

CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE MICROORGANISMOS DEL SUELO DE UN MANANTIAL TERMAL SULFUROSO DE LA HUASTECA POTOSINA

Recibido: 09/09/ 2019

Aceptado: 26/09/2019

C.I. Cano-Gómez¹
P.Y. González-Purata²
P. Aguilar-Zárate³
F. Veana⁴

RESUMEN

Las tendencias mundiales en energías renovables han sido un acierto en el aprovechamiento de residuos orgánicos para la producción de biogás por digestión anaerobia. Desafortunadamente, se genera sulfuro de hidrógeno como producto indeseable y que ocasiona un impacto ambiental negativo. Existen métodos fisicoquímicos que ayudan a la eliminación de este compuesto, sin embargo, no son factibles económicamente. Como alternativa se encuentran los métodos biológicos con el uso de microorganismos oxidantes de azufre que eliminan el sulfuro de hidrógeno. En la huasteca potosina existe "El Taninul", una manantial termal sulfuroso cuyas comunidades microbianas no han sido exploradas y que pudieran beneficiar el área de las energías renovables. Se aisló una comunidad microbiana del suelo cercano al manantial termal sulfuroso en medio selectivo ATCC-125 usando como fuente de energía azufre elemental (10 g/L) con pH inicial de 7.0. Después se realizó una cinética de crecimiento por 45 días a 28°C con monitoreo cada tres días por conteo celular en cámara de Neubauer y medición de SO₄²⁻. Los resultados se ajustaron con la ecuación logística Verhulst-Pearl obteniendo una velocidad de crecimiento de 0.0064 h⁻¹. Finalmente se evidenció la oxidación del azufre mediante la medición de la concentración de sulfatos a los 45 días (87.62 ± 4.6 mg/L). Futuros estudios son fundamentales para la caracterización de los microorganismos oxidantes de azufre evaluados y su aplicación en el área de las energías renovables.

PALABRAS CLAVE: biogás, digestión anaerobia, energías renovables; microorganismos oxidantes de azufre, modelo logístico

ABSTRACT

Global trends in renewable energy have been a success in the use of organic waste for the production of biogas by anaerobic digestion. Unfortunately, hydrogen sulfide is generated as an undesirable product, which causes a negative environmental impact. There are physicochemical methods that help to eliminate this compound, however they are not economically feasible. As an alternative, there exists biological methods with the use of sulfur oxidizing microorganisms that eliminate hydrogen sulfide. In the Huasteca Potosina is found "El Taninul", a source of sulfurous thermal water whose microbial communities have not been explored and that could benefit the area of renewable energy. It was isolated a microbial community from the soil near the sulfurous thermal spring in selective medium ATCC-125 using elemental sulfur (10 g/L) as an energy source with an initial pH of 7.0. Then, a kinetics growth was carried out for 45 days at 28°C and monitored every three days by cell count in Neubauer chamber and measurement of SO₄²⁻. The data were modeled with the Verhulst-Pearl logistic equation, obtaining a growth rate of 0.0064 h⁻¹. Finally, the oxidation of sulfur was evident through sulfates concentration measured at 45 days (87.62 ± 4.6 mg/L). Future studies are fundamental for the characterization of the sulfur oxidizing microorganisms evaluated and their application in the area of renewable

¹Estudiante de la carrera de Ingeniería Ambiental. Tecnológico Nacional de México, Campus Ciudad Valles.

²Pasante de la carrera de Ingeniería Ambiental. Tecnológico Nacional de México, Campus Ciudad Valles.

³Profesor de Tiempo Completo. Tecnológico Nacional de México, Campus Ciudad Valles.

⁴Profesor de Tiempo Completo. Tecnológico Nacional de México, Campus Ciudad Valles, fabiola.veana@tecvalles.mx

energías.

KEY WORDS: biogas, anaerobic digestion, renewable energy; sulfur oxidant microorganisms, Verhulst-Pearl

INTRODUCCIÓN

Las actividades industriales son de gran importancia para el desarrollo de las ciudades, pero en consecuencia generan una problemática ambiental como la generación de residuos. Actualmente la agroindustria trabaja para el aprovechamiento de los residuos que generan durante el procesamiento de las materias primas con la finalidad de reducir el impacto ambiental. Interesantemente, el principal sustrato utilizado en la producción de bioenergía es la biomasa, la cual corresponde a la fracción de carbono contenida en residuos de la agricultura, silvicultura, industria láctea y residuos urbanos, por mencionar algunos. Los procesos bioquímicos son catalizados por enzimas y microorganismos, la biomasa se transforma en sustratos fermentables dando como resultado biocombustibles como el etanol y el biogás, así como otros productos de alto valor agregado (Poggi-Varaldo, 2014).

El biogás es de gran interés y posee gran potencial para ser usado en la generación de electricidad, transporte y de uso doméstico; se produce durante la digestión anaerobia de sustratos orgánicos, tales como estiércol, lodos de aguas residuales, residuos orgánicos de casa, industriales y de agricultura. El biogás es una mezcla de gases metano y dióxido de carbono, incluyendo sulfuro de hidrógeno (H_2S) cercanas al 2%. Este último es necesario removerlo para obtener un biogás de alta pureza puesto que es indeseable (Wellinger *et al.* 2013; Hurtado-Hurtado & Salamanca-Carrascal, 2017). La presencia de H_2S , además de que ocasiona problemas sensoriales y es tóxico, puede corroer concreto y estructuras de acero de las plantas de biogás, dañar tuberías y bombas. Además, puede incrementar los problemas de emisiones de SO_x y es inhibidor del proceso fermentativo de generación de biogás.

Una solución es el uso de métodos biológicos, mediante el magnífico potencial de los microorganismos, el cual es amigable con el ambiente debido a que no requiere de una disposición final (Hurtado-Hurtado & Salamanca-Carrascal, 2017).

En la Huasteca Potosina existen aguas termales azufradas cuyas comunidades microbianas no han sido exploradas, tanto del agua como del suelo cercano al afluente. Al ser un ambiente rico en azufre, los microorganismos oxidantes de azufre (SOM, del inglés sulfur oxidant microorganisms) que ahí habitan pueden aportar beneficios al área de las energías renovables. Por tal motivo, el objetivo de este trabajo fue aislar microorganismos del manantial termal sulfuroso “El Taninul” y evaluar su crecimiento y oxidación de azufre.

METODOLOGÍA

Zona de muestreo y recolección de muestra

La zona de muestreo se caracteriza por ser un manantial termal sulfuroso y se denomina “El Taninul”. Esta zona se ubica en una porción de la sierra Abra-Tanchipa, en Ciudad Valles, S.L.P. El método de muestreo de suelo se basó en la norma NOM-021-RECNAT-2000 “Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudios, muestreo y análisis”. El método aplicado fue en zig-zag tomando 12 muestras en diferentes puntos con distancias entre 3 y 5 m del afluente, a una profundidad de 30 cm. Se retiraron materiales del suelo, tales como piedras, restos de maleza y plantas, entre otros. Posteriormente se realizó el muestreo compuesto mediante el método de cuarteo que consistió en homogenizar todas

las muestras y se dividieron en cuatro partes iguales, se tomaron las partes que forman la diagonal. Este procedimiento se realizó dos veces para minimizar muestras, obtener una muestra homogénea y representativa del área de estudio. Las muestras se trasladaron en hieleras al Laboratorio de Análisis de Alimentos del Tecnológico Nacional de México campus Ciudad Valles, en bolsas de plástico de 2 Kg con cierre hermético, debidamente etiquetadas y en condiciones de anaerobiosis generada por BD GasPak™ EZ Anaerobe Container System.

Caracterización físico-química del suelo

La temperatura del suelo se determinó *in situ* con apoyo de un pHmetro portátil (Oakton EcoTestr™ pH2+ Pocket). El pH se determinó de acuerdo con el método AS-02 de la NOM-021-RECNAT-2000. Para tal fin, se pesaron 10 gramos de suelo en un frasco de vidrio, se adicionaron 20 mL de agua destilada, se agitaron durante 5 minutos y se dejó reposar durante 30 minutos para la formación del extracto de saturación (parte superior). En seguida se calibró el potenciómetro (Oakton PC2700) y se midió el pH del extracto de saturación. Finalmente, los sulfatos se midieron en el extracto de saturación de acuerdo con el método AS-20 de la NOM-021-RECNAT-2000 usando como estándar K_2SO_4 . Las absorbancias se midieron a 340 nm en el espectrofotómetro Thermo Scientific™ Espectrofotómetro de UV Vis GENESYS™ 10S. La concentración de sulfatos se expresó en mg/L y las determinaciones se realizaron por triplicado.

Aislamiento de microorganismos

Para obtener el paquete celular de la muestra de suelo se tomó 1 gramo de este y se añadió a un tubo de ensaye con 9 mL de medio ATCC-125 sin azufre elemental (S^0 elemental), se mezcló y se centrifugó a 1500 rpm durante 10 minutos para lograr la separación de los microorganismos. Se realizaron dos lavados del botón celular con 10 mL de medio ATCC-125 sin S^0 elemental a 6000 rpm durante 10 minutos. En seguida se transfirieron a un matraz Erlenmeyer 250 mL previamente esterilizado y se añadieron 40 mL del medio ATCC-125 y S^0 elemental a una concentración de 10 g/L. El matraz se incubó a 28°C durante dos meses con agitación moderada para la homogenización del azufre elemental, el cual es insoluble en agua.

Cinética de crecimiento

La curva de crecimiento se preparó tomando el contenido del matraz anterior (50 mL de cultivo) para centrifugarlo a 6000 rpm durante 15 minutos con el objetivo de recuperar el botón celular. Los sobrenadantes se observaron al microscopio para observar que no se haya generado arrastre celular. Después de dos lavados, el botón celular se resuspendió en 6 mL de medio ATCC-125 sin S^0 elemental y se distribuyó en 2 matraces que contenían 27 mL de medio ATCC-125 y S^0 elemental (10 g/L). Se monitoreó el crecimiento de la comunidad SOM por 45 días, monitoreando el crecimiento cada tres días por conteo en cámara de Neubauer y medición de SO_4^{2-} . El crecimiento (biomasa) de la comunidad de SOM se expresó en cel/mL.

Oxidación de azufre por la comunidad SOM

La oxidación de azufre al inicio y al final de la cinética de crecimiento se determinó usando el procedimiento de la norma NMX-AA-074-SCFI-2014. Se realizó una curva de calibración usando como estándar Na₂SO₄. Las absorbancias se leyeron a 420 nm en el espectrofotómetro Thermo Scientific™ Espectrofotómetro de UV Vis GENESYS™ 10S. La concentración de azufre se expresó en mg/L. Las determinaciones se realizaron por triplicado.

Modelado de la cinética de crecimiento

Se aplicó la ecuación Verlhust-Pearl (Aguilar-Zárte et al., 2018) para modelar el proceso.

$$\frac{dX}{dt} = \mu \left[1 - \frac{X}{X_{max}} \right] X$$

Donde μ es el crecimiento específico máximo y X_{max} (crecimiento máximo en mm) es el valor de equilibrio para X donde $dX/dt=0$. La solución a la ecuación anterior se presenta en seguida:

$$X(t) = \frac{X_{max}}{1 - ((X_{ma} - X_0)/X_0)e^{-\mu t}}$$

Donde X_0 se refiere al valor de X cuando $t=0$. Los valores del error al cuadrado fueron minimizados considerando los valores de X_0 , X_{max} y μ .

Se utilizó como apoyo para ajuste del modelo la herramienta *solver* Excel, Microsoft 2016. Se consideraron los resultados de 0 a 33 días (792 h) de crecimiento para la aplicación de la ecuación. El resultado de la tasa específica de crecimiento se expresó como $\mu=h^{-1}$

RESULTADOS

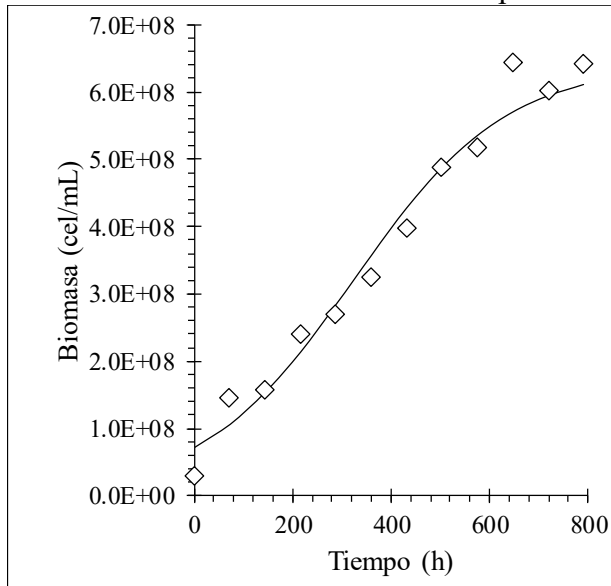
El pH del suelo cercano al afluyente de las aguas termales sulfurosas de “El Taninul”, San Luis Potosí, México es alcalino (8.1 ± 0.2) y la temperatura es de 28°C. Estas condiciones son propicias para encontrar Gammaproteobacterias, tales como aquellas del género *Beggiatoa* y *Thiothrix* con preferencias de pH entre 6.0-8.0 y temperaturas entre 25-30°C. Sin embargo, las Gammaproteobacterias se pueden desarrollar en pH amplio que oscila entre 2.0 y 10.5. Además, se pueden encontrar proteobacterias como *Thiobacillus* y arqueobacterias como *Sulfolobus* con preferencias similares (Espinosa-Márquez et al., 2010; Arellano et al., 2017). La concentración de sulfatos en el suelo es de 18.72 ± 1.3 mg/L. Durante la cinética de crecimiento de la comunidad SOM se visualizaron al microscopio en objetivo de 40X la formación de biofilms (Figura 1) y motilidad (datos no mostrados). Este acontecimiento se ha reportado para este tipo de microorganismos (Lara et al., 2012).



Figura 1 Visualización al microscopio con el objetivo de 40X durante la cinética de crecimiento de la comunidad SOM en medio ATCC-125 adicionado con S⁰ elemental.

Además, se determinó una concentración de sulfatos SO_4^{2-} de 87.62 ± 4.6 mg/L al final de la cinética de crecimiento. Dicho valor es inferior a valores reportados (Veerender *et al.*, 2015).

Lo anterior, exista SOM de la y las condiciones



probablemente a que competencia entre los comunidad en estudio del cultivo.

Figura 2. Modelado de la cinética de crecimiento de la comunidad SOM con la ecuación logística de Verhulst-Pearl

En cuanto al modelo matemático, se determinó un valor de μ de 0.0064 h^{-1} con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.95 (Figura 2). Además, se observó un valor máximo de biomasa de 6.23×10^8 cel/mL a los 33 días. La tasa específica de crecimiento de los microorganismos oxidantes de azufre es variable entre cepas y condiciones de cultivo, tales como el sustrato, temperatura de incubación, agitación, por mencionar algunas. El valor de μ obtenido en el presente trabajo está por debajo del reportado por SOM, sin embargo, es importante resaltar que son condiciones diferentes de cultivo y que es la evaluación de crecimiento de una comunidad microbiana. *Thiobacillus denitrifans* ha exhibido un valor de $\mu = 0.077 \text{ h}^{-1}$ (Vaclavkova *et al.*, 2014) y *Thiobacillus thioeparus* ATCC 23645 un valor de $\mu = 0.1625 \text{ h}^{-1}$ (Alcántara *et al.*, 2004).

CONCLUSIONES

El manantial termal sulfuroso “El Taninul” es ambiente para el crecimiento de SOM. Se logró aislar una comunidad microbiana de SOM, evaluando su crecimiento en un medio selectivo cuya fuente de energía es el S^0 elemental (10 g/L). La comunidad demostró la capacidad de oxidar azufre con un valor de 87.62 ± 4.6 mg/L. Se requieren de otros estudios que demuestren la capacidad de esta comunidad microbiana en la remoción del H_2S durante la producción de biogás.

BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara, A., Velasco, A., Revah, S., 2004, Sulfur Formation by Steady-state Continuous Cultures of a Sulfoxidizing Consortium And *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645, *Environmental Technology*, 25:10, 1151-1157. DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/09593330.2004.9619409>
- Aguilar-Zárate P., Wong-Paz J. E., Rodríguez-Duran L. V., Buenrostro-Figueroa J., Michel M., Saucedo-Castañeda G., Favela-Torres E., Ascacio-Valdés J.A., Contreras-Esquivel J.C., & Aguilar, C. N. 2018. On-line monitoring of *Aspergillus niger* GH1 growth in a bioprocess for the production of ellagic acid and ellagitannase by solid-state fermentation, *Bioresource Technology*, 247: 412–418.
- Arellano, L., Dorado, A.D., Fortuny, M., Gabriel, D., Gamisans, X., González-Sánchez, A., et al., 2017. Purificación del biogás. España: Universitat Autònoma de Barcelona.
- Espinosa-Márquez, J., Revah, S., Le Borgne, S., 2010. Rutas metabólicas de oxidación del azufre en bacterias quimiolitotróficas, relevancia ambiental y biotecnológica. *Mensaje Bioquímico*, XXXIV: 101-120.
- Hurtado-Hurtado, A. A., Salamanca-Carrascal, J. I., 2017, Búsqueda de bacterias oxidadoras de ácido sulfhídrico para su potencial uso en la producción de biogás. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Ambiental. Obtenido de <http://repository.unad.edu.co/bitstream/10596/13455/1/1031123067.pdf>
- Lara, R. H., García-Meza, J. V., Cruz, R., Valdez-Pérez, D., González, I., 2012, Influence of the sulfur species reactivity on biofilm conformation during pyrite colonization by *Acidithiobacillus thiooxidans*. *Applied microbiology and biotechnology*, 95(3), 799-809.
- NMX-AA-074-SCFI-2014. (13 de 01 de 2015). Análisis de agua - Medición del ion sulfato en aguas naturales, residuales y residuales tratadas - Método de prueba. Diario Oficial de la Federación. México Recuperado el 13 de septiembre de 2019 de <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/166149/nmx-aa-074-scfi-2014.pdf>
- NOM-021-RECNAT-2000. (31 de 12 de 2002). Especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos. Estudio, muestreo y análisis. Diario Oficial de la Federación. México Recuperado el 13 de septiembre de 2019, de <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/wo69255.pdf>
- Poggi-Varaldo, H. M., Muñoz-Paez, K. M., Escamilla-Alvarado, C., Robledo-Narváez, P. N., Ponce-Noyola, M. T., Calva-Calva, G., et al., 2014, Biohydrogen, biomethane and bioelectricity as crucial components of biorefinery of organic wastes: A review. *Waste Management & Research*, 32(5), 353–365. DOI: <https://dx.doi.org/10.1177/0734242X14529178>
- Vaclavkova, S., Schultz-Jensen, N., Jacobsen, O. S., Elberling, B., Aamand, J., 2014, Nitrate-Controlled Anaerobic Oxidation of Pyrite by *Thiobacillus* Cultures, *Geomicrobiology Journal*, 32(5), 412–419. DOI: <https://dx.doi.org/10.1080/01490451.2014.940633>

- Veerender, K. Soundararajan, D., Raghupati, S., Mathivanan, S., 2015, Comparative study of sulphur oxidizing bacteria isolated from different wastes, *International J Ext Res*, 1-7.
- Wellinger, A., Murphy, J., Baxter, D., 2013, *The Biogas Handbook: science, production and applications*. Woodhead publishing series in energy. Reino Unido: Woodhead Publishing