



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA- XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
ENERGÍA Y CONSUMO DE SUSTANCIAS FUNDAMENTALES

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

**USO DE BACTERIAS SULFÚRICAS PÚRPURAS Y VERDES PARA LA
ELIMINACIÓN DE H_2S CONTENIDO EN AGUAS TRATADAS, UTILIZADAS
PARA EL RIEGO**

PROFESORA:
DRA. KASUKO AOKI MAKI

MARIO DE JESÚS CASIMIRO REYES

Estudiante de la licenciatura de **Química Farmacéutica Biológicas**

16 DE MAYO DE 2006.

USO DE BACTERIAS SULFÚRICAS PÚRPURAS Y VERDES PARA LA ELIMINACION DE H_2S CONTENIDO EN AGUAS TRATADAS, UTILIZADAS PARA EL RIEGO

INTRODUCCIÓN

La presencia de H_2S en aguas tratadas, que son utilizadas para riego de cultivos u otros, representa un peligro extenso para las personas que tienen contacto con estas aguas. Debido a que existe una relación estrecha entre el metabolismo de ciertas bacterias con la degradación de éste ácido que se presenta en forma de gas, el cual es producido por desechos provenientes de residuos químicos empleados para la fertilización de los suelos o por diferentes síntesis químicas llevadas a cabo durante la putrefacción de materia orgánica e inorgánica, así como también en procesos metabólicos de organismos cuya nutrición o forma de vida o que requiere de la presencia de azufre. En el presente trabajo se pretende informar acerca de la actividad química de oxidación del H_2S por medio de bacterias específicas como las bacterias púrpuras y verdes del azufre, puesto que para su metabolismo requiere la presencia de este importante elemento químico, azufre, y una forma en que se encuentra éste, es en el H_2S , que las mismas bacterias de este grupo reducen a sulfuros, dando como una aplicación más para la eliminación de éste compuesto en aguas que son usadas tanto para riego como para otros usos fuera de cultivos agrícolas. Dando un enfoque más general acerca de la importancia de llevar a cabo investigación de esta índole, es debido a que la purificación de las aguas depende primeramente de bacterias como recurso ecológico, de la misma se desarrollan diversas formas de captación de compuestos químicos para la sobrevivencia de otro organismo dependiente al siguiente nivel trófico en la cadena alimenticia.

INTRODUCCIÓN

Las bacterias son microorganismos procariotas unicelulares que son capaces de degradar sustancias específicas que se encuentren en diversos ambientes, ya sea de origen acuático o terrestre, aún así en lugares en donde existe un descenso o ascenso de temperatura; se encuentran en todos los ambientes con actividad o en estado latente.

Algunos grupos de bacterias por su metabolismo autótrofo y su actividad sobre el sustrato en que actúan forman parte de los productores primarios que en su mayoría habitan en medios acuáticos, además pueden utilizar como fuente de carbono diversos compuestos orgánicos e inorgánicos de peso molecular bajo, además de utilizar la luz solar o no como fuente de energía. Dentro del grupo de las bacterias autotróficas se encuentran las bacterias oxigénicas y anoxigénicas; a estas últimas pertenecen las bacterias del azufre, que comprenden a las familias *Chromatiaceae* y *Ectothiorhodospiraceae*.

Las bacterias rojas del azufre representan una gran importancia como productoras primarias, puesto que forman parte de los ciclos del carbono y del azufre, además de servir como alimento de diversos organismos acuáticos.

En México, esta variedad de bacteria han sido muy poco estudiadas, a ello alude la importancia de abordar esta investigación, que va enfocada al uso benéfico de estos microorganismos para disminuir la concentración de H_2S en el agua que comúnmente usamos para riego en el cultivo de planta y que algunas veces está presente como traza en diferentes alimentos de consumo humano diario, aprovechando la capacidad que tienen estas bacterias de oxidar este compuesto químico gaseoso que es muy tóxico y representa un peligro extenso para las personas que tienen contacto con aguas de ésta índole (aguas tratadas y de desechos).

CUERPO DE INVESTIGACIÓN

El sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico (H_2S), es generado como producto de la digestión anaeróbica de sustancias biodegradables, presentes en diferentes ambientes, dicho proceso lo llevan a cabo un grupo de bacterias específicas cuyo metabolismo exige la presencia del azufre elemental como medio de almacenamiento de energía. A veces el sulfuro de hidrógeno es producido por la degradación de proteínas o algunos otros compuestos que contienen azufre en su constitución química, presentes en la materia orgánica digerida (Syed, et al, 2006), generalmente, este biogás es producido de masas industriales que contienen un alto porcentaje de sulfuro de hidrógeno (Schieder et al, 2003).

La liberación de este gas al ambiente genera un clima altamente tóxico cercano a lugares expuestos a la acción de este compuesto, provocando daños patológicos tanto a animales como a plantas, y como mención específica lo juega también el hombre (Roth, 1993), dichos daños se remontan debido a una alta inhalación, además el sulfuro de hidrógeno reacciona con enzimas del e inhibe la respiración celular resultando una parálisis pulmonar, y la muerte.

La exposición continua una ligera concentración de este ácido (15-50 ppm) genera irritación en las mucosas membranales y puede también ser causa de Dolores de cabeza, y náuseas. A concentraciones altas (200-300 ppm) puede ocasionar un paro respiratorio a coma e inconciencias. La exposición a concentraciones mayores de 700 ppm por más de 30 minutos puede ser fatal. (MSDS, 1996).

Como ya se mencionó la actividad de oxidación de este ácido por ciertas bacterias, puede ser favorable, puesto que disminuye la dosis de concentración, primero en el agua de riego, después reduce los daños patógenos que pueden ser provocados por la presencia del mismo en el agua hacia diversos organismos. La actividad específica que hemos mencionado es llevada a cabo por el grupo de bacterias clasificadas en el grupo de las fototróficas del azufre.

Las bacterias fototróficas anoxigénicas son un grupo diverso de microorganismos, que habitan generalmente zonas anaerobias de los sistemas acuáticos con exposición a la luz (Pfennig, 1967 y 1978, citados en Zehnder, 1988; Núñez-Cardona, 2003) y debido a su capacidad fotosintética, convierten la energía luminosa en química.

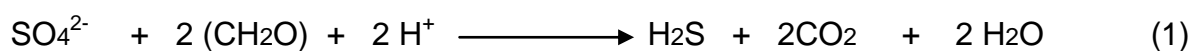
El fotometabolismo de las bacterias del azufre es estrictamente anaerobio por lo que el oxígeno molecular no es un producto de la fotosíntesis; para realizar dicho proceso utilizan como donadores de electrones compuestos relacionados con el azufre como el sulfuro de hidrógeno(H_2S), tiosulfato($S_2O_3^{2-}$), metionina o compuestos orgánicos simples de peso molecular bajo (Pfennig, 1977, Stanier *et al.*, 1977, citados en Zehnder, 1988, Núñez-Cardona, 1998, Trüper y Pfennig, 1981 y Drews e Imhoff 1991).

La importancia radical de estas bacterias es que al utilizar como fuente de electrones los compuestos reducidos del azufre lo almacenan como partículas de azufre elemental en forma oxidada, tal como lo llevan a cabo las bacterias rojas del azufre de la familia **Chromatiaceae** que se encuentran en el subgrupo de las γ - *Proteobacteria* (Overmann, 2001), pueden presentar formas esféricas, en espiral, bacilos o vibrios; con diámetros entre 1.0- 6.0 μm ; con arreglos de 1 o más células y son Gram negativa. En muchos casos, su reproducción es por fisión binaria o algunas por gemación. Pueden ser móviles, gracias a la presencia de flagelos o por deslizamiento, aunque algunas presentan vacuolas con gas que les permite flotar. En general, los pigmentos de las bacterias fotosintéticas pueden

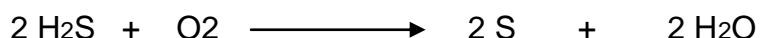
estar localizados en la membrana citoplasmática o en el sistema membranar intracitoplasmático (Holt et al., 1994; Pfenning et al., 1998 y Madigan et al., 2000).

COMPUESTOS AZUFRADOS EN EL AGUA

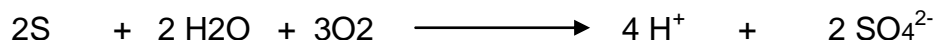
Los compuestos azufrados son muy comunes en el agua; cuando los compuestos orgánicos en cuya molécula está presente el azufre son descompuestos por bacterias, el producto inicial sulfurado está generalmente de forma reducida, es decir en forma de H_2S . Esto es debido a la presencia de bacterias en el agua que son capaces de reducir iones sulfato a H_2S , de la forma como lo hace la *desulfovibrio*, la actividad metabólica de reducción de sulfatos se lleva a cabo de la siguiente forma:



Como ya se dijo, algunas bacterias pueden reducir iones sulfatos a H_2S , otras pueden oxidar el H_2S a un estado de oxidación más alto. Las bacterias púrpuras y verdes del azufre obtienen energía de procesos metabólicos a través de la oxidación del H_2S . Estas bacterias utilizan CO_2 como medio de carbono y son estrictamente anaeróbicas, sin embargo algunas bacterias del azufre son aeróbicas, es decir pueden utilizar el oxígeno molecular para oxidar H_2S , de acuerdo a la siguiente reacción:



Sulfuro elemental:

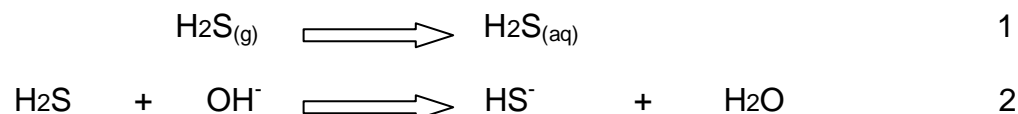


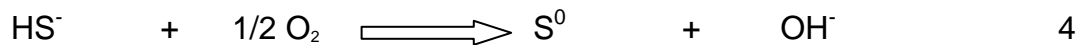
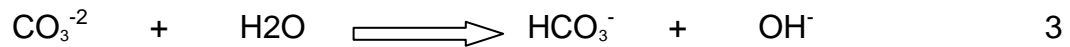
O con iones tiosulfato: H_2S

La oxidación del sulfuro en un estado de oxidación del ion sulfato produce ácido sulfhídrico, un ácido fuerte. El sulfuro elemental puede depositarse como gránulo en la célula bacteriana púrpura del azufre que se observa con un color rojo oscuro.



Para cuantificar la cantidad de H_2S oxidado por las bacterias rojas del azufre se han empleado biorreactores de medición de salida de gas que mide la disolución subsecuente a sulfuro elemental, de las ecuaciones>





El sulfuro producido biologicamente (o biosulfuro) es formado en partículas de aproximadamente 0.1- 1 μm , los cuales son estabilizados por la materia organica, tales como proteínas. Las partículas pueden formar agregados de sulfuro elemental, con diametro arriba de 3 mm (Kleijal, et al., 2003).

Las bacterias rojas contienen pigmentos de clorofilas llamados bacterioclorofila y ademas una variedad de pigmentos carotenoidicos, estos pigmentos dan el color a estas bacterias, el azufre elemental oxidado(S^0) es almacenado como granulo dentro de las células.

El proceso fototrófico que usan las bacterias del azufre, H_2S como donador de electrones, microscópicamente se almacenan en forma de glóbulos de azufre elemental alrededor de la célula bacteriana. La reacción que resume este fenómeno metabólico bacteriano se representa en la siguiente ecuación química:



Donde (CH_2O) forma el material orgánico intracelular; como los carbohidratos que utiliza la célula bacteria como fuente de carbono.

El S^0 producido por éste ciclo bacteriano de inmediato puede ser oxidado a la forma de ion SO_4^{2-} después que el H_2S ha sido consumido. En general las bacterias púrpuras en tres familias: Chomatiaceae, Ectothiorhodospiraceae y Rhodospirillaceae, del otro lado están las bacterias verdes del azufre que forman una familia muy pequeña de las Chlorobiaceae. El S^0 globular acumulado intracelularmente, en algunas bacterias del grupo chromatiacea corresponde a un intermediario durante la oxidación del $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (Brune, 1988).

La capacida de oxidar compuestos reducidos de azufre en ausencia de oxígeno representa una gran importacia tanto ecología y biogeoquímica en las formas más importante de bacterias púrpuras y verdes, ya que ambos grupos se encuentran en condiciones ambientales altamente selectivos anoxigénicamente conteniendo H_2S en aguas dulce y saladas. Todas las especies de bacterias verdes del azufre son estrictamente anaeróbicas y fototróficamente obligadas, sin embargo muchas especies de bacterias púrpuras toleran el oxígeno en bajas concentraciones y son facultativamente quimioautotróficas, habitan aguas dulces y aguas ricas en sales (marinas), además soportan diferentes rangos de pH que van desde alcalino hasta lentamente ácidos (Pfenning, 1981). A lo largo de su actividad sintética, estas bacterias tienen un potencial de oxidación para la fermentación propia de productos bacterianos, incluyendo ácidos grasos, alcoholes, ácidos dicarboxílicos

y algunos compuestos aromaticos, llevàndolos a CO_2 . ciertas bacterias de Desulfovibrio excretan acetato como producto final de la oxidaci3n incompleta de sustrato, llevandolas a CO_2 . Especies de Desulfobacter postgatei, es especial para usar acetato, la cual utiliza como fuente de carbono y reserva de energía. La gran mayoría de las bacterias que utilizan el H_2S como recurso energético han sido aisladas de fuentes marinas (Jorgensen, 1982).

TÉCNICA PARA LA CUANTIFICACI3N DE H_2S UTILIZADA PARA ESTÁNDAR DE EXPERIMENTACI3N CON BACTERIAS

El método se basa por una parte en la finalidad del yodo por el Hidrógeno y por otra parte en la afinidad de la plata por el azufre. Esto permite así:

- Seleccionar las diversas categorías de azufre
- Determinar por adici3n directa de una soluci3n de yodo, todas las formas reductoras del azufre, o sea el azufre total;
- Determinar el sulfuro de hidrógeno arrastrándolo por una corriente de hidrógeno y restando de la determinaci3n precedente el resultado de una nueva medida yodométrica.
- determinar los tiosulfatos por una nueva medida después de la precipitaci3n del sulfuro de hidrógeno y de los sulfuros con plomo y calcular el contenido de sulfuros con una simple diferencia con el resultado precedente.
- determinar el azufre total del sulfuro de hidrógeno, de los sulfuros y de los polisulfuros según la cantidad de iones plata absorbidos en la precipitaci3n de estos compuestos. La diferencia con el resultado de la medida de estos compuesto por yodometría, da el azufre sobreañadido por los polisulfuros.

TOMA DE LA MUESTRA

Para tomar las muestras de agua destinada para la determinaci3n de azufre y de sus compuestos, efectuaremos la toma con las menos perturbaciones posibles. Para ello utilizaremos un aparato especial. Con un frasco esterilizados completamente y sumergirlo a favor de la corriente del agua.

REACTIVOS:

- Soluci3n saturada de cloruro bárico
 - Soluci3n de yodo N/10
 - Engrudo de almid3n
 - Carbonato o sulfato de plomo puro
 - Soluci3n de nitrato de plata N/10
 - Soluci3n de plumbito s3dico:

Acetato de plomo (baja concentraci3n).....	10 ml
Agua destilada	50 ml
Soluci3n de sosa (d= 1.336)	50 ml
- Calentar hasta disoluci3n y dejar que se enfríe

- Papel de acetato de plomo
- Amoníaco de plomo
- Solución de cianuro potásico N/10

PROCEDIMIENTO

Se tomarán 250 ml de agua sulfurosa como muestra problema, a la que se deben agregar 5 ml de una solución saturada de cloruro bórico, para precipitar los sulfatos y los carbonatos. Después filtrar de modo que no le dé el aire. El filtrado no debe precipitar más después de añadir 1 ó 2 gotas de solución de cloruro bórico.

1.- DETERMINACIÓN DEL AZUFRE TOTAL

Para éste objetivo tomaremos en un vaso de precipitado 51 ml del filtrado (agua que no contenga sulfatos ni carbonatos), lo que corresponde a 50 ml de agua sulfurosa primitiva. Añadir 1ml de de engrudo de almidón y valorar con la solución de yodo N/10 hasta coloración azul. Sea n el número de mililitros de solución de yodo N/10 vertidos. El azufre total (sulfuro de hidrógeno, sulfuros, tiosulfatos) expresado en gramos de azufre

DETERMINACIÓN DEL SULFURO DE HIDROGENO LIBRE

Tomar en un frasco cerrado por un tapón con dos aberturas, 51 ml de filtrado precedente. Sumergir el frasco en un baño de agua a 60°C. Hacer pasar por una de las aberturas un tubo que llegue al fondo del matraz por el que se inyecta una corriente de hidrogeno lavada, que arrastra el sulfuro de hidrogeno por el otro tubo. Detener la corriente gaseosa cuando el gas, ala salida del frasco, no ennegrezca más una gota de plúmbico sodico o un papel de acetato de plomo.

Sumergir entonces el frasco en agua fría, manteniendo la corriente de hidrogeno. Una vez enfriado, añadir un mililitro de engrudo de almidón y valorar con la solución de yodo N/10 hasta coloración azul. Sea n1 el número de mililitros de yodo N/10 vertidos.

$n1 \times 0,032 = P$ gramos de azufre. La diferencia entre el azufre total y P representa el azufre del sulfuro de hidrogeno.

DETERMINACIÓN DE LOS SULFUROS, TIOSULFATOS Y SULFITOS

Introducir en un frasco de tapón esmerilado, 60 ml del filtrado inicial. Añadir 2 o 3 gramos de carbonato o de sulfato de plomo para absorber el azufre del sulfuro de hidrogeno y de los sulfuros. Filtrar. Tomar 51 ml de este nuevo filtrado. Añadir un mililitro de engrudo de almidón y valorar con la solución de yodo N/10 hasta coloración azul.

Sea n_1 el número de mililitros de yodo N/10 vertidos. H (azufre de los tiosulfatos y de los sulfitos) = $n_2 \times 0,032$; P-H = azufre de los sulfuros.

Si se quiere determinar el azufre de los sulfitos, separar los 51 ml del filtrado en dos partes iguales. En una de ellas, determinar el azufre de los tiosulfatos y de los sulfitos, como anteriormente. En la otra, complejar los sulfitos con formol. Y valorar con la solución de yodo N/10. El volumen de solución de yodo así vertido corresponde al azufre de los tiosulfatos. Por simple diferencia, calcular el azufre de los sulfitos.

Para expresar los sulfitos en $\text{SO}_3 = (\text{g/l})$, multiplicar el azufre de los sulfitos expresado en $\text{S} = (\text{g/l})$ por 2,5.

Para expresar los tiosulfatos en $\text{S}_2 \text{O}_3 = (\text{g/l})$, multiplicar el azufre de los tiosulfatos expresados en $\text{S} = (\text{g/l})$ por 3,5.

DETERMINACIÓN DE LOS POLISULFUROS

La determinación se efectúa con el agua primitiva. Introducir 50 ml de agua sulfurosa en un vaso de precipitados. Añadir 10 ml de amoníaco y 20 ml de solución de nitrato de plata N/10. Completar a 100 ml con agua destilada. Tomar 50 ml de filtrado y determinar con una solución de cianuro potásico N/10 la plata residual. Deducir la plata combinada en estado de sulfuro de plata y por consiguiente el azufre que está unido a él y que corresponde al azufre del sulfuro de hidrógeno de los monos y polisulfuros.

Sea X el número de mililitros de cianuro potásico N/10 vertidos. El azufre $\text{S} =$ de los polisulfuros $(\text{g/l}) = (20 - x) \times 0,032 \times 2$.

DETERMINACIÓN DEL H_2S POR EL MÉTODO CUANTITATIVO

MATERIAL Y MÉTODO

REACTIVOS

Na_2S

H_2SO_4

$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ 0.090 M

Na_2HPO_4 4mM

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO

PREPARACIÓN ESTÁNDAR DEL H_2S

El H₂S estándar se prepara de la reacción química de 1 gr. de Na₂S con 11 ml de H₂SO₄ 0.1N en un frasco herméticamente cerrado de 100 ml. El frasco se sella de inmediato después de agregar el Na₂S, luego se inyecta el H₂SO₄ en el recipiente con mucho cuidado.

DESCRIPCIÓN DEL MÉTODO

1).- Tomar 0.01 ml, 0.1 ml, 0.3 ml, 0.7 ml y 1 ml del H₂S antes preparado (estándar) y vaciarlos en diferentes tubos de ensayo que contengan 2 ml de solución 0.09 M de Pb(CH₃COO)₂ (Merck) y sellar, lo que produce un precipitado negro de PbS. El contenido de cada frasco se filtra con papel WHATMAN 40 y se transfieren a matraces volumétricos de 250 ml y aforar. (cada punto tiene cinco réplicas).

Del contenido de cada matraz volumétrico se toman alícuotas de 100 ml y se titulan con solución de NaHPO₄ 4 nM (Merck), se mide la conductividad de cada volumen del titulante agregado con un conductímetro Copenhagen CDM80 Radiómetros (el conductímetro se calibra usando una solución de KCl como estándar, Radiómetro, con conductividades de 20 μS/cm y 100 μS/cm respectivamente a 25^a C. En cada caso particular, el punto de equivalencia se determina con la curva de titulación conductimétrica. una vez ajustada la curva por regresión lineal (Líneas rectas descendentes y ascendentes), el punto de equivalencia es la intersección entre ellos.

Para determinar la concentración final del ión Pb²⁺ después de la reacción con H₂S la cantidad de H₂S absorbido es determinado indirectamente, de acuerdo a la siguiente relación:

$$n(\text{H}_2\text{S}) = V_i (\text{Pb}^{+2}) \Delta C(\text{Pb}^{+2})$$

Donde:

$n(\text{H}_2\text{S})$ = Cantidad de sustancia de H₂S absorbido (μmol)

$V_i (\text{Pb}^{+2})$ = Volumen inicial de Pb⁺² (ml)

$\Delta C(\text{Pb}^{+2})$ = variación de la concentración de Pb⁺² (mM)

La preparación estándar será analizada por el método yodométrico propuesta por ayres.

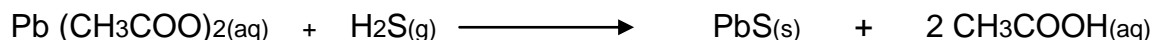
DESARROLLO DEL CULTIVO E INÓCULO

Para el análisis de producción gaseosa se utilizarán bacterias mixtas oxidadas del H₂S, cada minibioreactor debe inocularse con 2 ml del inóculo de bacterias, el medio de cultivo debe componerse por:

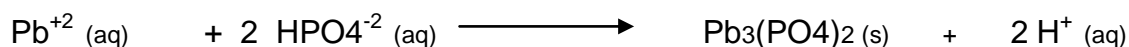
El crecimiento bacteriano será medido con la densidad óptica a 530 nm.

El análisis químico del H₂S absorbido en el colector de gas debe hacerse usando el método de conductimetría descrito arriba. Se toman 500 ml de cada determinación, se centrifuga a 10000 rpm durante 10 minutos y 300 ml del correspondiente supernadante y diluirlo a 100 ml para analizarla.

El H₂S es liberado durante el cultivo bacteriano, el cual es colectado en una solución de Pb(CH₃COO)₂ 0.09 M de la reacción.



El exeso de Pb⁺² es determinado por titulación con una solución de Na₂HPO₄ 4mM.



En este paso, el H₂S formado en el proceso fermentativo es cuantificado indirectamente.

Se evalúa la curva de titulación (curva de formación de precipitado) (Ayres, 1968), el punto de equivalencia es la intersección entre ellos.

BIBLIOGRAFIA

Brune C. Daniel, 1988. Sulfur oxidation by phototrophic bacteria. Bioquímica et Biophysica Acta(BBABIO), El Sevier . 975: 189 – 221 pp.

Pfennig N., 1981. Ecology of phototrophic purple and green sulfur bacteria. Biology, University of Konstanz, Konstanz Federal Republic of Germany, 97 – 112 pp.

Zehnder, A. J. 1988. Biology of anaerobic microorganisms. Wiley- Liss. USA. 872 pp.

Núñez-Cardona MT. 2003. Aislamiento y caracterización pigmentaria de bacterias rojas del azufre de la Laguna Tampamachoco, Veracruz. *Hidrobiológica* 13 (3): 171- 176.

Núñez-Cardona MT. 1998. Estudio de la composición de las bacterias fotosintéticas del azufre en el estero de la Mata, Tampamachoco, Veracruz.

Planctología Mexicana Boletín Informativo de la Sociedad Mexicana de Planctología A. C., 9 : 19-25.

Holt JG, NR Krieg, PHA Sneath, JT Staley and ST Williams. 1994. Anoxygenic Phototrophic Bacteria. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 9 ed. Williams y Wilking. USA. 787 p.

Madigan MT, JM Martinko and J Parker. 2000. Brock Biología de los microorganismos. 8 ed. Prentice Hall, España. pp. 635-740

Drews G and JF Imhoff. 1991. Phototrophic Purple Bacteria. In: Shively JM and LL Barton Editors. Variation in autotrophic life. Academic Press. London, New York. 51-97p.

Jorgensen. B.B., 1982. Ecology of the bacteria of the sulfur cycle with special reference to anoxic – oxic interface environments. Phil. Trans.R. Soc. Lond. B 298: 543-561 pp.

Roth, S.H., 1993. Hydrogen Sulfide. In Handbook of Hazardous Materials. New York, NY: Academic Press.

Schieder, D. P. Quicker, R. Schneider, H. Winter, S. Prechtel and M. Faulstich. 2003. Microbiological removal of hydrogen sulfide from biogas by means of a separate biofilter system: Experience with technical operation. Water Science and Technology 48(4): 259-212.