

50524
39



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

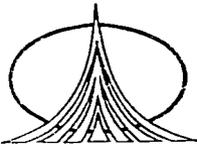
OXIDACION BIOLOGICA DE COMPUESTOS REDUCIDOS DE
AZUFRE POR *Thiobacillus* sp. CRECIDA EN CULTIVO
CONTINUO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
VICTOR CLAUDIO GARCES VARA

DIRECTOR DE TESIS DR. SERGIO J. ALCANTARA PEREZ
ASESOR DE TESIS: M. EN C. LEONORA SANCHEZ GARCIA F.

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE DE 2003



2

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.

AGRADECIMIENTOS

A DIOS

Gracias por permitirme alcanzar una de mis más importantes metas y por brindarme su apoyo en cada instante de mi vida

A MIS PADRES

Atagracia Vara Vargas y Claudio Garcés Ortiz

Por que gracias a su apoyo y tolerancia alcance una de mis más importantes objetivos que constituye el más grande éxito en mi superación personal.

A MIS HERMANOS

Gracias por su apoyo y ayuda, que de una u otra manera contribuyeron a que este trabajo se hiciera realidad.

A SILVIA

Por su apoyo y optimismo en los momentos buenos y difíciles.

Al Dr. Sergio J. Alcántara Pérez

Le agradezco por la oportunidad ofrecida y ayuda durante el proyecto que me permitió la culminación de una de mis grandes metas.

A la M en C. Leonora Sánchez García E.

Por su atención para el mejoramiento de este trabajo.

AMIGOS

A todos ellos por su cariño y confianza depositada en mí y por impulsarme a crecer cada día más.

A todos ellos, mil gracias

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Este trabajo fue realizado en el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) en el programa de Biotecnología del Petróleo y en la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa en el laboratorio de Tratamiento de Emisiones Gaseosas, bajo la dirección del Dr. Sergio J. Alcántara Pérez y la Asesoría de la M. en C. Leonora Sánchez García Figueroa.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

	Pág
INDICE	3
RESUMEN	5
I INTRODUCCIÓN	6
1. Ciclo de azufre	7
1.1 Importancia del ciclo del azufre y su relación con el medio ambiente	9
1.2 Ejemplos específicos de contaminación con compuestos de azufre	11
1.2.1 Oxido de azufre	11
1.2.2 Sulfuro de Hidrógeno	12
1.2.3 Tiosulfato	13
1.2.4 Compuestos Orgánicos Volátiles de Azufre	14
2 Cultivo de Microorganismos	15
2.1 Procesos biológicos de eliminación de CRS	15
2.2 Parámetros de Crecimiento	16
2.3 Cultivo en lote	19
2.3.1 Fases de Crecimiento en cultivo en lote (batch).	19
2.4 Cultivo Continuo	21
2.5 Objetivos Especiales de Cultivos en Quimiostato	25
2.6 Ejemplos de Cultivo Continuo para la Oxidación de Compuestos Reducidos de Azufre (CRS)	26
3 Fisiología y bioquímica de microorganismos sulfoxidantes	27
3.1 Microorganismos Quimiolitótrofos	
3.1.1 Bacterias sulfoxidantes	
4 Aspectos microbiológicos	31
4.1 Estructura celular de los Thiobacilli	32
4.2 Sitio de Oxidaciones Quimiolitótroficas	33
4.2.1 Periplasma	33
4.3 Sistema de transporte de electrones en <i>Thiobacillus</i>	34
4.4 Rutas Bioquímicas de CRS	35
4.4.1 Sulfuro	36
4.4.2 Tiosulfato	37
4.5 Inhibidores	38
II PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	42

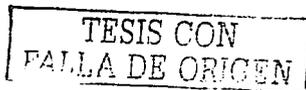
III	OBJETIVOS	43
IV	HIPÓTESIS DE TRABAJO	44
V	MATERIAL Y MÉTODOS	45
VI	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	54
	6.1 Descripción del Microorganismo	54
	6.2 Cinética de crecimiento	56
	6.3 Cultivo Continuo de <i>Thiobacillus</i> sp.	58
	6.3.1 Descripción y función del reactor	58
	6.3.2 Funcionamiento y Operación del reactor	59
	6.3.3 Biocontrolador	63
	6.3.4 Arranque del reactor y trabajo global utilizando tiosulfato como fuente de energía.	65
	6.4 Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento y la oxidación de tiosulfato.	67
	6.5 Crecimiento en Quimostato de <i>Thiobacillus</i> sp. utilizando como sustrato tiosulfato y sulfuro de sodio.	73
	6.6 Rendimiento del crecimiento y eficiencia oxidativa de la cepa <i>Thiobacillus</i> sp.	78
	6.7 Rendimiento del crecimiento y eficiencia oxidativa del <i>Thiobacillus</i> sp. con tiosulfato y/o sulfuro	81
	6.8 Velocidad de Oxidación del <i>Thiobacillus</i> sp., mediante estudios de respirometría.	84
	6.9 Efecto de los inhibidores en la oxidación de tiosulfato y sulfuro de sodio.	87
VII	CONCLUSIONES	91
VIII	BIBLIOGRAFÍA	93

RESUMEN

Dentro de los contaminantes de ámbito mundial, los compuestos azufrados tienen gran relevancia debido al impacto ambiental adverso que provocan en la naturaleza. Entre los compuestos de azufre de mayor importancia que se emiten a la atmósfera se encuentran SO_2 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, H_2S , CS_2 y los compuestos volátiles del azufre. Su emisión al ambiente está asociado a: la lluvia ácida, fenómenos de corrosión, mal olor y daños a la salud debido a la toxicidad de algunos compuestos. En la actualidad el enfoque para resolver problemas de contaminación se ha modificado y los procesos fisicoquímicos en uso, empiezan a tener un complemento y alternativa en los procesos biotecnológicos, particularmente en las concentraciones de contaminantes, en donde empiezan a tener cada vez mayor interés y con resultados exitosos.

La finalidad del presente trabajo consistió en determinar parámetros cinéticos de crecimiento y oxidación de una cepa pura de *Thiobacillus* sp. Esto con el fin de aportar información básica sobre su actividad sulfoxidante. Para ello se implementaron dos sistemas donde la cepa se creció en cultivo continuo. Se lograron establecer los estados estacionarios de los sistemas a partir de los cuales se determinaron la velocidad máxima de crecimiento así como los rendimientos de crecimiento y eficiencias de oxidación. Por otro lado el trabajo fue complementado con estudios de respirometría donde se determinaron las velocidades de oxidación y la afinidad por los sustratos, así como el efecto de inhibidores de la oxidación.

En el cultivo continuo utilizando como sustrato al tiosulfato, se observó que la cepa de *Thiobacillus* sp en tasas de dilución entre 0.12 y 7.9 d^{-1} , todo el tiosulfato se oxidó completamente a sulfato, mientras que en una $D=9.2$ el microorganismo sólo transformó el 40% del sustrato a sulfato. Finalmente a una $D=9.8$ el sistema entró en condiciones de lavado por lo que el tiosulfato no fue oxidado. De este modo la tasa de dilución crítica fue de 9.8 d^{-1} y la μ_{max} fue de 0.4 h^{-1} . En lo que respecta a las eficiencias de oxidación se observó que en el intervalo de D entre 0.12 y 7.9, la eficiencia oxidativa se incrementó proporcionalmente al aumentar la tasa de dilución. Mientras que en una D de 9.2 la eficiencia oxidativa disminuyó (230g sustrato/g proteína d) con respecto al valor de $D=7.9$ (255.59 g sustrato/g proteína d). Al utilizar tiosulfato y/o sulfuro igualmente se incrementó la eficiencia oxidativa al incrementar la D . El rendimiento de crecimiento promedio obtenido para tiosulfato fue de 9.3 g biomasa/ mol $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y para sulfuro fue de 3.2 g biomasa/ mol S^2 . La velocidad máxima de oxidación con tiosulfato fue de 140 mg $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ /g proteína min. con una K_m de 5 mM. Mientras que con sulfuro se obtuvo una velocidad máxima de 10.49 mg S^2 /g proteína min. y una K_m de 0.3 mM. Finalmente los resultados del efecto de los inhibidores en la oxidación con tiosulfato y sulfuro mostraron que en el caso del NEM, la velocidad de oxidación disminuyó en un 20% para tiosulfato y 11% para sulfuro. En el caso del Cianuro de sodio (NaCN) la actividad sulfoxidante fue inhibida completamente en ambos sustratos en concentraciones de entre 1.5 y 2 mM.



I. INTRODUCCIÓN.

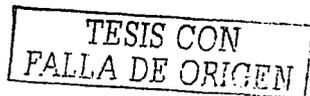
El azufre existe naturalmente en la tierra y la atmósfera. Sin embargo, el incremento de la actividad industrial interfiere en el ciclo natural del azufre provocando desbalances tanto en este ciclo como en el del carbono, nitrógeno y metales pesados. Muchos efectos adversos de la contaminación por azufre de fuentes antropogénicas se han reportado: la lluvia ácida, mal olor, la corrosión de acero y concreto y movilidad de metales pesados de los sedimentos y los minerales expuestos al aire por las actividades de minería.

Estos ejemplos muestran que la contaminación por azufre se encuentra en todos los compartimentos ambientales: aguas naturales y aguas residuales, la atmósfera, desperdicios sólidos, suelos y sedimentos.

Además de su importancia en la contaminación del medio ambiente y bioremediación, el ciclo del azufre es también importante desde el punto de vista más básico y científico. Las conversiones de azufre incluye el metabolismo de varios grupos específicos diferentes de la bacterias especializadas que usan estos compuestos de azufre (ejemplo: bacterias sulfato reductoras, bacteria incoloras de azufre, *Thiobacillus*). Estas bacterias se usan frecuentemente en la investigación frontal y para el desarrollo de nuevas técnicas analíticas.

El objetivo del presente trabajo es estudiar las características de crecimiento y los parámetros cinéticos de oxidación de una cepa pura sulfoxidante. Este microorganismo fue aislado por el grupo de investigadores donde se desarrollara este trabajo de investigación, y su identificación, de acuerdo al análisis completo del RNA (16s), mostró una similitud con un *Halothiobacillus neapolitanus* en un 97% y *Thiobacillus* sp. W5 en un 94%.

El trabajo aportará datos de importancia para el desarrollo de procesos biotecnológicos, para solucionar los problemas ambientales antes mencionados: se podrá determinar



rendimientos de crecimiento, la velocidad de crecimiento, la velocidad de oxidación, y se podrá comparar con los datos que se han reportado por el grupo para consorcios sulfoxidantes.

Es claro que la presente investigación queda enmarcada en los estudios básicos que se desarrollan actualmente en el laboratorio junto con otros temas de investigación como la aplicación de herramientas de biología molecular en el mismo microorganismo de estudio.

1. EL CICLO 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 (Takuwa, 1992; Robertson y Kuenen, 1991). Una cantidad de azufre, en todas sus formas tanto de fuentes naturales como antropogénicas, que se encuentran 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 (sulfhidrilo R-SH y sulfuro HS⁻), 0 (azufre elemental, S⁰) y +6 (sulfato).

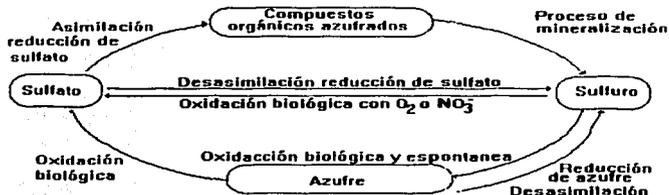


Figura 1. Ciclo biológico de azufre

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

- 1) Una Etapa Reductiva.
- 2) Una Etapa Oxidativa.

1) 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 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.

2) **ETAPA OXIDATIVA.** La segunda etapa del ciclo 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 fotótrofos (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 DEL AZUFRE Y SU RELACION CON EL MEDIO AMBIENTE.

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

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

Los seres vivos necesitan del 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

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

años la producción mundial de ácido sulfúrico fue de entre 133 y 152 millones de toneladas por año.

El azufre elemental excede de 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).

El conocimiento del ciclo del azufre nos permite conocer los compuestos involucrados en proceso químico y/o biológico de oxidación-reducción del azufre. Y de esta manera poder cerrar los balances del azufre.

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).

La lluvia ácida es una precipitación acuosa que contiene en disolución los ácidos sulfúrico y nítrico producidos por la combinación de los óxidos de azufre (SO_2) y de nitrógeno (NO_2) con el vapor de agua de la atmósfera. Una lluvia se considera ácida si su pH es inferior a 5.6 y es una consecuencia directa de los mecanismos de autolimpieza de la atmósfera. El dióxido de azufre se origina por combustión de carbones y de petróleos o sus derivados en automóviles, centrales termoeléctricas, calderas de calefacción, en la incineración de basura, en diversos procesos industriales como la obtención de papel y de cartón, en la fabricación de ácido sulfúrico, etc. También puede originarse por oxidación del H_2S originado por fuentes naturales e industriales.

La lluvia ácida provoca la acidificación de las aguas de los ríos y lagos, que las hace no potables. En el suelo origina una excesiva acidificación y un empobrecimiento en ciertos nutrientes.

La toxicidad del ácido sulfhídrico se presenta en la Tabla 1 y donde se observa que a partir de 20 ppm ya se requiere equipo de protección para su manejo.

Tabla 1. 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 8 h
20 ppm	Se requiere 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 para respiratorio y muerte.

Janssen A., (1996)

1.2 EJEMPLOS ESPECIFICOS DE CONTAMINACIÓN CON COMPUESTOS DE AZUFRE.

Entre los compuestos de azufre de mayor importancia que se emiten a la atmósfera se encuentran el SO₂, el S₂O₃²⁻, el H₂S y el CS₂ 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 (SO₂) y el trióxido de azufre (SO₃) junto con sus ácidos correspondientes y sus sales en macropartículas son contaminantes frecuentes en la atmósfera 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 de origen del combustible, ya que su contenido de azufre generalmente varía de 0.1 a más del 5%. El dióxido de azufre es un compuesto no 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 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 de 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 (Warner, 1980; Bailey y col., 1978).

1.2.2 SULFURO DE HIDROGENO (H_2S).

El sulfuro de hidrógeno, H_2S , es la forma más reducida de azufre y es muy tóxico, inflamable, fuerte irritante de ojos y mucosas, y es altamente soluble en agua

(aproximadamente 0.1 M a 25°C) con un pK_1 alrededor de 7 y un pK_2 de 13. El sulfuro de hidrógeno se prepara tratando el sulfuro de hierro II, con ácido sulfúrico:



El H_2S se emite en el 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 intermediario de la oxidación biológica del 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, tuberías de acero; su emisión al ambiente además de su toxicidad genera olores desagradables 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 se muestran los niveles de toxicidad del ácido sulfhídrico y sus efectos sobre salud. Es de destacar las bajas concentraciones en que el compuesto es tóxico.

1.2.3 TIOSULFATO

El tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) 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 del 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 ORGANICOS VOLATILES DE AZUFRE

Además de las formas inorgánicas de azufre, existen 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 (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 Lagenthobe, 1998). Entre los compuestos que se han identificado se encuentran el metanotiol (descomposición de

cebada), el dimetil sulfuro (descomposición de vegetales), demetilpolisulfuros (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 han reportado que en la industria de viscosa y celofán se emite a la atmósfera concentraciones del compuesto de hasta 4000 ppm (Estrada, I. 1998).

2. CULTIVO DE MICROORGANISMOS.

2.1 PROCESOS BIOLÓGICOS DE ELIMINACIÓN DE COMPUESTOS REDUCIDOS DE AZUFRE.

Para el tratamiento de emisiones de compuestos de azufre del ambiente se utilizan diferentes procesos tanto fisicoquímicos como biológicos. En general los procesos fisicoquímicos requieren altos flujos de energía. Sin embargo, no es este el 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 pueden oxidar los compuestos de azufre de interés, entonces queda a consideración el costo de su aplicación. En este sentido, se han 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 fisicoquímicas y una tecnológica denominada Thiopaq, la cual utiliza microorganismos del genero *Thiobacillus* en el proceso. El "biotratamiento" presenta ventajas económicas hasta concentraciones de 3500ppm sobre los tratamientos fisicoquímicos.

Los procesos biológicos de tratamiento (Tabla 2) de efluentes con compuestos de azufre tienen una aplicación diversificada (Alcántara, 2000). 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).

2.2 PARAMETROS DE CRECIMIENTO

La observación cualitativa si hay o no crecimiento en un cultivo es útil para muchos objetivos. La nueva información obtenida cuando el crecimiento es medido cualitativamente es frecuentemente presentada en forma de una grafica de biomasa contra el tiempo. Los datos pueden ser presentados más significativos y concisos si estos son analizados en cuanto a varios parámetros de crecimiento: la velocidad de crecimiento específico o duplicación del tiempo de biomasa, crecimiento retrasado, rendimiento del crecimiento, cocientes metabólicos por la utilización de sustrato y productos de formación, afinidad de sustratos y biomasa máxima. Los parámetros de crecimiento son definidos con referencia al crecimiento de un simple cultivo homogéneo en lote. Tal sistema es supuesto para consistir en un lote bien mezclado de un medio inoculado. Se asume que la mezcla es adecuada para dispersar la biomasa y que el medio es libre de concentraciones disminuidas.

Tabla 2. Procesos biológicos de oxidación de compuestos reducidos de azufre.

Proceso biológico	Microorganismos	Reacción
Anaerobio por bacterias fotosintéticas 1, 2	<i>Chlorobiaceae</i> <i>Chromatiaceae</i>	$2n \text{ H}_2\text{S} + n\text{CO}_2 \xrightarrow{\text{lx}} 2n\text{S}^0 + n(\text{CH}_2\text{O}) + \text{H}_2\text{O}$
Bacterias facultativas 3	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	$\text{H}_2\text{S} + \begin{matrix} n\text{O}_2 \\ n\text{NO}_2 \end{matrix} \longrightarrow n\text{SO}_4$
Proceso Químico-Biológico 4	<i>Thiobacillus ferroxidans</i>	$\text{H}_2\text{S} + \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 \longrightarrow \text{S}^0 + 2\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4$ $2 \text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{SO}_4 + \frac{1}{2} \text{O}_2 \xrightarrow{\text{Zf}} \text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3 + \text{H}_2\text{O}$
Aerobio 5, 6	<i>Thiobacillus</i> spp	$\text{H}_2\text{S} + \frac{1}{2}\text{O}_2 \longrightarrow \text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$ $\text{S}^0 + \text{H}_2\text{O} + \frac{3}{2} \text{O}_2 \longrightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$

1. Cork y col. (1986) *Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser.* 16: 149-162
2. Khanna y col (1996) *Current Microbiology* 32: 33-37
3. McComas y col. (2001) *Appl. Biochem. Biotech.*, 51/52: 761-770
4. Saito y col. (1983) *Hydrocarb. Process. Int. Ed.*, 76: 761D-761F
5. Alcántara y col. (1999) *Biotechnol. Lett.* 21: 815-819
6. Buisman y col. (1994) *Symp. Biol. W.Gas Clean.* 95-103

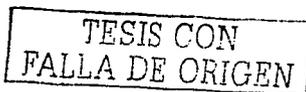
VELOCIDAD DE CRECIMIENTO ESPECIFICO

Las condiciones para el crecimiento de biomasa en un cultivo son: (i) un inoculo viable, (ii) una fuente de energía, (iii) los materiales para suministrar los nutrientes indispensables de los cuales se produce la biomasa, (iv) ausencia de inhibidores, el cual impiden el crecimiento, (v) apropiadas condiciones fisicoquímicas.

Si todos los requerimientos para el crecimiento son satisfactorios, entonces durante un intervalo infinitamente pequeño de tiempo (dt) uno espera el incremento en biomasa (dx) esta es proporcional a la cantidad (x) presente y el intervalo de tiempo; esto es :

$$dx = \mu x dt$$

Por lo tanto:



$$dx/dt = \mu x$$

El coeficiente diferencial (dx/dt) expresa la tasa de crecimiento poblacional. El parámetro μ representa la velocidad de crecimiento por unidad de la cantidad de biomasa $(1/x)(dx/dt)$, este término es la velocidad específica de crecimiento y tiene la dimensión del tiempo recíproco $(1/t)$. Este es análogo a la velocidad del compuesto de interés en una inversión así una velocidad específica de crecimiento de 0.1 h^{-1} es equivalente a un compuesto de interés con velocidad del 10 % por hora.

Cuando μ es constante, la integración de la ecuación $dx/dt = \mu x$ da:

$$\ln x = \ln x_0 + \mu t$$

donde x_0 es la biomasa cuando $t = 0$. La gráfica de $\ln x$ contra el tiempo debe ser una línea recta con inclinación, μ . Si los logaritmos son convertidos a la base 10 entonces la ecuación $\ln x = \ln x_0 + \mu t$, se convierte:

$$\log x = \mu t / 2.30 + \log x_0$$

Para poner la ecuación $\ln x = \ln x_0 + \mu t$, en la forma $\ln (x/x_0) = \mu t$. Ello queda:

$$x = x_0 e^{\mu t}$$

El crecimiento el cual se otorga con estos principios es llamado constante exponencial o crecimiento logarítmico. La medida básica de la velocidad de crecimiento es la velocidad de crecimiento específico. Las otras medidas las cuales están dadas mas adelante pudiendo ser relacionadas con la velocidad de crecimiento específico.

TIEMPO DE DUPLICACIÓN

La relación entre la velocidad específica de crecimiento y el tiempo de duplicación (td) de la biomasa se obtienen de la ecuación $\ln (x/x_0) = \mu t$; haciendo $x = 2x_0$ y $t = td$, se obtiene

$$td = \ln 2/\mu = 0.693/\mu$$

2.3 CULTIVO EN LOTE

El cultivo en lote (batch) es una forma de crecimiento de microorganismos en un tiempo definido. Este se realiza en un volumen fijo de un medio de cultivo que contiene todos los nutrimentos necesarios para el crecimiento celular. Debido a que no se adicionan más nutrimentos en el tiempo del cultivo, estos se van agotando lo que define el crecimiento microbiano, por lo tanto el crecimiento y la producción de metabolitos cesa en el momento en el que el nutrimento ha sido empleado. Algunos autores señalan que en determinado momento el medio de cultivo se modifica por el efecto del crecimiento microbiano en proliferación, de manera que ya no es adecuado para su mismo crecimiento (por cambios de pH, productos secundarios, etc.).

Para el entendimiento del comportamiento del crecimiento microbiano en un tiempo definido (lote) se han descrito cuatro etapas básicas del comportamiento celular: Fase Lag o de Retraso, Fase Exponencial, Fase Estacionaria y Fase de Muerte.

2.3.1 FASES DE CRECIMIENTO EN CULTIVO EN LOTE (Batch)

Cuando se inoculan bacterias en un medio fresco, la curva de crecimiento suele mostrar 4 fases:

Fase Lag o de retraso

Es el tiempo necesario para la adaptación de los microorganismos al nuevo medio donde se siembran. Durante esta fase los microorganismos no permanecen inactivos, al contrario, durante esta fase cada una de las células incrementa su tamaño, y no hay división. La actividad metabólica es muy intensa, donde hay la formación de enzimas y otros

intermediarios que se acumulan hasta alcanzar concentraciones que permitan la división celular la cual inicia lentamente y después se acelera con rapidez. Después de ello el cultivo entra a la fase exponencial. Cuando se usa como inóculo células en estado metabólico latente los factores de importancia crítica para iniciar el crecimiento son: el pH, temperatura, concentraciones adecuadas de oxígeno y concentraciones de sustrato.

Fase Exponencial

Durante este periodo las células se multiplican exponencialmente. En condiciones apropiadas durante esta fase se logra la máxima velocidad de crecimiento, es decir alcanza la auténtica fase de desarrollo. La población de microorganismos es casi uniforme en composición química, actividad metabólica y otras características fisiológicas. Esta fase continúa hasta que sucede una de dos cosas: que uno o más nutrientes del medio se agoten como ocurre generalmente o que se acumulen productos tóxicos e inhiban el crecimiento, tan pronto como esto ocurre cesa el crecimiento y las células entran en fase estacionaria. Las células pueden conservarse en fase exponencial utilizando un aparato de flujo continuo llamado Quimioestado, que conserva un cultivo con población y multiplicación constante.

Fase Estacionaria

Gradualmente el progresivo agotamiento de los elementos nutritivos empieza a alargar la velocidad de duplicación y en poco tiempo el crecimiento se detiene. Aunque la capacidad de reproducirse no desaparece, el número de microorganismos que se forman se equilibra con el de aquellos que pierden su viabilidad. La acumulación continua de

productos de desecho y de circunstancias desfavorables, antecede la interrupción completa de la división bacteriana. Por lo tanto el cultivo en esta forma entra poco a poco en una fase de muerte.

Fase de Muerte

Los nutrientes siguen agotándose, por lo que normalmente las células se autodigieren y acaban por sufrir autólisis. Indudablemente, gran variedad de condiciones contribuyen a la muerte, pero las más importantes son el agotamiento de sustancias nutritivas indispensables y la acumulación de productos inhibidores, como ácidos. Durante esta fase, el número de células viables desciende y se pierde toda capacidad metabólica y de división.

2.4 CULTIVO CONTINUO: REACTOR.

Un cultivo continuo es básicamente un sistema de flujo de volumen constante al que se le agrega continuamente medio y del cual algún dispositivo permite la eliminación constante del medio excedente. Puesto que un sistema de este tipo se encuentra en equilibrio, el número de células y su estado nutritivo permanecen también constantes, considerándose entonces que el sistema se encuentra en un estado estable. El tipo más frecuente de dispositivo para cultivo continuo es el llamado quimiostato.

El quimiostato consiste en un cultivo en el cual un medio de cultivo se alimenta continuamente y se elimina a una velocidad constante manteniéndose el volumen del cultivo constante. Idealmente la mezcla puede ser perfecta, lo que significa que al introducir el medio éste se distribuye instantánea y uniformemente en todo el cultivo. En la práctica esto significa que el tiempo requerido para mezclar un volumen pequeño de medio

de cultivo (una gota por ejemplo) debe ser mínimo comparado con el tiempo de residencia (t_r) dado por la relación volumen/Flujo (V/F), donde V = volumen del cultivo y F = la velocidad de flujo del medio.

Cuando en el quimiostato se mantiene un flujo y volumen constante de medio, la velocidad de crecimiento del cultivo iguala exactamente a la velocidad de entrada y de salida del medio de cultivo. La concentración de biomasa en el reactor, es por tanto, mantenida constante siempre que la velocidad de flujo del medio, que llamamos F ($L \cdot h^{-1}$) y el volumen de la vasija, que llamamos V (L), den lugar a una velocidad de flujo por unidad de volumen que será F/V . Este cociente se conoce como la tasa de dilución D (d^{-1}). Podemos deducir la relación existente entre D y la velocidad específica de crecimiento μ (que también tiene unidades de h^{-1}), describiendo un balance de masas de esta forma:

El aumento de biomasa en el cultivo continuo es igual al crecimiento menos la biomasa de salida del reactor.

$$\text{Esto es:} \quad dx/dt = \mu x - Dx.$$

Puesto que la concentración de biomasa en el quimiostato permanece constante, cuando se alcanzan condiciones de estado estacionario se cumple que:

$$dx/dt = 0 \text{ y } \mu = D.$$

En el control de un quimiostato se emplean dos elementos, la velocidad de flujo y la concentración de un nutriente limitante, como el carbono, fuente de energía o nitrógeno o un factor de crecimiento. En el quimiostato la velocidad a la que un cultivo es diluido gobierna la velocidad de crecimiento y el tamaño de la población es gobernado a su vez por la concentración del sustrato limitante.

El sustrato limitante (S_r) define también la velocidad de dilución crítica (D_c) de la siguiente manera:

$$D_c = \mu_{\max} (S_r / K_s + S_r)$$

Los estados de equilibrio sólo son posibles cuando las velocidades de dilución no exceden del valor crítico (D_c).

Los reactores continuos, por su parte, se suelen emplear en producciones grandes, donde comparados con los reactores discontinuos, generalmente presentan las siguientes ventajas:

- a) Disminuyen los costos de operación al eliminar la carga y descarga de los reactores y facilitar el control automático;
- b) Mejoran el mantenimiento de la calidad del producto al ser las condiciones de operación más probables.

Los dispositivos para cultivo continuo (quimioestatos) son un medio para mantener la población en crecimiento exponencial durante largos períodos.

El reactor continuo de tanque agitado (RCTA) consiste usualmente en un tanque cilíndrico bajo, en el que es esencial una buena mezcla de contenido pues, de otra manera habría cortocircuitos entre la corriente de entrada y la de salida de manera que gran parte del volumen sería espacio muerto. La agitación es pues una característica extremadamente importante, considerándose que una buena aproximación a una mezcla perfecta no es difícil

alcanzar una buena mezcla es que todos los elementos del fluido en el tanque tengan virtualmente la misma composición.

Una gran ventaja del RCTA, aparte de la simplicidad de construcción, es el fácil control de la temperatura y del pH. El material que entra en un tanque dado se sumerge inmediatamente en un gran volumen de fluido parcialmente fermentado y, a causa de la agitación, las variaciones locales de temperatura y de pH son mínimas. Los recipientes, ofrecen la oportunidad de proporcionar un área muy grande de superficie refrigerante; además de la superficie externa de serpentines refrigerantes sumergidos.

Un RCTA no necesita ser básicamente diferente al reactor discontinuo, excepto en que se añaden dispositivos para la alimentación y descarga en continuo. La diferencia fundamental esta en el hecho de que el contenido del recipiente está en estado estacionario, es decir no varía mucho con el tiempo; esto se aplica a la retención de microorganismos y a la concentración de los componentes del medio en el reactor. Las condiciones de estado estacionario pueden alcanzarse operando sobre principios quimiostáticos. Estos implican ajustar el caudal de alimento al fermentador a un valor apropiado y constante, permitiendo a las concentraciones de microorganismos, sustrato, y producto bioquímico alcanzar sus niveles naturales.

La consecuencia inmediata de la condición de estado estacionario es que para una operación económicamente satisfactoria, las condiciones ambientales seleccionadas para el reactor deben conducir a rendimientos aceptables de productos microbianos y bioquímicos. Este simple hecho requiere un profundo conocimiento de los factores fisiológicos y bioquímicos que influyen en la actividad microbiana.

2.5 OBJETIVOS ESPECIALES DE CULTIVOS QUIMIOSTATOS

Los tres únicos objetivos de cultivos en quimiostatos en el control del crecimiento y comportamiento de microorganismos son formulados a continuación:

- I) El quimiostato permite que la velocidad de crecimiento de la biomasa varíe en función de la concentración de sustrato sin otro cambio en el cultivo. En un cultivo en lote simple, los cambios de velocidad de crecimiento pueden ser solamente logrados por cambios cualitativos en la nutrición o por cambios cuantitativos en condiciones fisicoquímicas tal como temperatura o valor de pH. Tales métodos de velocidad de crecimiento causan cambios introduciendo otros efectos con el cual pueden enmascarar el efecto de velocidad de crecimiento, por ejemplo, el cambio en la temperatura puede afectar independientemente la velocidad de crecimiento y contenido de RNA de bacterias.
- II) El segundo objetivo es lo contrario de I, que es la fijación de la velocidad de crecimiento mientras el ambiente es alterado. Este objetivo es esencial para distinguir entre los efectos de los cambios de velocidad de crecimiento y los cambios ambientales.
- III) La tercera propuesta es mantener los sustratos limitados de crecimiento con una velocidad de crecimiento constante. Los sustratos limitan el crecimiento pudiendo ser solo obtenidos transitoriamente en un cultivo lote y siempre acompañadas por un cambio en la velocidad de crecimiento. Esta función del quimiostato es aumentar el posible rango de ambientes constantes para incluir

no solamente los extremos de exceso y agotamiento de los sustrato limitados de crecimiento, también todos estados intermediarios

El método quimiostato simplifica sistemas de cultivo y por medio de eso facilita la elucidación de la reacción de los organismos en este ambiente, y control de un proceso microbiano. Las ventajas de esta simplificación es que esta aumentando en importancia con interacción de dos o mas especies en un cultivo estas pueden ser investigadas y controladas.

2.6 EJEMPLOS DE CULTIVO CONTINUO PARA LA OXIDACIÓN DE COMPUESTOS REDUCIDOS DE AZUFRE.

En el caso de los compuestos reducidos de azufre se han utilizado los reactores totalmente agitados, que utilizan un consorcio sulfoxidante (Buisman y col. 1989) o 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.

Buisman et al 1990, reporta que las concentraciones de sulfuro debajo de 20 mg/l, la concentración de oxígeno puede mantenerse bajo (debajo de 0.1 g/l) en orden para suprimir la oxidación de azufre a sulfato.

Por eso la concentración de sulfuro arriba de 20 mg/l, la formación de azufre es independiente de la concentración de oxígeno. Sin embargo, el oxígeno puede ser aumentado en orden para incrementar la oxidación del sulfuro. Conforme a este dato Janssen et al., 1995 fundamenta que el óptimo oxígeno molar es proporcional al sulfuro,

para mejorar la acumulación de azufre, es cerca de 0.7. Los mismos autores (Janssen et al., 1997) describen el funcionamiento de la oxidación del sulfuro desarrollado en el reactor de lecho expandido, el cual es designado para la estimulación de la formación de sulfuro donde especialmente es separado. Un sedimento de azufre bien arreglado, el cual consiste principalmente de azufre elemental (92%) y biomasa (2%), es obtenida por los autores.

Steffes et al. (1996) reportaron que *Thiobacillus* sp. y *Thiobacillus lepadarius* acumulan azufre elemental desde sulfuro de hidrogeno parcial o oxidación de Tiosulfato, indistintamente. Ello también fundamenta que el azufre elemental es formado por debajo de oxígeno limitado (0.1% DO) o la velocidad carga de sustrato alta ($Q=18$ mmol/h). El sulfuro y tiosulfato así ponen a prueba para ser sustratos intercambiables para bacterias quimiolitotrofas produciendo azufre y sulfato.

3. FISIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA DE MICROORGANISMOS SULFOXIDANTES.

3.1 MICROORGANISMOS QUIMIOLITOTROFOS

3.1.1 Bacterias sulfoxidantes.

El nombre "bacterias incoloras del azufre" ha sido usado desde Winogradsky para designar a los procariontes capaces de utilizar compuestos reducidos del 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 3 se en listan algunos géneros de estos microorganismos, la fuente de energía que utilizan, así como el intervalo de pH en el cual crecen.

La mayor parte de los crecimientos 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, tanto en cultivos puros como en consorcios (Stuedel, 1998; Buisman, 1989). Su estudio ha permitido entender de manera más detallada y precisa las rutas bioquímicas de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre.

Tabla 3. 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 thioparus</i>	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiobacillus neapolitanus</i>	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O 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>Beggiatoxa</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>Thermothix</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>Acidithiobacillus</i>	S ⁰	1-5
<i>Sulfotobus</i>	H ₂ S, S ⁰	1-4

Madigan y col. (1999)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Algunas especies son capaces de vivir en ambiente 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.

Existen diversas especies del genero *Thiobacillus* que tienen actividad en intervalos de pH que van de 0.5 a 10 con temperaturas entre 20 y 75°C. La mayoría son autótrofas, pero también pueden crecer heterotróficamente. Se encuentran en diferentes ambientes: suelo, agua, desechos ácidos y aguas sulfurosas.

Los estudios de crecimiento en medios sintéticos ha permitido identificar diversas fuentes de carbono que son utilizados por estos microorganismos. Esto permitió establecer dos clases de microorganismos de acuerdo a la capacidad de crecimiento de 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 han 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. ASPECTOS MICROBIOLÓGICOS

Los thiobacilli son microorganismos aerobios y anaerobios facultativos, gram negativos con forma de bacilos pequeños que miden 0.3 μm de ancho por 1-3 μm de largo, móviles por un flagelo sencillo, no son formadores de esporas y crecen entre los 25 -35°C. Son quimiolitótrofos y con actividad de citocromos importante. La energía necesaria para llevar a cabo sus funciones se deriva de la oxidación de uno o más compuestos reducidos de azufre incluyendo sulfuros, tiosulfato, azufre elemental, sulfito, tiocianato y politionatos. Con compuestos orgánicos se afecta el crecimiento. Algunas especies son capaces de vivir en ambientes altamente ácidos, pueden utilizar 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. Son microorganismos de acuerdo a su capacidad de crecimiento de fuentes orgánicas de carbono como quimiolitótrofos. Los thiobacilli, son los más estudiados debido a que pueden cultivarse fácilmente en el laboratorio. Su estudio ha permitido entender la manera más detallada y precisa las rutas bioquímicas de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre.

También existen otras especies microbianas que usan compuestos reducidos de azufre como fuente de energía para su crecimiento. Sin embargo solo seis géneros se han cultivado consistentemente *Thiobacillus*, *Thiosphaera*, *Thiomicrospira*, *Thermotrix*, *Beggiatoa* y *Sulfolobus*.

4.1 ESTRUCTURA CELULAR DE LOS Thiobacilli.

La estructura de la envoltura celular de las bacterias gram negativas, en el caso de los thiobacilli, está más diferenciada que 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 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, fosfatasa, glicosidasas, nucleasas, proteasas y lipasas, capaces de hidrolizar toda clase de componentes que entran a 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 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 que 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 proteínicas 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 nutrimentos están 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.

4.2. SITIO DE OXIDACIONES QUIMIOLITOTROFICAS.

4.2.1 PERIPLASMA.

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 contienen 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, aa 3 y otras oxidasas) así como otros acarreadores de electrones y protones y las enzimas como 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, 1978).

Muchos de los sistemas enzimáticos para la oxidación de los 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 han localizado completamente en el periplasma (Kelly, 1997).

4.3 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 (o compuestos oxidados de nitrógeno, como en el caso de *Thiobacillus* $\Lambda 2$ y *Thiobacillus denitrificans*), ya que su metabolismo endógeno básico es similar al de cualquier otra bacteria. En el sistema de transporte de electrones de thiobacilli se han 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. Esto 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 aerobía 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 citocromo 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) esta enlazado al citocromo c via citocromo c551, de nitrito reductasa; no ha sido establecido un mecanismo para el transporte de electrones durante la oxidación de poliazufre a sulfito.
- B) La nitrito reductasa puede transferir alternativamente electrones al oxigeno.
- C) Se ha propuesto que la ATP sulfurilasa, más que la ADP sulfurilasa, es la enzima terminal de la ruta.

4.4 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 sostiene que posiblemente existen 2 procesos básicos de oxidación de compuestos reducidos de azufre (azufre, sulfuro y tiosulfato). Estos son los siguientes:

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- 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 sp.*, *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 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y SO_3^{2-} por *Thiobacillus* (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).

4.4.1 Sulfuro

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

- a. azufre elemental como producto: $\text{S}^{-2} \rightarrow \text{S}^0$
- b. Sulfato como producto: $\text{S}^{-2} \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$

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.

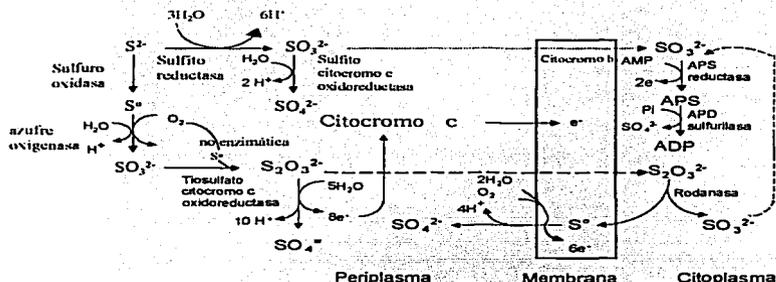


Figura 2. Arreglo de las enzimas involucradas en la oxidación de compuestos de azufre reducidos. El esquema está compuesto de las reacciones catalizadas por diferentes especies de thiobacilli. (Hooper y DiSpirito, 1985).

4.4.2 Tiosulfato

Las enzimas periplásmicas involucradas específicamente en la oxidación de tiosulfato por *Paracoccus versutus* (enzima A, enzima B, citocromo c552, citocromo c552.2 y oxidoreductasa sulfito: citocromo c también han sido llamadas sistemas multienzimático oxidante de tiosulfato o TOMES (por sus siglas en inglés). El TOMES 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).

4.5 INHIBIDORES.

Se han utilizado ciertos inhibidores para establecer las rutas metabólicas de thioabacilli. Los intermediarios en la oxidación de compuestos azufrados se acumulan cuando su oxidación es inhibida; se sabe que la N-etilmaleimida (NEM) inhibe la oxidación de azufre elemental, la N-óxido-2-N-heptil-4-Hidroxiquinolina (HQNO) y la antimicina A son inhibidores de la oxidación de sulfito (Hallberg et. al. 1996; Chan y Suzuki, 1994; Chan y Suzuki, 1993; Suzuki et. al. 1992).

Los electrones de los compuestos reducidos de azufre, entran a la cadena respiratoria en varios puntos (en función del potencial de reducción de los mismos compuestos reducidos de azufre) de acuerdo a Madigan et. al 1999. Los inhibidores de cadena respiratoria bloquean el transporte de electrones en sitios específicos. El cianuro bloquea el transporte de electrones a nivel de citocromo c.

Varios autores han utilizado el NEM para la caracterización de enzimas y para establecer las rutas metabólicas de la oxidación de compuestos reducidos de azufre. En general, solamente los grupos sulfhidrilos de las proteínas más reactivos se combinan con compuestos que contienen un enlace doble activado para formar tioésteres estables; el NEM ha demostrado ser muy útil para este propósito (Riordan y Vallee, 1971).

Los inhibidores sulfhidrilos como el p-cloromercuribenzoato (1 mM) reducen aproximadamente 73% de la actividad enzimática. Los agentes quelantes (bipiridil 1 mM) reducen en 50% la actividad de la enzima. La inhibición con sulfito fue extremadamente fuerte causando una pérdida de actividad del 50% con 5µm. Los autores reportaron un

efecto menos inhibitorio del NEM (1 mM) con respecto a otros inhibidores sulfhidrilos sobre la actividad de la enzima sulfito oxidasa en extractos de *Thiobacillus thioparus*. Asimismo, estos autores (1970b) estudiaron el efecto del NEM (1-5 mM) sobre la actividad de la tiosulfato oxidasa de *T. thioparus*, reportando que fue necesario un periodo de incubación de 15 minutos para incrementar la inhibición. Finalmente propusieron una ruta de oxidación para compuestos inorgánicos de azufre. Cuando se utiliza tiosulfato como fuente de energía, este puede ser , metabolizado de dos formas, 1) convertido a tetrationato por la enzima tetrationato oxidasa o 2) dividido para formar azufre y sulfito. La tetrationato oxidasa parece iniciar una ruta secundaria, con altas concentraciones iniciales de tiosulfato.

Hazeu et. al 1988 reportaron que el N-etilmaleimida (3mM) tienen un efecto inhibitorio sobre la oxidación del azufre, pero no sobre otros compuestos reducidos de azufre en *Thiobacillus ferrooxidans*. Esto sugiere que las enzimas con grupos sulfhidrilos pueden estar involucradas durante la oxidación de azufre elemental al estudiar la producción y utilización de azufre elemental intermediario, durante la oxidación microbiológica de compuestos reducidos de azufre por *T. ferrooxidans*.

Chan y Suzuki 1994 estudiaron la oxidación de tiosulfato por *T. thiooxidans* creciendo sobre azufre con células, extractos libres de células y enzima tiosulfato oxidasa. Usaron el NEM para establecer la ruta de oxidación del $S_2O_3^{2-}$, reportando que las células tratadas con NEM no fueron capaces oxidar azufre. Las células de *T. thiooxidans* pueden oxidar tiosulfato con un consumo de 2 mol O_2 / mol $S_2O_3^{2-}$. Las células tratadas con NEM consumieron solamente 0.5 mol O_2 / mol $S_2O_3^{2-}$ de acuerdo con la ecuación: $2 S_2O_3^{2-} + \frac{1}{2} O_2 + H_2O \rightarrow S_4O_6^{2-} + 2OH^-$. Los extractos libres de células de *T. thiooxidans* oxidaron tiosulfato en altas concentraciones con 0.25 mol O_2 / mol $S_2O_3^{2-}$.

Hallberg et. al. 1996 estudiaron la oxidación de compuestos reducidos de azufre en un sistema de células en reposo con *Thiobacillus caldus* KU. en ausencia y presencia de inhibidores y desacoplantes. Los desacoplantes 2, 4-dinitrofenol (DNP, 200 μ M) y cianuro de carbonilo m-clorofenil hidrazona (CCCP, 20 μ M) no tuvieron efecto sobre la oxidación del tiosulfato, sugiriendo que el tiosulfato es metabolizado periplásmicamente. Por lo contrario, estos desacoplantes inhibieron completamente la oxidación de $S_2O_6^{2-}$, S^2 , S^0 y SO_3^{2-} indicando que estos compuestos son metabolizados en el citoplasma de *T. caldus* KU. El NEM (6 mM) inhibió la oxidación de tetrionato y tiosulfato en la etapa de azufre elemental, mientras que el N-oxido-2-heptil-4-hidroxiquinolina (HQNO, 10 μ M) detuvo la oxidación de tetrionato, tiosulfato y azufre elemental en la etapa de sulfito. Encontraron los siguientes intermediarios en la oxidación de compuestos reducidos de azufre: el tiosulfato fue oxidado a tetrionato, el azufre elemental fue formado durante la oxidación de tetrionato y tiosulfato y el sulfito fue encontrado como intermediario del metabolismo de tetrionato y azufre.

Visser et. al (1997-a) estudiaron el efecto de inhibidores, entre ellos el NEM (1mM) y el cianuro de potasio (1mM), sobre la actividad enzimática de la tiosulfato deshidrogenasa aislada de *Thiobacillus* sp W5. La tiosulfato deshidrogenasa cataliza la reacción de oxidación del tiosulfato a tetrionato. Sus resultados mostraron que la adición de NEM o cianuro de potasio, no inhibe la actividad enzimática. Estos mismos autores (Visser et. al. 1997-b) reportan que no hubo inhibición del NEM (1mM) sobre la actividad de la flavocitocromo c sulfuro deshidrogenasa de *Thiobacillus* sp W5, aún preincubando con el inhibidor durante 5 minutos a 25°C. La adición de 25, 5, 75, y 95 % respectivamente. El cianuro ha sido reportado como inhibidor de las enzimas de bacterias fotótrofas del azufre.

Suzuki (1999) hace una revisión sobre la oxidación microbiana de compuestos inorgánicos de azufre, tanto de reacciones químicas como enzimáticas. La oxidación de tiosulfato es más compleja, existen al menos dos posibles rutas. Una es la ruta que comienzan con la división del enlace S-S por la rodanasa, seguido por la enzima azufre oxidasa. En presencia de HQNO, dos moles de sulfito se acumularían por un mol de tiosulfato con el consumo de un mol de oxígeno. En presencia del NEM el tiosulfato es oxidado a azufre más sulfato con $\frac{1}{2}$ mol de oxígeno. En ausencia de inhibidores, ambos átomos de azufre son oxidados a sulfato con el consumo de dos moles de oxígeno. La segunda ruta comienza con la condensación de dos moles de tiosulfato a tetrationato por la tetrationato hidrolasa. Estas dos reacciones dan la oxidación de tiosulfato a azufre y sulfato con el consumo de $\frac{1}{2}$ mol de oxígeno en presencia de NEM para inhibir la oxidación del azufre, un resultado idéntico a la primera ruta. Si están presentes ambos inhibidores, NEM y HQNO, en la primera ruta la oxidación de tiosulfato se detendría ya que ambas reacciones de oxidación de azufre y sulfito son inhibidas, pero no en la segunda ruta, ya que la oxidación de tiosulfato no es inhibida.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El estudio de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre utilizando una cepa pura de *Thiobacillus* sp. aportará información de los parámetros de oxidación en quimiostato. Los datos obtenidos permitirán profundizar en el conocimiento de los procesos biológicos desarrollados con el fin de disminuir los problemas ambientales ocasionados por este tipo de compuestos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

III. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL:

- Estudiar la oxidación de compuestos reducidos de azufre por *Thiobacillus* sp. en quimiostato.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS:

- Implementar el cultivo continuo de *Thiobacillus* sp. utilizando como fuente de energía al tiosulfato y al sulfuro.
- Evaluar el efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento de *Thiobacillus* sp. y la oxidación de tiosulfato.
- Determinar los rendimientos de crecimiento, la velocidad máxima de crecimiento (μ_{max}) y las tasas de oxidación de tiosulfato y sulfuro por la cepa.

IV. HIPÓTESIS.

Thiobacillus sp. puede ser cultivado en cultivo continuo utilizando como fuente de energía a el tiosulfato o al sulfuro. Lo cual permitirá determinar los parámetros cinéticos y de rendimiento de la cepa para estos compuestos reducidos de azufre.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V. MATERIAL Y MÉTODOS:

5.1 MATERIAL BIOLÓGICO:

La cepa pura de *Thiobacillus* sp. fue proporcionada por el laboratorio W-107 de tratamiento de emisiones gaseosas en la UAM-Iztapalapa. Este microorganismo se obtuvo de un consorcio sulfoxidante y fue identificado por metodologías moleculares.

5.2 MEDIO DE CULTIVO

Los microorganismos se crecieron en un medio descrito por Sublette (1987), utilizando tiosulfato como fuente de energía. El tiosulfato de sodio se utilizó como modelo de estudio en el trabajo, dado que permite su manipulación sin riesgos asociados a toxicidad. Es importante señalar que este compuesto se ha utilizado como modelo para estudios de la sulfoxidación (Sublette, 1987; Steffen y col., 1996; Kelly y col., 1997).

La composición del medio es el siguiente:

COMPUESTO	g/L
Na_2HPO_4	1.2
KH_2PO_4	1.8
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.1
NH_4Cl	0.5
CaCl_2	0.03
MnSO_4	0.02
FeCl_3	0.02
NaHCO_3	1.0
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	10

En este medio se utilizó como fuente de nitrógeno el cloruro de amonio, mientras como fuente de carbono el NaHCO_3 , el cual fue esterilizado mediante filtración y adicionado al recipiente en fresco. Y como única fuente de energía, como se menciono anteriormente fue el tiosulfato de sodio. El pH final del medio fue de 6.5 a 7.

5.3 INOCULO.

Para las cinéticas de crecimiento se utilizó el siguiente procedimiento:

En matraces Erlenmeyer de 250ml con 100 ml de medio, se inoculó con 0.1 ml de glicerol. Se dejaron crecer por 2 días a pH 7, a temperatura 30°C y se agitaron a 180 rpm. Después de 48 horas (fase estacionaria de crecimiento), los cultivos provenientes de 2 matraces se centrifugaron a 10,000 rpm y se resuspendieron en una solución salina estéril al 0.85%. Posteriormente se llevo a una DO (densidad óptica) de 1 para su posterior inoculación en matraces y en el reactor.

5.4 CULTIVO CONTINUO.

Utilizando un reactor, Applikon ADI 1030, se inició el cultivo continuo del microorganismo. Se utilizó una concentración inicial de tiosulfato de 10 g/l. El cultivo se inició primeramente en lote y cuando se alcanzó la fase estacionaria, se inició la alimentación continua del medio mineral estéril al reactor. Las condiciones para su desarrollo fueron a pH de 6.5 y a una temperatura de 30°C . A continuación cuando el cultivo continuo se encontró en fase estacionaria se evaluaron:

Diferentes tasas de dilución (d^{-1}):

0.12, 0.3, 0.7, 1.5, 2.2, 2.5, 3.2, 3.8, 4.5, 4.8, 5.2, 6.0, 6.8, 7.4, 7.9, 9.2, 9.8

Las concentraciones de tiosulfato utilizadas fueron (g/L): 4.5, 2.25, y 1.35.

Los estados estacionarios se tomaron cuando transcurrieron de 3 a 5 tiempos de residencia, como mínimo.

5.5 ESTUDIOS DE RESPIROMETRIA.

El inóculo utilizado para los estudios de respirometría se preparó de la siguiente forma:

Se tomaba efluente resultante del reactor, el cual fue centrifugado y resuspendido en medio mineral sin tiosulfato y sin fuente de carbono o en su caso se utilizó solución salina al 0.85%. Para evaluar la velocidad de oxidación para el tiosulfato se utilizaron las siguientes concentraciones: 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40 mM. Mientras que para el sulfuro de sodio fueron las siguientes concentraciones 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 5 mM.

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 de fosfatos a pH de 6.5 por aproximadamente 30 minutos. Esto con el propósito de saturarlo de oxígeno.
2. Se calibro el equipo y en el reactor con capacidad de 1500 ul, se colocan 1300 ul de buffer, mas 100ul de cada sustrato a evaluar, y 100ul de células resuspendidas en solución salina al 0.85%.
3. Se mantuvo el reactor en agitación, a temperatura de 30°C y pH 6.5.

4. Se midió el consumo de oxígeno contra el tiempo.
5. Se calculó la tasa de consumo de oxígeno (mg O_2 /min.) por medio de la pendiente del consumo respecto al tiempo.
6. Finalmente se calcularon las velocidades de oxidación de los sustratos: (mg de tiosulfato/g proteína min.) 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 calculó 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.

5.6 EFECTO DE LOS INHIBIDORES EN LA CADENA RESPIRATORIA.

Para evaluar el efecto de los inhibidores sobre la cadena respiratoria de los compuestos reducidos de azufre, mediante estudios de respirometría, fueron utilizados, NEM (N-etilmaleimida) y Cianuro de sodio (NaCN), las concentraciones usadas fueron:

- Con tiosulfato:

NEM: 0, 0.1, 0.3, 0.75, 1, 2 mM

NaCN: 0, 0.025, 0.05, 0.075, 1, 1.5, 2, 5, 10 mM

- Con sulfuro:

NEM: 0, 0.3, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mM

NaCN: 0, 0.05, 1, 1.5, 2 mM

Se utilizó tiosulfato (10 mM) y sulfuro de sodio (0.5 mM) como fuente de energía. Se siguió la misma metodología descrita en los estudios de respirometría descritos en 5.5.

5.7 METODOS ANALITICOS.

5.7.1 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:

- A: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ al 1% en H_2O
- B: Tartrato doble de Na y K al 2%
- C: NaCO_3 2% en NaOH 0.1N.
- D: 1 A + 1 B (preparar cuando se utilice)
- E: 1 D + 50 C (preparar cuando se utilice)
- Folin: 1: 1 con H_2O (preparar cuando se utilice)

PROCEDIMIENTO:

- 1) Tomar una alícuota de la solución problema, y colocarla en un tubo de ensayo
- 2) La alícuota anterior debe ser llenada a un volumen de 1 ml con NaOH 0.1 N
- 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 por 10 minutos
- 7) Agregar 0.5 ml de reactivo de Folin (1 : 1 con agua), y se agita nuevamente.
(este reactivo debe prepararse en el momento de usarse)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

8) Reposar por 30 minutos

9) Leer a 590 nm

Construir una curva estándar para la cuantificación de proteína.

5.7.2 CUANTIFICACIÓN DE SULFATOS (SO_4^{2-}).

DETERMINACION DE SULFATOS POR EL METODO TURBIDIMETRICO.

El ion sulfato en un medio de HCl 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 REACCION: Mezclar 30 ml de HCl concentrado, con 300 ml de H_2O destilada, 100 ml de alcohol isopropilico o etílico al 95% y 75 g de NaCl. Posteriormente se mezclan con 50 ml de glicerol.
- 2) Cloruro de Bario: cristales de tamaño de malla 20 o 30
- 3) Solución Estándar de Sulfato: Se disuelven 147,9 mg de Na_2SO_4 anhidro en 1000 ml de H_2O . 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 BaSO_4 pierde estabilidad.

PROCEDIMIENTO:

- 1) Colocar 99 ml de H₂O destilada en un matraz erlenmeyer de 250 ml.
- 2) Adicionar 1 ml de muestra.
- 3) Agregar 5 ml de mezcla de reacción.
- 4) Agitar.
- 5) Adicionar 1 g de cristales de BaCl.
- 6) Agitar por 1 minuto exactamente 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 2 primeros minutos y la lectura constante de 3 a 10 minutos.

5.7.3 TINCIÓN DE GRAM.

Esta es una tinción diferencial usada para demostrar las propiedades tintoriales de bacterias. Las bacterias gram positivas retienen el colorante de cristal violeta después de la decoloración y se ven de color azul oscuro. Las bacterias gram negativas no son capaces de retener el colorante cristal violeta después de la decoloración y se contrañen de color rojo rosado con el colorante de safranina.

PROCEDIMIENTO:

1. Se hace un frotis delgado del material a estudiar y se deja secar el aire.
2. Se fija el material en el portaobjetos pasándolo 3 o 4 veces a través de la llama de un mechero de modo que el material no sea lavado durante el procedimiento de tinción.

3. Se coloca el frotis sobre un soporte para tinción y se cubre la superficie con solución de cristal violeta.
4. Después de "1" minuto de exposición al cristal violeta se lava totalmente con agua destilada.
5. Se cubre el frotis con solución de yodo gram durante "1" minuto. Se lava nuevamente con agua.
6. Se sostiene el frotis entre los dedos pulgar e índice y se cubre la superficie con unas gotas de decolorante de alcohol y acetona hasta que no se desprenda color violeta.
7. Se lava con agua corriente y se coloca otra vez sobre el soporte. Se cubre la superficie con contratinción de safranina durante "1" minuto. Se lava con agua corriente.
8. Se coloca el preparado en posición vertical dejando que drene el exceso de agua.
9. Se examina el frotis al microscopio.

5.7.4 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA.

Se realizó la observación directa en el Microscopio Electrónico de Barrido (SEM de Scanning Electrón Microscope), del *Thiobacillus* sp. con el fin de observar su morfología. La preparación y observación de las muestras, fue realizada en el laboratorio de Microscopia Electrónica del Edificio W de la Ciencia y Tecnología Ambiental (UAM-I) y apoyadas por el especialista encargado del microscopio (Dr. José D. Sepúlveda Sánchez).

La preparación de las muestras se efectuó de la siguiente manera:

1. Las muestras se mantuvieron en refrigeración con glutaraldehído al 5% por dos días.
2. Al tercer día, se realizaron lavados cada 15 minutos a 10,000 rpm, con solución amortiguadora de fosfatos 0.1M (pH 7.2 – 7.4), hasta eliminar el glutaraldehído.
3. Posteriormente se agregó Tetróxido de osmio manteniéndose la muestra en refrigeración por una hora, después de transcurrido ese tiempo, nuevamente se llevaron a cabo lavados con solución amortiguadora para eliminar el fijador.
4. Las muestras libres de fijador, se deshidrataron utilizando etanol o acetona al 30, 50, 60, 70, 80, 90 y 100%; lavándose las muestras dos veces con cada una de las concentraciones, cada lavado con un tiempo de veinte minutos.
5. Posteriormente las muestras se secaron utilizando la técnica de secado por punto crítico, donde el etanol es desplazado por dióxido de carbono, fluido de transición presurizado.
6. Finalmente la muestra seca se montó en un soporte metálico mediante cinta de carbón y fue recubierta con 3 destellos de carbón y 3 destellos de 50 segundos de oro, quedando lista para su observación. Mediante esta técnica el haz de electrones del SEM barre la superficie de la muestra y los electrones desviados por la capa de metal son recogidos y proyectados sobre una pantalla produciendo una imagen. (figura 3a y 3b).

VI. RESULTADOS Y DISCUSION

6.1. DESCRIPCION DEL MICROORGANISMO.

Con la realización de la tinción de Gram, una de las más empleadas en bacteriología, se pudo observar que los microorganismos son bacilos de color rojo rosado por lo tanto gram negativos. El tamaño es de 0.3 μm de ancho por 1-3 μm de largo de acuerdo a la misma tinción y la micrografía electrónica (Figura 3a y 3b). La identificación por RNA 16 S, mostró una alta similitud al *Halothiobacillus neapolitanus* en un 97%. y al *Thiobacillus* sp. W3 en un 94%. (Kawasaki, L. y col. 2003, en preparación).



Figura 3a. Microscopia electrónica de la cepa pura de *Thiobacillus* sp. X15000

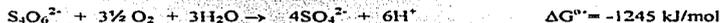


Figura 3b. Microscopía electrónica de la cepa pura de *Thiobacillus* sp. X10000.

De acuerdo a la literatura, los thiobacilli son bacterias gram negativas que poseen una región denominada periplasma como parte de su envoltura celular. El periplasma esta situado entre la membrana citoplasmática y la membrana externa de la célula, que mide aproximadamente 65 Å, el cual representar 20% del volumen celular (Ferguson, 1991). En el periplasma se presenta como una fase gel que contienen peptidoglicanos y es ahí donde se localiza numerosas proteínas del transporte de electrones. La mayoría de los citocromos c se encuentran en el periplasma. 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 citoplasmática. La reducción de oxígeno y la síntesis de ATP toma lugar sobre la superficie interna de la membrana citoplasmática 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 citoplasmática. 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) (Kelly, 1997).

Una característica de crecimiento se define por la forma de obtención de la energía de crecimiento y la fuente de carbono. Este microorganismo es un quimiolitótrofo es decir que oxida compuestos reducidos, por ejemplo los compuestos de azufre como el tiosulfato (como se muestra en las reacciones reportadas por Kelly (1990), para obtener energía.



La fuente de carbono que utilizan es carbono inorgánico (CO₂) por lo que es un organismo autótrofo. Se ha reportado que en presencia de compuestos orgánicos se ve afectado su crecimiento (Estrada I., 1999). Las condiciones óptimas para su crecimiento son: a un pH de 6.5, temperatura a 30°C (Mónica R, 2001).

6.2 CINÉTICA DE CRECIMIENTO.

En la figura 4 se presenta cinética de crecimiento del *Thiobacillus* sp. durante la oxidación de tiosulfato de sodio (2.7 g/L) como única fuente de energía en cultivo en lote. Se puede observar que el pH disminuye lentamente durante las primeras 24 horas, esto por el periodo de adaptación del microorganismo al medio de cultivo, hasta alcanzar un valor

de 3.5 aproximadamente a las 48 horas. Esto debido a la producción o acumulación de sulfatos (H_2SO_4) en el medio de cultivo. Posteriormente el valor de pH se mantiene constante por el agotamiento del sustrato (tiosulfato) además de que coincide con la fase de muerte del cultivo. La activación y la oxidación biológica del tiosulfato a sulfato como producto final (Suzuky, 1999), son dados por este microorganismo sulfoxidante, después de las 12 horas. A las 48 horas (donde se alcanza el máximo valor de proteína, 100 mg/L) se da inicio la fase estacionaria, donde normalmente, el factor limitante es la falta o carencia de un determinado nutriente esencial que llega a agotarse totalmente en el medio de cultivo. Tan pronto como esto ocurre, cesa el crecimiento y las células entran a la fase estacionaria (J.F.Wilkinson, 1976; Madigan, T. et al 1999). La producción de sulfatos dentro de las 24 horas, determinada experimentalmente, fue de 1 g/L, alcanzando su máximo a las 36 horas con un valor de 4.5 g/L (conversión completa de tiosulfato a sulfato). Este valor junto con el de pH permanecieron constantes al final del cultivo.

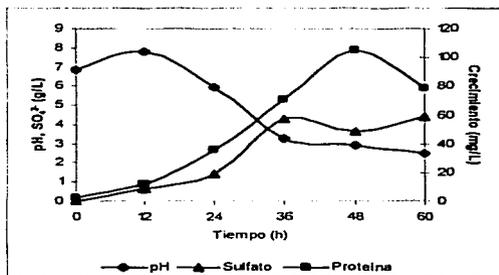


Figura 4. Crecimiento, pH y producción de sulfatos por *Thiobacillus* sp. con respecto al tiempo.

6.3 CULTIVO CONTINUO DE *Thiobacillus* sp.

6.3.1 DESCRIPCION Y FUNCION DEL REACTOR.

El reactor (Applikon) que se muestra en la Figura 5, consiste en un tanque de forma cilíndrica vertical de capacidad de 2 L, cerrado herméticamente. El aparato cuenta con mecanismos para controlar el pH, temperatura, la adición de medio fresco y oxígeno. Para ello se adaptan sensores de temperatura, oxígeno y pH. También cuenta con un agitador de doble propela que se controla automáticamente. El agitador tiene deflectores que están unidos o próximos a las paredes del recipiente. Este reactor es controlado independientemente por un dispositivo nombrado Biocontrolador (Applikon ADI 1030). Este a su vez puede estar conectado a un software, con el cual se pueden controlar y observar los parámetros de interés mediante valores y gráficos.

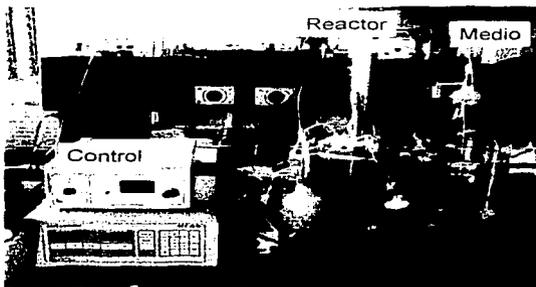


Figura 5. Sistema utilizado para el cultivo continuo de *Thiobacillus* sp.

El recipiente se adaptó con una salida de líquido a una altura para mantener un sistema continuo. La salida del reactor consiste en una mezcla en equilibrio o efluente (contiene organismos y nutrientes en las mismas condiciones bioquímicas y fisiológicas que los de dentro del reactor), que sale a una velocidad tal que la pérdida de organismos a la salida se compensa con los que se añaden a los que crecen en el reactor, manteniendo de esta manera un nivel constante en el reactor. La evacuación de las células y sus productos en igual proporción es por gravedad, los cuales son recolectados en un recipiente de recolección.

6.3.2 FUNCIONAMIENTO Y OPERACIÓN DEL REACTOR.

Agitación: La acción de la agitación en este proceso aerobio sirve para dispersar el aire estéril introducido en forma de burbujas, por todas las zonas del depósito. Además la agitación, proporciona una mezcla completa de los microorganismos en el seno del medio nutriente. Y aumenta la velocidad de transferencia de O_2 y nutrientes desde el medio a las células y a la vez los productos de las células al medio. El agitador es, en esencia, un mecanismo para transmitir energía. Por lo que su efectividad depende de la configuración y de los otros componentes del fermentador (Wiseman A, 1986).

Aireación: El suministro del oxígeno fue mediante el uso de una bomba, el cual se suministra a través de un difusor, en donde las burbujas ascendentes de aire ayudan a realizar toda la mezcla requerida y que junto con la agitación ayuda a la rápida disolución de el oxígeno en el medio. El aire suministrado se esteriliza generalmente por filtración ya que la esterilización por calor resulta antieconómica. El oxígeno es ligeramente soluble, lo que hace que se deba suministrarse de manera continua.

Ambos parámetros como se menciono anteriormente, fueron controlados mediante sus respectivos controladores.

Temperatura. La temperatura del reactor tanto en cultivo en lote como el continuo, se controló colocando una camisa alrededor del tanque y de un sensor, y estos a su vez controlados por el Biocontrolador a una temperatura de optima de crecimiento del microorganismo de 30°C, temperatura a la cual le permite multiplicarse y desarrollar su actividad metabólica. Si la temperatura no se mantiene puede provocar bajos rendimientos, perdidas de los productos o, incluso, productos inadecuados.

Fluidos. La adición de fluidos (medio mineral, soluciones ácida y básica) al cultivo fue mediante bombas propulsoras de la marca Masterflex, las cuales están controladas por el Biocontrolador.

pH. El electrodo de pH se esterilizó, junto con el reactor, por vapor. Debido a que durante el periodo de crecimiento hay un descenso del pH, el ajuste del pH a 6.5 en el medio de cultivo, se hace automáticamente, añadiendo álcali estéril, el cual esta bajo control y registro del biocontrolador.

Esterilización. Para una operación aséptica del reactor fue necesario esterilizar el medio de cultivo, el tanque y sus conexiones (electrodos de pH y O₂). Para conseguir la esterilización absoluta del aire se paso por un filtro estéril con poros o aperturas de 2µm que impidan el paso de partículas pequeñas, por lo cual se sustituian con frecuencia, manteniendo siempre condiciones estériles.

El medio mineral se ajusto a un pH de 6.5 a 7 previo a su esterilización. El bicarbonato de sodio fue esterilizado de manera independiente por filtración. La composición de este medio es una importante característica en los rendimientos de biomasa y producto.

Los fluidos de control deben ser estériles, aunque en el caso del ácido (HCl) y la base (NaOH), utilizados para controlar el pH (6.5 en el medio de cultivo), ya son estériles por si solos cuando se encuentran a concentraciones suficientemente elevadas, por lo cual requieren una dispersión en cultivo, de forma rápida y eficiente (Wiseman, 1986).

Biocontrolador. Las condiciones de operación de los controles en el biocontrolador de los parámetros fueron: pH 6.5, temperatura a 30°C, oxígeno al 100%. El control de la agitación fue variando, dependiendo de las tasa de dilución empleadas en el sistema.

Inoculación. Antes de iniciarse el cultivo en lote, el reactor con el nutriente se inoculó con células de la cepa pura de *Thiobacillus* sp. conservada en glicerol, manteniendo condiciones asepticas. Las conexiones tanto del reactor como las del biocontrolador, pH (electrodo, soluciones ácida y básica con concentración de 1N), electrodo de oxígeno, temperatura (sensor y camisa), así como el agitador se colocaron en sus respectivos lugares.

Posteriormente después de aproximadamente dos días de activarse y multiplicarse las células en cultivo en lote, sin la adición de medio mineral, y tener bajo control los parámetros (pH, Temperatura y Oxígeno), se inició el cultivo continuo.

En este cultivo continuo se comenzó la alimentación del medio mineral estéril de manera continua, con un pH de 6.5 a 7, el cual se suministro al sistema, a un flujo constante, agitado homogéneamente, e iniciando con flujos muy lentos, esto para lograr la estabilización del sistema, logrando esto en cada tasa de dilución. Los estados estacionarios se tomaran cuando hayan transcurrido de 3 a 5 tiempos de residencia como mínimo. De la misma forma que en el cultivo en lote, se controlaron los parámetros antes mencionados. En donde el cultivo se multiplica en las condiciones optimas de crecimiento. El medio de cultivo al salir de la vasija mantiene el nivel constante, por lo que en estas condiciones, la velocidad de crecimiento del cultivo iguala exactamente la velocidad de entrada del medio.

que a su vez es igual a la velocidad de salida del cultivo. La evolución del cultivo continuo se evaluó en cada aumento de la tasa de dilución, por la producción de biomasa y de la oxidación del tiosulfato a sulfato.

Descripción del cultivo. La alteración de la concentración de tiosulfato en el medio, es con la finalidad de evitar la formación de azufre por la saturación del sustrato en el medio de cultivo, por la alta tasa de dilución y a la poca saturación de oxígeno en el medio. El sistema en cultivo continuo, una vez preparado, se puede mantener durante meses, tomando las precauciones para impedir la entrada de contaminantes (utilizando condiciones asépticas).

Las condiciones óptimas para el crecimiento y la formación de productos son, con frecuencia, diferentes en términos de pH, el grado de aireación y la agitación requerida. Por lo que puede ser necesario cambiar estas variables de operación durante el periodo del funcionamiento del reactor. (B. Atkinson, 1985).

En este cultivo continuo, se evaluaron diferentes tasas de dilución, la oxidación del tiosulfato a sulfato, la producción de biomasa, y estudios de respirometría con el fin de evaluar su actividad sulfoxidante, así como el rendimiento.

6.3.3 BIOCONTROLADOR.

El biocontrolador ADI 1030, es un controlador capaz de medir y controlar hasta 4 parámetros. Consta de un menú principal:

ADI 1030		MAIN MENU		BIOCONTROLLER	
PROCESS	MANUAL	PARAM	CONFIG	UTILITY	
F1	F2	F3	F4	F5	

El Menú PROCESS se utiliza para manipular lazos de control.

- CONTROL: pH, temperatura, dO₂. Nos indica que parámetro está en el modo de operación de ON y OFF.
- SETPOINT: Nos da información relevante sobre el control los parámetros con los cuales se controla el sistema. Por ejemplo:
PH = 6.5 , Temp. = 30°C, dO₂ = 70.00 %
- DISPLAY. Indica los Dose Monitors, las salidas en estado de ON y OFF, las salidas controladas, además el tiempo del proceso.

El Menú MANUAL se usa para:

- CALIB: calibra los sensores de pH, Temperatura y O₂ disuelto.
- D.RESET. Reinicia los valores de los parámetros o el sistema completo.
- OUTPUTS definidas como TIMER o en el modo MANUAL. En el modo TIMER se controla mediante un tiempo programado para su función durante el funcionamiento del reactor.

El Menú PARÁMETROS. Se usa para especificar los parámetros de entrada y control. Por ejemplo:

- pH: setpoint 6.5, Low alarm 0, High alarm 14
- Temp. setpoint 30°C, Low alarm 0, High alarm 150
- DO₂ . setpoint 70.0, Low alarm 0, High alarm 100

El Menú CONFIGURACION. Se usa para especificar:

- SETUP. Se usa para la asignación de salidas para los lazos de control, alarmas, timers, registradoras y acciones manuales.
- SERIAL. Selección impresora / computadora, tipo de interfase y datos formato / velocidad.
- DOSE MN. Es un administrador del monitor factor y asignación
- VIEW. Nos indica como están controladas las salidas de nuestros parámetros.
- OUTPUT: Nos indica que salidas están controladas y cuales están bajo un temporizador. Y así mismo que salidas se encuentran definidas.

El menú UTILITY. Se utiliza para funciones adicionales para fijar tiempo fecha y clave de acceso.

- VERIFY. Proporciona información de la versión del equipo.
- TEST. componentes de la memoria el canal en serie.
- RESET. Para reiniciar parámetros o el sistema completo.
- LOGPUT. Es una clave de seguridad para los parámetros que han sido establecidos en la configuración, protegiéndolos de los cambios a personal no autorizado.

6.3.4 ARRANQUE DEL REACTOR Y TRABAJO GLOBAL UTILIZANDO TIOSULFATO COMO FUENTE DE ENERGÍA.

En la figura 6 se presenta el arranque del reactor y el trabajo de investigación global del reactor que utilizó tiosulfato de sodio como única fuente de energía y como fuente de carbono al bicarbonato de sodio. El tiempo que se grafica es de 92 días, con cambios en las tasas de dilución (D) y la concentración de tiosulfato del medio de cultivo. El pH se controló en 6.5 de acuerdo a las características señaladas en el apartado 1. La concentración de tiosulfato de sodio durante el estudio fue de 10, 5, y 3 g/L. El cultivo se inició en lote, hasta alcanzar la fase estacionaria (día 8). Posteriormente se cambió a cultivo continuo con una tasa de dilución inicial de 0.12 d^{-1} (con un tiempo de residencia hidráulico, TRH, de 192 horas donde alcanza el estado estacionario aproximadamente a los dos días de cultivo. En la tabla 4 y la figura 6 se observa que en cada estado estacionario de las diferentes tasas de dilución se alcanzaron por la oxidación completa de tiosulfato, valores máximos de sulfatos y proteína. Al cambiar la concentración de 10 a 5 g/L de tiosulfato ($\rightarrow a$) aproximadamente a los 67 días, disminuyó la carga de entrada de tiosulfato lo que explicó el descenso de la concentración de sulfatos y del crecimiento, hasta alcanzar los estados estacionarios, esto con cada tasa de dilución de 4.8 a 6.8 d^{-1} . Al seguir aumentando la tasa de dilución en un intervalo de 7.4 a 9.8 d^{-1} se disminuyó nuevamente la concentración de tiosulfato de 5 a 3 g/L ($\rightarrow b$) lo que nuevamente provocó un descenso en la concentración de sulfatos y del crecimiento celular. La disminución de la concentración de tiosulfato se realizó con el objetivo de permitir que todo el tiosulfato se oxidará a sulfato sin la acumulación de azufre elemental. Finalmente, se alcanzó la tasa de dilución $D = 9.8 \text{ d}^{-1}$,

siendo el momento en que el sustrato no es oxidado. Por lo tanto el sistema se lavó, por lo que se encontró en ese valor la tasa de dilución crítica (Dc).

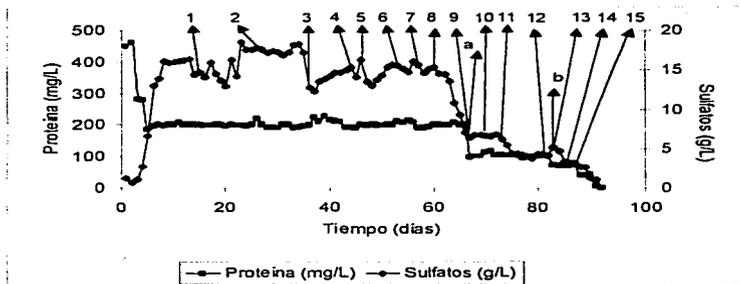


Figura 6. Crecimiento y producción de Sulfatos en cultivo continuo del *Thiobacillus* sp en 92 días de cultivo. (a) cambio de concentración de tiosulfato de 10 a 5 g/L. (—b) cambio de concentración de tiosulfato de 5 a 3 g/L. (—1 a 15) Cambios de las tasas de dilución (D) de 0.12 a 9.8 d⁻¹.

6.4 EFECTO DE LA TASA DE DILUCION SOBRE EL CRECIMIENTO Y LA OXIDACION DE TIOSULFATO.

En la Tabla 4 y Figuras (6.1, 6.2 y 6.3), se presentan los resultados obtenidos al evaluar el efecto de diferentes tasas de dilución sobre el crecimiento de *Thiobacillus* sp. y la oxidación de tiosulfato, en cultivo continuo. Se evaluó un intervalo de tasas de dilución entre 0.12 a 9.8 d⁻¹. En los experimentos la carga tiosulfato se fue incrementando conforme al incremento de la tasa de dilución, dado que la concentración de sustrato se mantuvo fija en el sistema ($Q=C*D$). Por otro lado en determinados valores de D se cambió la concentración de tiosulfato, con el fin de evitar la formación de azufre elemental (a, b, Figura 6). De este modo en las tasas de dilución de 0.12 a 4.5 d⁻¹ la concentración de tiosulfato fue de 4.5 g/L. Mientras que en tasas de dilución de 4.8 a 6.8 se hizo el primer cambio en la concentración de tiosulfato a 2.25 g/L. Por ultimo, en las tasas de dilución entre 7.4 y 9.8, la concentración de tiosulfato fue de 1.35 g/L. Los estados estacionarios en cada tasa de dilución se tomaron por lo menos de 3 a 5 tiempos de residencia hidráulica.

En la Figura 6.1 se presentan los resultados obtenidos en el intervalo de tasas de dilución de 0.12 a 4.5 y su efecto sobre el crecimiento y la producción de sulfatos.

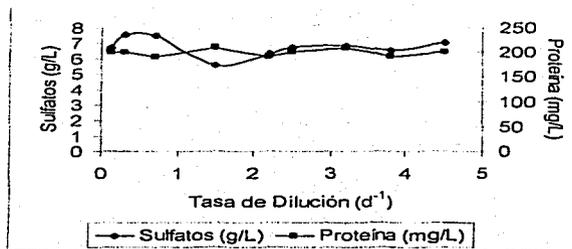


Figura 6.1. Efecto de la tasa de dilución de 0.12 a 4.5 d⁻¹, en la oxidación de tiosulfato, en concentración de 4.5 g/L, sobre el crecimiento del *Thiobacillus* sp.

En la figura 6.1 se observa que hasta una tasa de dilución de 4.5 el sistema permitió oxidar completamente el tiosulfato adicionado para cada valor de D. Por ejemplo para una D= 0.12 d⁻¹ la carga de tiosulfato fue de 0.54 g/L d y la carga de salida de sulfato fue de 0.80 g/L d, que corresponde a una eficiencia del 99 % de conversión. Respecto al crecimiento se observa que tiene un comportamiento estable, es decir que la variación entre una tasa de dilución y otra es de aproximadamente el 10%. De esta manera con la menor tasa de dilución se obtuvo una de proteína de 200 mg/L, y para la D de 4.5 d⁻¹ se alcanzó igualmente el mismo valor 200 mg/L. Estos datos de crecimiento son comparables a los obtenidos para una cepa pura de *Thiobacillus thioparus* ATCC 26345 donde se reportaron valores de crecimiento de 300 mg/L en tasas de dilución de 0.9 d⁻¹ (Aicántara, 2000). Indudablemente cada género y especie de los microorganismos sulfoxidantes presentan un valor determinado de crecimiento, lo que se pretende resaltar es que entra en el intervalo de valores de crecimiento reportado en bibliografía. Este punto quedará más

explicito en la discusión sobre el rendimiento celular calculado en las diferentes tasas de dilución.

Tabla 4. Balance de azufre en estado continuo de *Thiobacillus* sp. utilizando $S_2O_3^{2-}$ en una concentración de 4.5, 2.25, 1.35 μ/L , $S_2O_3^{2-}$.

D	$S_2O_3^{2-}$	Q $S_2O_3^{2-}$	S	QS	SO_4^{2-}	Q SO_4^{2-}	$S_2O_3^{2-}$	Q $S_2O_3^{2-}$	S	QS	Proteína
d ⁻¹	g/L	g/Ld	g/Ld	g/Ld	g/L	g/Ld	g/L	g/Ld	g/L	g/Ld	mg/L
e	e	e	e	e	s	s	s	s	s	s	s
0.12	4.5	0.54	0.30	0.57	6.70	0.80	0	0	0.33	0.26	200
0.3	4.5	1.35	0.77	0.57	7.57	2.27	0	0	0.33	0.75	200
0.7	4.5	3.15	1.8	0.57	7.52	5.26	0	0	0.33	1.73	190
1.5	4.5	6.76	3.85	0.57	5.53	8.30	0	0	0.33	2.74	210
2.2	4.5	9.92	5.65	0.57	6.27	13.80	0	0	0.33	4.55	190
2.5	4.5	11.27	6.42	0.57	6.7	16.73	0	0	0.33	5.52	200
3.2	4.5	14.43	8.22	0.57	6.84	21.91	0	0	0.33	7.23	210
3.8	4.5	17.13	9.76	0.57	6.56	24.92	0	0	0.33	8.22	190
4.5	4.5	20.3	11.56	0.57	7.0	31.5	0	0	0.33	10.4	200
4.8	2.25	10.8	6.15	0.57	2.78	13.38	0	0	0.33	4.41	100
5.2	2.25	11.7	6.7	0.57	2.77	14.41	0	0	0.33	4.75	110
6.0	2.25	13.61	7.76	0.57	2.51	15.20	0	0	0.33	5	100
6.8	2.25	15.30	8.72	0.57	2.3	15.6	0	0	0.33	5.14	100
7.4	1.35	10	5.70	0.57	2.12	15.71	0	0	0.33	5.2	70
7.9	1.35	10.66	6.08	0.57	1.64	12.95	0	0	0.33	4.27	70
9.2	1.35	12.42	7	0.57	1	9.8	0.76	7	0.33	3.23	40
9.8	1.35	13.23	7.54	0.57	0	0	1.35	13.23	0.33	7.54	0

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la Figura 6.2 se presentan los resultados obtenidos en el intervalo de tasas de dilución de 4.8 a 6.8 y su efecto sobre el crecimiento y la producción de sulfatos.

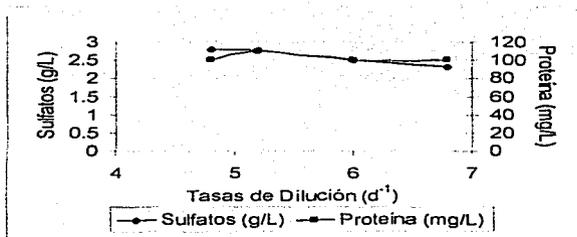


Figura 6.2. Efecto de la tasa de dilución de 4.8 a 6.8 d⁻¹ en la oxidación de tiosulfato, en concentración de 2.25 g/L., sobre el crecimiento del *Thiobacillus* sp.

En la figura 6.2, se presentan los resultados obtenidos en las tasas de dilución entre 4.8 y 6.8 d⁻¹. Como se indicó anteriormente la concentración de tiosulfato se disminuyó de 4.5 a 2.25 g/L. Esto con la finalidad de no limitar el oxígeno en el medio por las altas tasas de dilución y por lo tanto del incremento de las cargas de sustrato lo cual favorecería la formación de azufre elemental como se ha reportado en la bibliografía (Buisman y col., 1990, Alcántara y col., 2003).

Se puede observar que en este intervalo de D, nuevamente se mantuvo la estabilidad del sistema, permitiendo la oxidación estequiométrica de la carga de tiosulfato a sulfato. De esta manera, en una tasa de dilución de 4.8 la carga de tiosulfato fue de 10.8 g/L d y la carga de salida de sulfatos fue de 13.38 g/L d. Mientras que a una D de 6.8, la carga de tiosulfato es de 15.30 g/L d, con una carga de sulfatos de 15.6 g/L d. En cuanto a el

crecimiento en este intervalo de tasas de dilución se observó un promedio de proteína de 100 mg/L.

Por último se evaluaron tasas de dilución entre 7.4 a 9.8 d⁻¹, con tiempos de residencia de 4 a 2 horas. En esta etapa, la concentración de tiosulfato fue disminuida de 2.25 a 1.35 g/L con el fin de evitar una limitación por oxígeno en el sistema. Se determinó tanto la producción de sulfatos como el crecimiento microbiano. Los resultados se presentan en la Figura 6.3.

En la Figura citada se observa que en las tasas de dilución de 7.4 y 7.9 toda la carga de tiosulfato fue oxidada a sulfatos, presentando valores de 15.71 y 12.95 g/L d respectivamente. El crecimiento obtenido fue en ambos casos de 70 mg/L. Al seguir incrementando la D a 9.2 se observa que el sistema comenzó a disminuir la eficiencia de oxidación. Es decir no todo el sustrato fue oxidado y parte del mismo fue detectado en el efluente (0.76 g/L). De este modo la carga de sulfato detectada fue de 9.8 g/L d, y de tiosulfato 7 g/L d. Es decir que la conversión fue del 40 %. Finalmente, un posterior incremento del valor de D de 9.2 a 9.8 d⁻¹ el sistema no fue capaz de oxidar al sustrato entrando en condiciones de lavado del reactor. Es decir todo el tiosulfato de entrada se encontró en el efluente y el crecimiento microbiano determinado fue cero. Esto indicó que la velocidad de salida del sustrato es mayor que la del crecimiento del microorganismo, lo que provoca la completa eliminación del microorganismo en el quimiostato. De acuerdo a la bibliografía por lo tanto se tiene una $\mu_{max} = 0.4 \text{ h}^{-1}$. Este resultado es comparado con los resultados reportados por Steffen (1996) para cepas puras de *Thiobacillus sp.*, con una $\mu_{max} = 0.31 \text{ h}^{-1}$ y al *Thiobacillus neapolitanus* con $\mu_{max} = 0.33 \text{ h}^{-1}$.

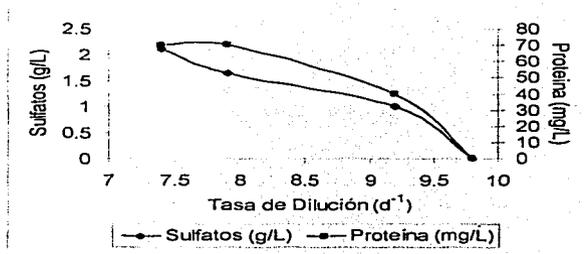


Figura 6.3 Efecto de la tasa de dilución de 7.4 a 9.8 d^{-1} en la oxidación de tiosulfato, en concentración de 2.25 g/L , sobre el crecimiento del *Thiobacillus sp.*.

6.5 CRECIMIENTO EN QUIMIOSTATO DE *Thiobacillus* sp. UTILIZANDO COMO SUSTRATO TIOSULFATO Y SULFURO DE SODIO.

En la Figura 7 se presenta el comportamiento global de un reactor en continuo para la oxidación de tiosulfato y sulfuro de sodio por un periodo de operación de 90 días. En este cultivo se evaluaron diferentes tasas de dilución y como sustrato tiosulfato y/o sulfuro.

En una primera etapa se utilizó al tiosulfato de sodio como única fuente de energía (→a) con una concentración de 2.25 g/L y una tasa de dilución de 0.37 d^{-1} (18 días de cultivo). Posteriormente se aumentó la concentración del sustrato (→b) a 4.5 g/L con una $D = 0.45 \text{ d}^{-1}$ (41 días de cultivo). En ambos casos el tiosulfato fue oxidado completamente a sulfato en un régimen estacionario.

A continuación se utilizaron dos sustratos (→c) como fuente de energía, tiosulfato y sulfuro de sodio en tasas de dilución de 0.42 y 0.85 d^{-1} (20 días de cultivo). Las concentraciones fueron distintas en ambos sustratos, 5 y 10 g/L de tiosulfato y la concentración de sulfuro en 8 g/L. Bajo estas condiciones también se observó una oxidación completa de los sustratos a sulfato.

Por último se usó como única fuente de energía al sulfuro (→d), a los 11 días de cultivo, con tasa de dilución de 0.76 d^{-1} . El sulfuro fue oxidado completamente a sulfato observándose una producción de sulfato de 2.33 g/L que corresponde al valor esperado de acuerdo a la estequiometría de la reacción.

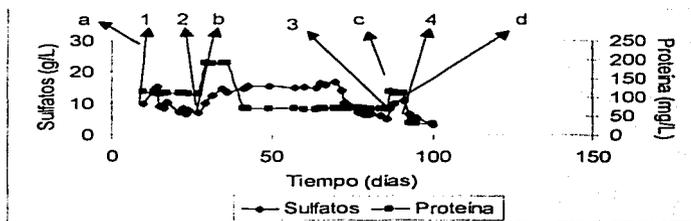


Figura 7. Crecimiento y producción de sulfatos en quimostato del *Thiobacillus* sp., en la oxidación biológica de tiosulfato de sodio y sulfuro de sodio, ambos en medios separados. (→ b) cambio de concentración de 5 a 10 g/L. (→ c) utilización de ambos sustratos en concentración de 5 y 8 g/L, respectivamente. (→ d) sulfuro de sodio como único sustrato en concentración de 10 g/L. (→ 1 a 4) cambio de tasas de dilución de 0.37 a 0.76 d⁻¹.

En la Tabla 5 y Figura 7.1 se muestran el crecimiento del *Thiobacillus* sp. en diferentes tasas de dilución, utilizando como fuente de energía al tiosulfato, tiosulfato más sulfuro y sulfuro. Esto con la finalidad de evaluar la capacidad del microorganismo de utilizar como única fuente de energía al sulfuro y de esta manera demostrar que la fuente de energía que se puede utilizar es indistinta. Para ello se estableció un estado estacionario con una $D=0.37$ y 0.45 d⁻¹, empleando tiosulfato como fuente de energía, con una carga de 0.83 y 2 g/L d respectivamente. La concentración de tiosulfato en las anteriores tasas de dilución son 2.25 y 4.5 g/L respectivamente. Posteriormente se adicionó sulfuro de sodio, en una concentración de 0.53 g/L, en un medio separado, con tasas de dilución de 0.42 y 0.85 d⁻¹. La carga de tiosulfato fue de 0.26 y 1.08 g/L d respectivamente. Finalmente se evaluó al

sulfuro como única fuente de energía con $D = 0.76 \text{ d}^{-1}$ y una carga de sulfuro de 0.50 g/L d . Los resultados son los siguientes:

En la Tabla 5, se observa que en todas las tasas de dilución evaluadas la fuente de energía es completamente utilizada. Por lo tanto se obtienen valores de sulfato similares a la estequiometría de oxidación de tiosulfato y sulfuro.

Con tiosulfato como sustrato las tasas de dilución evaluadas fueron de 0.37 a 0.45 d^{-1} , que correspondieron a cargas de 0.83 a 2 g/L d de tiosulfato. Como se observa todo el tiosulfato se oxidó a sulfato por lo tanto se obtuvieron cargas de 1.37 y 3 g/L d , respectivamente. Y con un crecimiento en las anteriores tasas de 110 y 190 mg/L .

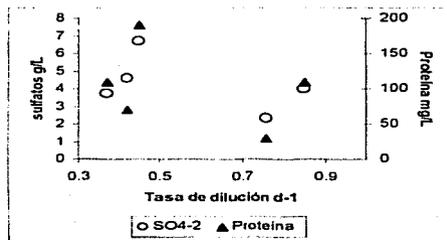


Figura 7.1. Estados estacionarios de diferentes tasas de dilución, en la producción de sulfatos y crecimiento del *Thiobacillus* sp.

A continuación se utilizaron como sustrato al tiosulfato y sulfuro en concentraciones de 1.12 y 0.53 g/L , respectivamente. La tasa de dilución utilizada fue de 0.42 d^{-1} . De esta manera la carga de tiosulfato correspondió a 0.26 g/L d , mientras que la de sulfuro fue de

0.22 g/L d. El cultivo en estado estacionario fue capaz de oxidar completamente ambos sustratos obteniendo una carga de sulfato de 1.92 g/L d. con un crecimiento de 70 mg/L. Para esta carga de sulfuro no se observó un efecto negativo del compuesto sobre el crecimiento del microorganismo ni sobre su actividad sulfoxidante. Como se ha reportado el sulfuro puede presentar un efecto tóxico sobre los microorganismos como se presenta mas adelante en la figura 9 y lo reportado en la bibliografía (Alcántara y col., 2003). Posteriormente se evaluó una segunda condición de cultivo donde se incrementó la carga de tiosulfato y se mantuvo la de sulfuro. Los resultados muestran la conversión estequiométrica de tiosulfato y sulfuro a sulfato, como era de esperarse ya que el tiosulfato no es un compuesto tóxico para los microorganismos. En esta condición se tiene una carga de tiosulfato de 1.08 g/L d, y una carga de sulfuro de 0.45 g/L d, el cual el microorganismo al oxidar estos sustratos se obtuvo una carga de sulfatos de 3.4 g/L d y un crecimiento de 110 mg/L.

Tabla 5. Balance de azufre en estado continuo de *Thiobacillus* sp. utilizando diferentes concentraciones de tiosulfato y/o sulfuro.

D d ¹ c	S ₂ O ₃ ²⁻ g/L c	Q S ₂ O ₃ ²⁻ g/Ld c	S ²⁻ g/L c	Q S ²⁻ g/Ld c	Q S g/Ld c	SO ₄ ²⁻ g/L s	Q SO ₄ ²⁻ g/Ld s	S ₂ O ₃ ²⁻ g/L s	Q S ₂ O ₃ ²⁻ g/Ld s	S ²⁻ g/L s	Q S ²⁻ g/Ld s	Q S g/Ld s	Prot. mg/L s
0.37	2.25	0.83	0	0	0.47	3.71	1.37	0	0	0	0	0.45	110
0.45	4.5	2	0	0	1.44	6.7	3	0	0	0	0	1	190
0.42	1.12	0.26	0.53	0.22	0.48	4.57	1.92	0	0	0	0	0.63	70
0.85	2.25	1.08	0.53	0.45	1.53	4	3.4	0	0	0	0	1.12	110
0.76	0	0	0.66	0.50	0.50	2.33	1.77	0	0	0	0	0.58	30

Posteriormente se utilizó como única fuente de energía al sulfuro. La concentración en el medio fue de 0.66 g/L. La tasa de dilución utilizada fue de 0.76 d⁻¹ y la carga de sulfuro de 0.50 g/L d. Como se observa en la tabla 5 y la Figura 7.1 después de alcanzar el estado estacionario, esta carga de sulfuro no tuvo un efecto negativo sobre el cultivo continuo. Todo el sulfuro se oxidado a sulfato dando una carga de 1.77 g/L d y el crecimiento producido fue en concentración de 30 mg/L.

6.6 RENDIMIENTO DEL CRECIMIENTO Y EFICIENCIA OXIDATIVA DE LA CEPA *Thiobacillus* sp.

En la tabla 6 y 7 se presenta el crecimiento (Y_{x_0} , g/L), rendimiento en crecimiento (Y_{x_0} , g proteína/ g tiosulfato y sulfuro) y eficiencia de oxidación (QSO_4/Y_{x_0} , g sulfato/ g proteína d) del cultivo en quimiostato de la cepa de *Thiobacillus* sp.

En relación a la eficiencia específica de oxidación medida como la producción de sulfato por gramo de proteína se puede observar que al incrementar las tasas de dilución se incrementa la eficiencia oxidativa. Esto es que al incrementar la carga de tiosulfato se incrementa proporcionalmente la producción de sulfato. Por ejemplo a una $D= 0.12 \text{ d}^{-1}$ hay una eficiencia oxidativa de 4.62 g sulfato/ g proteína d, mientras que a una $D 4.5$ la eficiencia oxidativa es de 171 g sulfato/ g proteína d. Este comportamiento se presenta en el intervalo de tasas de dilución entre 0.12 y 7.9 d^{-1} , es decir en condiciones donde se alcanzaron estados estacionarios de oxidación completa del sustrato.

En valores de $D= 7.4$ y 7.9 se encontraron eficiencias de oxidación de 241.35 y 255.59 g sulfato/ g proteína d. Esto quiere decir que a pesar de que no existe un incremento considerable del crecimiento el microorganismo es eficiente al oxidar el compuesto azufrado. Lo que indica que tiene una alta tasa de respiración medida como una alta capacidad de transporte de electrones.

La eficiencia de oxidación a una $D= 9.2 \text{ d}^{-1}$ disminuyó respecto al valor encontrado para una $D= 7.9 \text{ d}^{-1}$, lo que es consecuencia de que el sistema no fue capaz de oxidar completamente la carga de sustrato de entrada. La eficiencia oxidativa fue de 230 g sulfato/

g proteína d para una $D=9.2 \text{ d}^{-1}$, mientras que para una $D=7.9 \text{ d}^{-1}$ fue de 255. 5 g sulfato/ g proteína d.

Cuando se utilizó al tiosulfato y/o sulfuro como fuentes de energía (Tabla 7) se puede observar que las eficiencias de oxidación también incrementan con la carga de sustrato. Esto indica que el sulfuro en la carga evaluadas no afectó el crecimiento microbiano y las eficiencias de oxidación.

En cuanto a los rendimientos de crecimiento Kelly D. (1988), en una revisión bioenergética de los thiobacilli, reporta rendimientos de crecimiento ($Y_{v/s}$, g biomasa/ mol $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), para diferentes microorganismos de este género bacteriano crecidos en quimiostato, entre ellos se puede mencionar: *Thiobacillus versatus* 8.10 g biomasa/ mol $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$; *Thiobacillus tepidarius* 11 g biomasa/ mol $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y *Thiobacillus denitrificans* 14.7 g biomasa/ mol $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$.

De acuerdo a los resultados obtenidos si se considera que la biomasa contiene el 50 % de nitrógeno los gramos de biomasa observados en el reactor con un promedio de 0.04 g proteína/ g $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ da un rendimiento promedio igual a 9.3 g biomasa/ mol $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. En tanto el rendimiento promedio del crecimiento con sulfuro fue de 3.2 g biomasa/ mol S^2 . El rendimiento con tiosulfato es comparable con el rendimiento encontrado para el cultivo en lote con tiosulfato donde se obtuvo un rendimiento de 9.12 g biomasa / mol $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$. Los resultados como se observa son comparables con lo reportado en la literatura.

Tabla 6. Rendimiento del crecimiento y eficiencia oxidativa de la cepa de *Thiobacillus* sp.

D	QSO ₂ ⁻²	PSO ₄ ⁻²	Y _c	Y _{ox}	Y _{ox}	P*D(QSO ₂ ⁻²)	Y _c *D	*QSO ₂ ⁻² /Y _c
d ⁻¹	(g/Ld)	(g/L)	(g/L)	(g _{proteína} /g S ₂ O ₃ ⁻²)	(g _{biomasa} /mol S ₂ O ₃ ⁻²)	(g/L d)	(g/L d)	(g sulfatos/g proteína d)
0.12	0.54	7.70	0.20	0.044	9.85	0.92	0.02	4.62
0.3	1.35	7.57	0.20	0.044	9.85	2.27	0.06	11.36
0.7	3.15	7.62	0.19	0.042	9.40	5.33	0.13	28.07
1.5	6.76	7.70	0.21	0.046	10.30	11.55	0.32	55.00
2.2	9.92	7.69	0.19	0.042	9.40	16.92	0.42	89.04
2.5	11.27	7.70	0.20	0.044	9.85	19.25	0.50	96.25
3.2	14.43	7.50	0.21	0.046	10.30	24.00	0.67	114.29
3.8	17.13	7.65	0.19	0.042	9.40	29.07	0.72	153.00
4.5	20.30	7.60	0.20	0.044	9.85	34.20	0.90	171.00
4.8	10.80	3.78	0.10	0.044	9.85	18.14	0.48	181.44
5.2	11.70	3.70	0.11	0.048	10.75	19.24	0.57	174.91
6	13.61	3.80	0.10	0.044	9.85	22.80	0.57	240.00
6.8	15.30	3.79	0.10	0.044	9.85	25.77	0.67	262.98
7.4	10.00	2.12	0.07	0.051	11.42	15.69	0.48	241.35
7.9	10.66	2.20	0.07	0.051	11.42	17.38	0.54	255.59
9.2	12.42	1.00	0.04	0.03	6.72	9.20	0.37	230.00
9.8	13.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00

*eficiencia oxidativa

6.7 RENDIMIENTO DEL CRECIMIENTO Y EFICIENCIA OXIDATIVA DEL *Thiobacillus* sp. CON TIOSULFATO Y/O SULFURO.

En la tabla 7 se presenta el crecimiento (Y_x , g/L), rendimiento en crecimiento ($Y_{x/s}$, g proteína/g sustrato) y además de la eficiencia oxidativa (P^*D/Y_x , g sulfatos/ g proteína d), de *Thiobacillus* sp.. Se puede observar en todos los casos la eficiencia oxidativa, teniendo una mayor eficiencia en $D = 0.76 \text{ d}^{-1}$. Esto sucede al ir incrementando la tasa de dilución. Al usar como única fuente de energía a el tiosulfato con tasa de dilución de 0.37 y 0.45, todo el sustrato es oxidado completamente, en donde la eficiencia oxidativa es de 12.48 y 18 g sulfato/ g proteína d, respectivamente. Al seguir incrementando la tasa de dilución a 0.42, utilizando como fuente de energía al tiosulfato y sulfuro en concentración de 1.12 y 0.53 g/L. En estas condiciones la eficiencia oxidativa de ambos sustratos es 21 g sulfatos/ g proteína d. Nuevamente al incrementarse la D a 0.85 ahora con concentraciones de los sustratos de 2.25 g/L y manteniendo la del sulfuro a 0.53 g/L, la eficiencia oxidativa es mayor que en la condición anterior 41.73 g sulfatos/ g proteína d. Esto se debe al aumento en la concentración del tiosulfato, el cual junto con el sulfuro son oxidados por el microorganismo completamente.

Finalmente al tener solo como única fuente de energía al sulfuro en concentración de 0.66 g/L, la eficiencia oxidativa fue de 50.16 g sulfatos/ g. proteína d. En donde el sulfuro es oxidado completamente a sulfato. Considerando que la biomasa contiene el 50 % de nitrógeno los gramos de biomasa en las distintas tasas de dilución fueron: para tasas de dilución de 0.37 y 0.45 da un rendimiento igual a 10.95 y 9.46 g biomasa/ mol tiosulfato, respectivamente. Mientras que en la última tasa de dilución usando solo sulfuro, además de tener una buena eficiencia oxidativa, el rendimiento fue de 3.2 g biomasa/ mol sulfuro.

Al hacer la comparación de ambos cultivos en quimiostato en diferentes condiciones ya señaladas en las descripciones anteriores, se aprecia un mayor rendimiento con tiosulfato el cual es similar al rendimiento obtenido en cultivo en lote.

Tabla 7. Rendimiento del crecimiento y eficiencia oxidativa del *Thiobacillus* sp. con tiosulfato y/o sulfuro de sodio.

D	Qsustrato	PSO ₄ ⁻²	Y _x	Y _{x/s}		Y _{x/s}	P*D(QSO ₄ ⁻²)	Y _x * D	*QSO ₄ ⁻² /Y _x
d-1	g/L d	g/L	g/L	gproteína/gsustrato	gbiomasa/molsustrato		g/L d	mg/ L d	g sulfatos/ g proteína d
0.37	0.83	3.71	0.11	0.05	0.00	10.95	1.37	0.041	12.48
0.45	2	7.6	0.19	0.04	0.00	9.46	3.42	0.086	18.00
0.42	0.26	3.5	0.07	ND	ND	ND	1.47	0.029	21.00
0.85	1.08	5.4	0.11	ND	ND	ND	4.59	0.094	41.73
0.76	0	1.98	0.03	0.00	0.05	3.2	1.50	0.023	50.16

ND= no determinado

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

6.8 VELOCIDAD DE OXIDACIÓN DEL *Thiobacillus* sp., MEDIANTE ESTUDIOS DE RESPIROMETRIA.

Con el fin de determinar los parámetros cinéticos de oxidación de tiosulfato y sulfuro por el microorganismo se determinaron las velocidades de oxidación de los sustratos por respirometria. En las figuras 8 y 9, se presentan los resultados obtenidos a una temperatura (30°C) y pH (6.5). La biomasa utilizada se obtuvo del reactor en estudio, bajo condiciones de estado estacionario. Para el ajuste de los datos de las velocidades de oxidación se utilizó la ecuación de Monod para tiosulfato y de Han y Levenspiel para sulfuro. Las concentraciones evaluadas fueron:

Tiosulfato: 0, 1, 2.5, 5, 10, 15, 20, 30, 40 mM.

Sulfuro: 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2, 3, 5 mM.

Los resultados de la velocidad de oxidación usando tiosulfato se presentan en la figura 8. Se observa que al incrementar la concentración de tiosulfato en el intervalo de 0 a 15 mM, la velocidad de oxidación aumenta de manera exponencial (reacción de orden 1). Al seguir incrementando la concentración de 15 a 40 mM, la actividad sulfoxidante se mantiene constante (reacción de orden cero), debido a la saturación del sistema enzimático. La velocidad máxima de oxidación (V_{max}) fue de 80 mg O_2 /g proteína min. Por la estequiometría de la reacción ($S_2O_3^{2-} + 2 O_2 + H_2O \rightarrow 2H_2SO_4$) se tiene que este valor equivale a 140 mg $S_2O_3^{2-}$ /g proteína min. Por otra parte la K_m para el tiosulfato fue de 5 mM.

La velocidad de oxidación para tiosulfato es comparable a los reportados en la literatura para cepas puras de *Thiobacillus*. Jordan *et al.* (1995) reportaron para bacterias capaces de crecer en un amplio intervalo de compuestos reducidos de azufre, valores de velocidad

máxima de las cepas aisladas KL1 y KS2 de 155.79 y 97.32 mg $S_2O_3^{2-}$ /g proteína min. respectivamente. En cambio estas bacterias mostraron una alta afinidad por el sustrato reportando valores de K_m de 6.3 μM para KL1 y 8.6 μM para KS2. Un valor de velocidad máxima similar fue reportado por Beffa *et al.* (1991) en una cepa de *Thiobacillus tepidarius* siendo el valor de V_{max} para tiosulfato de 156.8 mg $S_2O_3^{2-}$ /g proteína min. Por su parte Visser *et al.* (1997) reportaron valores de K_m de 0.1 mM para *Thiobacillus tepidarius* y 1.0 mM para *Thiobacillus neapolitanus*.

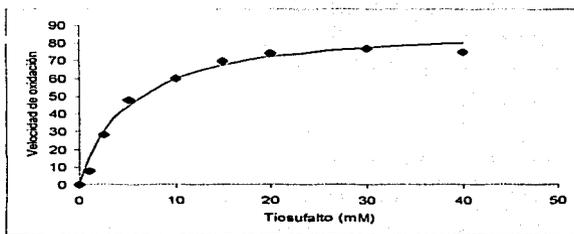


Figura 8. Velocidades de Oxidación de tiosulfato por la cepa *Thiobacillus* sp.

En la figura 9 se presentan las velocidades de oxidación utilizando diferentes concentraciones de sulfuro. Los datos fueron ajustados de acuerdo al modelo de Han y Levenspiel que a diferencia del ajuste por la ecuación de Monod, este considera un factor de inhibición. Los resultados indican que al incrementar la concentración de 0 a 0.5 mM, la velocidad máxima de oxidación aumenta también de forma exponencial. En concentraciones posteriores a 0.5 mM, la actividad sulfoxidante de *Thiobacillus* sp. empezó a disminuir lo que indicó un fenómeno de inhibición por toxicidad. La V_{max} fue de 20.98 mg O_2 /g proteína min. lo que equivale a 10.49 mg S^{2-} /g proteína min., de acuerdo a la

estequiometría de reacción ($\text{H}_2\text{S} + 2\text{O}_2 \rightarrow \text{H}_2\text{SO}_4$). La K_m fue de 0.3 mM, que representa la afinidad del microorganismo por el sustrato limitante.

En trabajos reportados en la literatura, las velocidades de oxidación del sulfuro son comparables con lo reportado en este trabajo. En los sistemas biológicos se ha reportado un intervalo de velocidades de oxidación del sulfuro entre 1.1 a 61.7 mg HS^-/g proteína min. (Takashima, T. y col., 2000). En un consorcio sulfoxidante adaptado a la oxidación de CS_2 , la velocidad máxima fue de 3.4 mg para CS_2 y 13.8 mg para HS^- (Aicántara y col. 1999). También ha sido reportado la máxima actividad específica para la oxidación por *Thiobacillus denitrificans* encontrando velocidades máximas de oxidación en condiciones aeróbicas de 23.7 mg HS^-/g proteína min., mientras que en condiciones anaeróbicas fue de 8.6 HS^-/g proteína min. (Mc Comas y col., 2001).

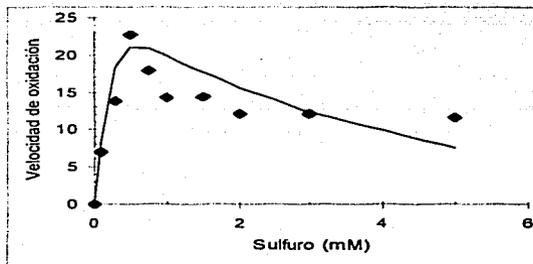


Figura 9. Velocidad de oxidación de sulfuro por la cepa *Thiobacillus* sp.

6.9 EFECTO DE LOS INHIBIDORES EN LA OXIDACIÓN CON TIOSULFATO Y SULFURO.

El uso de inhibidores de la cadena respiratoria ha sido ampliamente utilizado para el estudio de las rutas de oxidación de los compuestos reducidos de azufre. La existencia de vías alternativas de transporte de electrones en los sistemas respiratorios se puede deducir a partir de la acción diferencial de inhibidores. La inhibición casi total y monofásica del inhibidor, al incrementar su concentración, indica que a ese nivel solo hay un camino para el flujo de electrones. En tanto que una inhibición parcial o bifásica indica que en ese punto existe un camino alternativo poco sensible al inhibidor respiratorio (Flores-Encarnación y col., 1999; Aleem, 1987). Existen inhibidores que bloquean el transporte electrónico entre NADH y la ubiquinona: la rotenona, el amital y la piericidina, los cuales posiblemente actúan sobre la NADH-deshidrogenasa. Otro inhibidor característico es la actimicina A, que bloquea el transporte de electrones entre el citocromo b y el citocromo c. Una tercera clase de inhibidores bloquea el transporte electrónico desde el citocromo aa₃ hacia el oxígeno, en este grupo se encuentra el cianuro, el sulfuro de hidrógeno y el monóxido de carbono (Lehninger, 1983; Mandigan y col., 1998). Se ha reportado que el cianuro actúa inhibiendo a la citocromo oxidasa (Aleem, 1987; Lehninger y col., 1993).

En el estudio del efecto de los inhibidores sobre las oxidaciones utilizaron los siguientes compuestos: N-etilmaleimida (NEM) y cianuro de sodio (NaCN). El primero es inhibidor de la actividad de la azufre oxidasa y en algunas especies microbianas de la tiosulfato deshidrogenasa. El cianuro es un inhibidor de la cadena respiratoria en la etapa final de transporte de electrones.

Las concentraciones evaluadas de cada inhibidor con tiosulfato (10mM) fueron:

NEM: 0, 0.1, 0.3, 0.75, 1, 2 mM

Cianuro: 0, 0.025, 0.05, 0.075, 1, 1.5, 2, 5, 10 mM

Mientras que con sulfuro (0.5mM), las concentraciones de los inhibidores fueron:

NEM: 0, 0.3, 0.5, 0.75, 1, 1.5, 2 mM

Cianuro: 0, 0.05, 1, 1.5, 2 mM

Los resultados de la evaluación del efecto de los inhibidores para la oxidación de tiosulfato se presentan en la Figura 10. Se puede observar en esta figura que utilizando NEM en el intervalo de 0 a 2 mM la velocidad de oxidación se afectó 20 %. Como se indicó el NEM inhibe la actividad de las enzimas con grupo sulfhidrilo como la azufre oxidasa y la tiosulfato deshidrogenasa. Chan y Suzuki (1994) señalan que el NEM tuvo un efecto negativo en la oxidación de tiosulfato, mientras que para *Thiobacillus* sp W5 (Visser y col., 1997) la actividad enzimático de la tiosulfato deshidrogenasa no se vio inhibida por la presencia de NEM ni de cianuro.

En lo que respecta el efecto del cianuro se observa (figura 10) que en concentraciones entre 0 y 0.025mM la disminución de la velocidad de oxidación fue de un 8%. Mientras que en concentraciones de 1.5 mM la actividad sulfoxidante fue completamente inhibida. Como está reportado en la literatura el cianuro inhibe el transporte de electrones a nivel de citocromo c. En este sentido los resultados muestran que la incorporación de los electrones generados por la oxidación de los sustratos se incorporan a nivel de cadena respiratoria y que este paso de acuerdo a la fisiología de estos microorganismos es determinante para la generación de energía tanto para el crecimiento como para la fijación de CO₂.

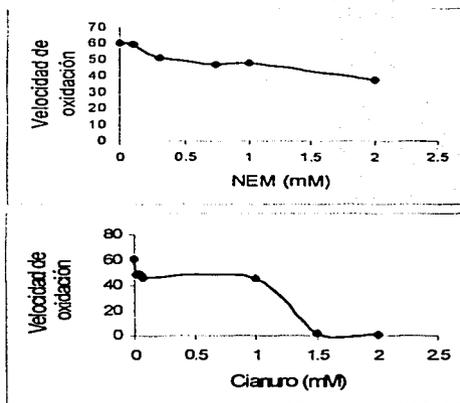


Figura 10. Efecto del NEM y Cianuro, sobre la actividad sulfoxidante de la cepa *Thiobacillus* sp., con tiosulfato como fuente de energía.

Por otra parte en las figura 11 se presenta el efecto del uso del NEM sobre la oxidación del sulfuro. Se observa que en concentraciones entre 0 y 2 mM la velocidad de oxidación disminuyó en un 11%. Este comportamiento es similar al observado con tiosulfato de sodio. Por lo que puede concluirse que el NEM inhibe tanto a la enzima sulfuro oxidasa como a la tiosulfato oxidasa y que ambas contienen grupos sulfhidrilo en su estructura. Se puede suponer que en concentraciones mayores del inhibidor detengan completamente la oxidación de los compuestos azufrados.

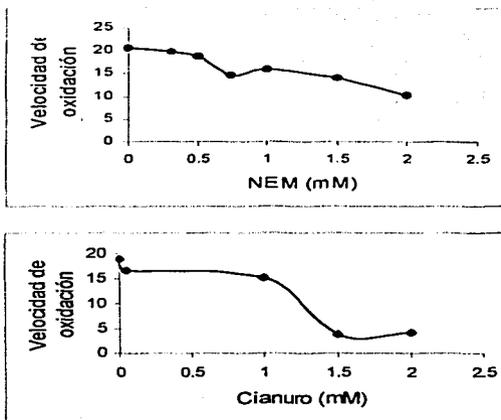


Figura 11. Efecto del NEM y Cianuro sobre la actividad sulfoxidante de la cepa *Thiobacillus* sp., con sulfuro como fuente de energía.

Por último en la figura 11 se observa el efecto inhibitorio del cianuro en la oxidación del sulfuro. Se observa que en concentraciones entre 0 y 1 mM el cianuro disminuye la velocidad de oxidación en un 8%. Así mismo se observa que en concentraciones mayores a 1 mM se comienza a disminuir la velocidad de oxidación. Al seguir incrementando la concentración en el intervalo de 1.5 y 2 mM, la actividad enzimática se afectó completamente. Al igual que en el caso del tiosulfato, probablemente el transporte de electrones a nivel de citocromo c se inhibió impidiendo la incorporación de electrones generados por la oxidación del compuesto.

VII. CONCLUSIONES

1. Este microorganismo por sus características de crecimiento es un quimioautótrofo. Es decir que utiliza compuestos inorgánicos como fuente de energía y CO_2 como fuente de carbono. De acuerdo a sus características microscópicas son bacilos cortos de color rojo rosado (gram negativos), y su identificación de acuerdo al análisis de su gen ribosomal 16S mostró que es altamente similar a *Halothiobacillus neapolitanus* en un 97% y del *Thiobacillus* sp. W5 en un 94%.
2. En valores de tasa de dilución (D) entre 0.12 y 7.9 d^{-1} , el cultivo oxidó completamente el tiosulfato a sulfato. Mientras que en la tasa de dilución (D) de 9.8 d^{-1} , la cepa *Thiobacillus* sp. no fue capaz de seguir oxidando al tiosulfato y el sistema entro en condiciones de lavado. Encontrándose en este valor la tasa de dilución crítica (D_c). De este modo μ_{max} fue igual 0.4 h^{-1} que es comparable a lo reportado en la bibliografía para cepas puras de *Thiobacillus* sp. ($\mu_{\text{max}} = 0.31 \text{ h}^{-1}$) y *Thiobacillus neapolitanus* ($\mu_{\text{max}} = 0.33 \text{ h}^{-1}$).
3. La eficiencia oxidativa se incrementa proporcionalmente al incrementar la carga de tiosulfato entre los intervalos de tasas de dilución evaluadas.
4. Con el crecimiento en quimiostato del *Thiobacillus* sp. utilizando como sustratos al tiosulfato y/o sulfuro ambos fueron oxidados completamente a sulfato. Por lo que se concluye que la fuente de energía que utiliza el microorganismo es indistinta como se ha reportado para diferentes especies de thiobacilli (Steffes y col., 1998).
5. En cuanto a rendimiento se obtuvo, para tiosulfato y sulfuro, un promedio igual a 9.3 g biomasa/ mol $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y para el sulfuro 3.2 g biomasa/ mol S^2 , lo que coincide en lo reportado en la bibliografía.

6. El *Thiobacillus* sp. presenta una velocidad máxima ($V_{m\acute{a}x}$) de oxidaci3n de 80 mg O_2/g proteina min., que equivale a 140 mg $S_2O_3^{2-}/g$ proteina min. La K_m para el tiosulfato fue de 5 mM. Mientras que para sulfuro la $V_{m\acute{a}x}$. de 20.98 mg O_2/g proteina min., que es igual a 10.49 mg S^{2-}/g proteina min., esto de acuerdo a la estequiometria de la reacci3n. La K_m fue de 0.3 mM.
7. Al evaluar el efecto inhibitorio de N-etilmaleimida (NEM) y cianuro de sodio (NaCN), se observ3 lo siguiente.
- 7.1 En el caso del NEM con tiosulfato y sulfuro, se afect3 en un 20% y 11% respectivamente, la velocidad de oxidaci3n. Por lo que se puede inferir que afect3 la actividad de las enzima responsable de la oxidaci3n.
- 7.2 Con respecto al cianuro en concentraciones de 1.5 y 2 mM la actividad sulfoxidante fue completamente inhibida en los dos sustratos, infiriendo que el cianuro inhibe el transporte de electrones a nivel de citocromo c. Pudiendo deducir as3, que la cadena respiratoria es un paso limitante en el crecimiento celular de estos microorganismos, ya que es el 3nico sitio de generaci3n de energ3a de crecimiento y fijaci3n de carbono.

VIII. BIBLIOGRAFÍA.

- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J. (1994). Introduction to the cell. In: molecular Biology of the Cell. Garland Pub., N. Y. p. 3-41
- Alcántara P. S. J. (2000). Estudios de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes, evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial de tiosulfato en azufre elemental. Tesis de Doctoría, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa. México. p.19-22, 25, 26, 28, 29.
- Alcántara S, Velasco A, Revah S. (2003). Sulfur formation by steady-state continuous cultures of a sulfoxidizing consortium grown on thiosulfate. Process Biochemistry. Enviado.
- A. Sergio. Velasco A. et al. (2000). Sulfur formation by steady-estate continuous cultura of sulfoxiding consortium grown on sulfide in a recirculation reactor system. IMP (Biotecnología). México. Enviado.
- Aleem M. (1987). Microbial Energetics. Ed. Haddock, B. A. y Hamilton, W. A. 27 Symposium the Society for General Microbiology held at Imperial College London, U. K.
- Alvarez B. J. et al. Diseño de reactores químicos. Ed. Trillas. México. 1978. p.15,34
- B. Atkinson. Reactores Bioquímicos. Ed. Reverte. España. 1986. p. 15, 17-19, 26, 28-30
- Beflä T, Berczy M, Aragno M. (1991c). Respiratory oxidation of reduced sulfur compounds by intact cell of *Thiobacillus tepidarius* (type strain). Arch. Microbiol. 158, 456-458
- 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. Reverte. España. P. 295-321
- Buisman, C; Post R; Ijspeert, P; Geraats, Lettinga, G. Biotechnological rocess for Sulfphide Removal with Sulphur Reclamation. Acta biotechnol. 1989. 9 (3) 255-267
- Buisman C, Prins, W. (1994). New process for biological (flue) gas desulfurization. Symposium on Biological Waste Gas Cleanning. Heidelberg, FRG. p. 95-103
- Buisman C. (1998). Industrial applications of new sulfur biotechnology. The Biological Sulfur Cycle: Environmental Science and Technology. Wageningen. The Netherlands, April. 19-24

Buisman C, Wit B, Geraats G, Lettinga G. (1990). Biotechnological Sulphide removal in three polyurethane carrier Reactors: stirred reactor, biorotor and upflow reactor. *Wat Res* (24) 2, 245-251.

Chan C, Suzuki I. (1993). Quantitative extraction and determination of elemental sulfur and stoichiometric oxidation of sulfide to elemental sulfur by *thiobacillus thiooxidans*. *Can. J. microbial.* 39,1166-1168

Chan C, Suzuki I. (1994). Thiosulfate oxidation by sulfur-grown *Thiobacillus thiooxidans* cell, cell free extracts and thiosulfate-oxidizing enzyme. *Can. J. Microbiol.* 40, 816-822.

Cork D, Garunas R, Sajjad A. (1983). Chlorobium limicola forma thiosulfatophilum. Biocatalyst in the production of sulfur and Organic Carbon from a Gas Stream containing H₂S and CO₂. *Appl. Environ. Microbiol.* 45(39), 913-918

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), 12-24

Estrada I. (1998). Aspectos microcinéticos de la oxidación de compuestos azufrados. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa. México. p. 60

Ferguson, S. J. (1991). The periplasm. In *Prokaryotic Structure and fuction*. Ed. Mohan C. D. and Coles J. A. p. 310-339

Flores-Encarnación M, Soto M, Contreras Z, Aguilar G, Baca E, Escamilla E. (1999). The respiratory system of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5 under nitrogen fixing conditions. *J. Bacteriol.* Accepted.

Gommers P, Bijlereld w, Zuijderwijk F, Kuenen J. (1998 a, b). Simultaneous sulfide and acetate oxidation in denitrifying fluidized bed reactor. I and II. *Wat. Res.* 22(9),1075-1083, 1055-1092

Groenestijn J, Hesselink P. (1993). Biotechniques for air pollution control. *Biodegradation.* 4, 283-301

Halberg K, Dopson M, Lindstrom E. (1996). Reduced sulfur compound oxidation by *thiobacillus caldus*. *J. Bacteriol.* 178(1), 6-11

Harder, W., J. G. Kuenen, and A. Matin. (1997). microbial selection in continuous culture. *J. Appl. Bacteriol.* 43:1-24

Hazeu 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

Hooper A, DiSpirito A. (1985). In bacteria which grow on simple reductans, generation of a proton gradient involves extracitoplasmic oxidation of substrate. *Microbiol. Rev.* 49(2), 140-157

Inouye M. (1979). What is the outer membrane. In *bacterial Outer Membranes*. Ed. Inouye M. p. 1-12

Janssen A, Webb C. (1995). Treatment of H₂S containing gases: A review of microbiological alternatives. *Enzyme Microbiol. Technol.* 17, 2-10

Janssen A. (1996). Formation and coidal behavior of elemental sulphur produced from the biological oxidation of hydrogensulphide. PhD Thesis, Wageningen, The Netherlands.

Janssen A, Ma S, Lens P, Lettinga G. (1997). Performance of a Sulfide-Oxidizing Expanded-Bed Reactor Supplied With Dissolved Oxygen. *Biotechnol Bioeng.* 53: 32-40

Janssen, A; Sleyter, R; Van der Kaa, C; Jochemsen, J; Bontsema, J; Ma, S.; Lettinga, G. (1995). Biological Sulphide Oxidation in a Fed-batch Reactor. *Biotechnol Bioeng.* 47, 327-333

Jordan S, Kraczkiewicz-Dowjat A Kelly D and Wood A. (1995). Novel eubacteria able to growth on carbon disulfide. *Arch. Microbiol.* 163, 131-137.

Kawasaki L, y col. (2003). Isolation and characterization of a sulfoxidizing bacterium from a microbial consortium adapted to sulfides. (en preparación)

Khanna P, Rajkumar N and Jothikumar N. (1996). Microbial Recovery of Sulfur from Thiosulfate-Bearing Wastewater with Phototrophic and Sulfur-Reducing Bacteria. *Curr Microbiol* 32: 33-37

K. G. Denbigh. et. al. (1990). Introducción a al teoría de los reactores químicos. Ed. Limusa Noriega. México. p.18-20, 83-86

Kevin B. Hallberg. et al. (1996). Reduced Sulfur compound Oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J. of Bacteriology*. p. 6-11

Kelly, D; Shergill, J; Lu, W; Word, A. (1997). Oxidative Metabolism of inorganic Sulfur Compounds by Bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 71, 95-107

Kelly D. (1990). Energetics of Chemolithotrophs. In *The Bacteria*, Vol. XII, Ed. T. A. Krulwich, Academia Press, Inc. USA. p. 479-501.

Kelly D. (1982). Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 238, 499-528

Kelly D. (1988). Mechanism of oxidation of Dimethyl Disulfide by *Thiobacillus thioparus* Strain E6. *J. Gen. Microbiol.* 134, 3031-3039

- Kuennen J. G., Pronk J. T., Meulenberg R., Bos P. (1993). A review of bioenergetics and enzymology of sulfur compound oxidation by acidophilic thiobacilli. In Biohydrometallurgical Technologies. Torma A. E. And Lakshman V. L. TMS press. p. 487-493
- Lee M., Senios J., Grossman M. (1995). Sulfur-specific Microbial Desulfurization of Sterically Hidered Analogs of Dibenzothiphene. App. Microbiol. 61, 43, 62-66
- Lehninger A. (1983). Enzimas de oxidación-reducción y transporte electrónico. En Bioquímica. Omega. p. 487-517
- Lehninger A., Nelson D., Cox M. (1993). Principles of bioenergetics. In: Principles of biochemistry. Worth Pub. N. Y. p. 364-369
- Lowry O. H., Rosebrough M J, Farr A L, Randal R J. (1951). Protein Measurements with the folin Phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275
- 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
- Nelly D. (1982). Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur. Phil. Trans. R. Soc. Lond. 238, 499-528
- Mackenzie F. (1995). Biogeochemistry. In: Encyclopedia of environmental Biology. Vol I. Academic Press, USA. p. 249-276
- McComas, C. Sublette, K., Jenneman G, Bala G. (2001). Biotechnol. Prog., 17, 439-446
- Mc Eldowney S, Hardman D, Warte S. (1993). Pollution: Ecology and Biotreatment. Logman Sci. And Tech., Singapore. p. 193-230
- Madigan T. M., Martinko J. M., Parker J. (1999). Diversidad metabólica de los microorganismos. En: Biología de los microorganismos. Prentice may Iberia. México. p. 332-336, 473-531
- Manion A. M. (1992). Acidification and Eutrophication. In: Enviromental Issues in The 1990's. Eds. Mannion A. M and Bowley S R. Jhon Wiley, Chichester. p. 177-197
- Mónica R H. (2001). Aislamiento y caracterización de una bacteria sulfooxidante. Tesis licenciatura. p. 9-16, 22-30
- Michael J, Pelczar Jr. (1991). Microbiología. Mc Graw Hill. México. p. 12-13, 90-91, 103-107.

Prosser J. (1989). Autotrophic nitrification in bacteria. In: *Advances in microbial physiology*. Vol. 30, 125-177

Revah S, Acosta M, Hugler W, Trinidad R, Avila C, Estrada I, Hinojosa A. (1995). Air biodesulfuration from Viscose plants: Carbon Disulfide Elimination, Conference On Biofiltration (an Air Pollution Control technology). Los Angeles, California, Oct. 5-6

Riordan J y Vallee B. (1967). Reactions with N-ethylmaleimide and p-mercuribenzoate, in: C: H: W: Hirs (ed). *Methods in Enzimology*, vol. XI, Academic. Press. USA. p. 541-548

Robertson I, Kuenen J. (1991). The colorless sulfur bacteria, In: Balows A, Truper H, Dworkin M, Harder H, Schlerfer K (eds). *The prokariotes*, vol. 1, Springer, Berlin Heidelberg. New York. p. 385-413

S. Jhon Pirr. (1975). *Principles of microbe and cell cultivation*. Ed. John Wiley & sons. Nueva Cork. p. 4, 29, 30, 38, 41

Smet E, Van Langenhove. (1998). Abatement of volatile organic sulfur compounds in odorous emissions from the bio-industry. *Biodegradation*, 9, 273-284

Steffes, G; Torresmans, R; Schrijver, R; Roberson, L; Kuenen, J. (1996). Quantitative Measurement of sulphur Formation by Steady-state and Transient-state Continuous Cultures of Autotrophic *Thiobacillus* species. *App. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 169-175

Stuedel R. (1996). The Yellow Element and its Astounding Complexity. *Anorganische Chemie*. 5, 226-234

Stuedel R. (1998). Sulfur chemistry: Speciation, natural occurrence, redox reations and colloidal aspects. In: *Cycle: Enviromental Science and technology*, Wageningen. The Netherlands, April 19-24

Sublette K. (1987). Aerobic Oxidation of Hydrogen Sulfide by *Thiobacillus denitrificans*, *Biotech. Bioeng.* 29, 690-695

Suzuki I, Chan C, Takeuchi T. (1992). Oxidation of elemental sulfur to sulfite by *Thiobacillus thiooxidans* cell. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (11), 3767-3769

Suzuki I. (1999). Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and Enzymatic Reactions. *Can. J. Microbiol.*, 45, 97-105.

Takakuwa S. (1992). Biochemical Aspects of microbial oxidations of inorganic sulfur compounds. In: *Organic sulfur chemistry: Biochemical Aspects*. Eds. Oae S, Okuyama T CRC Press, USA. p. 1-44

Takashima, T, Nishiki T, Konishi Y. J. (2000). *Bioscience and Bioeng.*, 89(3), 247-251

Torres C. M, Revah S, Hinojosa M. A, Páez M. F, Morales V. (1993). Biological Process for the elimination of sulphur compounds present in gas mixture. U.S. Patent. 5,236,677

Velasco A., Alcántara S., R. Flores Elías., Revah S. Sulfur Formation by steady-state continuous culture of a sulfoxiding consortium grown on Thiosulfate. Bioreactor-setter system. UAM-I, IMP, México. Enviado

Visser J. M, Robertson L, Versseveld H, Kuenen J. (1997). Sulfur production by obligately Chemolithoautotrophic *Thiobacillus* species. American society for microbiology. p. 63 (6) 2300- 2305

Volkmar, B. (1978). Structure function relationship of the gram negative bacterial cell envelope. In relations between structure and fuction in the prokaryotic cell. Eds. Stainer R. Y, Rogers H. G and Word J. b. p. 111-137

Warner P. (1980). Orígenes y medida de los contaminantes inorgánicos del aire. En: análisis de los contaminantes del aire. Ed. Paraninfo. 115-182

Wiseman A. (1986). Principios de Biotecnología. Acribia. España.