

RENDIMIENTO, CINÉTICA Y MICROBIOLOGÍA DEL TRATAMIENTO SULFIDOGÉNICO DE AGUAS ÁCIDAS CONTENIENDO SULFATO Y METALES PESADOS MEDIANTE UN REACTOR DE FLUJO DESCENDENTE

P. A. Kikot, V. Peralta Alcat, M. Viera, E. R. Donati y C. F. Mignone
Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales, CINDEFI (CCT La Plata-CONICET, UNLP), Facultad de Ciencias Exactas. Argentina.
pkikot@biotec.org.ar

Resumen

Los procesos metalúrgicos y los drenajes ácidos de minas (DAM) son la fuente principal de contaminación con metales pesados de recursos de hídricos. Los biorreactores sulfidogénicos con bacterias reductoras de sulfato (BRS) son una alternativa a los tratamientos convencionales de metales pesados en aguas residuales debido al bajo costo y alta eficiencia. El uso de células suspendidas en un sistema continuo impone un tiempo de residencia (t_R) alto, desventaja salvada por la técnica de inmovilización celular. El reactor de lecho fluidizado con flujo descendente (RLFFD) es un sistema que permite que el sulfuro de metal se deposite separado de la biomasa, evitando la oclusión y permitiendo su recuperación. Además, diseño del RLFFD admite el tratamiento de aguas residuales conteniendo inhibidores como los metales pesados, el pH ácido y el SH_2 generado por las BRS.

En este trabajo se evaluaron perlita (P) y bolitas de polipropileno (PP) como materiales de soporte en reactores de flujo descendente inoculados con un consorcio de BRS para la reducción de sulfato, la precipitación de metales pesados y la alcalinización de la solución. Se caracterizó el biofilm formado mediante FISH (hibridación fluorescente *in situ*), por microscopía electrónica de barrido (MEB) y por cuantificación de la biomasa inmovilizada.

Los reactores con P y PP permitieron un t_R de 2,6 h y 5,5 h; una velocidad volumétrica de reducción de sulfato (r_{SO_4}) de 0,7 g/L.h y 0,33 g/L.h; y una velocidad volumétrica de precipitación de metal máxima (r_{PP}) de 5,6 y 4,7 mmol/L.h; respectivamente. En todos los casos se observó un incremento en el pH. El estudio del biofilm mostró que P adhirió mayor cantidad de biopelícula y que gran parte de la población bacteriana pertenecía al grupo de las BRS.

Introducción

Los metales pesados están presentes en las aguas residuales de la industria metalúrgica, la de producción de químicos, pinturas, baterías, curtiembres y la industria minera, representando un grave problema para el medio ambiente y la salud humana. Las tecnologías convencionales para su eliminación (precipitación, intercambio iónico, absorción) son costosas, de baja selectividad, ineficientes en la remoción de metales en baja concentración y generan residuos voluminosos. La bioprecipitación de los metales como sulfuros corrige dichas desventajas. En estos bioprocesos participan las BRS, capaces de oxidar alcoholes y ácidos orgánicos de bajo peso molecular (como el láctico) utilizando sulfato como aceptor final de electrones; generando SH_2 , acetato y CO_2 . La aplicación tecnológica de esta metodología implica el uso de sistemas continuos con células en suspensión, requiriendo de altos t_R para evitar el lavado del reactor por arrastre, debido a la baja velocidad de crecimiento de las BRS. La inmovilización celular es ampliamente utilizada en los reactores anaerobios de tratamiento de aguas residuales para incrementar la concentración de la biomasa y evitar su pérdida, permitiendo operar el reactor con t_R más cortos. Además, el tipo de soporte utilizado puede modificar la eficiencia del biorreactor afectando el número y tipo

de células adheridas. El RLFFD es un proceso donde el soporte de inmovilización celular, de una densidad igual o menor a la del líquido, flota en la parte superior y eventualmente se fluidiza por el caudal descendente. En este diseño, el sulfuro metálico formado se deposita en el fondo del reactor separado de la biomasa, evitando la oclusión del reactor y permitiendo su recuperación. Uno de los factores que limitan la aplicación de los sistemas de remediación sulfidogénicos es la sensibilidad de las BRS a condiciones ácidas. El pH bajo del DAM puede afectar negativamente los bioprocesos sulfidogénicos haciendo necesaria la adición de álcali. El diseño del RLFFD permite el tratamiento de aguas residuales ácidas y una mayor resistencia a inhibidores como las altas concentraciones de metales pesados y el SH_2 generado por el metabolismo de las BRS.

En este trabajo se estudió la eficiencia en la reducción de sulfato y en la precipitación de metales pesados presentes en una solución ácida empleando un reactor de flujo descendente utilizando como soportes P y PP para la inmovilización de un consorcio de BRS enriquecido del efluente de una curtiembre. Se caracterizó el biofilm formado mediante FISH, MEB y se cuantificó mediante la determinación de biomasa adherida.

Materiales y Métodos

Inóculo y Medios de Cultivo. Se utilizó como inóculo para los experimentos un consorcio de BRS enriquecido de sedimentos provenientes del efluente de una curtiembre en el área del Río Luján (Argentina) según se describió previamente (Kikot *et al.*, 2010a). Los experimentos se realizaron con medio de cultivo Postgate G de pH 7,0 (Okabe y Characklis, 1992) conteniendo ácido láctico como fuente de carbono (limitante del crecimiento) y sulfato como aceptor de electrones.

Materiales de Inmovilización. Los materiales usados para estos ensayos fueron perlita (P) y perlas de polipropileno (PP). La P, con un tamaño de partícula entre 2,0 mm y 1,19 mm (malla -10 a +16), fue lavada con agua destilada y secada. El tamaño de partícula medio del PP (4,1 mm) se midió con un calibre. La densidad específica aparente se determinó como el peso de 1 L de material, siendo menores a las del agua (0,16 g/mL para P y 0,92 g/mL para PP), lo que les permitió permanecer flotando en los biorreactores.

Reactores de lecho descendente. Los biorreactores de flujo descendente se construyeron con columnas de vidrio (D, 4 cm, H, 21 cm) con un fondo cónico para la colección de los precipitados de sulfuro metálico. La Figura 1 muestra un diagrama esquemático del montaje experimental utilizado. El biorreactor se llenó con 125 mL (50 % del volumen total del reactor) de la matriz de inmovilización designada y se esterilizó en autoclave. El medio de cultivo estéril se introdujo en el reactor mediante una bomba peristáltica junto con 100 mL de inóculo. El biorreactor fue cerrado por 20 días a 30 °C para permitir la inmovilización de las células. Luego de este período, el líquido contenido en los biorreactores fue repuesto por completo para eliminar la mayor cantidad posible de microorganismos en suspensión; tras lo cual se comenzó a alimentar la columna a un caudal bajo. El caudal se aumentó de forma escalonada tras el establecimiento del estado estacionario con un t_R determinado hasta la detección de lactato en el efluente

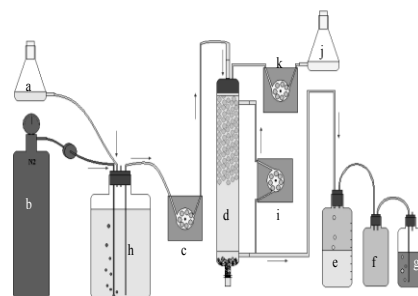


Fig. 1. Diagrama esquemático del proceso. a) Erlenmeyer de salida lateral para integrar el medio de cultivo; b) Nitrógeno con filtro de 0.22 μm ; c) Bomba peristáltica; d) Reactor conteniendo el soporte; e) Recipiente colector; f) Trampa; g) Recipiente con Fe^{+2} para capturar el SH_2 en fase gaseosa; h) Reservorio de medio de cultivo fresco; i) Bomba para recirculación; j) Reservorio con metales pesados; k) Bomba peristáltica para alimentación con metales pesados.

líquido (sustrato limitante del crecimiento). El estado estacionario se supuso que se estableció durante un período de funcionamiento igual a cuatro veces el t_R . El caudal se determinó midiendo el volumen de efluente retenido durante un cierto período de tiempo y el t_R se calculó en base al volumen hueco del lecho, estimado como el volumen de líquido escurrido. Dado que las bombas peristálticas disponibles en el laboratorio no consiguieron expandir efectivamente el lecho, en este experimento no se utilizó la recirculación del medio de cultivo para la fluidización del reactor y sólo se aplicó el caudal de alimentación descendente. El depósito conteniendo medio fresco se burbujeó continuamente con N_2 estéril para mantener las condiciones anaeróbicas. Se tomaron muestras diariamente del puerto efluente y se determinaron las concentraciones de sulfato, lactato y acetato. Se promediaron las concentraciones en el efluente en el estado estacionario de cada reactor para cada t_R estudiado. Con esos valores se calcularon los rendimientos estequiométricos $Y_{SO_4/S}$ (g de sulfato reducido por g de lactato consumido) e $Y_{P/S}$ (g de acetato generado por g de lactato consumido). Luego, se determinó el t_R mínimo ($t_R^{\text{mínimo}}$) para cada soporte que permitía mantener la reducción de sulfato constante y agotar completamente la fuente de carbono. Se estimaron los porcentajes de consumo de la fuente de carbono y de sulfato. La r_{SO_4} (g/L.h) y la velocidades volumétricas de consumo de ácido láctico r_S (g/L.h) fueron calculadas como la razón del cambio en la concentración de sulfato y lactato en el medio de cultivo, respectivamente, y el t_R .

Precipitación de metales pesados

Una vez determinado el $t_R^{\text{mínimo}}$ para cada sistema se procedió a remediar soluciones ácidas (pH 5,0) de metales pesados (esterilizadas mediante filtración con una membrana de 0,22 μm) inyectadas mediante una aguja en la zona del reactor donde terminaba el lecho del soporte. Los reactores conteniendo PP y P se utilizaron para remediar una solución de 500 ppm de Cu(II). Adicionalmente, la columna conteniendo P se usó con una mezcla conteniendo 175 ppm de Cu(II), 175 ppm de Co(II) y 145 ppm de Ni(II). La alimentación de medio de cultivo se mantuvo constante al $t_R^{\text{mínimo}}$ y el caudal de alimentación de la solución de metal se aumentó gradualmente hasta detectar la presencia de metal en el efluente, cuando se calcularon el porcentaje de precipitación de metal y la r_{PP} . Después de eso, el soporte conteniendo la biopelícula se utilizó para determinar la biomasa adherida y para observar la biopelícula microscópicamente (FISH, MEB).

Métodos analíticos

La concentración de sulfato se determinó por el método turbidimétrico con bario utilizando un espectrofotómetro Beckman DU 640 (Fullerton) a 450 nm (Greenberg *et al.*, 1985). La concentración de metales pesados en solución se midió usando un espectrofotómetro de absorción atómica Shimadzu AA-6650 (Shimadzu Corporation). Previamente, las muestras fueron filtradas con una membrana de tamaño de poro de 0,22 μm para remover biomasa y sólidos en suspensión. Para determinar la concentración de lactato y acetato se utilizó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) según se publicó previamente (Kikot *et al.*, 2010a).

Determinación de Proteínas. Luego de lavar cada soporte con agua destilada estéril, una cantidad equivalente a 1 mL de lecho se colocó en diferentes frascos tarados. Se agregaron 10 mL de agua estéril y las células se despegaron de la biopelícula por ultrasonido durante 30 minutos. Los frascos conteniendo el soporte fueron secados y pesados para calcular la cantidad empleada y el líquido se utilizó para estimar la biomasa inmovilizada mediante la cuantificación de proteínas basada en el método de

Bradford, utilizando un espectrofotómetro de microplacas (Benchmark, BIO–RAD) y albúmina sérica bovina como estándar.

FISH. Se lavaron muestras de soporte de inmovilización de los reactores rellenos con P y PP con PBS estéril. Luego, 1 mL de cada soporte fue tratado con ultrasonido durante 10 minutos con 1 mL de PBS estéril para desprender la biopelícula. Las células en suspensión fueron fijadas e hibridadas como describieron Amann *et al.* (1990). La hibridación se llevó a cabo con las sondas SRB385 (Amann *et al.*, 1990), ARCH915 (Stahl y Amann, 1991), EUB338 (Amann *et al.*, 1990) y NON338 (Manz *et al.*, 1992) para la detección específica de BRS, arqueas, eubacterias y para la hibridación inespecífica, respectivamente; todas marcadas con Cy3. El ensayo de FISH se analizó mediante un microscopio de epifluorescencia (Leica 2500). Se determinó la relación entre el número de señales positivas para cada sonda y el observado para las células totales teñidas con DAPI (4',6'-diamidino-2-fenilindol).

MEB. La efectiva formación del biofilm sobre la superficie de P y PP se examinó por MEB. El ensayo se realizó con el Sputter Coater Edwards S150B y el equipamiento Philips SEM 505. Se utilizaron como testigos de referencia partículas sin biopelícula adherida.

Resultados y Discusión

Ambos reactores rellenos con P y PP se mantuvieron funcionando por un tiempo prolongado (61 y 33 días, respectivamente) sin presentar inconvenientes de oclusión ni contaminaciones microbiológicas, demostrando que los sistemas fueron estables. Al t_R inicial, similar para ambos reactores, el tiempo requerido alcanzar una biopelícula madura que permitiera alcanzar valores de concentración constantes en el efluente fue de 6,4 y 14 veces el t_R , para P y PP, respectivamente. Ambos reactores mostraron un valor de r_{SO_4} mayor y un $t_R^{\text{mínimo}}$ menor que el del sistema en lote de células en suspensión del mismo inóculo ($t_R = 14$ h; $r_{SO_4} = 0,042$ g/l.h) (Kikot *et al.*, 2010b), siendo la P el soporte más eficiente con un $t_R^{\text{mínimo}} = 2,6$ h y una r_{SO_4} de 0,7 g/L.h. Para el PP el $t_R^{\text{mínimo}}$ fue mayor y el r_{SO_4} menor respecto a la P (5,9 h y 0,3 g/L.h, respectivamente) (Figura 2). Los resultados cinéticos obtenidos fueron superiores a los reportados para otros RLFFD sulfidogénicos (Celis *et al.*, 2009; Sahinkaya y Gungor, 2010; Villa-Gómez *et al.*, 2011). Por otro lado, el $Y_{SO_4/S}$ de los dos sistemas fue similar, siendo poco variable para los diferentes t_R para cada soporte (P $0,38 \pm 0,04$ g/g y PP $0,40 \pm 0,03$ g/g; los errores corresponden a la desviación estándar entre los diferentes t_R) (Figura 2). Paralelamente, los $Y_{P/S}$ presentaron un comportamiento errático en el caso de la P y se mantuvieron constantes para el PP en función del t_R (P $0,64 \pm 0,13$ g/g y PP $0,59 \pm 0,04$). Ambos rendimientos resultaron comparables a los reportados para el cultivo en lote de células libres de *Desulfovibrio desulfuricans* ($Y_{SO_4/S}$ 0,45 g/g; $Y_{P/S}$ 0,63 g/g) (Okabe *et al.*, 1992). Por otro lado, el porcentaje de reducción de sulfato máximo fue de 55 % para PP y 61 % para P.

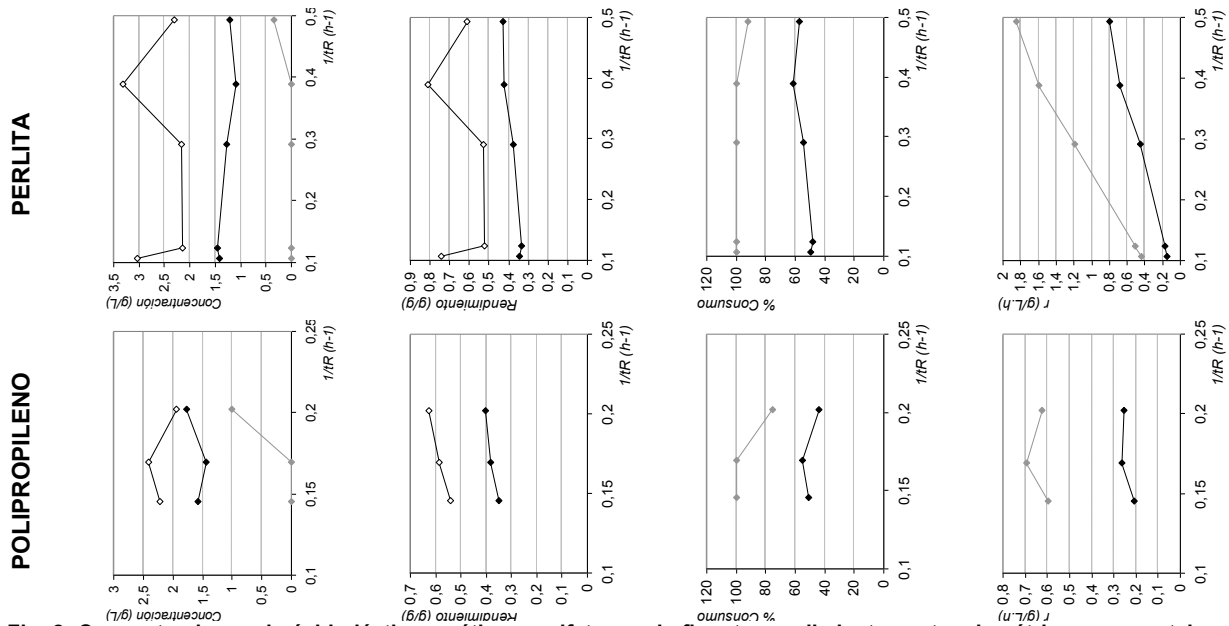


Fig. 2. Concentraciones de ácido láctico, acético y sulfato en el efluente, rendimientos estequiométricos, porcentajes de consumo y velocidades volumétricas de consumo de láctico y sulfato de los reactores con perlita y bolitas de polipropileno en función de la inversa del t_R . Lactato, rombos grises; Acetato, rombos vacíos; Sulfato, rombos llenos. Rendimientos: $Y_{P/S}$, rombos vacíos; $Y_{SO_4/S}$, rombos llenos.

Una vez alcanzado el $t_R^{\text{mínimo}}$, se procedió a alimentar adicionalmente con una solución de pH 5,0 y 0,5 g/L de Cu(II). Se observó que el reactor con PP poseía una r_{PP} de 4,69 mmol/L.h, donde la precipitación del metal era de 99,8 %. Para la P, la r_{PP} fue 5,60 mmol/L.h con una precipitación del 99,3 %. Diferentes trabajos reportan sistemas sulfidogénicos que bioprecipitaron altos porcentajes de cobre, pero con concentraciones iniciales muy inferiores a la utilizada en este estudio (Neculita *et al.*, 2007) y en los que no exponen la velocidad volumétrica de precipitación de metales. Por otro lado, a pesar de que el caudal de alimentación de la solución ácida de metal (pH 5,0) llegó a triplicar el caudal de alimentación del medio de cultivo, el pH en el efluente alcanzó en todos los casos un valor entre 6,8 y 7,8. Diferentes autores han reportado la alcalinización de efluentes ácidos conteniendo metales pesados mediante sistemas sulfidogénicos con valores de pH finales entre 3,5 y 8,5 (Neculita *et al.*, 2007). En el caso del reactor con P, se realizó además el mismo procedimiento pero con una mezcla de Cu(II), Co(II) y ppm de Ni(II); obteniendo una r_{PP} de 1,89, 2,04 y 1,70 mmol/L.h precipitando 100%, 99,4% y 98,3%, respectivamente; y aumentando el pH a 6,8.

Posteriormente, se determinó que la biomasa inmovilizada (calculada como masa de proteínas por volumen de lecho: P, $2,13 \pm 0,01$ g/L; PP, $0,39 \pm 0,02$ g/L) fue inversa al t_R observado para cada reactor (P, 2,6 h; PP, 5,9 h), siendo esto probablemente la causa de la alta productividad del reactor con P; en correlación con el gran área superficial que presenta la P (García-Calderón *et al.*, 1998). Los valores de biomasa inmovilizada (calculados en base a la relación 0,33 g de proteínas por g de biomasa) sobre la P y el PP fue superior a la obtenida por otros autores en RLFFD (Celis *et al.*, 2009; Villa-Gómez *et al.*, 2011), propiciado posiblemente por la ausencia de recirculación de este experimento.

La observación por MEB del soporte corroboró la inmovilización de los microorganismos y en el ensayo de FISH (Figura 3) se pudo visualizar que la biopelícula estaba formada casi totalmente por bacterias, siendo muy baja la señal obtenida con las sondas específicas para arqueas (ARCH915) y similares a las obtenidas con la hibridación inespecífica revelada con la sonda del control negativo (NON338). Casi la totalidad de las células teñidas por DAPI fueron hibridadas con la sonda para eubacterias (EUB338). La cantidad de señales con la sonda específica para BRS (SRB385) fue muy similar a la

obtenida para eubacterias, sugiriendo que la mayor parte de la población presente en la biopelícula formaba parte del grupo de las BRS. Dar *et al.* (2007) utilizó esta técnica para relacionar la efectividad de los biorreactores sulfidogénicos con la proporción de BRS sobre la población microbiana total.

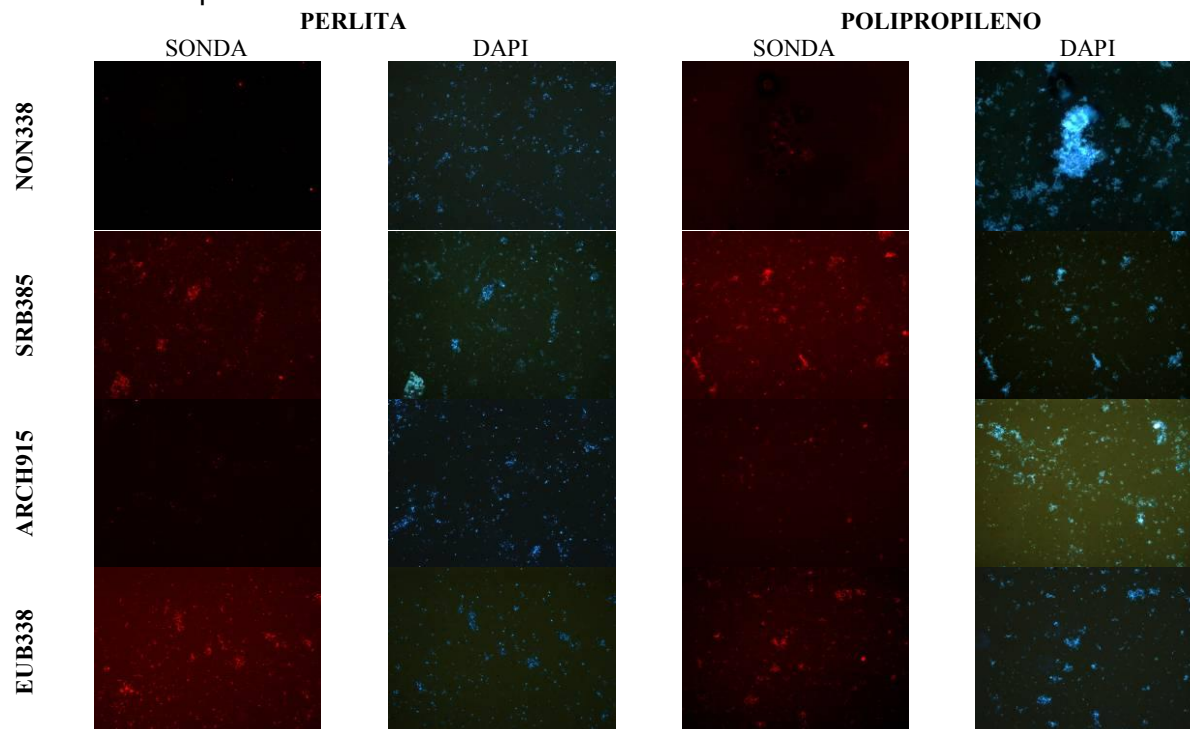


Fig. 3. Hibridación *in situ* de la biopelícula formada sobre los soportes de inmovilización con las sondas NON338 (hibridación inespecífica), SRB385 (específico para BRS), ARCH915 (específica para arqueas) y EUB338 (específica para eubacterias) marcadas con Cy3 (color rojo) y tinción de DAPI (color azul) para observar las células totales. 400X.

Palabras claves. bacterias reductoras de sulfato; metales pesados; drenaje ácido de mina.

Referencias

- Amann, R., Binder, B., Olson, R., Chisholm, S., Devereux, R., Stahl, D., 1990. *Combination of 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes with flow cytometry for analyzing mixed microbial populations*. Appl Environ Microbiol 56, 1919-1925.
- Araujo JC, Brucha G, Campos JR, Vazoller RF. Monitoring the development of anaerobic biofilms using fluorescence in situ hybridization and confocal laser scanning microscopy. Water Sci Technol 2000;41(12):69-77.
- Celis, L., Villa-Gómez, D., Alpuche-Solis, A., Ortega-Morales, B., Razo-Flores, E., 2009. *Characterization of sulfate-reducing bacteria dominated surface communities during start-up of a down-flow fluidized bed reactor*. J Ind Microbiol Biotechnol 36, 111-121.
- Dar, S., Stams, A., Kuenen, J., Muyzer, G., 2007. *Co-existence of physiologically similar sulfate-reducing bacteria in a full-scale sulfidogenic bioreactor fed with a single organic electron donor*. Appl Microbiol Biotechnol 75, 1463-1472.
- García-Calderón, D., Buffiere, P., Moletta, R., Elmaleh, S., 1998. *Anaerobic digestion of wine distillery wastewater in down-flow fluidized bed*. Wat. Res. 32 (12), 3593-3600.
- Greenberg, A., Trussell, R., Clesceri, L., (Eds.), 1985. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*. APHA-AWWA-WPCF, Washington.
- Kikot, P., Mignone, C., Viera, M., Donati, E., 2010a. *Study of the effect of pH and dissolved heavy metals on the growth of sulfate-reducing bacteria by a fractional factorial design*. Hydrometallurgy 104 (3-4), 494-500.
- Kikot, P., Viera, M., Donati, E., Mignone, C., 2010b. *Influencia del soporte de inmovilización de una comunidad microbiana reductora de sulfato en un reactor de lecho fijo*. Trabajo completo presentado en la II Reunión Interdisciplinaria de Tecnología y Procesos Químicos. Huerta Grande, Córdoba, Argentina.
- Manz, W., Amann, R., Ludwig, W., Wagner, M., Schleifer, K., 1992. *Phylogenetic oligodeoxynucleotide probes for the major subclasses of proteobacteria: problems and solutions*. Syst. Appl. Microbiol. 15, 593-600.
- Neculita, C., Zagury, G., Bussière, B., 2007. *Passive treatment of acid mine drainage in bioreactors using sulfate-reducing bacteria: critical review and research needs*. J. Environ. Qual. 36, 1-16.
- Okabe, S., Characklis, W., 1992. *Effects of temperature and phosphorus concentration on microbial sulfate reduction by Desulfovibrio desulfuricans*. Biotechnology and Bioengineering 39 (10), 1031-1042.
- Okabe, S., Nielsen, P., Jones, W., Characklis, W., 1992. *Factors affecting microbial sulfate reduction by Desulfovibrio desulfuricans continuous culture: limiting nutrients and sulfide concentration*. Biotechnology and Bioengineering 40, 725-734.
- Postgate, J., 1984. *The sulphate-reducing bacteria*. Cambridge University Press, United Kingdom.
- Sahinkaya, E., Gungor, M., 2010. *Comparison of sulfidogenic up-flow and down-flow fluidized-bed reactors for the biotreatment of acidic metal-containing wastewater*. Bioresource Technology 101, 9508-9514.
- Stahl, D., Amann R., 1991. *Development and application of nucleic acid probes*. Stackebrandt E, Goodfellow M (eds) Nucleic acid techniques in bacterial systematics. Wiley, Chichester, England, 205-248.
- Villa-Gomez, D., Ababneh, H., Papirio, S., Rousseau, D., Lens, P., 2011. *Effect of sulfide concentration on the location of the metal precipitates in inverted fluidized bed reactors*. Journal of Hazardous Materials 192 (1), 200-207.