

57



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

"AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE UNA BACTERIA SULFOOXIDANTE"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :
MONICA RIOS HERNANDEZ

1967

N A M
E S
RAGOZA
HUMANO EJE
ESTRA HES LEXION

MEXICO. D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

A MIS PADRES

Porque gracias a su apoyo
y consejo he llegado a
realizar una de mis más
grandes metas, la cual
constituye la herencia más
valiosa que pudiera
recibir.

A MIS HERMANOS

Ale, Oscar, Arturo y Diego
por su apoyo y ayuda que
siempre me brindaron.

A VICTOR

Gracias por el amor, buen
humor y apoyo durante un
proceso que parecía
interminable

El trabajo se realizó en el laboratorio de tratamiento de emisiones gaseosas (w-107) de la Universidad Autónoma Metropolitana - Itzapalapa, que dirige el Dr. Sergio Revah Morseev. La tesis fue dirigida por el Dr. Sergio J. Alcántara Pérez.

ÍNDICE	página
RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
ANTECEDENTES	7
1 Los contaminantes del medio ambiente	7
2 Ciclo del azufre y su relación con la contaminación de compuestos de azufre	9
3 Procesos biológicos de compuestos de azufre	15
4 Bacterias sulfooxidantes	22
5 Rutas bioquímicas	27
6 Aislamiento de microorganismos sulfooxidantes	30
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	38
OBJETIVOS	39
HIPÓTESIS DEL TRABAJO	40
MATERIAL Y MÉTODOS	41
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	48
1 Cultivo de consorcio sulfooxidante	48
2 Características de crecimiento del consorcio	49
3 Aislamiento	49
4 Identificación de la cepa	52
5 Curvas de crecimiento	52
6 Tinción	55
7 Características de crecimiento del <i>Thiobacillus</i> sp	55
8 Estudios de respirometría	58
CONCLUSIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	64

RESUMEN

Dentro de los contaminantes de importancia en el ámbito mundial, los componentes azufrados tienen gran relevancia debido al impacto ambiental adverso que provocan en la naturaleza. Su emisión al ambiente está asociada a lluvia ácida, fenómenos de corrosión, mal olor y daños a la salud debido a la toxicidad de algunos de estos compuestos. Entre los compuestos de azufre de mayor importancia que se emiten a la atmósfera se encuentran SO_2 , el $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, el H_2S , el CS_2 y los compuestos volátiles de azufre.

Para el tratamiento de emisiones de compuestos de azufre al ambiente se utilizan diferentes procesos tanto fisicoquímicos como biológicos. El proceso de interés de este trabajo ha sido el proceso biológico.

En los procesos biológicos los microorganismos que se han utilizados para la eliminación de los contaminantes por compuestos de azufre se encuentran las bacterias incoloras de azufre, estas son capaces de utilizar compuestos reducidos de azufre como fuentes de energía para su crecimiento. Los compuestos más comunes que se utilizan son el sulfuro de hidrógeno, el azufre elemental y el tiosulfato.

En este sentido la finalidad de este trabajo consistió en aislar y caracterizar un microorganismo con capacidad sulfooxidante de un consorcio que se encuentra operando en la UAM-I (en un cultivo continuo). Con el fin de aportar información básica en el aspecto microbiológico del sistema estudiado.

Se logró aislar, en medio mineral con goma gellan (1%), una bacteria gram negativa de entre 0.5 a 1 μm . De acuerdo al análisis del gen ribosomal 16S, se trata de una bacteria del género *Thiobacillus*.

Esta bacteria tiene la capacidad de oxidar compuestos reducidos de azufre como azufre elemental y tiosulfato. Se creció en diferentes fuentes de carbono como fue: glucosa, sacarosa, formiato, citrato, acetato y bicarbonato. Se midió el comportamiento del microorganismo a diferentes concentraciones de glucosa. Por sus características de crecimiento se trata de un microorganismo quimiolitótrofo y mixótrofo. Tiene mayor capacidad oxidante utilizando CO_2 como única fuente de carbono.

La cepa aislada y el consorcio tienen el mismo comportamiento sobre la oxidación del tiosulfato a diferentes pH. Siendo el pH 6.5 el óptimo. La velocidad máxima de oxidación fue de 18 $\text{mg O}_2/\text{g proteína min}$ y una K_m de 1 mM, mientras que para el consorcio una velocidad máxima de 68 $\text{mg O}_2/\text{g proteína min}$ y una K_m de 2 mM. En concentraciones arriba de 25 g/l del ion sulfato afecta negativamente la oxidación del tiosulfato en aproximadamente un 40%, tanto para el consorcio como para el *Thiobacillus* sp.

Comparando los resultados de los estudios de respirometría del consorcio y el *Thiobacillus* sp se puede confirmar que el microorganismo es representativo del consorcio sulfooxidante.

INTRODUCCION

La investigación científica para el control y prevención de la contaminación, de acuerdo a varios reportes (Hill, 1997a, Monticello y Finnerty, 1985), señala que la producción y uso de energía son la mayor fuente de contaminación de los ecosistemas. Esto como consecuencia del empleo, en dispositivos inadecuados, de los combustibles fósiles y sus derivados. De acuerdo a Hill (1997a) en Estados Unidos aproximadamente el 85 % de la energía utilizada proviene de estos combustibles.

Entre las fuentes de contaminantes se pueden distinguir a) los naturales como la proveniente de volcanes, incendios forestales; y b) los no naturales divididos en dos tipos los móviles como los vehículos automotores y los fijos como el proveniente de industrias, oficinas y hogares entre otros.

Dentro de los contaminantes de importancia en el ámbito mundial, los compuestos azufrados tienen gran relevancia debido al impacto ambiental adverso que provocan en la naturaleza. Su emisión al ambiente está asociada a: la lluvia ácida, fenómenos de corrosión, mal olor y daños a la salud debido a la toxicidad de algunos de estos compuestos (Manion, 1992, McEldowney y col. 1993). Janssen (1996) afirma que la emisión global de azufre a la atmósfera es de alrededor de 200 millones de toneladas por año.

En la actualidad el enfoque para resolver los problemas de contaminación se ha modificado y los procesos fisicoquímicos en uso, con altos consumos de energía y generación de contaminantes secundarios, empiezan a tener un complemento y alternativa en los procesos biotecnológicos, particularmente en concentraciones de contaminantes, donde los procesos fisicoquímicos son ineficientes. Estos procesos han cobrado cada vez mayor interés y la investigación desarrollada ha sido aplicada a procesos industriales con resultados exitosos. Por ejemplo, en el país se desarrolló y patentó un proceso biológico para eliminar ácido sulfhídrico y bisulfuro de carbono provenientes de una industria de fabricación de rayón y celofán con una capacidad para tratar hasta 700 m³/min de aire contaminado (Torres y col., 1993). Actualmente se desarrolla un proceso biológico para tratar efluentes de refinería contaminados con sulfuro (Revah y col. no publicado).

En el laboratorio en donde se desarrolló el trabajo, la investigación de la eliminación biológica de compuestos reducidos de azufre se integró en tres etapas. (a) la investigación básica, (b) el trabajo de ingeniería y el desarrollo de equipo a nivel laboratorio y planta piloto y (c) la aplicación a gran escala. La dinámica de trabajo del laboratorio, para el tratamiento de emisiones gaseosas de la UAM-I, en donde fue realizado el proyecto de investigación, permite una interacción en los tres niveles mencionados. El propósito ha sido incrementar el conocimiento de la fisiología y metabolismo microbiano, formación

de biopelícula y técnicas microbiológicas de los microorganismos sulfoxidantes, (b) el diseño de equipo que permita la oxidación parcial de los compuestos reducidos de azufre de interés, y (c) su aplicación a nivel industrial, e.g. en la industria del petróleo para el tratamiento de "aguas amargas".

En este sentido la finalidad de este trabajo consistió en aislar y caracterizar microorganismos con capacidad sulfooxidante. Con el fin de aportar información básica en el aspecto microbiológico del sistema estudiado, así como un mayor entendimiento de la fisiología de los microorganismos que utilizan como fuente de energía a los compuestos reducidos de azufre

ANTECEDENTES

1. Los contaminantes del medio ambiente

La EPA (Environmental Protection Agency) define un contaminante como cualquier sustancia (sólida, líquida o gaseosa) introducida en el ambiente que afecta adversamente un recurso natural (Hill, 1997b). El mismo organismo señala que en Estados Unidos se invierten anualmente (1997) 140 billones de dólares para el control y la eliminación de contaminantes. Pronostican que dicha cantidad se incrementará a 160 billones de dólares por año, 2.8 % del producto interno bruto, para el 2000. Estos datos son interesantes ya que señalan la importancia que en el próximo milenio tendrá la investigación en el área de contaminación, e.g. prevención, regeneración, eliminación y por otro lado, su impacto en términos económicos. En nuestro país, si bien no existen datos al respecto, basta señalar que al área de investigación se destina el 0.3 % del PIB.

Una clasificación de contaminantes, en inorgánicos y orgánicos, se da en Tabla 1.1. Si bien se han establecido diferentes formas de clasificación, cualquiera de ellas es adecuada y sirve como marco de referencia para el estudio de la problemática ambiental y normatividad sobre generación de contaminantes. Por otro lado, el hecho de que en cada país se promulgue una legislación ambiental de acuerdo a su criterio hace que las definiciones e intervalos de emisión de contaminantes no sean unívocas. Aunque muchas veces se tomen los criterios internacionales, a falta de investigación en los países menos desarrollados, como punto de referencia para la creación de una legislación lo más apropiada posible.

1.2 Los contaminantes del aire

Los contaminantes atmosféricos de interés en nuestro país, para evaluar la calidad de aire (Quadri, S., 1992, SGEyPA, 1992) están divididos en

Tabla 1.1 Grupos de contaminantes

Grupos	Orgánicos o inorgánicos
<u>Orgánicos</u>	
PCBs, hidrocarburos, pesticidas	

Inorgánicos

Sales, nitrato, metales

Las sales y el nitrato son inorgánicos, pero los metales pueden existir como contaminantes organometálicos (e.g. metilmercurio, pirita en el carbón)

Ácidos

Sulfúrico, sulfhídrico, nítrico

Los ejemplos mencionados son ácidos inorgánicos. Los ácidos orgánicos se producen en pequeñas cantidades.

Partículas

Suelos, cenizas

Tanto los suelos como las cenizas tienen una composición variable de componentes orgánicos e inorgánicos.

Radiológicos

Radón, radio, uranio

Los ejemplos son elementos inorgánicos.

Biológicos

Microorganismos patógenos

Los organismos vivos son básicamente orgánicos, pero contienen componentes inorgánicos que se presentan en los procesos de mineralización.

Fuente. Hill, 1997b

a) Contaminantes primarios que son las sustancias emitidas en forma directa por la combustión y otros procesos industriales, así como por la erosión, los incendios y otros fenómenos naturales, entre estos se encuentran:

- Partículas suspendidas totales
- Plomo
- Monóxido de Carbono
- Oxidos de azufre
- Hidrocarburos

b) Contaminantes secundarios que son las sustancias que se producen en la atmósfera como resultado de reacciones fotoquímicas entre contaminantes primarios, principalmente entre los óxidos de nitrógeno y los hidrocarburos, entre estos se encuentran:

- El ozono, otros oxidantes fotoquímicos

De acuerdo a la SEDUE (1980-90), los niveles máximos permitidos de los contaminantes se muestran en la Tabla (1.2)

Tabla 1.2. Criterios de evaluación de la calidad del aire

Contaminante	Criterio (norma)
Monóxido de Carbono	13 ppm en 8 h
Bióxido de azufre	0.13 ppm en 24 h
Bióxido de nitrógeno	0.21 ppm en 1 h
Ozono	0.11 ppm en 1 h
Partículas menores a 10 μ m *	150 μ g/m ³ en 24 h
Plomo *	1.5 μ g/m ³ (promedio de 3 meses)

SEDUE, 1989-90,

* Criterio internacional

2. El ciclo de azufre y su relación con la contaminación de compuestos de azufre

El azufre se encuentra en la naturaleza en diferentes estados de oxidación, por lo tanto formando diferentes compuestos que se intercambian por procesos químicos o biológicos de oxidación-reducción, constituyendo un ciclo denominado ciclo biogeoquímico del azufre (Takasuwa, 1992; Robertson y Kuenen, 1991). Una utilidad del término esta relacionada con la medición de la cantidad de azufre, en todas sus formas tanto de fuentes naturales como antropogénicas, que se encuentra en la naturaleza (Mackenzie, 1995).

Debido a la variedad de estados de oxidación del azufre, sus transformaciones son complejas. En la Figura 1 se presenta un esquema que muestra las transformaciones biológicas que corresponden al ciclo biológico del azufre. En este ciclo, aunque son posibles varios estados de oxidación, tres de ellos tienen, por su estabilidad, una mayor importancia en la naturaleza -2 (sulfhidruro R-SH y sulfuro HS⁻), 0 (azufre elemental, S⁰) y +6 (sulfato)



Figura 1. Ciclo biológico del azufre

Asimismo, en el ciclo se pueden distinguir dos etapas de acuerdo al tipo de reacciones de oxido-reducción que intervienen en el mismo

- i una etapa reductiva
- ii una etapa oxidativa

i. Etapa reductiva En los procesos biológicos se encuentran dos formas bioquímicas de reducción de los compuestos de azufre inorgánicos la reducción asimilativa y la reducción desasimilativa. La primera la presentan tanto eucariotes como procariotes y en ésta, el sulfato es reducido a sulfuro (H_2S) para la biosíntesis de compuestos que contienen azufre necesarios para el crecimiento celular. La reducción desasimilativa la presentan principalmente los procariotes y en ella el sulfato es reducido a sulfuro por microorganismos sulfato reductores en condiciones anóxicas, donde el sulfato es utilizado como aceptor último de electrones. Esta reducción está acoplada con la oxidación de varios ácidos grasos volátiles, lactato y piruvato que generan ATP y poder reductor necesarios para el crecimiento celular.

ii. Etapa oxidativa La segunda etapa del ciclo la constituyen las reacciones de oxidación de los compuestos reducidos de azufre. De igual manera, esta etapa puede dividirse en dos: las reacciones de oxidación en condiciones anaerobias efectuados por microorganismos fototrofos (Cork y col. 1983) y facultativos (Sublette, 1987) y la oxidación aerobia por

microorganismos del género *Thiobacillus* (Alcántara y col. 1999, Kelly, 1990, 1982, Buisman y col, 1989)

1.1 Importancia del ciclo de azufre

La importancia del ciclo del azufre se inscribe con relación a los siguientes aspectos

- 1) Los seres vivos
- 2) La industria (económico)
- 3) La contaminación ambiental

Los seres vivos necesitan de azufre para su metabolismo celular, ya que existen compuestos de la célula que contienen este elemento. Se ha encontrado que 1% del peso de las bacterias es azufre (Lee y col., 1995) y lo pueden incorporar por una reacción de reducción asimilativa del sulfato.

Por su parte, la industria química tiene una gran demanda de azufre elemental para producir ácido sulfúrico el cual es un importante producto para la síntesis de muchos compuestos orgánicos e inorgánicos. Steudel (1996) señala que durante los últimos cinco años la producción mundial de ácido sulfúrico fue de entre 133 y 152 millones de toneladas por año.

El azufre elemental excede la producción anual de 34 millones de toneladas. Los dos procesos básicos de obtención de este elemento es el proceso Claus, que convierte H_2S de refineries y de plantas endulzadoras de gas en azufre elemental y el proceso Frasch que se utiliza para extraer el azufre de los depósitos naturales (Steudel, 1996).

Como se señaló en el apartado 1.1, el deterioro ambiental debido a las emisiones antropogénicas de compuestos que contienen azufre orgánico e inorgánico provoca lluvia ácida, toxicidad, corrosión y mal olor (McEldowney y col. 1993, Manion, 1992).

1.2 Contaminación con compuestos de azufre

Entre los compuestos de azufre de mayor importancia que se emiten a la atmósfera se encuentran el SO_2 , el $S_2O_3^{2-}$, el H_2S , el CS_2 y los compuestos orgánicos volátiles de azufre. La forma como se emiten y otras características de estos compuestos se explican a continuación.

1.2.1 Oxidos de azufre

El dióxido de azufre (SO_2) y el trióxido de azufre (SO_3) junto con sus ácidos correspondientes y sus sales en macropartículas son contaminantes frecuentes en las atmósferas urbanas industriales. Estos compuestos, contribuyen a incrementar los problemas de partículas respirables y de visibilidad por medio de la formación de sulfato y la aglomeración con otros gases y partículas con los que interactúan. Asimismo, actúan como precursores en la formación de la lluvia ácida a través de reacciones químicas en la atmósfera (Mackenzie 1995, Betthelheim y Billinge, 1983, Bailey y col., 1978).

De los óxidos de azufre, el SO_2 es la emisión industrial de mayor importancia del grupo de compuestos contaminantes que contienen azufre y se ha estimado que cerca del 90% de la emisión total de SO_2 hecha por el hombre, proviene de la utilización de combustibles fósiles (Janssen, 1996). Por ejemplo, se ha estimado que las industrias que generan electricidad quemando carbón o derivados del petróleo son responsables de más del 50% del total de la emisión de SO_2 . Esta emisión varía considerablemente de acuerdo con la naturaleza y origen del combustible, ya que su contenido de azufre generalmente varía de 0.1 a más del 5%. Así, una termoeléctrica de carbón para generar 100 MW requiere alrededor de 9000 toneladas por día de combustible y en caso de que este contenga 2% de azufre se generarán 360 toneladas diarias de SO_2 . Este compuesto no es inflamable y es perceptible en concentraciones menores a 0.1 ppm. Por encima de 0.3 ppm se puede detectar por el sabor y a niveles de 1 ppm produce una sensación fuerte de malestar en la nariz. También se emiten cantidades considerables de estos compuestos en los procesos de transformación de plomo y zinc, producción de ácido sulfúrico, así como en algunos procesos de refinación del petróleo. Por otra parte el ácido sulfhídrico (H_2S) emitido por algunos procesos de degradación biológica y procesos industriales se oxida en el aire produciendo SO_2 (Perero, 1996, Warner, 1980, Bailey y col., 1978).

1.2.2 Ácido sulfhídrico (H_2S)

El H_2S se emite al ambiente por un gran número de industrias como la petroquímica, tanerías, producción de viscosa y celofán, como resultado del tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato, de la extracción de gas natural y es un intermediario de la oxidación biológica de CS_2 (Groenestijn y col., 1998; Revah y col., 1995, Torres y col., 1993, Buisman y col., 1989, Sublette y col., 1987). Sus propiedades corrosivas están relacionadas con el daño a paredes de concreto de los reactores, sistemas de drenaje, y tuberías de acero, su emisión al ambiente además de su toxicidad genera olores desagradable y lluvia ácida. Su característico olor a huevo-podrido es perceptible en aire

fresco en diluciones de 1 ppm de aire. En la Tabla 1.3 se muestran los niveles de toxicidad del ácido sulfhídrico y sus efectos sobre la salud. Es de destacar las bajas concentraciones en que el compuesto es tóxico.

Tabla 1.3 Niveles de toxicidad del H₂S y su efecto en la salud

Concentración de H ₂ S	Efecto
1 ppm	Mal olor (olor a huevo podrido)
10 ppm	Máxima exposición permitida en áreas de trabajo por 8h
20 ppm	Se requiere de equipo de protección
100 ppm	Puede causar dolor de cabeza y náusea, pérdida del sentido del olfato de 2 - 15 min.
200 ppm	Rápida pérdida del sentido del olfato, ardor de ojos y tráquea
500 ppm	Pérdida de equilibrio y de razonamiento, insuficiencia respiratoria en 200 min
700 ppm	Inconciencia inmediata, sin un tratamiento adecuado paro respiratorio y muerte.

Janssen A.,
(1996)

Por ejemplo, en el caso del gas natural, este debe contener niveles aceptables de sustancias tóxicas antes de su distribución y venta. Se ha establecido que este producto destinado al mercado de combustibles debe contener no más de 0.18 M de H₂S bajo condiciones estándar de 101.3 kPa y 0 °C. De acuerdo a Sublette (1987) el problema más común de esta industria es la eliminación y manejo del H₂S, por los problemas de corrosión debido al contacto con hierro y acero en tanques, tuberías, válvulas y bombas. Para resolver este problema, este autor propone la utilización de un sistema biológico de oxidación con *Thiobacillus denitrificans* (Sublette, 1987).

1.2.3 Tiosulfato

El tiosulfato (S₂O₃²⁻) es un anión metaestable que tiende a su descomposición química en

soluciones acuosas. Las soluciones diluidas del compuesto, 0.01 M o menores, se descomponen más rápidamente que las soluciones concentradas, 0.1 M o mayores. Junto con otros compuestos de azufre el tiosulfato es altamente "agresivo" por los problemas de corrosión asociados al mismo. El tiosulfato se utiliza en la industria de la fotografía, en la industria del papel y en la industria farmacéutica. Por lo tanto se encuentra como contaminante en las aguas de desecho de estas industrias. La industria del petróleo, de acuerdo a Khana y col. (1996), también emite como contaminante a este compuesto. Es claro que por sí mismo el tiosulfato no es un factor de deterioro ambiental sin embargo, sus productos de la oxidación biológica o química (SO_4^{2-}), o bien su reducción biológica en condiciones anaerobias (H_2S) tienen fuerte impacto ambiental (Suzuky, 1999, Dhawale, 1993).

1.2.4 Compuestos orgánicos volátiles de azufre

Además de las formas inorgánicas de azufre, existe un amplio conjunto de compuestos orgánicos de azufre que son sintetizados por los seres vivos, y que también desempeñan un papel en el ciclo biogeoquímico del azufre. El compuesto orgánico de azufre más abundante en la naturaleza es el dimetil sulfuro ($\text{H}_3\text{C-S-CH}_3$), el cual se origina principalmente en ambientes marinos como producto de la degradación de propionato de dimetil sulfonato, que es uno de los principales osmoreguladores de las algas marinas. La producción de este compuesto es muy abundante y se producen más de 45 millones de toneladas anuales. El dimetil sulfuro que se difunde en la atmósfera experimenta una oxidación fotoquímica que produce ácido metanosulfónico (CH_3SO_3^-), SO_2 y SO_4^{2-} . Existen muchos otros compuestos de azufre orgánicos entre los que se pueden señalar el metanotiol (CH_3SH), el dimetildisulfuro ($\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_3$) y el bisulfuro de carbono (CS_2) (Madigan y col., 1999).

La descomposición de los aminoácidos que contienen azufre, metionina y cisteína, de la materia orgánica en descomposición produce los compuestos orgánicos de azufre volátiles. Estos compuestos tienen particular relevancia por su mal olor en los procesos anaerobios de tratamiento de desechos de la bio-industria (Smet y Van Lagenhobe, 1998). Entre los compuestos que se han identificado se encuentran el metanotiol (descomposición de cebada), el dimetil sulfuro (descomposición de vegetales), dimetilpolisulfuros (Me_2S_x , putrefacción) y el bisulfuro de carbono (CS_2 , hortalizas con compuestos de azufre, aromáticas).

Por otro lado, el bisulfuro de carbono también es un compuesto azufrado de importancia industrial. Este compuesto se utiliza en la fabricación de viscosa (precursor de rayón y

esponjas) y celofán así como en la producción de fertilizantes. Se ha reportado que en la industria de viscosa y celofán se emiten a la atmósfera concentraciones del compuesto de hasta 4000 ppm (Estrada, 1998).

3. Procesos biológicos de eliminación de compuestos azufrados

Para el tratamiento de emisiones de compuestos de azufre al ambiente se utilizan diferentes procesos tanto físicoquímicos como biológicos. En el caso del H_2S el proceso comercial más utilizado para eliminar este ácido del gas natural y otras corrientes de aire contaminado con el compuesto es el proceso con aminas (Jensen y Webb, 1995; Sublette, 1987). En este proceso, después de contactar el gas con la solución, el solvente de amina es calentado entre 90 y 150 °C para liberar el H_2S . Después el solvente se regenera con el fin de reutilizarlo. El sulfuro de hidrógeno es después incinerado o convertido en azufre elemental por el proceso Claus o Stretford (Nagl, 1997).

En general los procesos físicoquímicos requieren de altos flujos de energía. Sin embargo, no es este elemento el único factor que se considera para su aplicación o sustitución por un proceso biológico. Entre los factores que se pueden considerar pueden citarse el costo, la concentración de contaminante y la factibilidad biológica.

Si se cuenta con los organismos vivos que puedan oxidar los compuestos de azufre de interés, entonces queda a consideración el costo de su aplicación. En este sentido, se ha observado que en bajas concentraciones de contaminantes los procesos biológicos presentan ventaja económica y de eficiencia de eliminación (Groenestijn y Hesselink, 1993). Un ejemplo lo reporta Buisman (1998) donde se compara los costos del tratamiento de SO_x con tres técnicas, 2 físicoquímicas y una tecnología biológica denominada Thiopaq, la cual utiliza microorganismos del género *Thiobacillus* en el proceso. El "biotratamiento" presenta ventajas económicas hasta las concentraciones de 3500 ppm sobre los tratamientos físicoquímicos.

Los procesos biológicos de tratamiento de efluentes con compuestos de azufre tienen una aplicación diversificada. Se han utilizado en el tratamiento de corrientes acuosas contaminadas con sulfuros, sulfatos y tiosulfato. También de corrientes de aire contaminadas con sulfuro, bisulfuro y compuestos orgánicos volátiles de azufre (VOCS).

En el caso del tratamiento de gases contaminados (incluido el "biogas" proveniente del tratamiento de aguas contaminadas con sulfato, sulfuro, bisulfuro y VOCS) los sistemas que se han utilizado son principalmente biofiltros y biolavadores de lecho escurrido (BLE) (Tabla 1.7). Una revisión de estas técnicas, sus límites de operación y su aplicación fue

hecha por Groenestijn y Hesselink (1993). Asimismo, Torres (1999), revisó los conceptos básicos de funcionamiento y operación de estos sistemas, especialmente de los biolavadores de lecho escurrido para el tratamiento de CS_2 y H_2S en corrientes gaseosas.

Por otro lado, en corrientes acuosas contaminadas con compuestos de azufre reducidos se han implementan diversos tipos de reactores completamente agitados (Buisman, 1987, Janssen, 1995) y de lecho fluidizado (Gommers y col 1988a), así como otros diseños de reactor para optimizar la recuperación de azufre elemental (Janssen, 1997)

3.1 Métodos biológicos de eliminación de compuestos reducidos de azufre

Los métodos biológicos utilizados en la eliminación de los compuestos reducidos de azufre se pueden clasificar de la siguiente forma (Alcántara y col., 1999, Buisman, 1989, Jensen y Webb, 1995, Janssen y col., 1997)

- oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas.
- oxidación anaerobia por microorganismos desnitrificantes
- oxidación por un proceso químico-biológico
- oxidación aerobia por bacterias incoloras del azufre

3.1.1 Oxidación por bacterias "incoloras" del azufre

La eliminación del H_2S puede ser llevada a cabo mediante un proceso de oxidación aerobia por los microorganismos sulfoxidantes conocidos como bacterias "incoloras" del azufre, los cuales utilizan la oxidación de compuestos reducidos de azufre para obtener energía. A este grupo pertenecen microorganismos de una gran diversidad fisiológica y morfológica. Los géneros que pertenecen a este grupo de organismos son *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*, *Thiovulum*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thiospira* y *Thioploca*

Un factor importante a considerar del proceso a desarrollar es si estas bacterias almacenan o no el azufre de la oxidación parcial de los compuestos reducidos de azufre dentro de la célula. Especies del género *Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Thiospira* acumulan el azufre producido en la célula, consecuentemente dificultan cualquier proceso ya que por una parte deberá de producirse una gran cantidad de biomasa para ser eliminada y el azufre no puede fácilmente separarse de la biomasa. Por esta razón las bacterias son seleccionadas con la característica de que el azufre producido sea excretado al medio, un ejemplo son los microorganismos del género *Thiobacillus*

No se necesitan factores ambientales especiales para el crecimiento de este género de

microorganismos. Diferentes especies tienen actividad en intervalos de pH que van de 0.5 a 10 con temperaturas entre 20 y 75 °C. La mayoría son autotófitas, pero también pueden crecer heterotófitamente. Se encuentran en diferentes ambientes: suelo, agua, desechos ácidos y aguas sulfurosas. Estos microorganismos pueden obtener energía de diferentes compuestos como el H₂S, CS₂, tiocianato, azufre elemental, tiosulfato, politionatos y sulfito. El producto final de la oxidación es sulfato, pero el azufre y los politionatos se acumulan bajo ciertas condiciones de crecimiento.

Buisman y Col. (1989) desarrollaron un proceso biotecnológico para la eliminación de H₂S utilizando microorganismos del género *Thiobacillus*. El proceso está basado en la oxidación del H₂S y su conversión en azufre elemental, el cual puede ser recuperado por sedimentación. Encontraron que el azufre elemental y el sulfato son los principales productos de la oxidación biológica del H₂S. Utilizaron dos reactores con agitación y alimentación continua de igual construcción variando exclusivamente el volumen y las cantidades de partículas de soporte inerte (poliuretano) para los microorganismos. La etapa de arranque de este sistema biológico fue muy corta, sólo son necesarios cuatro días para reducir la concentración de sulfuro de 100 a 2 mg/l con un tiempo de residencia de 22 minutos. Evaluaron algunos factores ambientales reportando los siguientes datos: el pH óptimo se encontró de 8.0 a 8.5; la temperatura en el intervalo de 25 a 35 °C. No se observó inhibición por H₂S a concentraciones superiores de 100 mg/l del ácido. Reportaron también que al incrementar la concentración del oxígeno las velocidades de oxidación del H₂S se incrementaron proporcionalmente, reportando que a una concentración de 3 mg/l de O₂ y a un pH de 8.5 la capacidad de eliminación del H₂S fue de 99 mg/l h con una eficiencia del 95%.

Buisman y col. (1990) estudiaron el efecto de diversos factores sobre el cultivo con la finalidad de determinar su importancia en la optimización de la producción de azufre. Los factores evaluados fueron la concentración de oxígeno, la concentración de H₂S y la utilización de un sistema con partículas de soporte de los microorganismos. Los resultados mostraron que en el reactor las concentraciones de H₂S mayores a 10 mg/ml generan, por la oxidación biológica, menos de 10% de sulfatos cuando la concentración de O₂ permanece por debajo de 6 mg/l. Suponen que, o bien el H₂S resulta inhibitorio o tóxico para los microorganismos sulfooxidantes o que el H₂S es preferido por las bacterias como donador de electrones al azufre elemental. Señalan además que la influencia de la concentración del oxígeno es insignificante cuando la concentración de H₂S excede los 20 mg/ml. Sin embargo, a concentraciones menores de 20 mg/ml, la producción de sulfato se incrementa cuando se incrementa la concentración de oxígeno de 3 a 9 mg/l.

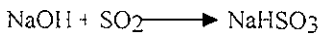
Por último reportan que el reactor con una suspensión de células libres, bajo las mismas

condiciones de cultivo que aquella con partículas de soporte de los microorganismos, la producción de sulfatos fue menor. La diferencia entre ambos sistemas la explican debida a las diferencias en el transporte de los reactantes y posiblemente también de los productos de la oxidación. Tanto el oxígeno como el sulfhídrico, que son los dos factores que más afectan la formación de sulfatos encuentran problemas de difusión en el material de soporte utilizado (partículas de poliuretano).

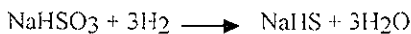
Buisman y Col (1994), reportaron un proceso biológico para la desulfuración de gas de combustión (SO_2), a nivel planta piloto y con proyecciones a su aplicación industrial en una termoeléctrica con capacidad de producción de 600 MW. El proceso consta de cuatro secciones, en ese orden:

- una sección de absorción del SO_2
- un reactor biológico anaerobio
- un reactor biológico aerobio
- una sección de recuperación de azufre

En la sección de absorción el SO_2 es solubilizado en una corriente acuosa básica produciéndose una solución rica en sulfito, de acuerdo a la siguiente reacción:



En el primer bioreactor, en condiciones anaerobias, se lleva a cabo un proceso de reducción del SO_3 con la formación de H_2S de acuerdo a la siguiente reacción (en esta etapa es necesario adicionar determinados compuestos que sirvan como donadores de electrones, básicamente compuestos orgánicos como etanol, los cuales son transformados en bióxido de carbono y biomasa)



En el segundo bioreactor, en condiciones aerobias, el ácido sulfhídrico es oxidado, bajo condiciones controladas, a azufre elemental utilizando los microorganismos del género *Thiobacillus*. Se lleva a cabo una oxidación parcial del ácido controlando las cantidades de oxígeno suministrado, ya que su oxidación total resultaría en la formación no deseable de sulfato. Esta oxidación se presenta de acuerdo a la siguiente reacción:



En la última etapa el azufre elemental, insoluble, se recupera del efluente del segundo bioreactor mediante un equipo de sedimentación

Los autores observaron que los parámetros de mayor importancia a ser controlados son: a) el pH del líquido de lavado del gas de combustión (sección de absorción) antes de entrar al primer reactor, b) el oxígeno disuelto en el reactor aerobio para lograr una oxidación parcial del sulfhídrico y recuperar azufre elemental

En una fase inicial se trataron 1500 m³/h de gas de combustión, reportándose eficiencias de eliminación de SO₂ del 95% y de H₂S del 99% con recuperación de azufre de un 95%

Cho y col (1991) encontraron que una bacteria heterotrófica aislada (*Xanthomonas sp.* DY44) fue capaz de oxidar H₂S. Dado que *Xanthomonas sp.* DY44 no tuvo un crecimiento autotrófico con H₂S en medio mineral, concluyeron que la oxidación del H₂S no es consecuencia de una actividad quimio litotrófica. Se detectaron polisulfuros como producto de la oxidación.

Lizama y Sankey (1993) utilizaron *Thiobacillus thiooxidans* para estudiar la conversión de sulfuro de hidrógeno (H₂S) a azufre elemental y sulfato en una columna usando un flujo de gas a contracorriente y medio líquido. La conversión inicial de azufre fue mucho más rápida que la subsecuente oxidación a sulfato. La velocidad de eliminación de H₂S aumentó con el incremento del área superficial disponible y con el tiempo. El número de bacterias aumentó muy lentamente, teniendo una gran importancia la concentración inicial de bacterias en la columna. En ambos modos de operación *Thiobacillus thiooxidans* es capaz de remover H₂S de la corriente gaseosa. La velocidad total de formación de sulfatos fue cuatro veces más lenta que la oxidación parcial de H₂S con la acumulación de azufre en el sistema.

Sam y col (1993) estudiaron el papel de las propiedades de la superficie en la adhesión de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre minerales como la pirita. Señalan que existen dos mecanismos responsables de la biodisolución de sulfuros metálicos, el indirecto y el directo. El mecanismo indirecto opera por la acción química del sulfato férrico producido por el metabolismo bacteriano. En este mecanismo no se requiere la adhesión de la bacteria a la superficie del mineral. El mecanismo directo, por otro lado, comprende el ataque enzimático, por lo tanto, se requiere del contacto y la adhesión. Después de que la bacteria entra en contacto con el mineral, las enzimas presentes en la membrana exterior llevan a cabo la disolución del mineral. La adhesión de la bacteria depende no sólo de las propiedades bioquímicas del organismo sino también de las propiedades interfaciales correspondientes a varias interfases existentes en un sistema de biolixiviación. Las propiedades superficiales de las bacterias que afectan la adhesión son la hidrofobicidad de

la superficie celular y el potencial electrocinético

Cho y col (1995) compararon la capacidad de dos cepas para oxidar H_2S , *Thiobacillus denitrificans* (cepa F) y un consorcio (LACT-10) aislado de aguas "amargas". Se caracterizó el consorcio con respecto a la oxidación de H_2S , respuesta al oxígeno, pH, temperatura y tolerancia al sulfuro. El consorcio mostró ser estrictamente aerobio y crecer en H_2S como fuente de energía con la oxidación completa a sulfatos. El consorcio LACT-10 presentó tanto ventajas como desventajas respecto a la cepa F para la remediación del agua amarga. Por ser LACT-10 estrictamente aerobia (no creció bajo condiciones anaerobias) su uso está limitado para ambientes con suficiente oxígeno o que pueden ser aireados eficientemente. La cepa F puede ser utilizada en ambientes anóxicos con nitrato como aceptor final de electrones. Bajo condiciones aeróbicas, LACT-10 ofrece la ventaja de una temperatura más alta (35 C) y un intervalo de pH más amplio (3.5-10) con respecto a la cepa F (30 C y pH 6-8.8). Tanto LACT-10 (3.1 mM) y *Thiobacillus denitrificans* cepa F (2.5 mM) tienen una tolerancia al sulfuro comparable y mayor que la cepa de *Thiobacillus denitrificans* (0.1-0.2 mM).

Degorce-Dumas y col. (1997) estudiaron la oxidación biológica de sulfuro de hidrógeno en un biofiltro empacado con sedimento de aguas residuales seco (BSE), caracterizaron la microbiología del biofiltro y estudiaron los efectos de algunos parámetros sobre la colonización y sobre la eficiencia del biofiltro. El efecto de la acidificación (causada por la acumulación de los productos de oxidación) también fue estudiado. Finalmente, la población microbiológica de los biofiltros utilizando turba y lodo activado como soporte fueron comparadas, así como su eficiencia de eliminación. La eficiencia de eliminación de H_2S del biofiltro puede ser correlacionada con la población inicial y su evolución. Los estudios concernientes a la evolución de thiobacilli en el biofiltro mostraron que los autótrofos no acidófilos son capaces de multiplicarse dependiendo de la velocidad volumétrica de carga. La velocidad de oxidación decrece cuando ocurre la acidificación del empaque, seguido por la multiplicación de autótrofos acidófilos. Amortiguando el pH del empaque cercano a un pH neutro se duplica el periodo de alta eficiencia (95%). Bajo estas condiciones se favorece el crecimiento de thiobacilli no acidófilos, sugiriendo la correlación entre la eficiencia de eliminación y la presencia de bacterias no acidófilas. La baja eficiencia de los biofiltros convencionales empacados (materna orgánica, por ejemplo turba) comparado con BSE, se puede explicar por su baja población inicial. La biomasa requiere de 2-4 semanas para adaptarse a las condiciones de operación. Sin embargo, el BSE contiene más nutrientes disponibles para el crecimiento microbiano, por lo tanto, su adición no es necesaria. La eficiencia de remoción completa fue obtenida en el intervalo de 2-3 kg H_2S m⁻³d, con azufre elemental y sulfato como productos principales. La

heterogeneidad del empaque es útil para varias aplicaciones industriales, por ejemplo, para el tratamiento de corrientes gaseosas que contengan compuestos azufrados, mercaptanos ó VOC's

Konishi y col (1994) estudiaron la cinética de la oxidación de azufre elemental por *Thiobacillus ferrooxidans* en un reactor lote midiendo la concentración de células adsorbidas a la superficie del azufre, la concentración de células en el medio líquido y la cantidad de azufre oxidado. Como el azufre elemental fue oxidado a sulfatos, la concentración de células libres en la fase líquida aumentó con respecto al tiempo, mientras que la concentración de células adsorbidas por unidad de peso tienen un valor límite. Durante la oxidación de azufre hubo una correlación cercana entre la concentración de las células adsorbidas y libres, estos datos fueron correlacionados con un modelo cinético de crecimiento y oxidación relacionados a la adsorción de células (isoterma de Langmuir). Las velocidades observadas del crecimiento por lotes y la oxidación de azufre elemental fueron consistentes con el modelo cinético, asumiendo que la velocidad de crecimiento de las bacterias adsorbidas es proporcional al producto de la concentración de células adsorbidas y la fracción de sitios de adsorción desocupados por las células. Los parámetros cinéticos y estequiométricos que aparecen en el modelo fueron evaluados usando datos experimentales. La concentración de células adsorbidas está relacionada con la concentración de células libres, aunque la isoterma de Langmuir demostrara que la adsorción bacteriana estaba en equilibrio durante la oxidación de azufre. Las velocidades de crecimiento y oxidación de azufre observadas fueron cuantitativamente explicadas por el modelo cinético. Los parámetros cinéticos fueron $\mu_A = 1.6 \text{ d}^{-1}$ y $Y_A = 6.25 \times 10^{14} \text{ cél./Kg SO}_4$

Revah y Col (1995) y Torres y col. (1993) describieron un proceso biológico de eliminación de CS_2 y H_2S de un gas proveniente de la fabricación de celofán y rayón con la conversión a azufre y sulfato. Utilizaron una población mixta de microorganismos aislados de fuentes azufradas y plantas de tratamiento de aguas residuales, enriquecida por inoculaciones sucesivas. Esta población mixta de microorganismos contenía bacterias del género *Thiobacillus*. Las concentraciones de los compuestos azufrados llegaron hasta 1000 ppm de cada uno, alcanzado una eficiencia del 98% de eliminación del H_2S y mayor a 80% de CS_2 . Los estudios en condiciones aerobias permitieron diseñar y construir equipos hasta de $800 \text{ m}^3/\text{min}$ y que llevan operando varios años.

Recientemente se reportan nuevas configuraciones de equipos que permiten tratar altas concentraciones (hasta 2500 ppmv) de H_2S en aire. Se propuso (Hugler y col., 1999) que dos biolavadores de lecho escurrido (BLE) en serie permiten mantener altas tasas de reacción facilitando el control de la oxidación. Bajo estas condiciones en donde se solubiliza el H_2S del aire existe una alta conversión hacia sulfato. Otras configuraciones de

BLE permiten tratar olores de plantas de tratamiento de aguas. Estas corrientes tienen concentraciones muy diluidas de H_2S , otros sulfuros, COVs y compuestos nitrogenados. Las configuraciones del BLE han sido estudiadas por Lobo y col. (1999) en donde se pone en relieve el efecto de los fenómenos de transferencia gas-líquido y reacción.

4. Bacterias sulfoxidantes

4.1 Bacterias "incoloras" del azufre

El nombre "bacterias incoloras del azufre" ha sido usado desde Winogradsky para designar a los procariotes capaces de utilizar compuestos reducidos de azufre como fuente de energía para su crecimiento (Madigan y col., 1999, Robertson y Kuenen, 1991). Los compuestos más comunes que se utilizan son el sulfuro de hidrógeno, el azufre elemental y el tiosulfato. En condiciones adecuadas de crecimiento el producto final de la oxidación es el sulfato, sin embargo en el caso del sulfuro y del tiosulfato, bajo ciertas condiciones de cultivo, es posible observar azufre elemental como producto de la oxidación parcial de estos compuestos. El adjetivo "incoloras" se utiliza debido a la falta de fotopigmentos en estas bacterias, aunque en cultivos con suficiente crecimiento celular se observa un color rosa o café debido a su alto contenido de citocromos.

Existe una gran diversidad de bacterias sulfoxidantes con muy diferentes propiedades morfológicas, fisiológicas y ecológicas y de igual manera diversos requerimientos ambientales para su crecimiento. En la Tabla 1.5 se enlistan algunos géneros de estos microorganismos, la fuente de energía que utilizan, así como el intervalo de pH en el cual crecen.

Tabla 1.5 Bacterias quimiolitótrofas oxidantes de azufre, fuente de energía y pH de crecimiento.

Género y Especie	Donador de electrones litotrófico	pH para crecimiento
<u>Crecimiento deficiente en medios orgánicos</u>		
<i>Thiobacillus thioparvus</i>	H_2S , S^0 , $S_2O_3^{2-}$	6-8
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	H_2S , S^0 , $S_2O_3^{2-}$	6-8
<i>Thiobacillus neapolitanus</i>	H_2S , S^0 , $S_2O_3^{2-}$	6-8
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	S^0	2-5

<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	S ⁰ , H ₂ S, Fe ²⁺ , sulfuros metálicos	1-5-4
<u>Crecimiento en medios orgánicos</u>		
<i>Thiobacillus novellus</i>	S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiobacillus intermedius</i>	S ₂ O ₃ ²⁻	3-7
<u>Litótrofos filamentosos</u>		
<i>Beggiatoa</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiothrix</i>	H ₂ S	6-8
Otros géneros		
<i>Thiomicrospira</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiosphera</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂	
<i>Thermothrix</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₂ ³⁻	6.5-7.5
<i>Thiovolum</i>	H ₂ S, S ⁰	6-8
<i>Acidhamis</i>	S ⁰	1-5
<i>Sulfolobus</i>	H ₂ S, S ⁰	1-4

Madigan y col (1999)

La mayor parte de los conocimientos fisiológicos de estos microorganismos proviene del estudio de un número limitado de géneros. Los thiobacilli, son los más estudiados debido a que pueden cultivarse fácilmente en el laboratorio. Su estudio ha permitido entender de manera más detallada y precisa las rutas bioquímicas de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre.

Los thiobacilli son microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, Gram-negativas con forma de bacilos pequeños que miden 0.3 µm de ancho por 1-3 µm de largo, móviles por un flagelo polar sencillo, no son formadoras de esporas y crecen entre los 25-35 °C. La energía necesaria para llevar a cabo sus funciones se deriva de la oxidación de uno o más compuestos reducidos de azufre incluyendo sulfuro, tiosulfato, azufre elemental, sulfito, tiocianato y politionatos. Algunas especies son capaces de vivir en ambientes altamente ácidos, pueden utilizar el hierro como una fuente de energía y algunas son capaces de llevar a cabo la desnitrificación y utilizar al nitrato como último aceptor de electrones.

Los estudios de crecimiento en medios sintéticos ha permitido identificar diversas fuentes de carbono que son utilizadas por estos microorganismos. Esto permitió establecer dos

clases de microorganismos de acuerdo a su capacidad de crecimiento en fuentes orgánicas de carbono. Estas son:

1. Quimiolitótrofos obligados

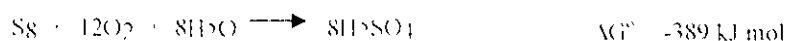
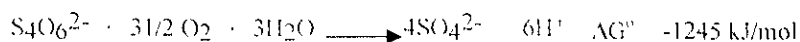
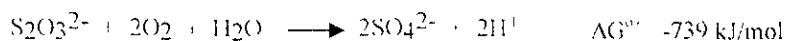
Son bacterias altamente especializadas, que requieren una fuente inorgánica como fuente de energía y obtienen su carbono a partir de fijar CO_2 por el ciclo de Calvin. Utilizan para ello el flujo inverso de electrones para la generación de poder reductor (NADPH).

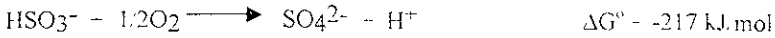
2. Quimiolitótrofos facultativos.

Estos microorganismos crecen adecuadamente con una fuente inorgánica de energía y CO_2 , o bien heterotróficamente con compuestos orgánicos que proveen de carbono mientras los compuestos inorgánicos proveen de electrones para la generación de energía (mixotrofia). Aunque también se ha observado que pueden utilizar simultáneamente dos o más vías metabólicas para la utilización de la energía y del carbono, perdiendo en algunos casos la capacidad quimiolitótrofa (Prosser, 1989).

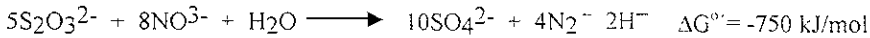
4.2 Energía de oxidación de compuestos reducidos de azufre

Una considerable variedad de microorganismos conservan energía de las oxidaciones quimiolitótróficas (Tabla 15). Los mejor estudiados son las especies de thiobacilli, pero existe información sobre el crecimiento de *Thiomicrospira*, *Sulfolobus*, *Beggiota*, algunos fotótrofos oxidantes de tiosulfato incluyendo a *Thiocapsa* y *Chromatium* y algunos heterótrofos oxidantes de hidrógeno incluyendo a *Paracoccus denitrificans*, los cuales pueden crecer autotróficamente en la oscuridad cuando se utilizan como sustrato los compuestos reducidos de azufre. Esto indica una unidad bioquímica respiratoria básica, en la cual se presenta una gran diversidad de sistemas enzimáticos oxidantes de azufre por medio de los cuales estas bacterias son capaces de generar electrones y obtener energía de crecimiento. Las oxidaciones mejor estudiadas son (Kelly, 1990)





Algunos thiobacilli y hyphomicrobia metilótrofos capaces de derivar energía quimiolitótrofa de la oxidación de azufre inorgánico, son también capaces de oxidar el azufre de sulfuros metilados. Asimismo en condiciones anaerobias, algunos thiobacilli y *Thiomicrospira denitrificans* pueden acoplar la oxidación de azufre inorgánico por la completa o parcial reducción de nitrato a nitrógeno molecular (Robertson y Kuenen, 1991)



4.3 Estructura celular de los thiobacilli

La estructura de la envoltura celular de las bacterias gram-negativas, el caso de los thiobacilli, está más diferenciada que la de las gram-positivas ya que cuentan con una membrana extra alrededor de la capa de peptidoglicanos. Una diferenciación de sistemas de membrana similar se observa en células animales las cuales contienen, en adición a la membrana citoplásmica, una membrana lisosomal, una membrana mitocondrial, retículo endoplásmico y una membrana nuclear. La función de la membrana externa es, en parte, muy similar a aquella de la membrana lisosomal de eucariotes. Los lisosomas de los eucariotes son organelos rodeados por una membrana simple y es llamada "bolsa suicida" ya que contiene enzimas hidrolíticas, fosfatasas, glicosidasas, nucleasas, proteasas y lipasas, capaces de hidrolizar toda clase de componentes que entran en la célula. Estas enzimas son usadas para digerir toda materia extraña que entra en la célula, tales como bacterias (Alberts y col., 1994). Las bacterias también necesitan esta clase de enzimas hidrolíticas para utilizar los nutrientes necesarios para su crecimiento. Sin embargo, ya que las bacterias no contienen lisosomas, estas enzimas se deben mantener separadas de los otros componentes celulares para prevenir su propia digestión. Las bacterias gram-positivas simplemente excretan estas enzimas fuera de la célula, mientras las bacterias gram-negativas elaboran dentro de la célula estas enzimas en el espacio situado entre la membrana externa y la membrana citoplásmica. Este espacio es llamado el espacio periplásmico y tiene un papel vital en el crecimiento celular y puede representar entre el 20 y 40 % de la masa celular (Ferguson, 1991).

La función de la membrana externa es confinar las enzimas periplásmicas y las estructuras proteicas del periplasma (proteínas de transporte, de fosforilación oxidativa, etc.) Al

mismo tiempo, la membrana externa provee canales específicos y no específicos para aquellos nutrientes y iones requeridos para el crecimiento, los cuales son transportados por difusión pasiva ya que todos los sistemas de transporte activo de nutrientes están localizados en la membrana citoplásmica. Por otro lado, la membrana externa también sirve como una barrera selectiva del exterior de la célula lo que permite a las bacterias gram-negativas tener una mayor resistencia que las gram-positivas a ciertas enzimas, químicos y antibióticos (Inouye, 1982)

Los principales componentes de la membrana externa son lipopolisacáridos, y se encuentran exclusivamente en esta membrana, que además de prevenir la entrada de ciertos compuestos desempeñan un papel importante en la interacción con el ambiente de la célula

4.4. El periplasma: sitio de oxidaciones quimiolitotróficas

Como se mencionó, los *thiobacilli* son bacterias gram negativas que poseen una región denominada periplasma como parte de su envoltura celular. El periplasma está situado entre la membrana citoplásmica y la membrana externa de la célula, mide aproximadamente 65 Å, y puede representar 20 % del volumen celular. El periplasma se presenta como una fase gel que contiene peptidoglicanos y es ahí donde se localizan numerosas proteínas del transporte de electrones. La mayoría de los citocromos c se encuentran en el periplasma. Los otros citocromos (b, a, aa₃ y otras oxidasas) así como otros acarreadores de electrones y protones y las enzimas como la ATPasa están localizadas en la membrana citoplásmica. La reducción de oxígeno y la síntesis de ATP toma lugar sobre la superficie interna de la membrana citoplásmica en función del movimiento de electrones y protones a través de la membrana (Kelly, 1990; Hooper y DiSpirito, 1985; Volkmar, B. 1978)

Muchos de los sistemas enzimáticos para la oxidación de sustratos inorgánicos por quimiolitótrofos están localizados en el lado periplásmico de la membrana citoplásmica. Esto se ha propuesto como un principio general en bacterias que generan gradientes de protones de la oxidación de sustratos simples, incluyendo compuestos de un átomo de carbono (CO). El sistema multienzimático de la oxidación de tiosulfato de *Thiobacillus versutus* (*Paracoccus versutus*) se ha localizado completamente en el periplasma (Kelly, 1997)

4.5 Sistema de transporte de electrones en *Thiobacillus*

Los *thiobacilli* quimiolitotróficos (obligados o facultativos) contienen todos los componentes del transporte de electrones necesarios para enlazar el NAD(P) al oxígeno to

compuestos oxidados de nitrógeno, como en el caso de *Thiobacillus* A2 y *Thiobacillus denitrificans*, ya que su metabolismo endógeno básico es similar al de cualquier otra bacteria. En el sistema de transporte de electrones de los thiobacilli se ha encontrado que las oxidaciones del azufre no reducen directamente el NAD y que la reducción del NAD requiere de un flujo de electrones dependiente de energía, desde los citocromos hasta el NAD.

Hasta ahora, se ha observado que los electrones de las oxidaciones de azufre entran a la cadena respiratoria a nivel de citocromo c en los thiobacilli aerobios, pero en *Thiobacillus denitrificans* entran a nivel de la flavina o del citocromo b. Estos datos señalan que posiblemente por cada par de electrones transportados, existen dos sitios para el acoplamiento de la síntesis de ATP en *Thiobacillus denitrificans* y solamente uno para los thiobacilli aerobios. Esto sugiere que el crecimiento es mayor para el primero que para los segundos de hecho, *Thiobacillus denitrificans* tiene mayores rendimientos de crecimiento, tanto aerobia como anaerobicamente, que cualquiera de los thiobacilli aerobios estudiados hasta la fecha (Kelly, 1982).

Del sistema de transporte de electrones del metabolismo de tiosulfato en *Thiobacillus denitrificans* se pueden resaltar los siguientes puntos de acuerdo a Kelly (1982)

- a) Observaciones con inhibidores del transporte de electrones y mediciones directas de la reducción de citocromos indican que la reducción de nitrato se da por una reductasa dependiente de sulfito, con flujo de electrones a través de la flavina, quinona y citocromo b hasta un citocromo c554, mientras que la oxidación de sulfuro (hacia el poliazufre unido a membrana) está enlazado al citocromo c vía citocromo c551, de nitrato reductasa, no ha sido establecido un mecanismo para el transporte de electrones durante la oxidación de poliazufre a sulfito
- b) La nitrato reductasa puede transferir alternativamente electrones al oxígeno.
- c) Se ha propuesto que la ATP sulfurilasa, más que la ADP sulfurilasa, es la enzima terminal de la ruta

5. Rutas Bioquímicas de la Oxidación de Compuestos Reducidos de Azufre

La complejidad y el número de reacciones involucradas en las transformaciones químicas y biológicas de los compuestos de azufre hace complejo el estudio de las reacciones bioquímicas llevadas a cabo por los microorganismos para la oxidación biológica de estos compuestos. Kelly y col. (1997) sostienen que posiblemente existen 2 procesos básicos de

oxidación de compuestos reducidos de azufre (azufre, sulfuro y tiosulfato) Estos son los siguientes

- i) Un mecanismo que involucra la formación de politionatos, presente en todos los thiobacilli que son quimiolitotróficos obligados y otros thiobacilli 'verdaderos' como *Thiobacillus acidophilus*.
- ii) Un mecanismo que no involucra la formación de politionatos observado en *Paracoccus* spp. '*Thiobacillus versutus*' y posiblemente *Thiobacillus novellus* y *Thiobacillus tepidarius*. Es probable que la ruta encontrada en *Paracoccus* prevalezca en los heterótrofos facultativos (mixotróficos) tales como *Paracoccus sp*, el cual es capaz de crecer autotróficamente sobre tiosulfato.

A continuación se presentan las rutas bioquímicas de la oxidación de sulfuro (H_2S), CS_2 , S^0 , $S_2O_3^{2-}$ y SO_3^{2-} por thiobacilli (Figura 2), que son uno de los sistemas más estudiados y donde algunas enzimas de la oxidación se han caracterizado parcialmente. (Suzuki, 1999, Kelly, 1997, 1990, 1982, Kuenen y col., 1993; Takakuwa, 1992, Kuenen y Robertson, 1991; Hooper y DiSpirito, 1985).

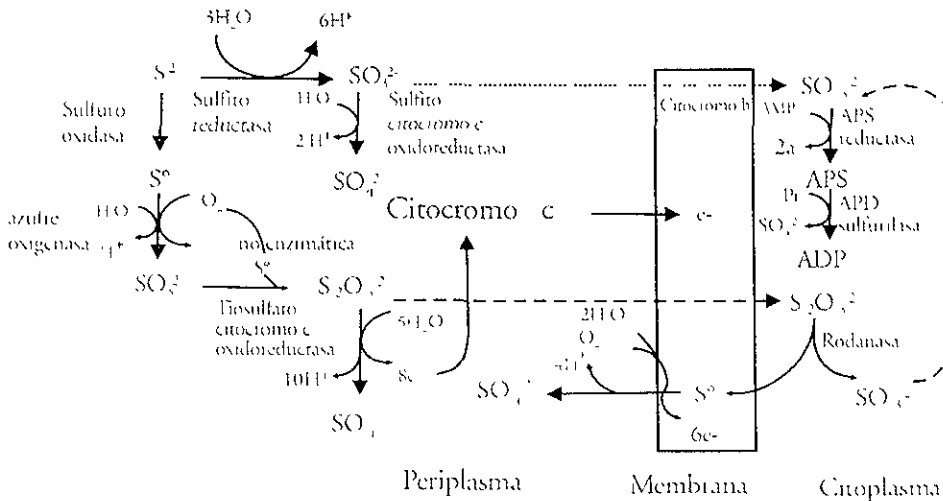
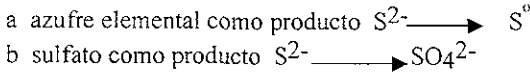


Figura 2. Arreglo de las enzimas involucradas en la oxidación de compuestos de azufre reducidos. El esquema está compuesto de las reacciones catalizadas por diferentes especies de thiobacilli (Hooper y DiSpirito, 1985)

5.1 Sulfuro

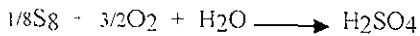
Sobre la base de la formación del producto final, las diferentes vías reportadas para la oxidación de sulfuros se pueden dividir en 2 tipos de reacción



El primer tipo de reacción se presenta en algunas especies de *Thiobacillus* y en bacterias fotosintéticas. La posibilidad que la oxidación de H_2S en los thiobacilli, se presente extracitoplásmicamente, lo ha sugerido Hooper y DiSpirito (1985), dado que se observa la precipitación de azufre elemental en el medio de crecimiento. Takakuwa (1992) reporta que la sulfuro oxidasa en estos microorganismos se localiza en la fracción de membrana.

5.2 Azufre

En los thiobacilli el azufre elemental se oxida a sulfato por vía del sulfito.



Los primeros estudios al respecto sugerían que el tiosulfato o los politionatos eran los productos finales o intermediarios de la oxidación, sin embargo actualmente se conoce que estos compuestos son el resultado de las reacciones químicas entre el azufre y un intermediario como el sulfito. Para la oxidación del azufre es necesario el contacto directo entre las células y las partículas sólidas de azufre. Estudio de microscopía electrónica han revelado que las células de *Thiobacillus thiooxidans* se adhieren a la superficie de los gránulos de azufre presentes en el medio antes de ser oxidados (Takakuwa y col., 1979). El mecanismo de adhesión involucra a grupos tioles de la envoltura celular. Los agentes que inhiben dicha adhesión (como el bisulfuro de carbono) provocan la pérdida o la disminución de la oxidación del azufre. El proceso es dependiente de energía y exhibe dependencia del pH del medio de cultivo (Baldensperger y col., 1974).

5.3 Tiosulfato

Las enzimas periplásmicas involucradas específicamente en la oxidación de tiosulfato por *Paracoccus versutus* (enzima A, enzima B, citocromo c551, citocromo c552, citocromo c552.5 y oxidoreductasa sulfito citocromo c) también han sido llamadas sistema multienzimático oxidante de tiosulfato o TOMS (por sus siglas en inglés). El TOMS

permite a *Paracoccus versutus* crecer autotróficamente con compuestos como el tiosulfato o sulfito como única fuente de energía. Este sistema ha sido caracterizado bioquímicamente lo que ha permitido aclarar el sistema de oxidación de tiosulfato (Kelly, 1997).

6. Aislamiento de microorganismos sulfooxidantes

Un cultivo que contiene solamente una clase de microorganismos se conoce como un cultivo puro. Un cultivo que contiene más de una clase de microorganismos se conoce como cultivo mixto o consorcio.

Los cultivos puros son normalmente obtenidos por aislamiento individual de células en diluciones en tubos o siembra por estría en placa. Son usadas técnicas asépticas para mantener aislado al microorganismo y poder estudiar sus propiedades.

Las bacterias sulfooxidantes han sido aisladas y cultivadas de lugares donde existe la presencia de composiciones de azufre inorgánico, hierro, sulfuro de hidrógeno, por ejemplo en sedimentos de ríos, canales, manantiales ácidos, desague de minas entre otros lugares.

Los trabajos que se han realizado para aislar bacterias sulfooxidantes han sido los siguientes:

Kuonen & Tuovinen (1991) han reportado que toda las bacterias pertenecientes al género *Thiobacillus* tienen requerimientos muy similares para las sales inorgánicas. La mayor parte de las formulaciones de medios, se han basado en la solución de elementos traza de Vishniac y Santer (1957). Todos los procedimientos de enriquecimiento para los quimioolitótrofos están basados en las propiedades quimioolitótrofas y la habilidad para crecer autotróficamente. La adición de compuestos orgánicos en teoría favorecen el crecimiento de quimioolitótrofos facultativos o quimioolitótrofos heterótrofos o ambos. En la práctica los medios de enriquecimiento de medios inorgánicos puros dan obligadamente organismos quimioolitótrofos. Los microorganismos quimioolitótrofos sulfooxidantes se purifican por siembra por estría en agar con tiosulfato o azufre. Se han aislado a partir de los cultivos de enriquecimiento en agar de tiosulfato y por subsecuente aislamiento y prueba para su capacidad heterotrofica. Uno de los problemas más comunes para obtener cultivos puros de quimioolitótrofos es la extrema persistencia con que los contaminantes

heterótrofos pueden permanecer asociados con las colonias quimiolitótrofas en placas de agar (Taylor, Hoare y Hoare, 1971) Debido a la presencia de trazas de material soluble orgánico y también a que los quimiolitótrofos excretan compuestos orgánicos

Las características morfológicas de las colonias de *Thiobacillus* son tan similares que tienen poco valor en la identificación de cultivos puros. La completa oxidación de los compuestos de azufre a sulfatos es común para todas las oxidaciones de compuestos de azufre. De ahí la habilidad de producir ácido sulfúrico, la cual baja la concentración de tiosulfato y además el pH del medio, los cuales son unos de los criterios que se usan para la identificación de quimiolitótrofos sulfooxidantes

Los quimioorganotróficos (heterótrofos) son capaces de oxidar parcialmente compuestos inorgánicos de azufre frecuentemente incrementando el pH del medio, por ejemplo por oxidación de tiosulfato o tetrationato De aquí que la falta de producción de ácido no es un criterio para la diferenciación entre el quimiolitótrofo y el quimioorganotrófico oxidante del azufre

El tiosulfato se usa comúnmente como sustrato para hacer crecer a los sulfooxidantes porque es menos tóxico, fácilmente soluble y estable a los rangos de pH que se emplean para los *Thiobacillus*. La degradación química del tiosulfato permite la formación de azufre coloidal, el cual se aumenta en medio ácido, dependiendo de la composición iónica.

A continuación se muestran en la tabla 2 algunos de los medios minerales reportados por Kuenen y col para el aislamiento de algunos *Thiobacillus*

Tabla 2. Formulaciones de medios minerales para el aislamiento de algunos *Thiobacillus*

Thiobacillus	Medio de cultivo	Características de crecimiento
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Medio líquido por litro KNO ₃ 2.0 g NH ₄ Cl 1.0 g KH ₂ PO ₄ 2.0 g NaHCO ₃ 2.0 g MgSO ₄ •7H ₂ O 0.8 g Na ₂ S ₂ O ₃ •5H ₂ O 5.0 g Elementos traza 1.0 ml PH 6.8 - 7.0	Microorganismo quimiolitótrofo obligado. Las células asimilan dióxido de carbono dentro del material celular y requieren azufre inorgánico como fuente de energía. Bajo condiciones anaerobias, la bacteria acopla la oxidación de compuestos de azufre a la reducción respiratoria de compuestos de nitrógeno. El enriquecimiento y aislamiento se pueden hacer selectivos usando nitrato como aceptor terminal de electrones.
<i>Thiobacillus neapolitanus</i>	Solución I (por litro): KH ₂ PO ₄ 4.0g K ₂ HPO ₄ 4.0g MgSO ₄ •7H ₂ O 0.8g NH ₄ Cl 0.4g KHCO ₃ 0.7g Na ₂ S ₂ O ₃ •5H ₂ O 10.0g Solución II, elementos traza (por litro): Na ₂ EDTA 50.0g ZnSO ₄ •7H ₂ O 2.2g CaCl ₂ •2H ₂ O 7.34g MnCl ₂ •4H ₂ O 2.5g CoCl ₂ •6H ₂ O 0.5g (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₁ •4H ₂ O 0.5g FeSO ₄ •7H ₂ O 5.0g CuSO ₄ •5H ₂ O 0.2g NaOH 11.0g PH 6.2-7.0 Adicionar 2 ml de la solución II por litro de medio de la solución I.	Microorganismo quimiolitótrofo obligado. La bacteria vive en pH cercano a la neutralidad y crece solamente en compuestos de azufre inorgánico. Asimilan compuestos orgánicos hacia el material celular, pero son incapaces de oxidarlos para energía y crecimiento.
<i>Thiobacillus novellus</i>	Medio líquido (por litro) KH ₂ PO ₄ 1.5g K ₂ HPO ₄ 4.0g MgSO ₄ •7H ₂ O 0.5g (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4g Elementos traza 10ml Na ₂ S ₂ O ₃ •5H ₂ O 10.0g PH 6.8 - 7.2 Extracto de levadura Citrato de amonio dibásico 5.0g	Microorganismo quimiolitótrofo facultativo. Crece en medio de sales minerales, en pH cercanos a la neutralidad y usa compuestos inorgánicos y orgánicos de azufre como fuente de energía y crecimiento. Crece lentamente bajo condiciones autótrofas y su crecimiento es estimulado fuertemente por los compuestos orgánicos.

<i>Thiobacillus thioparus</i>	Ver <i>Thiobacillus novellus</i> para cultivo en tiosulfato	Microorganismos quimiolitótrofos obligados. Son bacilos pequeños de $0.4 \times 1 \mu$, con motilidad. Tiene limitada capacidad para asimilar compuestos del carbono orgánico dentro del material celular, pero la generación de energía es obligadamente dependiente de la oxidación de los compuestos inorgánicos de azufre. Se diferencia del <i>Thiobacillus neapolitanus</i> por I) su habilidad de crecer anaerobicamente en presencia de nitrato el cual se convierte a nitrito II) su habilidad para crecer en tiocianato CNS^- y III) la inmediata formación de azufre en el medio de tiosulfato para <i>T. novellus</i> y <i>T. thioparus</i> .
<i>Thiobacillus intermedius</i>	Solución I (por litro): NH_4Cl 10 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 0.5 g $MgSO_4$ 0.3 g KH_2PO_4 0.4 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.02 g $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 10.0 g Crecimiento mixótrofo $Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ 10.0 g Glucosa 10.0 g Crecimiento heterótrofo Glucosa 10.0 g Cysteina o extracto de levadura Elementos traza 1 ml	Microorganismo quimiolitótrofo facultativo. Crece autótroficamente, aunque muy lentamente en medio inorgánico puro. En mezcla de tiosulfato y glucosa el crecimiento es mucho más rápido, la energía se deriva de la oxidación de tiosulfato y la glucosa es la fuente principal del carbono celular. Requiere de compuestos reducidos de azufre como fuente principal de azufre para el crecimiento. Tiene una tolerancia alta al ácido en relación a cualquier otro <i>thiobacilo</i> . Su pH óptimo para el crecimiento es 4.
<i>Thiobacillus perometabolis</i>	Para la preparación del medio ver <i>T. intermedius</i> .	Microorganismo quimiolitótrofo heterótrofo. Los compuestos inorgánicos de azufre los oxidan para el crecimiento solo en la presencia de compuestos orgánicos, tales como el extracto de levadura o el hidrolizado de caseína.

<p>Thiobacillus A2</p>	<p>Medio (por litro)</p> <p>KH_2PO_4 1.5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 7.9 g NH_4Cl 0.3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g</p> <p>Elementos traza (ver <i>Thiobacillus neapolitanus</i>) 5.0 ml</p> <p>PH 6 - 8.5</p> <p>Substratos (por litro):</p> <p>Formato de sodio 6.8 g Glucosa 3.6 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10.0 g</p>	<p>Microorganismo quimiolitótrofo facultativo. Crece bien bajo condiciones autótrofas, y también bajo condiciones mixotróficas y heterotróficas. Fisiológicamente es muy similar a <i>T. novellus</i>. Puede usar un rango muy grande de sustratos orgánicos. La diferencia más significativa entre el <i>T. novellus</i> y el A2 es la habilidad de crecer después anaeróticamente respirando nitrato, el cual es acoplado a la oxidación de los sustratos orgánicos ejemplo glucosa y acetato, pero no compuestos inorgánicos de azufre. Puede crecer autótroficamente no solamente en medios minerales de tiosulfato sino también en medios minerales de formiato. Crece en el rango de pH de 7.5-9.</p>
<p><i>Thiobacillus thiooxidans</i></p>	<p>Medio líquido (por litro)</p> <p>KH_2PO_4 3.5 g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.3 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.018 g CaCl_2 0.25 g Polvo de azufre 5 g PH 4.5</p>	<p>Microorganismos quimiolitótrofos obligados. Se encuentra en los ambientes ácidos en donde se producen grandes cantidades de ácido sulfúrico a partir de los compuestos reducidos de azufre. La bacteria tiene una notable tolerancia al ácido, superior a otras especies de thiobacillus. El crecimiento óptimo ocurre en un pH cercano a 4. El medio sólido se prepara substituyendo al tiosulfato por azufre elemental 10 g/l y usando una concentración baja de agar purificado (0.4 % p/v).</p>

Sorokin y col (1999). aislaron bacterias sulfooxidantes alcalófilas de suelos y lagos alcalinos (pH =9.5). El medio que utilizaron para inocular fue un medio líquido que contenía tiosulfato (20mM) con un pH de 10 e incubado en un agitador rotatorio a 28°C. Sigueron el desarrollo de los cultivos por el consumo del tiosulfato.

Para aislar cultivos puros de bacterias autotróficas alcalófilas sulfooxidantes se realizaron a partir de los cultivos de enriquecimiento (en donde el tiosulfato fue consumido en el medio líquido alcalino) una serie de diluciones (1.10⁻¹-1000). Las diluciones más altas que mostraron crecimiento fueron sembradas por estrías en placas de agar con tiosulfato con un pH alcalino. Las colonias las cultivaron de nuevo en medio líquido y siguieron el crecimiento por el consumo de tiosulfato antes de su resiembra en medio sólido. Para que pudieran mantener los cultivos a pH 10 o más alto fue necesario que agregaran carbonato de sodio.

Para evaluar la capacidad sulfooxidante midieron (con células lavadas) la velocidad de oxidación para varios compuestos de azufre. Esto por la desaparición de sustratos y la acumulación de productos. Además se determinó el consumo de oxígeno con un electrodo de oxígeno disuelto tipo Clarke (Yellow Spring Instr. Ohio USA). Para que evaluaran el pH óptimo de oxidación realizaron experimentos con diferentes valores de pH inicial (7 - 11) usando experimentos de respirometría.

Los métodos analíticos que utilizaron para medir la biomasa fue por su contenido de proteína con el método de Lowry. Y además determinaron la composición de las bases del DNA.

Se aislaron 2 cepas AL2 y AL3 y observaron la morfología para AL2 en agar a pH 10 con colonias transparentes, blancas, consistencia suave, bordes regulares y elevación convexa con depósitos de azufre que aparecieron primero en el centro y después en las orillas y la morfología de AL3 las colonias no contenían depósitos de azufre, fueron siempre transparentes, de un color rosado, consistencia suave, y elevación convexa.

Ambas cepas fueron capaces de crecer en medio mineral con tiosulfato a un rango de pH de 8.5 y 10.4 con un óptimo de 9.5 y 9.8. A pH 8 - 8.5 crecieron y el tiosulfato fue oxidado muy lentamente a azufre elemental como único producto de oxidación. Estos aislados representan los primeros cultivos puros de bacterias alcalófilas incoloras de azufre. El enriquecimiento de hábitats altamente alcalinos permitió el aislamiento de dos diferentes

tipos de bacterias alcalófilas, litoautotróficas obligadas sulfooxidantes. De acuerdo a los criterios clásicos de taxonomía estos aislados pueden ser identificados como miembros de género *Thiobacillus*. Los aislados son Gram negativos, con forma de bacilos con flagelo polar y aerobios obligados. Son capaces de crecer autotróficamente con compuestos de azufre inorgánico como fuente de energía. Tienen requerimientos específicos de iones para el crecimiento y una preferencia, pero no absoluta por nitrato como fuente de nitrógeno.

Stefan M. & col. (2000), aislaron una bacteria sulfooxidante, quimiofotoautótrofa de sedimento de aguas termales poco profundas.

El medio mineral que utilizaron contenía 20mM de tiosulfato como único donador de electrones para enriquecer, aislar y para cultivos rutinarios. La composición del medio mineral (g/l) fue: NaCl (29), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (1), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1.5), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (0.42), K_2HPO_4 (0.5), KCl (0.7), vitamina B12 (0.00005), solución de elementos traza, EDTA (1ml/L) (Widel & Back, 1992). Utilizaron azul de bromotimol como indicador de pH a una concentración de 4mg/l.

Para aislar la bacteria inocularon 1 cm³ de sedimento de aguas termales en medio mineral. Los cultivos fueron incubados a 22 °C en la oscuridad para impedir el crecimiento de bacterias fototróficas. Después de que crecieron, que fue indicado por un cambio en el color del indicador de pH y por el depósito de azufre, un mililitro del cultivo lo transfirieron a 10 ml de cultivo de medio fresco. Para el aislamiento de cultivos puros, fue transferido y dispersado 1 ml de alícuota de cultivo enriquecido sobre placas de agar con tiosulfato. Las colonias que se aislaron se transfirieron al menos tres veces hasta ser consideradas puras.

Los experimentos que realizaron para su crecimiento de la bacteria pura fue realizando cultivos en lote los cuales se hicieron en matraces de 500 ml conteniendo 100 ml de medio en un agitador rotatorio a 30 °C en la oscuridad. Se determinó la máxima velocidad de crecimiento en tiosulfato entre 22 y 37 °C. La velocidad de crecimiento máximo específico lo determinaron por microscopía de fluorescencia, por densidad óptica a 420 nm o por concentración de proteína con el método de Bradford (1976).

Evaluaron el pH óptimo para el crecimiento del nuevo aislado y los valores más bajos y más altos de pH tolerados se determinaron usando un medio ajustado a diferentes valores

de pH inicial (3.5 – 10). Un cambio de color del indicador de pH indicó crecimiento. El pH óptimo lo determinaron midiendo la velocidad de consumo de oxígeno a diferentes valores de pH. Determinaron la temperatura óptima de crecimiento (de 60 °C - 3.5 °C) dentro de las 24 horas después de la inoculación.

Con la secuenciación de los genes del 16S RNA de los microorganismos aislados se llegó a que eran 93 % similares a *Thiobacillus* sp. Con una morfología de 0.4 a 0.6 μ de ancho y 1.2 a 2.5 de largo, solas o en pares, con motilidad, Gram negativas y sin formación de esporas. Por sus condiciones de crecimiento los aislados son estrictamente aerobios y autotróficos en tiosulfato, tetrationato, azufre y sulfito pero no en tiocianato. Hay crecimiento en tiosulfato desde pH neutros hasta 2.8 – 3. A pH de 9 no hubo crecimiento. El tiosulfato fue completamente oxidado a sulfato con una recuperación de 90 a 99 %. Se observó la formación de azufre elemental en el medio sólido y en medio líquido. La temperatura óptima fue de 37 – 42 °C.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Aislar de un consorcio *sulfooxidante* (que se encuentra en un cultivo continuo) una bacteria incolora del azufre que tenga la capacidad de oxidar compuestos reducidos de azufre como sulfuro de hidrógeno, azufre elemental y tiosulfato. Caracterizando esta bacteria para conocer su fisiología y metabolismo microbiano. Para contribuir al entendimiento del proceso de oxidación biológica llevado a cabo por el consorcio *sulfooxidante*. Esto con la finalidad de proponer procesos que disminuyan los problemas de contaminación ambiental por compuestos reducidos de azufre.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Aislar y caracterizar un microorganismo con capacidad de oxidar compuestos reducidos de azufre presente en un consorcio sulfooxidante.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar una cepa pura de un consorcio sulfooxidante que utilice como fuente de energía compuestos reducidos de azufre .
- Evaluar la capacidad sulfooxidante del microorganismo aislado y determinar sus características de crecimiento.
- Determinar los parámetros cinéticos de oxidación del microorganismo aislado y del consorcio, y comparar ambos sistemas (K_m y V_{max}).
- Identificar el microorganismo aislado

HIPÓTESIS DEL TRABAJO

Es factible aislar un microorganismo con capacidad sulfooxidante de un consorcio que utiliza como fuente de energía los compuestos reducidos de azufre y es posible además comparar ambos sistemas (velocidad de oxidación) para determinar si el microorganismo aislado es representativo del consorcio

MATERIAL Y MÉTODOS

Material Biológico

El inóculo utilizado se obtuvo de un consorcio sulfooxidante proveniente de un cultivo continuo adaptado a tiosulfato a un pH de 6.5, que se encuentra operando desde 1996 en el laboratorio w-107 de emisiones gaseosas en la UAM-Iztapalapa.

Medio de cultivo

El medio mineral que se utilizó para aislar y crecer al microorganismo fue un medio descrito por Sublette (1987), utilizando al tiosulfato como único donador de electrones. Además es uno de los compuestos reducidos de azufre que permite su manipulación sin riesgos asociados a toxicidad. Es importante señalar que este compuesto se ha utilizado como modelo para estudios de la sulfooxidación (Sublette, 1987, Steffes y col., 1996; Kelly y col., 1997)

La composición del medio es la siguiente:

Componente	g/l
Na_2HPO_4	1.2
KH_2PO_4	1.8
$\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.4
NH_4Cl	0.5
CaCl_2	0.03
MnCl_2	0.02
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.02
NaHCO_3	1.0
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	20
pH final	6.5 -7

Aislamiento

Se evaluaron diferentes parámetros de cultivo con el fin de obtener resultados positivos en el crecimiento de microorganismos sulfooxidantes. Se aisló una cepa de acuerdo al siguiente procedimiento. Se favoreció la acumulación de azufre elemental en el quimiostato. Se tomaron muestras del cultivo y se filtraron utilizando papel filtro Whatman 42. Estos filtros fueron colocados en diferentes cajas petri con medio mineral y goma gellan (1 %). Se siguió utilizando al tiosulfato como fuente de energía y al bicarbonato como fuente de carbono. Se incubaron las cajas por 60 horas a 30 °C y se observó el crecimiento de colonias con precipitado de azufre, debido a la oxidación del tiosulfato. Estas colonias se picaron y se resembró en cajas en condiciones estériles. Mediante resiembras consecutivas se obtuvo finalmente la cepa aislada y se resembró en medio líquido para verificar su capacidad quimiolitotrófica. Finalmente se tomaron muestras para ser sembradas en medio nutritivo y agar sabouraud.

Tinción

Para demostrar las propiedades tintoriales de la bacteria aislada y además para ser observada en el microscopio óptico se utilizó la tinción de Gram.

Método

Se hizo un frotis delgado del material a estudiar y se dejó secar al aire. Se fijó el material en el portaobjeto pasándolo 3 o 4 veces a través de la llama de un mechero. Se cubrió la superficie con solución de cristal violeta. Después de un minuto de exposición al cristal violeta se lavó totalmente con agua destilada. Se cubrió el frotis con solución de yodo de Gram durante un minuto. Se lavó totalmente con agua. Se cubrió la superficie con unas gotas de decolorante de alcohol y acetona hasta que no se desprendió color violeta. Se cubrió la superficie con safranina durante un minuto. Se lavó con agua corriente. Se examinó el frotis en el microscopio.

Cultivos

Los cultivos en lote se hicieron en matraces de 250 ml conteniendo 100 ml de medio, incubados en un agitador rotatorio a 180 rpm a 30°C. Después de que ocurrió el crecimiento, que fue indicado por el cambio de pH de 6.5 a 3 y por el depósito de azufre, 5 ml de cultivo se transfirieron de nuevo a medio mineral fresco.

Características de crecimiento

Crecimiento del microorganismo en diferentes fuentes de carbono

Se evaluó el crecimiento de los microorganismos utilizando seis diferentes fuentes de carbono, las cuales fueron (1g/l) bicarbonato de sodio, glucosa, citrato de sodio, sacarosa, formiato de sodio y acetato de sodio.

Se inocularon 1ml de células a una D.O de 0.5 en matraces de 250 ml con 100 ml de medio mineral conteniendo cada uno las diferentes fuentes de carbono. Se midió el pH, la acumulación de sulfatos y la biomasa cada 12 horas desde el tiempo cero hasta las 60 horas.

Curvas de crecimiento

Cuando el pH del cultivo se encontraba en 4.5 - 5, se centrifugaban 750 ml a 10,000 por 25 min y el sedimento se resuspendió en solución salina (0.85 %). Se llevó a un DO de 0.5 para posterior inoculación de matraces con 1 ml. Se tomaron muestras cada 12 horas para medir el pH, biomasa y acumulación de sulfatos, desde las cero horas hasta las 60 horas. Para este experimento se utilizaron dos fuentes de carbono por separado (1g/l) glucosa y bicarbonato.

Crecimiento del microorganismo en diferentes concentraciones de glucosa.

Se evaluó el comportamiento del microorganismo aislado utilizando la glucosa como única fuente de carbono a diferentes concentraciones 1, 2 y 5 g/l. La preparación del inóculo fue la misma que para las curvas de crecimiento. Se midió el pH, la biomasa y la acumulación

de sulfatos, así como la concentración de glucosa en el tiempo cero y después hasta las 48 h

Efecto del pH sobre la oxidación, velocidad de oxidación para tiosulfato y tolerancia a sulfatos.

El inóculo utilizado para los estudios de respirometría se preparaba de la siguiente manera. Cuando el pH medido se encontraba en 4.5 -5, los cultivos provenientes de cuatro matraces se centrifugaron y se resuspendieron en medio mineral sin tiosulfato y sin fuente de carbono. Para evaluar el efecto del pH sobre la oxidación se utilizaron soluciones buffer pH de 3, 5, 6.5, 7.5 y 8. Para evaluar la velocidad de oxidación para tiosulfato se adicionaron en una concentración de 0.25, 0.5, 0.75, 1, 2, 2, 4, 8 y 10 g/l de tiosulfato. Para evaluar la tolerancia a sulfatos se adicionaron en una concentración de 1, 2, 4, 8, 10, 15, 20, 25 y 30 g/l de sulfatos.

La técnica se basa en la medición del consumo de oxígeno como una medida indirecta de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre en el microorganismo estudiado. El oxígeno se midió utilizando un oxímetro YSI modelo 5300. El procedimiento se describe a continuación

1. En un matraz se aireó la solución buffer a probar durante el tiempo necesario para saturarlo de oxígeno, aproximadamente 30 minutos. Para tiosulfato y sulfatos se aireó la solución buffer (en donde mejor hubo oxidación).
2. En un reactor con una capacidad de 1500 µl se inoculó con 10% v/v de células centrifugadas y lavadas con solución salina al 0.85%
3. Se adicionaron las soluciones buffer y los sustratos a evaluar
4. Se mantuvo el reactor en agitación a temperatura de 30°C y pH 6.5
5. Se midió el consumo de oxígeno contra tiempo
6. Se calculó la tasa de consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 / \text{min}$) por medio de la pendiente del consumo respecto al tiempo.
7. Finalmente se calcularon las velocidades de oxidación de los sustratos ($\text{mg de tiosulfato g proteína}^{-1} \text{ min}^{-1}$) de acuerdo a la estequiometría global de la reacción de

oxidación de los compuestos reducidos de azufre considerando la biomasa y la corrección para la respiración endógena. Esta última se calculo midiendo el consumo de oxígeno sin sustrato, es decir al medio con células sin fuente de energía se le midió el consumo del oxígeno respecto al tiempo

MÉTODOS ANALÍTICOS

Determinación de sulfatos por el método turbidimétrico

El ion sulfato en un medio con ácido clorhídrico y cloruro de bario, forma cristales uniformes de sulfato de bario. La absorbancia de la solución es medida por nefelometría y la concentración del ion sulfato es determinada por comparación de la lectura con una curva estándar.

Reactivos

1. Mezcla de reacción: Mezclar 30 ml de HCl concentrado, con 300 ml de agua destilada, 100 ml de alcohol isopropílico o etílico al 95 % y 75 g de cloruro de sodio. Posteriormente se mezclan con 50 ml de glicerol.
2. Cloruro de bario: Cristales de tamaño de malla 20 ó 30.
3. Solución estándar de sulfato. Se disuelven 147.9 mg de Na_2SO_4 anhidro en 1000 ml de agua destilada. Se hace una curva con incrementos de concentración de 5 mg/l en un rango de 0 - 40 mg/l. Alrededor de 40 mg/l la exactitud del método decrece y la suspensión de sulfato de bario pierde la estabilidad.

Procedimiento

1. Colocar 99 ml de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 250 ml.
2. Adicionar 1 ml de la muestra.
3. Agregar 5 ml de la mezcla de reacción.
4. Agitar.
5. Adicionar 1g de cristales de cloruro de bario.
6. Agitar durante un minuto exactamente y a una velocidad constante.

- 7 Medir la absorbancia a 420 nm Medir la turbidez generada a intervalos de 30 segundos durante 4 minutos, porque el máximo de turbidez ocurre durante los dos primeros minutos y la lectura permanece constante de 3 a 10 minutos

Biomasa

La biomasa se determinó indirectamente por su contenido de proteína. Esta fue cuantificada por el método de Lowry (1951) utilizando una curva patrón con albúmina de 0 a 500 $\mu\text{g/ml}$

Reactivos

Reactivo A $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en H_2O

Reactivo B Tartrato doble de Na y K al 2%

Reactivo C: Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1N

Reactivo D 1A + 1B preparar cuando se va a utilizar

Reactivo E: 1D + 50C preparar cuando se va a utilizar

Reactivo Folin 1.1 con H_2O se prepara cuando se va a utilizar.

Procedimiento:

- 1 Tomar una alícuota de la solución problema, colocar en tubo de ensaye
- 2 La alícuota anterior debe ser llevada a un volumen de 1 ml con NaOH 0.1N
3. Calentar en baño maría por 5 minutos
- 4 Enfriar en el refrigerador
- 5 Agregar 5 ml de reactivo E, agitando vigorosamente.
- 6 Reposar cada tubo 10 min
- 7 Agregar 0.5 ml de reactivo de Folin (1.1 con agua) agitar.
Preparar en el momento de usarse
- 8 Reposar 30 min
- 9 Leer a 590 nm

La curva estandar que se utilizó para la cuantificación de proteína fue la siguiente

Determinación de glucosa

La glucosa se determinó por un prueba comercial de la marca Hycel, la cual es una determinación cuantitativa colorimétrica. El procedimiento está basado en el método de Hultman (1959) y en las correcciones hechas por Dubousky (1962), en donde la o-toluidina reacciona con el grupo aldehído de la glucosa en solución de ácido acético y forma una mezcla en equilibrio de las glucosilaminas. El color verde-azul que se desarrolla indica el final de la reacción, el cual tiene su máxima absorción a 630 nm y es proporcional a la concentración de glucosa

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Cultivo del consorcio sulfooxidante

Al realizar estudios a nivel laboratorio sobre procesos de eliminación biológica de contaminantes para el escalamiento y su posterior aplicación industrial en los compuestos reducidos de azufre se han utilizado los reactores totalmente agitados, que utilizan un consorcio sulfooxidante (Revah y col. no publicado) y cepas puras de *Thiobacillus* (Sublette, 1987; Visser y col, 1997). para la eliminación de sulfuro de corrientes acuosas. Este sistema se utiliza también para el tratamiento de corrientes acuosas contaminadas con tiosulfato y tiocianatos de la industria fotográfica (Robertson y Kuenen, 1991)

De esta manera el consorcio sulfooxidante se mantiene en un cultivo continuo en un reactor completamente agitado, al cual se adiciona tiosulfato de sodio como única fuente de energía. La velocidad máxima de crecimiento V_{max} observada es de 0.31 h^{-1} (Revah y col. no publicado)

A continuación se describe brevemente un quimostato (Figura 1) Un cultivo continuo es un cultivo de volumen constante, al que se añade medio fresco y del que sale medio usado con células. Cuando alcanza el estado de equilibrio, el número de células y el estado metabólico se mantiene constante

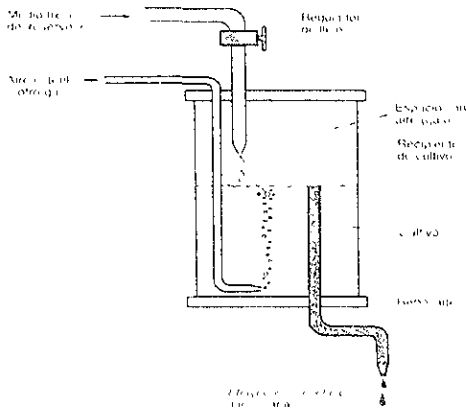


Figura 1. Esquema de un cultivo continuo (quimostato)

2. Características de crecimiento del consorcio

El consorcio sulfooxidante es capaz de oxidar compuestos reducidos de azufre. La velocidad de oxidación del azufre elemental es la más baja comparada con los otros compuestos de azufre. $H_2S > CS_2 > SO_3 > S_2O_3^{2-} > S^0$, (Revah y col 2000, no publicado).

Está ampliamente documentado que la oxidación de los diferentes compuestos reducidos de azufre por microorganismos sulfooxidantes, producen diferentes intermediarios y sulfato como producto final (Suzuky, 1999) Este último, en determinadas concentraciones en el medio de cultivo, tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de los microorganismos sulfooxidantes del consorcio. Las concentraciones de inhibición del crecimiento por sulfatos es de 25 g/l (Revah y col. 2000, no publicado)

La disminución del pH, está relacionada con la acumulación de sulfatos en el medio de cultivo. De esta manera el tiempo que tarda en disminuir el pH depende del punto de equivalencia del amortiguador que es de 4 y de la concentración de tiosulfato, pero en la mayoría de los casos es después de las 36 horas a un pH de 3

Las condiciones más favorables para la oxidación de compuestos reducidos de azufre por el consorcio de microorganismos sulfooxidantes son las siguientes intervalo de pH entre 5.5 y 7, temperatura de 30 °C y para la oxidación completa a sulfatos a partir de tiosulfato, una concentración de oxígeno disuelto superior o igual a 0.2 mg/l . Por otro lado, cabe mencionar la capacidad del consorcio de llevar a cabo la oxidación en valores de pH ácidos de alrededor de 2 y 3 Posiblemente por la presencia de bacterias acidófilas azufre-oxidantes como *Thiobacillus thiooxidans* y *Thiobacillus ferrooxidans*

3. Aislamiento

El cultivo en placa y aislamiento de cepas de microorganismos quimiolitotróficos es particularmente difícil de realizar debido a sus características de crecimiento lo cual ha sido ampliamente documentado. Los trabajos de Johnson y col (1995, 1997) son un punto de referencia en cuanto a la formulación de medios sólidos para el aislamiento de cepas de *Thiobacillus* y otros acidófilos de interés. Básicamente sus resultados muestran la importancia de eliminar cualquier sustancia orgánica del medio de cultivo, para lo cual

utilizan diferentes gelificantes, así como medios sólidos de doble capa donde en una de las capas se favorece el crecimiento de los heterótrofos que consumen la materia orgánica y en la capa externa los organismos quimiolitótrofos

El cultivo en sólido consistió en crecer el consorcio en diferentes medios tanto para observar el crecimiento como la posibilidad de aislar algún microorganismo de interés del consorcio. Así mismo se evaluó como control el crecimiento de *Thiobacillus thiooparus* ATCC 26345 y *Thiobacillus thiooxidans* ATCC 21835. Se utilizó el medio de cultivo utilizado por Sublette (1987). Se cultivaron de acuerdo a la Tabla 1. Por otro lado, se mantuvieron los cultivos en medio líquido que resulta el más adecuado para mantener a este género microbiano.

Tabla 1 Crecimiento de cepas puras de *Thiobacillus* y consorcio sulfooxidante en cultivo sólido utilizando diferentes tipos de gelificante.

Medio de Cultivo (medio mineral)	T thiooparus ATCC26345	T thiooxidans ATCC21835	Consorcio Sulfooxidante
Agar bacteriológico (1.5%)	+	+	-
Agar bacteriológico (1%)	+	+	-
Agar bacteriológico (1%) lavado	+	+	+
Agar bacteriológico Extracto de levadura (0.5 g/l)	++	+	Hongos (++) Bacterias (+)
Goma Gellan (1%)	++	++	++
Agarosa Ultrapurificada	---	+++	--

Al sembrar el consorcio en caja petri (tabla 2) utilizando como gelificante goma gellan al 1% si hubo crecimiento y aislamiento. Utilizando agar (1%) no hubo crecimiento, esto se debe tal vez a que el agar tenga la presencia de trazas de material soluble orgánico o presente sustancias inhibidoras para el crecimiento de microorganismos quimiolitótrofos (Taylor col, 1971 y Johnson 1995)

Al hacer crecer las colonias aisladas en medio mineral líquido se observaba después de 24 horas la formación de azufre y la disminución del pH de 6.5 a 3 (tabla 2) Una característica de la oxidación de compuestos reducidos de azufre es la acidificación del medio, resultado de la producción de protones. El ácido formado por la oxidación de compuestos reducidos de azufre es el ácido sulfúrico (H_2SO_4).

Tabla 2. Comportamiento del microorganismo en los diferentes medio

Medio	Crecimiento	Observaciones
Mineral líquido	+	pH inicial (0 h) 6.5 pH final (48 h) 3
Mineral sólido (goma gelan 1%)	+	Formación de colonias puntiformes de color amarillo, opacas con formación de azufre
Mineral sólido (agar 1%)	-	
Saboroud	-	
Agar nutritivo	-	

+ crecimiento

- no hay crecimiento

Al sembrar el microorganismo aislado en agar Saboroud y agar nutritivo incubados durante 5 días y 24 horas respectivamente a 30°C no se presentó crecimiento de ningún tipo de microorganismo. Taylor y col. (1971) han reportado que uno de los problemas más comunes para obtener cultivos puros de quimiolitotrofos es la extrema persistencia con que los contaminantes heterótrofos pueden permanecer asociados con las colonias quimiolitótrofas en las placas de agar. Debido a la presencia de trazas de material soluble orgánico y también a que los quimiolitótrofos excretan compuestos orgánicos

4. Identificación

La cepa pura aislada a partir del consorcio se envió a la compañía Microbial Insights (Rockford, Tennessee, E.U.) para que se identificara mediante la secuenciación parcial del gen ribosomal 16S. Amplificaron por PCR y secuenciaron un fragmento de aproximadamente 500 pb el cual posteriormente se comparó con las secuencias depositadas en el Ribosomal Database Project. Los resultados obtenidos se muestran a continuación:

Índice de similitud	Microorganismos
0.914	<i>Thiobacillus</i> sp. STrW5
0.683	<i>Thiobacillus hydrothermalis</i> str. R3
0.648	<i>Thiobacillus halophilus</i>
0.648	<i>Thiobacillus neapolitanus</i>

Los índices de similitud mayores a 0.800 se consideran excelentes, de 0.6 – 0.7 son buenos y por debajo de 0.5 se consideran secuencias únicas.

De los datos indicados, podemos saber que se trata de un *Thiobacillus*, aunque la especie no está claramente definida, al menos por este mecanismo.

5. Curvas de crecimiento

Para evaluar el comportamiento de la cepa al utilizar trisulfato de sodio (20g/l) como única fuente de energía y bicarbonato y glucosa como fuentes de carbono, se realizó una cinética de crecimiento. Se evaluó el crecimiento, pH, y producción de sulfatos con respecto al tiempo.

Crecimiento del *Thiobacillus* sp. con respecto al tiempo

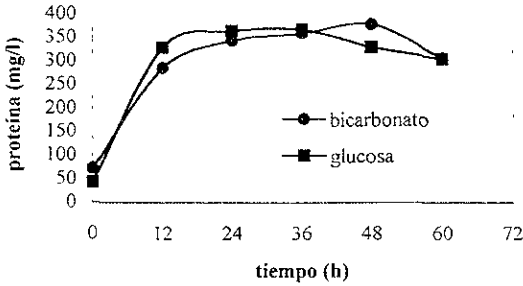


Figura 2 Crecimiento del *Thiobacillus* sp a 30°C, 150 rpm, pH 7

En la Figura 2 se presenta el crecimiento del *Thiobacillus* sp. El microorganismo se obtuvo de un consorcio adaptado a tiosulfato, por lo que no se observa una fase de adaptación y alcanza la fase estacionaria en las primeras 12 horas, para las dos fuentes de carbono. La concentración máxima de proteína que se tiene es de 368 mg/l para bicarbonato y para glucosa 380 mg/l.

Comportamiento del pH con respecto al tiempo

El comportamiento del pH durante la oxidación de tiosulfato de sodio por el *Thiobacillus* sp se presenta en la figura 3. El pH del medio aumenta ligeramente durante las primeras 24 horas a pH de 7 para las dos fuentes de carbono (glucosa y bicarbonato), esto se debe a la acumulación de azufre, después a las 36 horas disminuye rápidamente a pH 3, esto se debe a que hay una acumulación mayor de sulfatos y después el valor del pH se mantiene constante, por el agotamiento del sustrato (tiosulfato). Durante la oxidación biológica del tiosulfato por la cepa pura se observa la formación de intermediarios como S^0 y SO_4 .

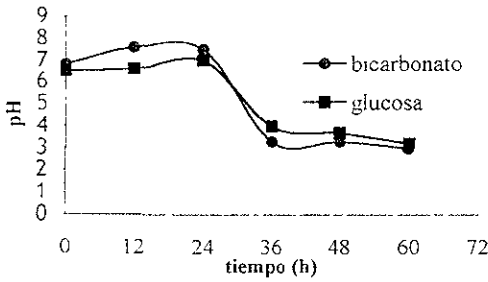


Figura 3. Comportamiento del pH durante la oxidación por el *Thiobacillus* sp a 30 °C, 150 rpm

Producción de sulfatos contra tiempo

En la Figura 4 se muestran los resultados de la acumulación de sulfatos durante la oxidación de tiosulfato de sodio por el microorganismo aislado. La acumulación de sulfatos alcanzan su valor máximo para bicarbonato y glucosa (13 y 8.5 g/l respectivamente) aproximadamente a las 36 horas.

Se observa que existe una mejor oxidación biológica del tiosulfato utilizando como fuente de carbono al bicarbonato que usando la glucosa.

Estos resultados son similares a los observados en el consorcio sulfurooxidante crecido en S_2O_3 como fuente de energía (Estrada I, 1999).

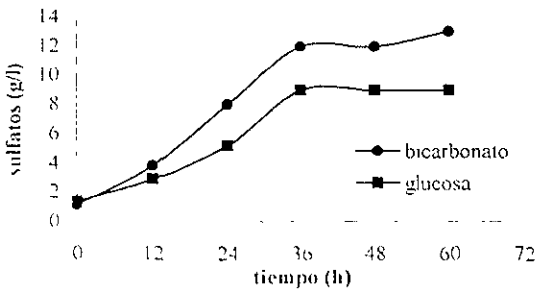


Figura 4. Acumulación de sulfatos contra tiempo

5. Tinción

Al realizar la tinción de Gram se pudo observar bacilos de color rojo rosado. Este resultado coincide con las propiedades de los *Thiobacillus* reportadas por Kuenen (1991) el cual describe a las bacterias sulfooxidantes como organismos gram-negativos.

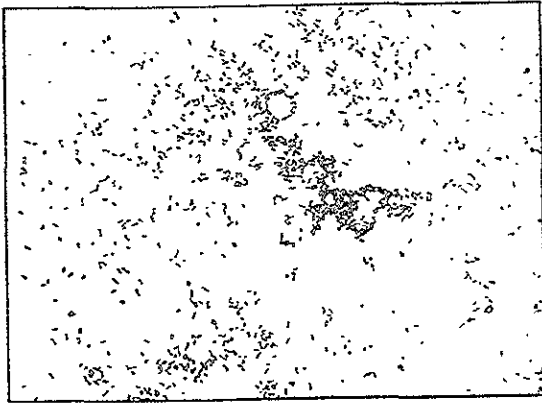


Figura 5. *Thiobacillus* sp. Observados en el microscopio óptico a 100x utilizando una tinción de Gram.

7. Características de crecimiento

Dependiendo de sus características de crecimiento los microorganismos quimiolitótrofos se han clasificado en (Madigan y col. 1999):

Quimiolitótrofo. Microorganismos que obtiene su energía de la oxidación de compuestos inorgánicos, como el hidrógeno o el tiosulfato, y el dióxido de carbono como fuente de carbono.

Mixotrofo. Microorganismo capaz de asimilar los compuestos orgánicos como fuentes de carbono, usando compuestos inorgánicos como donadores de electrones.

Con el fin de determinar algunas características de crecimiento se evaluó el comportamiento del *Thiobacillus* sp utilizando diferentes fuentes de carbono. Las fuentes

de carbono fueron (1g/l) bicarbonato, glucosa, acetato, sacarosa, formiato y citrato. La fuente de energía de éste y los demás experimentos fue tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) en 20 g/l

Al mismo tiempo se evaluó el comportamiento del *Thiobacillus* sp. a diferentes concentraciones de glucosa, se observó su efecto utilizando concentraciones crecientes sobre el crecimiento, producción de sulfatos y pH. Las concentraciones evaluadas fueron 1, 2 y 5 g/l. Tomando siempre como fuente de energía al tiosulfato.

7.1 Diferentes fuentes de carbono

Tabla 3. Comportamiento del microorganismo en diferentes fuentes de carbono

Fuente de carbono	pH (60 h)	Proteína (mg /L) (60 h)	SO_4^{2-} (g/l) (60 h)
Bicarbonato	3.3	244.21	12.37
Glucosa	3.3	233.7	9.7
Acetato	3.5	210.5	9.7
Sacarosa	3.4	221.0	9.7
Formiato	Sin crecimiento	0	0
Citrato	3.9	265.26	10

Como se observa en la tabla 3, el *Thiobacillus* sp. utiliza como fuente de carbono para su crecimiento al bicarbonato, glucosa, acetato, sacarosa y citrato. La fuente de carbono que no utiliza es el formiato, esto posiblemente se debe a que es un compuesto tóxico. Al utilizar al bicarbonato como única fuente de carbono se observa que hay una mayor producción de sulfatos, es decir, hay una mejor oxidación del tiosulfato a comparación de los otros compuestos. Existe una mayor producción de biomasa utilizando citrato como fuente de carbono, siguiendo el bicarbonato. De acuerdo a estos resultados se puede sugerir que el microorganismo es mixótrofo. Es decir, utiliza únicamente como fuente de energía un compuesto inorgánico y como fuente de carbono un compuesto orgánico o inorgánico. Kuenen y col. (1991) reportaron microorganismos sulfooxidantes mixótrofos que podían tomar como fuente de carbono compuestos inorgánicos y orgánicos, entre los que se

encuentran el *Thiobacillus intermedius*, *Thiobacillus A2* y *Thiobacillus ferrooxidans*.

7.2 Comportamiento del *Thiobacillus* sp. en diferentes concentraciones de glucosa

Tabla 4. Efecto de la glucosa sobre el crecimiento del *Thiobacillus* sp.

Glucosa [g/l]		pH		Proteínas [mg/l]		Sulfatos [g/l]	
0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h	0 h	48 h
1	0.036	6.19	3.4	15.0	356.0	0	8.89
2	0.074	6.21	3.4	16.2	380.8	0	8.258
5	0.8	6.20	3.4	15.0	456.0	0	8.49
0 ^A	0	6.20	3.0	16.0	254.2	0	9.34
1 ^B	0.987	6.27	5.76	43.42	38.00	0	0
5 ^C	4.232	6.29	6.0	45.8	30.74	0	0

A = medio mineral con bicarbonato (1g/l) y tiosulfatos (20 g/l).

B = medio mineral con glucosa (1g/l) y sin tiosulfato

C = medio mineral con glucosa (5g/l) y sin tiosulfato

En la tabla 4 se observa que la producción de biomasa presenta un ligero aumento con respecto al incremento de la concentración de la glucosa. Cuando se utiliza bicarbonato se tiene un crecimiento de 254.2 mg/l y en presencia de glucosa 356 mg/l. Así mismo se observa que no existe un efecto sobre el comportamiento del pH, pero sí con la producción de sulfatos. La producción de sulfatos disminuyó ligeramente al adicionar glucosa como única fuente de carbono en un 10 %.

Al utilizar a la glucosa como única fuente de energía y de carbono, después de las 48 horas no hay disminución de pH ni producción de sulfatos, como tampoco un aumento de biomasa, por lo que no existió crecimiento del microorganismo. La glucosa no se utiliza como única fuente de carbono y de energía por el *Thiobacillus* sp., lo cual nuevamente sugiere que se trata de un mixotrofo. Esto atribuye a que es quimiolitótrofo obligado ya que

únicamente utiliza un compuesto inorgánico como fuente de energía, pero puede utilizar compuestos orgánicos e inorgánicos como fuente de carbono

8. Estudios de respirometría

8.1 Efecto del pH sobre la oxidación

Con la finalidad de evaluar el pH óptimo para la oxidación del tiosulfato por el *Thiobacillus* sp y el consorcio se realizaron estudios de respirometría .

La técnica utilizada se basa en la medición del consumo de oxígeno por el microorganismo estudiado como una medida indirecta de la oxidación del tiosulfato de sodio. El oxígeno se midió utilizando un oxímetro YSI modelo 5300.

Los diferentes pH que se probaron para el consorcio y el *Thiobacillus* sp. fueron: 3, 5, 6.5, 7.5, 8 y 9. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura 6.

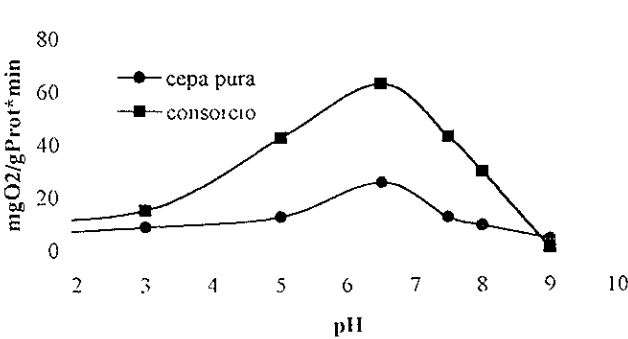


Figura 6. Oxidación del tiosulfato en el consorcio y *Thiobacillus* sp. a diferentes pH determinadas por respirometría.

Como se observa en la Figura 6 existe una mayor actividad sulfooxidante a pH 6.5 en el consorcio y en el *Thiobacillus* sp. Las máximas velocidades de oxidación observadas fueron de 63.54 $\mu\text{g(O)}_2 \cdot \text{mg}_{\text{protocel}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ y 26 $\mu\text{g(O)}_2 \cdot \text{mg}_{\text{protocel}}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ respectivamente. En los pH 3 y

9 existe la más baja oxidación del tiosulfato comparada con la de los pH de 5, 7.5 y 8 tanto para el consorcio como para el *Thiobacillus* sp

De acuerdo a estos resultados el pH de oxidación del tiosulfato por el *Thiobacillus* sp. y el consorcio esta entre 5 y 8. Los valores de pH para la oxidación del tiosulfato por el *Thiobacillus* sp., se muestra que son organismos neutrófilos lo cual es una característica de la especie microbiana. Kuenen y col.(1986) reportan varias especies de *Thiobacillus* que crecen en pH neutros como son *T. denitrificans*, *T. neapolitanus* y *T. thioparus*.

Comparando los resultados obtenidos para el *Thiobacillus* sp y el consorcio se observa que tiene el mismo comportamiento sobre la oxidación del tiosulfato a diferentes pH Lo cual sugiere que la cepa pura es representativa del consorcio con respecto al pH.

8.2 Parámetros cinéticos de oxidación de tiosulfato

Por medio de respirometría, se determinaron las velocidades de oxidación del tiosulfato a diferentes concentraciones del mismo tanto en el *Thiobacillus*sp como en el consorcio. Se determinó también el efecto que tiene el sulfato sobre la oxidación microbiana, evaluando el efecto de concentraciones crecientes del ion

En las Figura 7 y 8 se presentan las diferentes velocidades de oxidación en presencia de tiosulfato utilizando la ecuación de Monod para el ajuste de los datos Las velocidades máximas de oxidación de tiosulfato obtenidas fueron: para el consorcio, una V_{max} de 68 mg O_2 /g proteína min, en tanto la K_m fue de 1.9 mM Para la *Thiobacillus* sp una V_{max} de 18 mg O_2 /g proteína min y una K_m de 1 mM Estos resultados se obtuvieron en las condiciones óptimas de temperatura (30 C) y pH (6.5) Los datos son similares a los reportados en la literatura para cultivos puros de thiobacilli Jordan *et al.* (1995) reportó para bacterias , capaces de crecer en un amplio gama de compuestos de azufre orgánicos e inorgánicos, velocidades máximas de oxidación de tiosulfato para las cepas KLI y KS2 de 155.79 y 97.32 mg O_2 /g proteína min, respectivamente. Estos microorganismos presentaron una alta afinidad por tiosulfato, los valores de K_m reportados fueron de 6.3 μ M para KLI y 8.6 μ M para KS2 Velocidades de oxidación similares fueron reportadas por Beffa y col., (1992) en una cepa de *Thiobacillus tepidarius*, la velocidad de oxidación de tiosulfato fue de 156.8 mg O_2 /g proteína min Por su parte Visser y col (1997) reportaron valores de

afinidad para distintas cepas de thiobacilli. Los datos están en un intervalo de valores de Km entre 0.1 mM para *Thiobacillus tepidarius* y 1.0 mM para *Thiobacillus neopolitanus*

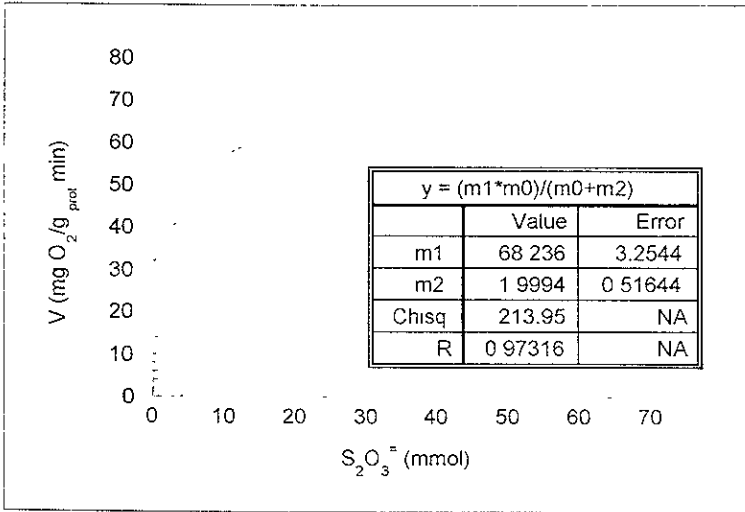


Figura 7 Velocidades de oxidación de tiosulfato por el consorcio sulfooxidante.

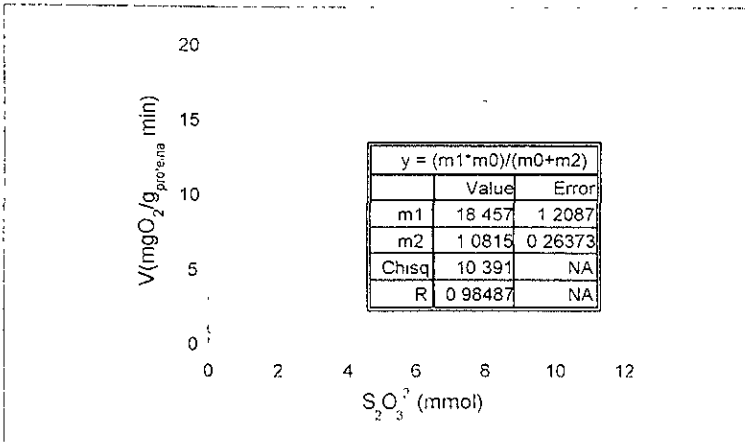


Figura 8 Velocidades de oxidación de tiosulfato por *Thiobacillus* sp

8.3 Efecto del sulfato sobre la oxidación del tiosulfato

Con el fin de evaluar el efecto que tiene el producto final de la oxidación del tiosulfato sobre la capacidad sulfooxidante de los microorganismos estudiados, se probaron concentraciones crecientes de sulfato y se evaluó por respirometría la capacidad sulfooxidante. Los resultados se presentan en las figuras 9 y 10.

Como se puede observar las concentraciones arriba de 25 g/l del ion afectan negativamente la oxidación del tiosulfato en aproximadamente 40 % de la actividad microbiana. Esto tanto en la cepa aislada como el consorcio sulfooxidante

De acuerdo a Ongcharit y col. (1991), el sulfato en concentraciones de 20 y 25 g/l inhibe la oxidación de sulfuro de hidrógeno en *Thiobacillus denitrificans*. Este efecto, afirman, se presentó como consecuencia de un fuerte estrés iónico. En tanto Yang y Allen (1994) reportan el efecto negativo en concentraciones arriba de 25 g/l de sulfato, como consecuencia de un efecto tóxico del ion sobre los cultivos sulfooxidantes, en un biofiltro de eliminación de sulfuro de hidrógeno.

Desde otra perspectiva, Yamanaka y Fukumori (1995) reportaron un trabajo relacionado a los aspectos moleculares de sistema de transporte de electrones en *Thiobacillus ferrooxidans*. Después de aislar el ferrocitocromo c552 realizaron ensayos para determinar el efecto del sulfato sobre la actividad del sistema citocromo c oxidasa-ferrocitocromo c552. Encontraron que la oxidación se estimula en presencia del sulfato en concentraciones de 0.75 mM (0.072 g/l), en tanto la actividad se inhibe en concentraciones superiores a 100 mM del ion (9.6 g/l). Señalan que la estimulación se debió posiblemente al requerimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* de sulfato para su crecimiento. Sin embargo, no se explica el efecto negativo del sulfato sobre la actividad de la citocromo-oxidasa.

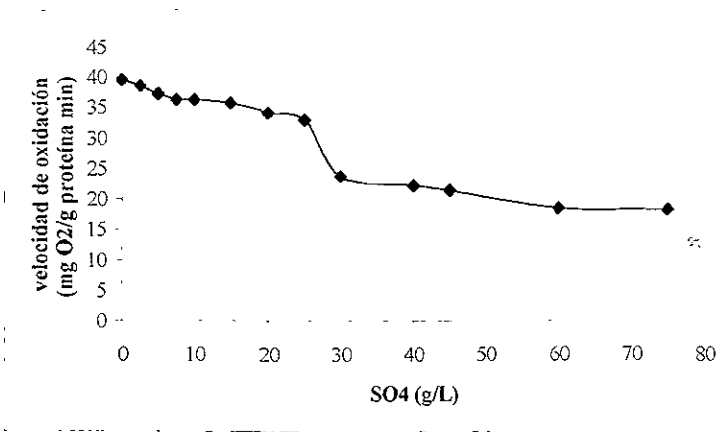


Figura 9. Efecto de concentraciones crecientes de sulfato sobre la oxidación del tiosulfato

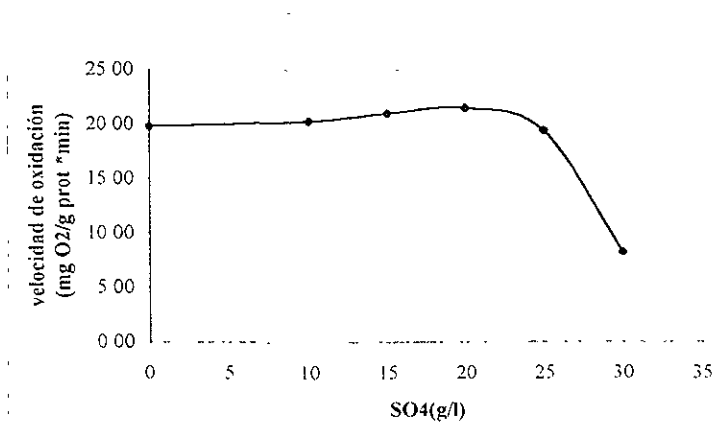


Figura 10. Efecto de concentraciones crecientes de sulfato sobre la oxidación del tiosulfato

CONCLUSIONES

1. El análisis del gen ribosomal 16S demostró que el microorganismo aislado es del género *Thiobacillus*.
2. Por sus características de crecimiento se trata de un microorganismo, mixótrofo y quimioolitótrofo obligado. Es decir utiliza únicamente como fuente de energía compuestos inorgánicos y como fuente de carbono compuestos orgánicos e inorgánicos.
3. Al evaluar diferentes fuentes de carbono se observó que tiene mayor capacidad oxidante utilizando CO₂ como única fuente de carbono.
4. En medio sólido, el medio mineral con goma gelan (1%) resultó ser el más adecuado para su crecimiento.
5. El pH óptimo para la oxidación es 6.5 para el consorcio y *Thiobacillus* sp. La cepa aislada y el consorcio tienen el mismo comportamiento sobre la oxidación del tiosulfato a diferentes pH.
6. *Thiobacillus* sp. presenta una mayor afinidad por el tiosulfato que el consorcio y presenta una velocidad máxima de oxidación de 18 mg O₂/g proteína min y una Km de 1 mM. En tanto el consorcio una velocidad máxima de oxidación de 68 mg O₂/g proteína min y una Km de 2 mM.
7. En concentraciones arriba de 25 g/l del ion sulfato se afecta negativamente la oxidación del tiosulfato en aproximadamente 40%, tanto para el consorcio como para el *Thiobacillus* sp.
8. Se puede afirmar que el microorganismo aislado es representativo del consorcio de origen lo cual permite realizar diferentes estudios básicos de la oxidación de compuestos reducidos de azufre. Como por ejemplo el establecimiento de las rutas bioquímicas de oxidación.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta C, Walter H, Benavente JL, Revah S (1999) Biological treatment of a waste gas pollution with carbon disulfide from sponge manufacturing facility. *Environm. Progress*. (accepted).
- Alcántara S, Estrada I, Vásquez M, Revah S (1999) Carbon disulfide oxidation by a microbial consortium from a trickling filter. *Biotechnol. Lett.* **21**, 815-819.
- Barton L, Shively M (1968) Thiosulfate utilization by *Thiobacillus thiooxidans* ATCC 8085. *J. Bacteriol.* **95**, 720.
- Beffa T, Berczy M, Aragno M (1991a) Chemolithoautotrophic growth on elemental sulfur (S₀) and respiratory oxidation of S₀ by *Thiobacillus versutus* and another sulfur-oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **84**, 285-290.
- Beffa T, Berczy M, Aragno M (1991b) Growth and respiratory oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus novellus* (type strain) grown on thiosulfate. *Curr. Microbiol.* **26**, 323-326.
- Bettelheim, J Billinge, H (1983) Eliminación de óxidos de azufre de los gases de chimenea de las centrales de energía y las calderas industriales. En Contaminación del aire por la industria. Parker, A. comp Td. José Costa L Ed Reverté, España. pp. 295-321.
- Berzacy L, Niedermayer E, Kloimstein L, Windsperger A (1988) Biological exhaust gas purification in the rayon fiber manufacture. *Chem. Biochem. Eng.* **2**, 201-204.
- Buisman C (1998) Industrial applications of new sulphur biotechnology. The Biological Sulphur Cycle. Environmental Science and Technology. Wageningen, The Netherlands, April 19-24.
- Buisman C, Prins, W (1994) New process for biological (flue) gas desulfurization. Symposium on Biological Waste Gas Cleaning Heidelberg, FRG. pp 95-103.
- Buisman C, Ijspeert P, Janssen A, Lettinga G (1990) Kinetics of chemical and biological sulphide Oxidation in aqueous solutions. *Wat. Res.* **24**(5), 667-671.
- Buisman C, Wit B, Lettinga G, (1990), Biotechnological sulphide removal in three polyurethane carrier reactors. stirred reactor, biorotor reactor and upflow reactor. *Wat Res* **24**(2), 245-251.
- Buisman C, Post R, Ijspeert P, Geraats G, Lettinga G (1989) Biotechnological Process for Sulfide Removal with Sulphur Reclamation. *Acta Biotechnol.* **9**(3), 255-267.
- Chan C, Suzuki I (1994) Thiosulfate oxidation by sulfur-grown *Thiobacillus thiooxidans* cells, cell free extracts and thiosulfate-oxidizing enzyme. *Can. J. Microbiol.* **40**, 816-

- 822.
- Cho J, Sublette K, Raterman K (1995) Oxidation of Hydrogen Sulfide by an Enrichment from Sour Water Coproduced with Petroleum *Appl. Biochem Biotech.* **51**, 761-770
- Cho K, Hirai M, Shoda M (1992) Enhanced Removal Efficiency of Malodorous Gases in a Pilot-Scale Peat Biofilter Inoculated with *Thiobacillus thiooparus* DW44. *J. Ferment. Bioeng.* **73**(1), 46-50
- Choppin G, Jaffe B, Summerlin, L Jackim L (1977) Azufre y elementos del grupo VI En: Química Pub Cultural, México pp. 486-499.
- Cadenhead P, Sublette K (1990) Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacilli* *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 1150-1154
- Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México 1992. ¿Que estamos haciendo para combatir la contaminación ambiental en el Valle de México 20 pp
- Dhawale S (1993) Thiosulfate. An interesting sulfur oxoanion that is useful in both medicine and industries -but is implicated in corrosion *J. Chem. Education.* **70**(1), 12-14
- Degorce-Dumas J, Kowal S, Le Cloirec P (1997) Microbiological oxidation of Hydrogen sulphide in a biofilter *Can. J. Microbiol* **43**, 264-271
- De Ley J, Van Poucke M (1961) The formation of sulphite during the oxidation of thiosulfate by *Thiobacillus novellus*. *Biochim. Biophys Acta.* **50**, 371-373.
- Estrada I (1998) Aspectos microcinéticos de la oxidación de compuestos azufrados. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa México. 60 pp
- Groenestijn J, Hesselink, P (1993) Biotechniques for air pollution control *Biodegradation*, **4**, 283-301
- Hallberg K, Dopson M, Lindstrom E (1996) Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus* *J. Bacteriol.* **178**(1), 6-11.
- Hanze W, Batenburg-van der Vegte W, Bos P, van der Pas R, Kuenen J (1988) The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans* *Arch Microbiol.* **150**, 574-579
- Hill M (1997a) Energy production and use In: Understanding environmental pollution. Cambridge University Press, SA pp 260-280.
- Hill M (1997b) Understanding pollution In: Understanding environmental pollution Cambridge University Press, SA pp 260-280
- Hugler W, Acosta C, Revah S (1999) Biological removal of Carbon Disulfide from waste air streams *Environm Progress* Accepted

- Huxtable R, Lafranconi W (1986) The chemistry of sulfur In Biochemistry of sulfur Plenum Press, N Y pp 1-6
- Kelly D, Shergill J, Lu W, Wood A (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria *Antoine van Leeuwenhoek* **71**, 195-107.
- Kenneth W, Warner C (1990) Control de los óxidos de azufre En Contaminación del Aire Origen y Control. Td. Carlos A. García. Noriega Editores. pp. 433-465
- Konishi Y, Takasaka Y, Asai S (1994) Kinetics of Growth and Elemental Sulfur Oxidation in Batch Culture of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotech. Bioeng.* **44**, 667-673
- Kuenen JG, Pronk JT, Hazeu, Meulenbergh R, Bos P (1993) A review of bioenergetics and enzymology of sulfur compound oxidation by acidophilic thiobacilli. In Biohydrometallurgical Technologies. Torma AE and Lakshman VL TMS press pp. 487-493
- Lehninger A, Nelson D, Cox M (1993) Principles of bioenergetics In: Principles of biochemistry. Worth Pub N.Y. pp. 364-369.
- Lehninger A (1983) Enzimas de oxidación-reducción y transporte electrónico En Bioquímica Omega Ed pp. 487-517.
- Lee M, Senios J, Grossman M (1995) Sulfur-specific Microbial Desulfurization of Sterically Hidered Analogs of Dibenzothiophene. *App. Environ. Microbiol.* **61**, 4362-66.
- Lizama H, Sankey B (1993) Conversion of hydrogen sulphide by acidophilic bacteria. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **40**, 438-441.
- Lu W P, Kelly D P (1988) Kinetic and energetic aspects of inorganic sulphur compounds oxidation *J. Gen. Microbiol.* **134**, 865-876.
- Lyric R M, Suzuki I (1970) Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*. III. Properties of thiosulfate-oxidizing enzyme and proposed pathway of thiosulfate oxidation. *Can. J. Biochem.* **48**, 355-363.
- Madigan M, Martinko J, Parker J (1999) Diversidad metabólica de los microorganismos En. Biología de microorganismos. Prentice Hall Iberia. pp 473-531.
- McEldowney S, Hardman D, Waite S (1993) Pollution: Ecology and Biotreatment Logman Sci. and Tech, Singapore. pp. 193-230
- Monticello D, Finnerty R (1985) Microbial desulfurization of fossil fuels *Ann. Rev Microbiol* **39**, 371-389.
- Moore W, Frisch N (1974) Sistemas y programas para el control de la contaminación del aire En Manual para el Control de la Contaminación Industrial Herbert Lund, compilador 1: Aurora Bernaldec y Carlos Blasco. pp 95-145
- Nagl G (1997) Controlling H₂S emissions. *Chemical Engineering* **3**, 125-127

- Otero A, Curutchet G, Donati E, Tedesco P (1995) Action of *Thiobacillus thiooxidans* on sulphur in the presence of a surfactant agent and its application in the indirect dissolution of phosphorus *Process Biochem* **30** (8), 747-750.
- Ongcharit C, Sublette K, Shah Y (1991) Oxidation of hydrogen sulfide by flocculated *Thiobacillus denitrificans* in a continuous culture *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 497-504.
- Pauling L (1964) In *College Chemistry An introductory text book of general chemistry*. S Fco. Freeman. pp
- Pesic B (1933) Redox potential technique to study the factors of importance during reactions of *Thiobacillus ferrooxidans* with Fe^{2+} . In *Biohydrometallurgical Technologies*. Torma AE and Lakshman VL. TMS press pp. 545-549.
- Plas C, Harant H, Danner H, Jelinek E., Wimmer K, Holubar P, Braun R (1992) Ratio of biological and chemical oxidation during the aerobic elimination of sulphide by colorless sulphur bacteria *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 817-822.
- Plas C, Wimmer K, Holubar P, Mattanovich D, Danner H, Jelinek E, Harant H, Braun R (1993) Degradation of carbon disulphide by a *Thiobacillus* isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 820-823
- Quadri S (1992) La contaminación atmosférica en la ZMCM En la Ciudad de México y la contaminación atmosférica. Ed Limusa-Noriega. pp.20-40
- Rajganes B, Sublette K, Camp C (1995) Pilot-scale biotreatment of refinery spent sulfidic caustics *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51/52**, 661-672.
- Rawlings D E, Kusano T (1994) Molecular Genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol Rev.* **58**, 39-55.
- Riveros H, (1996), Contaminación Atmosférica en la Ciudad de México, Primer Coloquio Binacional México-Japón sobre Gestión Ambiental. Contaminación Atmosférica, México, enero 25-26.
- Robertson L, Kuenen J (1991) The colorless sulfur bacteria, In: Balows A, Trüper H, Dworkin M, Harder H, Schlicifer K (eds) *The prokaryotes*, vol 1, Springer, Berlín Heidelberg New York, pp. 385-413
- Sam L, Rema V, Davasia P, Natarajan K (1993) Surface properties of *Thiobacillus ferrooxidans* and its adhesion to mineral surfaces *Current Science* **65**(12), 974-978
- Satoru A, Konishi Y, Yabu T (1990) Kinetics of absorption of hydrogen sulfide into aqueous ferric sulfate solutions *AIChE J.* **36**, 1331-1337
- Sorokin D, Robertson L A, Kuenen (1999) Isolation and characterization of alkaliphilic, chemolithoautotrophic, sulphur-oxidizing bacteria.
- Sistema General en Materia de Equilibrio Ecológico y Protección del Ambiente (SGE-FAVA) (1992) Calidad Ambiental Informe 1989-1990 Comisión Nacional de

Ecología, México pp 70-106

- Steinmüller W, Bock E (1976) Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter I
Mixotrophic growth Arch. Microbiol **108**, 299-304
- Sublette K (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*:
desulfurization of natural gas. *Biotechnol. Bioeng* **29**, 249-257.
- Sublette K, Sylvester N (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by mixed cultures of
Thiobacillus denitrificans and heterotrophs *Biotechnol. Bioeng* **29**, 759-761
- Sublette K, (1987), Aerobic Oxidation of Hydrogen Sulfide by *Thiobacillus denitrificans*,
Biotech Bioeng **29**, 690-695.
- Suzuki I (1999) Oxidation of inorganic sulfur compounds Chemical and enzymatic
reactions. *Can. J. Microbiol.* **45**, 97-105.
- Torres C M, Revah S, Hinojosa M A, Paez M F, Morales V (1993) Biological Process for
the elimination of sulphur compounds present in gas mixture U S Patent 5,236,677.
- Tyagi RD, Blais FJ, Deschne L, Lafrance P, Villeneuve JP (1994) Comparison of
microbial sulfuric acid production in Sewage Sludge from added sulfur and
thiosulfate. *J. Environ. Qual* **23**, 1065-1070.
- Visser J, Jong G, Robertson L, Kuenen J (1997) A novel membrane-bound
flavo-cytochrome c sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium
Thiobacillus sp. W5. *Arch Microbiol.* **167**, 295-301.
- Visser J, Robertson L, Verseveld H, Kuenen J (1997) Sulfur Production by Obligately
Chemolithoautotrophic *Thiobacillus* Species. *Appl. Environmental. Microbiol* **63**(6),
2300-2305
- Wodara C, Kostaka S, Egert M, Kelly P, Friedrich C (1994) Identification and sequence
analysis of the *soxB* gene essential for sulfur oxidation of *Paracoccus denitrificans*
GB17 *J. Bacteriol.* **176**, 6188-6191
- Wood A, Kelly P (1987) Chemolithotrophic metabolism of the newly-isolated moderately
thermophilic, obligately autotrophic *Thiobacillus tepidarius* *Arch. Microbiol* **144**,
71-77
- Yamanaka T, Fukumori Y (1995) Molecular aspects of the electron transfer system which
participates in the oxidation of ferrous iron by *Thiobacillus ferrooxidans* *FEMS*
Microbiol Rev **17**, 401-413.