

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Evaluación de la actividad sulfoxidante termotolerante de
microorganismos provenientes de un suelo alcalino.**

TESIS PROFESIONAL

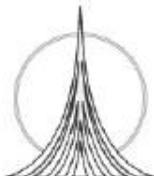
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

PEDRO MOYA GARCÍA

**Director de tesis: Dra. Patricia Olguín Lora.
Adscripción: Instituto Mexicano del Petróleo.**



México D. F., 2005



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 toda mi familia, en especial a mis padres y hermanas por que con su apoyo y comprensión este trabajo que plasma mi trayectoria escolar ha podido concluirse.

A mi sobrina Joselyn por que su curiosidad e interés me animan a seguir.

A Vanessa y a Luis por ser más que amigos y estar con nosotros en todo momento y desinteresadamente.

A la Biol. María de los Angeles Galván Villanueva y a la Dra. Patricia Olguín Lora por que antes que todo son personas que confiaron en mí impulsándome a dar lo mejor cada día.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a mis profesores y compañeros, por que juntos lo hemos logrado y ya son parte de mí.

Al Instituto Mexicano del Petróleo, al equipo de trabajo ya que en todo momento estuvieron a mi lado.

Por poder escribir estas palabras gracias a tod@s aquell@s que han compartido parte de su tiempo conmigo y que al hacerlo me han hecho mejor.

Este trabajo se realizó en el Instituto Mexicano del Petróleo en el programa de biotecnología del petróleo, dentro del proyecto D.00011: “aislamiento y caracterización de microorganismos para la regeneración de aminas ácidas del endulzamiento del gas natural” bajo la dirección de la Dra. Patricia Olguín Lora.

ÍNDICE

	Página
ÍNDICE	1
ÍNDICE DE TABLAS	3
ÍNDICE DE FIGURAS	4
ANOTACIONES	6
RESUMEN	7
1 Introducción	9
1.1 Química del azufre	10
1.1.1 Azufre	10
1.1.2 Tiosulfato ($S_2O_3^{-2}$)	12
1.1.3 Sulfuro (S^{-2})	13
1.1.4 Sulfato (SO_4^{-2})	14
1.2 Procesos de remoción de SO_2 y H_2S del gas natural	15
1.3 Ciclo Biogeoquímico del Azufre	17
1.4 Microorganismos extremófilos	19
1.4.1 Clasificación de microorganismos extremófilos	20
1.4.2 Microorganismos alcalófilos	20
1.4.2.1 Alcalófilos aerobios	21
1.4.2.2 Alcalófilos anaerobios	21
1.4.2.3 Haloalcalinófilos	23
1.4.2.4 Cyanobacterias	23
1.5 Bacterias sulfoxidantes	23
1.5.1 Quimiolitótrofos obligados	24
1.5.2 Quimiolitótrofos facultativos	24
1.5.3 Alcalófilos sulfoxidantes	26
1.6 Procesos biológicos en la eliminación de compuestos de Azufre	28
1.7 Biorreactor continuo de tanque agitado	29
2 JUSTIFICACIÓN	31
3 HIPÓTESIS DE TRABAJO	32
4 OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo general	33
4.2 Objetivos particulares	33
5. MATERIALES Y MÉTODOS	34
5.1 Adaptación de un consorcio microbiano sulfoxidante en un reactor agitado	34
5.1.1 Parámetros de operación del reactor	37
5.2 Ensayos de respirometría	38
5.2.1 Efecto de la concentración de NaCl, pH, MDEA y Sulfuro sobre la actividad sulfoxidante	40
5.2.2 Tratamiento de resultados	42
5.3 Adaptación del consorcio sulfoxidante a temperatura de 40 °C	44
5.4 Cinéticas de oxidación de tiosulfato	45
5.4.1. Preparación del inóculo para las cinéticas	45

5.4.1.1 Prueba de inóculo	46
5.4.2. Efecto de la concentración de NaCl, pH, temperatura y concentración de MDEA sobre la oxidación de tiosulfato	46
5.5 Aislamiento de microorganismos	48
5.5.1 Caracterización macroscópica	52
5.5.2 Caracterización microscópica	52
5.6 Métodos analíticos	52
5.6.1 Cuantificación de biomasa	52
5.6.2 Cuantificación de sulfatos por el método turbidimétrico	54
5.6.3 Cuantificación de sulfato (SO_4^{-2}) y tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$)	56
5.6.4 Tinción de Gram	58
6 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	60
6.1 Cultivo continuo	60
6.1.1 Adaptación de un consorcio microbiano sulfoxidante en un reactor agitado	60
6.1.2 Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento microbiano y la oxidación de tiosulfato	60
6.2 Ensayos de respirometría	62
6.2.1 Efecto de la concentración de tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$) sobre la actividad sulfoxidante del consorcio	62
6.2.2 Influencia de la concentración de NaCl sobre la actividad sulfoxidante del consorcio	63
6.2.3 Efecto del pH sobre la actividad sulfoxidante del consorcio	64
6.2.4 Inhibición de la actividad sulfoxidante del consorcio por la metildietanolamina (MDEA)	65
6.2.5 Actividad del consorcio usando como sustrato sulfuro (S^{-2})	66
6.3 Adaptación del consorcio sulfoxidante a temperatura de 40 °C	67
6.3.1 Cinéticas de oxidación de tiosulfato	68
6.3.1.1 Selección del volumen de inóculo	68
6.3.2 Efecto de la concentración de tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$) en el consorcio a 40 °C	69
6.3.3 Influencia de la concentración de NaCl sobre la actividad sulfoxidante en el consorcio a 40 °C	71
6.3.4 Efecto del pH sobre la actividad sulfoxidante en el consorcio a 40 °C	72
6.3.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad sulfoxidante del consorcio a 40°C	73
6.3.6 Inhibición de la actividad sulfoxidante del consorcio a 40 °C por la metildietanolamina (MDEA)	74
6.4 Aislamiento de microorganismos	76
6.4.1 Características macroscópicas	76
6.4.2 Características microscópicas	77
6.4.3 Observación al microscopio electrónico de barrido ambiental	77
6.5 Caracterización de la actividad sulfoxidante de la cepa	79
7 CONCLUSIONES	80
8 GLOSARIO	82
9 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Estados de oxidación del azufre	12
Tabla 2	Clasificación de microorganismos extremófilos con base en el factor ambiental que soportan	22
Tabla 3	Bacterias sulfoxidantes	25
Tabla 4	Composición del medio mineral para el crecimiento de microorganismos sulfoxidantes	36
Tabla 5	Experimentos correspondientes a los estudios de respirometría	41
Tabla 6	Experimentos correspondientes a las cinéticas de oxidación del tiosulfato	47
Tabla 7	Preparación de las diluciones para la curva patrón de proteína	54
Tabla 8	Preparación de las diluciones para la curva patrón de sulfatos	55
Tabla 9	Preparación de las diluciones para la curva patrón de electrolitos	57
Tabla 10	Balance de azufre del consorcio microbiano sulfoxidante en un reactor agitado	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo Biogeoquímico del Azufre	18
Figura 2	Oxidación biológica de sulfuro en función de la concentración de oxígeno disuelto y la concentración de sulfuro en el medio (O_2/S^{-2})	28
Figura 3	Reactor continuo de tanque agitado	29
Figura 4	Sistema en continuo para la adaptación de la biomasa a la oxidación del tiosulfato	30
Figura 5	Biorreactor en continuo para la oxidación de tiosulfato	34
Figura 6	Consumo de oxígeno en función del tiempo en un estudio de respirometría	42
Figura 7	Velocidades específicas de consumo de tiosulfato en función de la concentración de tiosulfato	43
Figura 8	Método de diluciones sucesivas para la siembra en sólido	50
Figura 9	Diagrama para la siembra en placa	50
Figura 10	Siembra por estría simple y estría cruzada	51
Figura 11	Cromatograma, picos y tiempos de retención característicos en la determinación de sulfato (SO_4^{-2}) y tiosulfato ($S_2O_3^{-2}$)	58
Figura 12	Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento y producción de sulfato del consorcio sulfoxidante	62
Figura 13	Oxidación biológica de tiosulfato ($S_2O_3^{-2}$) por el consorcio	63
Figura 14	Velocidad de oxidación del tiosulfato en presencia de NaCl por el consorcio	64
Figura 15	Velocidad de oxidación del tiosulfato a diferentes pH por el consorcio	65
Figura 16	Velocidad de oxidación del tiosulfato a diferentes concentraciones de MDEA por el consorcio	66
Figura 17	Oxidación biológica de sulfuro (S^{-2}) por el consorcio	67

Figura 18	Cinética de desaparición de tiosulfato, aparición de sulfato y crecimiento de la biomasa (proteína)	69
Figura 19	Capacidad de oxidación de tiosulfato y crecimiento del consorcio en función de la concentración de tiosulfato	70
Figura 20	Influencia de la concentración de NaCl en la oxidación de tiosulfato y en el crecimiento de la biomasa	71
Figura 21	Efecto del pH en la oxidación de tiosulfato y en el crecimiento de la biomasa	73
Figura 22	Efecto de la temperatura en la oxidación del tiosulfato y sobre el crecimiento de la biomasa	74
Figura 23	Inhibición de la actividad de oxidación de tiosulfato y el crecimiento de la biomasa por la MDEA	75
Figura 24	Crecimiento en placa de la colonia aislada a partir del consorcio	76
Figura 25	Cepa con tinción de Gram	77
Figura 26	Microfotografía de las colonias aisladas	78
Figura 27	Velocidad de oxidación de tiosulfato y crecimiento microbiano por la cepa	79

RESUMEN

El desarrollo de las actividades industriales altera el ciclo natural del azufre provocando un desequilibrio en los ciclos del carbono y del nitrógeno. En muchas industrias este elemento se emite a la atmósfera en diferentes formas de compuestos contaminantes, teniendo que ser removidos para disminuir el impacto negativo sobre los ecosistemas. Por lo que el estudio del ciclo del azufre es de gran importancia tanto a nivel básico como de proceso con el fin de proponer alternativas de manejo de los compuestos relacionados. En este sentido, el presente trabajo propuso evaluar la actividad sulfoxidante termotolerante de microorganismos provenientes de suelos alcalinos, para posteriormente proponer alternativas biotecnológicas que remuevan compuestos azufrados.

En trabajos anteriores se colectaron muestras de suelos alcalinos, de tres zonas de México para obtener consorcios microbianos sulfoxidantes, una de ellas fue la zona de Tlahuac en el Distrito Federal. De esta zona se obtuvo el consorcio TI, que contienen bacterias alcalófilas sulfoxidantes, el cual utiliza como fuente de energía al tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) y como fuente de carbono al CO_2 , por lo que se consideran microorganismos quimiolitótrofos sulfoxidantes.

El consorcio TI oxida $S_2O_3^{2-}$ y sulfuro (S^{2-}). La tasa de oxidación de tiosulfato para el consorcio adaptado a una temperatura de 30 °C fue de $17.0 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ Proteína} \cdot \text{min}^{-1}$, para el sulfuro la tasa de oxidación fue de $11.2 \text{ mgO}_2 \text{ g}^{-1} \text{ Proteína} \cdot \text{min}^{-1}$. Las constantes de afinidad fueron de 0.22 y 0.06 mM, respectivamente. La actividad sulfoxidante del consorcio se observó inhibida a medida que se aumentó la concentración de NaCl. El pH óptimo para el consorcio fue de 10 por abajo y encima de este pH la actividad es afectada. La adición de metildietanolamina en el medio a partir de concentraciones de 10 mM, igualmente disminuyó la actividad del consorcio. Se estimó la tasa de dilución máxima de este consorcio en un reactor agitado y se obtuvo que en tasas de 0.46 a 2.51 d^{-1} el sistema removió completamente el tiosulfato alimentado hasta cargas de $11.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ de $S_2O_3^{2-}$, a partir de una tasa de dilución de 3.32 a 5.34 d^{-1} , la actividad del consorcio disminuyó presentando un 50 y 80% de la oxidación de tiosulfato alimentado. En la adaptación del consorcio a una

temperatura de 40 °C, se obtuvo una velocidad de oxidación del tiosulfato de 60 g S₂O₃⁻² g⁻¹ Proteína· h⁻¹, con una constante de saturación de 11 mM y una velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) de 0.035 h⁻¹. La actividad del consorcio adaptado a 40°C, se evaluó en presencia de diferentes concentraciones de NaCl, de MDEA, de diferentes valores de pH y diferente temperatura. Se obtuvo que la concentración de NaCl, donde la actividad sulfoxidante fue máxima, es de 0.3 mM, el pH fue 10 y una temperatura de 40 °C. La adición de amina afectó drásticamente la actividad del consorcio. Del consorcio adaptado a 40 °C, se aisló una cepa Gram (-), en forma de bacilos delgado y cortos, cuya actividad fue de 34 g S₂O₃⁻² g⁻¹ Proteína· h⁻¹, y una Ks de 9 mM. Los resultados son comparables con los reportados para microorganismos sulfoxidantes y alcalófilos sulfoxidantes. Filogenéticamente la cepa aislada no ha sido identificada

1 INTRODUCCIÓN

El interés de la contaminación ambiental es reciente, ya que es en los últimos años cuando se han empezado a realizar acciones para su prevención y control. Existen fuentes de contaminación naturales, como las provenientes de los volcanes e incendios forestales y las no naturales, provenientes de las industrias, oficinas y hogares (Erkerlin y col., 1997).

Dentro de los contaminantes de importancia en el ámbito mundial, los compuestos azufrados tienen un gran impacto debido a los efectos graves que ocasionan en el equilibrio ambiental y a la salud. Este elemento es esencial para la vida en la tierra, por lo que el entendimiento del ciclo biogeoquímico es importante. El ciclo involucra el metabolismo de diferentes grupos de bacterias especializadas en usar compuestos azufrados, en sus distintos estados de oxidación y en diversas condiciones ambientales (temperatura, salinidad y pH) (Lens y Kuenen, 2001).

Existen diversas biotecnológicas para eliminar o remediar los efectos de la contaminación por compuestos azufrados, las cuales toman en cuenta las conversiones que realizan naturalmente las bacterias en el ciclo biogeoquímico del azufre como se ilustra en la figura 1 (Lens y Kuenen, 2001).

Dentro de los compuestos azufrados que se emiten en grandes cantidades a la atmósfera se encuentra el dióxido de azufre (SO_2) y el ácido sulfhídrico (H_2S). El primero es el causante de la lluvia ácida, mientras que el segundo se emite a la atmósfera debido a la actividad de los volcanes, durante la evaporación de las aguas oceánicas y también por la explotación de fuentes naturales que contienen H_2S como el gas natural y el petróleo. El H_2S , es el causante del mal olor que se genera en ríos contaminados, en rellenos sanitarios y en sistemas de tratamiento de aguas residuales; además es el causante de los fenómenos de corrosión de acero y concreto; y daños a la salud debido a su toxicidad (Chopin y col., 1977).

Las diferentes corrientes de desecho (líquidas, gaseosas) que se generan en procesos industriales donde se emite H_2S , tienen características muy variadas en cuanto a temperatura, pH, salinidad y otros compuestos. Algunos de estos

procesos sobre todo fisicoquímicos, operan a condiciones extremas de temperatura y pH, pero necesitan una gran inversión en energía, por lo que los costos de operación son muy altos. Dichas condiciones, se encuentran lejos de los óptimos de operación de los microorganismos sulfoxidantes, por lo que es necesario contar con microorganismos que puedan oxidar los compuestos azufrados en ambientes extremos (extremófilos), para posteriormente ser utilizados en procesos biotecnológicos que traten corrientes contaminadas con H_2S en condiciones extremas.

Un ejemplo; es el proceso de endulzamiento de gas natural. El proceso fisicoquímico comercial para la remoción de H_2S del gas natural, utiliza soluciones de aminas, el cual consta de dos etapas: una de absorción donde la solución de aminas entra en contacto con el gas amargo con el fin de absorber el H_2S . La otra etapa de regeneración donde, el H_2S se desorbe por medio de calor de la solución de aminas ácidas. Finalmente, el compuesto se transforma en azufre elemental por medio del proceso Claus o produciendo gases ricos en SO_2 (Kohl y Nielsen, 1997).

Este proceso fisicoquímico tiene alternativas biológicas donde en vez de utilizar la solución de aminas, utilizan álcalis y los siguientes pasos son remplazados por reactores biológicos. Sin embargo, aun es necesario contar con microorganismos sulfoxidantes alcalófilos capaces de sobrevivir en las condiciones del proceso y seleccionar las bacterias apropiadas, cuyas características cinéticas satisfagan las necesidades del proceso de remoción de azufre.

1.1 Química del Azufre

1.1.1 Azufre

El azufre ocupa el lugar 16 en abundancia entre los elementos de la corteza terrestre, se encuentra ampliamente distribuido tanto en estado libre como combinado con otros elementos. Se halla en numerosos sulfuros metálicos,

como el sulfuro de plomo o galena (PbS), la esfalerita (ZnS), la calcopirita (CuFeS₂), el cinabrio (HgS), la estibina (Sb₂S₃), y la pirita de hierro (FeS₂). También se encuentra combinado con otros elementos formando sulfatos como la baritina (BaSO₄), la celestina (SrSO₄), y el yeso (CaSO₄•2H₂O). Asimismo está presente en moléculas de una gran variedad de sustancias como la mostaza, el huevo y las proteínas. En estado libre se encuentra mezclado con rocas de yeso y pumita en zonas volcánicas, principalmente en Islandia, Sicilia, México y Japón, apareciendo a menudo como sublimados en las inmediaciones de orificios volcánicos. El azufre en estado libre puede formarse por la acción del aire sobre las piritas, o también depositarse por aguas sulfurosas calientes, en las cuales el sulfuro de hidrógeno se ha oxidado en contacto con la atmósfera.

El Azufre es un elemento que en la naturaleza se encuentra como una mezcla de cuatro isótopos ³²S, ³³S, ³⁴S y ³⁶S; en porcentajes de 95.1%, 0.74%, 4.2% y 0.016%, respectivamente

El azufre es un sólido cristalino amarillo (ortorrómbico) poco soluble en agua (5 µg•L⁻¹ de S₈ a 25 °C), muy soluble en bisulfuro y tetracloruro de carbono, y disolventes orgánicos no polares. A partir de estas soluciones se pueden obtener cristales de Azufre perfectamente formados. Fundiéndose a los 112.8 °C, formando un líquido color paja.

Este elemento se emplea en la fabricación del ácido sulfúrico y del bisulfato de carbono, así como en la fabricación de pólvora, cerillas, fuegos artificiales y colorantes; de igual forma se usa como fungicida y en Medicina. Así como para vulcanizar el caucho.

El azufre es uno de los elementos más interesantes debido a los diferentes estados de oxidación que puede asumir, a la tendencia que tiene el azufre elemental (S₀) de formar cadenas y anillos concatenados, así como a las complejas reacciones de equilibrio de algunos compuestos azufrados.

El azufre tiene nueve estados de oxidación (tabla 1) y la mayoría de ellos existen en sistemas acuosos, en los cuales las reacciones de oxido-reducción ocurren ya sea por actividad microbiana o actividad química. El equilibrio entre los compuestos de azufre en un sistema acuoso, depende del potencial redox,

el valor de pH, la temperatura, y la concentración, siendo los compuestos relativamente más estables HS^- , S_8 , SO_4^{-2} y HSO_4^- (Steudel, 2000).

Tabla 1. Estados de oxidación del azufre (Steudel, 2000; Brüser y col., 2000).

Estado de oxidación	Compuestos
-2	Ácido sulfhídrico (H_2S), ion sulfuro de hidrogeno* (HS^-), ion sulfuro (S^{-2})
-1	Disulfano (H_2S_2), disulfuro (S_2^{-2}), polisulfuros* ($^-\text{S}-\text{S}_n-\text{S}^-$), tiosulfato* ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$)
0	Azufre elemental* (S_n) polisulfanos orgánicos ($\text{R}-\text{S}_n-\text{R}$), politionatos* ($^-\text{O}_3\text{S}-\text{S}_n-\text{SO}_3^-$)
+1	Diclorurodisulfano ($\text{Cl}-\text{S}-\text{S}-\text{Cl}$)
+2	Dicloruro de azufre (SCl_2), sulfoxilato (SO_2^{-2})
+3	Ditionito ($\text{S}_2\text{O}_4^{-2}$)
+4	Dióxido de azufre (SO_2), sulfito (SO_3^-), bisulfito* (HSO_3^-)
+5	Ditionato ($\text{S}_2\text{O}_6^{-2}$), sulfonato (RSO^{-2})
+6	Trióxido de azufre (SO_3), sulfato* (SO_4^{-2}), peroxosulfato (SO_5^{-2})

* Compuestos inorgánicos de relevancia biológica

Los compuestos reducidos de azufre son aquellos que tienen estados de oxidación -2 y -1; los estados de oxidación intermedios 0, +2, +4 tienen solo una existencia transitoria geoquímicamente y la forma más oxidada del azufre (+6) se encuentra en el SO_4^{-2} .

1.1.2 Tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$)

El $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ es un anión formado por dos átomos de azufre no equivalentes que tiende a su descomposición química en soluciones acuosas.

Junto con otros compuestos de azufre el $S_2O_3^{-2}$ es altamente agresivo por los problemas de corrosión asociados al mismo. Este se utiliza en las industrias de la fotografía, del papel y en la farmacéutica, por lo tanto se encuentra como contaminante en las aguas residuales de estas. La industria del petróleo, también lo emite como contaminante. Es claro que por si mismo el $S_2O_3^{-2}$ no es un factor de deterioro ambiental, sin embargo; los productos de su oxidación biológica o química (SO_4^{-2}), o bien su reducción biológica en condiciones anaerobias (H_2S) tienen fuerte impacto ambiental (Alcántara, 2000).

Los tiosulfatos son las sales del hipotético ácido sulfúrico. Son estables en medios con pH básico y neutro y se descomponen bajo formación de azufre elemental, ácido sulfhídrico (H_2S), dióxido de azufre (SO_2) y trazas de otros compuestos azufrados en presencia de ácido. Su estructura es tetraédrica con un átomo central de azufre rodeado de tres átomos de oxígeno y otro átomo de azufre. Los tiosulfatos son fácilmente oxidables formando con oxidantes suaves como el yodo elemental, tetratonatos ($O_3S-S-S-SO_3^{-2}$).

1.1.3 Sulfuro (S^{-2})

El sulfuro es la combinación del azufre (número de oxidación -2) con un elemento químico o con un radical. Hay pocos compuestos covalentes del azufre, como el disulfuro de carbono (CS_2) y el sulfuro de hidrógeno (H_2S) que son también considerados como sulfuros.

Uno de los sulfuros más importantes es el de hidrógeno. Este compuesto es un gas con olor a huevo podrido y es altamente tóxico. Pertenece, también a la categoría de los ácidos por lo que, en disolución acuosa, se le denomina ácido sulfhídrico. En la Naturaleza, se forma en las zonas pantanosas y en el tratamiento de lodos de aguas residuales, mediante transformaciones anaerobias del azufre contenido en las proteínas o bien por reducción bacteriana de sulfatos. Se desprende también en las emisiones gaseosas de algunos volcanes y es asimismo un subproducto de algunos procesos industriales.

Muchas menas de algunos metales son sulfuros. Entre ellos están:

- Arsenopirita: FeAsS
- Argentita: Ag₂S
- Calcopirita: CuFeS₂
- Cinabrio: HgS
- Galena: PbS
- Pirita: FeS₂
- Rejalgar: AsS
- Estibina: Sb₂S₃
- Esfalerita/Blenda: ZnS
- Wurtzita: ZnS

Los sulfuros son significativamente tóxicos por inhalación o ingestión, especialmente si el ion metálico es tóxico. Los sulfuros, cuando se exponen a la acción de un ácido mineral fuerte, liberan sulfuro de hidrógeno.

Los sulfuros son componentes frecuentes en efluentes y emisiones industriales, encontrándose como ion sulfuro de hidrógeno (HS⁻) e ion sulfuro (S⁻²) en corrientes líquidas o como (ácido sulfhídrico) H₂S en las gaseosas. Estos compuestos se liberan al ambiente por un gran número de industrias, como las refinerías de petróleo, la extracción y tratamiento de gas natural, las fábricas de papel y pulpa, las plantas productoras de celofán y rayón a partir de viscosa, las tenerías, en los efluentes gaseosos de hornos de coke, producción de caucho, en la fundición de mineral de hierro, en los sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales y producción de metano (biogas) por digestión anaerobia de efluentes líquidos, entre otras. (Buisman y col, 1991; Steudel, 1996; Janssen y col., 2001; Morgan y col., 2001).

1.1.4 Sulfato (SO₄⁻²)

En el suelo, del 10 al 15% de azufre se encuentra en forma de sulfatos, el cual puede lixiviar fácilmente a menos que sea adsorbido en coloides del suelo (Campbell, 1987) y por las plantas. Los sulfatos son las sales o los ésteres del

ácido sulfúrico. Contienen como unidad común un átomo de azufre en el centro de un tetraedro formado por cuatro átomos de oxígeno.

Los sulfatos inorgánicos son las sales del ácido sulfúrico (H_2SO_4). En la naturaleza se encuentran en forma de yeso (sulfato cálcico dihidratado, $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), barita (sulfato de bario) o sulfato sódico (Na_2SO_4). La mayor parte de los sulfatos se genera a partir de una base y del H_2SO_4 o por reacción del H_2SO_4 con el metal.

Las aplicaciones de los sulfatos suelen variar enormemente con el metal a que van unidos. Así el sulfato sódico por ejemplo se utiliza en la fabricación del vidrio, como aditivo en los detergentes etc; el sulfato de cobre se aprovecha en la fabricación de la viscosa según un determinado proceso.

Los sulfatos son parte esencial de sales dobles como los alumbres de fórmula general $\text{AB}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, siendo A y B cationes con carga +1 y +3 respectivamente. La más conocida es la alumbre formada con sodio y aluminio. Los sulfatos solubles precipitan en presencia de cloruro de bario incluso de solución ácida en forma de sulfato de bario (BaSO_4) como sólido blanco. Si al mismo tiempo hay permanganato presente este puede ser incluido en el precipitado dándole un color ligeramente rosáceo.

Con sodio metálico es reducido a sulfuro (mediante una reacción muy violenta) y puede ser determinado como tal.

Los sulfatos orgánicos son ésteres del ácido sulfúrico con fórmula general $\text{R-O-SO}_2\text{-O-R'}$. Se pueden formar directamente del alcohol correspondiente y del H_2SO_4 o del trióxido de azufre.

1.2 Procesos de remoción de H_2S del gas natural

Los procesos utilizados comúnmente para la remoción de SO_2 y H_2S del gas natural y otras corrientes de aire contaminado son el lavado cáustico y los procesos con alcaolaminas (Alcántara, 2000).

El lavado cáustico se lleva a cabo en la extracción selectiva de SO_2 a baja concentración de corrientes gaseosas, donde el SO_2 presente en las corrientes de combustión de hulla o de petróleo representa un serio problema, ya que al

presentarse en concentraciones menores al 0.5%, forma una mezcla compleja de otros gases y partículas a temperaturas elevadas. Aunque la concentración de SO_2 es baja, las descargas debido a los procesos de combustión son enormes.

El proceso con alcaolaminas se aplica para la extracción selectiva de H_2S del gas natural. Dado que el gas natural para ser aceptado en las instalaciones domésticas o de automotores no debe sobrepasar el 1% en concentración de sulfuro de hidrógeno. Para ello se emplea un lavador en el cual se utilizan soluciones de alcaolaminas, entre ellas la metildietanolamina (MDEA), empleándose una sola amina o mezcla de varias.

Las alcaolaminas tienen propiedades de alcoholes y de aminas, estas moléculas permiten la reducción de la presión vapor, incrementando la solubilidad en agua, así como la alcalinidad necesaria para generar la adsorción de gases ácidos en solución acuosa. En el caso particular de la MDEA esta presenta las siguientes características:

- Amina terciaria,
- De moderada reactividad,
- Buena estabilidad,
- Alta adsorción de hidrocarburos,
- Pérdidas menores por evaporación,
- Con selectividad por el H_2S ,
- Baja remoción del S^- orgánico,
- De baja corrosión,
- Costo moderado,
- Sin degradabilidad de H_2S , baja para el CO_2 y muy baja para el COS ,
- De 0.3 a 0.45 mol/mol de gas ácido

La MDEA tiene una gran capacidad de absorción de H_2S , pero también una presión de vapor mayor a la temperatura de operación de los lavadores y por lo tanto se requiere de un lavador secundario para su lavado.

En la actualidad el enfoque para resolver los problemas de contaminación por compuestos de azufre se ha modificado. Los procesos fisicoquímicos se usan

sobre todo en corrientes con altas concentraciones de contaminantes pero conllevan altos consumos de energía y generación de contaminantes secundarios.

1.3 Ciclo Biogeoquímico del Azufre

El ciclo biogeoquímico del azufre describe las oxidaciones y reducciones que suceden química y bioquímicamente (biosíntesis, biodegradación y biotransformaciones); así como, las transformaciones físicas (disolución, precipitación, volatilización y fijación) de los compuestos azufrados, que se llevan a cabo en la atmósfera, la hidrosfera y la litosfera, donde el azufre experimenta cambios en su estado de oxidación de -2 (HS^-) a +6 (SO_4^{-2}), cíclicamente. Dichos eventos pueden provocar translocaciones espaciales del azufre y pueden afectar significativamente la geología y el ambiente de nuestro planeta. En la figura 1 se presenta el esquema del ciclo biogeoquímico del azufre.

Los compuestos inorgánicos de azufre más comunes en la naturaleza son: el sulfuro de hidrógeno (H_2S), polisulfuros ($\text{S-S}_n\text{-S}^-$), tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$), politionatos ($\text{O}_3\text{S-S}_n\text{-SO}_3^-$), azufre elemental (S^0) bisulfito (HSO_3^-) y sulfato (SO_4^{-2}), los cuales pueden ser usados por muchos organismos para propósitos asimilativos o desasimilativos. Una amplia variedad de bacterias adquieren energía metabólica a partir de la oxidación o la reducción de éstos (Brüser y col., 2000).

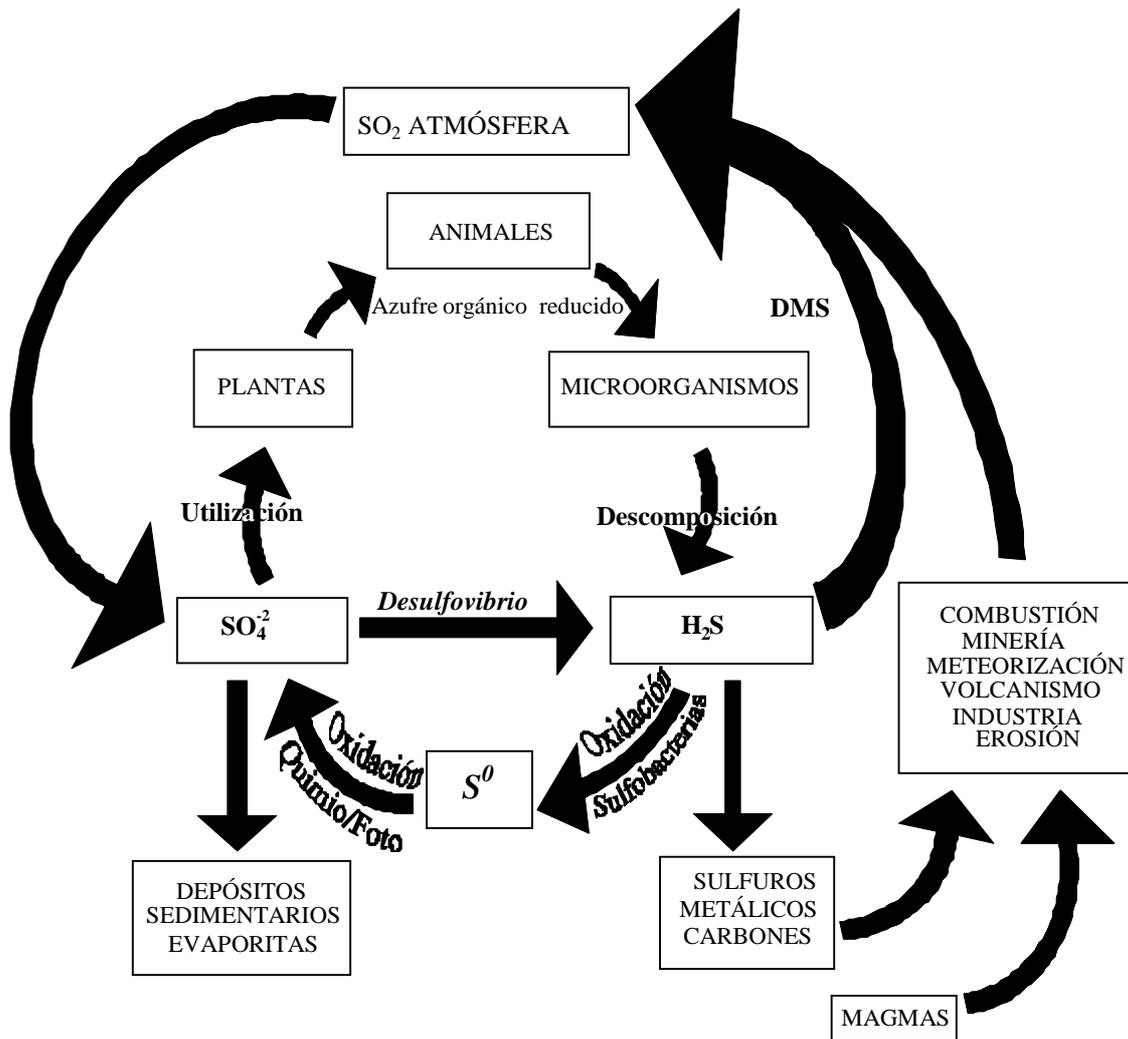


Figura 1. Ciclo Biogeoquímico del azufre (www.lenntech.com/espanol/ciclo-azufre).

El ciclo se puede resumir si se distinguen dos etapas de acuerdo al tipo de reacciones de oxidorreducción que intervienen:

Etapas reductivas. En los procesos biológicos se encuentran dos formas bioquímicas de reducción de los compuestos de azufre inorgánicos: la reducción asimilativa y la reducción desasimilativa.

La primera la presentan tanto eucariotes como procariotes y en ésta, el sulfato es reducido a sulfuro (H_2S) para la biosíntesis de compuestos que contienen azufre, necesarios para el crecimiento celular.

La reducción desasimilativa la presentan principalmente los procariotes y en ella el sulfato es reducido a sulfuro por microorganismos sulfato-reductores en

condiciones anóxicas donde el sulfato es utilizado como aceptor último de electrones. Esta reducción está acoplada con la oxidación de varios ácidos grasos volátiles, lactato y piruvato que generan ATP y energía reductora necesarios para el crecimiento celular.

Etapa oxidativa. La segunda etapa del ciclo la constituyen las reacciones de oxidación de los compuestos reducidos de azufre. De igual manera, esta etapa puede dividirse en dos: las reacciones de oxidación en condiciones anaerobias efectuados por microorganismos fotótrofos y facultativos; y la oxidación aerobia por microorganismos litoautótrofos (Alcántara, 2000).

La importancia del ciclo biogeoquímico del azufre está relacionada con la relevancia bioquímica, los graves daños ambientales que provoca el desbalance entre las reacciones oxidoreductoras globales y la necesidad industrial que existe por este elemento.

Actualmente el ciclo biogeoquímico del azufre tiene un gran interés en especial por los recientes descubrimientos de microorganismos extremófilos que actúan en este y también debido a que las conversiones que suceden en este ciclo no están restringidas sólo al azufre, estas pueden ser usadas para la degradación de compuestos recalcitrantes, materia orgánica y para remover metales pesados o nitrogenados de aguas residuales, suelos y sedimentos. Los microorganismos del ciclo biogeoquímico del azufre ofrecen por lo tanto, oportunidades únicas para la disminución de la contaminación (Lens y Kuenen, 2001).

1.4 Microorganismos extremófilos

Los microorganismos extremos o extremófilos son aquellos que pueden sobrevivir y crecer en ambientes considerados como hostiles para la mayoría de los organismos vivos, siendo quizá una forma de vida de las más antiguas de la Tierra. Se cree que los extremófilos se adaptaron a los desafíos ambientales que las formas de vida más tempranas tuvieron que soportar. (Clive, 1990).

A partir de 1950, algunos investigadores descubrieron que las moléculas que provenían de organismos que viven en condiciones ambientales adversas (pH ácido o alcalino, elevada o baja temperatura, alta salinidad, presión elevada) podrían tener diversas aplicaciones.

La biotecnología y la industria petrolera son áreas donde el uso de microorganismos extremos puede ser potencialmente útil. Su aislamiento y cultivo ha sido lento y difícil. Sin embargo, los avances técnicos están contribuyendo a mejorar el proceso y a conocer su genética.

1.4.1 Clasificación de microorganismos extremos

Los microorganismos extremos se han clasificado en seis tipos diferentes con base en el factor ambiental que soportan (Madigan y col., 1999) termófilos, psicrófilos, barófilos, halófilos, acidófilos y alcalófilos (tabla 2).

1.4.2 Microorganismos alcalófilos

Las bacterias alcalófilas se han estudiado intensivamente en los últimos 20 años. El interés surgió por varios factores, incluyendo el posible uso industrial de enzimas extracelulares, la novedad de los sistemas bioenergéticos y la importancia filogenética de los organismos en ambientes alcalinos extremos. (Horikoshi, 1999; Marguesin y Schinner, 2001).

No existe una definición específica que caracterice a un organismo alcalófilo o alcalinotolerante (Horikoshi, 1999). Varios microorganismos presentan más de un valor de pH óptimo de crecimiento en función de las condiciones de cultivo, particularmente nutrientes, iones metálicos y temperatura. Sin embargo, se puede plantear que el término alcalófilo se refiere a microorganismos que crecen adecuadamente o bien de manera óptima a valores de pH mayores a 9, frecuentemente entre 10 y 12, pero no pueden crecer o crecen muy lentamente a valores de pH cercanos al neutro.

Además de la condición alcalófila se han encontrado microorganismos con actividad sulfoxidante en condiciones óxicas o anóxicas (Sorokin y col., 2000) los cuales son particularmente importantes en la industria petrolera. A continuación se describe brevemente los diferentes microorganismos alcalófilos reportados en la literatura.

1.4.2.1 Alcalófilos aerobios

Es el grupo de microorganismos alcalino-tolerantes más estudiado. Para su aislamiento se utilizan medios alcalinos con carbonato de sodio que permite alcanzar valores de pH de alrededor de 10. Muchas clases de microorganismos alcalófilos aerobios incluyendo bacterias pertenecientes al género *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas* y *Streptomyces*, también eucariotas como levaduras y hongos filamentosos se han aislado de estos ambientes extremos.

1.4.2.2 Alcalófilos anaerobios

El primer reporte de un alcalófilo anaerobio fue hecho por Nimura y col., (1987). Después de este trabajo se han aislado una gran variedad de microorganismos por procedimientos convencionales y sus aplicaciones han sido poco exploradas. Destacan el aislamiento de especies hipertermofilas alcalinófilas del género *Thermococcus* que tiene la capacidad de crecer en polisulfuros a pH alcalino y a temperaturas entre 56 y 90°C.

Tabla 2. Clasificación de microorganismos extremófilos con base en el factor ambiental que soportan (Madigan y col. 1999)

	Factor ambiental	Grupo microbiano		
M I C R O O R G A N I S M O S	Temperatura	Psicrófilo	Temperatura de crecimiento entre 15 °C y 19.9°C	
		Termófilo e Hipertermófilo	Temperatura de crecimiento entre 45 y 80°C	
	pH	Alcalófilo	pH de crecimiento mayor que 9,	
		Acidófilo	pH de crecimiento menor que 5	
	E X T R E M O S	Salinidad	Halófilo	Microorganismos que requieren de la presencia de cloruro sódico, habitan en ambientes muy salinos
		Presión	Barófilo	Crecimiento a presión mayor que 1 atm , incluso a 400 atm , habitan en fuentes hidrotermales o pozos petroleros

1.4.2.3 Haloalcalinófilos

Los alcalófilos consisten de dos grupos principales de microorganismos: alcalófilos y haloalcalófilos. Los alcalófilos requieren de un pH alcalino de 9 o mayor para crecer y tienen un pH óptimo de crecimiento alrededor de 10, mientras que los haloalcalófilos requieren un pH alcalino mayor a 9 y alta salinidad (hasta 33%, P/V, de NaCl). Haloalcalófilos se han aislado de ambientes salinos extremos, como lagos y desiertos salinos. Lagos alcalinos extremos por ejemplo, lago Magadi en Kenia y el Wadi Natrum en Egipto, son probablemente los ambientes alcalinos más estables sobre la tierra, con valores de pH de 10.5 a 12.5 dependiendo del sitio.

1.4.2.4 Cyanobacterias

Gerasimenko y col. (1996) reportaron el aislamiento de una amplia diversidad de cianobacterias alcalofílicas (16 géneros y 34 especies). No se han reportado aplicaciones industriales aunque señalan su potencialidad para la producción de hidrógeno.

1.5 Bacterias sulfoxidantes

La oxidación biológica de HS^- a SO_4^{2-} es una de las principales reacciones del ciclo biogeoquímico del azufre. Los compuestos inorgánicos reducidos de azufre son oxidados exclusivamente por procariotes, y el SO_4^{2-} es el principal producto de oxidación. En el pasado el término “bacteria sulfoxidante” fue usado para clasificar taxonómicamente a las bacterias litotróficas capaces de oxidar compuestos azufrados. Tradicionalmente las bacterias sulfoxidantes incluyen las bacterias verdes, púrpuras e incoloras del azufre que pertenecen tanto a las proteobacterias como a las arqueobacterias (Brüser y col., 2000).

Existe una gran variedad de bacterias sulfoxidantes que tienen diversas propiedades morfológicas, fisiológicas y ecológicas. En la tabla 3 se presentan algunas bacterias sulfoxidantes y el pH al cual se desarrollan.

Dentro de las bacterias sulfoxidantes, el género *thiobacilli* ha sido el más estudiado, porque puede cultivarse fácilmente en el laboratorio. 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 flagelos polares sencillos, no son formadores de esporas y crecen entre 25-35 °C. La energía necesaria para realizar sus funciones, deriva de la oxidación de uno o más componentes reducidos de azufre incluyendo sulfuro, tiosulfato, azufre elemental, sulfito, tiocianato y politionatos.

Las fuentes de carbono utilizadas por estos microorganismos han sido estudiadas mediante su crecimiento en medios sintéticos. Así, se ha establecido dos clases de microorganismos de acuerdo con su capacidad de crecimiento en fuentes orgánicas de carbono.

1.5.1 Quimiolitótrofos obligados

Son bacterias altamente especializadas, requieren una fuente inorgánica como fuente de energía y obtienen el carbono a partir de fijar CO_2 por el ciclo de Calvin.

1.5.2 Quimiolitótrofos facultativos

Crece adecuadamente con una fuente inorgánica de energía y, o bien, heterotróficamente con compuestos orgánicos que proveen de carbono mientras los compuestos inorgánicos proveen de electrones para la generación de energía. Aunque también se ha observado que pueden ocupar simultáneamente dos o más rutas metabólicas, perdiendo en algunos casos capacidad quimiolitótrofa (Prosser, 1989).

Tabla 3. Bacterias sulfoxidantes (Madigan y col, 1999)

Género y Especie	pH para el crecimiento
<u>Crecimiento deficiente en medios orgánicos</u>	
<i>Thiobacillus thioparus</i>	6 a 8
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	6 a 8
<i>Thiobacillus neapolitanous</i>	6 a 8
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	2 a 5
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	1.5 a 4
<u>Crecimiento en medios orgánicos</u>	
<i>Thiobacillus novellas</i>	6 a 8
<i>Thiobacillus intermedius</i>	3 a 7
<u>Litótrofos filamentosos</u>	
<i>Beggiatoa</i>	6 a 8
<i>Thiothrix</i>	6 a 8
Otros géneros	
<i>Thiomicrospira</i>	
<i>Thiosphera</i>	
<i>Thermothix</i>	6.5 a 7.5
<i>Thiovolum</i>	6 a 8
<i>Acidianus</i>	1 a 5
<i>Sulfolobus</i>	1 a 4
<u>Bacterias Alcalófilas</u>	
<i>B. Alcalóphilus</i>	8 a 11
<i>B. Firmus</i>	7 a 11.4
<i>Bacillus strain YN-2000</i>	7.5 a 10.2
<i>B. Halodurans C-125 (celulas intactas)</i>	7 a 10.5
<i>Protoplastos</i>	7 a 9.3
<i>Thioalcalimicrobium aerophilum gen nov., sp</i>	7.5 a 10.6
<i>Thioalcalimicrobium sibericum sp, nov</i>	7.5 a 10.6
<i>Thioalcalovibrio nitratis sp, nov.</i>	9 a 11
<i>Thioalcalivibrio denitrificans sp. nov</i>	9 a 11

1.5.3 Alcalófilos sulfoxidantes

Los microorganismos sulfoxidantes se han aislado de lagos salados (pH alcalino y altas concentraciones de $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ de las estepas de Asia y África del este. Las diferentes especies se han clasificado como dos nuevos géneros *Thioalcalomicrobium* y *Thioalcalovibrio*. Estos organismos son quimiolitotóxicos debido a su capacidad para crecer a pH entre 9 y 11 y de oxidar compuestos reducidos de azufre (sulfuro, tiosulfato, tiocianato). Otra notable característica de estos organismos es su capacidad de crecer en ambientes salinos-altos 0.6 a 4 M de sodio total.

Sorokin y col. (1998, 1999, 2001a) han reportado diversos trabajos relacionados al estudio de los alcalófilos sulfoxidantes. Las cepas oxidan diferentes compuestos reducidos de azufre y han sido clasificadas utilizando herramientas moleculares. Así mismo han aislado y purificado enzimas involucradas en la oxidación de sulfuro.

Este grupo de trabajo reportó el aislamiento del organismo *Thioalcalovibrio denitrificans*, afirmando que es el primer ejemplo de una bacteria alcalófila, autotrofica obligada, azufre oxidante capaz de crecer anaeróbicamente en condiciones de desnitrificación. Se aisló de un lago de África con tiosulfato como donador de electrones y N_2O como aceptor de electrones a pH 10. La bacteria puede utilizar nitrito y N_2O , como aceptor de electrones durante el crecimiento anaerobio sobre compuestos reducidos de azufre. El nitrato sólo se utilizó como fuente de nitrógeno.

Otros géneros alcalino-tolerantes de interés fueron estudiados por su capacidad de utilizar tiocianato. Tres clases de bacterias alcalófilas capaces de utilizar tiocianato (CNS) a pH 10 se aislaron de sedimentos de lagos alcalinos y suelos salinos. El primer grupo incluyó heterótrofos obligados que utilizan tiocianato como fuente de hidrógeno mientras crecieron a pH 10 utilizando acetato como fuente de carbono y energía. La mayoría de las cepas heterotróficas fueron capaces de oxidar sulfuro y tiosulfato a tetratiónato.

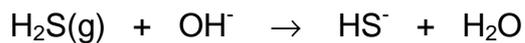
El segundo grupo, incluyó alcalófilas autotróficas obligadas azufre-oxidantes que utilizan tiocianato como fuente de nitrógeno durante el crecimiento con

tiosulfato como fuente de energía. El análisis genético demostró que ambos alcalófilos, autótrofos y heterótrofos, que utilizaron tiocianato como fuente de nitrógeno estuvieron relacionados con los alcalófilos previamente descritos.

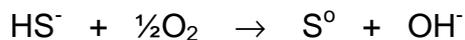
El tercer grupo incluyó organismos autótrofos obligados sulfoxidantes, bacterias alcalófilas capaces de utilizar tiocianato como única fuente de energía. Estas bacterias fueron enriquecidas en medio mineral con tiocianato a pH 10. El crecimiento con tiocianato fue generalmente mucho más lento que el crecimiento con tiosulfato, sin embargo el rendimiento de biomasa fue mayor con tiocianato (Sorokin y col. 2001).

Las reacciones que llevan a cabo los microorganismos sulfoxidantes son:

Absorción-hidrólisis de H₂S



Oxidación biológica de sulfuro en azufre elemental



En el caso de existir un exceso de oxígeno, el azufre elemental se oxida a sulfato



Para el control de las reacciones en trabajos previos (Alcántara y col., 2003) se han estudiado los parámetros de operación de reactores que permiten el control del nivel de oxidación del sulfuro. En la figura 2 se presentan las etapas de reacción en función del oxígeno disuelto medido como una relación O₂/S⁻². Como se observa, en relaciones O₂/S⁻² de 0.5 se obtiene un 80 % de azufre elemental a partir de la oxidación parcial de sulfuro, mientras que en relaciones O₂/S⁻² de 2, se obtiene una oxidación completa a sulfatos.

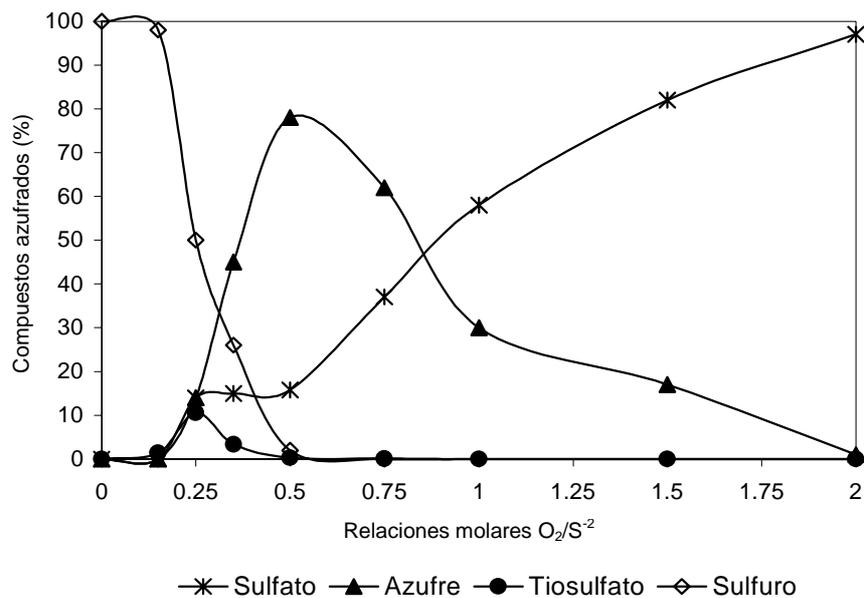


Figura 2. Oxidación biológica de sulfuro en función de la concentración de oxígeno disuelto y la concentración de sulfuro en el medio (O_2/S^{-2}) (Alcántara y col. 2004)

1.6 Procesos biológicos en la eliminación de compuestos de Azufre

Para el tratamiento de emisiones de compuestos de azufre al ambiente se utilizan diferentes procesos, tanto fisicoquímicos como biológicos. Como se explicó anteriormente, para la eliminación del H_2S del gas se utiliza el proceso con aminas (Jensen y Webb, 1995; Sublette, 1987).

En general, los procesos fisicoquímicos requieren altos flujos de energía. Sin embargo, no es el único factor que se considera para su aplicación o sustitución por un proceso biológico. Entre los factores que se pueden considerar están: 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 género *Thiobacillus* en el proceso. El “biotratamiento” presenta ventajas económicas hasta concentraciones de 3500 ppm sobre los tratamientos fisicoquímicos.

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

Por otro lado, en corrientes acuosas contaminadas con compuestos de azufre reducido se han implementado diversos tipos de reactores completamente agitados (Buisman, 1998, Janssen y Webb, 1995) y de lecho fluidizado (Gommers y col. 1988); así como otros diseños de reactor para optimizar la recuperación de azufre elemental (Janssen y col., 1997).

1.7 Biorreactor continuo de tanque agitado

Un biorreactor es un sistema en el cual se efectúa una conversión biológica a partir de enzimas, microorganismos y células de animales o plantas. Los biorreactores son recipientes mecánicos, en los cuales los microorganismos son cultivados de manera controlada y los materiales o sustratos se transforman a productos.

Los biorreactores son selectivos lo cual es de importancia primaria debido a la producción de ciertas moléculas complejas (antibióticos, vitaminas, ácidos de azúcares).

El tipo más frecuente de dispositivo para cultivo continuo es el llamado tanque agitado (figura 3), que permite el control tanto de la densidad de la población como de su velocidad de crecimiento. Este tipo de reactor está equipado con

un mecanismo de agitación, así como elementos de transferencia de calor (chaquetas de calentamiento, serpentín externo o interno). Además de operar en lote o continuo.

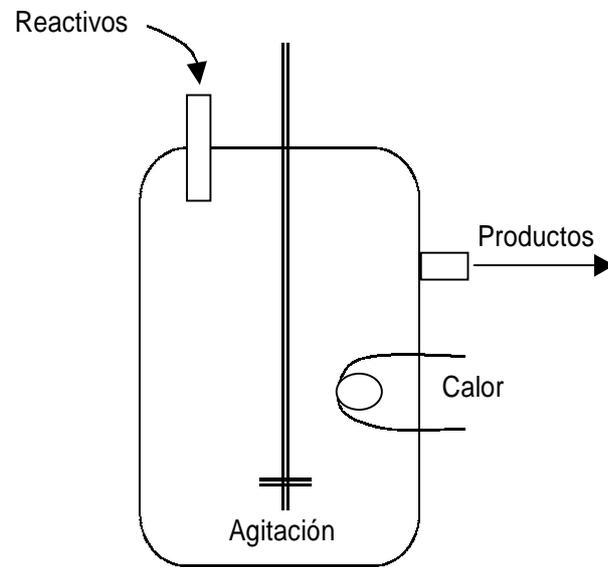


Figura 3. Reactor continuo de tanque agitado

2 JUSTIFICACIÓN

La industria del petróleo utiliza procesos fisicoquímicos para la obtención de gasolina, gas LP, entre otros. Existen otras alternativas de proceso, como son los procesos biotecnológicos; los cuales además de ser eficientes, son menos costosos y tienen un menor impacto en el medio ambiente.

Para poder ofrecer dichas alternativas, es necesario encontrar microorganismos que trabajen en las condiciones actuales de los procesos (extremas).

En este trabajo se pretende obtener microorganismos sulfoxidantes extremófilos ó termotolerantes, que puedan ser utilizados en procesos biotecnológicos, que traten las corrientes contaminadas con compuestos azufrados de la industria petrolera. Los posibles beneficios para esta industria, serían el utilizar tecnología de punta con bajo costo energético y sin producción de gases ricos en SO_2 . El posible ahorro energético por la disminución de las etapas del proceso. Por ejemplo por la sustitución del rehervidor para la regeneración de aminas (proceso de endulzamiento de gas) y las etapas Claus y SuperClaus (procesos posteriores al endulzamiento de gas natural).

3 HIPÓTESIS DE TRABAJO

Los consorcios microbianos aislados de los suelos seleccionados, tendrán la capacidad de oxidar compuestos azufrados tales como el tiosulfato y el sulfuro. Mantendrán su actividad sulfoxidante a temperaturas de 40 °C o más y pH 10, así como a concentraciones moderadas de cloruro de sodio (0.08 a 1 M). La actividad sulfoxidante de los microorganismos aislados se mantendrá en presencia de aminas terciarias como la metildietanolamina (MDEA).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Aislar y caracterizar microorganismos aerobios alcalófilos que utilicen como fuente de energía compuestos reducidos de azufre.

4.2 Objetivos específicos

1. Determinar los parámetros de operación de un reactor continuo agitado, inoculado con un consorcio alcalino sulfoxidante obtenido a partir de un suelo alcalino.
2. Describir las condiciones de pH, temperatura y salinidad, que favorecen el crecimiento y la actividad sulfoxidante de los microorganismos alcalófilos por medio de estudios de respirometría.
3. Aclimatar el consorcio alcalino sulfoxidante a temperatura de 40 °C.
4. Aislar y caracterizar macroscópica y microscópicamente bacterias alcalófilas sulfoxidantes a partir de los consorcios.
5. Medir la actividad sulfoxidante de las cepas aisladas en diferentes condiciones de pH, temperatura, salinidad y presencia de MDEA.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Adaptación de un consorcio microbiano sulfoxidante en un reactor agitado

Con el propósito de obtener un inóculo más importante de microorganismos sulfoxidantes alcalófilos, la biomasa obtenida en pruebas de enriquecimiento previas (Alcántara y col., 2005), se colocó en un reactor Applikon completamente agitado (figura 4).

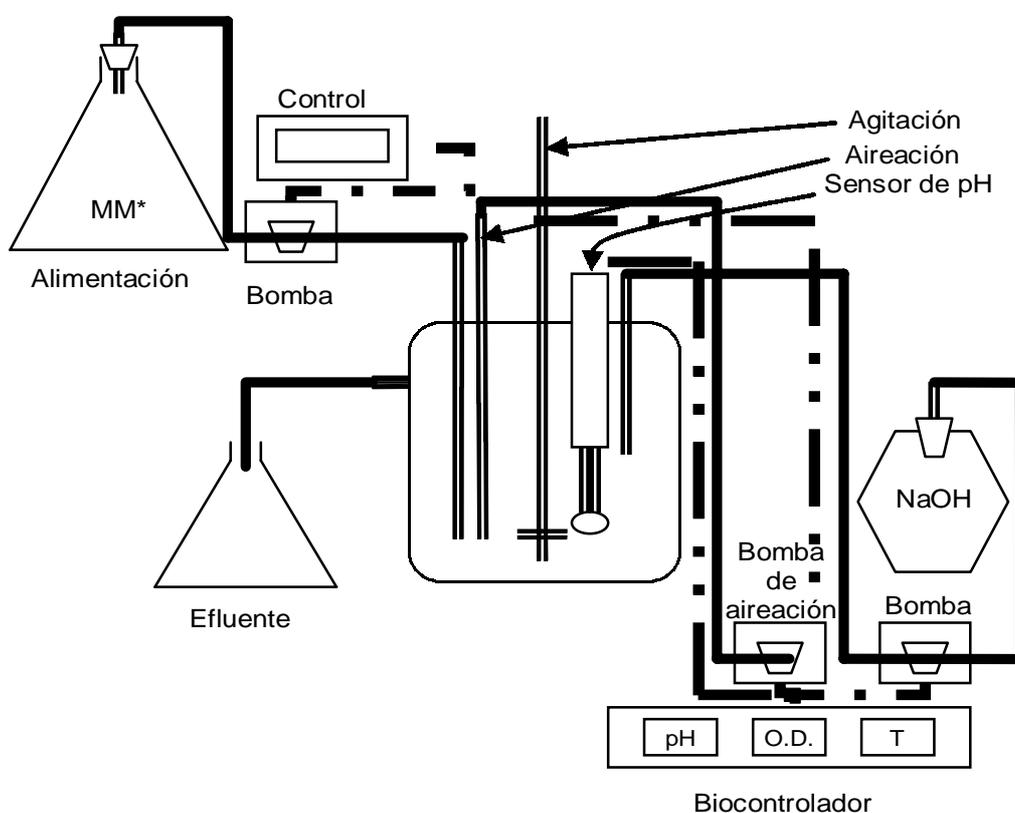


Figura 4. Sistema en continuo para la adaptación de la biomasa a la oxidación del tiosulfato

El reactor consta de una jarra de aireación de 1.5 L de volumen de operación, cerrada. Se adaptó a un mecanismo para controlar el pH, temperatura, la adición del medio fresco y la oxigenación, lo cual se logró mediante sensores de pH, temperatura y oxígeno, conectados a un biocontrolador marca B & C

modelo ADI 1030. Cuenta con agitación continua mediante el empleo de un agitador de doble propela que se controla automáticamente.

El reactor fue alimentado en continuo, con medio mineral adicionado de tiosulfato como fuente de energía. La composición del medio mineral se muestra en la tabla 4. El sistema se mantuvo a una temperatura de 30 °C, en un cuarto de temperatura controlada, el pH del medio de alimentación se ajustó a 10 (± 0.2). Inicialmente el reactor se mantendrá a una tasa de dilución de 0.5 días, para poder realizar las pruebas de respirometría. Posteriormente, se modificaron los parámetros de operación del sistema, para determinar la tasa de dilución crítica a la que opera el mismo.

Tabla 4. Composición del medio mineral para el crecimiento de microorganismos sulfoxidantes (Sorokin y col. 2001a)

Compuesto	g·L ⁻¹
Na ₂ CO ₃	14
NaHCO ₃	9
NaCl	5
K ₂ HPO ₄	0.5
KNO ₃	0.5055
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0.2481
Solución de elementos traza*	2 mL
Na ₂ S ₂ O ₃	10
PH	10 (± 0.2)

*Composición de la solución de elementos traza

Compuesto	mg·L ⁻¹
Fe III-Citrato	1000.00
MnCl ₂ ·4H ₂ O	10.00
ZnCl ₂	5.00
LiCl	5.00
KBr	2.50
KI	2.50
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005
CaCl ₂	1000.00
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	1.00
CoCl ₂ ·6H ₂ O	5.00
SnCl ₂ ·2H ₂ O	0.50
BaCl ₂ ·2H ₂ O	0.50
AlCl ₃ ·6H ₂ O	1.00
H ₃ BO ₃	10.00
EDTA	20.00

5.1.1 Parámetros de operación del reactor

- **Tasa de dilución.** El volumen del medio de alimentación adicionado al reactor se modificó durante el transcurso del experimento permitiendo el cambio continuo en cuanto al volumen en el recipiente, del efluente y, por lo tanto, del contenido celular en estos. Al inicio se logró mantener el desarrollo celular en etapa de crecimiento, permitiendo la toma de muestras para los ensayos de respirometría y para la preparación de un nuevo inoculo. Al comenzar, la tasa de dilución fue de 0.5 d^{-1} la cual permitió el enriquecimiento del consorcio. Posteriormente fue en aumento, hasta observar el “lavado” del reactor, es decir, la falta de capacidad del consorcio para igualar la velocidad de la dilución (ver resultados).
- **Temperatura.** La temperatura del reactor se controló mediante el acondicionamiento a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$, del cuarto donde este se colocó. Esta temperatura, permitió el crecimiento, la multiplicación y el desarrollo de la actividad metabólica en los microorganismos estudiados.
- **pH.** El ajuste a pH 10 se logró adicionando al medio NaOH 1N, de forma automática por medio del control y registro del biocontrolador.
- **Oxígeno.** El suministro de oxígeno se logró mediante el empleo de una bomba de aireación, a través de un difusor con apertura hacia el fondo del reactor, donde las burbujas ascendentes de aire ayudaron a dispersar la mezcla y junto con la agitación a la rápida dilución del oxígeno. Debido a que el oxígeno es ligeramente soluble en el medio su suministro debe realizarse de manera continua.
- **Medio de alimentación.** La adición del medio de alimentación al reactor se logró mediante el empleo de una bomba peristáltica marca Masterflex. La composición del medio de alimentación fue la descrita en la tabla 4. El volumen de alimentación del reactor se preparó diariamente y se mantuvo a $8 \text{ }^{\circ}\text{C}$.
- **Fuente de energía.** Los microorganismos utilizados en los experimentos basan sus funciones metabólicas en el uso de tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$) una forma reducida de azufre que puede ser oxidada hasta sulfato. Por lo que el medio

contiene, además de la fuente de carbono (Na_2CO_3 y NaHCO_3), $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ de tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$).

En la figura 5 se muestra el reactor utilizado, donde se observa: 1) matraz con el medio de alimentación reacción, 2) recipiente de reacción, 3) recipiente con hidróxido de sodio, 4) bomba para el hidróxido de sodio, 5) bomba de aireación, 6) bomba de alimentación, 7) controlador de aireación y, 8) el sistema de control de pH y temperatura.

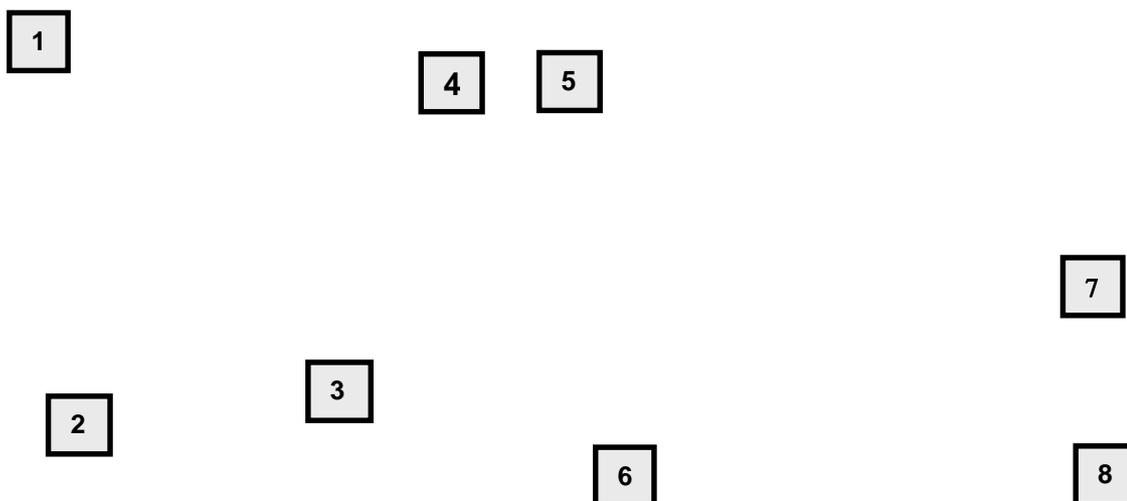


Figura 5. Biorreactor en continuo para la oxidación de tiosulfato

5.2 Ensayos de respirometría

Los ensayos de oxidación biológica y química del tiosulfato, se realizaron mediante el uso de un oxímetro YSI (5300 Biological Oxygen Monitor, YSI Co). La técnica propuesta por Buisman y col. (1991), se basa en la medición del

consumo de oxígeno, que es un parámetro indirecto del consumo u oxidación del tiosulfato. Este parámetro se corrige con las medidas de consumo de oxígeno de la oxidación química y biológica del tiosulfato.

Los ensayos de respirometría se llevaron a cabo en botellas serológicas de 60 mL en las cuales se adicionó medio mineral sin fuente de energía (previamente saturado de oxígeno por medio de una corriente de aire). Se adicionó un volumen de biomasa, de 0.5 a 1.0 mL, de tal forma que la concentración de esta fuese de $0.0100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$.

Se adicionó un volumen de 0.2 a 1.0 mL de soluciones concentradas de tiosulfato con el propósito de obtener concentraciones de 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 y 10.0 mM.

Los volúmenes de biomasa y tiosulfato adicionados, fueron los mismos que se retiraron de la solución de medio mineral sin tiosulfato para tener un volumen final de experimentación de 60 mL.

En la botella se introdujo el sensor de oxígeno disuelto y se enciende la agitación. La botella se colocó en un baño de agua a $30 \text{ }^{\circ}\text{C}$. A partir de este momento el oxígeno disuelto se midió cada 30 segundos durante un periodo de 12 minutos.

La biomasa utilizada para estos ensayos provino del reactor continuo, adaptado a la oxidación de tiosulfato a una tasa de dilución de 0.5 d^{-1} (figura 5). Un volumen de 500 mL de biomasa en suspensión, se centrifugó a 10,000 rpm durante 30 minutos desechándose el sobrenadante. El precipitado (biomasa) se recuperó en un volumen de 20 mL de medio mineral (tabla 4) sin fuente de energía. A esta suspensión de células se le determinó la concentración de proteína por el método Lowry (Lowry y col., 1951).

Cada experimento se realizó por triplicado.

La respiración endógena, se determinó midiendo el O_2 consumido de un volumen determinado de células en el mismo medio, solo que sin fuente de energía.

La respirometría química del tiosulfato se realizó en una solución del medio con fuente de energía sin células.

5.2.1 Efecto de la concentración de NaCl, pH, Metildietanolamina (MDEA) y Sulfuro sobre la actividad sulfoxidante

Con el propósito de caracterizar el crecimiento del consorcio utilizado, se midió la actividad sulfoxidante a diferentes condiciones como se muestra en la tabla 5.

La actividad sulfoxidante en función de los parámetros a variar, se evaluó siguiendo el mismo método de respirometría.

Para los experimentos de influencia de la concentración de NaCl, se prepararon 200 mL del medio de alimentación con las siguientes concentraciones de NaCl: 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.7 y 1.0 M.

Las soluciones se burbujearon con aire, se adicionó el volumen de inóculo necesario y se procedió a la lectura de consumo de oxígeno.

Para los experimentos de efecto del pH, el medio mineral utilizado fue el descrito en la tabla 4, sin Na_2CO_3 y NaHCO_3 . Los valores de pH utilizados fueron: 6.78, 8.13, 9.14, 9.8, 10.5 y 11.0. Para obtener estos valores se varió la concentración de Na_2CO_3 y NaHCO_3 . El pH de 6.78, se obtuvo adicionando un buffer de fosfatos.

Para evaluar el efecto de la amina (MDEA), se preparó una solución del reactivo comercial 2-metil-amino-etanol a una concentración de 600 mM, para lo cual se colocaron 23.98 mL de este reactivo en un matraz aforado de 50 mL y diluyendo con agua desionizada hasta la marca.

Se adicionó el volumen necesario de la solución de 600 mM para obtener concentraciones de 10, 20, 30, 50, 70 y 100 mM de MDEA.

Para evaluar el efecto del sulfuro sobre la actividad sulfoxidante, se utilizó una solución de $\text{Na}_2\text{S}\cdot 9\text{H}_2\text{O}$ a una concentración de 156 mM. Se pesaron 34 g de

Na₂S•9H₂O y se disolvieron con agua desionizada en un matraz aforado de 100 mL hasta la marca.

En este experimento la fuente de energía fue el sulfuro y se midió la actividad sobre este sustrato.

Cada experimento se realizó por triplicado.

Tabla 5. Experimentos correspondientes a los estudios de respirometría

No. de experimento	Variable de respuesta	Constantes	Variable
1	Actividad sulfo-oxidante $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$	T = 30 °C Tiosulfato = 1mM pH = 10 MM* (tabla 4)	NaCl 0 a 1.0 M
2	Actividad sulfo-oxidante $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$	T = 30 °C Tiosulfato = 1mM MM* (tabla 4)** T = 30 °C	pH 7.0 10.8
3	Actividad sulfo-oxidante $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$	Tiosulfato = 1mM pH = 10 MM* (tabla 4) T = 30 °C	MDEA 0 a 100 mM
4	Actividad sulfo-oxidante $\text{MgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$	Tiosulfato = 1mM pH = 10 MM* (tabla 4)	Sulfuro 0 a 1.0 mM

*MM = Medio mineral.

**En este caso, para ajustar los valores de pH, se utilizan soluciones de Na₂CO₃ y NaHCO₃ en diferentes concentraciones.

5.2.2 Tratamiento de resultados

En las pruebas de respirometría, la velocidad de oxidación del tiosulfato ($-q_{O_2}$) se midió indirectamente a partir del consumo de oxígeno. Para ello se grafica la concentración de O_2 vs. el tiempo, como se muestra en la figura 6. Del comportamiento de este experimento se obtiene la pendiente por regresión lineal.

Posteriormente la pendiente se divide entre la concentración de proteína inicial ($g \cdot L^{-1}$) obteniéndose la velocidad específica de oxidación del tiosulfato ($-q_{O_2} = mg_{O_2} \cdot g_{proteína}^{-1} \cdot min^{-1}$).

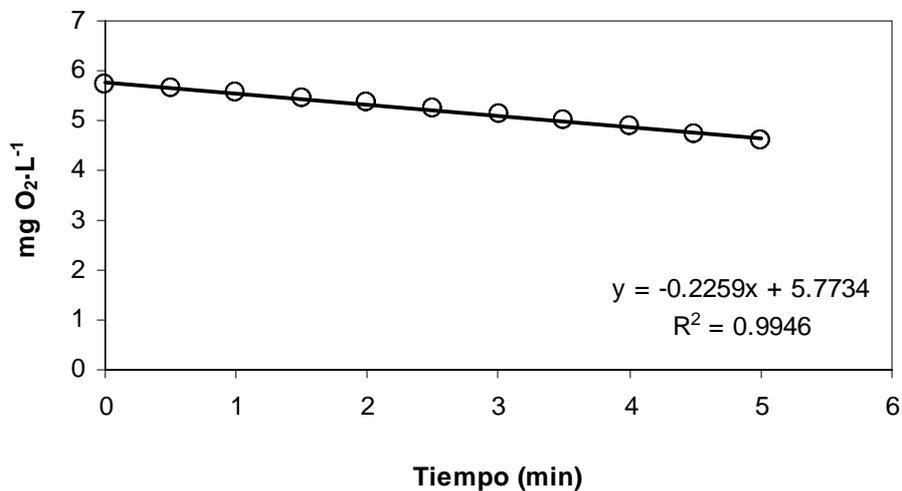


Figura 6. Consumo de oxígeno en función del tiempo en un estudio de respirometría

Para obtener la velocidad máxima de oxidación del tiosulfato se grafican todas las velocidades específicas de oxidación vs. concentración de tiosulfato.

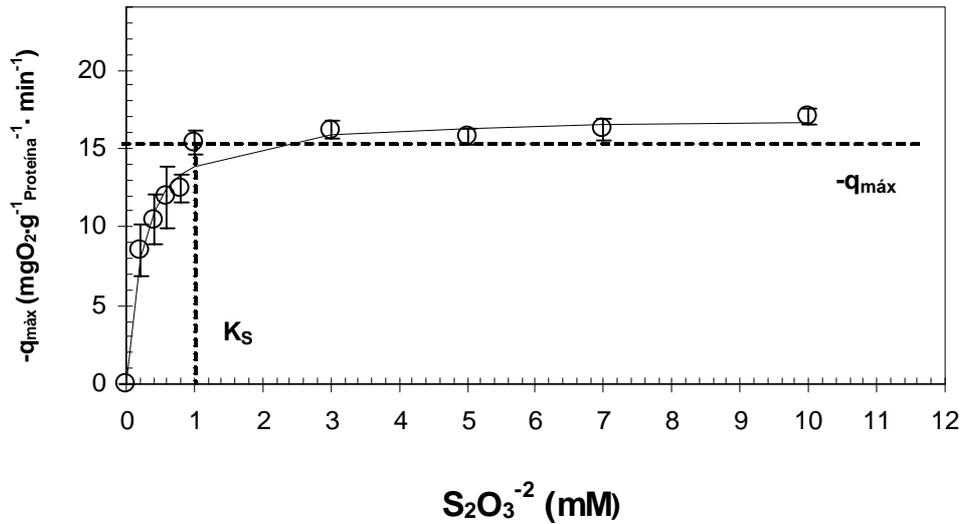


Figura 7. Velocidades específicas de consumo de tiosulfato en función de la concentración de tiosulfato

Modelo de Monod (Monod 1961)

Los parámetros cinéticos: velocidad máxima de oxidación de tiosulfato ($-q_{O_2} = mgO_2 \cdot g^{-1} \text{proteína} \cdot min^{-1}$) y la constante de afinidad del sustrato ($K_S = mM$) para el $S_2O_3^{-2}$, fueron estimadas por el modelo de Monod (ecuación 1):

$$-q_{máx} = \frac{-q \cdot S_{S_2O_3^{-2}}}{(K_S + S_{S_2O_3^{-2}})} \quad (\text{Ec. 1})$$

donde:

$-q_{máx}$ = Velocidad específica máxima de desaparición del sustrato como consumo de oxígeno ($mgO_2 \cdot g^{-1} \text{Proteína} \cdot min^{-1}$)

$-q$ = Velocidad específica de desaparición del sustrato como consumo de oxígeno ($mgO_2 \cdot g^{-1} \text{Proteína} \cdot min^{-1}$)

$S_{S_2O_3^{-2}}$ = Concentración de sustrato (tiosulfato $S_2O_3^{-2}$) (mM)

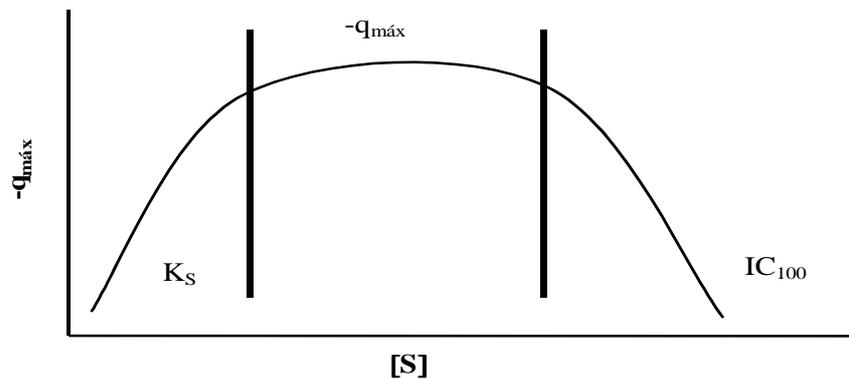
K_S = Constante de afinidad para el sustrato (tiosulfato $S_2O_3^{-2}$) (mM)

La cinética de Monod se divide en dos etapas:

- La primera de orden 1, donde la velocidad es proporcional a la concentración de sustrato. Esta etapa se obtiene cuando la concentración de sustrato se acerca a K_S .
- La segunda etapa de orden 2. Cuando la concentración de sustrato es superior al K_S , entonces la velocidad de consumo del sustrato es constante, dependiente de la concentración de sustrato y máxima, este nivel es el nivel buscado en los experimentos para eliminar la variación aportada por la variable: concentración de sustrato.

Modelo de Han y Levenspiel (Han y Levenspiel. 1988)

Cuando se obtienen cinéticas como la siguiente:



Donde la velocidad depende de la concentración de sustrato y hay una inhibición o decremento de esta por la concentración de sustrato, entonces la ecuación de Monod no puede describir la cinética, por lo cual se utiliza el modelo de Han y Levenspiel el cual describe la tercera etapa de la curva de inhibición.

5.3 Adaptación del consorcio sulfoxidante a temperatura de 40°C

Para evaluar la actividad sulfoxidante a temperatura de 40 °C, el consorcio obtenido y adaptado a temperatura de 30 °C, se colocó en un reactor como el descrito en la sección 5.1.1. Las condiciones de operación fueron las mismas,

excepto la temperatura que fue de 40 °C, la cual se controló con una chaqueta de calentamiento. La tasa de dilución del reactor fue de 5 d⁻¹.

5.4 Cinéticas de oxidación de tiosulfato

Se realizaron cinéticas de oxidación de tiosulfato, con el propósito de caracterizar fisicoquímicamente al inóculo adaptado a 40 °C.

En matraces erlenmeyer de 50 mL, se adicionaron 49 mL de medio mineral con la fuente de energía (tiosulfato) a concentraciones de 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0, 15.0 y 20.0 mM.

Se adicionó 1 mL del inóculo previamente obtenido (ver preparación de inóculo).

Los matraces se incubaron a 40 °C en una agitadora orbital marca Lab-line, manteniéndose con agitación continua a 150 rpm durante 72 horas.

Se tomaron muestras a diferentes intervalos de tiempo, para seguir la oxidación del tiosulfato, la aparición de sulfato y el crecimiento de la biomasa (proteína).

5.4.1 Preparación del inóculo para las cinéticas

Para obtener el inóculo necesario para la prueba de oxidación de tiosulfato, previamente se inocularon seis matraces Erlenmeyer de 150 mL, conteniendo 50 mL de medio mineral estéril más la fuente de energía y se adicionó 1 mL de inóculo. Los matraces se incubaron a 40 °C con agitación continua a 150 rpm, durante 44 horas.

Posteriormente el contenido de los matraces se colocó en tubos para centrifuga estériles y se centrifugaron a 10,000 rpm durante 10 minutos en una centrifuga marca Eppendorf 5810 R.

El sobrenadante fue desechado y el precipitado (biomasa) de todos los tubos se recuperó en medio mineral sin tiosulfato, en un volumen aproximado de 40 mL. Se ajustó el valor de la densidad óptica del inóculo a un valor de 1.0 de

absorbancia, utilizando una longitud de onda de 540 nm en un espectrofotómetro marca HACH modelo DR/2000. La dilución del inóculo para ajustar la densidad óptica se realizó con medio mineral sin tiosulfato esterilizado por filtración.

La filtración del medio mineral se realizó en una membrana estéril de 0.2 μm de tamaño de poro y con una jeringa estéril de 50 mL.

Todo el material utilizado para las cinéticas fue esterilizado en una autoclave marca Yamato a 120 °C y 15 libras de presión, durante 15 minutos.

5.4.1.1. Prueba de inóculo

Para llevar a cabo las cinéticas de oxidación de tiosulfato, inicialmente se realizó una prueba de inóculo, esto con el propósito de saber el volumen de inóculo a adicionar en los experimentos.

Esta prueba permitió homogeneizar los experimentos relacionados con la cinética de oxidación de tiosulfato y establecer el tiempo de muestreo de los mismos. Los resultados se muestran en la sección 6.3.1.1.

5.4.2. Efecto de la concentración de NaCl, pH, temperatura y concentración de MDEA sobre la oxidación de tiosulfato

Para caracterizar la actividad del consorcio adaptado a 40 °C, se realizaron cinéticas de oxidación de tiosulfato variando diferentes condiciones.

Los experimentos realizados se muestran en la tabla 6.

La actividad sulfoxidante en función de los parámetros a variar, se evaluó por medio de la velocidad de oxidación del tiosulfato y del crecimiento de la biomasa.

Para determinar la concentración de tiosulfato a utilizar, se preparó medio mineral sin tiosulfato. Las concentraciones utilizadas fueron 0.5, 1.0, 2.5, 5.0,

7.5, 10.0 y 15.0 g•L⁻¹, siendo el volumen necesario de 100 mL para cada concentración.

Tabla 6. Experimentos correspondientes a las cinéticas de oxidación del tiosulfato

No. de experimento	Variable de respuesta	Constantes	Variable
1	Actividad sulfo-oxidante $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$	T = 40 °C Tiosulfato = 1mM pH = 10 MM* (tabla 4)	NaCl 0 a 1.0 M
2	Actividad sulfo-oxidante $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$	T = 40 °C Tiosulfato = 1mM MM** (tabla 4)	pH 7.0 a 10.8
3	Actividad sulfo-oxidante $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$	Tiosulfato = 1mM pH = 10 MM* (tabla 4)	T 30 a 60 (°C)
4	Actividad sulfo-oxidante $\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$	T = 40 °C Tiosulfato = 1mM pH = 10 MM* (tabla 4)	MDEA 0 a 100 mM

*MM= Medio mineral

*El medio mineral (MM) se preparó sin Na₂CO₃ y NaHCO₃.

Para los experimentos de influencia de la concentración de NaCl, se preparó medio mineral sin NaCl, ajustándolo a las concentraciones requeridas de 0.085, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, y 1.0 mM.

Para los experimentos de efecto del pH, el medio mineral utilizado fue el descrito en la tabla 4, sin Na_2CO_3 y NaHCO_3 . Los valores de pH utilizados fueron: 8, 9, 10, 10.5 y 10.7. Para obtener estos valores se varió la concentración de Na_2CO_3 y NaHCO_3 en la preparación de cada solución.

Para evaluar el efecto de la temperatura, los matraces adicionados con medio mineral (tabla 4) y el inóculo fueron incubados a 30, 35, 40, 45, 50 y 60 °C, para lo cual fue necesario mantener estas temperaturas constantes mediante el uso de incubadoras con agitación.

Para evaluar el efecto de la amina metildietanolamina (MDEA), se preparó una solución del reactivo comercial 2-metil-amino-etanol a una concentración de 600 mM, para lo cual se colocaron 23.98 mL de MDEA reactivo en un matraz aforado de 50 mL y diluyendo con agua desionizada hasta la marca.

Se adicionó el volumen necesario de la solución de 600 mM para obtener concentraciones de 1, 3, 5, 10, 15, y 20 mM de MDEA.

Cada uno de los experimentos se realizó por duplicado.

5.5 Aislamiento de microorganismos

Del consorcio adaptado a 40 °C, se aislaron cepas puras, para lo cual se procedió del siguiente modo:

- **Esterilización del material**

El material utilizado se esterilizó a 120 °C y 15 libras de presión, durante 15 min. Se utilizó una autoclave marca Yamato, modelo SE 510.

Toda la cristalería utilizada se envolvió en papel de estraza, en el caso de matraces y probetas además se taparon con tapones de algodón y gasa ajustados. Las puntas para pipetas utilizadas fueron esterilizadas en sus contenedores.

La solución del medio mineral se esterilizó por filtración como se describió previamente.

El trabajo se realizó en campanas de flujo laminar para tener esterilidad.

- **Aislamiento**

El aislamiento de los microorganismos se realizó de la siguiente manera:

Del reactor adaptado a 40 °C se tomó una muestra de 50 mL y se colocó en un tubo falcon de 50 mL. Se concentró la biomasa por centrifugación a 10,000 rpm durante 10 minutos. Se eliminó el sobrenadante, se resuspendió la biomasa en 25 mL del medio mineral sin tiosulfato y nuevamente se concentró.

La biomasa obtenida se resuspendió en 25 mL de medio mineral sin fuente de energía, de la cual se inoculó 1 mL en matraces erlenmeyer de 125 mL que contenían medio mineral con la fuente de energía.

Los matraces se incubaron a 40 °C, a 150 rpm durante 48 horas. Después de este tiempo se recuperó la biomasa de los matraces como se indicó anteriormente y se procedió a realizar diluciones como a continuación se indica:

La biomasa obtenida se colocó en un tubo de vidrio con 9 mL del medio mineral sin tiosulfato, se mezcló en un vortex, se tomó 1 mL de esta solución y se pasó a otro tubo con 9 mL del medio, de esta forma hasta completar 10 diluciones (diluciones sucesivas) como se indica en la figura 8.

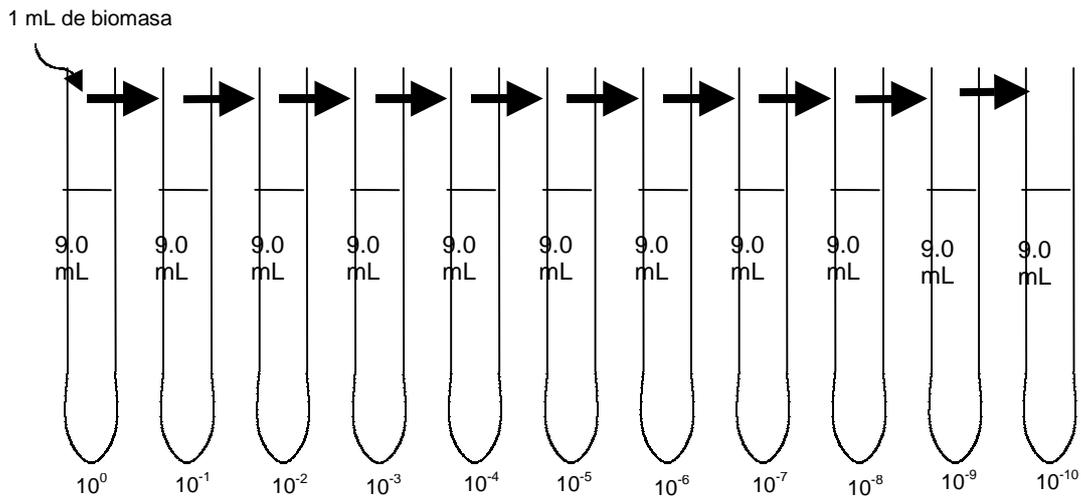


Figura 8. Método de diluciones sucesivas para la siembra en sólido

- **Siembra en placa**

La siembra en placa para el aislamiento de microorganismos, se realizó en cajas Petri con medio mineral adicionado con la fuente de energía (ver preparación de medios sólidos).

A partir de las diluciones 10^{-2} hasta 10^{-10} , se tomó 0.1 mL de cada tubo y se inoculó en las cajas petri. El volumen se dispersó en las cajas por medio de una espátula de vidrio (ver figura 9). Las cajas se incubaron a 40 °C hasta observar crecimiento. Se realizaron observaciones periódicas para registrar tiempo de crecimiento, características macro- y microscópicas de las colonias (Ramírez Gama, 1992).

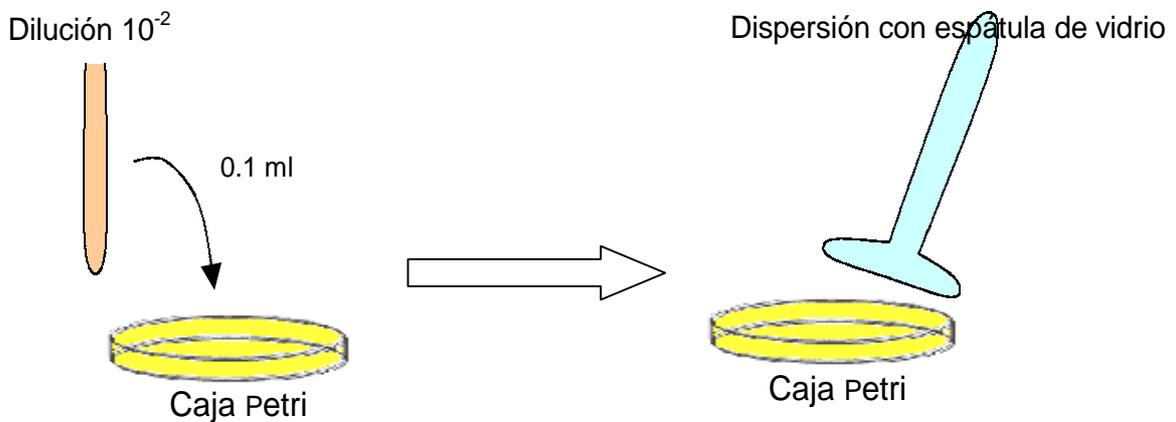


Figura 9. Diagrama para la siembra en placa

- **Preparación del medio sólido**

El medio sólido para las cajas Petri y aislamiento de las colonias fue preparado mezclando 4% (P/V) de agar y del medio mineral (tabla 4) dos veces concentrado.

Por un lado se disolvieron 20 g de agar en 500 mL de agua destilada. Por otro lado la solución de medio mineral en 500 mL de agua destilada de tal forma que la concentración fuera dos veces (tabla 4).

Ambas soluciones se esterilizaron por separado, dejándose enfriar a temperatura de 55-60 °C.

Se adicionó la fuente de energía en la solución mineral.

Se mezclaron las dos soluciones lentamente para prevenir la caramelización del agar debido al alto pH y la formación de burbujas. Se homogenizó la solución y se vació en las cajas Petri.

Las cajas se dejaron enfriar para solidificar, posteriormente se inoculó como se describió anteriormente.

- **Siembra por estría cruzada**

Las colonias obtenidas de la siembra en placa, se resembraron en placas, por medio de la técnica de estría simple o cruzada (Atlas y Bartha, 1996). Con el propósito de purificar las diferentes colonias observadas.

Las placas se incubaron a 40 °C hasta observar crecimiento.

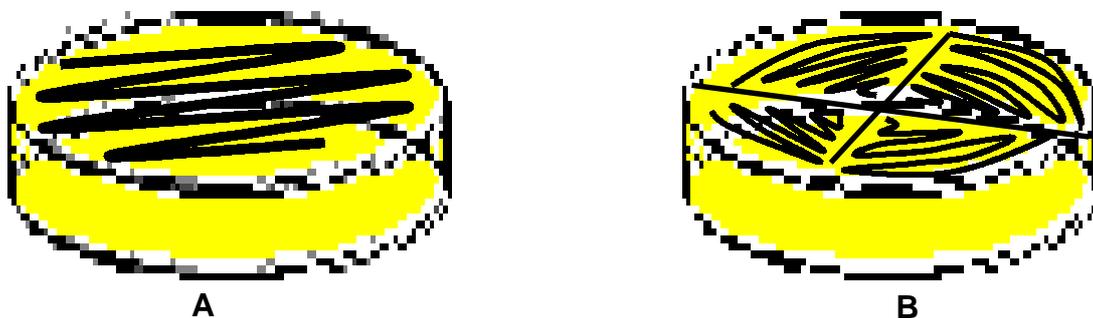


Figura 10. Siembra por estría simple (A) y estría cruzada (B)

5.5.1 Caracterización macroscópica

A las colonias crecidas en placa se les realizó una observación macroscópica y se describieron sus características morfológicas.

La descripción se realizó con base en lo propuesto por Ramírez Gama (1992).

Se anotaron las siguientes características:

- Forma de la colonia
- Borde
- Color
- Textura

5.5.2 Caracterización microscópica

A las colonias obtenidas se les realizó una caracterización microscópica, siguiendo la técnica de tinción de Gram (ver métodos microbiológicos).

Las muestras se observaron en microscopio marca Nikon modelo Eclipse E 800 y se observó si se trataban de cocos o bacilos Gram (\pm) y su agrupación

5.6 Métodos analíticos

5.6.1 Cuantificación de biomasa

La biomasa se estimó indirectamente por el contenido de proteína. Cuantificándose por el método colorimétrico propuesto por Lowry y col., (1951). El fundamento de la técnica se basa en la reacción de la proteína con el tartrato de cobre en medio alcalino y la subsecuente reducción del reactivo de Folin por el complejo tartrato-cobre-proteína, produciendo el característico color azul que posee un máximo de absorbancia a 590 nm.

Reactivos

- Solución estándar de albúmina a una concentración de $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$. Pesar 1 g de albúmina sérica bovina, disolver en agua desionizada y aforar a 100 mL.
- Reactivo A. Sulfato de cobre pentahidratado al 1%. Pesar 1.0 g de sulfato de cobre pentahidratado, disolver en agua desionizada y aforar a 100 mL.
- Reactivo B. Tartrato doble de sodio y potasio al 2%. Pesar 2.0 g de tartrato doble de sodio y potasio, disolver en agua desionizada y aforar a 100 mL.
- Reactivo C. Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 0.1 N. Pesar 20 g de carbonato de sodio, disolver en la solución de hidróxido de sodio (pesar 4 g de hidróxido de sodio), disolver en agua desionizada y aforar a 1 L.
- Reactivo D. Al momento de utilizarse se mezclan una parte de A y una de B (1A + 1B).
- Reactivo E. Al momento de utilizarse se mezclan una parte de D y 50 de C (1D + 50C).
- Reactivo de Folin Cicalteau. Al momento de utilizar, se mezclan una parte del reactivo de Folin y una de agua (1:1)
- Solución de hidróxido de sodio 1 N. Pesar 40 g de hidróxido de sodio, disolver en agua destilada y aforar a 1 L.

Procedimiento

Preparación de la curva patrón. De la solución estándar de albúmina sérica bovina, se realizaron diluciones, en matraces aforados de 10 mL, como se observa en la tabla 7.

Preparación de las muestras. Tomar 1 mL de la biomasa proveniente del reactor colocarlo en un vial eppendorf de 1.8 mL y centrifugar a 10000 rpm durante 10 minutos, en una centrifuga Beckman Microfuge 12. Retirar el sobrenadante y agregar al precipitado 1 mL de la solución de hidróxido de sodio 1N. Agitar enérgicamente en vortex hasta disolver completamente el precipitado. Tomar 1 mL de las muestras y de las diluciones patrón y colocarlos en un tubo de ensaye. Colocar solo las muestras en baño maría durante 10 minutos. Retirar y dejar enfriar los tubos en el refrigerador. Adicionar 5 mL de

reactivo E a todos los tubos (muestras y estándares) y agitar vigorosamente en vortex. Dejar reposar durante 10 minutos, agregar 0.5 mL de reactivo de Folin y agitar en vortex, reposar durante 30 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Al final de este tiempo leer en espectrofotómetro UV/VIS a 590 nm. Usar un blanco de agua tratado de la misma manera.

Construir la curva patrón de concentración de proteína vs absorbancia y calcular con la ecuación de la curva patrón la concentración de proteínas de las muestras.

Tabla 7. Preparación de las diluciones para la curva patrón de proteína

Concentración de proteínas (mg·L ⁻¹)	Solución estándar de proteínas (mL)	
10	0.1	Aforar a 10 mL
30	0.3	
50	0.5	
70	0.7	
100	1.0	
200	2.0	
300	3.0	

5.6.2 Cuantificación de sulfatos por el método turbidimétrico

Este método consiste en precipitar el ion sulfato con cloruro de bario en medio ácido. Se lee la absorbancia de la muestra tratada en espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm.

Reactivos

- Solución estándar de Sulfatos a concentración de 10 g·L⁻¹. Pesar 1.81 g de sulfato de potasio, disolver en agua destilada y aforar a 100 mL.

- Mezcla de reacción. Mezclar 30 mL de ácido clorhídrico concentrado, con 300 mL de agua destilada, adicionar 100 mL de alcohol isopropílico o etílico al 95% y 75 g de cloruro de sodio, agregar 50 mL de Glicerol.
- Cristales de Cloruro de Bario. Cristales de tamaño de malla de 20 o 30 μm .

Procedimiento

Preparación de la curva patrón. A partir de la solución estándar de sulfatos, se preparan diluciones como se muestra en la tabla 8. Se toman alícuotas de la solución estándar y son aforadas a 10 mL con agua destilada.

Tabla 8. Preparación de las diluciones para la curva patrón de sulfatos

Concentración de Sulfatos ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Solución estándar de Sulfatos (mL)	Agua (mL)	Tomar 1 mL y aforar a 100 mL
0	0.0	10.0	
5	0.5	9.5	
10	1.0	9.0	
20	2.0	8.0	
30	3.0	7.0	
40	4.0	6.0	
50	5.0	5.0	

Preparación de las muestras. Colocar 1 mL de la muestra diluida (1:100) en un matraz erlenmeyer de 250 mL. Agregar 5 mL de la mezcla de reacción e inmediatamente agitar durante 1 minuto. Mientras la solución se encuentra agitando, añadir una pizca de cloruro de bario. Al paso de 1 minuto leer la absorbancia a 420 nm.

Para los estándares se sigue el mismo procedimiento.

Se debe preparar un blanco con agua destilada al que se le aplica el mismo tratamiento.

Construir la curva patrón de concentración de sulfatos vs absorbancia. Calcular la concentración de la muestra con la ecuación obtenida y corregir con el factor de dilución.

5.6.3 Cuantificación de SO_4^{-2} y $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$

La concentración de estos iones se analiza por medio de electroforesis capilar (EC) siendo este un proceso de movimiento diferencial de las especies con carga: iónica, catiónica o neutra, provocado por la atracción o repulsión de un campo eléctrico.

Se utilizó un equipo EC marca Waters, el sistema consiste de: una fuente de alto voltaje, un capilar cuyos extremos se encuentran sumergidos junto con dos electrodos en viales que contienen un electrolito con capacidad amortiguadora, un detector y un sistema de recuperación de datos. El equipo cuenta con un carrusel automatizado, en el extremo opuesto se encuentra otro que contiene la solución tampón del electrolito. Ambos compartimentos están unidos por el capilar que a su vez está conectado a la fuente de alta tensión (20 a 30 kv) y que posteriormente es sometido a la luz UV/vis proveniente del detector.

El capilar se llena con el electrolito y posteriormente se hace pasar la muestra, este sistema se somete a la influencia de un campo eléctrico y como resultado las especies iónicas del electrolito o de las muestras migran hacia el electrodo correspondiente. La migración de cada uno de los componentes de la muestra ocurre a diferentes velocidades y se separan a zonas diferentes según la movilidad de cada analito (sulfato y tiosulfato eluyen a un tiempo de retención aproximado de 3.3 y 3.5 minutos, respectivamente). El electrolito debe tener mayor movilidad que la muestra y por lo tanto está ocupa únicamente una franja del capilar

Las condiciones para el análisis general de los iones se presentan a continuación:

Columna de sílice fundida de 60 cm de largo X 70 μm de diámetro interno.

Temperatura de columna: 25 °C.

Suministro de energía: negativa, con voltaje de 15 KV.

Con corriente de 18 a 20 μ A.

Lámpara de Mercurio, UV a 254 nm.

Modo de inyección: hidrostática.

- **Reactivos**

Solución estándar de sulfato y tiosulfato. Preparación de soluciones de 1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ de cada uno de los iones. Pesar 0.1478 g y 0.1696 de sulfato de sodio y tiosulfato de potasio, respectivamente, disolverlos y aforar a 100 mL.

Electrolito comercial: Higt mobility electrolite.

- **Procedimiento**

Preparación de la curva patrón. Se utilizó una solución estándar preparada con reactivos de alta pureza y agua desionizada, efectuándose alícuotas progresivamente más concentradas (10, 30, 60, 80 y 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Esta solución se transfiere a viales eppendorf de 0.5 mL con una jeringa en cuyo extremo se coloca un filtro de 0.45 μm (tabla 9).

Tabla 9. Preparación de las diluciones para la curva patrón de electrolitos

Concentración de $\text{S}_2\text{O}_4^{-2}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Solución de $\text{S}_2\text{O}_4^{-2}$ (mL)	Concentración de $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Solución de $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ (mL)	Agua (mL)	Filtrar y colocar en viales eppendorf de 0.5 mL
10	.050	100	.500	4.45	
30	.150	80	.400	4.45	
60	.300	60	.300	4.40	
80	.400	30	.150	4.45	
100	.500	10	.050	4.45	

Preparación de las muestras. Las muestras se centrifugan a 10,000 rpm durante 10 minutos, se toma una alícuota sobrenadante y se preparan diluciones 1:50. Se toman 100 μL del sobrenadante y se completa el volumen a

5 mL. Se homogeneizan por medio de agitación en vortex y se toman 500 μL y se filtra a través de membranas de acetato de celulosa de 12 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro. Las muestras se colocan en viales de 200 μl y son analizados automáticamente en el equipo de EC.

Para los estándares se sigue el mismo procedimiento.

Con base a los resultados se construye la curva patrón concentración de sulfato y tiosulfato vs tamaño de pico (figura 11). Calcular la concentración de las muestras y corregir con el factor de dilución.

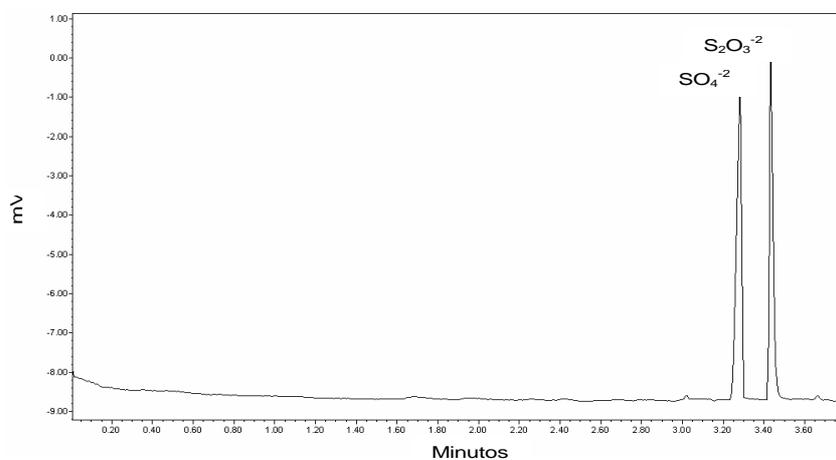


Figura 11. Cromatograma, picos y tiempos de retención característicos en la determinación de Sulfato (SO_4^{-2}) y tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$)

5.6.4 Tinción de Gram

La morfología microscópica de las bacterias se realizó aplicando la tinción de Gram para ello, la preparación se dividió en dos etapas: 1) fijación de la muestra y 2) tinción de Gram. Para fijar la muestra se suspendió una asada de células en una gota de agua. La suspensión se distribuyó sobre éste y se dejó secar al aire. Para fijar las células, el portaobjetos se pasó por la flama de un mechero (de forma rápida para evitar quemarlas por exposición prolongada). Una vez fija, se procedió a la tinción de Gram, cubriendo la muestra con solución de cristal violeta durante 2 minutos, se lavó con una suave corriente

de agua. Inmediatamente después, se cubrió con una solución de lugol durante 1 minuto, para después lavar con una solución de alcohol-acetona (70:30), hasta eliminar el color violeta. Se enjuagó, y finalmente se aplicó una solución de safranina por 30 segundos; se enjuago con agua y se dejó secar al aire. Las muestras se observaron al microscopio (NIKON, Eclipse E 800) con el objetivo de inmersión.

- **Reactivos**

Cristal violeta. Pesar 10 g de cristal violeta y 4 g de oxalato de sodio. Disolver en 100 mL de alcohol absoluto. En un matraz aforado de 500 mL disolver con agua destilada y aforar hasta la marca.

Lugol. Pesar 1 g de yodo y 2 g de yoduro de potasio. En un matraz aforado de 100 mL disolver con agua destilada y aforar hasta la marca.

Safranina. Pesar 2.6 g de safranina. Disolver con 10 mL de etano. En un matraz aforado de 100 mL disolver con agua destilada y aforar hasta la marca.

Alcohol acetona. En una probeta de 100 mL vaciar 70 mL de etanol y posteriormente vaciar 30 mL de acetona.

6 RESULTADOS Y DISCUSION

6.1 Cultivo continuo

6.1.1 Adaptación de un consorcio microbiano sulfoxidante en un reactor agitado

Con el propósito de obtener un inóculo más importante de microorganismos sulfoxidantes alcalófilos, la biomasa obtenida en pruebas de enriquecimiento previas (Alcántara y col. 2005), se colocó en un reactor agitado Applikon (figura 5),

El reactor tuvo un volumen de operación de 1.5 L, adaptado a un sistema para controlar pH, temperatura, adición del medio mineral y agitación. El reactor fue alimentado con medio mineral adicionado de tiosulfato como fuente de energía a una concentración de $10 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ($40 \text{ mM S}_2\text{O}_3^{2-}$). La composición del medio mineral fue la descrita en la tabla 6 de materiales y métodos. El sistema se mantuvo a una temperatura de $30 \text{ }^\circ\text{C}$, en un cuarto de temperatura controlada, el pH del medio de alimentación se ajustó a $10 (\pm 0.2)$.

El cultivo se inició en lote y al acercarse al máximo de SO_4^{2-} producible se cambió a cultivo continuo con una tasa de dilución de 0.5 días. En esta tasa se recolectó biomasa para poder realizar las pruebas de respirometría.

6.1.2 Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento microbiano y la oxidación de tiosulfato

Una vez que el sistema se estabilizó en la primera tasa de dilución (0.5 d^{-1}), se estudió el efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento microbiano y la

actividad sulfoxidante del consorcio. Los resultados se presentan en la tabla 10 y la figura 12.

Se observó que el consorcio oxida completamente al tiosulfato hasta una tasa de dilución de 2.51 d⁻¹, teniendo una carga de sulfato (Q_{SO₄⁻²}) de 16.97 g•L⁻¹•d⁻¹ y una eficiencia de oxidación del 98%.

Al incrementar la tasa de dilución de 2.51 a 3.32 d⁻¹ hubo disminución en la oxidación de tiosulfato y también en la concentración de proteína. El incremento de la tasa de dilución a valores de 5.34 d⁻¹, provocó el lavado del reactor.

La velocidad máxima de crecimiento del consorcio es de 6.0 d⁻¹ (0.25 h⁻¹).

El desarrollo del consorcio presentó una disminución de la proteína cuando se disminuyó la tasa de dilución de 1.62 a 5.34 d⁻¹ con valores de 44 hasta 3.81 mg/L de proteína, respectivamente. El comportamiento del consorcio estudiado, es similar al reportado por Alcántara y col, (2004), con un consorcio desarrollado a pH neutro. El rendimiento del consorcio sulfoxidante, fue de 1.33 mg•mmol⁻¹.

Tabla 10. Balance de azufre del consorcio microbiano sulfoxidante en un reactor agitado

D	QS ₂ O ₃ ⁻² (e)	QS (e)	SO ₄ ⁻² (s)	QSO ₄ ⁻² (s)	S ₂ O ₃ ⁻² (s)	QS ₂ O ₃ ⁻² (s)	S (s)	Proteína (s)
d ⁻¹	g•L ⁻¹ •d ⁻¹	g•L ⁻¹ •d ⁻¹	g•L ⁻¹	g•L ⁻¹ •d ⁻¹	g•L ⁻¹	g•L ⁻¹ •d ⁻¹	g•L ⁻¹ •d ⁻¹	mg•L ⁻¹
0.46	1.99	1.13	6.52	3.00	0	0	2.17	44.08
0.95	4.03	2.3	6.64	6.30	0	0	2.21	64.59
1.37	5.90	3.37	6.91	9.47	0	0	2.30	64.27
1.62	6.95	3.97	6.66	10.8	0	0	2.22	44.00
2.51	11.00	6.28	6.49	16.29	0	0	2.16	49.39
3.32	13.90	7.94	2.93	9.72	0.67	2.23	0.97	44.43
3.90	17.10	9.77	3.00	11.70	1.19	5.48	1.0	24.23
5.34	23.65	13.51	1.08	5.80	2.53	13.50	0.36	3.81

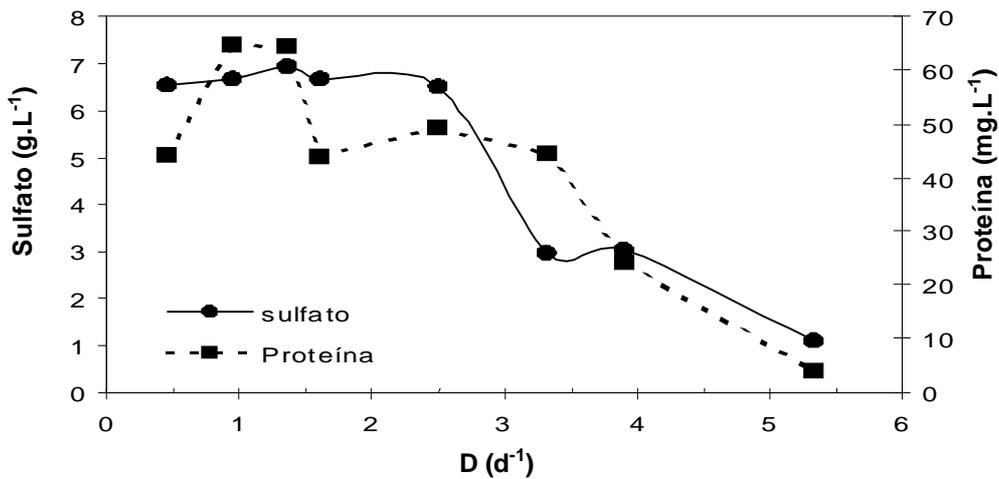


Figura 12. Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento y producción de sulfato del consorcio sulfoxidante

6.2 Ensayos de respirometría

Con el objeto de caracterizar fisicoquímicamente al consorcio sulfoxidante, se realizaron estudios de respirometría. Se estudio el efecto de la concentración de tiosulfato sobre la actividad sulfoxidante, el efecto de la concentración de NaCl, del pH, de la concentración de metildietanolamina y del sulfuro, sobre esta actividad.

6.2.1 Efecto de la concentración de tiosulfato ($S_2O_3^{-2}$) sobre la actividad sulfoxidante del consorcio

Con el fin de determinar los parámetros cinéticos de oxidación del tiosulfato para el consorcio se determinó la velocidad de oxidación del sustrato (tiosulfato) con base en el consumo de oxígeno (respirometría). El efecto de la concentración de sustrato fue medida de acuerdo al modelo de Monod (ecuación 1 de materiales y métodos), para calcular los parámetros cinéticos de desaparición de sustrato $-q_{m\acute{a}x}$ y la constante de afinidad K_S .

La figura 13 muestra el comportamiento de la oxidación de tiosulfato por el consorcio, se obtuvo una $-q_{\text{máx}}$ de $17.0 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$, la K_s fue de 0.22 mM. La concentración de tiosulfato que permite una actividad máxima es de 1 mM ($5 \times K_s$ aproximadamente.). No se observaron efectos tóxicos del tiosulfato en el rango de concentraciones estudiadas, por lo tanto se puede planear la utilización de una concentración de 1 a 5 mM de tiosulfato para evitar todo tipo de limitaciones.

La $-q_{\text{máx}}$ obtenida se acerca particularmente a los valores obtenidos por Sorokin y col. (2003) con el género *Thioalkalividrio* ($17.6 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$). Sin embargo se alejan del género *Thioalkalimicrobium* ($120 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$).

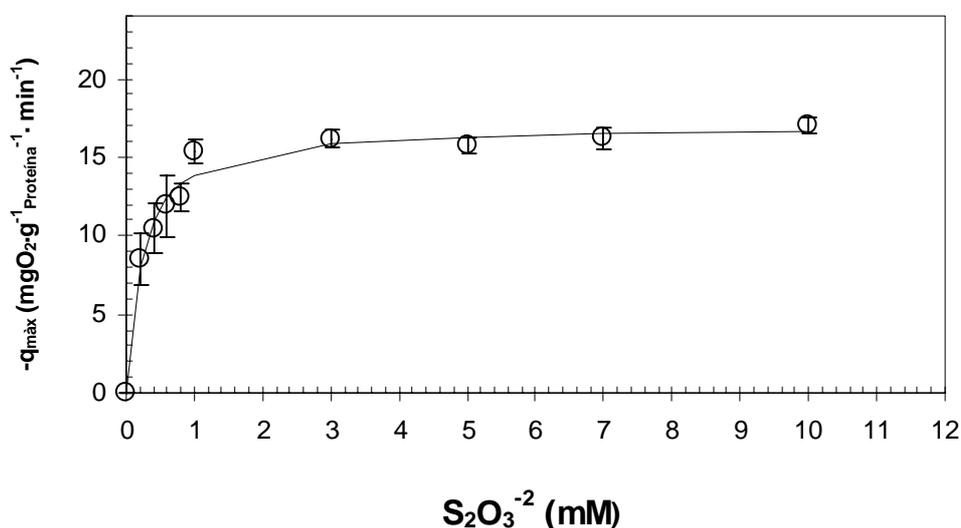


Figura 13. Oxidación biológica de tiosulfato ($\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$) por el consorcio

6.2.2 Influencia de la concentración de NaCl sobre la actividad sulfoxidante del consorcio

La capacidad de los microorganismos alcalófilos de oxidar a los compuestos reducidos de azufre en alta presión osmótica es una característica. Por ello se evaluó la oxidación de tiosulfato en concentraciones crecientes de la sal. Los resultados se presentan en la figura 14. Se observa que la velocidad de oxidación del tiosulfato disminuye progresivamente conforme aumenta la

concentración de NaCl, estos resultados demuestran que el consorcio aislado es dominado por bacterias moderadamente tolerante al cloruro de sodio (Sorokin y col., 2001). Particularmente, esta resistencia se da en bacterias del género *Thioalkalivdrio*, el cual agrupa ciertas especies como los halófilas y las sodio dependientes. De acuerdo a lo reportado por Sorokin y col., (2003), la concentración óptima de NaCl para organismos alcalófilos sulfoxidantes aislados de lagos salinos fue de 0.1 M ($5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$).

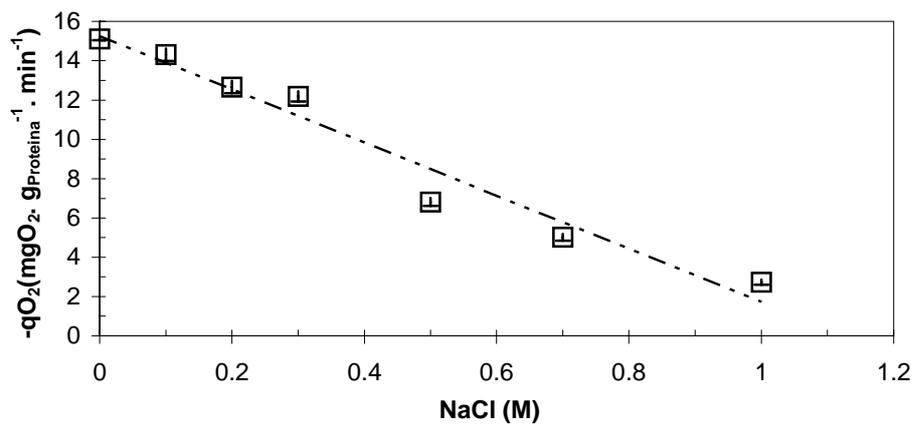


Figura 14. Velocidad de oxidación del tiosulfato en presencia de NaCl por el consorcio

6.2.3 Efecto del pH sobre la actividad sulfoxidante del consorcio

El efecto del pH, se estudio determinando las velocidades específicas de consumo de O_2 a distintos valores de pH, a partir de estudios de respirometría. Se evaluaron valores crecientes de pH en un intervalo de 7 a 11.

La figura 15 representa el comportamiento del consorcio a diferentes pH, se observó que la zona de pH óptima se centra en valores cercanos a 9.8, pH al cual fue adaptado el consorcio, por arriba de este valor de pH, la actividad sulfoxidante disminuye, llegando a ser nula a valores de pH igual a 11. En valores de pH menores de 9.8 la actividad se ve afectada en un 50%. Estos

resultados son cercanos a los resultados publicados para este tipo de consorcios (Sorokin y col., 2003).

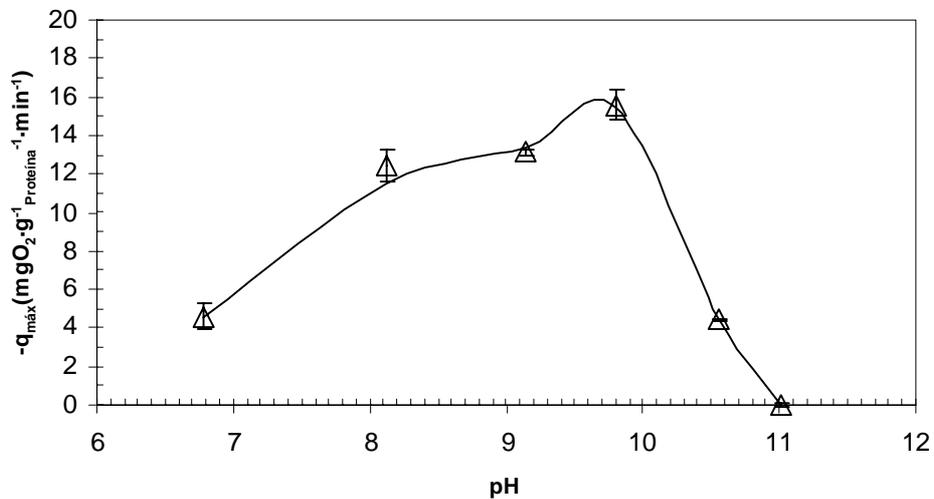


Figura 15. Velocidad de oxidación del tiosulfato a diferentes pH por el consorcio

6.2.4 Inhibición de la actividad sulfoxidante del consorcio por la metildietanolamina (MDEA)

Se evaluó la actividad sulfoxidante del consorcio en presencia de concentraciones crecientes MDEA. Los resultados se presentan en la figura 16. Se encontró que los microorganismos son capaces de llevar a cabo la oxidación del tiosulfato en presencia de esta solución aunque parte de su actividad se afecte negativamente. Se observó que la actividad sulfoxidante del consorcio disminuye conforme aumenta la concentración de MDEA, obteniéndose una disminución del 50% de la actividad a concentraciones de 20 mM de MDEA, y una actividad sulfoxidante nula, a concentraciones de 115 mM de MDEA. En la bibliografía no se han encontrado reportes de actividad sulfoxidante en presencia de este compuesto.

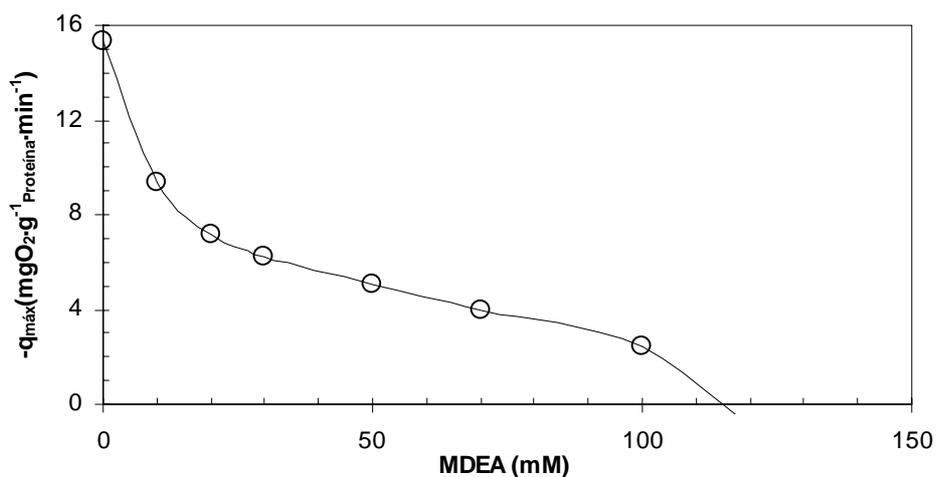


Figura 16. Velocidad de oxidación del tiosulfato a diferentes concentraciones de MDEA por el consorcio

6.2.5 Actividad del consorcio usando como sustrato sulfuro (S⁻²)

En muchas corrientes industriales además del tiosulfato, existen otros compuestos azufrados tales como el sulfuro, es por esta razón que se estudió la actividad del consorcio, teniendo como sustrato dicho compuesto.

Los resultados obtenidos se muestran en la figura 17. Se observó que el sulfuro es un sustrato inhibidor. Con el modelo simple de Monod, utilizado para describir la cinética de tiosulfato, no es posible describir la cinética de sulfuro, por lo que se utilizó el modelo de Han y Levenspiel, 1988, que describe la fase inhibitoria del sustrato.

En la figura 17 se presentan las velocidades de oxidación, utilizando diferentes concentraciones de sulfuro, los resultados indican que al aumentar la concentración de 0 a 0.2 mM, la velocidad de oxidación del sulfuro aumenta, a partir de esta concentración y hasta una concentración de 0.9 mM la velocidad disminuye, debido al efecto inhibitorio del sustrato.

La velocidad máxima de oxidación $-q_{\max}$ obtenida, fue de 11.2 mgO₂·g⁻¹ Proteína·min⁻¹, la K_S fue de 0.06 mM. Resultados similares se han obtenido en

los trabajos reportados por Banciu y col. (2004), para el género *Thioalkalivibrio*, en presencia de $S_2O_3^{2-}$ y HS^- ($-q_{m\acute{a}x}$ de $9.6 \text{ mg O}_2 \cdot \text{g}^{-1} \text{ Proteína} \cdot \text{min}^{-1}$, y una K_S de 1 mM).

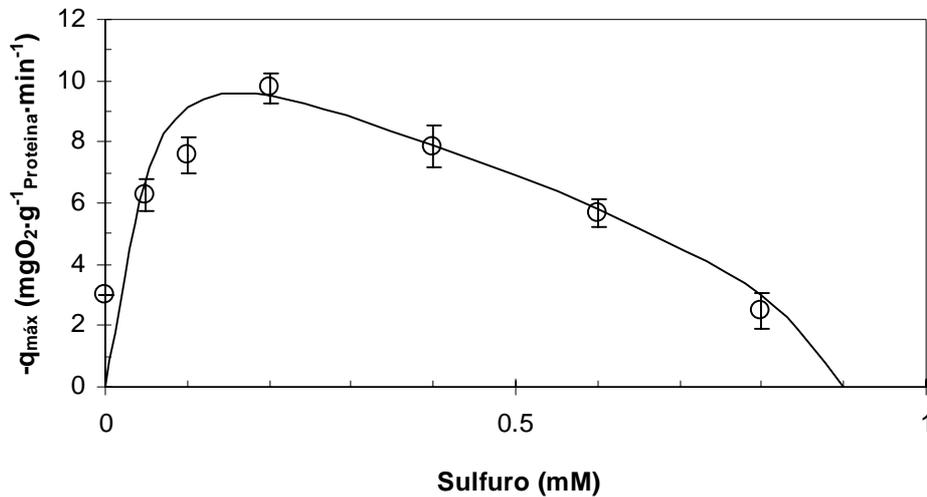


Figura 17. Oxidación biológica de sulfuro (S^{2-}) por el consorcio

6.3 Adaptación del consorcio sulfoxidante a temperatura de 40°C

Para evaluar la actividad sulfoxidante del consorcio, a la temperatura de 40 °C, el consorcio obtenido y adaptado a temperatura de 30 °C, se colocó en un reactor agitado como el descrito en la sección 5.1. Las condiciones de operación fueron las descritas en la sección 5.1.1, manteniendo la temperatura a 40 °C.

El reactor se alimentó en continuo con medio mineral adicionado de tiosulfato a una concentración de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (40 mM), se mantuvo a una tasa de dilución de 0.5 d^{-1} . Durante este periodo se obtuvo un inoculo más importante de los microorganismos y entonces se realizaron cinéticas de oxidación de tiosulfato.

6.3.1 Cinéticas de oxidación de tiosulfato

Para caracterizar la velocidad de oxidación de tiosulfato del consorcio adaptado a 40 °C, se realizarán cinéticas de oxidación, a diferentes concentraciones de tiosulfato, NaCl, valores de pH, concentraciones de MDEA y temperatura.

Para llevar a cabo estas cinéticas, primero se evaluó el volumen de inóculo a adicionar.

6.3.1.1 Selección del volumen de inóculo

Con el propósito de conocer el volumen de inóculo a adicionar en los estudios cinéticos, se realizó una prueba con 3 volúmenes de inóculo: 1, 3 y 5 mL. Este experimento nos permitió estandarizar las siguientes y establecer el tiempo de muestreo de cada experimento.

En la figura 18 se presentan los resultados obtenidos utilizando 1 mL de inóculo. Se observa la desaparición del sustrato (tiosulfato), la consecuente aparición de sulfato y el crecimiento de la biomasa (proteína). Con estos resultados, para los experimentos siguientes se tomaron muestra a intervalos de tiempo más corto, lo que permitió calcular las velocidades específicas con mayor precisión.

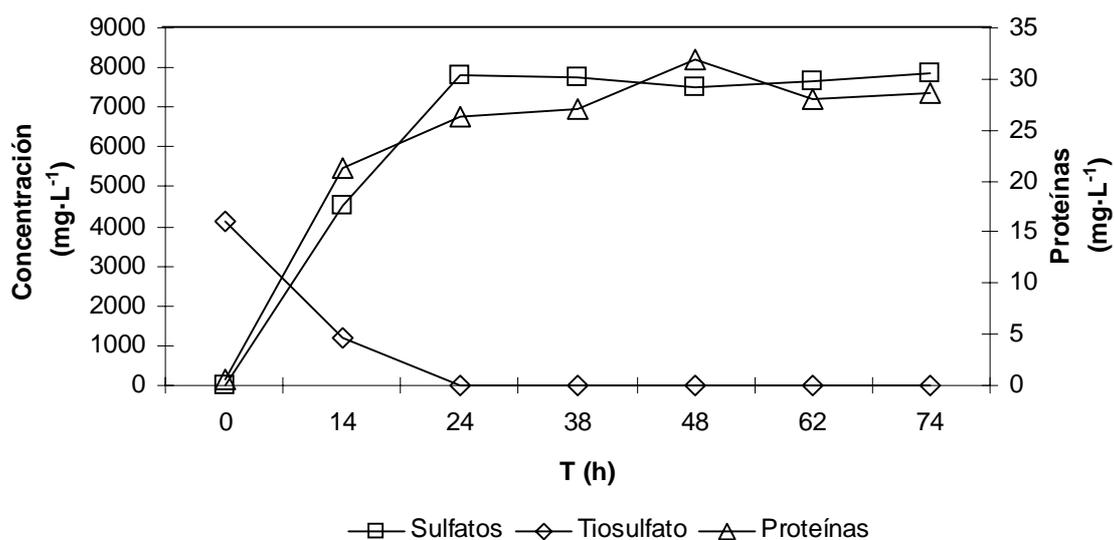


Figura 18. Cinética de desaparición de tiosulfato, aparición de sulfato y crecimiento de la biomasa (proteína)

6.3.2 Efecto de la concentración de tiosulfato ($S_2O_3^{2-}$) en el consorcio a 40 °C

Se determinaron los parámetros cinéticos de oxidación del tiosulfato para el consorcio adaptado a 40 °C. Se determinó la velocidad de oxidación del sustrato: tiosulfato ($-q_{m\acute{a}x}$) con base en el consumo de este a diferentes tiempos. Se determinó la velocidad máxima de crecimiento de la biomasa como proteína ($\mu_{m\acute{a}x}$) a lo largo del tiempo del experimento.

Al igual que en el experimento de respirometría, el efecto de la concentración de sustrato fue medida de acuerdo al modelo de Monod y se calcularon los parámetros cinéticos de desaparición de sustrato ($-q_{m\acute{a}x}$, K_s , $\mu_{m\acute{a}x}$).

En la figura 19A se observan las velocidades específicas en función de la concentración de tiosulfato y en la figura 19B se muestran los resultados correspondientes al crecimiento del consorcio ($\mu_{m\acute{a}x}$).

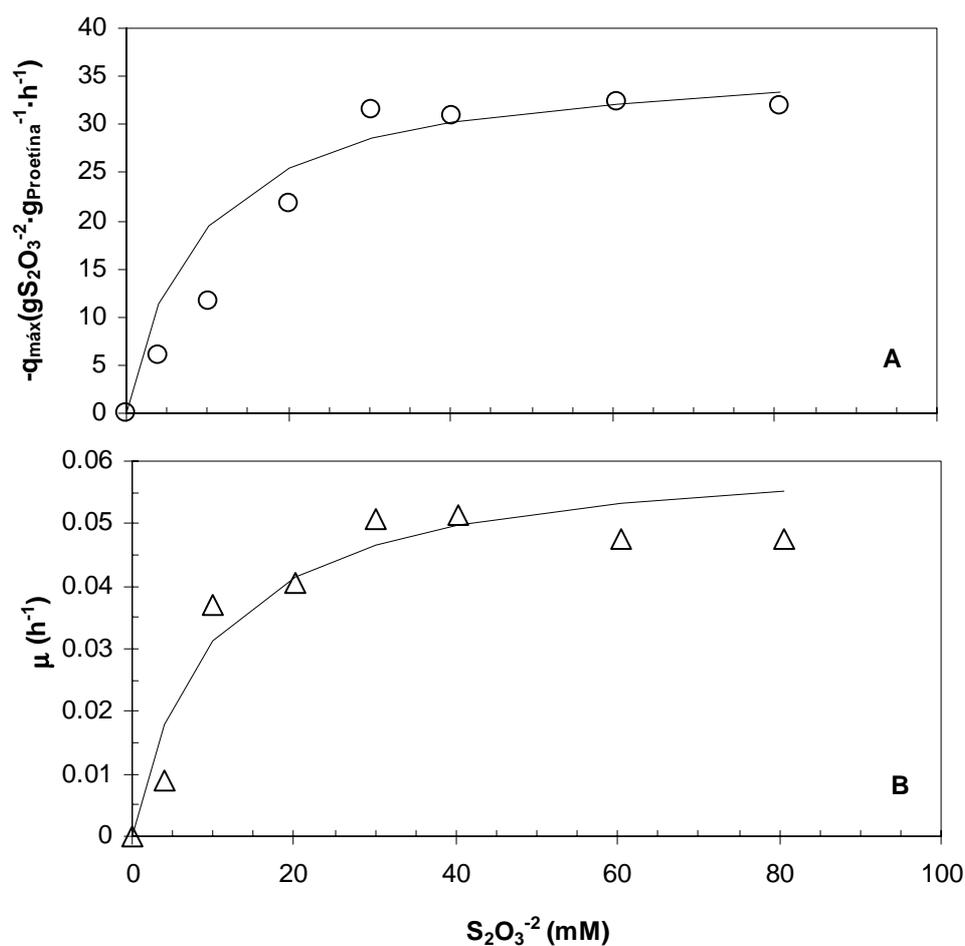


Figura 19. Capacidad de oxidación de tiosulfato (A) y crecimiento del consorcio (B) en función de la concentración de tiosulfato

Se observa en la figura 19A, que al incrementar la concentración de $S_2O_3^{2-}$ en el intervalo de 0 a 20 mM la velocidad de oxidación es de orden 1. Al incrementarla de 30 hasta 60 mM, la actividad sulfoxidante se mantiene constante (reacción de orden cero), debido a la saturación del sistema enzimático. La velocidad máxima de oxidación $-q_{\max}$ fue de $60 g S_2O_3^{2-} \cdot g_{Proteina}^{-1} \cdot h^{-1}$, la constante de saturación (K_s) fue de 11 mM. En lo que respecta al crecimiento microbiano (figura 19B), se obtuvo una velocidad de crecimiento (μ_{\max}) de $0.035 h^{-1}$.

6.3.3 Influencia de la concentración de NaCl sobre la actividad sulfoxidante en el consorcio a 40 °C

En la figura 20A se muestran los resultados obtenidos para la oxidación del tiosulfato en presencia de concentraciones crecientes de NaCl.

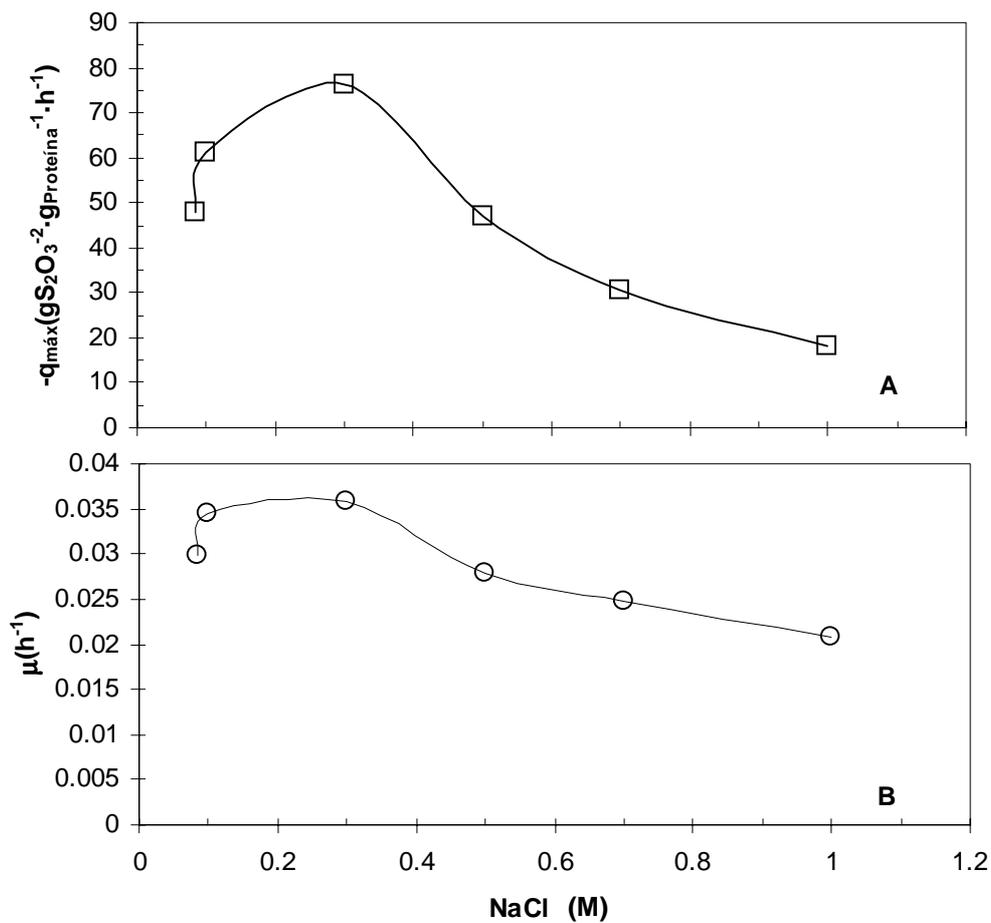


Figura 20. Influencia de la concentración de NaCl en la oxidación de tiosulfato (A) y en el crecimiento de la biomasa (B)

Se observa que la velocidad máxima de oxidación del tiosulfato ($79 \text{ gS}_2\text{O}_3^{2-} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Proteína} \cdot \text{h}^{-1}$) se obtiene a una concentración de 0.3 M de NaCl. Es un valor más alto que el obtenido con la oxidación de tiosulfato a diferentes concentraciones, manteniendo una concentración de NaCl de 0.1 M, lo que significa que esta concentración de cloruro de sodio, estimula el crecimiento del consorcio. A

medida que la concentración de sal se incrementa la actividad disminuye hasta valores de $20 \text{ gS}_2\text{O}_3^{-2} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{Proteína}} \cdot \text{h}^{-1}$ en una concentración de 1 M de NaCl.

El crecimiento de la biomasa (figura 20B) se mantiene constante en concentraciones de 0.1 a 0.3 M, teniendo un valor de 0.035 h^{-1} en este rango de concentraciones de NaCl. Conforme se incrementa la concentración de NaCl el crecimiento de la biomasa se ve disminuido hasta valores de 0.02 h^{-1} , en 1M de NaCl.

6.3.4 Efecto del pH sobre la actividad sulfoxidante en el consorcio a 40°C

La figura 21A muestra los resultados obtenidos para la actividad sulfoxidante del consorcio a diferentes valores de pH, se observa que la máxima actividad obtenida fue a un pH de 10, valor al cual se creció y se adaptó este consorcio. Por encima o debajo de este valor la actividad sulfoxidante disminuye hasta valores de 0 a pH de 7 y 11.

El crecimiento del consorcio (21B) tuvo su valor máximo (0.035 h^{-1}) a pH de 10. El crecimiento no es afectado considerablemente por el cambio de pH, ya que a valores de 8, 9, 10 y 11 se obtuvo crecimiento de 0.015, 0.02, 0.013 y 0.01 h^{-1} , respectivamente.

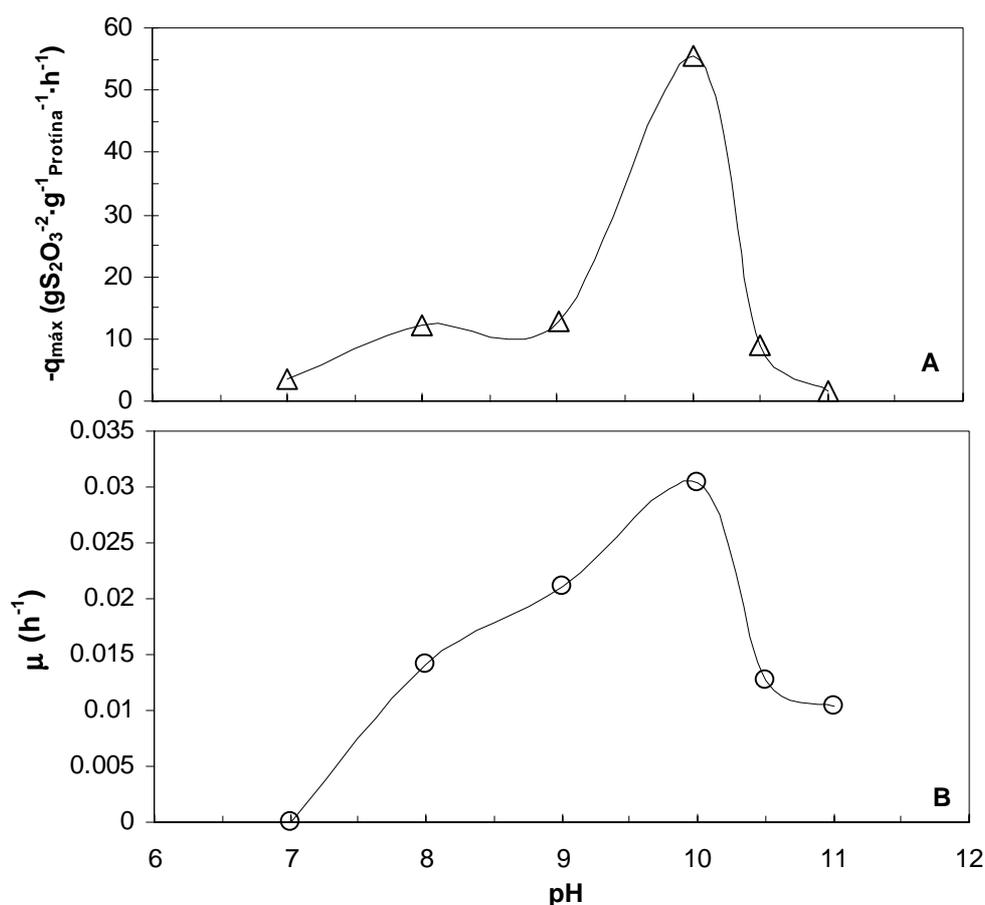


Figura 21. Efecto del pH en la oxidación de tiosulfato (A) y en el crecimiento de la biomasa (B)

6.3.5 Efecto de la temperatura sobre la actividad sulfoxidante del consorcio a 40 °C

En la figura 22A se muestran los resultados obtenidos para la actividad sulfoxidante a diferentes valores de temperatura, presentándose una máxima actividad a valores de temperatura de 40 °C, siendo esta a la cual se adaptó y creció el consorcio. Por debajo de 40 °C la actividad decae en un 50% aproximadamente ($30 \text{ mgO}_2 \cdot \text{g}_{\text{proteína}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$), a temperatura de 25 °C la actividad es casi nula. Por encima de los 40 °C la actividad decae bruscamente.

El crecimiento microbiano (22B) tiene un máximo a temperatura de 40 °C (0.030 h^{-1}), por debajo de este valor y hasta 30 °C el crecimiento no es afectado

considerablemente, obteniéndose valores de 0.027 y 0.028h^{-1} a 30 y 35 °C, respectivamente. Cuando la temperatura fue superior a los 40 °C el crecimiento microbiano se afectó negativamente, aproximándose a valores de cero cuando la temperatura aumentó hasta los 50 °C ($\mu = 0.001\text{h}^{-1}$).

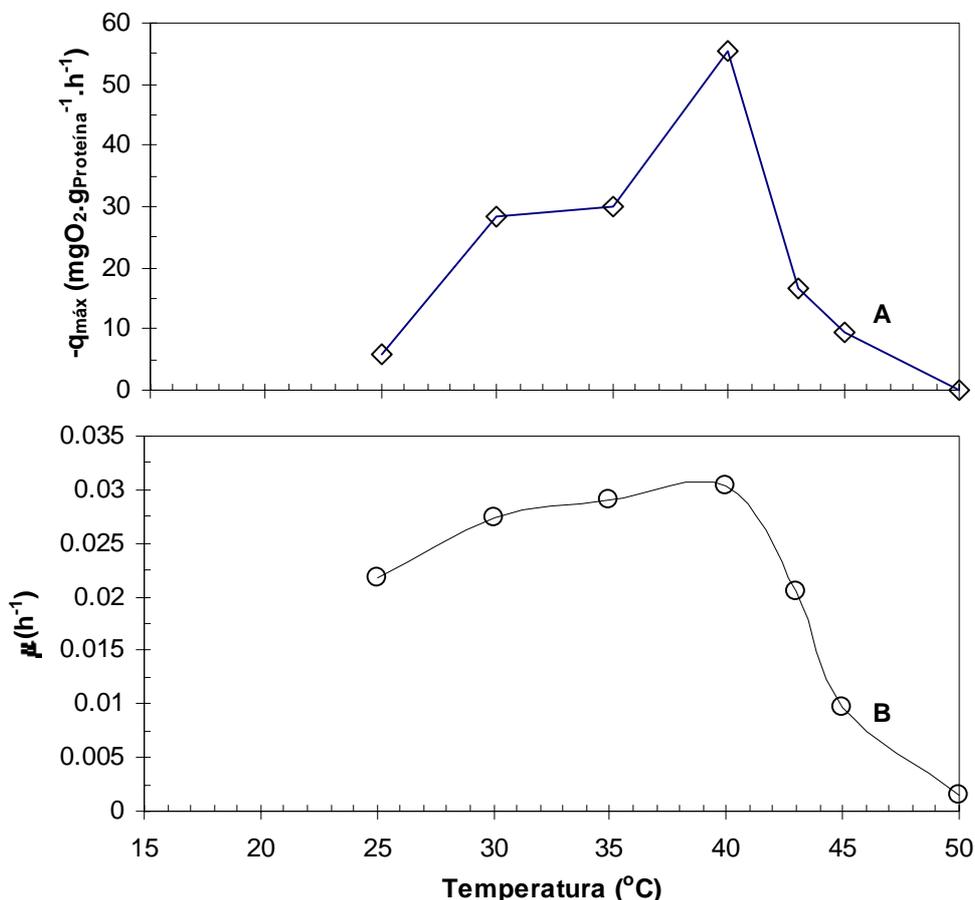


Figura 22. Efecto de la temperatura en la oxidación del tiosulfato (A) y sobre el crecimiento de la biomasa (B).

6.3.6 Inhibición de la actividad sulfoxidante del consorcio a 40 °C por la metildietanolamina (MDEA)

Se estudio el efecto de la concentración de la metildietanolamina en la oxidación del tiosulfato y el crecimiento microbiano. La figura 23A muestra los resultados obtenidos a diferentes concentraciones de MDEA. Se observa que al adicionar una concentración de 0.2 mM de amina, la actividad de oxidación

del tiosulfato disminuye en un 45%. A partir de esta concentración y hasta una concentración de 15 mM, la actividad se mantuvo en un valor de $37 \text{ gS}_2\text{O}_3^{-2} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Proteína} \cdot \text{h}^{-1}$, cuando la concentración de MDEA se incrementó a 20 mM la actividad disminuyó en un 93%, con un valor de $-q_{\text{máx}} = 5 \text{ gS}_2\text{O}_3^{-2} \cdot \text{g}^{-1} \text{ Proteína} \cdot \text{h}^{-1}$. La actividad microbiana presentó un comportamiento similar a la oxidación del sustrato, se obtuvo que el crecimiento (23B) se mantiene aproximadamente constante hasta una concentración de 15 mM de MDEA, por encima de esta concentración el crecimiento de la biomasa disminuye drásticamente, tendiendo a cero cuando la concentración de MDEA fue 30 mM.

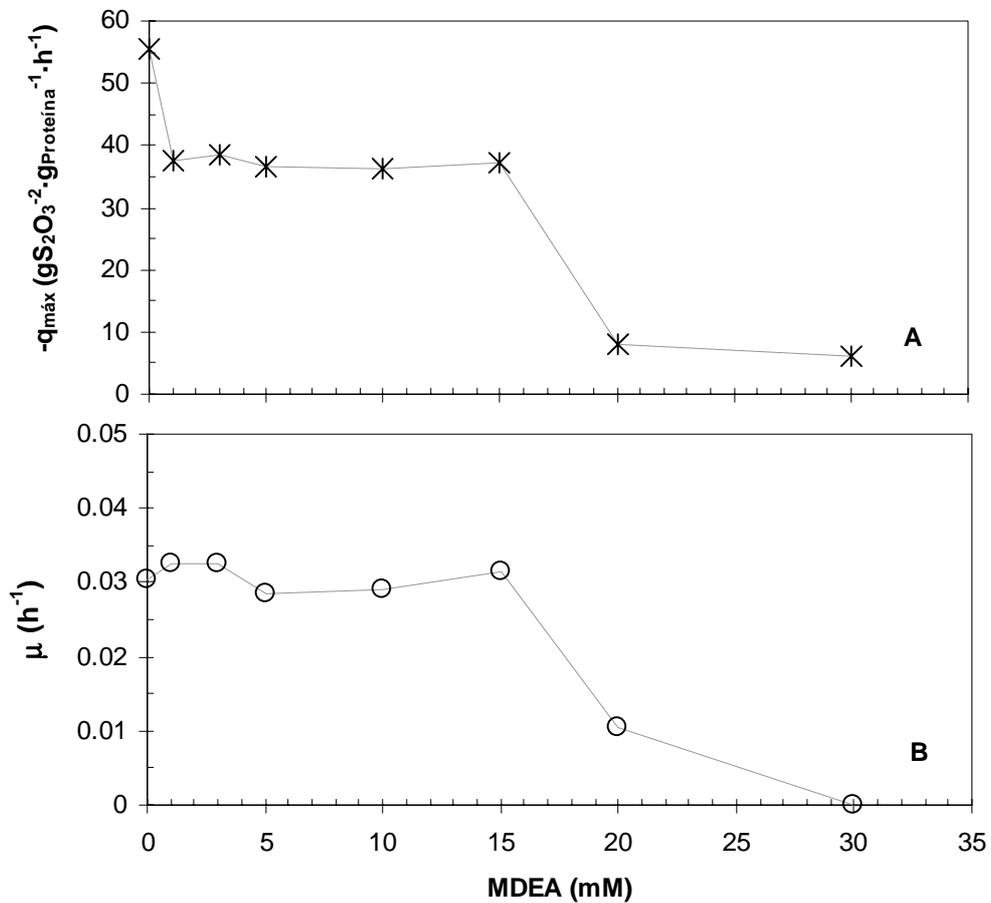


Figura 23. Inhibición de la actividad de oxidación de tiosulfato (A) y el crecimiento de la biomasa (B) por la MDEA

6.4 Aislamiento de microorganismos

A partir del consorcio sulfoxidante se aislaron cepas puras a partir del método de diluciones sucesivas y siembra en placa en medio sólido.

El aislamiento por dilución permitió la obtención de varias colonias, las cuales parecían diferentes en cuanto a la morfología, aunque al realizar la tinción de Gram y observarlas al microscopio resultaron ser un solo microorganismo: bacilos cortos Gram negativos. Su descripción se presenta a continuación.

6.4.1 Características macroscópicas

En medio líquido la biomasa crece formando pequeñas partículas agregadas amorfas y provoca opacidad al medio. Las características morfológicas de la cepa aislada, se identificaron con base en lo propuesto por Ramirez-Gama (1992). El crecimiento en placa se caracterizó por la formación de colonias circulares, con borde irregular, de color crema y textura brillante (figura 24).

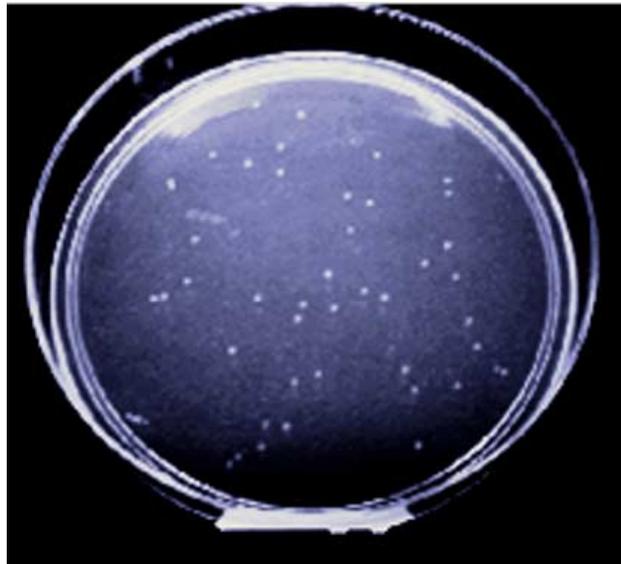


Figura 24. Crecimiento en placa de la colonia aislada a partir del consorcio, se observa la coloración crema de los microorganismos

6.4.2 Características microscópicas

Para asegurar que la colonia presuntamente aislada efectivamente sea la única en la placa o en el medio basal, se realizó tinción de Gram. Los resultados de la primera resiembra mostraron más de una colonia, en resiembras sucesivas logró aislarse la cepa. La cepa es una bacteria Gramm negativa con forma de bacilos delgados y cortos que crece en forma dispersa (figura 25).

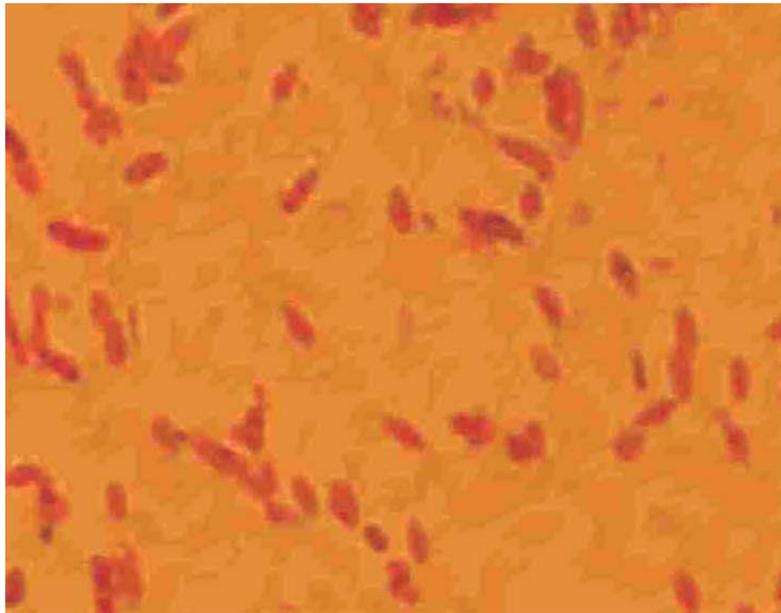


Figura 25. Cepa con tinción de Gram donde se observa el crecimiento en forma dispersa y la forma de bacilos de la bacteria

6.4.3 Observación al microscopio electrónico de barrido ambiental

A través de microfotografías tomadas en microscopio electrónico de barrido ambiental se pudieron observar con más detalle la forma y tamaño de los microorganismos aislados, así como del consorcio que se utilizó en este estudio.

La microfotografía A (figura 26) presenta la cepa, se observan los bacilos cortos de un tamaño aproximado de 2 μm . La microfotografía B (figura 26) presenta al consorcio, como se puede observar hay bacilos además de la presencia de biopolímero que secretan estos microorganismos.

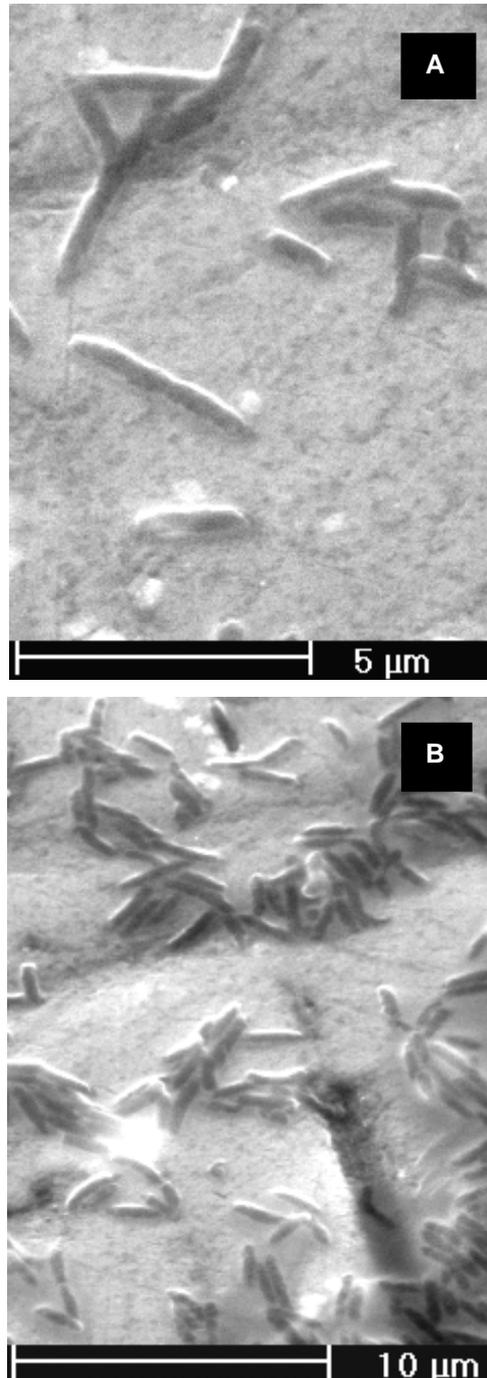


Figura 26. Microfotografías de las colonias aisladas

6.5 Caracterización de la actividad sulfoxidante de la cepa

Con el fin de evaluar la actividad sulfoxidante de la cepa aislada, se realizaron cinéticas de desaparición de tiosulfato a diferentes concentraciones.

La figura 27 muestra los resultados obtenidos, se observó que la velocidad máxima obtenida fue de $34 \text{ g S}_2\text{O}_3^{-2} \cdot \text{g}^{-1} \text{ proteína} \cdot \text{h}^{-1}$, la K_s fue de 9 mM.

Como en el consorcio adaptado a 30 y 40°C, la velocidad de oxidación de tiosulfato se mantuvo constante en concentraciones de 40 a 80 mM, el crecimiento de la biomasa se mantuvo constante en el rango de 30 a 80 mM y se obtuvo una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.050 h^{-1} .

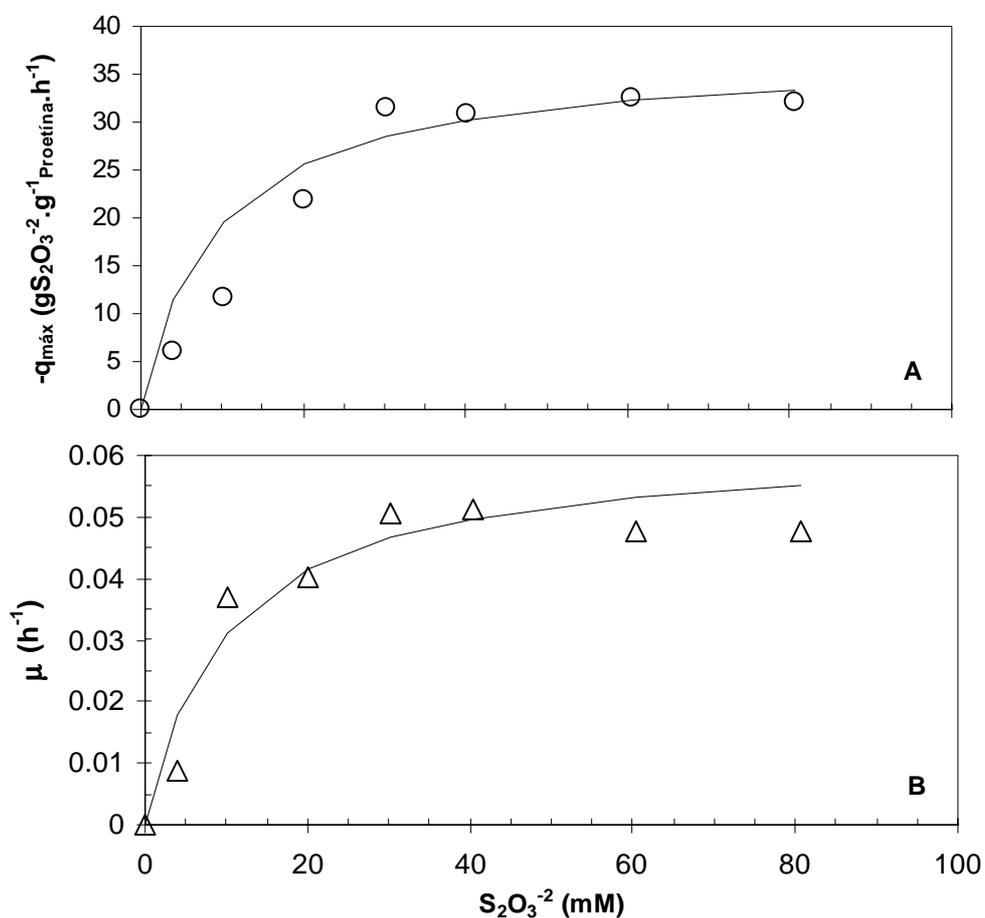


Figura 27. Velocidad de oxidación de tiosulfato (A) y crecimiento microbiano (B) por la cepa

7 CONCLUSIONES

1. Las condiciones de cultivo propuestas en el trabajo, permitieron el enriquecimiento del consorcio (TI) sulfoxidante mesófilo, termotolerante, alcalófilo.

2. Se caracterizó la actividad sulfoxidante del consorcio TI en un reactor con agitación, se obtuvo que en tasas de 0.46 hasta 2.51 d⁻¹ el sistema removió completamente el tiosulfato alimentado hasta cargas de 11.0 g·L⁻¹·d⁻¹ de S₂O₃.

3. Las características del consorcio TI en mesofilia fueron: una tasa de oxidación de S₂O₃²⁻ 17.0 mgO₂·g_{Proteína}⁻¹·min⁻¹, con una constante de afinidad de 0.22 mM y una tasa de oxidación de sulfuro 11.2 mgO₂·g_{Proteína}⁻¹·min⁻¹, con una constante de afinidad 0.06 mM. La actividad sulfoxidante del consorcio se inhibió adicionando NaCl en concentraciones de 0.1 a 1 M. Con pH óptimo de 10. La metildietanolamina en el medio a partir de concentraciones de 10 mM, disminuyó la actividad del consorcio. La actividad sulfoxidante es similar a la reportada en la literatura para microorganismos sulfoxidantes alcalófilos. No existen reportes en la literatura de la utilización de MDEA con este tipo de consorcios.

4. El consorcio adaptado a una temperatura de 40 °C disminuyó la actividad sulfoxidante por encima o debajo de esta temperatura, considerando al consorcio obtenido como termotolerante. El crecimiento de este consorcio en rangos de temperatura de 30 a 40 °C, fue similar, de 0.27 a 0.30 h⁻¹, pero la capacidad de oxidar el tiosulfato se pierde en los rangos de temperatura menores o mayores de 40 °C, una vez que ha habido un proceso de adaptación.

5. Las características del consorcio adaptado a una temperatura de 40 °C fueron: una velocidad de oxidación del tiosulfato de 60 g S₂O₃·g_{Proteína}⁻¹·h⁻¹, con

una constante de saturación de 11 mM y una velocidad de crecimiento ($\mu_{\text{máx}}$) de 0.035 h^{-1} . La concentración de NaCl, donde la actividad sulfoxidante es máxima, fue de 0.3 mM, pH de 10, y temperatura de $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. La adición de amina afectó drásticamente la actividad del consorcio.

6. Del consorcio adaptado a $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$, se aisló una cepa Gram (-), en forma de bacilos delgado y cortos, cuya actividad fue de $34 \text{ g S}_2\text{O}_3 \cdot \text{g Proteína}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, y una K_s de 9 mM. Los resultados son comparables con los reportados para microorganismos sulfoxidantes y alcalófilos sulfoxidantes. Filogenéticamente la cepa aislada no ha sido identificada

7. Los microorganismos obtenidos ofrecen la facilidad de proponer alternativas biotecnológicas para el proceso de endulzamiento de gas natural y para otros procesos donde se puedan tratar corrientes con compuestos azufrados

8 GLOSARIO

Corrientes de desecho. Término empleado en la industria de la refinería para denominar a las aguas residuales, provenientes de los procesos que se aplican en ésta.

Bioteología. Aplicación de organismos, sistemas o procesos biológicos en la manufactura y procesos industriales.

Biorreactor. Sistema en el que se lleva a cabo una conversión biológica. En el cual es necesario un recipiente para el cultivo de organismos de manera controlada y para que los materiales ahí depositados se conviertan o se transformen por medio de reacciones específicas.

Bacteria sulfoxidante. Término empleado para clasificar taxonómicamente a las bacterias litotróficas capaces de oxidar compuestos azufrados.

Organismos extremófilos. Organismos que pueden sobrevivir y crecer óptimamente bajo condiciones extremas.

Litótrofos. Aquellos que utilizan un compuesto inorgánico como fuente de energía.

Quimioautótrofos. Aquellos que obtiene energía a través de la oxidación de compuestos orgánicos.

Quimiolitótrofos. Organismos capaces de obtener su energía por medio de la oxidación de compuestos inorgánicos.

Halófilos. Microorganismos que requieren de la presencia de sales para su crecimiento.

Moderadamente halófilos. Aquellos que se desarrollan en concentraciones que van del 3 al 15% (P/V) de sal.

Extremadamente halófilos. Con un crecimiento óptimo a concentraciones de NaCl del 25% (P/V).

Halófilos obligados. Microorganismos que requieren de NaCl para su proliferación.

Halófilos facultativos. Microorganismos que crecen en una solución de NaCl, pero no lo requieren, se denominan también **halotolerantes**.

Psicrófilos. Microorganismos que se desarrollan a temperatura óptima muy baja.

Mesófilos. Aquellos organismos capaces de sobrevivir en temperatura ubicadas entre 30 y 45 °C.

Termófilos. Organismos que crecen a temperaturas por encima de 45 o 50 °C.

Cepa pura. Aquel cultivo que contiene solamente una clase de microorganismos.

Consortio. Un cultivo que contiene más de una clase de microorganismos. También se le denomina cultivo mixto.

Aislamiento. Conjunto de técnicas microbiológicas mediante las cuales es posible obtener cultivos puros.

BIBLIOGRAFÍA

1. Alcántara Pérez S., Muñoz Colunga A. M., Le Borgne S. y Olguín Lora P. 2005. Molecular and physiological characterization of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing microbial consortia environments of México. Sometido
2. Alcántara S., Velasco J. A. y Revah S. 2004. Sulfur formation by steady-state continuous cultures of a sulfoxidizing consortium and *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645. *Environmental. Technology*. (en prensa)
3. Alcántara, S., Velasco, A., Muñoz, A., Cid, J., Revah, S. y Razo-Flores E. 2003. Sulfide oxidation by a microbial consortium in a recirculation reactor system: sulfur formation under oxygen limitation and removal of phenols. *Environmental Science & Technology*. Sometido.
4. Alcántara S. 2000. Estudio 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 del tiosulfato en azufre elemental. Tesis Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. pp 139
5. Atlas R. M. y R. Bartha. 1996. Microbial Ecology. Fundamentals and applications. 3ª Edición. The Benjamin/Cummings Publishing Co. Inc. N. Y. pp 563.
6. Banciu H., Sorokin D. Y., Kleerebezem R., Muyzer J. G., Galinski E. A., Kuenen J. G. 2004. Growth kinetics of alcaloalkaliphilic, sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio versutus* strain ALJ f15 in continuous culture. *Extremophiles*. 8 (3). 185-192
7. Brüser, T., Lens, P., Truper, H. 2000. The biological sulfur cycle. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering*. Lens P. N. L y Hulshoff Pol L. (Editores). International Water Association, London. pp. 47-85.
8. Buisman C., Jespeer P., Hof A., Janssen, A., Hagen, R., Lettinga, G. 1991. Kinetic Parameters of a Mixed Culture Oxidizing Sulfide and Sulfur with Oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*. 38: 813-820.

9. Buisman C. 1998. Industrial applications of new sulphur biotechnology. The Biological Sulphur Cycle: Environmental Science and Technology. Wageningen, The Netherlands. pp 19-24.
10. Campbell R. 1987. Ecología microbiana. Edit. Limusa, México. pp 92-101
11. Chopin G., Jaffe, B., Jackinm, L. 1977. Azufre y elementos del grupo VI. En: Química. Pub. Cultural, México. pp. 486-499.
12. Clive E. 1990. Microbiology of extreme environments. Mc Graw Hill.
13. Enkerlin E., Cano, G., Garza R., Vogel, E. 1997. Ciencia ambiental y desarrollo sostenible. Internacional Thomson Editores, México, D.F.
14. Gerasimenko L M., Jaroszewicz M., Ito M., Sturr M., Krulwich T., Kolsto A. 1996. Alkaliphilic cyanobacteria from soda lakes of Tuva and their ecophysiology. *Microbiol.* 65: 736-740.
15. Groenestijn J. y Hesselink P. 1993. Biotechniques for air pollution control. *Biodegradation*, 4. pp 283-301.
16. Gommers P., Bijlereld W., Zuijderwijk F. y Kuenen J. 1988. Simultaneous sulfide and acetateoxidation in a denitrifying fluized bed reactor-II. *Wat. Res.* 22(9). pp 1055-1092.
17. Han K. y Levenspiel O. 1988. Extended Monod kinetics for substrate product, and cell inhibition. *Biotechnol. And Bioeng.* 32: 430-437.
18. Horikoshi K. 1999. Alkaliphiles: some applications of their products for biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 63 (4) 735-750.
19. Janssen A. J. H., Ruitenberg R., Buiman C. J. N. 2001. Industrial applications of new sulphur biotechnology. *Water science and Technology.* 44. 8. 85-90.
20. 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.
21. Jensen A. y Webb C. 1995. Treatment of H₂S-containig gases: A review of microbiological alternatives. *Enzyme Microbiol. Tecno.* 17, 2-10.
22. Kohl A., Nielsen R. B. 1997. Gas purification. Gulf Pub. Co., Houston TX.

23. Lens P. N. L., Kuenen J. G. 2001. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water science and Technology*. 44. 8. 57-66.
24. Lowry, O.H., Rosebrough, N. J., Farr A. L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Biol. Chem.* pp. 265-275.
25. Madigan M., Martinko J. y Parker J. 1999. Diversidad metabólica de los microorganismos. En: *Biología de microorganismos*. Prentice Hall Iberia. pp 473-531.
26. Marguesin R. y Schinner F. 2001. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology. *Extremophiles*. 5: 73-83.
27. Monod J. 1961. Mecanismos de regulación genética en la síntesis de proteínas. *J. Mol. Biol.* 3:318-356
28. Morgan J., Revah D., Loyola A. 2001. Algunas tecnologías para la remoción de H₂S por vía fisicoquímica y biológica. *Revista del IMIQ* 9-12. 207-215.
29. Nimura Y., Yanagida F., Uchimura T., Ohara N., Suzuki K., Kozaki K. 1987. A new facultative anaerobic xylan-using alkalophile lacking cytochrome, quinone and catalase. *Agric Biol Chem.* 51: 2271-75
30. Prosser J. 1989. Autotrophic nitrification in Bacteria. In: *Advnces in microbial physiology*. Vol. 30, 125-177
31. Ramírez Gama R. M. 1992. Manual de prácticas de microbiología general. Laboratorio de Microbiología Experimental. Facultad de Química. UNAM.
32. Smith J. M. 1991. Ingeniería de la cinética química. Mc Graw-Hill. México. pp 47-54.
33. Sorokin D. Y., Tourova T. P., Sjollem K. A., Kuenen J. G. 2003. *Thiobacillus nitratireducens* sp. Nov., a nitrate –reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from a soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53. 1779-1783.
34. Sorokin D. Y., Kuenen J. G., Jetten M. S. 2001. Denitrification at extremely high pH values by the alkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio denitrificans* strain ALJD. *Arch Microbiol* 175 (2): 94-101.

35. Sorokin D. Y., Lysenco A. M., Mityushina L. L., Tourova T. P., Jones B. E., Rainey L. A., Kuenen J. G. 2001a. *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov. *Thioalkalivibrio nitratos* sp. nov., and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligately chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51. 565-580.
36. Sorokin D.Y., Tourova T.P., Kuenen J.G. 2000. A new facultatively autotrophic hydrogen- and sulfur-oxidizing bacterium from an alkaline environment. *Extremophiles*. 4(4):237-45.
37. Sorokin D. Y., Robertson L. A., Kuenen J. G. 1999. Isolations and characterization of alkaliphilic, chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacteria.
38. Sorokin D. Y., Robertson L. A., Kuenen J. G. 1998. Purification and characterization of sulfide hydrogenase from alkaliphilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria. *FEBS Letters*. 427.
39. Steudel R. 2000. The chemical sulfur cycle. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution Principles and Engineering*. Lens P: N: L: Editores. International Water Association, London. pp. 1-31.
40. Steudel R. 1996. The yellow element and its astounding complexity. *Anorganische Chemie*. 5. 226-234.
41. Sublette K. 1987. Aerobic oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*, *Biotech. Bioeng.* 29, 690-695.
42. www.lenntech.com/espanol/ciclo-azufre

NOTACIONES

$$-q_{\text{máx}} = \left(\frac{-q \cdot S_{\text{S}_2\text{O}_3^{-2}}}{K_S + S_{\text{S}_2\text{O}_3^{-2}}} \right)$$

Modelo de Monod

$-q_{\text{máx}}$ Velocidad específica máxima de desaparición del sustrato como consumo de oxígeno ($\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{Proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$)

$-q$ Velocidad específica de desaparición del sustrato como consumo de oxígeno ($\text{mgO}_2 \cdot \text{g}^{-1}_{\text{Proteína}} \cdot \text{min}^{-1}$)

$S_{\text{S}_2\text{O}_3^{-2}}$ Concentración de sustrato (tiosulfato $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$) (mM)

K_S Constante de afinidad para el sustrato (tiosulfato $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$) (mM)

$Q_{\text{S}_2\text{O}_3^{-2}}$ Carga de tiosulfato ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)

Q_S Carga de azufre ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)

$Q_{\text{SO}_4^{-2}}$ Carga de sulfato ($\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)