

Caracterización de un consorcio bacteriano sulfooxidante aislado de un sistema de Biofiltración de gas natural

Yuletsis Díaz-Rodríguez, Silvia Acosta-Díaz, Yaima Barrios-San Martín, Sergio Pascual Mustelier-Pérez, Rosa Contrera-Aviléz, Francisca González-Hernández.

Centro de Investigación del Petróleo. Churruca #481 e/ Vía Blanca y Washington, Cerro, La Habana, Cuba. email: yuletsis@ceinpet.cupet.cu

Recibido: 22 de noviembre de 2016.

Aceptado: 04 de mayo de 2017.

Palabras claves: aislados, biodesulfuración, biofiltro.

Keywords: isolates, biodesulfurization, biofilter

RESUMEN

La biodesulfuración es el proceso que emplea microorganismos para oxidar compuestos reducidos de azufre y transformarlos en compuestos de fácil eliminación. Sin embargo, el procedimiento es lento, siendo necesario buscar nuevos microorganismos que reduzcan los tiempos de residencia y hagan más competitivo el proceso a nivel industrial. La aplicación de mezclas complejas para la inoculación de biofiltros como son los lodos activos, resulta más conveniente a escala real, que el empleo de especies aisladas de microorganismos con potencialidades para degradar el compuesto de interés. En tal caso, el conocimiento de sus características reduce el tiempo de adaptación en el biofiltro y contribuyen a mejorar la eficiencia del proceso de degradación. El propósito de la investigación es: conformar y caracterizar un consorcio bacteriano sulfooxidante aislado de la biopelícula adherida al soporte de un sistema de biofiltración de gas natural. Para ello se realizó el aislamiento e identificación de representantes bacterianos además de la formación de un consorcio bacteriano y la caracterización de la actividad sulfooxidante del mismo. Se realizaron pruebas fisiológicas y bioquímicas, así como el análisis de la contribución de factores que pueden influir en su crecimiento. Se obtuvieron 8 aislados identificados presuntivamente en los géneros *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Aeromonas*. La actividad sulfooxidante demostró que las condiciones más favorables para el crecimiento de estos microorganismos fueron a pH 2 y 4. La mayor degradación de azufre y consecuentemente la mayor obtención de concentración de sulfato se obtuvo a pH 4, el cual no resultó inhibitorio en ninguna de las condiciones evaluadas.

ABSTRACT

Desulfurization is the process in which microorganisms to oxidize reduced sulfur compounds and transform them into easily removable compounds are used. However, the process is slow, making it necessary to look for new microorganisms that reduce the residence times and make the process more competitive in industry. The application of complex mixtures for inoculation of biofilters such as activated sludge, it is more convenient to scale, that the use of species isolated from microorganisms with potential for degrading the compound of interest. However, the knowledge of its characteristics reduces the adaptation time in the biofilter and help improve the efficiency of the degradation process. The purpose of the investigation is shape and characterize a sulfooxidante bacterial consortium isolated from the biofilm adhered to the support of a biofiltration system as natural gas. For this, the isolation and identification of isolates plus sulfooxidante characterizing the activity thereof was performed; by performing physiological and biochemical tests and analysis of the contribution of factors that can influence growth, respectively. 8 isolates presumptively identified in the generas *Bacillus*, *Lactobacillus* y *Aeromonas* were obtained. The sulfooxidante activity showed that the most favorable conditions for the microorganism's growth are pH 2 and 4. The latter further degradation of sulfur and consequently greater concentration of sulfate was obtained to pH 4, which was not inhibitory at any of conditions, is evaluated.

INTRODUCCIÓN

Las tendencias globales del desarrollo sustentable promueven la aplicación de procesos de tratamiento biológico, así como la necesidad de extender el uso de materias primas naturales, renovables y biodegradables en dichas aplicaciones. La biofiltración presenta como beneficio adicional sobre otras tecnologías de oxidación, la carencia de contaminantes secundarios, costos de operación generalmente bajos, alta eficiencia de degradación, larga vida de la

biomasa inmovilizada y brinda efectos negativos de menor incidencia sobre el medio ambiente que los tratamientos químicos.^{1,2}

Los biofiltros empacados con fibras naturales, en donde se desarrolla la población microbiana, han sido usados por muchas décadas; fundamentalmente en plantas de tratamiento de agua residual y para la remoción de bajas concentraciones de compuestos olorosos.³ Las plantas de tratamiento de aguas residuales también forman parte de las fuentes más comunes de microorganismos, específicamente los provenientes de los procesos de lodos activados. Esto es debido a que esta microbiota, presenta una previa adaptación en su metabolismo, que les permite asimilar concentraciones elevadas de sustratos tales como el sulfuro de hidrógeno ($H_2S_{(g)}$).⁴ Estos lodos constituyen, por tanto, un medio de cultivo favorable para el desarrollo de los microorganismos, que cierran los ciclos biogeoquímicos de elementos como el azufre, el carbono, el nitrógeno o el fósforo.⁵

La aplicación de estas mezclas complejas para la inoculación de biofiltros, resulta más conveniente a escala real, que el empleo de especies aisladas de microorganismos con potencialidades para degradar el compuesto de interés.⁶ Aunque la selección de microorganismos efectivos para la remoción de sulfuro de hidrógeno se aplica de forma más frecuente.^{7,8} El conocimiento de las características de estos microorganismos reduce el tiempo de adaptación en el biofiltro y contribuyen a mejorar la eficiencia del proceso de degradación.

En la actualidad se pretende extender dichas aplicaciones a procesos con mayores cargas contaminantes y desarrollarlos de modo eficiente.¹ De ahí que se realicen estudios para seleccionar microorganismos oxidadores de $H_2S_{(g)}$ u otros contaminantes gaseosos en general. El propósito de la investigación es: caracterizar un consorcio bacteriano sulfooxidante aislado de la biopelícula adherida al soporte de un sistema de biofiltración de gas natural.

MATERIALES Y MÉTODOS

Toma de la muestra para el aislamiento

El aislamiento se realizó a partir de partículas de fibra de kenaf utilizada como empaque de un biofiltro escurrido, luego del tratamiento del gas natural.^{9,10} En la misma se encuentra adherida la microbiota de los lodos activos utilizados en este tratamiento. Las muestras se tomaron del tope, medio y fondo del equipo (**Fig. 1**); a fin de recuperar la mayor variabilidad de microorganismos sulfooxidantes que se encuentran inmovilizados a lo largo de la columna de biofiltración.



Fig. 1. Identificación de la toma de muestras.

Aislamiento microbiológico y obtención de cultivos puros

Se tomaron 10 g de partículas de fibra de kenaf del tope, medio y fondo del biofiltro por separado y se suspendieron en 100 mL de medio líquido para aislamiento de bacterias sulfooxidantes (3 g KH_2PO_4 ; 0,1 g NH_4Cl ; 0,01 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,5 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,3 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$; para 1 L de agua destilada) en frascos de 500 mL.⁷ Cada muestra se incorporó en un frasco con este medio de cultivo suplementado con 10 g de azufre elemental y otro con sulfuro de sodio a 20 ppm, con una réplica en cada caso. El pH del medio se ajustó a 4 utilizando ácido clorhídrico a 2 N. Los frascos se incubaron a 30 °C y 180 rpm hasta que el pH disminuyó a 2 por la acumulación de sulfato como producto de la oxidación del azufre, a partir de ese momento se tomaron 10 mL del cultivo en crecimiento y se inocularon en 90 mL de medio fresco.⁷

Este proceso se repitió varias veces hasta la aclimatación del cultivo en crecimiento. Posteriormente se tomaron 100 μL de la fase acuosa y se inocularon por el método de esparcimiento en placas Petri con el medio de cultivo descrito anteriormente, pero agarizado para el aislamiento de bacterias. Las placas inoculadas se incubaron a 37 °C de 24-48 h.⁷

La purificación de las colonias bacterianas se realizó en medio Agar Triptona Soya bajo las mismas condiciones. Para ello se tuvieron en cuenta, las colonias con características micromorfológicas diferentes y se empleó el microscopio estereoscópico. El chequeo de la pureza y descripción de las características morfológicas y tintoriales de los aislados se realizó mediante la tinción de Gram, según Harrigan y McCance.¹¹ Se realizó una selección primaria de los aislados sulfooxidantes, la cual se estableció tomando las cepas con características diferentes.

Caracterización fisiológica-bioquímica parcial de los aislados

Para la caracterización bioquímica parcial de los aislados, se procedió a realizar las pruebas recomendadas y descritas por el Manual de Identificación de Bacterias.¹²

Antagonismo

Para formar un consorcio bacteriano con los aislados se realiza una segunda selección tomando como criterio el crecimiento abundante en el medio con ambas fuentes de azufre y diferentes características morfológicas y tintoriales. Posteriormente fue necesario realizar una prueba de antagonismo donde se comprueba la sobrevivencia de las bacterias en el mismo medio de cultivo seleccionado para los experimentos. Para ello se empleó el método de los pozos por halos de inhibición según la técnica de Umbreit.¹³

Caracterización de la actividad sulfooxidante del consorcio.

Se determinó la concentración de SO_4^{2-} según la Norma APHA 4500-E;¹⁴ y la densidad celular a 660 nm,⁷ cada 24 horas por 7 días. El diseño de experimento y el análisis estadístico del mismo se realizó con ayuda del Statgraphics Centurion XV.II.

Se realizó el planteamiento de la matriz de diseño multifactorial 2³ para el crecimiento del consorcio tomando como variables de respuesta: la densidad óptica (DO) y la concentración de sulfato en el medio. Se realizaron 27 corridas experimentales a 3 niveles en condiciones de pH 2, 4, 6; y concentración de sustrato de 5, 10 y 15 gS^o.L⁻¹.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento y caracterización fisiológica-bioquímica parcial de los aislados

En el aislamiento se adquirieron un total de 12 cepas de las cuales un 50 % se obtuvo del tope, 33 % del medio y el 17 % restante se extrajo del fondo del biofiltro. Las cepas se identificaron según su aparición y fuente de azufre. Luego de la observación detallada de las características fisiológicas se realizó la primera selección de las colonias diferentes para un total de 8 cepas.

La realización de las pruebas fisiológicas-bioquímicas tributó al agrupamiento de los aislados presuntivamente como *Bacillus* a 1.1, 2.2, 3.1, 3.2 y 4.1. En la literatura se reportan bacterias aerobias azufre oxidantes pertenecientes a este género, así como su uso en biofiltros.¹⁵ Por otro lado se determinó que el aislado 1.2 pertenece al género *Lactobacillus*, mientras que 5.2 y 7.1 correspondieron al género de *Aeromonas*. Estos no son referidos en la literatura consultada como bacterias más frecuentes aisladas en este tipo de sistemas. No obstante, para llegar a una identificación certera se requiere de la realización de otros ensayos bioquímicos y fisiológicos en combinación con métodos moleculares que complementen la metodología convencional desarrollada.

Antagonismo

Una vez confirmado la pureza de las bacterias, de cada género, escogidas al azar para el consorcio (1.2, 5.2 y 4.1); se determinó la presencia o ausencia de competencia entre ellas. En esta prueba ninguna de las bacterias inhibió el crecimiento de la otra, aunque hubo una pequeña formación de halo en las primeras 24 h de incubación, el cual desapareció en las siguientes 24 h. Tal situación confirma que las bacterias seleccionadas para el consorcio no compiten por el alimento y pueden desarrollarse juntas.

Caracterización de la actividad sulfoxidante

El análisis para cada uno de los efectos estimados y las interacciones demostró que en orden decreciente la variable de mayor significancia estadística fue el pH ($P < 0,05$) (**Fig. 2a**). Así mismo la variabilidad de DO en piezas separadas para cada uno de los efectos (**Fig. 2b**); donde se demuestra que la mayor densidad óptica se obtiene a pH 4 y concentración de azufre de 5 g.L⁻¹.

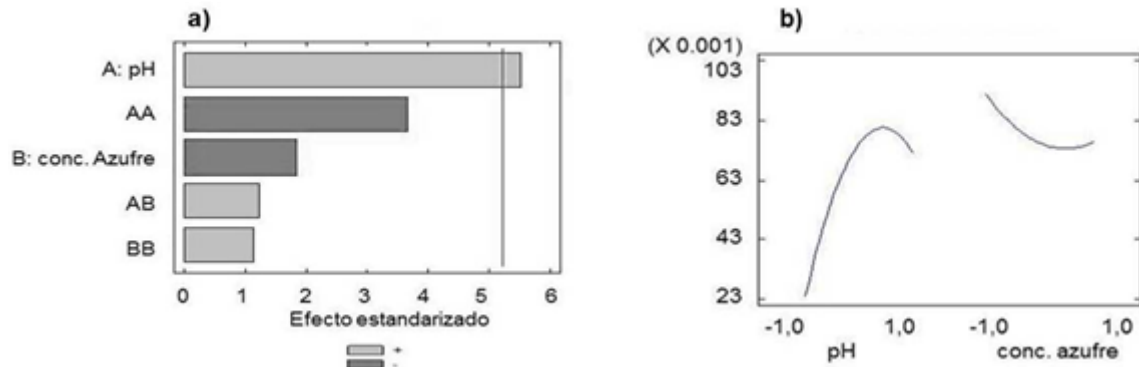
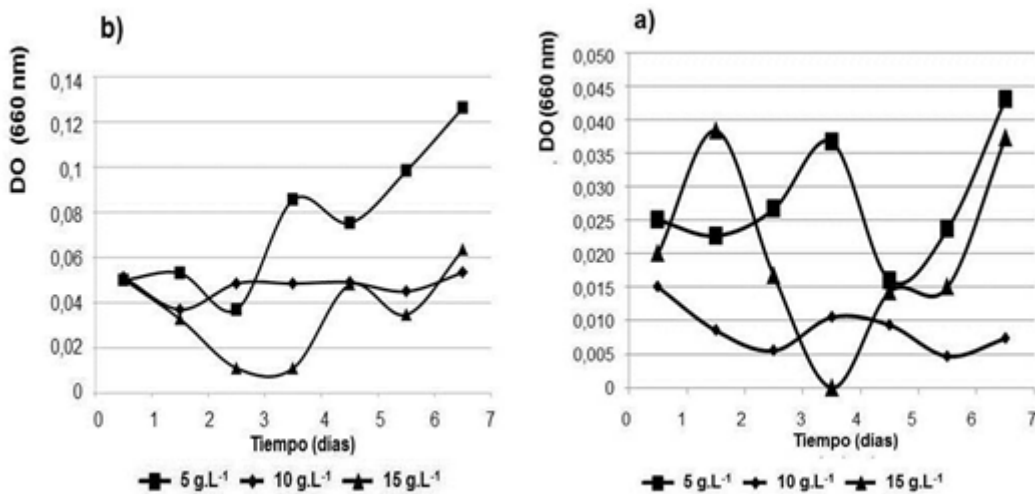


Fig. 2. Análisis de efectos e interacciones para DO. a) Diagrama de Pareto estandarizado. b) Efectos principales.
 A partir de la eliminación de la concentración de azufre como variable no significativa en la salida, se muestran los resultados de ajustar un modelo de regresión lineal múltiple para describir la relación entre DO y 2 variables independientes. La ecuación del modelo ajustado es:

$$DO = 0,0625185 + 0,0240556 * pH \quad \text{Ec. 1.}$$

Puesto que el valor-P en la tabla ANOVA es menor que 0,05, existe una relación estadísticamente significativa entre las variables, con un nivel de confianza del 95%. El estadístico R-Cuadrada indica que el modelo así ajustado explica 17,0139% de la variabilidad en DO.

En este sentido, la densidad óptica constituye una medida del crecimiento bacteriano, donde la suspensión celular aparece como turbidez debido a que las células dispersan la luz que atraviesa la suspensión. Cuantas más células estén presentes mayor será la luz dispersada y, por tanto, mayor la turbidez.¹⁶ De ahí su pertinencia para seguir el aumento de la población microbiana durante el período de ensayo. Así mismo se reflejan los resultados de la dinámica de crecimiento durante los 7 días de cultivo, (Fig.3).



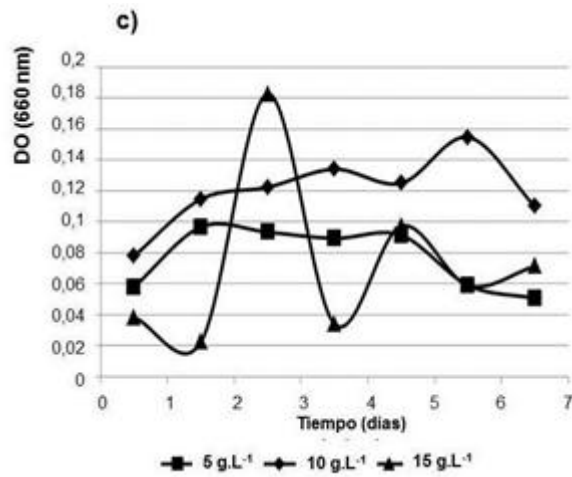


Fig. 3. Dinámica de crecimiento del consorcio a diferentes condiciones de pH y concentraciones de sustrato. a) pH=2, b) pH 4, c) pH=6.

El crecimiento general de la población del consorcio se mantiene durante todo el período en las tres condiciones de pH, aunque la absorbancia disminuyó alrededor del 3^{er} día reflejando una etapa de muerte celular. Esta etapa sugiere el acondicionamiento del consorcio a las condiciones impuestas ya que al 4^{to} día aumenta la densidad celular nuevamente, la cual se favorece con la menor concentración de sustrato.

El caso de los experimentos con pH 2 y 4, después del 5^o día, continúa aumentando el crecimiento celular. Tales resultados sugieren que los aislados desarrollan una actividad sulfoxidante más efectiva bajo estas circunstancias.⁷ Así mismo, durante el cultivo, se mostró un aumento de la concentración de sulfato que acompañó al incremento de la densidad celular (Figuras 4 a y b).

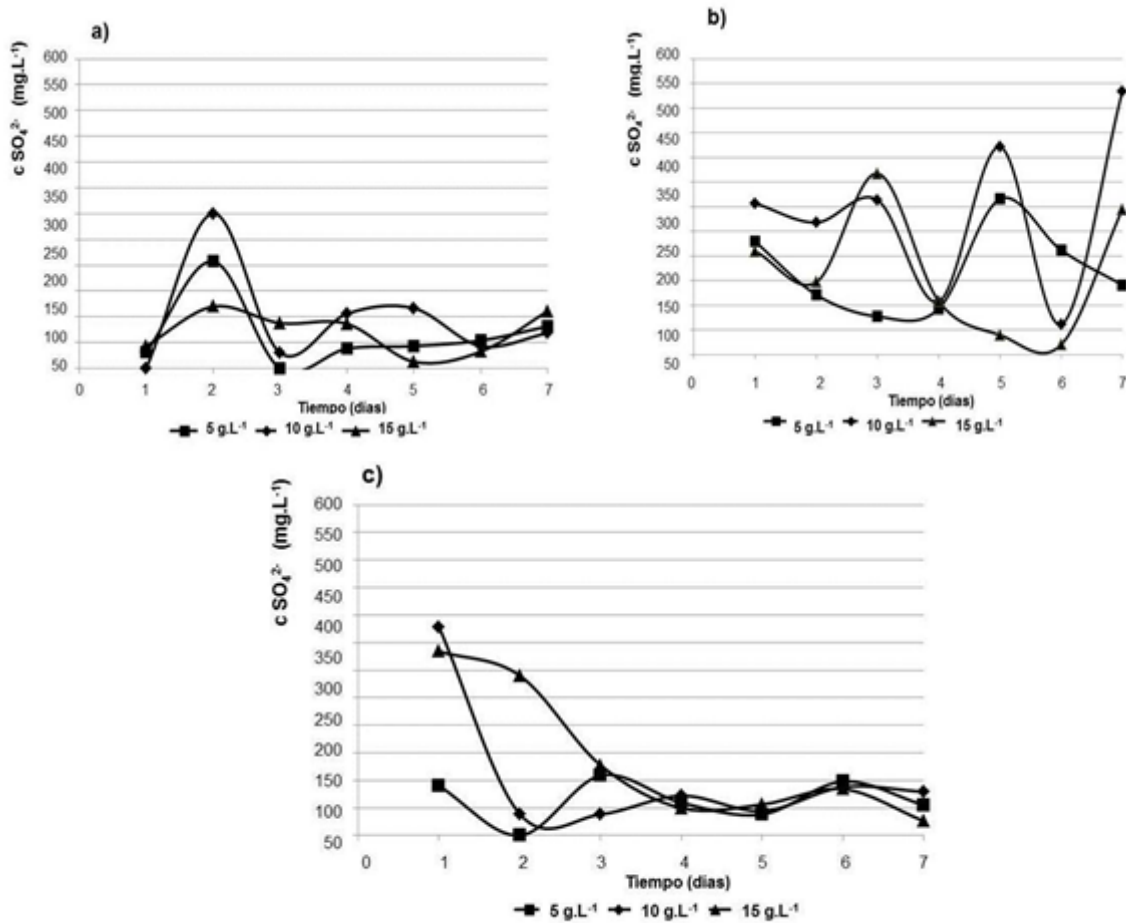


Fig. 4. Comportamiento de la concentración de sulfato en el medio a diferentes condiciones de pH y concentraciones de sustrato. **a)** pH=2, **b)** pH 4, **c)** pH=6.

Sin embargo, a pH 6 se observan diferentes resultados desde el inicio del experimento (**Fig. 4 c**), lo que puede atribuirse a la precipitación de las sales del medio al ajustar el pH. No obstante, la disminución de la concentración sulfato durante los 7 días sugiere la degradación transitoria del azufre a sulfito, lo cual ocurre en algunas especies durante el ciclo de oxidación, aunque no se determinó para este estudio. En el ciclo del azufre una primera etapa sería la pérdida de dos electrones del H₂S y la formación de azufre sobre la membrana de la bacteria; en una segunda etapa este azufre es oxidado a sulfito y después a sulfato.^{15,17}

Por otro lado, se expone el análisis utilizando como variable de respuesta la concentración de sulfato (**Fig. 5**). En ella se muestra que, para cada uno de los efectos estimados y las interacciones en orden decreciente, tanto el pH como la concentración de azufre presentan significancia estadística ($P < 0,05$), aunque la mayor influencia se origina por el pH.

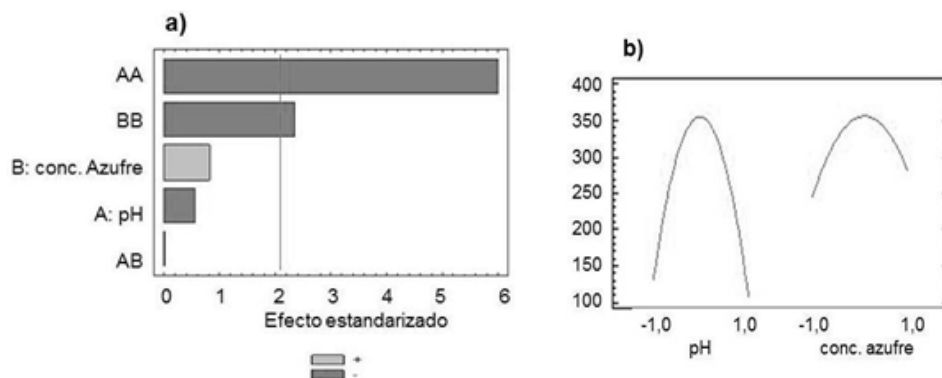


Fig. 5. Análisis de efectos e interacciones para concentración de SO₄²⁻. **a)** Diagrama de Pareto estandarizado. **b)** Efectos principales.

En la representación gráfica de la variabilidad de la concentración de SO₄²⁻ en piezas separadas para cada uno de los efectos; se observa que la mayor concentración de sulfato obtenida es a pH 4 y concentración de azufre de 10 g.L⁻¹. Aunque las concentraciones de sulfato obtenidas en todos los casos no resultan inhibitorias para el crecimiento de los aislados tienen estrecha relación con la acidificación del medio. Al respecto algunos autores informan que no percibieron una disminución de la eficacia de eliminación a pH en el rango 6,8-8.5, solo se daba el efecto inhibitorio del sulfato a pH bajos. En tal caso la eficacia disminuyó al 26% a pH 2, mientras que a pH 8 se obtuvo un 82.3%.^{15,18} El hecho de utilizar la fibra de Kenaf como material de soporte para el crecimiento del consorcio sulfoxidante representa también una ventaja adicional futura con respecto al efecto inhibitorio del sulfato. Esto se debe a que presenta una alta porosidad que permite el lavado de sulfato que pudiera generarse y evitar así su acumulación.⁷

CONCLUSIONES

Se obtuvieron 12 cepas aisladas indistintamente en el tope, medio y fondo del material de soporte (fibra de kenaf) utilizado en el biofiltro. Se seleccionaron 8 aislados y se identificaron presuntivamente como *Bacillus* a 1.1, 2.2, 3.1, 3.2 y 4.1; *Lactobacillus* a 1.2, mientras que 5.2 y 7.1 pertenecieron al género de *Aeromonas*. La actividad sulfoxidante del consorcio demostró que las condiciones más favorables para su crecimiento fueron a pH 2 y 4. A pH 4 se obtiene mayor degradación de azufre y consecuentemente mayor obtención de sulfato. La concentración de sulfato no resultó inhibitoria para el crecimiento del consorcio en ninguna de las condiciones evaluadas.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFÍA

1. Antunez J, De-Castro VC, Soares M, Lorenci A, Soccol CR. Biofiltration of Volatile Organic Compounds of Brazilian Gasoline. *International Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2014;57(1):119-24.
2. Bravo E. Los impactos de la explotación petrolera en ecosistemas tropicales y la biodiversidad. *Acción Ecológica* 2007 (consultado: 14 de enero de 2014). Available: http://www.inredh.org/archivos/documentos_ambiental/impactos_explotacion_petrolera_esp.pdf
3. Lapo Calderon BG. Estudio de medios de soporte para el crecimiento bacteriano aplicado al tratamiento biológico aeróbico de aguas residuales [Tesis en opción del título de Master en Ingeniería Ambiental]. Quito, Ecuador; Escuela Politécnica Nacional; junio; 2014.
4. Estrada JM, Hernández S, Muñoz R, Revah S. A comparative study of fungal and bacterial biofiltration treating a VOC mixture. *Journal of Hazardous Materials*. 2013;250-251:190-7.
5. Rincón Castillo Á, Baquero Peñuela JE, Flores Díaz H. Manejo de la nutrición mineral en sistemas ganaderos de los Llanos Orientales de Colombia. Villavicencio (Meta), Colombia: Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA). 2012: p.25-56.

6. Kennes C, Montes M, López ME, Veiga MC. Waste gas treatment in bioreactors: environmental engineering aspects. *Journal of Environmental Engineering and Science*. 2014;9(1):20-7.
7. Eun Young L, Kyung Suk C, Hee Wook R. Characterization of Sulfur Oxidation by an Autotrophic Sulfur Oxidizer, *Thiobacillus* sp. ASWW-2. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 2000;5(1):48-51.
8. Chang Tang C. Biofiltration of hydrogen sulfide-containing waste gas by entrapped mixed microbial cells. *Journal of the Chinese Institute of Engineers*. 2006;29(5): 777-81.
9. Díaz Rodríguez Y, Casellas Ortega R, Rodríguez Muñoz S, Fernández Santana E, Mustelier Pérez SP. Biofiltración del gas natural cubano en soporte orgánico con lodos activos. *Ingeniería Hidráulica y Ambiental*. 2016;37(2):68-78. [Consultada: 11 de mayo de 2016] Disponible en: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1680-03382016000200006&lng=es&tlng=es
10. Díaz Rodríguez Y, Casellas Ortega R, Mustelier Pérez SP, González Hernández F, Acosta Díaz S. Biofiltración del gas acompañante del petróleo en soporte orgánico de fibra de kenaf. V Congreso Cubano de Petróleo. Taller: Aplicación de la química en la industria petrolera y gasífera. Sexta Convención Cubana de Ciencias de la Tierra, GEOCIENCIAS 2015, 4 al 8 de mayo de 2015. Palacio de Convenciones de La Habana; 2015.
11. Harrigan W and McCance M. *Métodos de laboratorio de Microbiología*. Editorial Academia. 1ra ed. Madrid, España. 1968.
12. Holt J, Krieg N, Sneath P, Staley J and Williams ST. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams and Wilkins: Ninth Edition. Baltimore, USA. 1994:p.787.
13. Umbreit W. Método de los pozos por halos de inhibición. *Modern Microbiology*. ed. WH Freeman & Co. San Francisco, EE.UU. 1982:p.189-93.
14. APHA 4500- SO_2^{4-} - E: 2005: Standard Methods for the examination of water and wastewater. APHA _AWWA_ WEF.
15. Ramírez Muñoz M. Viabilidad de un proceso para la eliminación conjunta de H_2S y NH_3 contenido en efluentes gaseosos [Tesis en opción del título de Doctor]. Universidad de Cádiz: Cádiz, España; junio; 2007,p. 233.
16. Madigan M, Martinko J and Parker J. *Biology of Microorganisms*. eds. Microbial Ecology. Ninth Edition ed. Brock. 2000, Prentice Hall, N. J. p.77.
17. Varnero MT, Carú M, Galleguillos K, Achondo P. Tecnologías disponibles para la Purificación de Biogás usado en la Generación Eléctrica. *Información tecnológica*. 2012;23(2):31-40. [Consultada: 5 de marzo de 2016] Disponible en: <https://dx.doi.org/10.4067/S0718-07642012000200005>
18. Jones, K. and A. Martinez, Rizwan, M., Boswell, J. Sulfur toxicity and media capacity for H_2S removal in biofilters packed with a natural or a commercial granular medium. *Journal of the Air & Waste. Management Association*. 2005(55): p. 5.