



UNIVERSIDAD TÉCNICA PARTICULAR DE LOJA

La Universidad Católica de Loja

ESCUELA DE INGENIERIA QUIMICA

**“OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO PARA LA PRODUCCIÓN DE H₂S A
PARTIR DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS
PROVENIENTES DE UNA FUENTE HIDROTHERMAL”**

**TESIS DE GRADO PREVIA A
LA OBTENCIÓN DEL TÍTULO
DE INGENIERO QUIMICO.**

Autor:

Carlos Alberto Torres Salcedo

Director:

Ing. Víctor Aurelio Sanmartín

Loja, abril del 2010

CESIÓN DE DERECHOS

Yo Carlos Alberto Torres Salcedo declaro conocer y aceptar la disposición del Art. 67 del Estatuto Orgánico de la Universidad Técnica Particular de Loja que en su parte pertinente textualmente dice: “Forman parte del patrimonio de la Universidad la propiedad intelectual de investigaciones, trabajos científicos o técnicos y tesis de grado que se realicen a través, o con el apoyo financiero, académico o institucional (operativo) de la Universidad”

Carlos Alberto Torres Salcedo

CERTIFICACIÓN

Ing. Víctor Sanmartín, Director de Tesis de Grado, que versa sobre el tema:

“OPTIMIZACIÓN DEL MEDIO PARA LA PRODUCCIÓN DE H_2S A PARTIR DE UN CONSORCIO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS PROVENIENTES DE UNA FUENTE HIDROTERMAL”.

CERTIFICO:

Que el presente trabajo ha sido realizado bajo mi dirección y una vez que ha sido íntegramente revisado y cumple con los requisitos autorizo su presentación.

Ing. Víctor Sanmartín
DIRECTOR DE TESIS

Loja, abril del 2010

AUTORÍA

La presentación, procedimientos y conceptos vertidos en el presente trabajo de tesis son de responsabilidad absoluta del autor.

Carlos Alberto Torres Salcedo

AGRADECIMIENTO

Agradezco de manera infinita a Dios por darme fuerza, fortaleza y disposición para seguir siempre adelante y ayudarme a cumplir mis metas.

Por todos los valores cultivados durante toda mi vida, por todo el apoyo incondicional brindado y por la paciencia que me han tenido, agradezco profundamente a mis padres.

A mis hermanos, familiares y amigos les agradezco por apoyarme siempre, por no permitirme que me rinda en el largo caminar de mi vida y sobre todo por la confianza inspirada para con mis sueños.

Al personal del Centro de Biología Celular y Molecular de la Universidad Técnica Particular de Loja por la colaboración brindada en el desarrollo de este trabajo y por los consejos brindados.

A mi Director de Tesis Ing. Víctor Sanmartín, por su predisposición y sus sugerencias durante la elaboración de este proyecto.

Finalmente agradezco a mis amigos y compañeros que siempre estuvieron pendientes de mi trabajo y a todas aquellas personas que de una u otra manera hicieron posible la realización de este trabajo.

El Autor.

DEDICATORIA

Con inmensa gratitud y sobre todo cariño dedico este trabajo a Dios, a mi hija Doménica, por darme la fuerza y el valor de superarme día a día, a mi esposa Jhaneth por brindarme el apoyo moral y demostrarme que en la vida todo se puede si te esfuerzas, y a mis padres quienes con esfuerzo y comprensión supieron guiarme durante todos mis años de estudio y por ser mis principales ejemplos de constancia, dedicación, amor y sencillez.

ÍNDICE	pág.
CESIÓN DE DERECHOS.....	1
CERTIFICACIÓN.....	2
AUTORÍA.....	3
AGRADECIMIENTO.....	4
DEDICATORIA.....	5
ÍNDICE.....	6
RESUMEN.....	9
CAPITULO I: INTRODUCCIÓN.....	10
1.1. Fin del proyecto.....	12
1.2. Propósito del proyecto.....	12
1.3. Componentes del proyecto.....	12
1.4. Hipótesis del trabajo.....	13
CAPITULO II: REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1. Biorremediación.....	15
2.2. Producción de gas sulfhídrico biológico.....	16
2.2.1. Bacterias sulfato reductoras.....	16

2.2.1.1. Definición.....	17
2.2.1.2. Géneros.....	17
2.2.1.3. Características.....	19
2.2.1.4. Hábitat.....	19
2.2.1.5. Fuentes de energía y nutrición.....	20
2.2.1.6. Reducción microbiana de sulfatos.....	21
2.2.2. Sulfuro de Hidrógeno.....	22
2.3. Producción química de gas sulfhídrico.....	24
2.3.1. Generador de Kipp para gases.....	24
CAPITULO III: MATERIALES Y METODOS.....	25
3.1. Producción de gas sulfhídrico biológico.....	26
3.1.1. Microorganismo y medios de cultivo.....	26
3.1.2. Producción de gas sulfhídrico.....	26
3.1.3. Medición de de gas sulfhídrico.....	27
3.1.4. Determinación de sulfatos.....	27
3.1.5. Conteo Bacteriano.....	27
3.2. Producción Química de gas sulfhídrico.....	28
3.3. Diseño experimental y variables de estudio.....	29
3.3.1. Producción óptima de gas sulfhídrico Biológico.....	29
3.3.2. Producción química de gas sulfhídrico.....	30
3.4. Análisis estadístico.....	30
CAPITULO IV: RESULTADOS Y DISCUSION.....	33

4.1. Análisis estadístico.....	34
4.2. Discusión de resultados.....	34
4.2.1. Producción biológica de gas sulfhídrico.....	34
4.2.2. Reducción de sulfatos.....	37
4.2.3. Conteo Bacteriano.....	39
4.2.4 Producción química con K₂S y FeS₂.....	41
4.2.5. Comparación en términos de costos y eficiencia	
de la Producción química y biológica de gas	
sulfhídrico.....	43
4.2.5.1. Eficiencia en la producción.....	43
4.2.5.2. Costos.....	44
CAPITULO V: CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	46
5.1. Conclusiones.....	47
5.2. Recomendaciones.....	49
BIBLIOGRAFÍA.....	50
ANEXOS.....	55

RESUMEN

Las bacterias sulfato reductoras (BSR) son responsables de la producción de sulfuro de hidrógeno (H_2S) en anaerobiosis a partir de sulfatos y un donador de electrones. El sulfuro producido podría utilizarse para precipitar metales catiónicos divalentes, permitiendo la biorremediación de efluentes contaminados.

Se evaluó la producción de sulfuro de hidrógeno de un consorcio de bacterias sulfato reductoras aisladas de una fuente hidrotermal ubicada en el sector agua caliente del distrito minero Portovelo, con tres concentraciones de sulfato de sodio (30, 40, 50 mM) y de ácido láctico como fuente de carbono (70, 90, 110 mM). La mejor producción de sulfuro de hidrógeno se dio con las concentraciones de 110 mM de ácido láctico y 30 mM de sulfatos como aceptor de electrones, obteniendo una producción de 36,33 ml de gas sulfhídrico.

Además se realizó una producción de sulfuro de hidrógeno por métodos químicos utilizando piritita y sulfuro de potasio, con concentraciones de (30, 40, 50 mM) respectivamente, por reacción química con ácido clorhídrico con concentraciones de (70, 90, 110 mM). Los resultados de la producción química se compararon y se determinó que la mejor producción, se la obtuvo con sulfuro de potasio a concentración de 30 mM y ácido clorhídrico 110 mM.

Finalmente se realizó una comparación de gas sulfhídrico producido por el método biológico frente al método químico con K_2S , en términos de eficiencia y costos; y se determinó que el método biológico es el más adecuado.

CAPÍTULO I:

INTRODUCCIÓN.

1. INTRODUCCION

La actividad industrial, hoy en día se ha convertido en un problema medio ambiental, debido a que vierten grandes cantidades de desechos con altas concentraciones de sulfato, metaloides (arsénico) y metales pesados como: cobre, níquel, zinc, plomo y hierro en las cuencas hidrográficas (Álvarez M 2007).

Mediante el avance de la biotecnología se ha desarrollado una rama muy importante para el medio ambiente llamada remediación, la misma que se encarga de mitigar el impacto creado por los metales pesados y metaloides debido a su alta concentración presente en efluentes contaminados.(Luptakova A, 2009)

Muchos intentos relacionados con la remediación de metales pesados se han llevado a cabo en todo el mundo y practicado durante varias décadas con el objetivo de prevenir los efectos nocivos de los metales tóxicos sobre el medio ambiente, estos contaminantes incluso en cantidades pequeñas pueden causar daños a los organismos vivos. (Alvarez M, 2005)

Los metales pesados, no pueden ser degradados fácilmente, por ello, los procesos de remediación se reducen a la inmovilización de los mismos, mediante la producción de gas sulfhídrico que puede ser producido de dos maneras química y biológica, este gas al ser liberado a un medio con presencia de metales pesados, reacciona para formar compuestos sulfurados estables de baja solubilidad y biodisponibilidad. (Vicente M, 2006).

1.1 FIN DEL PROYECTO

Contribuir al conocimiento científico para desarrollar un procedimiento de producción de gas sulfhídrico de una manera económica y amigable con el medio ambiente, con miras de aplicarlo en la precipitación de metales pesados en la industria.

1.2 PROPÓSITO DEL PROYECTO

Modificar el medio lactato C con variaciones en las concentraciones de donador de electrones (ácido láctico) y aceptor de electrones (sulfato de sodio), para optimizar la producción biológica de gas sulfhídrico con un consorcio de bacterias sulfato reductoras (BSR).

1.3 COMPONENTES DEL PROYECTO

1.3.1 Determinar las concentraciones óptimas de ácido láctico y sulfato de sodio para la producción de H₂S biológico.

1.3.2 Determinar la mejor producción de gas sulfhídrico con K₂S y FeS₂ (pirita). De acuerdo a la estequiometría de reacción con HCl para la producción de H₂S químico

1.3.3 Comparar la producción biológica y química de H₂S en términos de rendimiento y costos de producción.

1.4 HIPÓTESIS DE TRABAJO

H.1. Las variaciones en las concentraciones de fuente de carbono (ácido láctico) y del aceptor de electrones (sulfato de sodio) inciden en la producción biológica del gas sulfhídrico.

H2. Producir gas sulfhídrico con K_2S , resulta más eficiente que la producción de gas sulfhídrico con FeS_2 (pirita).

H3. Producir gas sulfhídrico biológicamente es más eficiente y económico que la producción química.

CAPÍTULO II:

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

2.1. BIORREMEDIACIÓN

El término biorremediación fue acuñado a principios de la década de los '80. Se trata fundamentalmente de la aplicación de estrategias de remediación biológicas, basadas en la capacidad de los microorganismos de interactuar en forma directa con contaminantes. Los microorganismos pueden degradar los desechos en productos menos tóxicos, concentrar e inmovilizar sustancias tóxicas tales como metales pesados; minimizar desechos industriales y rehabilitar áreas afectadas con diversos contaminantes. De este modo la biorremediación permite mejorar los ecosistemas dañados, acelerando algunos procesos naturales (Whiteley y Lee, 2006).

El tratamiento biológico de residuos tiene algunas ventajas, cuando es comparado con técnicas tradicionales utilizadas con este fin, entre dichas ventajas se encuentran (Veglio y Beolchini, 1997; Tomotada y Masao, 2001):

- Bajo costo del tratamiento.
- Tratamiento in situ, no hay gastos de transporte.
- Reducción y eliminación de subproductos finales.
- Eliminación de un costoso equipamiento y atención frecuente del operador.
- Eliminación de un seguimiento a perpetuidad.

La aplicación de la biorremediación para solucionar los graves problemas de deterioro ambiental se ha incrementado notablemente en los últimos años; no obstante, el terreno más importante de aplicación ha sido el del tratamiento de contaminantes orgánicos, en particular, de hidrocarburos (Tomotada y Masao, 2001).

A diferencia de lo que puede ocurrir con compuestos orgánicos contaminantes, los metales pesados no pueden ser degradados. Las posibilidades para el tratamiento de contaminaciones producidas por ellos se reducen a inmovilizarlos (si se encuentran en una fase líquida o gaseosa) o movilizarlos (para extraerlos desde matrices sólidas) de forma tal de reducir su biodisponibilidad o su toxicidad, esto mediante la producción de sulfuro de hidrógeno. (Ledin, 2000; Viera y Donati, 2004).

2.2. Producción de Sulfuro de Hidrógeno Biológico.

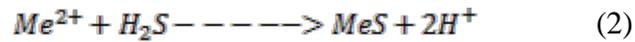
2.2.1. Bacterias Sulfato Reductoras

Las bacterias sulfato-reductoras son un grupo muy heterogéneo de organismos heterótrofos anaeróbios facultativos. Algunos autores como Widdel y Hansen (1991) consideran que las bacterias sulfato-reductoras son estrictamente anaerobias y sostienen que, por lo general, son muy sensibles a los medios óxicos y mueren de forma más o menos rápida expuestos a éstos. Sin embargo, estudios recientes apuntan hacia la tesis de que la respiración del oxígeno limita la actividad de las bacterias sulfato reductoras mediante la competencia por los sustratos orgánicos y no tanto por la toxicidad del oxígeno (Norsker, 1995).

Las bacterias sulfato reductoras producen aproximadamente 2 moles de alcalinidad por mol de sulfato que es reducido (Frank, Paul, 1999); la cantidad exacta de alcalinidad varía con la estructura del donador de electrones. Un ejemplo de la reacción con acetato como donador de electrones muestra esta proporción 2:1 de producción de alcalinidad (Reacción 1):



Un mol de sulfuro es generado por mol de reducción de sulfato, y el sulfuro precipitará los metales pesados con bajo producto de solubilidad del sulfuro de metal (Reacción 2):



donde Me^{2+} simboliza un metal pesado divalente.

Todos los sistemas de reactores microbianos requieren una fuente de carbono y un soporte que permita el crecimiento bacteriano, puesto que se han encontrado relaciones cuantificables entre la actividad de BSR y los parámetros físicos del soporte (Lyew & Sheppard, 1997).

2.2.1.1. Definición de bacterias sulfato reductoras

Son las bacterias que tienen la facultad de reducir sulfato, sulfito o tiosulfato de manera no asimilatoria, utilizándolos como aceptores de electrones, produciendo como desecho metabólico ácido sulfhídrico (H_2S).

2.2.1.2. Géneros

Actualmente se han reconocido diez géneros de bacterias reductoras de sulfato, subdivididos en dos grandes grupos fisiológicos (según su metabolismo), es decir, si oxidan o no el acetato como fuente de carbono y energía.

Tabla 2.1. Bacteria Sulfato Reductoras

GRUPO/GENERO	RASGOS FENOTIPICOS SOBRESALIENTES			
	GRAM	MORFOTIPO	ESPORAS	CAPACIDAD CRECIMIENTO AUTOTROFICO
GRUPO - I (No Oxidan Acetato)				
<i>Desulfovibrio</i>	-	bacilos curvos	-	+
<i>Desulfomicrobium</i>	-	bacilos	-	-
<i>Desulfobotulus</i>	-	vibrios	-	-
<i>Desulfotomaculum</i>	-	bacilos	+	-
<i>Archaeoglobus</i>	+	pleomórfico	-	-
<i>Desulfobulbus</i>	-	ovoide	-	-
<i>Thermodesulfobacterium</i>	-	bacilos	-	-
GRUPO - II (Oxidan Acetato)				
<i>Desulfobacter</i>	-	bacilos	-	-
<i>Dsulfobacterium</i>	-	bacilos	-	+
<i>Desulfococcus</i>	-	cocos	-	+
<i>Dseufonema</i>	+	filamentos	-	+
<i>Desulfosarcina</i>	-	cocos	-	+
<i>Desulfoarculus</i>	-	vibrios	-	-

Fuente: Kolmer et. al (2000)

1. GÉNEROS DEL GRUPO I *Desulfovibrio*, *Desulfomonas*, *Desulfotomaculum*, *Desulfobulbus*: Utilizan fundamentalmente lactato, piruvato, etanol, o ciertos ácidos grasos como fuentes de energía y de carbono, reduciendo el sulfato a sulfuro de hidrógeno.
2. GÉNEROS DEL GRUPO II: *Desulfobacter*, *Desulfococcus*, *Desulfosarcina* y *Desulfonema*: Están particularmente especializados en la oxidación de ácidos grasos, en particular del acetato, reduciendo el sulfato a sulfuro.

2.2.1.3. Características

Aunque son morfológicamente diversas, las bacterias reductoras de sulfatos se pueden considerar un grupo unificado fisiológicamente, del mismo modo que las bacterias metanogénicas o fototróficas.

- Las BSR están representadas tanto por microorganismos heterótrofos, por ejemplo *Desulfovibrio desulfuricans*, como autótrofos, por ejemplo *Desulfobacterium macestii*.
- Las BSR también se caracterizan por ser anaerobias obligadas, se deben usar técnicas anaeróbicas estrictas en su cultivo.
- Las *Desulfuromonas* difieren de las *Campilobacter* en que son anaerobios obligados y utilizan solamente azufre como aceptor de electrones.

2.2.1.4. Hábitat

Estas bacterias se encuentran ampliamente distribuidas en ambientes anóxicos tanto acuáticos como terrestres:

- Se encuentran en el nivel subsuperficial de ambientes acuáticos como sedimentos o aguas profundas que se vuelven anóxicas.
- También se encuentran en lodos y sedimentos de plantas industriales petrolíferas.
- En biofilms metálicos de conducciones industriales donde producen procesos de corrosión.
- En heces del hombre y animales.

- En frutas en estado de descomposición.
- Ocasionalmente en ambientes hipersalinos y termófilos.

2.2.1.5. Fuentes de energía y nutrición

Gottschalk (1986) presentan dos grupos principales de bacterias sulfato-reductoras (Tabla 2.2). El primer grupo lo comprenden especies cuyo metabolismo implica la oxidación incompleta del sustrato orgánico a acetato, mientras que el segundo grupo abarca aquellos microorganismos capaces de oxidar completamente la materia orgánica excretando dióxido de carbono. En general, las bacterias que realizan la oxidación incompleta se caracterizan por ser nutricionalmente menos versátiles que las especies oxidantes completas y presentar velocidades de crecimiento más rápidas.

BSR no oxidantes de acetato: las fuentes de energía que utilizan son el malato, formiato y alcoholes como metanol, etanol, propanol y butanol, oxidándolos hasta acetato como producto final y excretan ácido graso.

BSR oxidantes de acetato: oxidan lactato, succinato e incluso benzoato para producir CO₂.

Tabla 2.2 Clasificación de las bacterias sulfato-reductoras de acuerdo a su metabolismo

Clasificación	Aceptor de electrones	Dador de electrones	Ejemplo (forma, ancho/μm, largo/μm)
Grupo I Oxidantes incompletos, excreción de acetato	Compuestos oxidados de azufre	Lactato, formato, propionato, butirato, piruvato, hidrogeno molecular. Cadenas largas y cortas de ácidos grasos, alcoholes, compuestos aromáticos, hidrogeno molecular	<i>Desulfovibrio</i> (vibrio, 0.5-0.8, 1.5-2.0)
			<i>Desulfotomaculum</i> (varilla, 0.7-1.2, 2-4)
			<i>Desulfomonas pigra</i> (varilla, 0.8-1.3, 1.2-5.0)
			<i>Desulfovibrio thermophilus</i> (varilla, 0.5, 1.2-2.5)
			<i>Desulfolobus</i> Varilla u óvalo, 0.6-1.3, 1.5-2.5
Grupo II Oxidantes completos, excreción de CO₂	Compuestos oxidados de azufre	Cadenas ramificadas de ácidos grasos, acetona, compuestos fenólicos, sustratos mencionados para el grupo I	<i>Desulfococcus</i> (esfera, 1.5-3.0)
			<i>Desulfobacterium</i> (varilla u óvalo, 0.7-2.0, 1.5-2.8)
			<i>Desulfonema</i> Filamento, 2.5-8.0, 500-100

Fuente: (Vincke, 2000)

2.2.1.6. Reducción microbiana de Sulfatos

La reducción microbiana de sulfatos, es un proceso de reducción disimilativa que consiste en la habilidad de un selecto grupo de microorganismos procariotas para utilizar sulfato como aceptador final en cadenas de transporte de electrones que generan energía. Dicho grupo lo componen bacterias anaerobias estrictas conocidas como bacterias reductoras de sulfato. El ión sulfato es utilizado como aceptor de electrones en la oxidación de materia orgánica de bajo peso molecular, generalmente subproductos de la fermentación anaerobia (Widdel y Hansen, 1991, Kolmer, 2000),

al final el sulfuro de hidrógeno resultante se desprende hacia el medio como residuo del proceso (Gottschalk, 1986).

2.2.2. Sulfuro de Hidrógeno

Las bacterias reductoras de sulfato son los principales responsables de la generación de H_2S bajo condiciones anaerobias. El sulfato que llega al hipolimnio y los sedimentos es reducido por bacterias reductoras de sulfato, las cuales lo utilizan como aceptador de electrones en la oxidación de materia orgánica (respiración anaerobia). En algunas zonas costeras, donde se acumulan grandes cantidades de materia orgánica, se produce una reducción intensa del sulfato a sulfuro de hidrógeno (Postgate, 1965). Estas zonas se tornan virtualmente inhabitables por causa del olor fétido y del efecto tóxico del H_2S . Cuando en dichos ambientes coinciden altas concentraciones de H_2S con altas concentraciones del ión ferroso (Fe_{2+}) se generan grandes cantidades de FeS , el cual es altamente insoluble. Este último no puede ser utilizado y escapa a la acción biológica posterior. La acumulación del ión ferroso imparte un color negro brillante y un olor fétido a los sedimentos. Cuando se produce una deficiencia de hierro en los sedimentos o cuando las concentraciones de H_2S exceden la cantidad necesaria para precipitar todo el ión ferroso (Fe_{2+}) presente, entonces el H_2S podrá ser oxidado por bacterias. En zonas anaerobias de cuerpos de agua dulce estratificados donde hay buena penetración de la energía radiante pueden crecer bacterias fotosintéticas. Estas utilizan H_2S como donante de electrones produciendo gránulos de azufre intracelular o extracelular. El H_2S también es generado a través de procesos de putrefacción y desulfurilación de compuestos

organosulfurados, de igual manera por alguno químico las emanaciones volcánicas y los depósitos de gas natural representan fuentes menores del H₂S.

El sulfuro de hidrógeno (H₂S) es un gas incoloro con un fuerte olor fétido a huevos podridos. Este gas es extremadamente tóxico, particularmente para animales aerobios. Causa dolor de cabeza y nauseas en humanos en concentraciones > 10 mg/l y puede causar parálisis súbita y muerte cuando su concentración alcanza los 100 mg/l. La forma química en que encontramos el H₂S en el ambiente depende del pH:

Tabla 2.2 Relación entre pH y estado en que se encuentra el H₂S en la Naturaleza

H₂S	HS⁻	S²⁻
pH ácido (< 6)	pH neutral (= 7)	pH básico (> 8)

Fuente: Visser (1995)

Tanto el HS⁻, como el S₂⁻ son muy solubles en agua, mientras que el H₂S es un gas poco soluble, que escapa a la atmósfera. El H₂S que llega a la atmósfera es oxidado a óxidos de azufre (SO_x). Estos óxidos al combinarse con agua forman ácido sulfúrico y ácido sulfuroso. (Visser, 1995)

2.3. Producción de sulfuro de hidrógeno químico.

2.3.1. Generador de Kipp para gases

Una preparación estándar de H_2S es cuando se calienta lentamente un ácido fuerte con el sulfuro de hierro o sulfuro de potasio, en un generador de Kipp(figura2.3). El aparato de Kipp, también denominado generador de Kipp, es un instrumento usado para la preparación de pequeños volúmenes de gases. Su nombre viene de su inventor, Petrus Jacobus Kipp.

Sus usos más comunes son la preparación de ácido sulfhídrico mediante la reacción de ácido sulfúrico con sulfuro ferroso, preparación de dióxido de carbono mediante la reacción de ácido clorhídrico con carbonato de calcio, y de hidrógeno mediante la reacción de ácido clorhídrico con un metal apropiado.

Cuenta con tres salas y cada cámara tiene una función concreta a realizar. Mientras que la cámara superior tiene un reactivo líquido y la del medio tiene un reactivo sólido, la cámara inferior se utiliza para recibir el reactivo líquido, como y cuando sea necesario (Griffin, 1938).

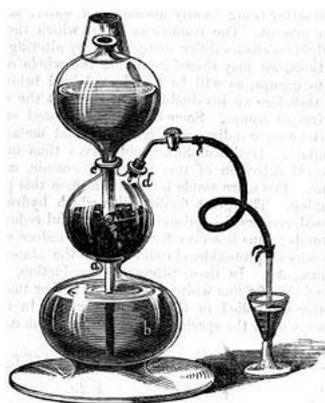


Fig 2.3. Generador de gases de Kipp

CAPÍTULO III:

MATERIALES Y MÉTODOS.

3.1. Producción de Gas Sulfhídrico Biológico

3.1.1. Microorganismos y medios de cultivo.

Se trabajó con una cepa de bacterias sulfato reductoras, aisladas de una fuente hidrotermal ubicada en el sector agua caliente del distrito minero Portovelo. Estas bacterias fueron mantenidas en viales con medio lactato B (ver anexo 2) a 30 °C.

El cultivo se lo realizó de la siguiente manera:

Primero se fijó la cantidad de medio lactato B que se va a preparar, luego de autoclavar el medio a 120 °C y 25 psi durante 60 minutos, se añadió mediante filtración de membrana 10 ml (en base a 1 litro de medio) de la solución reductora (ver anexo 2), se procedió a controlar el pH este debía estar entre 7 y 7.5 mediante NaOH al 30%, luego se añadió 10 ml de una solución al 5% de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ disuelto en 0.1 M de H_2SO_4 (previamente filtrada con filtro de poro 0,45 mm), para prevenir su auto oxidación. En seguida se colocó en los viales de 10 ml, 9 ml de medio lactato B y 1 ml de bacteria, se los selló con el tapón de goma y la virola metálica, posteriormente se incubó a 30° C.

3.1.2. Producción de Gas Sulfhídrico.

Para la producción de H_2S se tomó un consorcio de BSR cultivadas en medio lactato B, se lo filtró en papel filtro, luego 10 ml del filtrado se coloca en matraces de 100 ml, adiciónanos 90 ml de medio lactato C (ver anexo 2) con sus respectivas modificaciones en las variaciones de sulfato de sodio y ácido láctico, se burbujeó con nitrógeno para eliminar el oxígeno presente en el medio y finalmente se selló correctamente para mantener una completa anoxia.

En esta experiencia se trabajó con tres variaciones en las concentraciones de sulfato de sodio (30, 40 y 50 mM) como receptor de electrones y tres variaciones en la concentración de ácido láctico (70, 90 y 110 mM), determinando así las concentraciones adecuadas para una mejor producción de H₂S.

3.1.3. Medición de gas sulfhídrico.

Después de 21 días, se midió el volumen desprendido de gas sulfhídrico, en una probeta con agua sostenida en una cuba con agua se hace burbujear el gas producido, el volumen desplazado en dicha probeta se midió para luego hacer los cálculos respectivos y de esta manera reportar la cantidad producida de gas sulfhídrico (Chavez G, 2006).

3.1.4. Determinación de Sulfatos

La concentración de sulfato fue determinada empleando el método turbidimétrico descrito por Kolmert *et al* (2000). En el cual se colocó 0,5 ml de muestra en un balón de aforo de 25 ml, se lo afora, se pasa el contenido a un frasco de 50 ml, se adiciona 1 ml de buffer (ver anexo 3), se añadió aproximadamente 60 mg de cloruro de bario, se mezcló vigorosamente durante 30 segundos y se leyó en un espectrofotómetro helius épsilon a 450 nm.

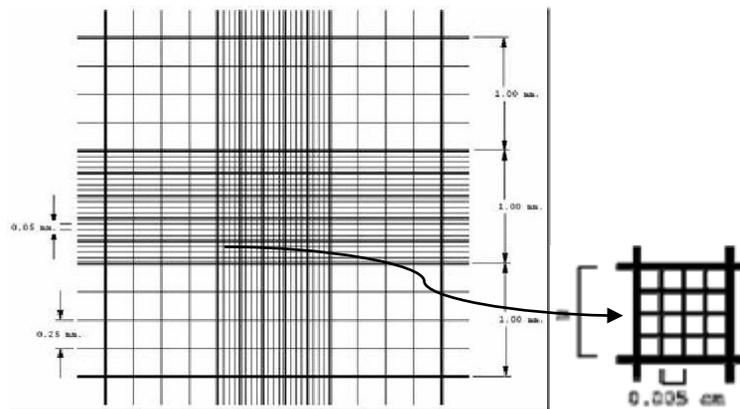
3.1.5. Conteo bacteriano.

El conteo del número de bacterias se lo realizó por recuento directo. Para esto se utilizó una cámara de Neubauer (Figura 3.1). Esta cámara posee una rejilla dividida en 25 campos grabada en el fondo; cada uno de los campos está subdividido en una cuadrícula de 16 cuadraditos. Una vez que se ha cargado la cámara con la muestra (un

cubreobjetos hace de tope superior). Se usó el microscopio óptico olympus para contar las bacterias en diagonal. Se puede calcular el número de microorganismos en una muestra, a partir del volumen de la cámara y las diluciones de la muestra que sean necesarias. La ecuación a utilizar para esta determinación es:

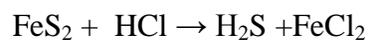
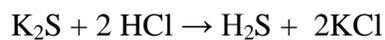
$$\frac{\text{bacterias}}{\text{mL}} = \frac{\# \text{ bacterias} \times 4 \times 10^6 \times fd}{20}$$

Figura 3.1. Cámara de Neubauer



3.2. Producción Química de Gas Sulhídrico.

Mediante el cálculo de las relaciones cuantitativas entre reactivos y productos, se utilizó el principio del generador de gases de Kipp (Mascareñas, 1904), se determinó los pesos de K_2S y FeS_2 (pirita) que reaccionan con HCl para la producción de gas sulfhídrico, de acuerdo a las siguientes reacciones:



Se realizaron 3 repeticiones, con 3 concentraciones diferentes de K_2S y FeS_2 (30, 40, 50 mM) respectivamente, los ensayos realizan en matraces de 50 ml, se colocan los reactivos y se agita para ponerlos en contacto, la reacción produce gas sulfhídrico, el cual es recogido en una probeta con agua sostenida en una cuba con agua, se mide el volumen y se hace los cálculos respectivos.

3.3. Diseño experimental y variables de estudio.

El diseño a utilizar es el factorial.

- Producción óptima de gas sulfhídrico biológico.
- Producción química de gas sulfhídrico.

3.3.1. Producción óptima de gas sulfhídrico biológico.

Variables Independientes:

- Concentraciones de sulfato de sodio (30, 40, 50 mM).
- Concentraciones de ácido láctico (70, 90, 110 mM).

Variable dependiente:

- Producción de H_2S .

Valores constantes:

- pH
- Medio lactato C

- Concentración de inoculo (10 %)

- Temperatura 30 °C

- Tiempo 21 días.

Nomenclatura:

A = SRB

C1= concentración sulfato de sodio 30 mM.

C2 = concentración sulfato de sodio 40 mM.

C3 = concentración sulfato de sodio 50 mM.

L1= concentración ácido láctico 70 mM.

L2= concentración ácido láctico 90 mM.

L3= concentración ácido láctico 110mM.

R = repeticiones (3)

Experimentos: A * C (1, 2, 3) *L(1 ,2 ,3)* R (1, 2, 3) + control = 3*3*3 + control =
27 + controles.

3.3.2. Producción química de gas sulfhídrico.

Sulfuro de Hierro (pirita) :

Variables Independientes:

- Concentraciones de sulfuro de hierro (30, 40, 50 mM)

- Concentraciones de ácido clorhídrico (70, 90, 110 mM)

Variable dependiente:

- Producción de H₂S.

Valores constantes:

- Temperatura

Nomenclatura:

SS1= sulfuro de hierro 30 mM.

SS2= sulfuro de hierro 40 mM.

SS3= sulfuro de hierro 50 mM.

AC1=ácido clorhídrico 70 mM

AC2= ácido clorhídrico 90 mM

AC3= ácido clorhídrico 110 mM.

R= Repeticiones (3)

Experimentos: SS(1, 2 ,3)*AC(1, 2, 3)*R(1, 2, 3)=3*3*3=27

Sulfuro de Potasio:

Variables Independientes:

- Concentraciones de sulfuro de potasio (30, 40, 50 mM)

- Concentraciones de ácido clorhídrico (70, 90, 110 mM)

Variable dependiente:

- Producción de H₂S.

Valores constantes:

- Temperatura.

Nomenclatura:

SP1= sulfuro de potasio 30 mM

SP2= sulfuro de potasio 40 mM

SP3= sulfuro de potasio 50 mM

AC1=ácido clorhídrico 70 mM

AC2= ácido clorhídrico 90 mM

AC3= ácido clorhídrico 110 mM

R= Repeticiones (3)

Experimentos: SP(1, 2, 3)*AC(1, 2, 3)*R(1, 2, 3)=3*3*3=27.

3.4. Análisis Estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa XLSTAT version 7.5 y se realizando las pruebas de Tukey y Duncan con un intervalo de confianza del 95%.

CAPÍTULO IV:

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

4. RESULTADO Y DISCUSION

4.1. ANALISIS ESTADISTICOS

Conociendo la producción biológica de gas sulfhídrico se sometieron los datos a un análisis estadístico, para las variables: concentración de sulfato y concentración ácido láctico, evaluando los resultados mediante el programa estadístico XLSTAT versión 7.5, realizando las pruebas de Duncan y Tukey con un intervalo de confianza del 95%.

4.2. DISCUSION DE RESULTADOS.

4.2.1. Producción Biológica de Gas Sulfhídrico

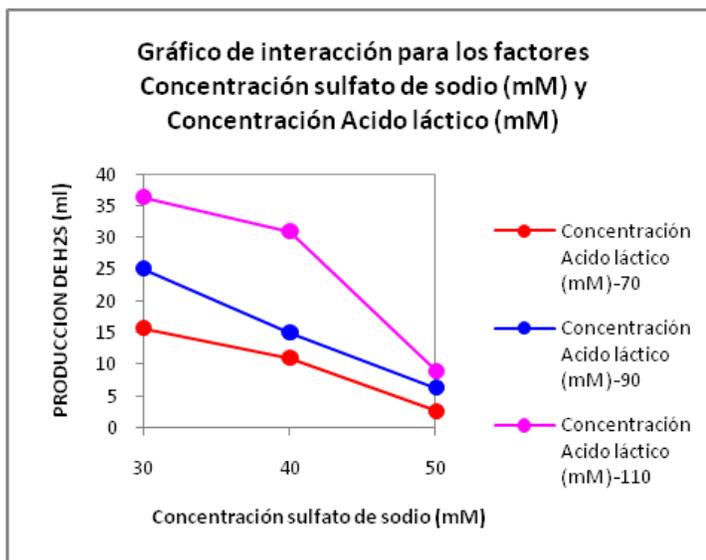
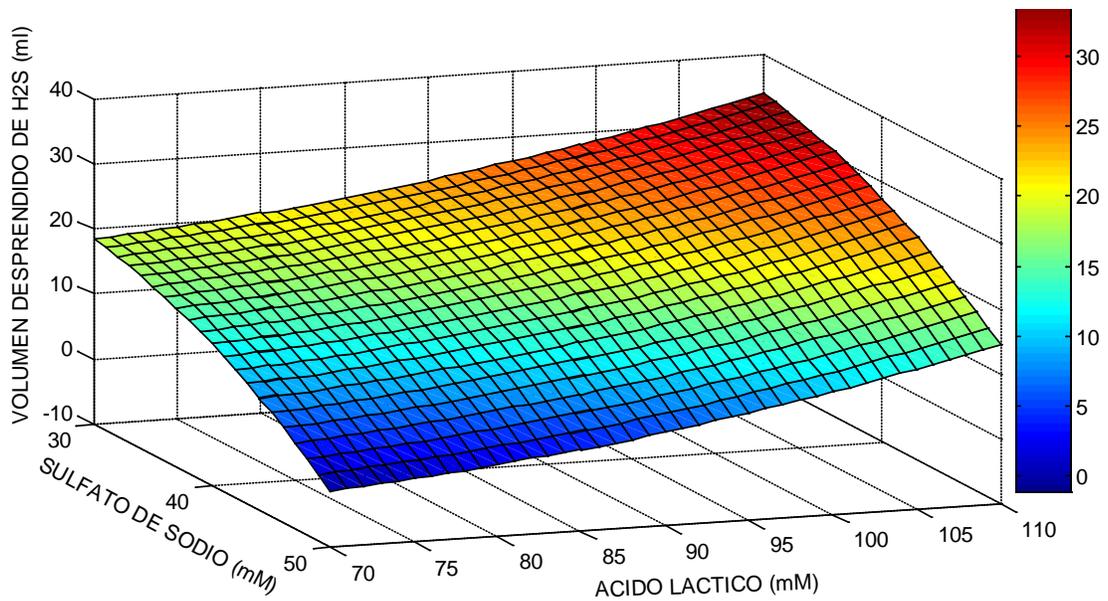


Gráfico 1. Interacción para los factores concentración sulfato, concentración ácido láctico y producción de gas sulfhídrico.



Gráfica 2. Superficie de Respuesta de la producción de sulfuro de hidrógeno a través de las variaciones de ácido láctico y sulfato de sodio.

Categorías	Media	Agrupamientos		
110 mM Acido Láctico	36,333	A		
90 mM Acido Láctico	25,000		B	
70 mM Acido Láctico	15,667			C

Tabla 4.1. Análisis de las diferencias entre las categorías de concentración de ácido láctico con un intervalo de confianza de 95 % para 30 mM de sulfato de sodio.

Categorías	Media	Agrupamientos		
110 mM Acido Láctico	31,000	A		
90 mM Acido Láctico	15,000		B	
70 mM Acido Láctico	11,000			C

Tabla 4.2. Análisis de las diferencias entre las categorías de concentración de ácido láctico con un intervalo de confianza de 95 % para 40 mM de sulfato de sodio.

Categorías	Media	Agrupamientos	
110 mM Acido Láctico	9,000	A	
90 mM Acido Láctico	6,333	A	B
70 mM Acido Láctico	2,667		B

Tabla 4.3. *Análisis de las diferencias entre las categorías de concentración de ácido láctico con un intervalo de confianza de 95 % para 50 mM de sulfato de sodio*

De acuerdo al análisis estadístico, la tabla 4.1. para la concentración 30 mM de sulfato de sodio nos muestra una diferencia significativa en la producción de gas sulfhídrico al variar la concentración de ácido láctico; en la tabla 4.2. para la concentración de 40 mM de sulfato de sodio nos muestra una diferencia significativa en la producción de gas sulfhídrico al variar la concentración de ácido láctico; y en la tabla 4.3. para la concentración de 50 mM de sulfato de sodio nos muestra que no hay una diferencia significativa en la producción de gas sulfhídrico al variar la concentración de ácido láctico, la mejor producción de gas sulfhídrico 36,33 ml, se encuentra en las concentraciones de 30 mM de sulfato de sodio y 110 mM de ácido láctico; las gráficas 1 y 2 nos muestra la interacción entre los factores concentración de sulfato, concentración de ácido láctico y producción de gas sulfhídrico, se puede apreciar en la gráfica 1 que las variaciones de concentración de ácido láctico y concentración de sulfato inciden en la producción de gas sulfhídrico lo que se puede corroborar de acuerdo a la bibliografía (Vicente M.S. 2006, Alvarez T, 2005); en la grafica 2 existe una tendencia que a mayor concentración de ácido láctico y concentraciones medias y bajas de sulfatos existe una producción adecuada de gas sulfhídrico, debido a que en dichas concentraciones se produce el punto de equilibrio

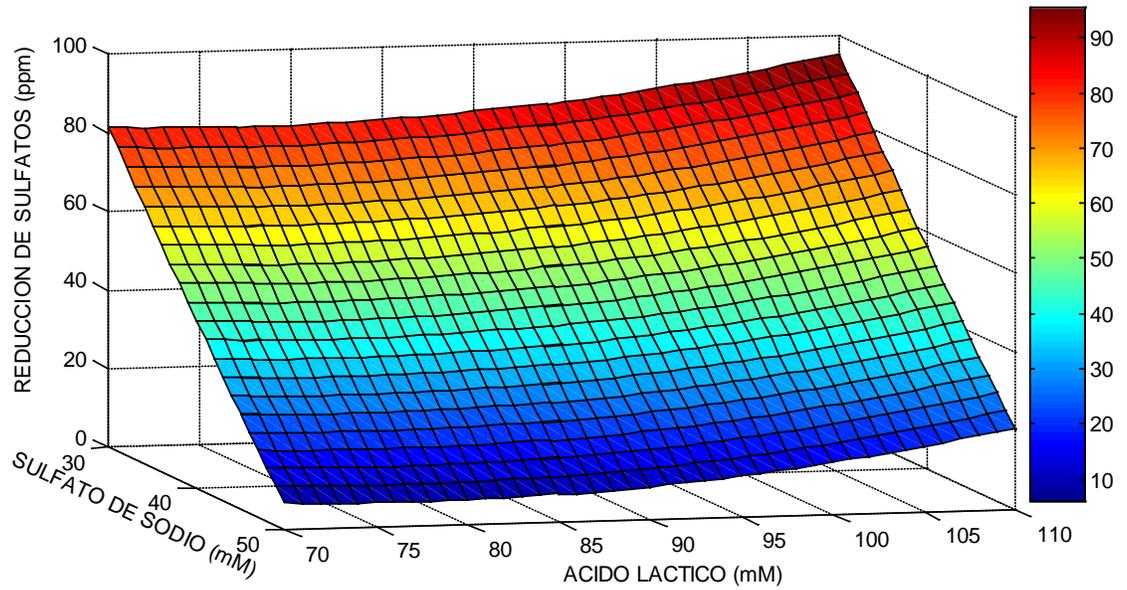
estequiométrico, esto lo corroboramos con los trabajos realizados por (Alvarez M.T, Pozzo T, Mattiasson Bo, 2006).

Con estos resultados se puede deducir que las variaciones de concentración de sulfato y concentración ácido láctico tienen un gran efecto en la producción biológica de gas sulfhídrico. Por lo que la hipótesis H.1 es aceptada.

4.2.2. Reducción de Sulfatos

Categorías	Media	Agrupamientos			
Concentración sulfato de sodio (mM)-30*Concentración Acido láctico (mM)-110	90,756	A			
Concentración sulfato de sodio (mM)-40*Concentración Acido láctico (mM)-110	85,566	A			
Concentración sulfato de sodio (mM)-30*Concentración Acido láctico (mM)-90	83,520	A			
Concentración sulfato de sodio (mM)-30*Concentración Acido láctico (mM)-70	65,274		B		
Concentración sulfato de sodio (mM)-40*Concentración Acido láctico (mM)-90	41,649			C	
Concentración sulfato de sodio (mM)-40*Concentración Acido láctico (mM)-70	36,283			C	
Concentración sulfato de sodio (mM)-50*Concentración Acido láctico (mM)-110	16,479				D
Concentración sulfato de sodio (mM)-50*Concentración Acido láctico (mM)-90	10,580				D
Concentración sulfato de sodio (mM)-50*Concentración Acido láctico (mM)-70	8,834				D

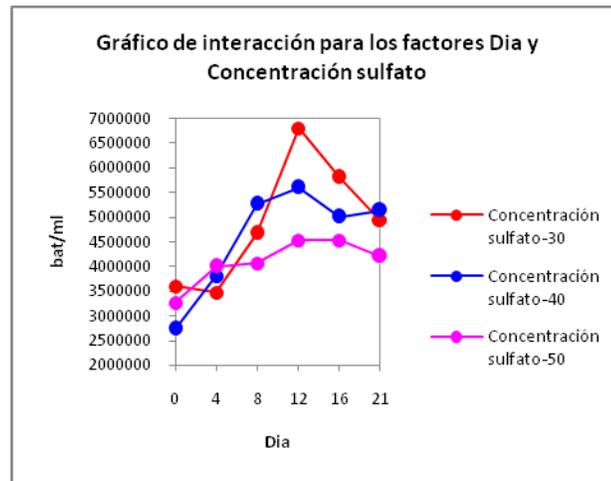
Tabla 4.4. Análisis de la reducción de sulfatos, para las diferentes concentraciones de Sulfato de sodio (30, 40, 50 mM) y concentraciones de Acido Láctico (70, 90, 110 mM) con un intervalo de confianza del 95%



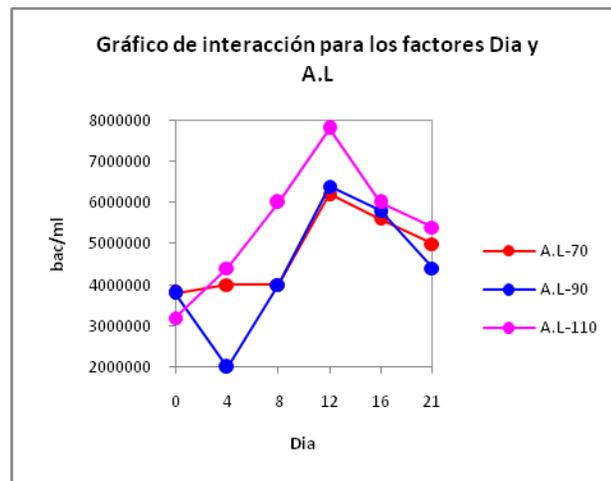
Gráfica 3. Superficie de Respuesta de la reduccion de sulfatos a traves de las variaciones de acido láctico y sulfato de sodio

La gráfica 3 nos muestra la interacción entre las concentraciones de sulfato de sodio y ácido láctico en función de la reducción de sulfatos, en la cual se puede observar una misma tendencia que la producción de gas sulfhídrico, es decir que la mayor reducción de sulfatos se da en las mismas concentraciones en las que se tiene la mayor producción de gas sulfhídrico; 30 mM de sulfato de sodio y 110 mM de ácido láctico, esta misma tendencia se lo puede corroborar en el trabajo realizado por (Chavez G, 2006).

4.2.3. Conteo Bacteriano



Gráfica 4. *Conteo bacteriano variando las concentraciones de sulfato de sodio*

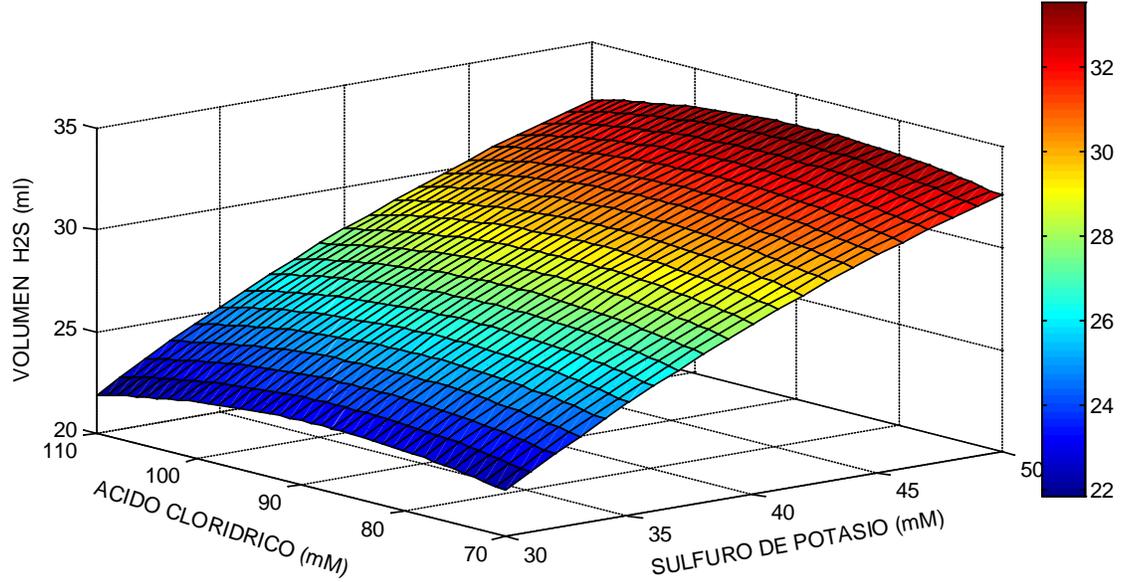


Gráfica 5. *Conteo bacteriano mediante la reducción de 30 mM de Sulfato de sodio variando las concentraciones de ácido láctico*

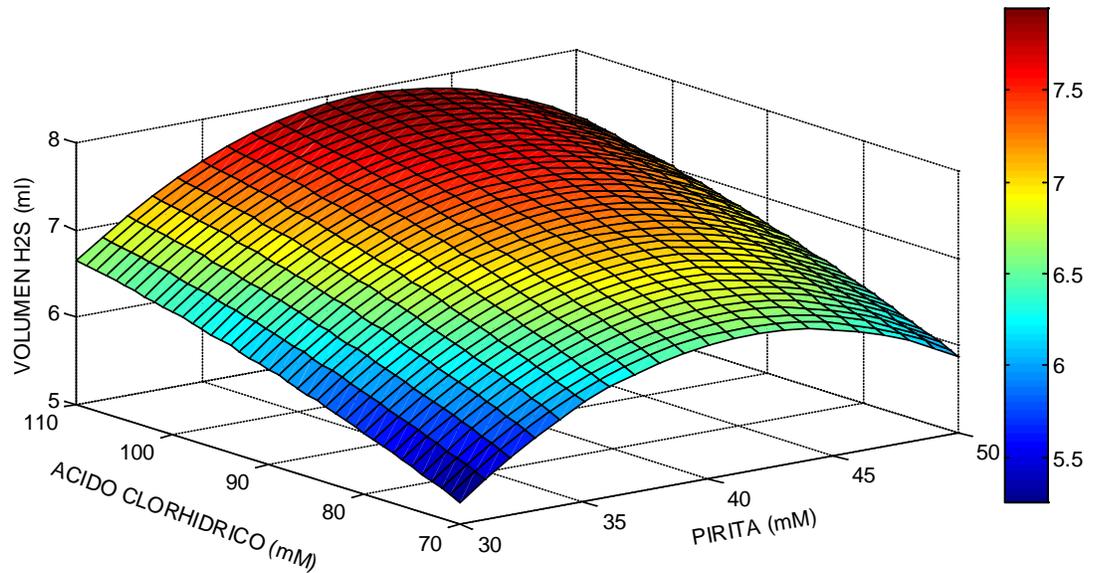
La gráfica 4 nos muestra la interacción entre los factores concentración de sulfato de sodio, días y cantidad de bac/ml, donde se puede ver claramente que el mayor número de bacterias se dio con la concentración de 30 mM de sulfato de sodio, la misma concentración en la que se obtuvo la mayor producción de gas sulfhídrico y la mayor reducción de sulfatos. La gráfica 5 nos muestran la cantidad de bacteria/ml que se

producen con una concentración de 30 mM de sulfato de sodio, variando las tres concentraciones de ácido láctico (70, 90, 110 mM), se puede ver claramente que existe un mayor número de bacterias con la concentración de 110 mM de ácido láctico, con esta concentración se obtuvo la mayor producción de gas sulfhídrico y la mayor reducción de sulfatos, de todo lo expuesto anteriormente podríamos decir que a mayor cantidad de bacterias/ml existe una mayor reducción de sulfatos y por ende una mayor producción de gas sulfhídrico (Vicente M, 2006) de la misma manera, en el caso de la población bacteriana en suspensión se observa un incremento constante de tipo exponencial hasta los 12 días a partir de los cuales se alcanza una meseta y un posterior decrecimiento que puede atribuirse a la lisis bacteriana, manteniéndose una tendencia mayor de biomasa hasta los 21 días con respecto a los demás ensayos; cabe indicar que el periodo de tiempo de los 12 a los 21 días es donde el metabolismo bacteriano llega a la mayor producción de gas sulfhídrico (Vicente M, 2006).

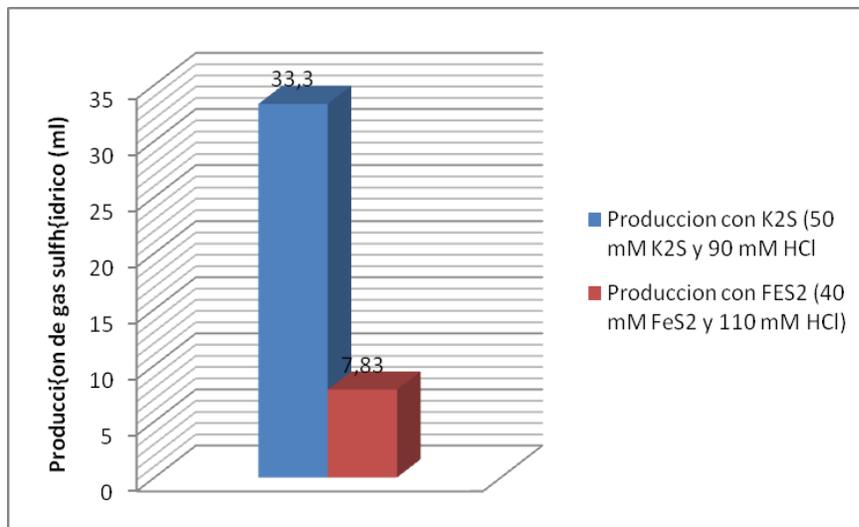
4.2.4. Producción Química con K_2S y FeS_2 (pirita)



Gráfica 6. Superficie de respuesta de la producción de sulfuro de hidrógeno a través de diferentes concentraciones de Acido clorhídrico y de sulfuro de Potasio.



Gráfica 7. Superficie de respuesta de la producción de sulfuro de hidrogeno a través de las diferentes concentraciones de Acido Clorhídrico y sulfuro de hierro.



Gráfica 8. Producción química de gas sulfhídrico con K_2S y FeS_2 (pirita).

La gráfica 6 nos muestra la producción de sulfuro de hidrogeno, con las variaciones en las concentraciones de sulfuro de potasio (30, 40 y 50 mM) y variaciones de la concentración de ácido clorhídrico (70, 90 y 110 mM), la mayor producción de gas sulfhídrico 33,3 ml se dio con las concentraciones 50 mM de K_2S , y 90 mM de HCl.

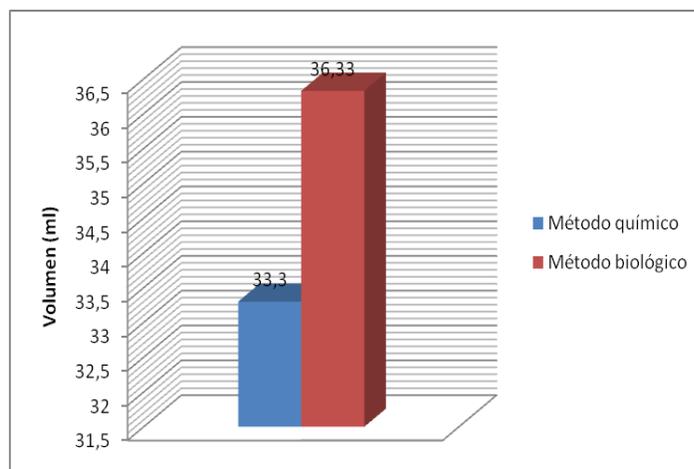
En la gráfica 7 nos muestra la producción de sulfuro de hidrógeno, con las variaciones de concentración de sulfuro de hierro (pirita) (30, 40 y 50 mM) y variaciones de la concentración de ácido clorhídrico (70, 90 y 110 mM), donde la mayor producción de 7,83 ml se dio con las concentraciones de 40 mM de FeS_2 y 110 mM de HCl.

La gráfica 8 nos muestra una comparación entre la la producción química de gas sulfhídrico con K_2S y FeS_2 , donde se puede observar que producir gas sulfhidrico con K_2S resulta más eficiente en terminos de volumen que la produccion con FeS_2

esto podría atribuirse a la reactividad de los elementos de la tabla periódica la misma que aumenta al avanzar en un grupo y aumenta cuanto más a la izquierda este en el periodo, donde metales como el zinc e hierro son disueltos lentamente por los ácidos. El magnesio es atacado rápidamente por los ácidos. El sodio y el potasio, son tan reactivos que incluso el agua los ataca; además el residuo que genera la reacción química del ácido clorhídrico con sulfuro de potasio es el cloruro de potasio, este tiene una importante aplicación como fertilizante de suelos de acuerdo a la bibliografía citada (Jhonson, 2006; Beavon, 1978), Por lo tanto la hipótesis H.2. es aceptada.

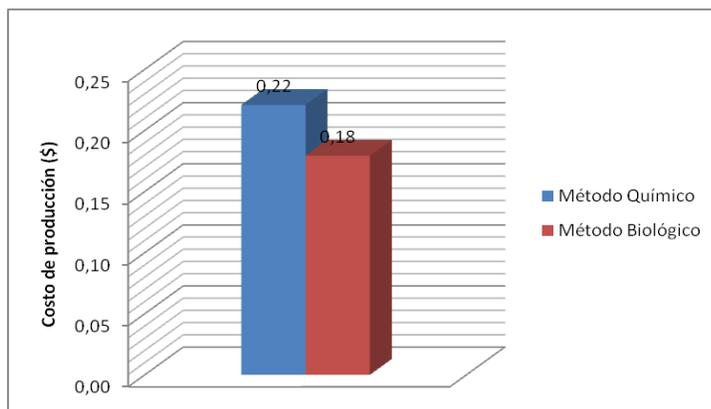
4.2.5. Comparación en términos de costos y eficiencia de la producción biológica y química de gas sulfhídrico.

4.2.5.1. Eficiencia en la producción.



Gráfica 9. Relación producción de gas sulfhídrico (volumen) y método de producción aplicado.

4.2.5.2. Costos



Gráfica 10. Relación costos de producción de H₂S y método de producción aplicada.

La gráfica 9 nos muestra la producción de gas sulfhídrico en términos de eficiencia respecto al método aplicado donde se puede ver claramente, que por el método biológico se obtiene una producción de 36,33 ml, respecto al método químico donde se obtiene 33,3 ml.

La gráfica 10 nos muestra la producción de gas sulfhídrico en términos de costos, para producir 33,3 ml de gas sulfhídrico por el método químico tiene un costo estimado de 0,22 USD, y para producir 36,33 ml de gas sulfhídrico por el método biológico tiene un costo estimado de 0,18 USD.

Producir Sulfuro biogénico con algunas modificaciones en el medio de cultivo es ligeramente superior que el sulfuro producido por el método químico con K₂S (Esposito, 2006); es evidente la eficiencia de producir gas sulfhídrico por métodos biológicos cuando se trata de la manipulación y el almacenamiento en zonas remotas

(Álvarez M, 2005), con lo referente al costo de producir gas sulfhídrico, por el método biológico resulta ser menos costoso que el método químico (Catalogo Merck 2010); por lo que podríamos decir de todo lo mencionado que la hipótesis H.3. es aceptada.

CAPÍTULO V:

CONCLUSIONES

Y

RECOMENDACIONES.

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. Conclusiones:

1. El Medio Lactato C fue modificado con variaciones en las concentraciones de ácido láctico y sulfato de sodio para determinar la mejor producción de H₂S medida, con las concentraciones de 30 mM de sulfatos y 110 mM de ácido láctico, se obtuvo una producción de gas sulfhídrico de 36,33 ml.
2. La mayor reducción de sulfatos medidos fue de 90,756 ppm con las concentraciones de 30 mM de sulfato de sodio y 110 mM de ácido láctico, lo que corrobora la mejor producción de sulfuro de hidrógeno.
3. El mayor crecimiento bacteriano se dio a 30 mM de sulfato de sodio y 110 mM de ácido láctico, a los 12 días fue de 7800000 bac/ml, manteniéndose en la lisis bacteriana una tendencia mayor de biomasa con respecto a los otros ensayos.
4. La mejor producción de gas sulfhídrico por el método químico se dio con el sulfuro de potasio que fue de 33,3 ml con las concentraciones de 50 mM de K₂S y 90 mM de ácido clorhídrico.
5. La mejor producción de gas sulfhídrico fue 36,33 ml por el método biológico con respecto a la producción por el método químico que fue de 33,3 ml.
6. El costo de 1 ml de gas sulfhídrico producido por el método biológico es de 0,005 USD, y 1 ml de gas sulfhídrico por el método químico tiene un

coste de 0,0066 USD, por tanto la producción biológica es menos costosa en las condiciones en las que se trabajo en el laboratorio.

5.2 Recomendaciones.

- Se debe mantener las condiciones óptimas de temperatura (30 °C), pH (6,8 – 7, 5) y completa anoxia, debido a que las SRB son susceptibles a variaciones de temperatura y pH.
- Se debería caracterizar las BSR, para tener una clasificación del tipo de bacterias que se encuentran en el laboratorio y analizar sus comportamientos frente a estas variaciones en el medio de crecimiento.
- Se debería realizar más investigaciones sobre fuentes de carbono naturales que puedan reemplazar al ácido láctico para mejorar la producción y reducir costos, por ejemplo estiércol de vaca, oveja , paja, etc...
- Se podría optimizar el sistema de recolección de gas sulfhídrico, mediante el uso de una bolsa recolectora, para posteriormente bombear este gas directamente a un efluente contaminado por metales pesados e inmovilizarlos.

BIBLIOGRAFIA:

Bibliografía:

1. Arbor Ann .(1990). *Handbook of Chemistry and Physics*, 71st edition, CRC Press, Michigan.
2. Alvarez M.T, Crespo K, Mattiasson B. (1996). *Precipitation of Zn(II), Cu(II) and Pb(II) at bench-scale using biogenic hydrogen sulfide from the utilization of volatile fatty acids*. Chemosphere: 66:1677-1683
3. Alvarez M.T, Pozzo T, Mattiasson Bo.(2007). *Enhancement of sulphide production in anaerobic packed bed bench-scale biofilm reactors by sulphate reducing bacteria*, Biotechnology Letters 28: 175-181.
4. Beavon D. (1978). *Hydrogen Sulphide production*. U.S. Patent. United State. 4094961:7
5. Chambe, M. (2008). *Evaluación de los métodos químicos y biogénico para el tratamiento de drenaje ácido de mina a escala de laboratorio*. Mención del título Magister en Ciencias Ambientales .Universidad Mayor de San marcos. Lima, Perú.
6. Chavez G. (2006). *Precipitación de Metales pesados con sulfuro de hidrógeno biogénico producido a partir de la degradación anaeróbica de material celulósico y xilanósico*. Mención del título de Magister Scientiarum. Universidad Mayor San Andrés
7. Escobar, B. (2008) “*Biohidrometalurgia*” . Curso de otoño. Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas de la Universidad de Chile
8. Esposito G., Veeken A, Weijma J & Lens P .(2006). *Use of biogenic sulfide for ZnS precipitation*. Sciencedirect.1:1-2

9. Frank Paul, (1999). "**Bioremediación de Drenaje Ácido de Mina por Bacterias Sulfato reductoras**" Departamento de Ciencias Ambientales UC Berkeley
10. Greenwood, A. Earnshaw. (1984), *Chemistry of the Elements*, Pergamon Press
11. Gottschalk G. (1986). **Bacterial Metabolism. Science & TechLanguage**. vol I, 2nd edn.
12. Griffin J.(1838), **Recreación Química - Un compendio de la química experimental**, ed 8, R Griffin and Co., Glasgow
13. Johnson Dennis, E. M. (2006). **Integrated hydrogen sulphide absorber system for making potassium-sulfure**. United Stated. U. Stated. United Stated, EnviroSolv Energy LLC. 0236735: 4.
14. Kolmert, Å. (2000).**Sulfate-Reducing Bacteria in Bioremediation Processes**".Tesis de licenciatura. Department of Biotechnology. Lund University
15. Ledin M. (2000) **Accumulation of metals by microorganisms-processes and importance for soil systems**. Earth-Science Reviews **51**:1-3
16. Luptakova A, Macingova E, Harbulakova V.(2009).**Positive and negative aspects of sulphate reducing bacteria in environment and industry**. Nova Biotechnologica. 9: 147-157.
17. Madigan, M., Martinko, J & Parker, J. (1998) **Brock: "Biología de los microorganismos"**. 8 ed., Prentice Hall, España.

18. Postgate J. R. (1954) *Recent Advances in the Study of the Sulfate-Reducing Bacteria*. *Bacteriological Reviews* **29**: 425-441.
19. Postgate John R. (1965) “*Recent Advances in the Study of the Sulfate- Reducing Bacteria*”, Universidad de Sussex, Falmer, Sussex, Inglaterra Vol 29 N° 4. Revista Bacteriológica, Sociedad Americana para la Microbiología
20. Postgate J.R.(1984) . *The sulfate reducing bacteria*. Cambrige University press. **2:169-199**.
21. Roy, A, B & Trudinger. (1970). *The biochemistry of inorganic compounds of sulfur*. Cambridge University Pres
22. Tomotada I., Masao N. (2001). *Current bioremediation practice and perspective*. Journal of Bioscience and Bioengineering **92**: 1-8.
23. Veglio F., Beolchini F. (1997).*Removal of metals by biosorption: a review*. Hydrometallurgy **44**: 301-316.
24. Vicente M.S. (2006). “*Uso de bacterias sulfato-reductoras inmovilizadas para la precipitación de metales pesados*”. Mención de Titulo, Ing. Químico. Universidad Nacional de la Plata, Facultad de Ciencias Exactas. La Plata, Argentina.
25. Viera M., Donati E.R. (2004) *Microbial processes for metal recovery from waste products*. Current Topics in Biotechnology **1**: 117-127.

26. Visser A. (1995) "*The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater*".Tesis doctoral. Wageningen Agriculturan University, Wageningen, Holanda.
27. Voigt Karl, R., Reck Reinhold,Bittner Friedrich, Kleinschmit (1984). *Method for the preparation of hidrogen sulphide*. U. S. Patent. Germany. 4629617: 3.
28. White C., Gadd G.M. (1996) *A comparison of carbon/energy and complex nitrogen sources for bacterial sulphate-reduction: potential applications to bioprecipitation of toxic metals as sulphides*. Journal of Industrial Microbiology: 116-123.
29. Whiteley C.G., Lee D.-J. (2006). *Enzyme technology and biological remediation*. Enzyme and Microbial Technology **38**: 291–316.
30. Widdel F, Hansen TA, (1991).*The dissimilatory sulphate and sulphur-reducing bacteria* *In The Prokaryotes*, Springer, New York, vol. II, 2nd edn, 583 – 624

Anexos:

ANEXO 1: GLOSARIO

Anoxia. - Total ausencia de oxígeno.

Ácido láctico. – Conocido también como lactato (del lat. *lac*, *lactis*, leche), también conocido por su nomenclatura oficial ácido 2-hidroxi-propanoico o ácido α -hidroxi-propanoico, es un compuesto químico que juega importantes roles en diversos procesos bioquímicos, como la fermentación láctica.

Biorremediación. - Se define como biorremediación a cualquier proceso que utilice microorganismos, hongos, plantas o las enzimas derivadas de ellos para retornar un medio ambiente alterado por contaminantes a su condición natural.

Gas sulfhídrico. - El ácido sulfhídrico o sulfuro de hidrógeno (IUPAC) es un ácido inorgánico de fórmula H_2S . Este gas, más pesado que el aire, es inflamable, incoloro, tóxico y su olor es el de la materia orgánica en descomposición, como los huevos podridos.

Mili molaridad (mM) . – Número de milimoles de soluto en 1000 ml (1 litro) de solución.

Pirita. - La pirita es un mineral del grupo de los sulfuros cuya fórmula química es FeS_2 . Tiene un 53,4% de azufre y un 46,4% de hierro. Frecuentemente macizo, granular fino, algunas veces subfibroso radiado; reniforme, globular, estalactítico. También llamada "el oro de los tontos" o el "oro falso" por su parecido a este metal. Insoluble en agua, y magnética por calentamiento. Su nombre deriva de la raíz griega *pyr* (fuego).

Sulfato de Sodio . - El sulfato de sodio o sulfato sódico (Na_2SO_4) es una sustancia incolora, cristalina con buena solubilidad en el agua y mala solubilidad en la mayoría de los disolventes orgánicos con excepción de la glicerina.

ANEXO 2: PREPARACION DE MEDIOS

Medio lactato B

Compuesto	Cantidad
Solución al 50 % de lactato de sodio	5,5 ml
CaSO ₄	1,0 gr
NH ₄ Cl	1,0 gr
KH ₂ PO ₄	0,5 gr
MgSO ₄ *7H ₂ O	2,0 gr
Extracto de levadura	1,0 gr

Estos pesos están en función a un litro.

Medio Lactato C

Compuesto	Cantidad
Na ₂ SO ₄	4,5 g
Ácido láctico	5,5 ml
CaCl ₂ *2H ₂ O	0,06 g
Citrato de Sodio	0,3 g
NH ₄ Cl	1 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
MgSO ₄ *7H ₂ O	2 g
Extracto de levadura	1 g

Estos pesos están en función a un litro

ANEXO 3: PREPARACION DE REACTIVOS

Solución reductora

Compuesto	Cantidad
Ácido ascórbico	0,1 gr
Tioglicolato de sodio	0,1 gr
Agua destilada	10 ml

Estos pesos están en función a un litro

Buffer para sulfatos

Compuesto	Cantidad
Agua destilada	45 ml
HCl concentrado	4,5 ml
Etanol de 96 grados	15 ml
Glicerina	7,5 ml
NaCl	11,25 gr

ANEXO 4: GRAFICOS



Graf 1. Aislamiento y crecimiento de BRS en el



Graf 2. Cultivo y crecimiento de las SRB en el medio lactato C, con sus respectivas modificaciones y producción de H_2S



Graf 3. Medición del volumen de gas sulfhídrico desprendido



Graf 4. Espectrofotómetro UV- VISIBLE

ANEXO 5: PRODUCCION BIOLÓGICA DE GAS SULFHIDRICO

DATOS DE PRODUCCIÓN DE GAS SULFHÍDRICO CON VARIACIONES EN LAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO LÁCTICO Y SULFATO DE SODIO

$a_0 = 30$ mM sulfato de sodio

$b_0 = 70$ mM ácido láctico

$a_1 = 40$ mM sulfato de sodio

$b_1 = 90$ mM ácido láctico

$a_2 = 50$ mM sulfato de sodio

$b_2 = 110$ mM ácido láctico

Variable	Producción de gas sulfhídrico (ml)			Promedio (ml)
$a_0 b_0$	16	15	16	15,66
$a_0 b_1$	24	26	25	25
$a_0 b_2$	37	36	36	36,33
$a_1 b_0$	11	10	12	11
$a_1 b_1$	15	16	14	15
$a_1 b_2$	31	30	32	31
$a_2 b_0$	3	3	2	2,66
$a_2 b_1$	8	2	9	6,33
$a_2 b_2$	8	9	10	9

**DATOS DE LA REDUCCIÓN DE SULFATOS CON VARIACIONES EN LA
CONCENTRACIONES DE ACIDO LÁCTICO Y SULFATO DE SODIO.**

Variable	Reducción de sulfatos (mM)			Promedio
a ₀ b ₀	62,3	69,84	63,68	65,27
a ₀ b ₁	80,49	83,21	86,85	83,62
a ₀ b ₂	95,07	86,83	95,07	90,76
a ₁ b ₀	31,56	38,12	39,16	36,28
a ₁ b ₁	40,26	39,69	44,98	41,65
a ₁ b ₂	88,30	84,25	84,14	85,57
a ₂ b ₀	9,67	10,54	6,29	8,83
a ₂ b ₁	10,43	4,8	16,25	10,58
a ₂ b ₂	13,23	13,57	22,63	16,48

DATOS DE CONTEO BACTERIANO
CONTEO BACTERIANO VARIANDO LAS CONCENTRACIONES DE
SULFATO SODIO

DIA	Variable	Bacteria/ml x(10e+6)
0	a ₀	3,6
0	a ₁	2,7
0	a ₂	3,3
4	a ₀	3,5
4	a ₁	3,8
4	a ₂	4,0
8	a ₀	4,7
8	a ₁	5,3
8	a ₂	4,0
12	a ₀	6,8
12	a ₁	5,6
12	a ₂	4,5
16	a ₀	5,8
16	a ₁	5,0
16	a ₂	4,5
21	a ₀	4,9
21	a ₁	5,1
21	a ₂	4,2

**CONTEO BACTERIANO MEDIANTE LA REDUCCIÓN DE 30 mM DE
SULFATO VARIANDO LAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO LÁCTICO**

DIA	Variable	Bacteria/ml x(10e+6)
0	a ₀ b ₀	3,8
0	a ₀ b ₁	3,8
0	a ₀ b ₂	3,2
4	a ₀ b ₀	4,0
4	a ₀ b ₁	2,0
4	a ₀ b ₂	4,4
8	a ₀ b ₀	4,0
8	a ₀ b ₁	4,0
8	a ₀ b ₂	6,0
12	a ₀ b ₀	6,2
12	a ₀ b ₁	6,4
12	a ₀ b ₂	7,8
16	a ₀ b ₀	5,6
16	a ₀ b ₁	5,8
16	a ₀ b ₂	6,0
21	a ₀ b ₀	5,0
21	a ₀ b ₁	4,4
21	a ₀ b ₂	5,4

**CONTEO BACTERIANO MEDIANTE LA REDUCCIÓN DE 40 mM DE
SULFATO VARIANDO LAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO LÁCTICO**

DIA	Variable	Bacteria/ml x (10e6)
0	a ₁ b ₀	2,2
0	a ₁ b ₁	2,4
0	a ₁ b ₂	2,6
4	a ₁ b ₀	2,6
4	a ₁ b ₁	4,0
4	a ₁ b ₂	4,8
8	a ₁ b ₀	4,6
8	a ₁ b ₁	5,6
8	a ₁ b ₂	5,6
12	a ₁ b ₀	4,8
12	a ₁ b ₁	5,8
12	a ₁ b ₂	6,2
16	a ₁ b ₀	5,8
16	a ₁ b ₁	4,0
16	a ₁ b ₂	5,2
21	a ₁ b ₀	5,4
21	a ₁ b ₁	5,2
21	a ₁ b ₂	4,8

**CONTEO BACTERIANO MEDIANTE LA REDUCCIÓN DE 50 mM DE
SULFATOS VARIANDO LAS CONCENTRACIONES DE ÁCIDO LÁCTICO**

DIA	Variable	Bacteria/ml x (10e6)
0	$a_2 b_0$	3,8
0	$a_2 b_1$	3,4
0	$a_2 b_2$	4,0
4	$a_2 b_0$	4,0
4	$a_2 b_1$	4,2
4	$a_2 b_2$	4,8
8	$a_2 b_0$	4,4
8	$a_2 b_1$	3,8
8	$a_2 b_2$	4,0
12	$a_2 b_0$	3,8
12	$a_2 b_1$	5,4
12	$a_2 b_2$	4,4
16	$a_2 b_0$	5,6
16	$a_2 b_1$	3,0
16	$a_2 b_2$	5,0
21	$a_2 b_0$	5,0
21	$a_2 b_1$	3,8
21	$a_2 b_2$	3,8

ANEXO 5: PRODUCCIÓN QUÍMICA DE GAS SULFHÍDRICO

DATOS DE PRODUCCIÓN QUÍMICA DE GAS SULFHÍDRICO CON K_2S

$c_0 = 30 \text{ mM } K_2S$

$d_0 = 70 \text{ mM HCl}$

$c_1 = 40 \text{ mM } K_2S$

$d_1 = 90 \text{ mM HCl}$

$c_2 = 50 \text{ mM } K_2S$

$d_2 = 110 \text{ mM HCl}$

Variable	Producción de gas sulfhídrico (ml)			Promedio
$c_0 d_0$	23	22	22	22,3
$c_0 d_1$	22	23	23	22,6
$c_0 d_2$	22	23	22	22,3
$c_1 d_0$	28	28	29	28,3
$c_1 d_1$	31	29	30	30
$c_1 d_2$	27	29	27	27,3
$c_2 d_2$	32	33	33	32,7
$c_2 d_2$	33	33	34	33,3
$c_2 d_2$	32	32	33	32,3

DATOS DE PRODUCCIÓN QUÍMICA DE GAS SULFHÍDRICO CON FeS₂
(PIRITA)

$e_0 = 30 \text{ mM FeS}_2$

$d_0 = 70 \text{ mM HCl}$

$e_1 = 40 \text{ mM FeS}_2$

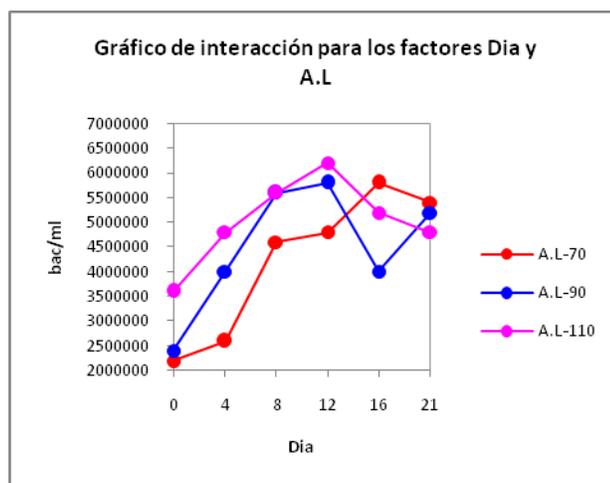
$d_1 = 90 \text{ mM HCl}$

$e_2 = 50 \text{ mM FeS}_2$

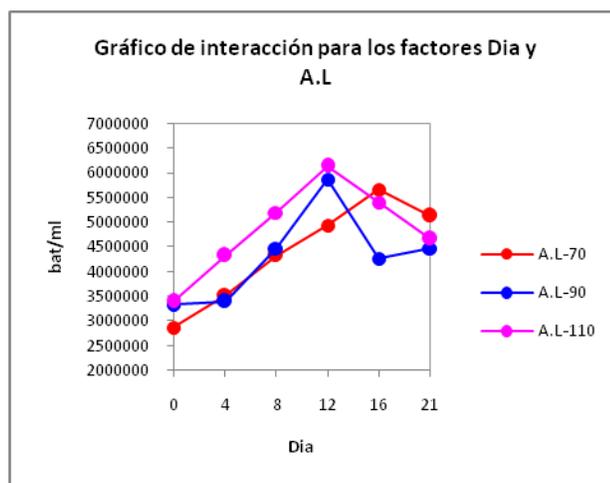
$d_2 = 110 \text{ mM HCl}$

Variable	Producción de gas sulfhídrico (ml)			Promedio
$e_0 d_0$	5	5,5	5	5,2
$e_0 d_1$	6	6	6,5	6,2
$e_0 d_2$	6,5	6,5	7	6,7
$e_1 d_0$	7	6,5	6,5	6,7
$e_1 d_1$	7,5	7,5	7	7,3
$e_1 d_2$	7,5	7,5	8	7,83
$e_2 d_0$	5,5	6	6	5,8
$e_2 d_1$	7	6,5	6,5	6,7
$e_2 d_2$	7,5	7,5	7	7,3

ANEXO 6: GRAFICAS DE CONTEO BATERIANO



Gráfica 1. *Conteo bacteriano mediante la reducción de 40 mM de Sulfato de sodio variando las concentraciones de ácido láctico.*



Gráfica 2. *Conteo bacteriano mediante la reducción de 50 mM de sulfato de sodio variando las concentraciones de ácido láctico.*

