventajas de la recuperación de metales (Kotbra, et al., 2000).

Uno de los mecanismos biológicos mejor conocido para la precipitación de metales, es la producción de sulfuro de hidrógeno por las bacterias sulfato reductoras (BSR), que juegan un papel crucial en la inmovilización de sulfuros de metal en sedimentos anaeróbicos que contienen altas concentraciones de metales.

Examinando el crecimiento de biopelículas (biofilms) bacterianas en cultivos continuos de bacterias sulfato reductoras (BSR), el fenómeno de bioremediación puede ser atribuido al depósito de sulfuros metálicos en la superficie del biofilm o en la fase líquida, seguido del atrapamiento de los sulfuros metálicos por los exopolímeros o soportes (Kolmert, A. et al., 1999).

8. BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) fueron descubiertas por Beijerinck en 1895, constituyen un grupo fisiológico y filogenéticamente diverso, que contribuye con funciones importantes en ambientes anaeróbicos y son un grupo muy antiguo que podría haberse originado hace más de 750 millones de años (Valls, et al., 2002).

El nombre de “bacterias sulfato reductoras”, se aplica convencionalmente, a las bacterias que realizan la reducción desasimilatoria de sulfato; las BSR utilizan el sulfato como aceptor final de electrones, con la consiguiente producción de sulfuro; que es liberado al medio en su mayor parte. Las BSRs de característica anaerobia estricta o aerotolerante; son ubicuas y tienen vital importancia en los ciclos biogeoquímicos del carbono y principalmente del azufre (Achá, et al., 2004).



Figura 5: Interacciones principales de las bacterias sulfato reductoras, adaptado de Barton y Tomei (1995).

Las BSRs además de participar en el ciclo del azufre, están involucradas en la biodegradación de hidrocarburos, en la remoción de metales pesados de drenajes ácidos de mina, reducción de uranio, tratamiento de aguas residuales, en la salud humana y en la metilación del mercurio (Achá, et al., 2004). Estas bacterias son de gran interés económico, debido a que las petroleras pierden grandes sumas de dinero por la corrosión provocada por estas bacterias; sus aplicaciones industriales son diversas. Aunque aun intrigante, su importancia ecológica es indudable, y constantemente se encuentran nuevos papeles ecológicos para representantes de este grupo (Figura 4).

a. CLASIFICACIÓN DE LAS BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS

Las BSR son un conjunto anaeróbico heterogéneo de Bacteria y Archaea, las cuales llevan a cabo la reducción desasimilatoria de sulfato; como grupo tienen la capacidad de metabolizar una amplia variedad de compuestos, empezando por el hidrógeno, compuestos orgánicos de cadena sencilla, como metanol, etanol, ácido acético, ácido láctico (AGVs), hasta tolueno, hexadecanos e incluso compuestos aromáticos.

Los cultivos de BSR pueden ser obtenidos a temperatura variable, desde condiciones psicrófilas a hipertermófilas, y a concentraciones salinas empezando desde agua dulce hasta condiciones hipersalinas; si bien poseen una gran diversidad morfológica, la reducción desasimilatoria de sulfato es un proceso unificado. Las BSR pueden estar comprendidas en dos grupos de acuerdo a su utilización de fuente de carbono. El grupo I utiliza sustratos como el lactato, piruvato, etanol y ciertos ácidos grasos, como fuente de carbono y energía. Los géneros del grupo II se especializan en la oxidación de ácidos grasos volátiles, particularmente acetato (Kolmert, A. et al., 1999).

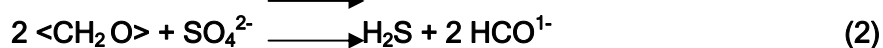
Entre ambos procesos hay una gran extensión de diversidad morfológica, desde cocoides (*Desulfobacula*, *Desulfacinum*), y ovoides (*Desulfobulbus*), hasta bacilos (*Desulforhabdus*, *Desulfomicrobium*) y vibrios (*Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfotomaculum*), incluso fueron encontradas bacterias filamentosas largas (*Desulfonema*), y sarcinas (*Desulfosarcina*). La diversidad es mucho mayor si se comparan otros rasgos fenotípicos, como las formas esporuladas (*Desulfotomaculum*), termófilos (*Thermodesulfobacterium*, *Archaeoglobus*).

Tabla 6: Algunos géneros comunes de BSR, de acuerdo a la utilización de fuente de carbono.

GRUPO I	<i>Desulfovibrio,</i>	<i>Desulfomicrobium,</i>	<i>Desulfobotulus,</i>
No oxidadores de acetato	<i>Desulfotomaculum,</i>	<i>Desulfomonile,</i>	<i>Desulfobacula,</i>
	<i>Archaeoglobus,</i>	<i>Desulfobulbus,</i>	<i>Thermodesulfobacterium</i>
GRUPO II	<i>Desulfobacter,</i>	<i>Desulfobacterium,</i>	<i>Desulfococcus,</i>
Oxidadores de acetato	<i>Desulfonema,</i>	<i>Desulfosarcina,</i>	<i>Desulfobarculius,</i>
	<i>Desulfacinum,</i>	<i>Desulforhabdus,</i>	<i>Thermodesulforhabdus</i>

b. METABOLISMO DE LAS BSR

Metabólicamente las BSR están estrechamente unidas por su capacidad de reducir sulfatos a sulfuro de hidrógeno, esta es la principal característica que define la inclusión de diversas bacterias y archaeas a este grupo; no obstante, el resto de su metabolismo es variado y hasta ahora poco comprendido. Recientemente las BSR han ganado un interés tecnológico considerable, por su uso potencial en sistemas de remoción de sulfato y metales pesados de aguas contaminadas ricas en metales, la reacción básica mediada por las BSR es la siguiente:



Donde la fuente de carbono (<CH₂O>) constituye el donador de electrones y el sulfato es el aceptor final de electrones. El producto de esta reducción, es el sulfuro, que forma complejos insolubles con la mayoría de iones metálicos divalentes, Las BSR son anaeróbicas pero más tolerantes a ambientes oxigenados de lo esperado por bacterias anaeróbicas; esta es una característica que mejora su disponibilidad para propósitos de remediación (Kolmert, A. et al., 1999).

1) CICLO DEL AZUFRE

El azufre es un nutriente secundario requerido por plantas y animales para realizar diversas funciones, además está presente en prácticamente todas las proteínas y de esta manera es un elemento absolutamente esencial para todos los seres vivos.

El azufre circula a través de la biosfera de la siguiente manera; por una parte comprende el paso desde el suelo o bien desde el agua, si hablamos de un sistema acuático, a plantas, animales y regresa nuevamente al suelo o al agua.

Algunos de los compuestos sulfúricos presentes en la tierra son llevados al mar por los ríos, el azufre es devuelto a la tierra por un mecanismo que consiste en convertirlo en compuestos gaseosos tales como el ácido sulfhídrico (SH_2) y el dióxido de azufre (SO_2), estos penetran en la atmósfera y vuelven a tierra firme, generalmente son lavados por las lluvias, aunque parte del dióxido de azufre puede ser directamente absorbido por las plantas desde la atmósfera.

La exposición de rocas a la intemperie extrae sulfatos, los que recirculan en los ecosistemas. En los lodos reducidos, el azufre recircula gracias a las bacterias reductoras del azufre (BSR) que reducen sulfatos y otros compuestos similares a sulfuros, en el ciclo también participan las bacterias desnitrificantes, que oxidan los sulfuros a sulfatos.

Las bacterias desempeñan un papel crucial en el ciclo del azufre, cuando está presente en aire, la descomposición de los compuestos del azufre (incluyendo la descomposición de las proteínas) produce sulfato (SO_4^-). Bajo condiciones anaeróbicas es producido el ácido sulfúrico y el sulfuro de dimetilo o DMS (CH_3SCH_3). Cuando estos últimos gases llegan a la atmósfera, son oxidados y se convierten en bióxido de azufre (SO_2). La oxidación posterior del bióxido de azufre y su disolución en el agua de lluvia produce ácido sulfhídrico y sulfatos, formas principalmente bajo las cuales regresa el azufre a los ecosistemas terrestres (Lenntech, et al., 1998).

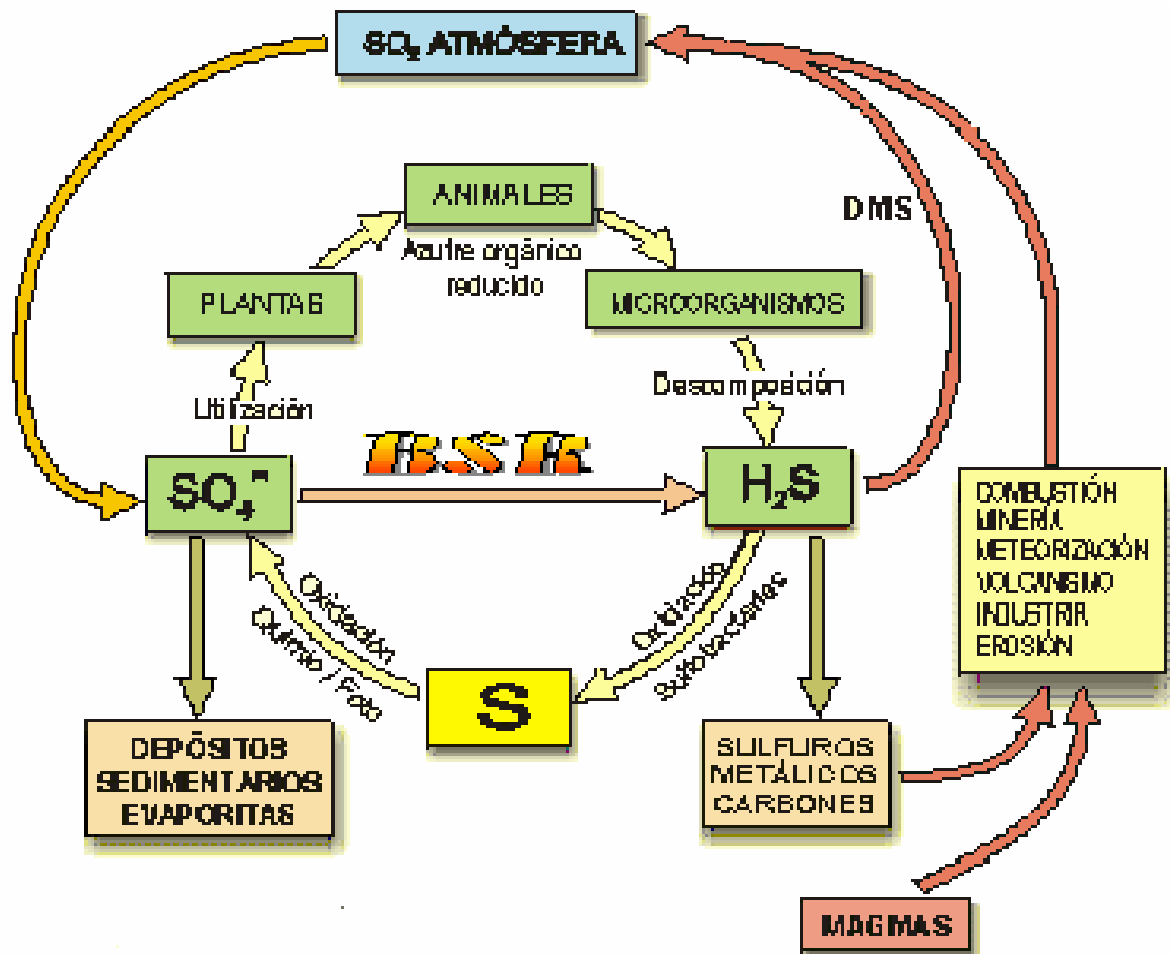
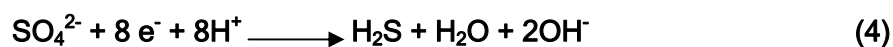


Figura 6: Ciclo del azufre en el que se hallan involucradas las bacterias sulfato reductoras (Desulfovibrio sp).

2) REDUCCIÓN MICROBIANA DE SULFATO

Una amplia variedad de organismos pueden usar el sulfato como fuente de azufre y llevar a cabo la reducción asimilatoria de sulfato, convirtiendo el sulfato a sulfuro orgánico (R-SH). Sin embargo, la reducción desasimilatoria de sulfato, en la cual el sulfato es usado como aceptor de electrones (reacción generadora de energía), es llevada a cabo solo por las bacterias sulfato reductoras (Kolmert, A. et al., 1999).



El sulfato es reducido a sulfuro de hidrógeno, la reacción también genera alcalinidad, la cual es aún otra ventaja en la remediación de aguas acídicas contaminadas por metales pesados.

9. SISTEMAS DE CULTIVO

El equipo en el que se realiza el proceso de digestión anaeróbica o tratamiento de aguas contaminadas utilizando sistemas biológicos se denomina bioreactor o fermentador. El mismo provee todos los servicios que son necesarios para el cultivo, tales como mezclado, termostatación, entradas para adición de nutrientes, control del pH, etc. Por otra parte, cuando se habla de sistemas de cultivo o métodos de cultivo, se hace referencia al modo de operar del bioreactor, ya sea en forma continua o discontinua.

Para un componente cualquiera del cultivo, incluida la biomasa, se puede plantear el siguiente balance de materia en el bioreactor (ver Figura 7).

$$\begin{array}{cccccc} \text{Velocidad de} & = & \text{velocidad} & - & \text{velocidad} & + & \text{velocidad} & - & \text{velocidad} \\ \text{Acumulación} & & \text{ingreso} & & \text{salida} & & \text{formación} & & \text{consumo} \end{array}$$
$$\frac{d(V C_i)}{dt} = F_1 C_{i1} - F_2 C_i + V r_{fi} - V r_{ci} \quad (1)$$

Donde V es el volumen de cultivo, F 1 es caudal de alimentación, F 2 el de salida, C_{i1} la concentración del componente "i" en la alimentación y C_i la concentración en el caudal de salida, si el cultivo esta bien mezclado, se puede asumir idéntica a la que hay dentro del bioreactor. Los restantes términos, r_{fi} y r_{ci} se refieren a la velocidad de formación y consumo del componente "i" respectivamente (Pirt, et al. 1975).

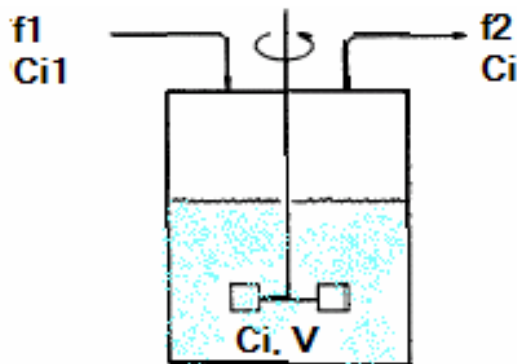


Figura 7: Esquema de un bioreactor con indicación de caudales y concentraciones a la entrada y a la salida. La flecha que rodea el eje del agitador significa que el cultivo esta perfectamente mezclado.

Por otra parte el volumen de cultivo variará en el tiempo según sean F_1 y F_2 . Ahora bien, dependiendo de como sean F_1 y F_2 surgen, básicamente, dos sistemas de cultivo:

- *Batch*; ambos caudales son nulos por lo que V es constante y en la ecuación (1) se anulan los términos $F_1 C_{i1}$, $F_2 C_i$. La duración del cultivo batch es limitada en el tiempo y depende esencialmente de las condiciones iniciales del cultivo. Una vez inoculado el medio, la concentración de biomasa aumenta a expensas de los nutrientes y cuando el sustrato que limita el crecimiento se agota, finaliza el batch (Pirt, P. et al., 1975).

$$\frac{d C_i}{dt} = V r_{fi} - V r_{ci} \quad (2)$$

- *Cultivo continuo*; ambos caudales son iguales, V es constante, por lo tanto la ecuación se reduce a:

$$V * \frac{d C_i}{dt} = F (C_{i1} - C_i) + V (r_{fi} - r_{ci}) \quad (3)$$

A continuación se analiza con más detalle los sistemas vistos aplicando en particular los balances de materia a la biomasa, X , al producto, P , y al sustrato limitante de crecimiento, S . Para el primero es necesario considerar la cinética de formación r_X y r_P respectivamente, con lo cual $r_{ci} = 0$. Para el sustrato se tiene el caso inverso y sólo

deberá considerarse la velocidad de consumo, r_s . Si por las características del proceso, la lisis celular o la descomposición del producto son importantes, deberá incluirse en el balance un término adicional que contemple este aspecto.

a. CULTIVO CONTINUO

Para poner en marcha un cultivo continuo, se realiza previamente un cultivo batch y en un momento dado se comienza a alimentar con medio fresco a un caudal F y por un rebalse se mantiene el volumen constante.

El caudal de salida contendrá células, medio de cultivo parcialmente agotado y, eventualmente, algún producto. Si alimentamos con medio fresco significa que: $X_1 = 0$ y $P_1 = 0$, por lo que sólo deberemos considerar la concentración de sustrato limitante del crecimiento, S_1 , en la alimentación. En estado estacionario las concentraciones dentro del bioreactor permanecerán constantes en el tiempo, de la primera, y teniendo en cuenta que $r_X = u_x$, resulta:

$$\frac{F}{V} = D = \mu \quad (4)$$

Donde D = Velocidad de dilución, este valor nos permite determinar los parámetros de crecimiento, en función a los tiempos de retención del sustrato (Pirt, P. et al., 1975).

$$\mathcal{T} = 1/D \quad (5)$$

V. OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones adecuadas de laboratorio para la biogénesis de sulfuro de hidrógeno llevada a cabo por un consorcio de bacterias sulfato reductoras, empleando ácidos grasos volátiles como fuente de carbono y energía, producidos por la hidrólisis enzimática de residuos orgánicos municipales como los vegetales y la fruta en descomposición.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la actividad enzimática de un consorcio microbiano aerobio/anaeróbico hidrolítico de vegetales y fruta, mediante la cuantificación de azúcares reductores, proceso realizado en el bioreactor de hidrólisis.
- Determinar la producción biogénica de sulfuro de hidrógeno, llevada a cabo por un consorcio de bacterias sulfatoreductoras en el bioreactor anaerobio de sulfidogénesis.
- Optimizar la producción de Sulfuro de Hidrógeno mediante la aplicación de diseños factoriales, determinando condiciones adecuadas de cultivo para el mejoramiento en el proceso de producción.
- Evaluar la capacidad del Sulfuro de Hidrógeno biogénico para precipitar cationes divalentes presentes en un efluente artificial contaminado con metales pesados, simulando las concentraciones presentes en el drenaje ácido del Centro minero Bolívar; realizando un análisis químico mediante espectrofotometría de absorción atómica, y métodos potenciométricos.

VI. DISEÑO METODOLÓGICO

A. MATERIAL BIOLÓGICO

El sistema de bioreactores estuvo constituido por dos consorcios microbianos con actividad diferente. En el bioreactor de hidrólisis se utilizó un consorcio microbiano de capacidad hidrolítica (lodo activado), éste fue colectado en una Planta de Tratamiento de Aguas Residuales en Elingö - Suecia, a condiciones variables de temperatura (-4°C - 30°C), y a un pH aproximado a 7.5 - 8 (Cirne et al., 2003).

El bioreactor de sulfidogénesis estuvo constituido por un consorcio de bacterias sulfatoreductoras denominado CLD3a (aun no identificado por pruebas moleculares), proveniente de una muestra de lodo colectada de un efluente industrial de la Cervecería Huari del departamento de Oruro - Bolivia a condiciones de temperatura de 10° C y pH de 7.5; se escogió este consorcio bacteriano debido a que se realizaron pruebas preliminares, y se establecieron algunos parámetros óptimos para su desarrollo y condiciones adecuadas para la producción de sulfuro de Hidrógeno (Mendieta et al., 2002).

B. ACTIVACIÓN DE CONSORCIOS - PREPARACIÓN DE INÓCULOS

1. CONDICIONES DE CULTIVO BATCH

Para la activación de los consorcios y preparación de inóculos se establecieron tres bioreactores con capacidad volumétrica de 200 mL utilizando la técnica de Hungate (1965), bajo condiciones de cultivo estacionarias, es decir cultivo Batch. La siguiente figura detalla las características de los sistemas.

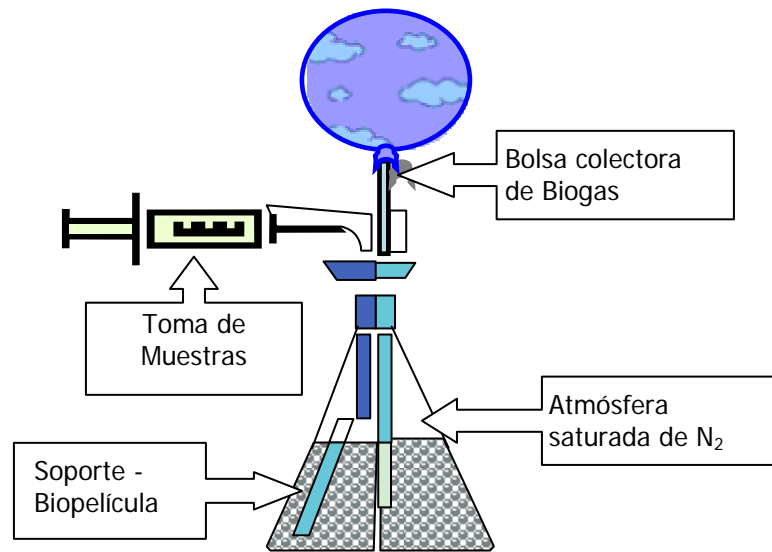


Figura 8: Bioreactor para cultivo anaeróbico Batch, activación y establecimiento del biofilm (Técnica de Hungate, 1965).

El sistema detallado anteriormente, fue utilizado para la activación de ambos consorcios microbianos, con la diferencia del soporte utilizado para el establecimiento de la biopelícula durante el incremento de la biomasa. El desarrollo del consorcio bacteriano sulfidogénico fue inmovilizado en un soporte denominado Poraver (Material de vidrio reciclado, inerte y poroso), estudiado previamente (Álvarez. Et al., 2002),

Para la activación del consorcio microbiano no se utilizó un soporte específico, debido a que los vegetales y frutas, constituyeron el soporte como superficie de inmovilización. Los cultivos batch se establecieron a condiciones de temperatura ambiente, y pH neutro, durante un tiempo de treinta días.

a. CONSORCIO MICROBIANO HIDROLÍTICO

EL consorcio microbiano con actividad hidrolítica fue activado en dos medios de cultivo diferentes, para realizar el control del desarrollo microbiano (medio comercial) y la actividad hidrolítica (medio complejo).

Para la activación de este consorcio se utilizó la Técnica de Hungate (1973), inoculando 4 mL de una suspensión microbiana (2%) en un matraz erlenmeyer que contenía 200 mL de

Medio definido comercial Scharlaw Anaeróbico Fluido (AFM), para posteriormente saturar la atmósfera aérea con N₂ como indica la técnica mencionada (Ver Anexos).

El mismo consorcio fue activado por hidrólisis enzimática de vegetales y frutas en descomposición; para ello se inoculó 4 mL de la misma suspensión microbiana (2%), en 100 mL de medio basal 11 modificado, conteniendo 100 g de una mezcla de vegetales y fruta en las mismas proporciones (25 g tomate, 25 g manzana, 25 g plátano y 25 g papaya), posteriormente se suplementó este medio complejo con una solución de vitaminas (Pfenning et al., 1981), utilizando también la Técnica de Hungate (Ver Anexos).

b. CONSORCIO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS (BSR)

Para la activación del consorcio CLD3a de BSR, se utilizó un medio de enriquecimiento definido, denominado Postgate B (Postgate et al., 1984), para ello se inoculó 5 mL de una suspensión del consorcio CLD3a (5%), en 100mL de medio de cultivo. Para el establecimiento de la biopelícula e inmovilización bacteriana, el bioreactor fue empacado con Poraver como soporte , el cultivo se desarrolló bajo condiciones anaeróbicas estrictas (Hungate et al., 1969).

C. CONDICIONES DE CULTIVO CONTINUO

1. CONSTRUCCIÓN DEL SISTEMA DE BIOREACTORES

Una vez que preparados los inóculos mediante su activación, se estableció un sistema continuo de dos bioreactores interconectados entre si por un tubo Tygone y una serie de accesorios indispensables para el desarrollo del cultivo, como ser conectores de diverso tamaño, sujetadores metálicos y plásticos, jeringas, etc; ambos bioreactores estuvieron conectados a bolsas colectoras de biogas. El cultivo continuo se desarrolló a temperatura ambiente, durante un tiempo de seis meses.

COMPONENTES DEL SISTEMA DE BIOREACTORES:

- Bioreactor de Hidrólisis
- Bioreactor de Sulfidogénesis
- Trampa de precipitación de metales pesados

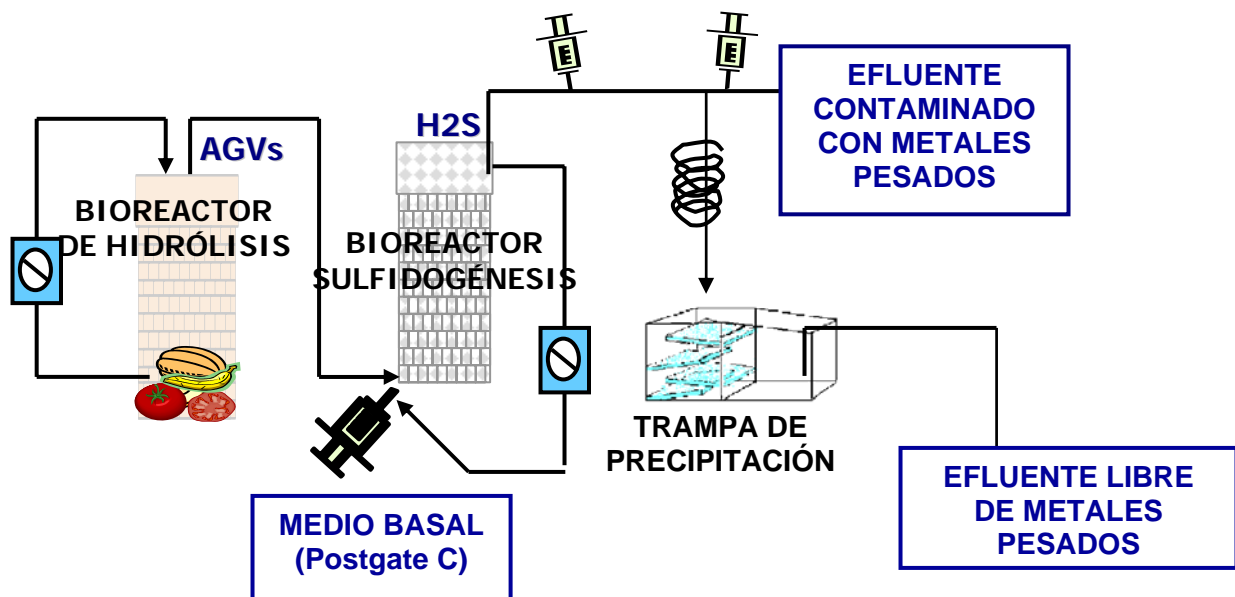


Figura 9 : Sistema de bioreactores en cultivo continuo.

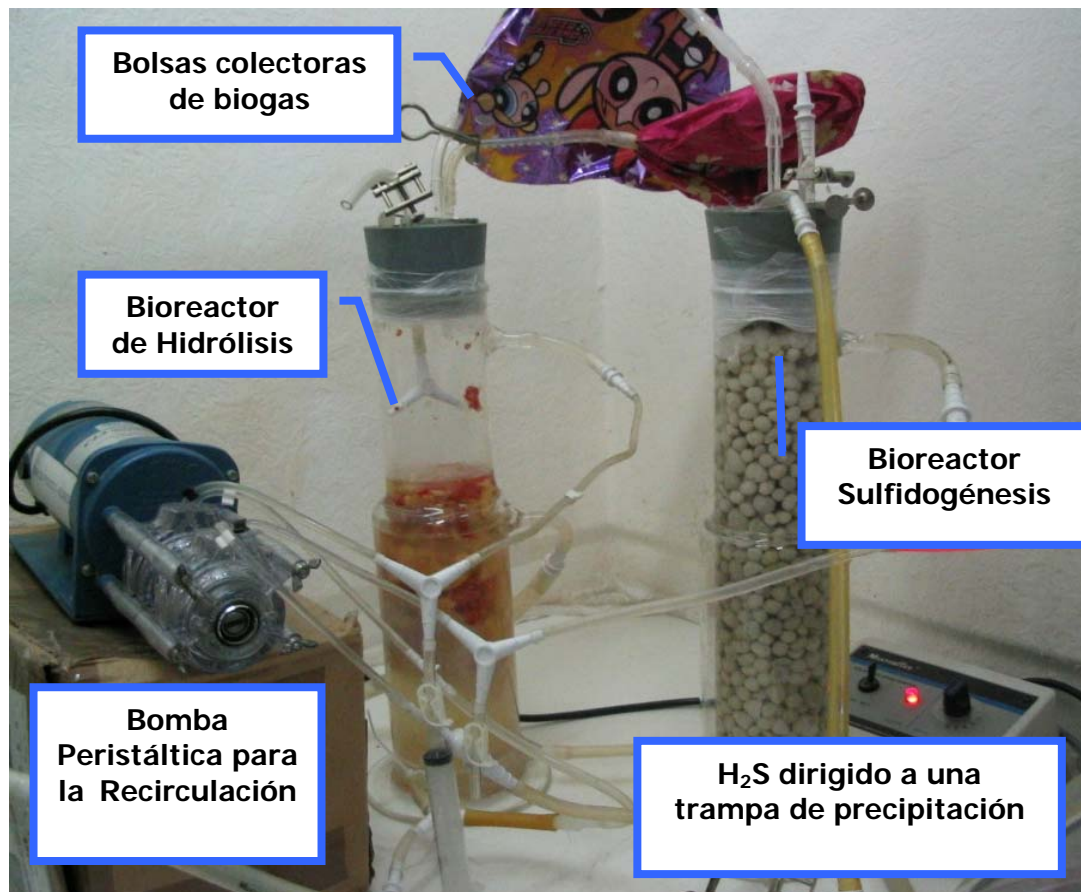


Figura 10 : Sistema de bioreactores en cultivo continuo.

a. BIOREACTOR DE HIDRÓLISIS

El bioreactor de hidrólisis de 1160 mL con capacidad útil de 500 mL fue llenado con 225 g de una mezcla proporcional de vegetales y fruta fresca (75 g tomate, 75 g manzana y 75 g plátano) y aproximadamente 75 g de fruta en descomposición, proveniente del cultivo batch para la activación, a esta mezcla se adicionó 500 mL de agua potable, y posteriormente se inoculó 50 mL de una suspensión microbiana activada en el cultivo batch, el contenido de este bioreactor se encontraba en constante recirculación interna impulsada por una bomba peristáltica de dos canales a una velocidad de 16 rpm (8 mL/min), manteniendo de esta forma una velocidad de crecimiento constante (μ).

En este bioreactor se produjo la hidrólisis enzimática de los vegetales y frutas, cuyo producto son los Ácidos Grasos Volátiles (AGVs); éstos fueron dirigidos al bioreactor de sulfidogénesis a través de un tubo tygon, que conectaba ambos sistemas.

b. BIOREACTOR DE SULFIDOGÉNESIS

Se utilizó un bioreactor UASB (Upflow Anaerobic Packed Bed Reactor) de 1160mL con capacidad útil de 535 mL, para la producción de Sulfuro de Hidrógeno, éste fue empacado con poraver en su totalidad (soporte químicamente inerte, de porosidad mayor al 90%) para el establecimiento del biofilm (inmovilización de BSR) y llenado con 535 mL de Medio Postgate C modificado (Ver Anexos); se inoculó 50 mL de una suspensión bacteriana proveniente del cultivo batch para la activación del inóculo, y el contenido líquido del bioreactor se encontraba en constante recirculación impulsada por una bomba peristáltica a una velocidad de 16 rpm (8 mL/min) manteniendo de esta forma la velocidad de crecimiento (μ). El bioreactor además fue conectado a un tubo tygone de salida o rebalse diario de Sulfuro de Hidrógeno dirigido a una trampa de precipitación de metales pesados.

c. TRAMPA DE PRECIPITACIÓN DE METALES PESADOS

Para el proceso de bioprecipitación se preparó una solución de metales conteniendo Cobre (7.84 mg/L), Plomo (3.68 mg/L) y Zinc (8.94 mg/L), concentraciones similares al drenaje ácido de la mina Simón Bolívar del departamento de Potosí - Bolivia (Aguilar et al., 2002).

Se desarrolló el proceso de bioprecipitación de metales con la adaptación de una trampa de precipitación al sistema de bioreactores; donde el tubo salida o rebalse del bioreactor de sulfidogénesis, fue conectado un tubo de alimentación de un efluente artificial contaminado con metales pesados mencionados anteriormente, Ambos el Sulfuro de Hidrógeno y el efluente artificial se mezclaron en un tubo espiral, para después ser esta mezcla conducida a una trampa de precipitación de metales.

La trampa de precipitación fue construida en vidrio de acuerdo a las características descritas a continuación.

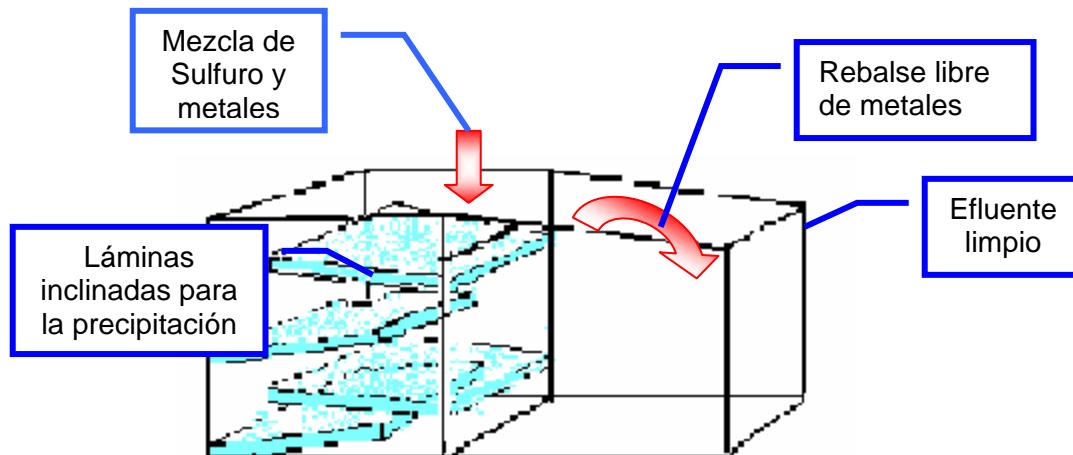


Figura 11: Trampa de precipitación de un efluente contaminado, tratamiento con sulfuro de hidrógeno de origen biogénico.

2. MONITOREO DE BIOREACTORES DE HIDRÓLISIS Y SULFIDOGÉNESIS

La alimentación del sistema fue dada en determinados periodos de tiempo variantes para ambos bioreactores. En el bioreactor de hidrólisis se llevó a cabo la retroalimentación negativa respecto a la producción de ácidos grasos volátiles (AGVs) y/o actividad enzimática, es decir que se cambió la carga orgánica (vegetales y fruta) al término de la actividad enzimática o cuando no se registró la producción de AGVs; la nueva carga sustituida contenía las mismas proporciones del sustrato inicial; además se adicionó un volumen de 50 mL de agua potable por mes para mantener el medio acuoso para la reacción enzimática.

En el bioreactor de sulfidogénesis se proporcionó una alimentación por pulsos diarios de AGVs y medio de cultivo durante un periodo de 140 días, en los primeros seis tiempos de retención (60 días) la alimentación se realizó por pulsos diarios de 0.5 mL de AGVs (Producto de la hidrólisis del primer bioreactor) y 49.5 mL de medio Postgate C

modificado (carente de fuente de carbono), de acuerdo a una velocidad de crecimiento de $0.1d^{-1}$, y un valor de dilución del bioreactor de 1/100 respecto a los AGVs.

Debido a los resultados poco favorables bajo estas condiciones de alimentación los siguientes seis tiempos de retención se mantuvo constante la velocidad de crecimiento pero se varió la dilución de AGVs a 1/50, por lo cual los pulsos de alimentación diarios fueron de 1 mL AGVs y 49 mL de medio Postgate C modificado, los resultados obtenidos con esta modificación fueron aceptables, pero posteriormente se realizaron nuevas modificaciones.

Durante los últimos setenta días de cultivo se realizó una nueva modificación en la alimentación del bioreactor, variando ambas características, la velocidad de crecimiento fue de $0.05d^{-1}$, y el valor de dilución respecto a los AGVs fue de 1/20, los pulsos de alimentación se realizaron tres veces por semana, y fueron de 2.5 mL de AGVs y 47.5 de medio Postgate C modificado.

Como se explicó con anterioridad el proceso de bioprecipitación de metales se realizó con la adaptación de una trampa de precipitación al sistema; para ello se conectaron dos sistemas a su vez, el rebalse diario del bioreactor que fue de aproximadamente 25 mL/día y un rebalse de la misma magnitud (25 mL/día) de un efluente artificial contaminado con metales pesados, ambos el Sulfuro de Hidrógeno y el efluente artificial se mezclaron en un tubo espiral, para después ser conducida la mezcla (50 mL) a la trampa de precipitación de metales; se tomaron 15 mL diarios del rebalse de este sistema para posteriores análisis.

En el sistema de bioreactores se realizaron determinaciones analíticas específicas dos veces por semana; en el bioreactor de hidrólisis se realizaron determinaciones analíticas como control de pH, determinación de la actividad enzimática (celulasas, xilanasas y amilasas), determinación de la producción de Ácidos Grasos Volátiles; en el bioreactor de sulfidogénesis se realizó la determinación de la producción de sulfuro de hidrógeno cuali y cuantitativa, determinación de la concentración de sulfato remanente no reducido, determinación del consumo de AGVs, determinación del potencial de oxido reducción.

En el sistema de precipitación de metales pesados se realizaron determinaciones de la concentración de sulfuro de hidrógeno producido, y sulfato remanente, los controles de pH y potencial redox.

a. TOMA DE MUESTRAS

Para el control diario y determinaciones analíticas realizados en el sistema de bioreactores y precipitación, se tomaron diez mililitros de muestra por semana, utilizando jeringas estériles de plástico (10mL), inmediatamente después de la toma las muestras fueron filtradas a través de una membrana milipore de 0.45 μ m, y posteriormente fueron realizados los respectivos análisis.

D. OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO PARA LA PRODUCCIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO

Para la optimización de las condiciones de cultivo adecuadas para la producción de sulfuro de hidrógeno se realizaron una serie de experimentos a través del establecimiento de diseños factoriales que nos permitan revelar los parámetros adecuados para la optimización del proceso.

El diseño factorial nos introduce al análisis multivariable que implica encontrar la relación matemática que explica el comportamiento de una variable dependiente (Producción de Sulfuro de Hidrógeno) a partir de dos variables independientes (Concentración de Sulfatos y Ácidos grasos volátiles). En este sentido se realizó el estudio de un diseño factorial basado en concentraciones variables de Sulfato y Ácido acético como representante de los ácidos Grasos Volátiles totales, los resultados del mismo determinaron las características de un segundo diseño factorial, donde las concentraciones variables de Sulfato y Ácidos Grasos Volátiles fueron estudiadas.

1. DISEÑO FACTORIAL Nº 1

Se realizaron nueve experimentos (diseño factorial 3^2) cada uno de ellos por triplicado, para este primer diseño factorial se prepararon 27 viales de 50 mL conteniendo 40 mL

del medio de cultivo Postgate C modificado cuya composición es descrita en anexos, estos fueron inoculados con 0.8 mL de una suspensión de BSR, extraída del bioreactor de sulfidogénesis. Para la preparación de los viales se utilizó la Técnica de Hungate (1965) para el cultivo de anaerobios estrictos, creando una atmósfera saturada de N₂.

En esta primera serie de experimentos se utilizó ácido acético (representante de los AGVs), como donador de electrones y fuente de carbono; y medio Postgate C modificado como fuente de Sulfato, y micronutrientes.

Al inicio, intermedio y final del experimento se realizaron pruebas analíticas como la determinación de la producción de Sulfuro de Hidrógeno, reducción de Sulfato, y al final del experimento se determinó el consumo de Ácido Acético o AGVs.

Para la realización del diseño factorial se preparó un medio basal Postgate C (Ver Anexos), este medio fue alicuotado en tres partes y a cada alícuota se le añadió una cantidad determinada de Na₂SO₄ de manera que la concentración final de sulfato de cada alícuota fuera de 44mM, 32mM y 20mM, para finalmente añadir proporciones adecuadas de ácido acético como donador de electrones, como se observa en la siguiente tabla:

Tabla 7: Esquema del Diseño factorial N°1: Variables independientes (mM SO₄) y (g/L Ac. acético), variable dependiente (mM H₂S)

Nº Experimento	(mM SO ₄) CÓDIGO	(g/L Ac. acético) CÓDIGO
1	+1	+1
2	0	+1
3	-1	+1
4	+1	0
5	0	0
6	-1	0
7	+1	-1
8	0	-1
9	-1	-1

+1 44 mM SO₄; 10g/L Ácido Acético; 0 32 mM SO₄; 5g/L Ácido Acético;
- 1 20 mM SO₄; 1g/L Ácido Acético

2. DISEÑO FACTORIAL Nº 2

En el segundo diseño factorial se aplicaron las características de cultivo batch, al igual que el primero, con la modificación de la concentración de Sulfato como primera variable independiente, y la sustitución del ácido acético por un filtrado de AGVs extraído del bioreactor de hidrólisis, como segunda variable independiente. los resultados del primer diseño factorial determinaron las características del segundo.

Al inicio, intermedio y final del experimento se realizaron pruebas analíticas como la determinación de la producción de Sulfuro de Hidrógeno, reducción de Sulfato.

Tabla 8: Esquema del Diseño factorial Nº 2: Variables independientes (mM SO₄) y (g/L AGVs), variable dependiente (mM H₂S)

Nº Experimento	(mM SO ₄) CÓDIGO	(g/L AGVs) CÓDIGO
1	+1	+1
2	0	+1
3	-1	+1
4	+1	0
5	0	0
6	-1	0
7	+1	-1
8	0	-1
9	-1	-1

+1 32 mM SO₄ ; 0.35 g/L AGVs; 0 20 mM SO₄; 0.20 g/L AGVs;
- 1 8 mM SO₄; 0.05 g/L AGVs

E. DETERMINACIONES ANALÍTICAS

1. DETERMINACIÓN DE SULFURO DE HIDRÓGENO (H₂S)

a. MÉTODO CUALITATIVO

Ensayo del Acetato de Plomo: La producción de sulfuro de hidrógeno por reducción de sulfato, fue determinada por el método descrito por Álvarez et al. (2004), colectando el gas proveniente de la fase aérea del sistema de bioreactores, mediante una jeringa (1mL) y esparciendo este en una tira de papel filtro embebido en una solución de Acetato de Plomo al 10%,

b. MÉTODO CUANTITATIVO

Método Turbidimétrico: El sulfuro de hidrógeno disuelto fue medido inmediatamente después de su muestreo, previniendo su oxidación, para este propósito fue utilizado el método turbidimétrico descrito por Cord-Rudwish (1995), se realizó una curva de calibración con diluciones seriadas de Sulfito de Sodio como estándar ($y = x - 0.0192/0.066$; $r^2 = 0.9974$) (Ver Anexos). Para realizar el análisis se siguió el procedimiento detallado a continuación:

Tabla 9: Esquema del procedimiento para la determinación de Sulfuro de Hidrógeno disuelto (Cord-Ruwish et al., 1995)

	1) Rvo de Cobre	2) Ácido Clorhídrico	3) Muestra	4) Agitación (Inversión)	5) Longitud de Onda λ
Estándar	1950 uL	-	50 uL	5 veces	480 nm
Blanco	1950 uL	50 uL	-	5 veces	480 nm
Muestra	1950 uL	-	50 uL	5 veces	480 nm

2. DETERMINACIÓN DE SULFATO REMANENTE NO REDUCIDO

Método Turbidimétrico: La concentración de sulfato fue determinada empleando el método turbidimétrico descrito por Kolmert et al (2000); la muestra fue diluida para obtener datos en el rango de la linealidad, se realizó una curva de calibración con diluciones seriadas de Sulfato de Potasio como estándar ($y = (x+0.0495/0.3467)*20$; $r^2 = 0.9909$) (Ver Anexos). Para realizar el análisis se siguió el procedimiento detallado a continuación:

Tabla 10: Esquema del procedimiento para la determinación de la concentración de Sulfato remanente no reducido (Kolmert et al., 2000)

	1) Rvo Condicion	2)Muestra Dil 1/20	3)Cloruro de Bario	4)Agitación (vortex)	5)Longitud de Onda λ
Estándar	1 mL	1 mL	60 mg	30 seg	420 nm
Blanco	2 mL	-	60 mg	30 seg	420 nm
Muestra	1 mL	1 mL	60 mg	30 seg	420 nm

3. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMÁTICAS

Método del DNS: Se determinaron las actividades de diversas enzimas (endocelulasas, exocelulasas, endoxilanasas exoxilanasas y amilasas), involucradas en el proceso de digestión anaeróbica del sustrato (vegetales y frutas); utilizando el método modificado del ácido dinitrosalicílico (DNS) para la determinación de azúcares reducidos descrito por Álvarez et al. (2004).

Para este análisis se estableció previamente una curva de calibración con diluciones seriadas de Glucosa y Xilosa como estándares ($y = 0.0053x - 0.0193$; $r^2 = 0.9928$ y $y = 0.0198x - 0.1983$; $r^2 = 0.9978$) (Ver Anexos). El procedimiento utilizado se detalla a continuación:

Tabla 11: Esquema del procedimiento para la determinación de las actividades enzimáticas (Álvarez et al., 2004)

	Blanco	Control	Test
Buffer*	1.5mL	1.5mL	1.5mL
Sustrato**	0.5mL	0.5mL	0.5mL
Enzima***	-	-	0.5mL

* Buffer citrato para glucanasas, amilasas, y buffer fosfato para xilanasas.

** PNPG como sustrato de glucanasa, Almidón como sustrato de amilasas, y PNPX como sustrato de xilanasas.

*** Muestra proveniente del Bioreactor de hidrólisis filtrada (0.2um)

Incubación a 50 °C durante 60 minutos.

Rvo DNS	3mL	3mL	3mL
Enzima	-	0.5mL	-

Incubación a 100 °C durante 10 minutos.

Agua dest.	5mL	5mL	5mL
-------------------	-----	-----	-----

Leer absorbancias a una Longitud de Onda de 540 nm.

Las actividades enzimáticas se determinaron restando la absorbancia del tubo control al test, y ejecutando este valor en la ecuación de la recta, proveniente de la curva de calibración.

$$\text{ABS real} = \text{ABS test} - \text{ABS control}$$

$$\text{Actividad Enzimática (UI/mL)} = (\text{ABS real} + 0,0193)/0,0053)*20$$

4. ANÁLISIS DE AGVs

Método de Titulación en tres puntos: La cuantificación de ácidos grasos volátiles se analizó por titulación en tres puntos de pH, utilizando el método descrito por Buchauer, K. et al., 2001. Previamente se realizó una curva de calibración con diluciones seriadas de Ácido acético (representante de AGVs) como estándar ($y = 1.093x - 107.13$, $r^2 = 0.9943$) (Ver Anexos). El procedimiento utilizado es detallado a continuación:

Tabla 12: Esquema del procedimiento para la determinación de Ácido Grasos Volátiles, por el método de titulación (Buchauer, K. et al., 1998)

Muestra filtrada	pH _i	Ajuste	pH _f
20 mL	~ 3.4 - 4	NaOH 0.01N	6.7- 7
	~ 7		5
Titulación en tres puntos de pH	5	Ajuste H ₂ SO ₄ 0.01N	4.3
	4.3		4
Volumen gastado en cada punto de pH		Con NaOH	pH ~ 7
		Con H ₂ SO ₄	pH 5, 4.3, 4

5. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE METALES PESADOS

La concentración de metales pesados de un efluente contaminado de manera artificial (Concentraciones iniciales: Zn= 8.94 mg/L, Cu= 7.84 mg/L y Pb= 3.68 mg/L), se cuantificó por el método de Absorción atómica como es descrito por Drury et al. (1999) utilizando el equipo de absorción atómica AAnalyst 100. Se establecieron curvas de calibración para cada metal componente de la mezcla (Ver Anexos).

Las muestras fueron sometidas a un tratamiento previo al procesamiento automático realizado por el equipo. Se colectaron 10 mL diarios del sistema de precipitación de metales, en frascos de plástico tratados con Ácido Nítrico 0.1N, posteriormente se procedió a oxidar las muestras con 4.67mL de peróxido de hidrógeno (30 vol), manteniéndolas a temperatura ambiente durante 24 horas, para después ser acidificadas con 200uL de Ácido Nítrico concentrado y guardadas a 4°C hasta su procesamiento.

VII. RESULTADOS

En la figura 12 se muestra la curva de progreso característica, para cada enzima analizada: celulolíticas (endocelulasa CMCasa y exocelulasa β -glucosidasa), xilanolíticas (endoxilanasas Xilanasas y exoxilanasas β -Xilosidasas) y amilolítica (amilasa); se evidencia el efecto del tiempo sobre la actividad enzimática producida por el consorcio microbiano hidrolítico, durante la permanencia de la primera carga orgánica de vegetales y frutas en descomposición presentes en el Bioreactor de Hidrólisis. Además se observa la relación directa entre la actividad de las diversas enzimas analizadas y la concentración de AGVs, producidos por efecto de la actividad enzimática ejercida por el consorcio microbiano hidrolítico presente en el Bioreactor de Hidrólisis.

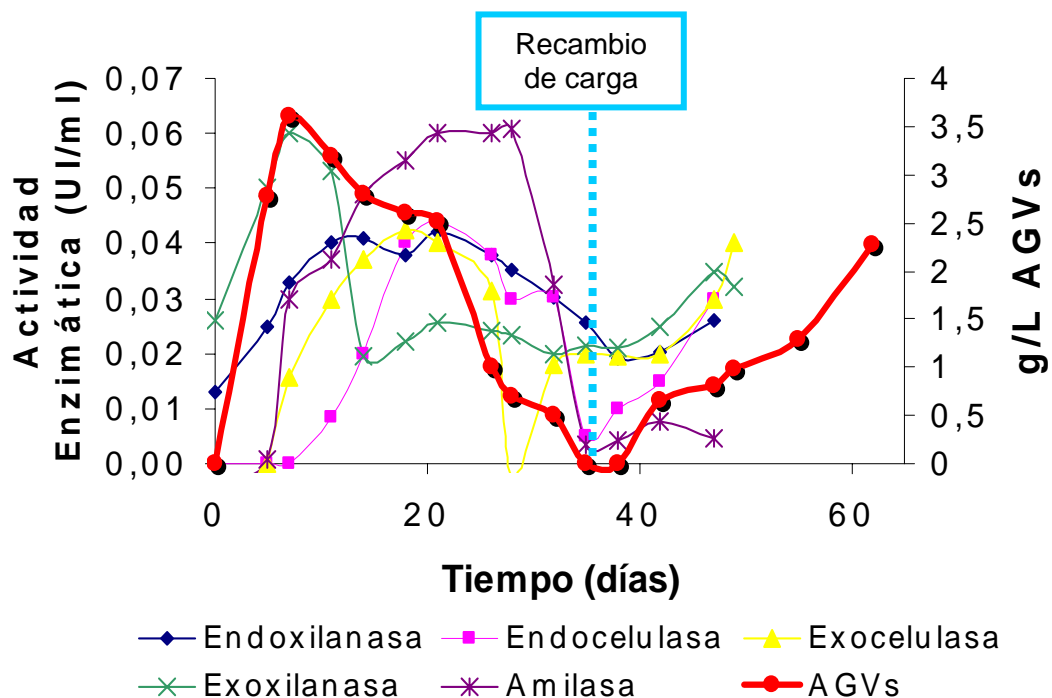


Figura 12: Relación entre la Actividad Enzimática sobre hidratos de carbono y la producción de Ácidos Grasos Volátiles, durante la hidrólisis de vegetales y fruta, en un periodo de permanencia de la carga orgánica (BIOREACTOR DE HIDROLISIS).

La concentración del sustrato o la carga orgánica de vegetales y frutas también disminuye con el tiempo, debido a que empieza a agotarse; de manera que, la actividad enzimática se hace menor, porque las enzimas están menos saturadas del sustrato, lo que hace necesario un recambio de la carga orgánica de vegetales y frutas. Al incrementarse el sustrato con el recambio de la carga orgánica, la actividad enzimática se incrementa hasta alcanzar un valor máximo, el producto de esta actividad se halla reflejado en la generación de monosacáridos consumibles como fuente de carbono por el consorcio microbiano hidrolítico, generador de AGVs; este mecanismo explica la relación directa entre la actividad enzimática y la generación de AGVs.

1º Recambio de carga orgánica: En el Bioreactor de Hidrólisis fue sustituida la carga orgánica de vegetales y frutas bajo las mismas características de la carga inicial (75g manzana, 75g plátano, 75g tomate y 75g carga anterior), por lo cual, la producción de AGVs (Ácidos Grasos Volátiles) fue afectada.

2º Recambio de carga orgánica: En el Bioreactor de Hidrólisis fue sustituida la carga orgánica de vegetales y frutas, la nueva carga estuvo constituida únicamente por frutas en proporciones similares a la carga anterior (75g manzana, 75g plátano, 75g papaya y 75g carga anterior), por lo cual, la producción de AGVs (Ácidos Grasos Volátiles) fue modificada ocasionando mayor producción de H₂S en el Bioreactor de Sulfidogénesis.

En la figura 13, se muestra el comportamiento del cultivo en el bioreactor de sulfidogénesis, respecto a la producción de sulfuro de hidrógeno, y la concentración de sulfato remanente no reducido en el medio. Este cultivo se caracteriza por cuatro fases de variación en las condiciones de alimentación del bioreactor de sulfidogénesis:

- **A:** *Cultivo Batch*: periodo de establecimiento, inmovilización y adaptación del consorcio CLD3a (No se registró producción de H₂S).

- **B:** *Cultivo Continuo*: flujo de alimentación F= 50 mL/día, flujo constituido por: 0.5 mL AGVs (2.9 g AGVs/L del Bioreactor de Hidrólisis) y 49.5 mL de medio Postgate C modificado; velocidad de crecimiento $\mu=0.1\text{ d}^{-1}$, parámetros constantes durante 6 tiempos de retención (6T = 60 días). Se registró una producción máxima de H₂S de ~ 7 mM.

- **C:** *Cultivo Continuo*: flujo de alimentación F=50mL/día, flujo constituido por 1mL AGVs (3.5 g AGVs/L del Bioreactor de Hidrólisis) y 49mL de medio Postgate C modificado; velocidad de crecimiento $\mu=0.1\text{ d}^{-1}$; parámetros constantes durante 6 tiempos de retención (6T = 60 días). Se registró una producción máxima de H₂S de aproximadamente 8mM.

- **D:** *Cultivo Continuo*: flujo de alimentación F=25 mL/día, flujo constituido por 1.25 mL AGVs (3.8 g AGVs/L del Bioreactor de Hidrólisis) y 23.75 mL Postgate C modificado), velocidad de crecimiento $\mu=0.05\text{ d}^{-1}$, parámetros constantes durante los últimos 70 días de cultivo (3.5 tiempos de retención). Se registró un pico máximo de producción de 16.54 mM de H₂S.

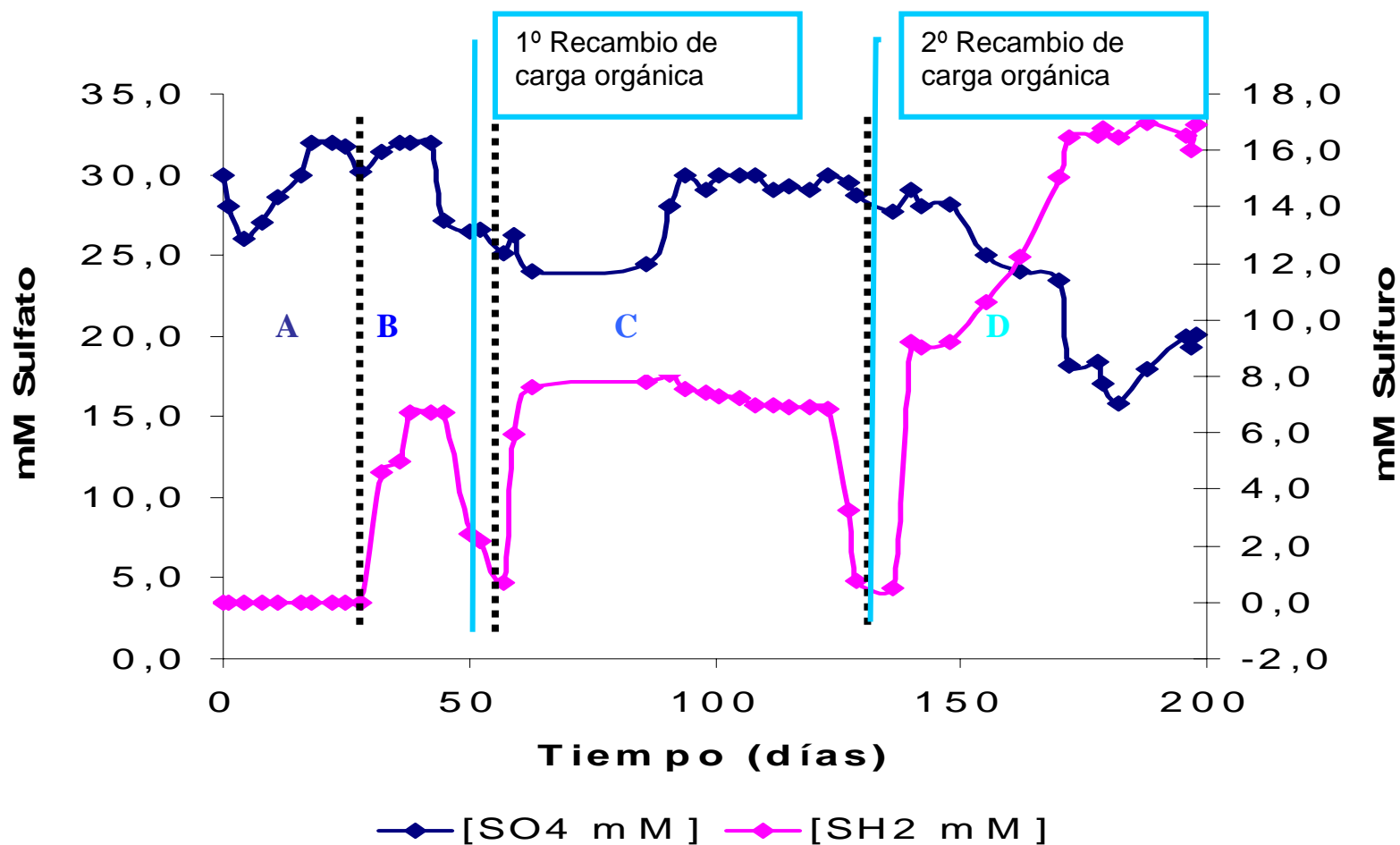


Figura 13: Concentración de Sulfuro de Hidrógeno producido por el consorcio bacteriano CLD3a y Concentración de Sulfato remanente no reducido en el medio (BIOREACTOR DE SULFIDOGÉNESIS).

En la figura 14 se muestra la existencia de una relación proporcional directa entre la concentración de Ácidos Grasos Volátiles y la producción de Sulfuro de Hidrógeno. Los AGVs producidos en el Bioreactor de Hidrólisis, son utilizados por el consorcio CLD3a de bacterias sulfato reductoras del Bioreactor de Sulfidogénesis, como fuente de carbono y donador de electrones para la subsecuente producción de Sulfuro de Hidrógeno.

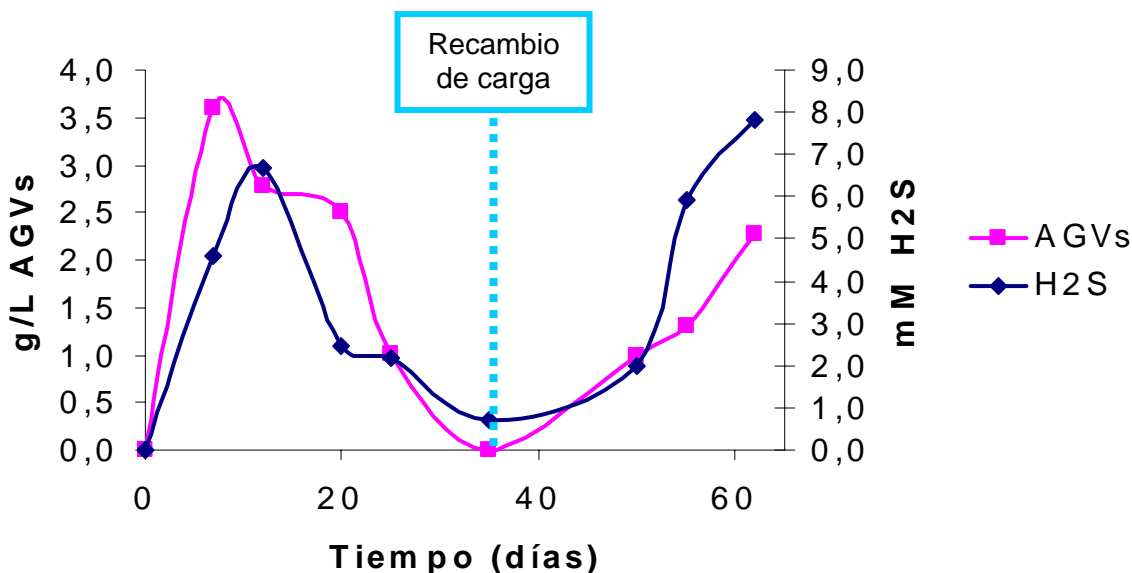


Figura 14: Relación directa entre la producción de Ácidos Grasos Volátiles (como fuente nutricional) y la producción de Sulfuro de Hidrógeno (AGVs Bioreactor de Hidrólisis; H₂S Bioreactor de Sulfidogénesis).

Numerosos factores dependientes de las características funcionales de los consorcios de BSRs afectan la producción de Sulfuro de Hidrógeno. En el presente trabajo, la actividad del consorcio utilizado (CLD3a de característica neutrófila), se ve afectada por el pH. Esta relación se muestra en la figura 15.

- **A : Ajuste de pH.** Debido a la acidez del medio de cultivo continuo, en el Bioreactor de Sulfidogénesis, se procedió a un ajuste manual de pH a un valor de 8.5, utilizando una solución de Hidróxido de Potasio al 20%.
- **B : Tamponamiento celular.** A partir de esta etapa se estableció el tamponamiento del medio de cultivo por los sistemas biológicos presentes en él.

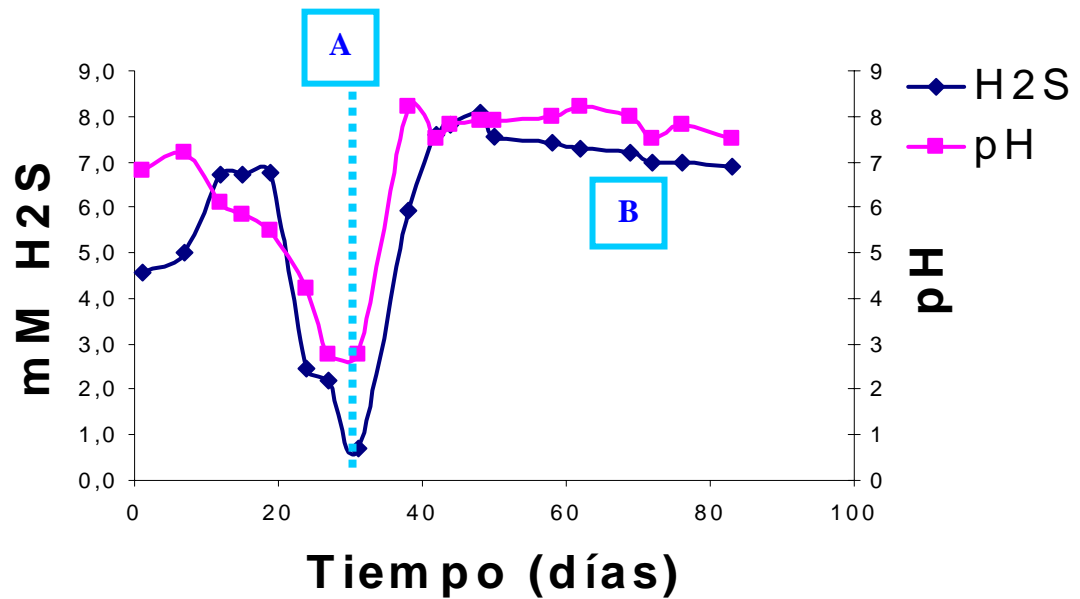


Figura 15: Relación directa entre la producción de Sulfuro de Hidrógeno (por el consorcio CLD3a) y las condiciones de pH en el Bioreactor de Sulfidogénesis.

Se establecieron cultivos Batch con el objetivo de optimizar las condiciones de cultivo para lograr una mayor producción de Sulfuro de Hidrógeno, en el primer experimento se utilizó como fuente de carbono y donador de electrones el Ácido Acético (representante de los AGVs), además se constató la capacidad del consorcio para asimilar este compuesto.

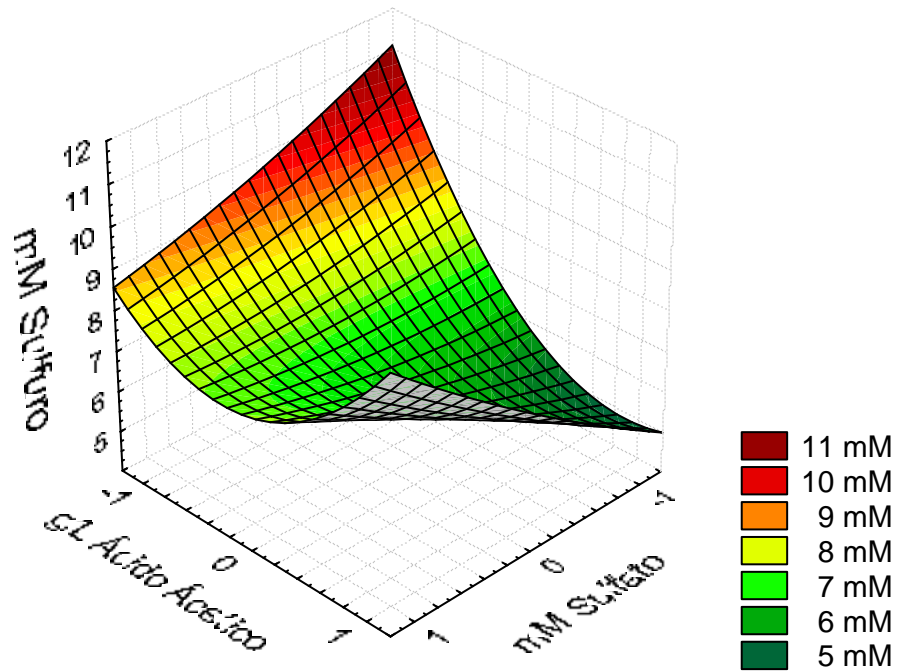
Como se observa en tabla 13, se obtuvo una mayor producción de Sulfuro de Hidrógeno utilizando las variables +1 (44 mM de Sulfato) y 0 (5 g/L de Ácido Acético).

Tabla 13: Diseño Factorial N° 1 (16 días de experimento) Producción de Sulfuro de Hidrógeno y concentración de Sulfato remanente no reducido en el medio (Cultivo Batch).

N°Exp	Sulfato	Ácido Acético	[mM SO ₄]	[mM SH ₂]
1	+1	+1	45,68	8.42
2	+1	0	47,48	7.92
3	+1	-1	51,76	7.92
4	0	+1	28,11	7.21
5	0	0	27,85	6.56
6	0	-1	34,44	8.33
7	-1	+1	19,17	5.48
8	-1	0	25,67	5.02
9	-1	-1	24,81	10.39

+1 44 mM SO₄; 10g/L Ácido Acético; 0 32 mM SO₄; 5g/L Ácido Acético;
 - 1 20 mM SO₄; 1g/L Ácido Acético

**SUPERFICIE DE RESPUESTA
DISEÑO FACTORIAL N° 1
mM Sulfuro =**
 $6,3918+0,5617*x-0,9197*y+0,1602*x*x+1,3533*x*y+1,4616*y*y$



X = mM Sulfato; Y = g/L Ácido Acético; Z = mM Sulfuro

Figura 16: Diseño Factorial N° 1 (16 días de experimento) Superficie de Respuesta, Variables independientes: [mM SO₄] y [g/L Ác. Acético] Variable dependiente (mM H₂S).

El tratamiento estadístico de los datos fue establecido mediante cálculos de promedios (medias) y sus respectivos desvíos standard.

Se aplicaron criterios de modelos lineales: Anova-Análisis Multivariante

Ajuste por regresión lineal múltiple

Los datos fueron procesados gracias al empleo del programa estadístico: Statistica 6.0 (versión Windows).

DISEÑO FACTORIAL N ° 1

REGRESIÓN MÚLTIPLE:

Variable dependiente: mM Sulfuro Múltiple R = 0,56988203 F=1,442901

R² = 0,32476553

No. de casos: 9

Ajuste R²= 0,09968737 p < 0,307867

Error estándar de estimación: 1,553977640

Intercept: 7,472962963 Std.Error: 0,5179926 t(6) = 14,427 p = 0,0000

mM Sulfato beta= 0,297g/L; Ac. Acético beta= -0,49

(Los valores significantes son resaltados)

ANOVA – ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Test de Significancia multivariante para la producción de Sulfuro (mM)

Hipótesis Efectiva de descomposición.

Variables	SS	º Libertad	MS	F	p
Intercept	502,6066	1	502,6066	197,7715	0,000148
mM Sulfato	1,9445	2	0,9722	0,3826	0,704642
g/L Ácido Acético	9,3480	2	4,6740	1,8392	0,271384
mMSulfato*g/LÁc Acét	10,1654	4	2,5414	-	-

Se realizó un segundo diseño factorial, en base a los resultados obtenidos en el primero, utilizando Ácidos Grasos Volátiles como fuente de carbono y donador de electrones.

Como se observa en la tabla 14, se obtuvo una mayor producción de Sulfuro de Hidrógeno utilizando las variables +1 (32 mM de Sulfato) y +1 (0.35 g/L de AGVs).

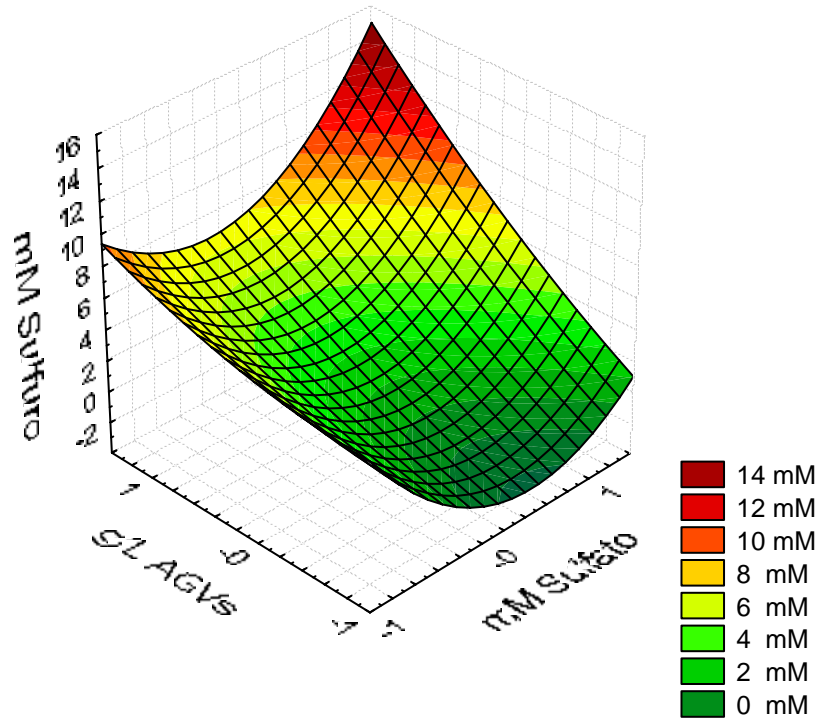
Tabla 14: Diseño Factorial N° 2 (16 días de experimento) Producción de Sulfuro de Hidrógeno y concentración de Sulfato remanente en el medio (Cultivo Batch).

N° Exp	Sulfato	Ácidos Grasos Volátiles	[mM SO4]	[mM SH2]
1	+1	+1	18.72	11.87
2	+1	0	25.31	5.64
3	+1	-1	31.26	0.03
4	0	+1	13.60	5.59
5	0	0	19.34	0.00
6	0	-1	17.13	0.00
7	-1	+1	0.00	7.38
8	-1	0	0.00	6.15
9	-1	-1	0.35	2.48

+1 32 mM SO₄; 0.35 g/L VFAs; **0** 20 mM SO₄; 0.20 g/L VFAs;
-1 8 mM SO₄; 0.05 g/L VFAs

**SUPERFICIE DE RESPUESTA
DISEÑO FACTORIAL N°2**

$$\text{mM Sulfuro} = 1,4467 + 0,2551 * x + 3,7211 * y + 3,7279 * x * x + 1,7347 * x * y + 0,6259 * y * y$$



X = mM Sulfato; Y = g/L AGVs; Z = mM Sulfuro

Figura 17: Diseño Factorial N° 2 (16 días de experimento) Superficie de Respuesta, Variables independientes: [mM SO₄] y [g/L Ác. AGVs] Variable dependiente (mM H₂S).

DISEÑO FACTORIAL N ° 2

REGRESIÓN MÚLTIPLE:

Variable dependiente: mM Sulfuro Múltiple R = 0,77755216 F=4,587011
R² = 0,60458737

No. de casos: 9 Ajuste R²= 0,47278316 p <0,061823

Error estándar de estimación: 2,951003355

Intercept: 1,676702491 Std.Error: 1,380851 t(6) = 1,2143 p = 0,2703

mM Sulfato beta=0,273 g/L AGVs beta=0,728

(Los valores significantes son resaltados)

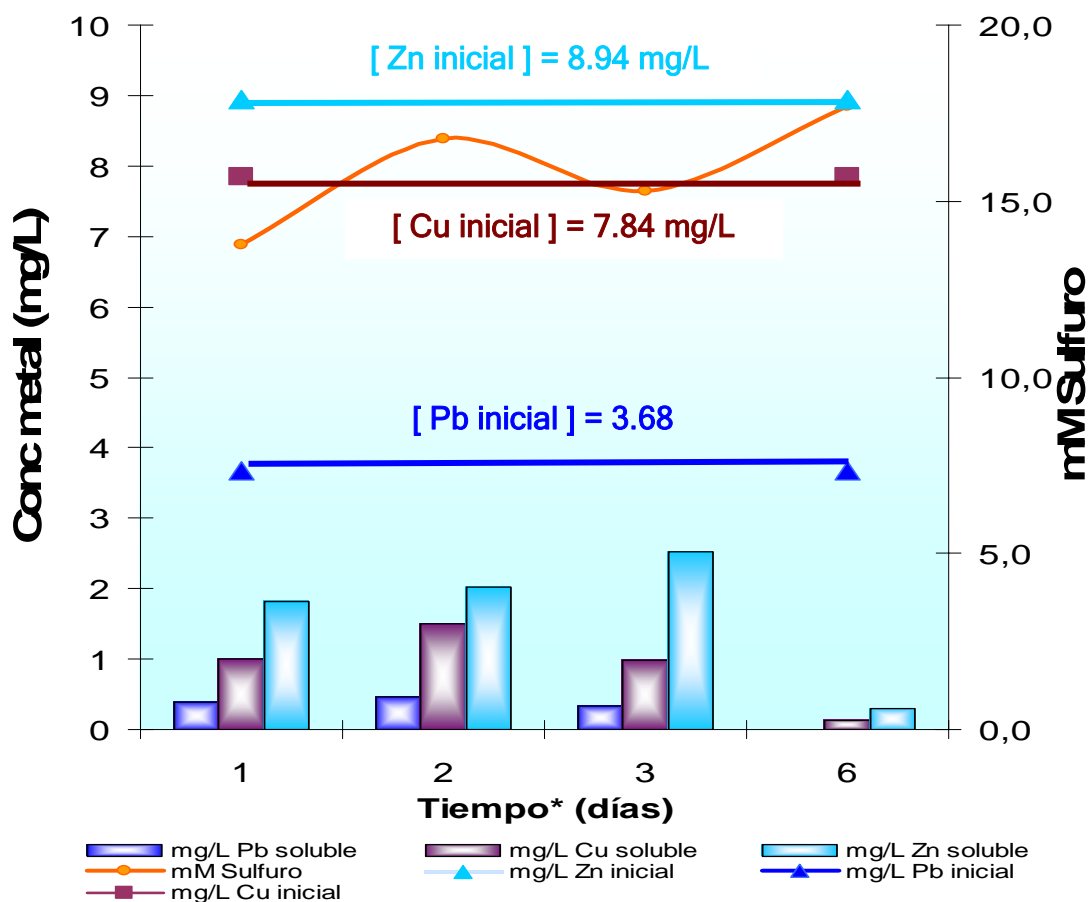
ANOVA - ANÁLISIS MULTIVARIANTE

Test de Significancia multivariante para la producción de Sulfuro (mM)

Hipótesis Efectiva de descomposición.

Variables	SS	° Libertad	MS	F	p
Intercept	170,2404	1	170,2404	33,88780	0,004336
mM Sulfato	28,1848	2	14,0924	2,80521	0,173235
"g/LAGVs"	83,8624	2	41,9312	8,34676	0,037364
mM Sulfato*"g/LAGVs"	20,0946	4	5,0236	-	-

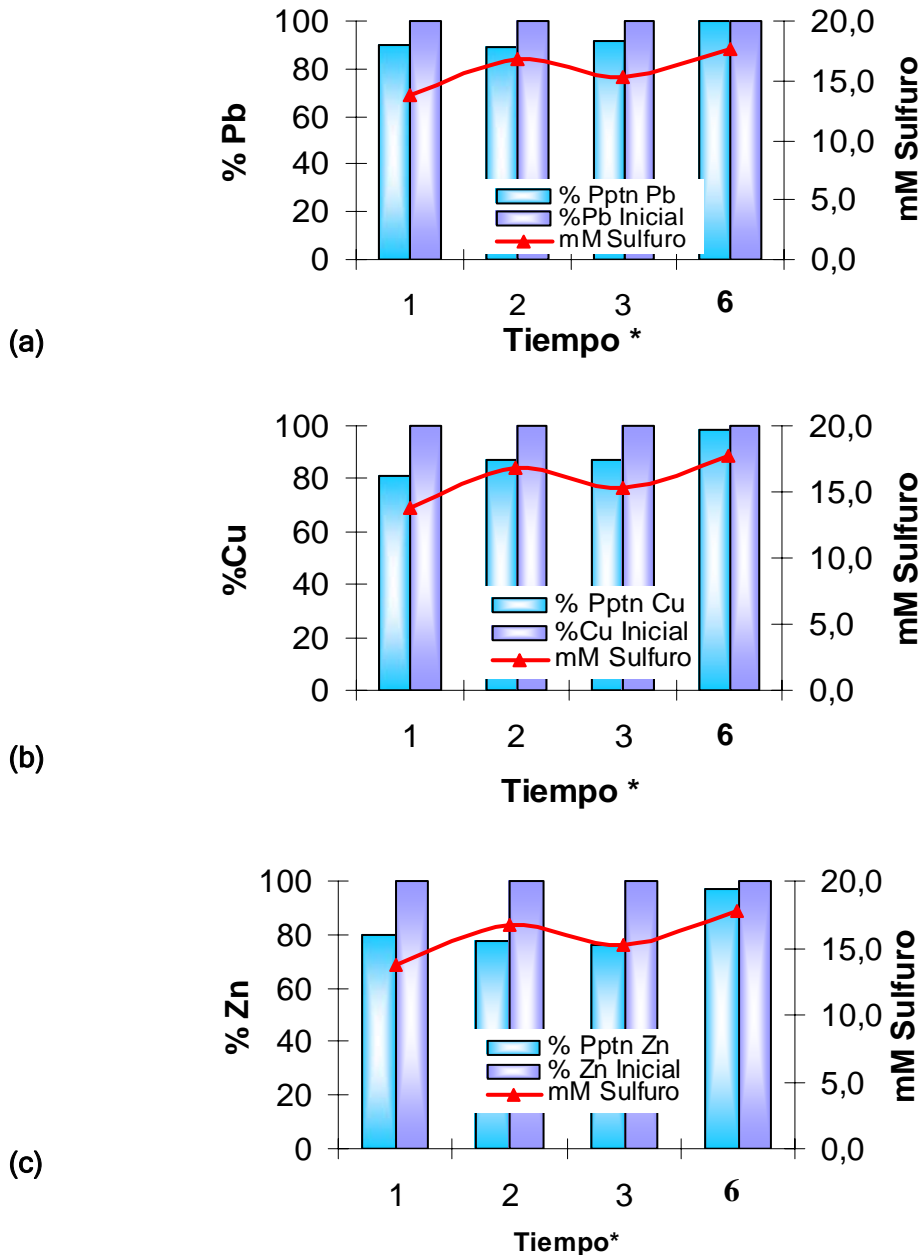
La figura 18 muestra la efectividad en la precipitación de metales (Concentraciones iniciales: Zn= 8.94 mg/L, Cu= 7.84 mg/L y Pb= 3.68 mg/L), por combinación con Sulfuro de Hidrógeno biogénico a una concentración promedio de 15.75 mM (578 mg/L). El efluente artificial contaminado con metales pesados simuló las concentraciones presentes del drenaje ácido del Centro minero Bolívar, y como se observa las concentraciones de metales presentes en éste descendieron: Zinc bajó a un nivel de 0.29 mg/L, Cobre bajó a un nivel de 0.12 mg/L y Plomo fue completamente precipitado.



* Tiempo de contacto entre: Sulfuro de Hidrógeno biogénico y metales solubles del efluente minero artificial.

Figura 18: Concentraciones de Zinc, Cobre y Plomo, antes y después de su precipitación (Trampa de Precipitación) y producción de Sulfuro de Hidrógeno durante la precipitación (Bioreactor de Sulfidogénesis).

Al evaluar la capacidad del Sulfuro de Hidrogeno para precipitar Zinc, Plomo y Cobre, se observó que la precipitación de los mismos, alcanzó valores desde 96.75% para el Zinc, 98.45% para el cobre, a 100% de precipitación en el caso del Plomo.



*Tiempo de contacto: Sulfuro de Hidrogeno biogenico y metales solubles del efluente minero artificial.

Figura 19: (a, b y c) Porcentaje de precipitación de Zinc, Cobre y Plomo (Trampa de Precipitación) y producción de Sulfuro de Hidrógeno durante la misma (Bioreactor de Sulfidogénesis).

La figura 20 muestra la variación del potencial redox (Eh), durante la precipitación de metales (Zn= 8.94 mg/L, Cu= 7.84 mg/L y Pb= 3.68 mg/L) del efluente minero artificial. La determinación del Eh, se realizó tres veces por día, durante un tiempo de nueve días; además se llevó a cabo un control diario en la producción de Sulfuro de Hidrógeno del Bioreactor de Sulfidogénesis.

Como se observa en la figura, se produce un cambio drástico en el potencial redox al ser mezclado el efluente minero artificial (~ +200 mV) y el Sulfuro de Hidrógeno producido en el Bioreactor de Sulfidogénesis, descendiendo a valores aproximados a -250 mV, registrados en la Trampa de precipitación de metales pesados.

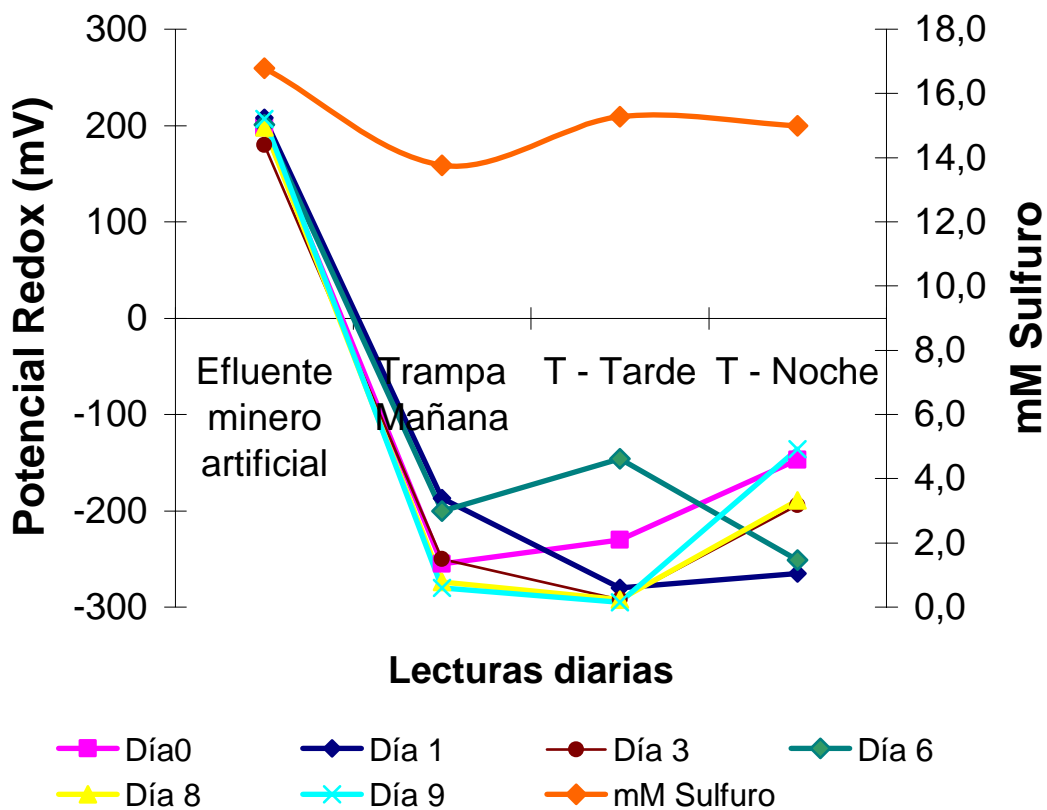


Figura 20: Variación del potencial redox (mV), durante la precipitación de metales (Cobre, Zinc y Plomo) del efluente minero artificial y producción de Sulfuro de Hidrógeno en el Bioreactor de Sulfidogénesis.

A continuación se muestra la variación del pH (Figura 21), durante la precipitación de Cobre, Zinc y Plomo del efluente minero artificial. La determinación del pH, se realizó tres veces por día, durante un tiempo de nueve días; además se llevó a cabo un control diario en la producción de Sulfuro de Hidrógeno del Bioreactor de Sulfidogénesis. Como se observa, se produce una variación en el pH al ser mezclado el efluente minero artificial (pH~ 4) y el Sulfuro de Hidrógeno proveniente del Bioreactor de Sulfidogénesis (pH~7), incrementándose a valores aproximados a pH~8 registrados en la Trampa de precipitación de metales pesados.

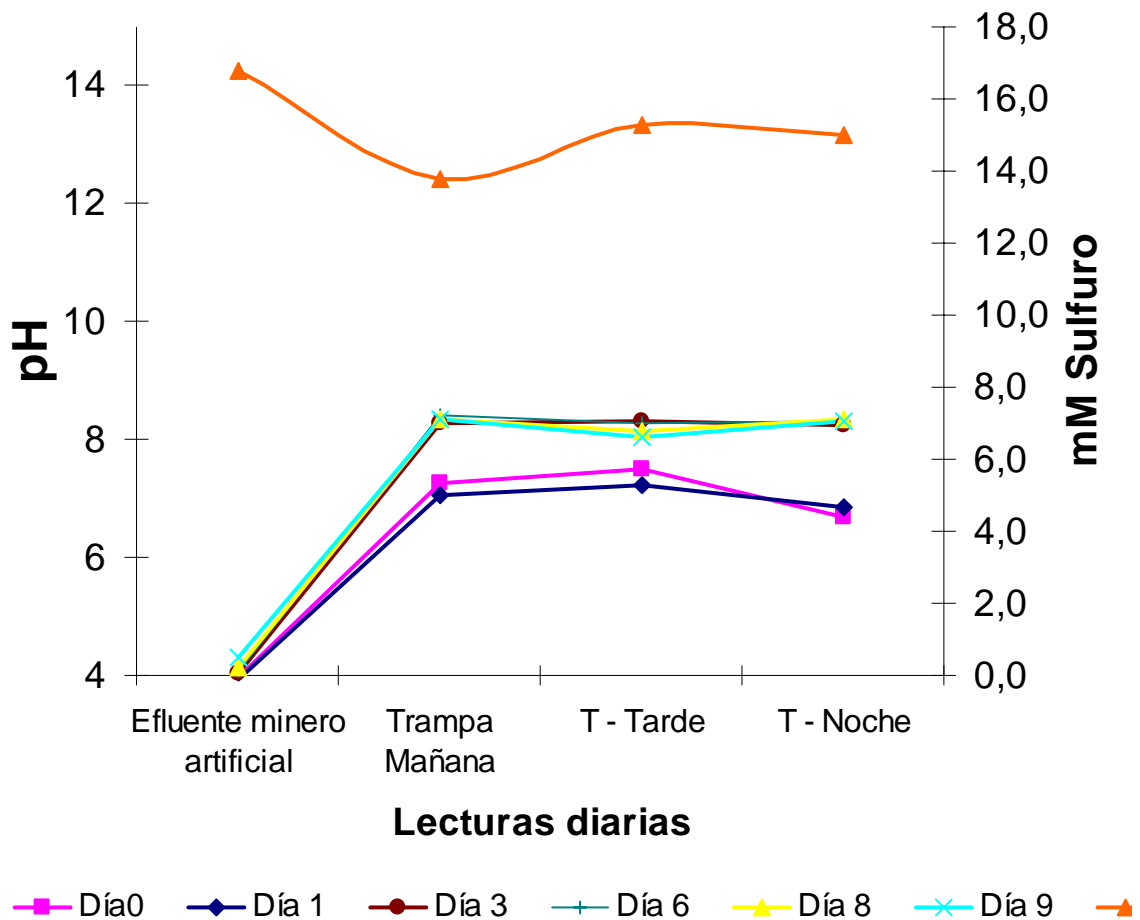


Figura 21: Variación del pH, durante la precipitación de metales (Cobre, Zinc y Plomo) del efluente minero artificial y producción de Sulfuro de Hidrógeno en el Bioreactor de Sulfidogénesis.

VIII. DISCUSIONES

Hidrólisis enzimática y producción de ácidos grasos volátiles

Una gran variedad de estudios realizados hasta el momento confirman la posibilidad de tratar mediante digestión anaeróbica, residuos sólidos municipales y agrícolas, utilizándolos como sustratos de alta calidad nutricional, ya que están constituidos por una fracción importante de materia orgánica, lo que permite esperar una capacidad de degradación rápida, que si bien no es ejecutable por las bacterias sulfato reductoras lo es por consorcios microbianos de alta capacidad hidrolítica (Ciappesoni et al, 2004).

Por este motivo, se estableció un sistema de dos bioreactores con diferente función; donde los microorganismos fermentativos pertenecientes a diversos géneros y con una gran batería de capacidades digestivas fueron establecidos en el Bioreactor de Hidrólisis,

El presente estudio demuestra que las frutas y vegetales son hidrolizados por la actividad enzimática de celulasas, xilanasas y amilasas a pH ácido, sin que este factor afecte su actividad, La concentración del sustrato decreció con el tiempo, de manera que la actividad enzimática se hace menor, debido a que la enzima esta menos saturada del sustrato, por lo cual es necesario un recambio de sustrato.

Al incrementarse el sustrato con el recambio de la carga orgánica de fruta y vegetales, la actividad enzimática se incrementa hasta alcanzar un valor máximo, y el producto de esta actividad se halla reflejado en la generación de monosacáridos consumibles como fuente de carbono por el consorcio microbiano hidrolítico, que genera a su vez como metabolitos los AGVs; en este sentido se estableció un segundo parámetro indicador de la hidrólisis completa del sustrato, debido a la relación directa entre la actividad enzimática y la producción de AGVs.

Biogénesis de Sulfuro de Hidrógeno

La utilización de procesos biotecnológicos, constituye una alternativa de protección ambiental, para ello se emplean sistemas utilizando microorganismos, un ejemplo claro, es el uso de consorcios anaeróbicos robustos de bacterias sulfato reductoras encargadas de la producción de Sulfuro de Hidrógeno biogénico, como una alternativa para la remoción de metales pesados y sulfatos de efluentes contaminados (Álvarez, M. et al, 2004).

En el presente estudio se ha demostrado que la biogénesis de Sulfuro de Hidrógeno por el consorcio CLD3a de bacterias sulfato reductoras, alcanzó una concentración aproximada a 17 mM, manteniéndose constante durante la precipitación de metales pesados, sin existir la inhibición por el producto (H_2S), durante esta actividad; en comparación al presente estudio, Okabe et al (1992) determinaron un nivel de inhibición en la producción de Sulfuro de Hidrógeno, por *Dv. desulfuricans*, de 14.5 mM, y otros autores reportan la inhibición total de crecimiento de BSRs, a concentraciones de Sulfuro de Hidrógeno libre de ~16 mM. No han sido reportados niveles de inhibición superiores, excepto por Isa, et al. (1986), que utilizó un consorcio mixto de bacterias metanogénicas y sulfato reductoras, alcanzando una concentración de 25.1 mM de Sulfuro de Hidrógeno. Basándonos en investigaciones de inhibición del crecimiento bacteriano, durante la biogénesis de sulfuro de hidrógeno, es posible afirmar que el consorcio CLD3a, aún no identificado por pruebas moleculares, no se halle constituido por especies como *Desulfovibrio desulfuricans*, en cambio es muy probable que *Desulfovibrio vulgaris*, forme parte de este consorcio, debido a que se han reportado estudios en los cuales esta especie es utilizada como modelo biológico en el tratamiento de aguas (Foucher, et al. 2001).

En el presente estudio, se demostró también la influencia del pH como indicador del rendimiento en la producción de Sulfuro de Hidrógeno; el bioreactor de sulfidogénesis del sistema de cultivo continuo, necesitó un ajuste de pH, ya que el consorcio CLD3a de característica neutrófila ejerce mejor actividad a un pH próximo a 8 (producción óptima de sulfuro de hidrógeno); al inicio del cultivo continuo fue indispensable regular el pH del medio debido al ingreso de los ácidos grasos volátiles (fuente de carbono y donador de

electrones), después de la adaptación y establecimiento de la biopelícula no se tuvo dificultades al respecto, ya que el consorcio bacteriano (inmovilizado sobre el soporte) ejerce un efecto buffer, estabilizando el pH del medio mediante las actividades metabólicas propias del consorcio (Hilgsmann et al,1998).

La característica del donador de electrones y/o sustrato es uno de los factores más importantes que determinan el proceso microbiano de tratamiento de drenajes ácidos de mina, se prefiere un donador de electrones que mantenga la sulfidogénesis por un periodo prolongado y no necesite la adición de suplementos (White y GDA, 1996); en el presente estudio se demostró la eficacia en el consumo de ácidos grasos volátiles (como fuente de carbono y donador de electrones, producidos por la hidrólisis enzimática de frutas y vegetales) por el consorcio CLD3a, que sufrió un período de adaptación inicial, antes del consumo de los AGVs.

La producción de Sulfuro de Hidrógeno se incrementó, después de realizar el último recambio de carga orgánica en el Bioreactor de Hidrólisis, esto posiblemente se debió al nuevo sustrato reemplazado, que estuvo constituido únicamente por frutas (de alto contenido en polisacáridos), afectando la composición de AGVs producidos; este incremento en la producción Sulfuro de Hidrógeno coincidió, también, con el cambio en el flujo de alimentación del Bioreactor de Sulfidogénesis, modificando la velocidad de crecimiento del consorcio CLD3a. Ambos factores pudieron coadyuvar al incremento en la producción de Sulfuro de Hidrógeno, que se mantuvo constante durante la precipitación de metales pesados; por tanto, fue necesario determinar la existencia de una relación directa entre el donador (AGVs) y el aceptor de electrones (sulfato), para el rendimiento de la actividad del consorcio CLD3a.

Optimización - Diseños Factoriales

Se establecieron diseños factoriales, optimizando las concentraciones de Sulfato (aceptor de electrones) y ácidos grasos volátiles (fuente de carbono y donador de electrones), para el mejoramiento en la producción de Sulfuro de Hidrógeno. Al modificar ambas variables (concentración de Sulfato y AGVs), en forma simultánea, se asume que el valor de la variable concentración de ácido acético y AGVs (1º y 2º diseño factorial respectivamente), maximiza la respuesta (incremento en la producción de H₂S), debido a los resultados

significativos obtenidos por el análisis estadístico ANOVA; sin embargo existe una interdependencia entre ambas variables (ejemplo +1+1, 00 o -1 -1), ya que su interrelación queda sacrificada o nula, debido a que la interacción es de mayor grado.

El efecto mencionado se observó en ambos diseños factoriales, existiendo una producción superior de Sulfuro de Hidrógeno cuando ambas variables se hallaban en un mismo nivel (-1,-1 en el primer diseño factorial y +1,+1 en el segundo diseño factorial).

Al realizar el análisis de superficie de respuesta de ambos diseños factoriales, el programa estadístico presenta ecuaciones de segundo orden, mediante las cuales se puede determinar las concentraciones adecuadas de AGVs y Sulfatos, necesarias para la obtención de una concentración de Sulfuro de Hidrógeno requerida por el investigador.

Precipitación de metales pesados

La remoción de metales fue atribuida a la precipitación de sulfuros de metal insolubles, por acción del sulfuro de hidrógeno producido por la actividad biológica del consorcio CLD3a de bacterias sulfato reductoras, Los resultados de este experimento muestran que el consorcio CLD3a tiene una capacidad simultánea de reducir concentraciones de cobre, zinc y plomo, de un efluente minero artificial, logrando a su vez un incremento de pH en el mismo, debido a la variación en la solubilidad de los metales presentes; otro indicador directo de la precipitación, es el potencial redox, ya que permite la medición indirecta de la concentración de Sulfuro en solución determinando las condiciones reducidas del medio (Pott, B. et al., 2004),

En el presente trabajo se determinó que la capacidad de producir concentraciones altas de Sulfuro de Hidrógeno (~ 17 mM), permite una óptima precipitación de metales pesados contaminantes; se piensa que el Sulfuro de Hidrógeno de origen biogénico tuvo afinidad para precipitar plomo, puesto que su porcentaje de precipitación fue del 100%, este efecto también puede ser explicado por el hecho de que el efluente minero artificial presentó una concentración de plomo inferior en comparación a los otros metales en solución (Cobre =7.84 mg/L, Plomo =3.68 mg/L y Zinc =8.94 mg/L), esto explicaría el grado de precipitación de zinc que fue de 96.75%, y como se observa fue el metal de mayor concentración en el efluente artificial del centro minero Bolívar.

IX. CONCLUSIONES

La actividad enzimática en el Bioreactor de Hidrólisis se evidenció mediante la cuantificación de azúcares reductores; a través de una curva de progreso en el tiempo para cada enzima analizada: celulolíticas: CMCasa (Act Max: 0.04UI/mL a los 21 días de hidrólisis) y β -glucosidasa (Act Max: 0.04UI/mL a los 18 días), xilanolíticas: Xilanasa (Act Max: 0.04UI/mL a los 14 días) y β -Xilosidasa (Act Max: 0.06UI/mL a los 7 días) y amilolítica (Act Max: 0.06UI/mL a los 26 días).

Se estableció una relación proporcional directa entre la actividad enzimática y la producción de Ácidos Grasos Volátiles, considerando también a esta última un indicador de la hidrólisis de la carga orgánica de vegetales y frutas en el Bioreactor de Hidrólisis.

La biogénesis de Sulfuro de Hidrógeno a partir de la utilización de AGVs (fuente de carbono y donador de electrones); al inicio fue ~8 mM, después del recambio de carga orgánica (sólo frutas: manzana, papaya y plátano) y modificación en el flujo de alimentación del Bioreactor de Sulfidogénesis (F=25 mL/día constituido por 1.25 mL AGVs y 23.75 mL Postgate C modificado), se registraron valores superiores a 16.5 mM de Sulfuro de Hidrógeno biogénico.

El pico máximo de producción de Sulfuro de Hidrógeno fue de 17 mM registrado a los 185 días de cultivo, manteniéndose constante durante un tiempo de 30 días, en el que se realizó la precipitación de metales pesados de un efluente artificialmente contaminado.

La concentración de AGVs, tiene un efecto importante en la biogénesis de Sulfuro de Hidrógeno; a concentraciones superiores a 3.5g/L de AGVs (Bioreactor de Hidrólisis), se logró una producción de Sulfuro de Hidrógeno aproximada a 17mM (Bioreactor de Sulfidogénesis) siendo esta relación directamente proporcional.

Otro factor influyente en la biogénesis de Sulfuro de Hidrógeno es el pH, debido a la característica neutrófila del consorcio CLD3a de BSRs, A pH constante, igual o superior a 7.5, se mantuvo una biogénesis constante de Sulfuro de Hidrógeno: ~8mM (1º Recambio de carga orgánica) y ~16mM (2º Recambio de carga orgánica). Además se evidenció la capacidad tamponante del consorcio CLD3a, que mantuvo el pH constante (Bioreactor de Sulfidogénesis) ante la adición de AGVs como fuente nutricional.

Las condiciones adecuadas de alimentación para el cultivo del consorcio CLD3a fueron: 32 mM de Sulfato y 0.35 g/L AGVs, establecidas mediante la aplicación de diseños factoriales para la optimización del proceso de producción de Sulfuro de Hidrógeno.

El análisis químico de los efluentes contaminados por metales pesados fue realizado mediante espectrofotometría absorción atómica, debido a que este método es útil para cuantificar bajas concentraciones de elementos metálicos.

El Sulfuro de Hidrógeno biogénico posee alta capacidad precipitante de cationes divalentes del efluente artificial; existiendo un mayor porcentaje de precipitación (incluso precipitación total): 100% de plomo, 98.45% de cobre y 96.75% de zinc; a los seis días de contacto Metal-Sulfuro.

Mediante un análisis potenciométrico se determinó que durante y después del tratamiento del efluente artificial con H₂S, el valor de pH se incrementó desde ~4 a ~8; así mismo, la condición reductora del efluente tratado (determinada por el ORP), descendió desde valores superiores a +200mV, a aproximadamente -200mV, ambas variables expuestas, son consideradas indicadores de la precipitación de metales pesados.

Las concentraciones iniciales de metales del efluente artificial fueron: Zn= 8.94 mg/L, Cu= 7.84 mg/L y Pb= 3.68 mg/L (modelo en precipitación), después del tratamiento con H₂S a una concentración de ~17mM (o 578 mg/L), estas descendieron a valores de Zn de 0.29 mg/L, Cu de 0.12 mg/L y Pb de 0 mg/L; las cuales se hallan dentro de rangos permisibles de agua potable y de riego, según las normas EPA (EEUU- Environmental Protection Agency).

X. BIBLIOGRAFÍA

- ▶ Alvarez, T, Pott B, et al (2004). Steps towards the development of a robust, low-technology sulphide producing process as an integral component in the treatment of heavy metal pollution in the environment, La Paz-Bolivia (manuscrito en preparación).
- ▶ Achá, Dario (2004). Bacterias Sulfato Reductoras en la rizósfera de macrofitos de una laguna de la llanura de inundación del río Beni, La Granja, La Paz-Bolivia.
- ▶ Buchauer, K, et al (1998). A Comparison of two simple titration procedures to determine volatile fatty acids in influents to waste - water and sludge treatment processes. Water SA. Vol. 24. No 1.
- ▶ Chang, IS, and Kyun, S (1999). Biological treatment of Acid Mine Drainage under Sulphate reducing conditions with solid waste materials as substrate. Water environmental research 34: 1269-1277.
- ▶ Christensen, B. et al (1996). Treatment of acid mine water by Sulfate reducing bacteria: Results from a bench scale experiment. Water research 30: 1617-1624.
- ▶ Cord-Ruwish, R (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulphides in cultures of sulphate-reducing bacteria. J.Microbiol Meth 4:33-36.
- ▶ Cotoras Davor (1996). Biohídrica: Drenaje Acido de las Minas (AMD), Buenos Aires-Argentina.
- ▶ Connell, D.W., Miller G.J. (1984). Chemistry and Ecotoxicology of Pollution. New York.
- ▶ Drury W (1999). Treatment of acid mine drainage with anaerobic solid substrate reactors. J. Microbiol. Meth. 19:1-11.
- ▶ Federación Europea de Biotecnología (1999). 4º Boletín de Biotecnología Medioambiental: Bioremediación, Prevención, Detección y seguimiento, Ingeniería Genética. 2 ed, National Museum of Science and Industry. GB-SW7 2DD.
- ▶ Foucher, S. et al (2001). Treatment by sulphate reducing bacteria of Chessy acid mine drainage and heavy metals recovery. Chemical Engineern Science 56: 1639-1645.

- ▶ Béchard, G. et al (1994). Use of cellulosic substrates for the microbial treatment of Acid Mine Drainage. *J. Environmental quality* 23:111-116.
- ▶ Gail, L. et al (1959). Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Research and engineering center*, Vol 31:3: 426-429.
- ▶ Gomec CY, Speece RE (2003). The role of pH in the organic material solubilization of domestic sludge in anaerobic digestion. *Curr. Microbiol* 30:255-258.
- ▶ Ghosh S. y Lall, V (1998). Kinetics of anaerobic digestion of solid substrates, *Appl. Environ. Microbiol* 64: 594-610.
- ▶ [http:// www.Lenntech-Micenv/Ciclo del Azufre/1998.htm](http://www.Lenntech-Micenv/Ciclo del Azufre/1998.htm)
- ▶ [http:// www.drwebsa.com.ar/aam/revvol332/v32-4-05.htm](http://www.drwebsa.com.ar/aam/revvol332/v32-4-05.htm)
- ▶ <http://www.waterresearch.com.UK/madu/concide7vol34.htm>
- ▶ <http://www.mduque/uniandes.edu.co.htm>
- ▶ Hazen, T.C, Amy P. and Sverberg D. (1997). Bioremediation in Microbiology of the terrestrial Subsurface. Vol 3S, 247-266.
- ▶ Hungate, R. et al (1989). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *J. Norris and Ribbons, Methods in Microbiology*. Vol 3B, 117-132.
- ▶ Jong, T. et al. Removal of sulfate and heavy metals by sulfate reducing bacteria in short-term bench scale upflow anaerobic packed bed reactor runs. *Water Research* 37: 3379-3389.
- ▶ Kotrba, Pavel et al (2000). Bioremediation of heavy metal pollution exploiting constituents, metabolites and metabolic pathways of livings, a review. *J. bioremediation of Heavy Metal Pollution*. Vol 65, 1205-1247.
- ▶ Kolmert A, Wikström P, Hallberg K (2000). A fast and simple Turbidimétric method for the determination of sulphate in sulphate-reducing bacterial cultures. *J. Microbiol. Meth.* 41:179-184.
- ▶ Kerndorff, H (1980). Sorption of metals on humic acid. *Geochim cosmochim. Acta*. 44-45.
- ▶ Lahav, y Loewenthal (2000). Measurement of VFA in anaerobic digestion: The five point titration method revisited, *Water SA*. No 26.
- ▶ La Patria (22 de marzo-2004). Basura, residuo que nos acompaña toda la vida. Oruro - Bolivia.
- ▶ Lovera, D, et al (2001). Simulación de la producción y remediación de aguas provenientes del drenaje de rocas ácidas, Quito-Ecuador.

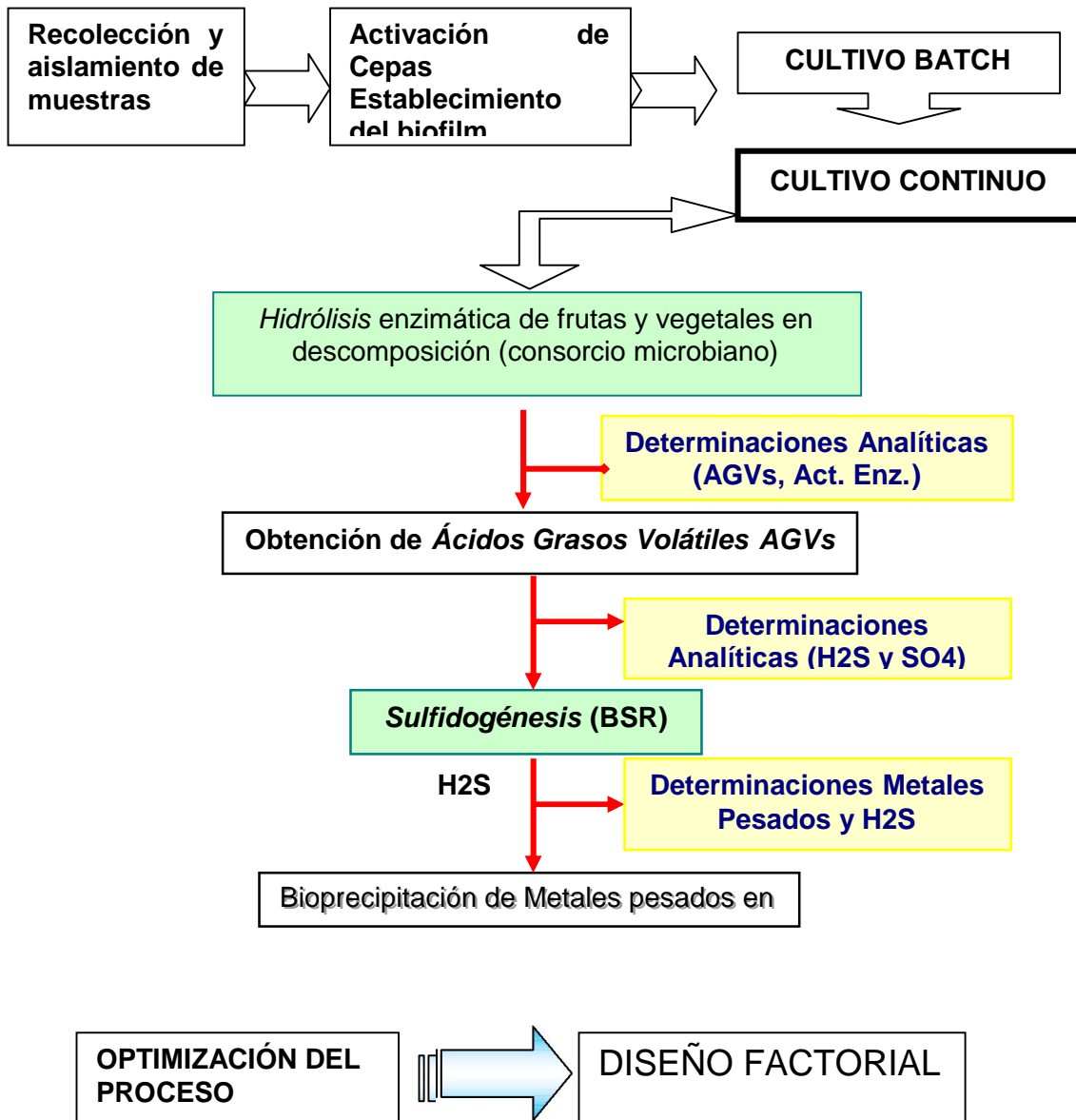
- ▶ Marmoud, A. et al (1999). Sulfide production by Sulfate Reducing Bacteria with lactate as feed in an upflow anaerobic fixed film reactor. *Water, air and soil pollution* 112: 67-84.
- ▶ Mendieta, J (2002). Aislamiento de bacterias sulfato reductoras provenientes de muestras de agua, lodo y tierra de la región altiplánica de Bolivia. La Paz-Bolivia.
- ▶ Ministerio de Desarrollo Sostenible y Medio Ambiente (1996). Impacto de la minería y el procesamiento de minerales en cursos de agua y lagos, Oruro-Bolivia
- ▶ Millar, T. et al (1974). A serum bottle modification of the Hungate technique for cultivating obligate anaerobes. *Applied Microbiology* 24:985-987.
- ▶ McCullough, J., Hazen, T.C., Benson, S.M., Metting, F.B., and Palmisano, A.C. (1999). *Bioremediation of Metals and Radionuclides. What it is and how it works.* Office of Biological and Environmental Research of the U.S. Department of Energy's Office of Science (<http://www.lbl.gov/NABIR/primer>).
- ▶ Montserrat, E. et al (1997). Biosurfactant facilitated remediation of metal contaminated soils. *Environmental Health Perspect* 103: 59-62.
- ▶ Norris, P. et al (1992). Acidophilic bacteria: adaptations and applications. *Molecular biology and biotechnology.* Glasgow. UK. 115-162.
- ▶ Pott, B. et al (2004). Separation of heavy metals from water solutions at the laboratory scale. *Biotechnology letters* 26: 451-456.
- ▶ Pozzo, T (2002). Cuantificación de metales pesados en drenajes ácidos de mina de diversas regiones del Altiplano boliviano. La Paz-Bolivia.
- ▶ Pirt, P (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Scientific Publications, J. Environ. Microbial. 98: 156-168.
- ▶ Six, W y De Baere (1991). Dry anaerobic Conversion of municipal solid waste by stream of the DRANCO process, Vol 38:1254-1265..
- ▶ *Standard Methods for the Examination of water and wastewater.* 18th ed (1992) Am public Health assoc., Washington, DC.
- ▶ Svensson LM, Bostone DJ, Bjönsson L, and Mattiasson B (2001). Start-up of an anaerobic single stage digester with a fixed wheat straw bed. Proceed of 9th world congress on anaerobe Digest. Part 2, Antwerpen, Belgium, September: 549-551.
- ▶ Tuttle, J. et al (1999). Microbial dissimilatory sulfur cycle in acid mine water. *J. Bacterol* 97:594-602.

- ▶ U.S. EPA (1997). Recent development for in situ treatment of metal contained soils, EPA/547/3-97/Washington D.C. USA.
- ▶ Valls, Marc y De Lorenzo, Victor (2002). Exploiting the genetic and biochemical capacities of bacteria for the remediation of heavy metal pollution, a review. FEMS: Elsevier. Vol 26, 327-338.
- ▶ Veeken, A. et al (2003). Control of the sulphide concentration for optimal zinc removal by sulfide precipitation in a continuously stirred tank reactor. Water Research 37: 3709-3717.
- ▶ Vázquez, V. et al (2000). Digestión anaeróbica de Residuo Sólido generado en Restaurante Inoculado con lodo de reactor UASB. Selvatia 32:154-165.

ANEXOS

ANEXO #1

Esquema del procedimiento realizado en el presente trabajo de investigación.



ANEXO #2

MEDIO 11 - CONSORCIO MICROBIANO HIDROLÍTICO

Para el cultivo batch del consorcio microbiano con actividad hidrolítica fue utilizado el medio 11 con algunas modificaciones. Se preparó un stock de soluciones constituyentes de este medio:

10 mL Solución A: 100g/L NH_4Cl , 10g/L NaCl , 10g/L $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 5g/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2 mL

Solución B: 200g/L $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$;

1 mL Solución 2 (Solución de elementos traza) 1.5g/L $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 60mg/L H_3BO_3 , 6.5 mL HCl (25%), 120mg/L $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 100mg/L $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 25mg/L $\text{Na MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 25mg/L $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 60mg/L ZnCl_2 , 15mg/L $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$;

1 mL Solución 3: 3mg Na_2SeO_3 , 0.5g/L NaOH ; 30 mL Solución 4: 8.5g/100mL NaHCO_3 ;
(después de la esterilización)

1 mL Solución 7 estéril: 1 mg Biotina, 5 mg Ácido para -amino Benzoico, 5 mg Vitamina B_{12} , 10 mg Tiamina,

100 mL de agua deionizada.

El pH del medio debe ser ajustado a 7.5 con KOH (50%) antes de su esterilización.

ANEXO #3

MEDIO POSTGATE C MODIFICADO - CONSORCIO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS

Para el cultivo del consorcio CLD3a, productor de H₂S fue utilizado el medio Postgate C modificado. Se preparó una solución con los siguientes sales:

0.5g/L KH₂PO₄

4.5g/L Na₂SO₄

1g/L NH₄Cl

0.06g/L MgSO₄*7H₂O

0.06g/L CaCl₂*6H₂O

0.3g/L Ácido Cítrico

0.004FeSO₄*7H₂O

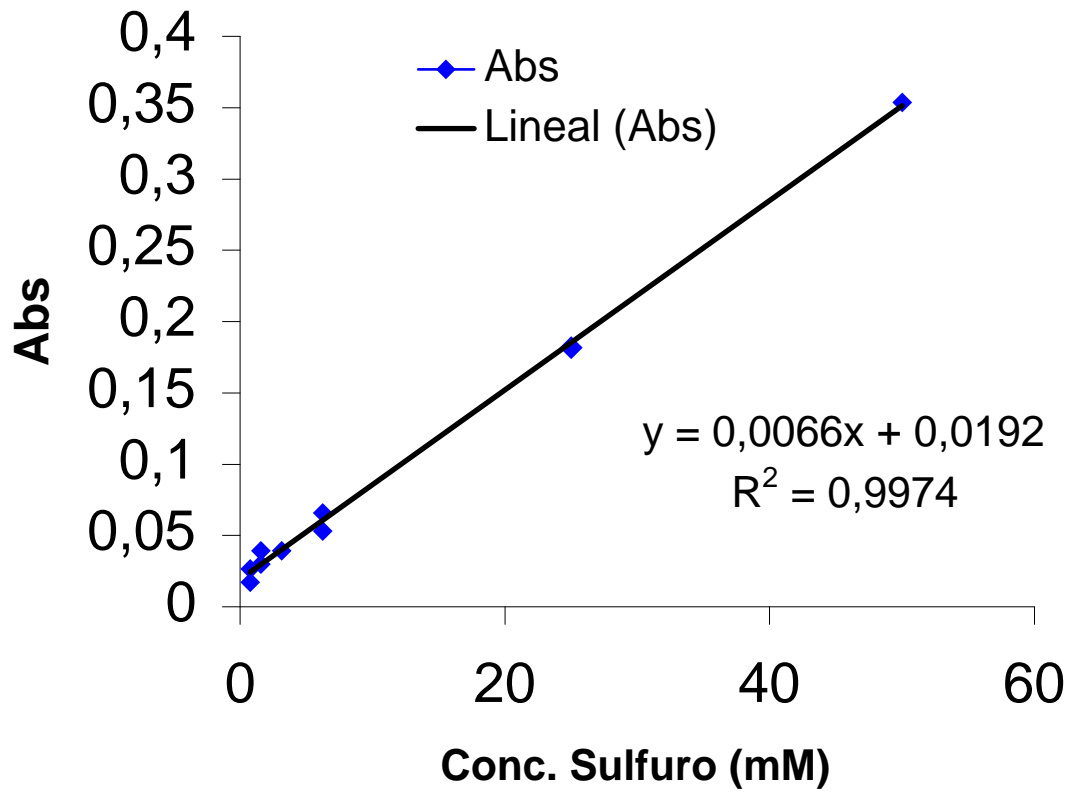
**Ácido láctico 80%(1.19g/mL) 6g/L

El pH del medio debe ser ajustado a 7.5 con KOH (50%) antes de su esterilización.

** Para la preparación de Medio Postgate Basal, reemplazar este compuesto por AGVs a la concentración deseada.

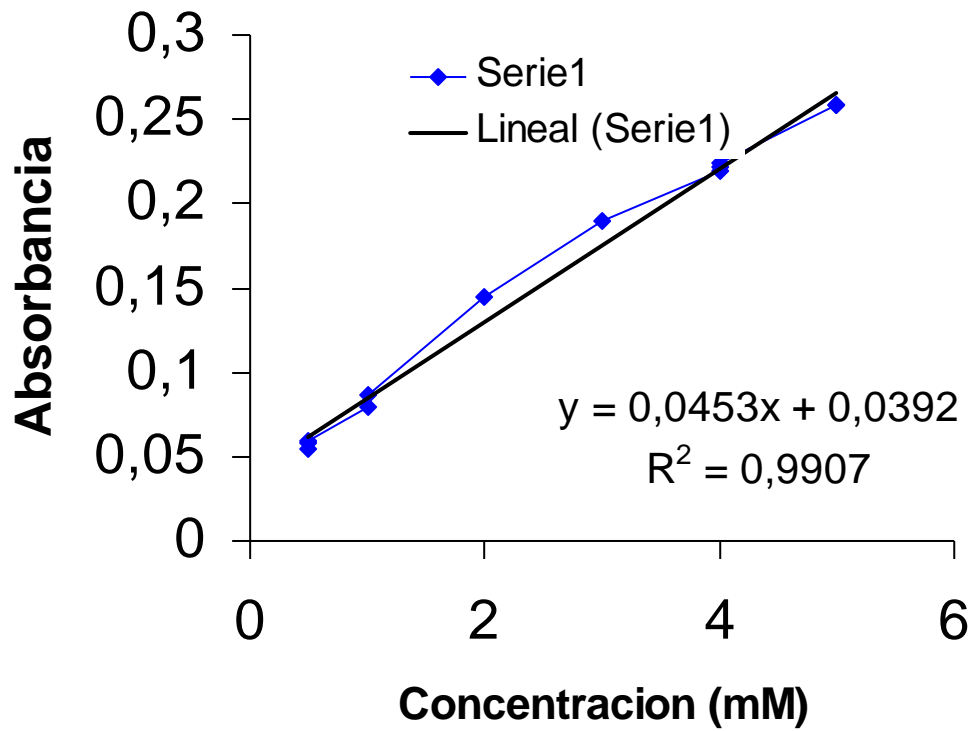
ANEXO #4

Curva de Calibración - Sulfuros



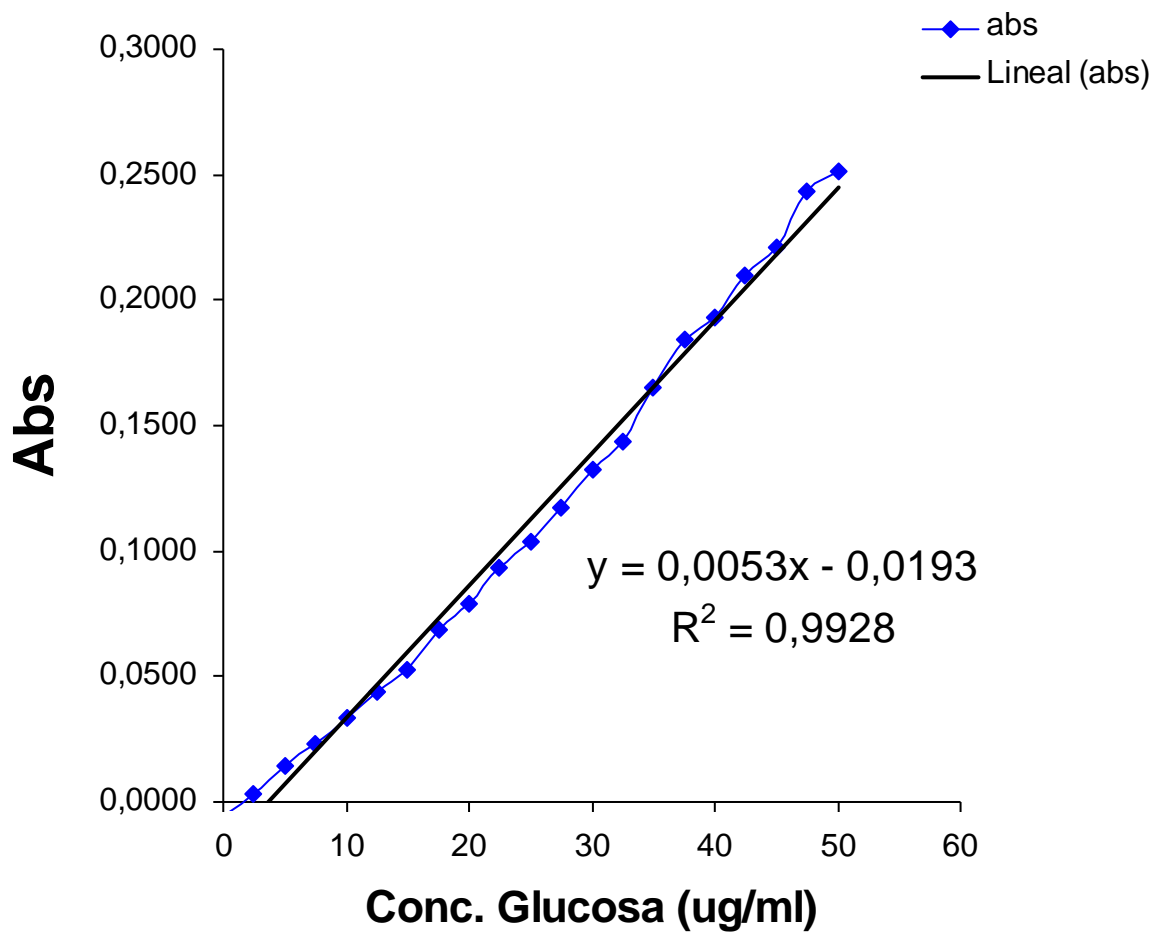
ANEXO #5

Curva de calibración-Sulfatos



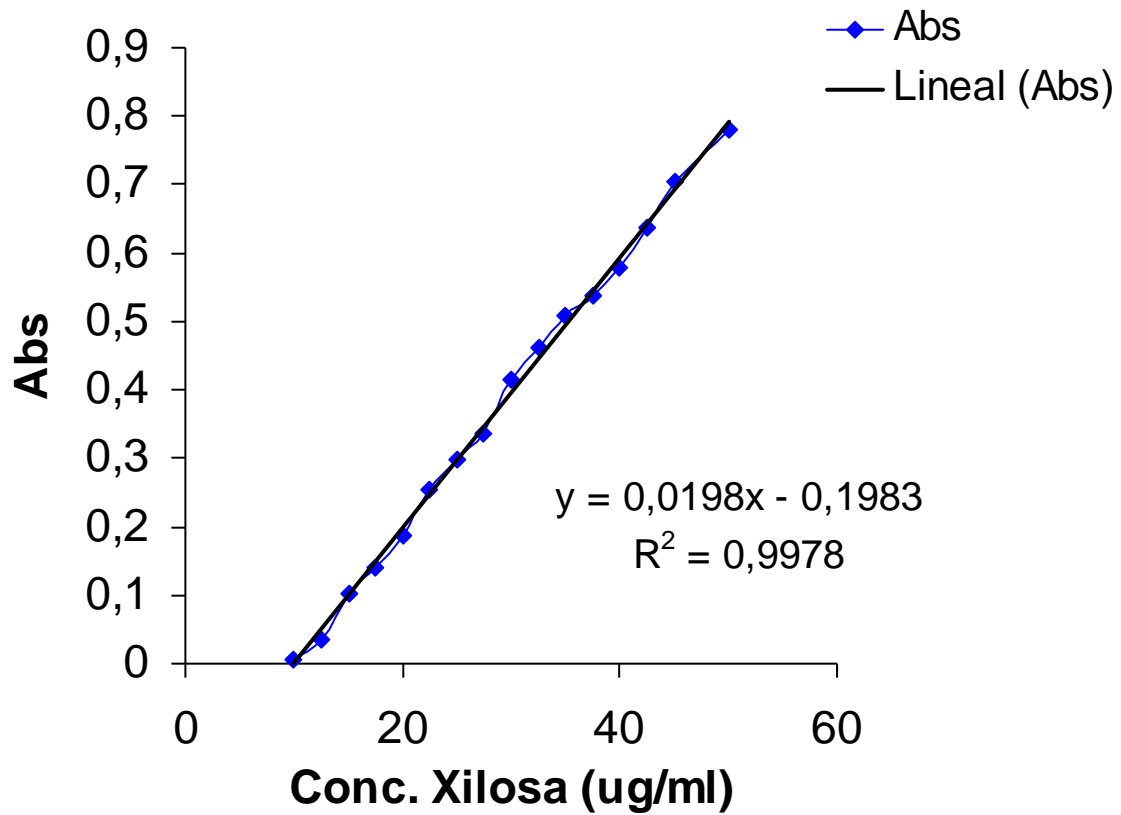
ANEXO #6

Curva de Calibracion-Glucosa (Det. Celulasas y Amilasa)



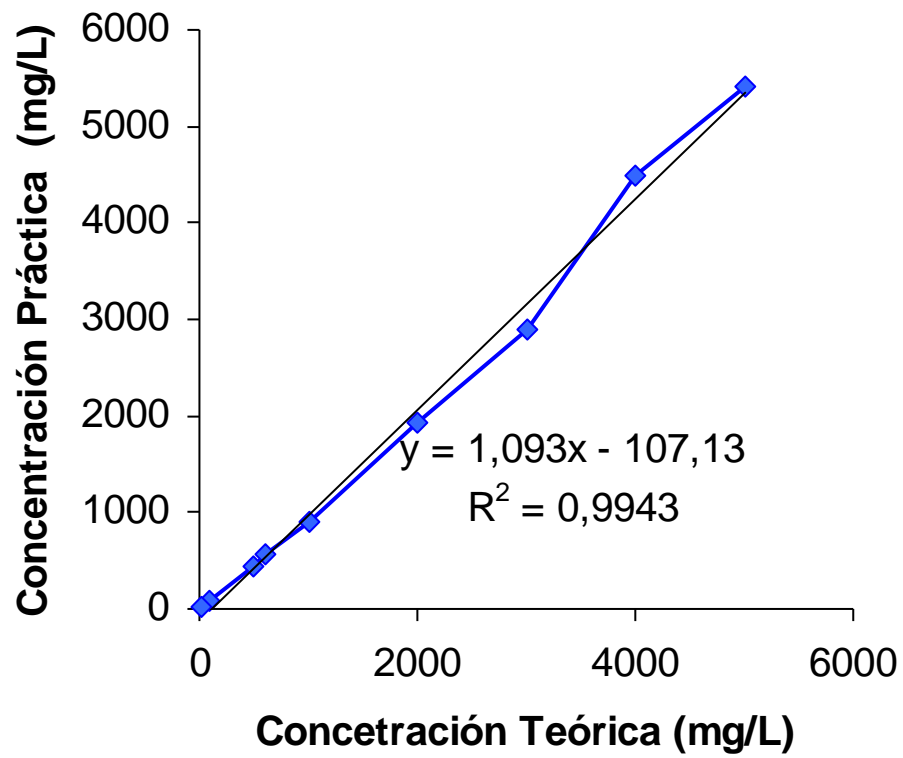
ANEXO #7

Curva de Calibracion-Xilosa (Det. Xilanasas)



ANEXO #8

Curva de Calibración de AGVs



ANEXO #9

Tabla 1: Diseño Factorial N° 1 (final del experimento) Producción de Sulfuro de Hidrógeno y concentración de Sulfato remanente en el medio (Cultivo Batch).

N°Exp	Sulfato	Ácido Acético	[mM SO ₄]	[mM SH ₂]
1	1	1	41,92	0,78
2	1	0	42,62	0,00
3	1	-1	43,95	3,36
4	0	1	26,75	0,00
5	0	0	35,70	0,00
6	0	-1	32,32	1,97
7	-1	1	18,20	0,00
8	-1	0	11,85	0,00
9	-1	-1	17,41	0,00

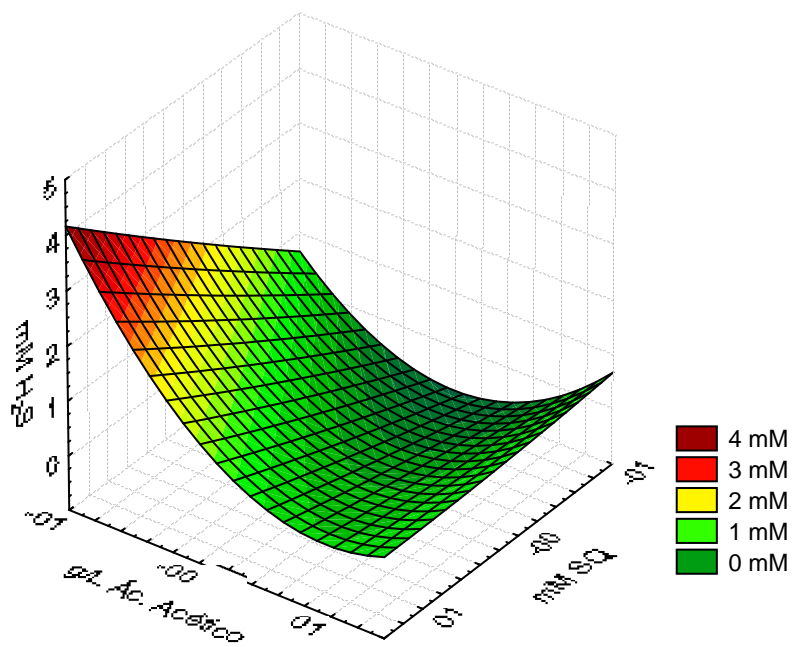
+1 44 mM SO₄ ; 10g/L Ácido Acético; 0 32 mM SO₄; 5g/L Ácido Acético;
-1 20 mM SO₄; 1g/L Ácido Acético

ANEXO #10

Figura 1: Diseño Factorial N° 1 (Final del experimento) Superficie de Respuesta
Variables Independientes [mM SO₄] y [g/L Ác. Acético] Variable dependiente
(mM H₂S).

SUPERFICIE DE RESPUESTA-DISEÑO FACTORIAL N°1 (Final del experimento)

$$\text{mM H}_2\text{S} = -0,0227 + 0,6907 * x - 0,7588 * y + 0,0341 * x * x - 0,6458 * x * y + 1,0189 * y * y$$



X= g/ L Ácido Acético; Y = mM Sulfato; Z= mM Sulfuro



BIENVENIDOS !!!



Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas
Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas

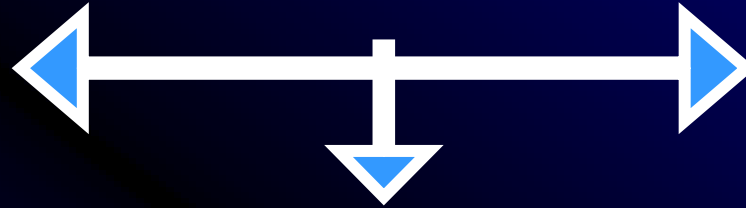
BIOGÉNESIS DE SULFURO DE HIDRÓGENO EMPLEANDO AGVs, PRODUCIDOS POR LA HIDRÓLISIS DE VEGETALES Y FRUTAS EN DESCOMPOSICIÓN

Elaborado por: Carla Crespo Melgar

La Paz - Bolivia
2005



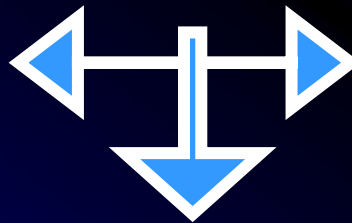
INTRODUCCIÓN



PROCESOS BIOTECNOLÓGICOS

Ventajas
Desventajas

BSRs



Consorcios Hidrolíticos

Bioremediación

JUSTIFICACIÓN

IMPACTO AMBIENTAL

Residuos municipales
orgánicos
biodegradables

Contaminación
por Metales
Pesados (DAM)

?

Solución

Digestión
Anaeróbica

Bioprecipitación

BIOREMEDIACIÓN AMBIENTAL



Hidrólisis enzimática de vegetales y fruta en descomposición (Consortio Microbiano)

Determinaciones Analíticas
(Act.Enz y AGVs)

Producción Ácidos Grasos Volátiles

Sulfatos

Biogénesis de Sulfuro de Hidrogeno (BSRs)

Determinaciones Analíticas
(H₂S, SO₄ AGVs)

Precipitación de metales pesados (DAM)

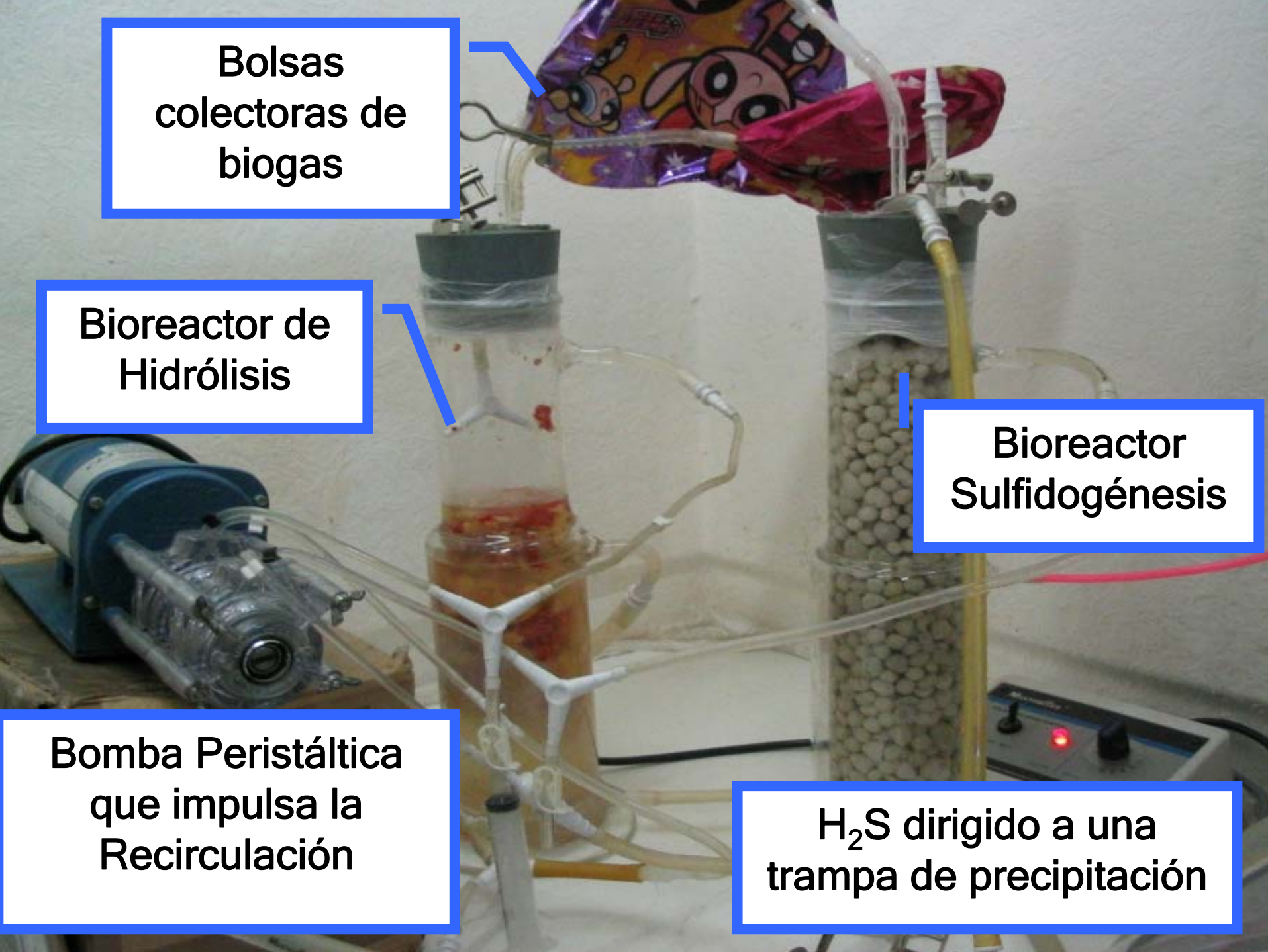
**Bolsas
colectoras de
biogas**

**Bioreactor de
Hidrólisis**

**Bioreactor
Sulfidogénesis**

**Bomba Peristáltica
que impulsa la
Recirculación**

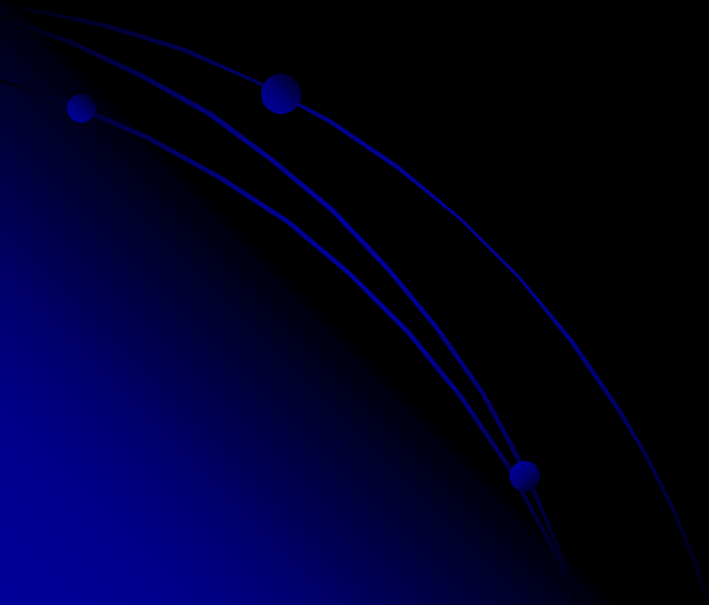
**H₂S dirigido a una
trampa de precipitación**



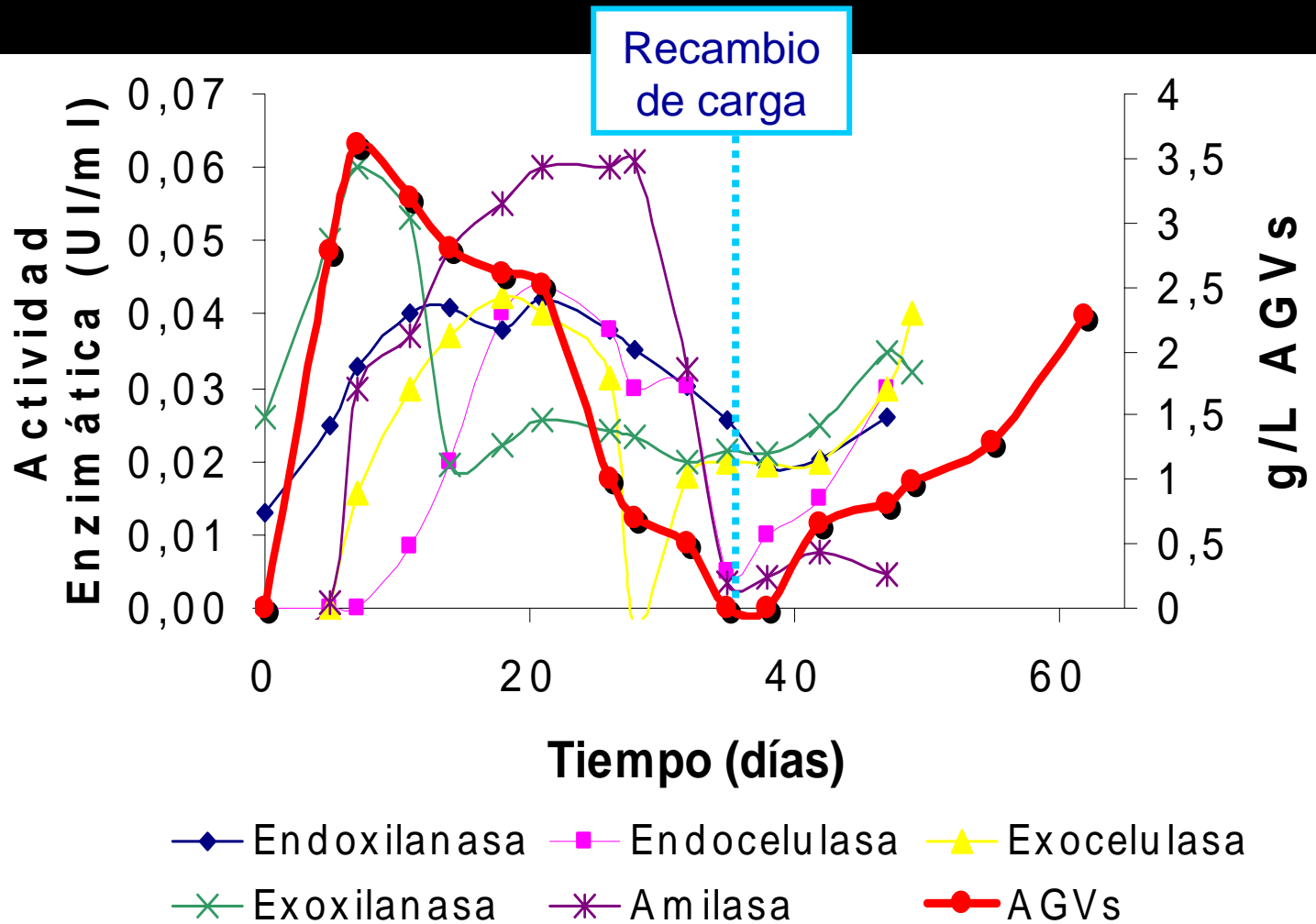
OBJETIVOS

- Establecer condiciones para la biogénesis de H₂S empleando AGVs, producidos por la hidrólisis de vegetales y fruta en descomposición.
- Determinar la actividad enzimática de un consorcio microbiano hidrolítico de vegetales y fruta
- Determinar y controlar la biogénesis de H₂S
- Optimizar la producción de H₂S mediante diseños factoriales
- Evaluar la capacidad precipitante del H₂S biogénico (pH y ORP)

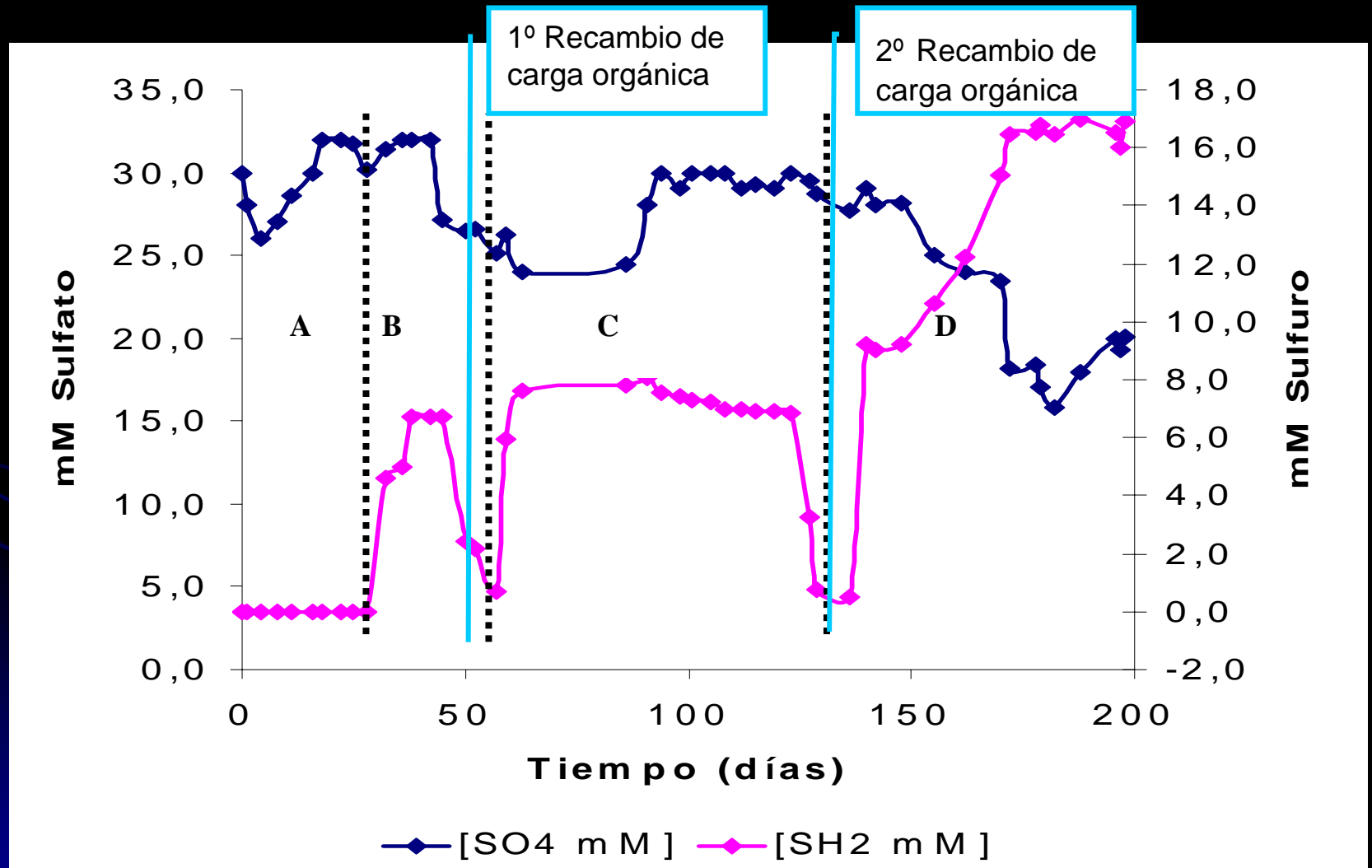
RESULTADOS



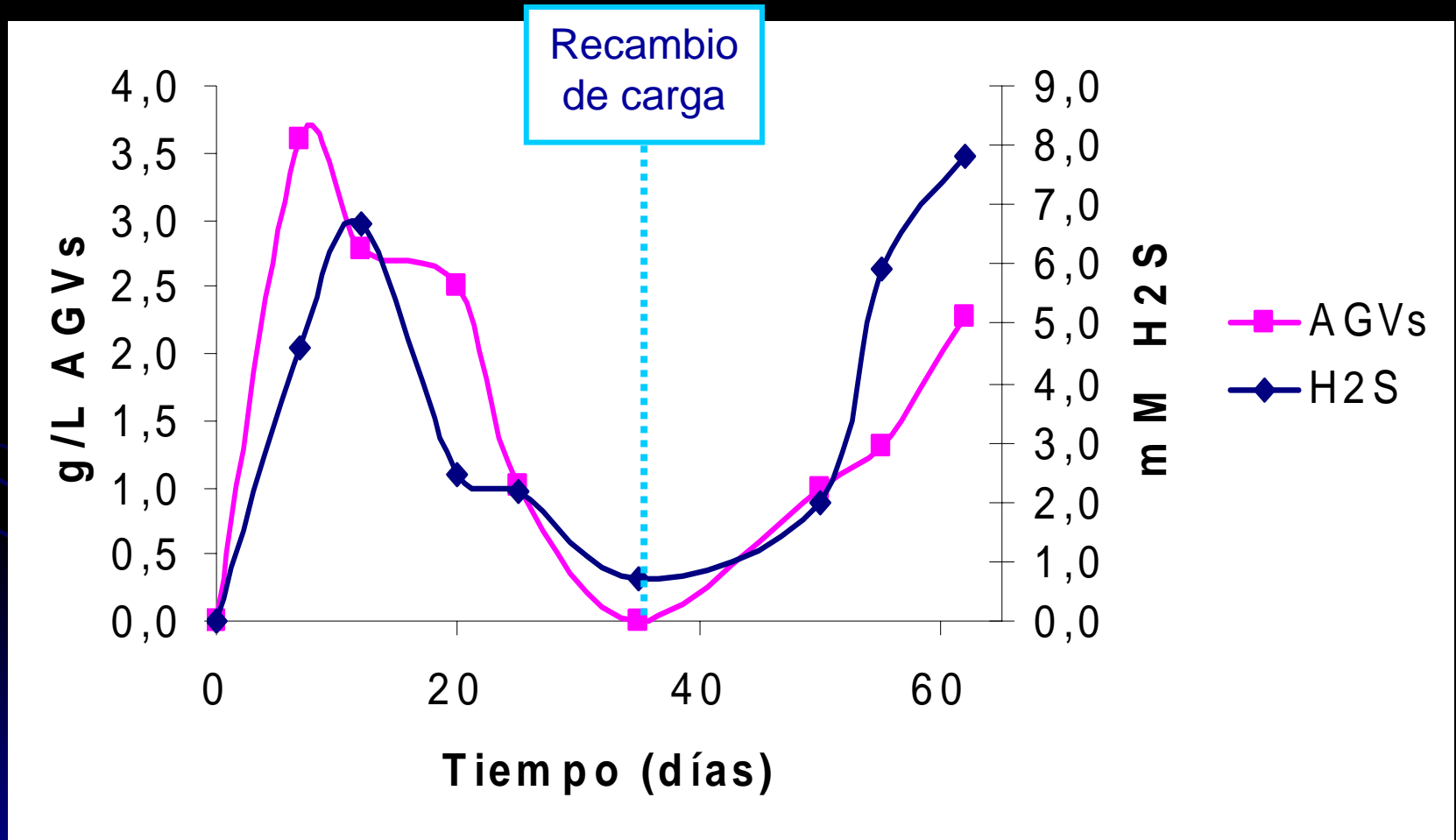
Relación: Act Enz y [AGVs]



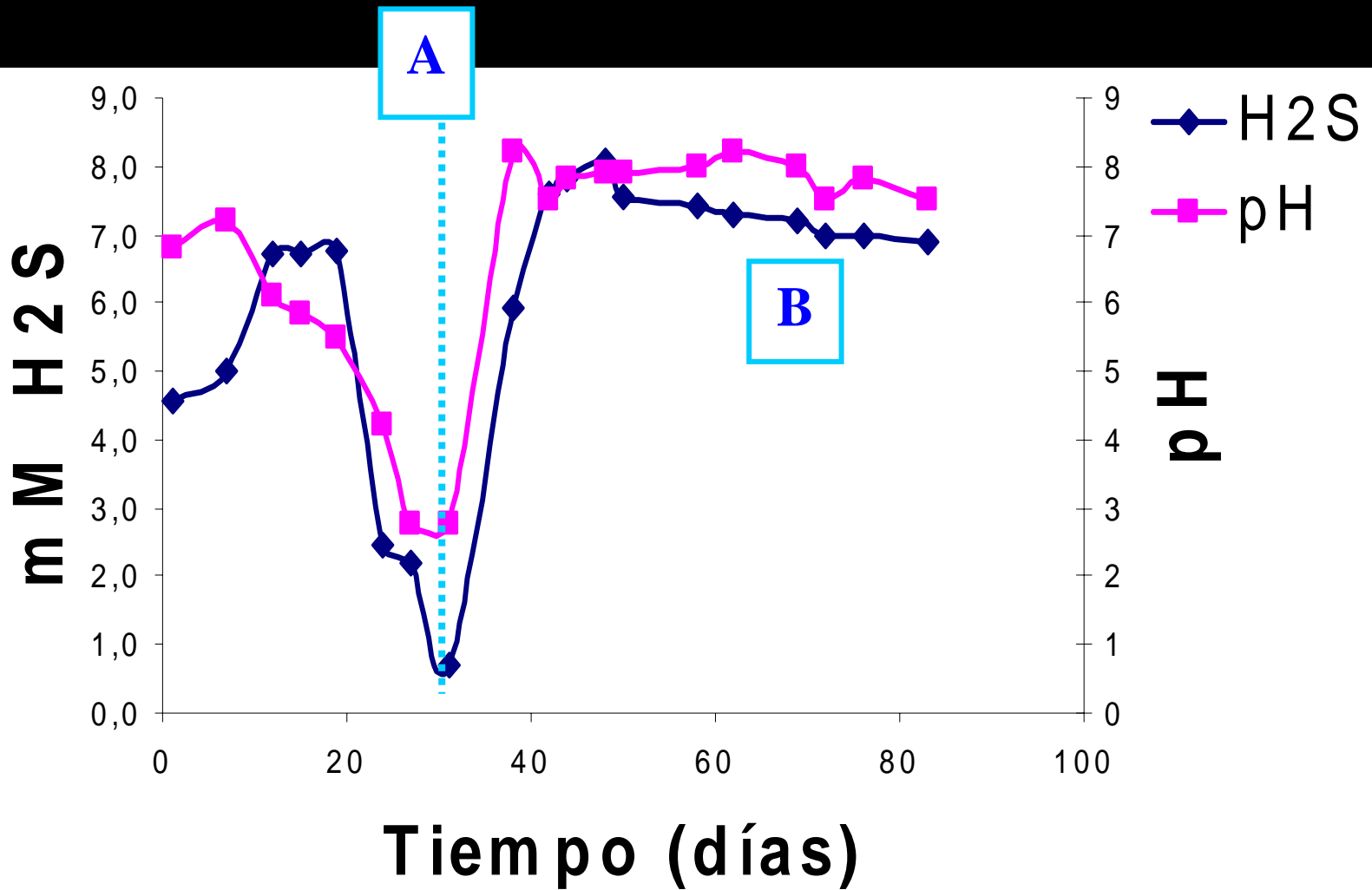
Biogénesis de H₂S, [Sulfato] remanente



Biogénesis de H₂S Vs [AGVs]



Biogénesis de H₂S Vs pH



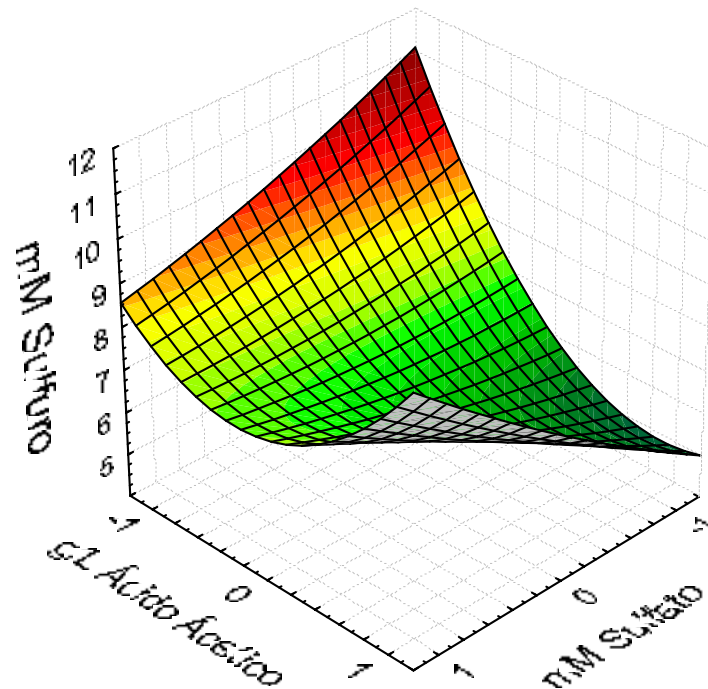
Optimización del proceso de biogénesis de H₂S

SUPERFICIE DE RESPUESTA

DISEÑO FACTORIAL N° 1

mM Sulfuro =

$$6,3918+0,5617*x-0,9197*y+0,1602*x*x+1,3533*x*y+1,4616*y*y$$



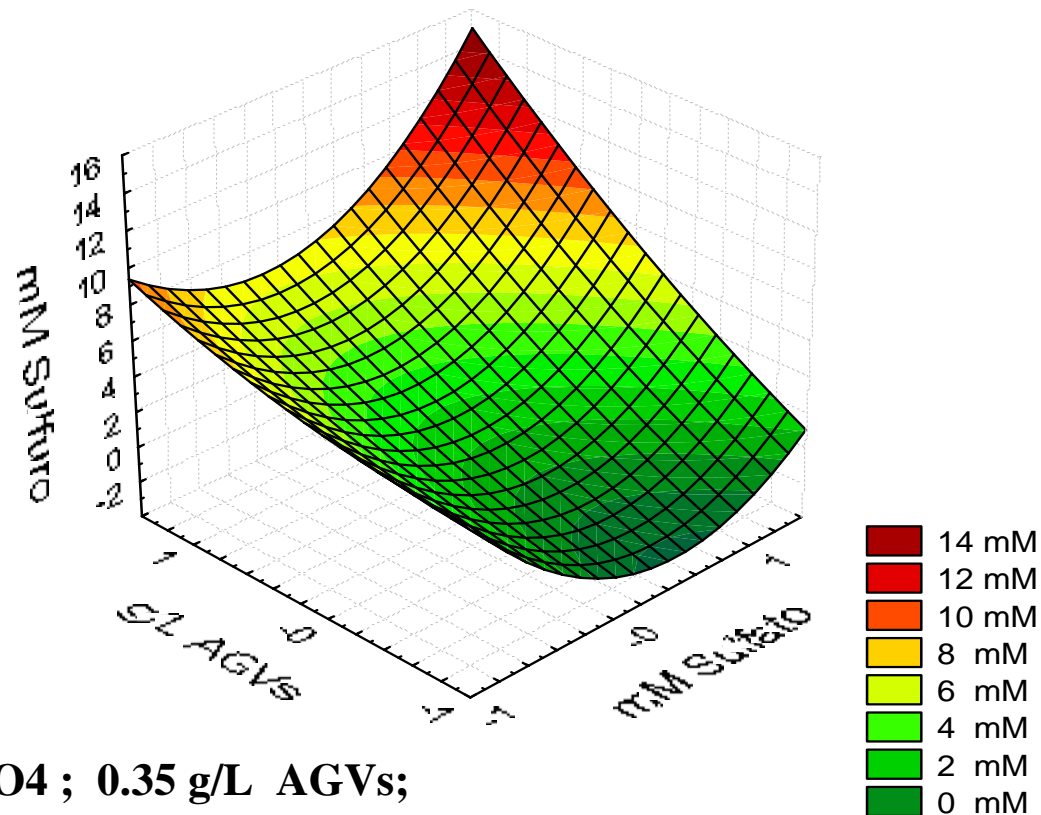
+1 44 mM SO₄; 10g/L Ácido Acético;
0 32 mM SO₄; 5g/L Ácido Acético;
-1 20 mM SO₄; 1g/L Ácido Acético



Optimización del proceso de biogénesis de H₂S

SUPERFICIE DE RESPUESTA
DISEÑO FACTORIAL N°2

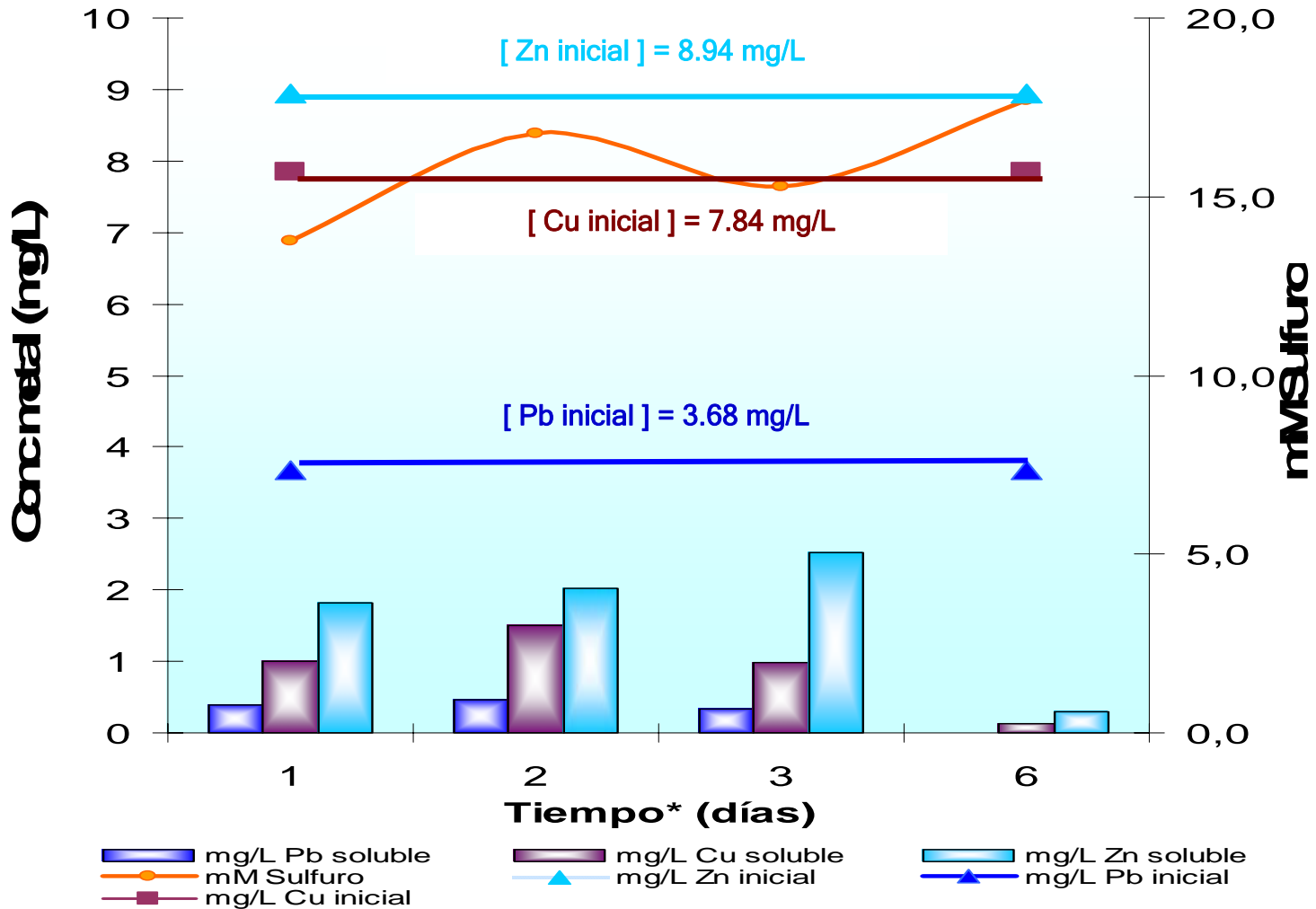
$$\text{mM Sulfuro} = 1,4467 + 0,2551 * x + 3,7211 * y + 3,7279 * x * x + 1,7347 * x * y + 0,6259 * y * y$$



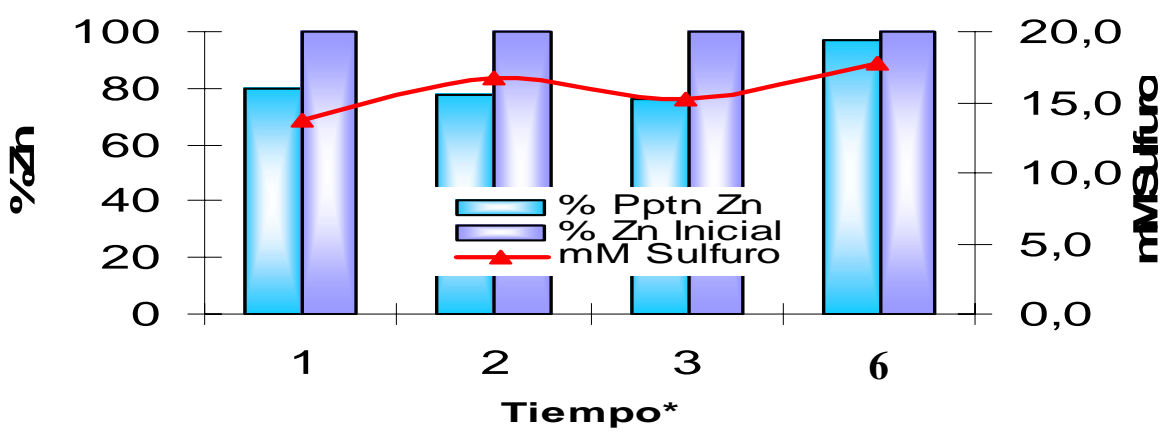
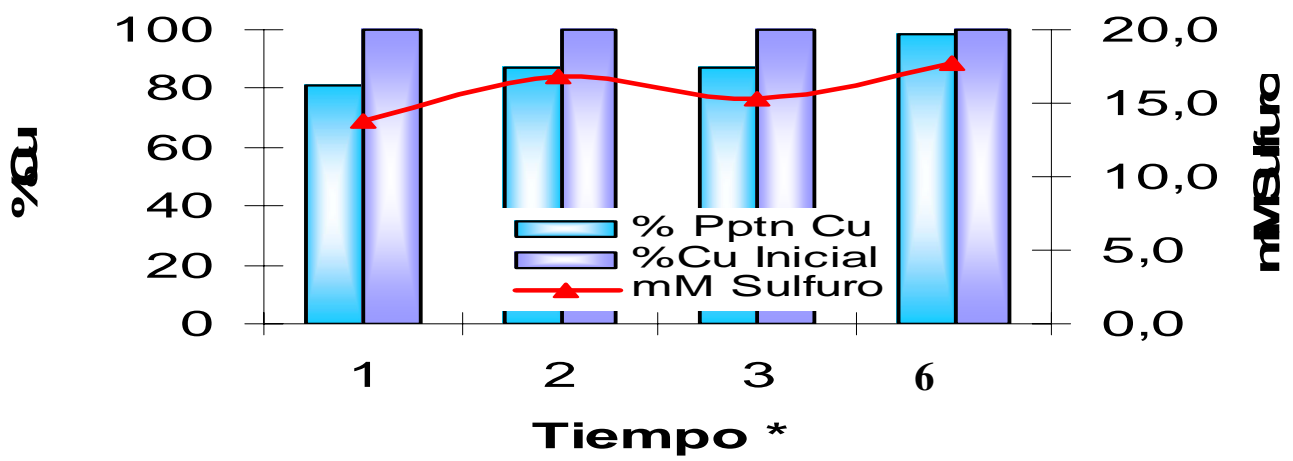
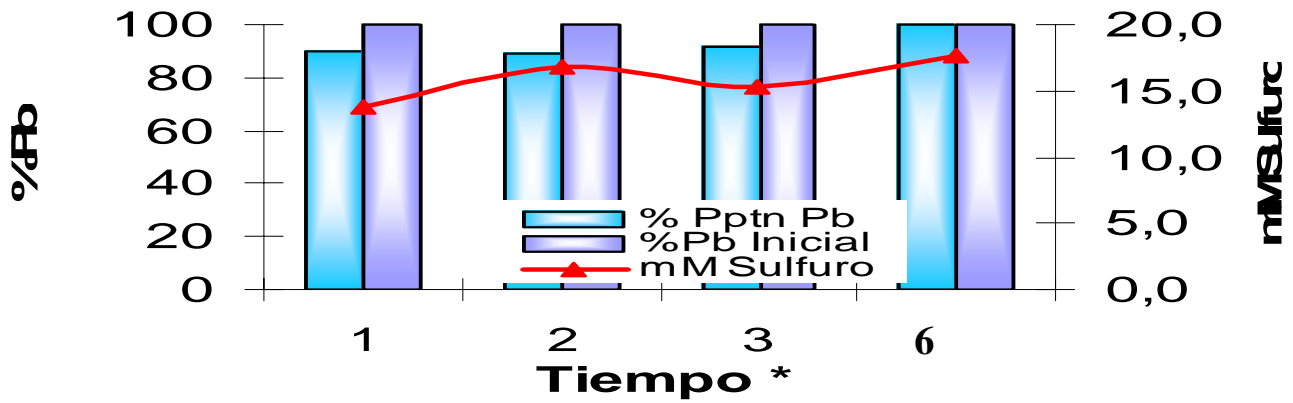
- +1 32 mM SO₄ ; 0.35 g/L AGVs;
- 0 20 mM SO₄; 0.20 g/L AGVs;
- 1 8 mM SO₄; 0.05 g/L AGVs



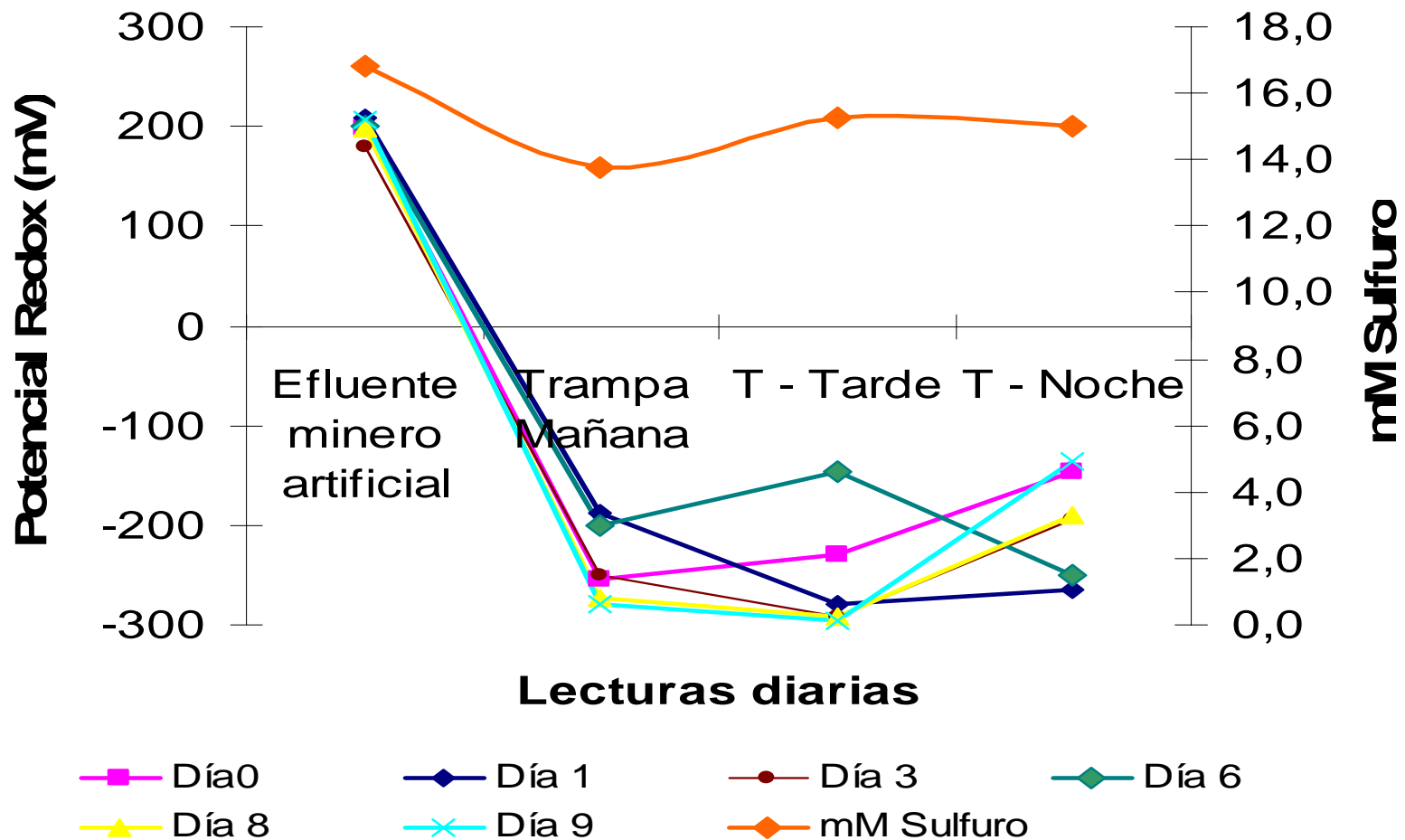
[Metales pesados] antes/después de la precipitación



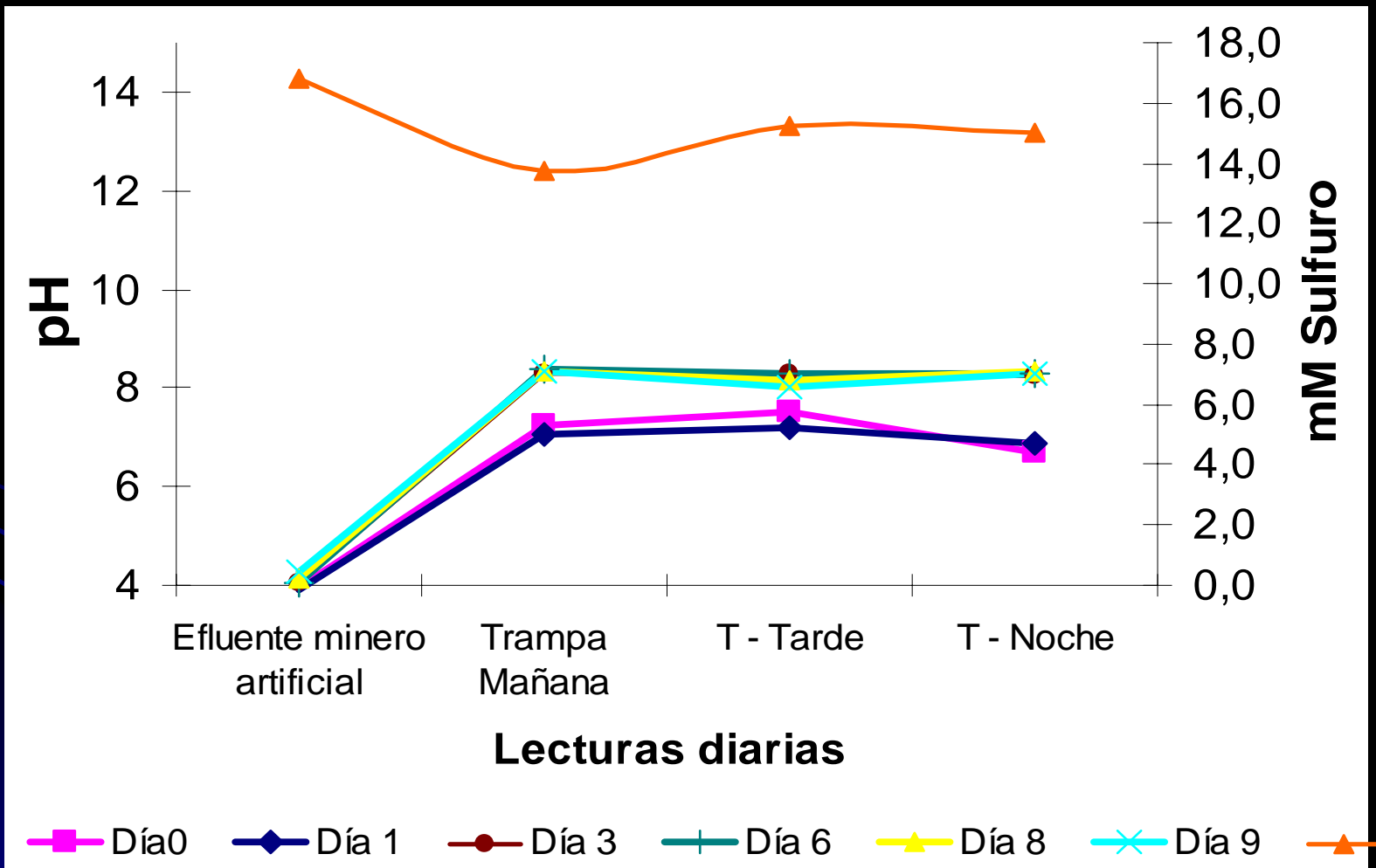
PRECIPITACIÓN PORCENTAJE DE



Efecto del Potencial Redox durante la precipitación



Efecto del pH durante la precipitación



CONCLUSIONES

- La biogénesis de H₂S alcanzó un valor de 16.5 mM con las condiciones:
 - Carga orgánica (mezcla proporcional de frutas)
 - Alimentación: F=25 mL/día (1.25 mL AGVs [3.8g/L B.H.] y 23.75 mL Postgate C [32 mM]); $\mu = 0.05d^{-1}$, $\tau = 20d$
 - pH= 8.5; T° amb
- Relación proporcional: Act. Enz. Y [AGVs]
- Optimización del proceso: 32 mM de Sulfato y 0.35 g/L **AGVs**
- Capacidad precipitante H₂S: 100% Pb, 98.45% Cu y 96.75% Zn; a los 6 días de contacto Metal-Sulfuro.
- Indicadores de precipitación: pH ~4 a ~8; ORP +200mV, a -200mV



A blue-tinted landscape of rolling hills and mountains. The foreground shows a dense forest of evergreen trees covering a hillside. In the background, several layers of mountain ranges are visible, creating a sense of depth and distance. The sky is a pale, hazy blue. The word "GRACIAS" is centered in the middle of the image in a bold, serif font with a 3D effect and a color gradient from light blue to white.

GRACIAS