

MICROBIOLOGÍA DE LA PRODUCCIÓN CONTROLADA DE SULFURO DE HIDRÓGENO. UNA EXPERIENCIA DE TRABAJO EN EL LABORATORIO DE EDUCACIÓN SECUNDARIA

López Pérez, J.P.(*), J.J. Jiménez, A. Fabregat y J.A. Gutiérrez

(*) IES "Ortega y Rubio". 30170. Mula. Murcia. España

josepedro.lopez@murciaeduca.es

[Recibido en Noviembre de 2009, aceptado en Febrero de 2010]

RESUMEN

Esta comunicación muestra las directrices para lograr el éxito en la producción microbiológica de sulfuro de hidrógeno (a microescala), como experiencia en el laboratorio de educación secundaria obligatoria, el estudio de su metabolismo y las repercusiones en la depuración de aguas residuales.

Palabras clave: Microbiología; producción de sulfuro de hidrógeno; educación secundaria; clostridios; *Clostridium*.

La depuración de aguas residuales es uno de los contenidos que se imparten a lo largo de los estudios en la Educación Secundaria Obligatoria, tratándose más en detalle cuando el alumno cursa segundo de bachillerato, en materias como Ciencias de la Tierra y Medio Ambiente (Anónimo, 2007; 2008). Este apartado del temario podría completarse con una actividad de laboratorio consistente en el estudio de la línea de anaerobiosis productora de sulfuro de hidrógeno por parte de la comunidad de clostridios sulfito reductores presentes en una muestra de agua de albañal[1]. De igual modo, la actividad pretende repasar conceptos tan importantes dentro de la biología como son los ciclos biogeoquímicos (en particular, el ciclo del azufre), la dependencia microbiana por el oxígeno (microorganismos anaeróbicos estrictos, anaeróbicos facultativos y aeróbicos) y la bioquímica básica del metabolismo.

La presencia de una línea de anaerobiosis dentro de una Estación de Depuración de Aguas Residuales (EDAR) es indispensable para la captura de metales pesados (plomo, cadmio, hierro...) presentes en el efluente de entrada a la depuradora. Para ello, y como podrá comprobarse a lo largo de esta comunicación, el sulfuro de hidrógeno producido por una ambiciosa comunidad de microorganismos es capaz de combinarse con diversos cationes de metales pesados, tóxicos, los cuales podrían dañar seriamente los siguientes tratamientos y líneas de procesamiento del agua residual, sobre todo los dependientes de microorganismos capaces de eliminar los contaminantes y el exceso de materia orgánica presentes en la masa de agua (fangos activados).

Para lograr el objetivo principal previsto con esta experiencia, el alumnado elaborará un medio de cultivo para los microorganismos de interés, cuya composición en gramos por litro de agua de grifo es la siguiente: 10 gramos de triptona (que pueden sustituirse por una pastilla de concentrado de carne); 0.5 gramos de sulfito de sodio; 0.5 gramos de citrato de hierro y 15 gramos de agar. El pH del medio oscilará entre 7.1 ± 0.2 (modificación de Anónimo, 1995). Para que el agar se disuelva en el agua es preciso calentar el medio y llevarlo a ebullición. A continuación, y tomando las medidas de precaución oportunas (ya que el medio estará muy caliente), se verterán 16 ml del mismo en tubos de ensayo de 10x15 mm (aproximadamente dejando 2 cm hasta la boca). El tubo de ensayo se cubrirá con plástico film transparente, dejándolo enfriar hasta unos 45 °C (temperatura previa a la solidificación del medio de cultivo).

La muestra de agua de albañal deberá prepararse antes de su vertido en el tubo de ensayo. Los microorganismos que nos interesa estudiar, productores de sulfuro de hidrógeno, corresponden a un grupo de bacterias productoras de esporas (estructuras de resistencia), capaces de resistir temperaturas extremas de 80 °C. Para lo cual, 1 ml de agua residual se diluirá en 9 ml de agua del grifo y se someterá a esta temperatura durante 20 minutos. Durante este período de tiempo, las poblaciones microbianas morirán, quedando únicamente como formas viables las estructuras de resistencia, las esporas. *Clostridium* spp. es un género microbiano con capacidad de formar esporas cuando las condiciones del medio no son del todo favorables para el óptimo desarrollo. Además, son microorganismos anaeróbicos estrictos, con lo que debemos de proporcionarle un sistema de crecimiento con ausencia de oxígeno (tubo de ensayo tapado y medio de cultivo hasta la boca) y responsables de la reducción del anión sulfito a sulfuro mediante la presencia en su citoplasma de enzimas sulfito reductasas (Figura 1).

Se verterá 1 ml de esta muestra de agua tratada, así como diluciones pertinentes de la misma en agua de grifo, en la proporción de 1 ml de agua tratada residual y 9 ml de agua del grifo estéril mediante tindalización (López Pérez, 2009), en un tubo de

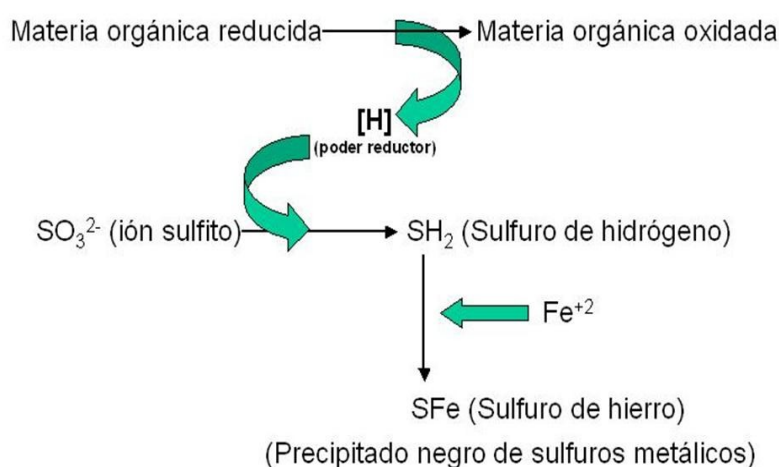


Figura 1.- Secuencia de reacciones bioquímicas que conllevan a la precipitación de sulfuros metálicos. *Clostridium* spp. es un grupo microbiano capaz de reducir el sulfito/sulfato hasta sulfuro. La presencia de cationes (Fe^{+2} , Cd^{+2} , Pb^{+2} ...) en el agua de albañal provocará la precipitación de sulfuros de metales pesados (sedimentos negros).

ensayo provisto de medio de cultivo aún licuado (temperatura del medio próximo a los 45 °C). Se volteará con cuidado, no provocando la aparición de ninguna burbuja de aire en el interior, tras cubrir con plástico film transparente y/o tapón la boca del tubo. La incubación se llevará a temperatura ambiente durante 24 y 48 horas. Durante este período de tiempo, se podrá comprobar la formación de unas esferuelas negras de sulfuro de hierro en el interior del medio de cultivo (Fig. 2B), consecuencia del desarrollo de una espora (con la consiguiente división celular) y reducción de sulfito sódico presente en el exterior celular por parte del complejo sulfito reductasa que presentan en su citoplasma (Figura 1). La combinación de este sulfuro de hidrógeno que abandona la célula con el hierro presente en el medio (citrato de hierro) es la responsable de la precipitación del sulfuro metálico, con la consiguiente detección de la colonia microbiana (Figura 1, 2B-C). Los electrones necesarios para la reducción proceden de la oxidación de la materia orgánica; contenidos en la molécula de NAD^+ (Nicotín-adenin-dinucleótico; donador-aceptor electrónico).

El desarrollo celular se produce en el interior del medio de cultivo, alejado de la superficie donde la concentración de oxígeno es importante (Figura 2B). Los clostridios sulfito reductores son microorganismos anaeróbicos estrictos. Carecen de todo un sistema de detoxificación de la molécula de oxígeno. De igual modo, no disponen de sistemas citocrómicos ni de los mecanismos de fosforilación por transporte electrónico (indicativos de un sistema aeróbico), por lo que únicamente pueden obtener energía por fosforilación a nivel de sustrato, caso de la fermentación (Madigan et al., 2004, pag. 405-406).

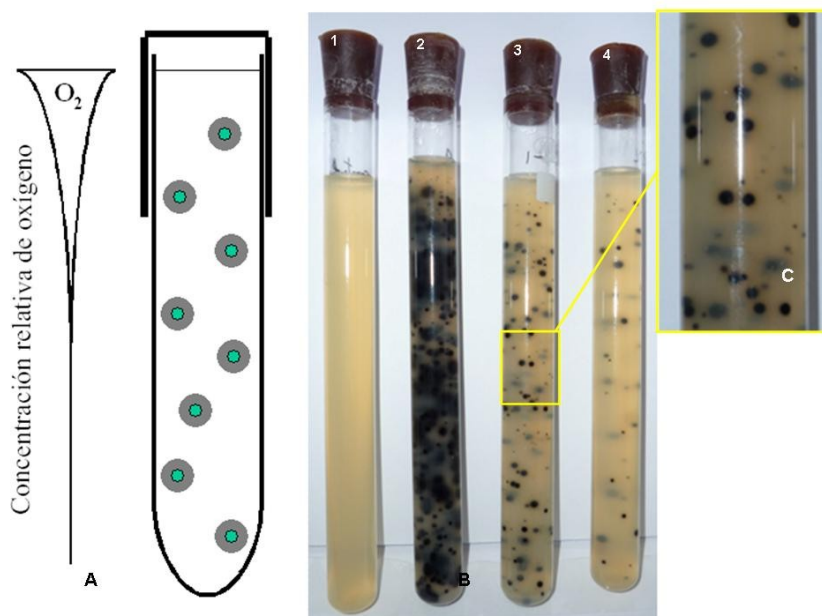


Figura 2.- (A) Esquema aproximativo de la concentración de oxígeno en tubo de ensayo provisto de medio del cultivo solidificado. (B) Recuento de clostridios sulfito reductores en una muestra de albañal. [1] Control inoculado con agua destilada. [2] Muestra original. [3 y 4] Dilución 1:10 y 1:100, respectivamente, de la muestra origen. (C) Detalle de uno de los tubos donde se denota las colonias de clostridios sulfito reductores en base a la precipitación de sulfuro de hierro.

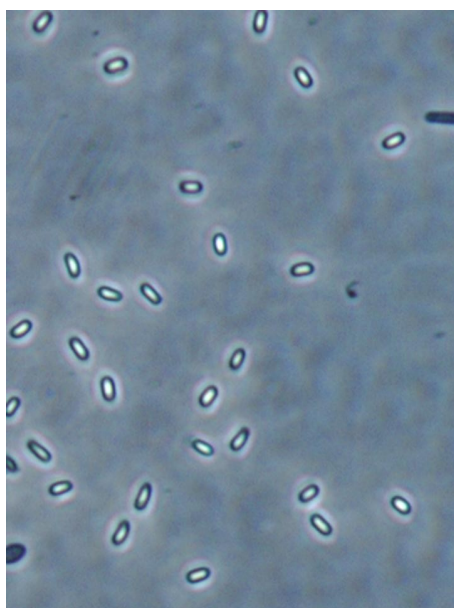


Figura 3.- Imagen al microscopio de contraste de fase de una de las esferuelas negras de crecimiento en el medio de cultivo. Puede comprobarse la refringencia de las esporas de *Clostridium* spp.

El sulfuro de hidrógeno producido es un gas tóxico, denso y muy corrosivo. La toxicidad del mismo, a nivel humano y a macroescala, puede comprobarse tras analizar las numerosas muertes que se han comunicado después de adentrarse en fosas sépticas, carentes de ventilación, y sin dispositivos de protección (mascarillas de gas y bombona de aire). El poder corrosivo se evidencia cuando se visita alguna instalación de depuración de aguas residuales por lagunaje que no ha tenido un control exhaustivo de mantenimiento: oxidación de los barrotes metálicos que protegen las lagunas, así como las arquetas de control de registro.

La experiencia también nos sirve para cuantificar las poblaciones de estos microorganismos en la masa de agua. El recuento de las esferuelas negras (multiplicado por el factor de dilución pertinente) dará una estimación muy fiable de este grupo microbiano (anaerobios sulfito-reductores), el cual está recomendado por la legislación europea y española como control de calidad de las aguas (Anónimo, 1998, 2002 y 2003).

El tiempo estimado para la realización de la explicación de esta experiencia es de 55 minutos (una clase). No obstante, el montaje, la preparación del medio de cultivo y la inoculación de la muestra requiere –al menos– de una clase previa o hacer uso del tiempo en algún descanso (recreo, tutoría...). Con ayuda de una pipeta Pasteur pueden tomarse alícuotas de las esferuelas negras y realizar observaciones de los microorganismos al microscopio óptico de campo claro o de contraste de fase, comprobándose la refringencia de las esporas de los clostridios (Figura 3).

Finalizada la experiencia y como medida básica de higiene, es aconsejable el lavado de las manos con abundante agua y jabón. El material de trabajo (tubos de ensayo con el cultivo microbiano...) debe dejarse unas horas en agua con hipoclorito de sodio, previo a su fregado escrupuloso.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Anónimo. 1995. *Detección y recuento de las esporas de microorganismos anaerobios sulfito-reductores (clostridia). Parte 1: Método por enriquecimiento en un medio líquido*. AENOR. UNE-EN 26461-1 (ISO 6461-1:1986).
- Anónimo. 1998. Directiva 98/83/CD del Consejo, de 3 de noviembre de 1998, relativa a la Calidad de las Aguas Destinadas al Consumo Humano. *Diario Oficial de las Comunidades Europeas* L330/32, de 5 de diciembre de 1998.
- Anónimo. 2002. Real Decreto 1074/2002, de 18 de octubre, por el que se regula el proceso de elaboración, circulación y comercio de las aguas de bebida envasadas. *BOE* 29 de octubre de 2002. pp. 37934-37949.

- Anónimo. 2003. Real Decreto 140/2003, de 7 de febrero, por el que se establecen los criterios sanitarios de la calidad del agua de consumo humano. *BOE* 21 de febrero de 2003. pp. 7228-7245.
- Anónimo. 2007. Real Decreto 1467/2007, de 2 de noviembre, por el que se establece la estructura del bachillerato y se fijan sus enseñanzas mínimas. *BOE* 6 de noviembre de 2007. pp. 45436-45439.
- Anónimo. 2008. Decreto 262/2008, de 5 de septiembre, por el que se establece el currículo del Bachillerato en la Comunidad Autónoma de la Región de Murcia. *BORM* 10 de septiembre de 2008. pp. 28093-28095.
- López Pérez, J.P. 2009. Microbiología básica en la Educación Secundaria Obligatoria: el lavado de las manos. *Rev. Eureka Ens. Div. Cienc.* 6 (2), pp.319-324. En línea en: <http://www.apac-eureka.org/revista/>
- Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker. 2004. *Brock: Biología de los microorganismos*. 10ª edición. Prentice Hall, Madrid.

[1] La muestra para análisis puede recogerse en una Estación Depuradora de Aguas Residuales, en barros cenagosos de acequias y lagunas estancadas o bien en la arqueta de salida de agua fecal del propio instituto.

MICROBIOLOGY OF THE HYDROGEN SULPHIDE CONTROLLED PRODUCTION. A WORK EXPERIENCE IN COMPULSORY SECONDARY EDUCATION LABORATORY

SUMMARY

This communication shows the indications to achieve the success in the hydrogen sulphide microbial production (to microscale) as experience in the compulsory secondary education laboratory, the study of its metabolism and the repercussions on sewage treatment.

Keywords: *microbiology; hydrogen sulphide production; secondary education; clostridia; Clostridium.*