



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**OXIDACIÓN DEL TIOSULFATO EN CONDICIONES  
DE ALTA ALCALINIDAD UTILIZANDO  
BIOREACTORES**

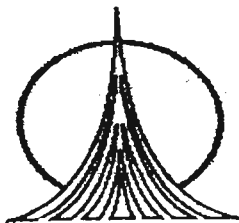
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN INGENIERÍA QUÍMICA

**P R E S E N T A :**  
**JULIO CESAR LOYA CHÁVEZ**

**DIRECTOR:**  
**DR. SERGIO JULIÁN ALCÁNTARA PÉREZ**

**ASESORA INTERNA:**  
**DRA. LEONORA SÁNCHEZ FIGUEROA**



MÉXICO, D.F.

2005

m 342792



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES ZARAGOZA**

**JEFATURA DE LA CARRERA  
DE INGENIERIA QUIMICA**

**OFICIO: FESZ/JCIQ/062/04**

**ASUNTO: Asignación de Jurado**

**ALUMNO: LOYA CHÁVEZ JULIO CÉSAR**

**P r e s e n t e.**

En respuesta a su solicitud de asignación de jurado, la jefatura a mi cargo, ha propuesto a los siguientes sinodales:

<b>PRESIDENTE</b>	<b>Dra. Leonora Sánchez Figueroa</b>
<b>VOCAL</b>	<b>Dr. Sergio Julián Alcántara Pérez</b>
<b>SECRETARIO</b>	<b>M. en C. Néstor Noé López Castillo</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>I.I.Q. Alejandro Rubio Martínez</b>
<b>SUPLENTE</b>	<b>I.Q. Everardo Feria Hernández</b>

Sin más por el momento, reciba un cordial saludo.

**A t e n t a m e n t e**

**“POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU”**

México, D.F., 10 de Diciembre del 2004.

**EL JEFE DE LA CARRERA**

**M. EN C. ANDRES AQUINO CANCHOLA**

## CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.	vii
GLOSARIO.	viii
RESUMEN.	x
ÍNDICE DE TABLAS.	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.	xii
1. INTRODUCCIÓN.	1
1.1. Ciclo del azufre.	2
1.1.1. Ciclo microbiano del azufre.	5
1.1.2. Oxidación bacteriana del azufre.	5
1.1.3. Riesgos ambientales.	7
1.2. Reactores químicos.	9
1.2.1. Tipo de reactores químicos.	9
1.2.1.1. Reactor por lotes.	10
1.2.1.2. Reactor continuo.	11
1.2.1.3. Reactor semicontinuo.	11
1.2.1.4. Reactor tanque.	11
1.2.1.5. Reactor tubular.	12
1.2.1.6. Reactor de lecho fijo.	13
1.2.1.7. Reactor de lecho fluidizado.	13
1.2.1.8. Reactor en torre.	13
1.2.1.9. Reactor en fases dispersas.	13
1.3. Reactores biológicos (bioreactores).	14
1.3.1. Productos de las bioreacciones.	16
1.3.2. Diseño y operación del bioreactor.	18
1.3.3. Bioreacciones en lote.	19
1.3.4. Cultivo continuo.	20
1.3.5. Bioreacciones semicontinuas.	22

1.4. Microorganismos alcalófilos como biocatalizadores.	23
1.4.1. Microorganismos alcalófilos.	24
1.5. Relación entre compuestos reducidos de azufre y pH.	26
1.5.1. Ácido sulfúrico y pH.	26
1.6. Oxidación de compuestos reducidos de azufre a sulfato y/o azufre elemental en condiciones neutras.	28
1.7. Oxidación de compuestos reducidos de azufre en condiciones alcalinas.	33
2. HIPÓTESIS.	36
3. OBJETIVOS.	37
4. MATERIAL Y MÉTODOS.	38
4.1. Biocatalizador.	38
4.2. Medio mineral.	38
4.3. Características de los bioreactores empleados.	38
4.4. Equipos a utilizar en el control de variables.	39
4.4.1. Biocontrolador ADI 1030.	39
4.4.2. Analizador capilar de iones (Waters).	43
4.4.3. Cromatógrafo de gases.	44
4.5. Métodos analíticos.	45
4.5.1. Determinación de sulfatos por turbidimetría.	45
4.5.2. Determinación de iones sulfato y tiosulfato por electroforesis capilar.	46
4.5.3. Determinación de proteína por el método de Lowry.	47
4.5.4. Respirimetría.	48
4.5.5. Determinación de 2-metilaminoetanol.	49
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	50

5.1. Oxidación química.	50
5.1.1. Oxidación química del tiosulfato.	50
5.1.2. Oxidación química del sulfuro.	51
5.2. Oxidación biológica de tiosulfato y sulfuro de hidrógeno. Estudios de respirometría.	52
5.2.1. Biocatalizador.	52
5.2.2. Oxidación biológica del tiosulfato.	53
5.2.3. Oxidación biológica del sulfuro.	54
5.3. Reactor agitado.	55
5.3.1 Arranque del sistema.	55
5.3.2. Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento microbiano y oxidación de tiosulfato.	55
5.4. Reactor de recirculación.	57
5.4.1. Descripción del sistema con recirculación.	57
5.4.2. Tanque de aireación. El oxígeno como una variable controlable.	57
5.4.3. Relación molar $O_2/S_2O_3$ .	58
5.4.4. Tanque de reacción y sedimentación.	59
5.4.5. Descripción de los sistemas estudiados.	59
5.4.6. Oxidación completa a sulfato.	60
5.4.6.1. Sistema 1.	60
5.4.6.2. Sistema 2.	62
5.4.7. Formación de azufre elemental.	64
5.4.7.1. Sistema 1.	64
5.4.7.2. Sistema 2.	64
5.5. Efecto del 2-metilaminoetanol.	66
6. CONCLUSIONES.	69
7. BIBLIOGRAFÍA.	71

## **AGRADECIMIENTOS.**

Primeramente agradezco a Dios por permitirme alcanzar esta meta tan importante en mi vida.

A toda mi familia y a Lizbeth les agradezco la paciencia, confianza, consejos y todo el apoyo que me han brindado durante toda esta etapa para que pudiera alcanzar mis objetivos.

Al Dr. Sergio Alcántara y a la Dra. Leonora Sánchez por la oportunidad que me dieron de desarrollar este trabajo, por sus asesorías y sugerencias las cuales me sirvieron para ir mejorando este trabajo.

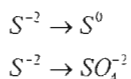
A todos mis amigos y amigas por su apoyo, por toda la amistad y confianza que depositaron en mí. Y por aquellas "convivencias" tan amenas e inolvidables.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por haberme abrigado durante todo este tiempo y mostrarme la vida desde muy diversos acontecimientos lo cual me ha permitido formarme un criterio propio y forjarme como una mejor persona cada día.

**Muchas gracias a todos.**

## GLOSARIO.

**Ácido sulfúrico.** Es un compuesto inestable, de olor desagradable; incoloro, altamente tóxico que reacciona con el oxígeno para producir agua y  $SO_2$  ó S libre, dependiendo de la cantidad de oxígeno empleado. Por medio de la oxidación este puede presentar dos reacciones dando en una como producto al azufre elemental y en la otra a sulfatos.



**Biocatalizador.** Se denomina biocatalizador a los diferentes microorganismos o a sus enzimas que pueden llevar a cabo una reacción enzimática de conversión de un substrato de interés. El término es empleado para diferenciarlo de un catalizador químico.

**Biomasa.** Cantidad de materia viviente dentro de un área determinada.

**Bioreactor.** Es un sistema en el cual se efectúa una conversión biológica, reacciones en las cuales intervienen enzimas, microorganismos y células de animales o vegetales.

**Cargas de iones tiosulfato y sulfato ( $QS_2O_3^{2-}$ ) ( $QSO_4^{2-}$ ).** Es la cantidad de ión presente en el sistema tanto a la entrada como a la salida del mismo en un litro por día [g/Ld].

**Oxidación biológica.** Cantidad de oxígeno consumido por un sistema de medio mineral con una determinada cantidad de biomasa y con variaciones de concentración de tiosulfato o sulfuro.



**Oxidación química.** Es la cantidad de oxígeno consumido por un sistema de medio mineral con variaciones de concentración de tiosulfato o sulfuro.

**Proteína.** Cantidad de biomasa presente en un sistema con unidades de [mg/L·d] donde mg es miligramo, L es litro y d es día.

**Relación molar ( $R_{mt}$ ).** Es la relación que se presenta en un sistema con recirculación de la entrada de oxígeno proveniente del tanque de aireación con la entrada de ión tiosulfato proveniente del medio mineral de la alimentación representado por ( $O_2/S_2O_3^{2-}$ ).

**Tasa de dilución (D).** Es la velocidad con la que el medio mineral de la alimentación entra al sistema sustituyendo al medio mineral con biomasa que se encuentra en el sistema con unidades de [ $d^{-1}$ ].

**Tiosulfato  $S_2O_3^{2-}$ .** Es un anión que se prepara mediante la reacción del azufre con sulfitos en solución acuosa. Es estable a temperatura ambiente, no es tóxico.

## RESUMEN.

En la industria muchos procesos forman sulfuros como efluente de desecho como en el endulzamiento del gas natural, generando contaminación ambiental. A través del empleo de bioreactores se puede dar tratamiento a este efluente produciendo un compuesto que no sea contaminante y más estable en el medio ambiente.

En el presente trabajo se empleo como compuesto de estudio el tiosulfato de sodio por su fácil manipulación en el laboratorio y ya que por pruebas de respirometría en condiciones de pH 10 y en presencia de microorganismos este compuesto mostró consumo de oxígeno presentando oxidación del tiosulfato, por estas mismas pruebas se mostró que el sulfuro es inestable en presencia de oxígeno.

Se emplearon tres bioreactores de distintas características como sistemas sulfoxidantes. Uno fue un tanque con agitación que operó a condiciones de alta alcalinidad y 30 °C con el cual se obtuvo una eficiencia del 97.7 % de conversión a sulfato teniendo la mayor carga de sulfato de 6.7 g/Ld a  $D = 1 \text{ d}^{-1}$  Se encontró una velocidad máxima de crecimiento cercana a  $0.054 \text{ h}^{-1}$ .

Los otros dos sistemas son bioreactores con recirculación que operaron en condiciones de alta alcalinidad y temperatura ambiente en los cuales en el primer sistema se obtuvo una eficiencia de oxidación del 100 % a una tasa de dilución de  $0.9 \text{ d}^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 2 presentando una oxidación completa a sulfato teniendo una  $QSO_4^{2-}$  de 6.12 g/Ld. En este sistema no hubo sedimentación de azufre pero presentó azufre en suspensión por lo que se encontró una máxima cantidad de 1.35 g/L de azufre junto con 90 mg/L de biomasa a una tasa de dilución de  $0.6 \text{ d}^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 0.2. Con el segundo sistema con recirculación se obtuvo una eficiencia de 92 % de conversión a  $SO_4^{2-}$  a una tasa de dilución de  $0.7 \text{ d}^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 2 presentando una  $QSO_4^{2-}$  de 4.76 g/Ld. En este sistema se presento azufre elemental tanto en sedimentación como en suspensión a una tasa de dilución de  $1.2 \text{ d}^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 0.2 teniendo una cantidad de 2.44 g/L de azufre elemental y 125 mg/L de biomasa.

Para ambos sistemas con recirculación se considero el potencial redox como variable de medición corroborando la similitud de los potenciales experimentales con el una reacción teórica, obteniendo de esta forma valores experimentales de -0.3112 V y de -0.2647 V respectivamente donde el primero es el que presenta una mayor aproximación con el valor teórico de -0.356 V.

Por último se estudió el efecto del 2-metilaminoetanol en uno de los sistemas resultando ser tóxico para el biocatalizador, provocando un lavado del sistema aún a bajas concentraciones 10 mM.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1.	Composición del gas amargo, en la plataforma de Cantarell (IMP).	1
Tabla 2.	Cantidad de azufre en distintos componentes de la tierra.	3
Tabla 3.	Características de los grupos metabólicos.	25
Tabla 4.	Parámetros cinéticos de los microorganismos.	26
Tabla 5.	Balance del azufre en el cultivo continuo del consorcio sulfoxidante. La concentración de $S_2O_3^{2-}$ utilizada fue de 4.0 g/L.	56
Tabla 6.	Balance del azufre en el primer sistema con recirculación. La concentración de $S_2O_3^{2-}$ utilizada fue de 4.0 g/L.	61
Tabla 7.	Balance del azufre en el segundo sistema con recirculación. La concentración de $S_2O_3^{2-}$ utilizada fue de 4.0 g/L.	63
Tabla 8.	Azufre elemental y biomasa en el primer sistema con recirculación a una tasa de dilución de $0.6\text{ d}^{-1}$ y un $R_{mt}$ de 0.2.	65
Tabla 9.	Azufre elemental y biomasa en el segundo sistema con recirculación a una $D = 1.2\text{ d}^{-1}$ y una $R_{mt}$ de 0.2.	65
Tabla 10.	Operación del sistema con una concentración 10 mM de 2-metilaminoetanol en condiciones de alta alcalinidad y una $D = 0.6\text{ d}^{-1}$ .	67
Tabla 11.	Datos del cromatógrafo de gases. Días de la operación del sistema con el alcohol-amina tanto en la alimentación como en la salida.	68

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Ciclo del azufre en la naturaleza.	4
Figura 2.	Reactor por lote.	10
Figura 3.	Reactor continuo de tanque agitado (R.C.T.A).	12
Figura 4.	Grupos metabólicos	24
Figura 5.	(a) Solubilidad del $H_2S_{(g)}$ en función del pH para una presión parcial de 0.1 atm y 25 °C, (b) Fracciones mol en equilibrio en función del pH y temperatura.	26
Figura 6.	Interfase física del biocontrolador.	40
Figura 7.	Exhibición del ADI 1030.	41
Figura 8.	Menús principales del biocontrolador.	42
Figura 9.	Velocidad de oxidación química del tiosulfato.	51
Figura 10.	Velocidad de oxidación química del sulfuro.	52
Figura 11.	Velocidad de oxidación biológica del tiosulfato.	53
Figura 12.	Velocidad de oxidación biológica del sulfuro.	54
Figura 13.	Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento y producción de sulfato del biocatalizador (■ sulfato, ●proteína).	56
Figura 14.	Diagrama del primer sistema con recirculación.	60
Figura 15.	Diagrama del segundo sistema con recirculación.	62
Figura 16.	Efecto del 2-metilaminoetanol en un bioreactor con recirculación.	67

## 1. INTRODUCCIÓN

En algunos procesos industriales se obtienen como productos secundarios o productos no deseados compuestos reducidos de azufre especialmente sulfuros los cuales por sus características tóxicas y corrosivas son compuestos altamente dañinos al medio ambiente, uno de estos procesos es el endulzamiento de gas natural.

El proceso comercial de endulzamiento de gas natural consta de dos etapas: una de absorción del ácido sulfúrico y otra de regeneración de la solución de absorción. Para la etapa de absorción se utilizan soluciones de carbonatos o bien de aminas. En la etapa de regeneración el ácido sulfúrico se reabsorbe por calor. Estos procesos se desarrollaron con la finalidad de eliminar el H<sub>2</sub>S del gas amargo del cual forma parte como se ve en la Tabla 1, el cual es considerado un compuesto indeseable en el proceso debido a sus propiedades corrosivas. De este modo, para la comercialización del gas natural la norma describe una concentración igual o menor a 4 ppm. [9, 18]

**Tabla 1. Composición del gas amargo, en la plataforma de Cantarell (IMP).**

<b>COMPOSICIÓN</b>	<b>% MOL</b>
Nitrógeno	3.96
Bióxido de Carbono	3.05
Ácido sulfúrico	2.39
Metano	65.04
Etano	14.8
Propano	6.91
i-Butano	0.72
n-Butano	1.97
i-Pentano	0.4
n-Pentano	0.52
n-Hexano	0.24

En este trabajo se pretende desarrollar un proceso alternativo en la etapa de

regeneración de la solución de absorción. Para ello se pretende estudiar la oxidación de compuestos reducidos del azufre utilizando catalizadores biológicos (microorganismos) en soluciones de carbonatos y en condiciones de alta alcalinidad.

De esta forma una primera etapa del trabajo consiste en estudiar la oxidación química de los compuestos reducidos del azufre tales como tiosulfato y ácido sulfúrico, que permitirán determinar los parámetros cinéticos de la reacción y su comparación con la oxidación mediante el uso de biocatalizadores (microorganismos). Una segunda parte del proyecto consiste en implementar y operar sistemas en condiciones de alta alcalinidad con el fin de evaluar la factibilidad de oxidar los compuestos de azufre referidos utilizando biocatalizadores.

### **1.1. CICLO DEL AZUFRE**

El ciclo del azufre es un proceso que se lleva a cabo en el medio ambiente donde por medio de una serie de reacciones secuenciales sufren transformaciones los átomos de azufre con distintos estados de oxidación de un rango de -2 a +6.

Dentro del ciclo del azufre se llevan a cabo una serie de reacciones que modifican el estado físico y químico del azufre, muchas de estas reacciones se realizan por la presencia de microorganismos los cuales tienen la capacidad de reducir y oxidar los compuestos de azufre y formar así el ciclo del azufre. Las reacciones transformantes representan un flujo continuo que contiene compuestos de azufre dentro de los compartimientos de la tierra (suelo, agua, aire y biomasa).<sup>[20]</sup>

El azufre es uno de los compuestos más abundantes tanto en la atmósfera como

en la corteza terrestre. Se encuentra presente en varios de los componentes ambientales de la tierra (Tabla 2). En el compartimiento de la litosfera se encuentra aproximadamente un 95% de este elemento. Los océanos (hidrosfera) de la tierra contienen aproximadamente un 5% del azufre total. El sulfato es el segundo anión abundante en el agua de mar. Los otros componentes en las cuales se encuentra el azufre abarcan <0.001% del azufre restante.

**Tabla 2. Cantidad de azufre en distintos componentes de la tierra.** <sup>[20]</sup>

COMPONENTE	CANTIDAD DE AZUFRE (kg)
Atmósfera	$4.8 \times 10^9$
Litosfera	$2.4 \times 10^{19}$
Hidrosfera	
Mar	$1.3 \times 10^{18}$
Agua dulce	$3.0 \times 10^{12}$
Organismos marinos	$2.4 \times 10^{11}$
Pedósfera	
Suelo	$2.6 \times 10^{14}$
Materia orgánica del suelo	$1.0 \times 10^{13}$
Biosfera	$8.0 \times 10^{12}$

Dentro del marco global biogeoquímico del ciclo del azufre (Figura 1), este tiene transformaciones de acuerdo a su estado de oxidación y a su estado físico (gas, líquido, o sólido; soluble o insoluble), formando compuestos orgánicos e inorgánicos. En condiciones oxidantes, el compuesto de azufre más estable es el sulfato. Y cuando se lleva a cabo la reducción ambiental se forma sulfuro. El sulfuro y algunos compuestos orgánicos que contienen azufre reducido; por ejemplo, sulfuro de dimetilo (DMS), sulfuro de carbonilo (COS), y disulfuro de carbono (CS<sub>2</sub>); son volátiles y pueden emitirse a la atmósfera. De allí, los compuestos de azufre son redepositados en la litosfera, hidrosfera y la pedósfera, directamente o después de la conversión del sulfato, por medio del SO<sub>2</sub> gaseoso.

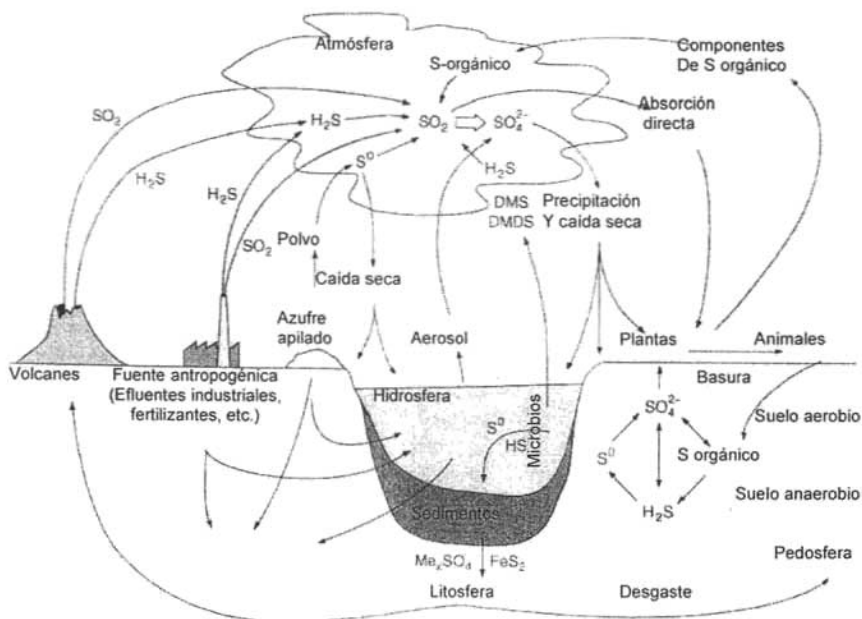


Figura 1. Ciclo del azufre en la naturaleza. [20]

Una de las propiedades del sulfuro es la alta reactividad química que presenta con algunos cationes metálicos llevando a cabo la formación de sulfuros metálicos de baja solubilidad en algunos ambientes anaerobios tales como pantanos, tierras mojadas, agua dulce y sedimentos de agua de mar. Esto permite la acumulación del azufre reducido en estado sólido.

Las fuentes antropogénicas originan un aumento en los compuestos con sulfuro, lo que origina una perturbación considerablemente alta en la litosfera. El flujo antropogénico más importante es la emisión del sulfuro a la atmósfera ( $113 \times 10^{12}$  g azufre/año). En la parte continental del ciclo del azufre, este flujo es comparable solamente con el desgaste por la acción atmosférica ( $114.1 \times 10^{12}$  g azufre/año) y la salida del río a los océanos del mundo ( $108.9 \times 10^{12}$  g azufre/año). Un segundo



flujo antropogénico de azufre es la contaminación de los ríos y la salida subsiguiente de las aguas del río ( $104 \times 10^{12}$  g de azufre/año). Las entradas antropogénicas del azufre en la tierra dan lugar a una aceleración para completar el ciclo del azufre. Esto se demuestra en los niveles elevados de sulfato a la salida del agua, la acumulación del sulfuro en ambientes anaerobios, en la exposición del azufre reducido en el aire, acidificación del ambiente y lixiviación de metales tóxicos. Al mismo tiempo, las emisiones antropogénicas crecientes a la atmósfera traen otros efectos ambientales adversos, por ejemplo, la lluvia ácida. Las consecuencias negativas de la lluvia ácida son bien sabidas e incluyen, por ejemplo, daño extenso a los bosques, a la fauna y efectos perjudiciales sobre edificios y construcciones. <sup>[20]</sup>

#### **1.1.1. Ciclo microbiano del azufre.**

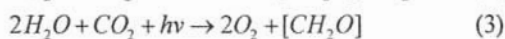
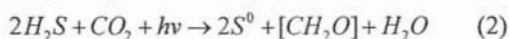
El comportamiento que presentan los compuestos de azufre en el ambiente es altamente influenciado por la actividad de los organismos vivos, particularmente de los microbios.

Desde los años 80, ha recibido una considerable atención por parte de diversos campos científicos el papel que desempeñan las bacterias en la ecología del ciclo del azufre (ejemplo, los sedimentos y esteras de microbios, los biofilms en el tratamiento de aguas residuales y la corrosión).

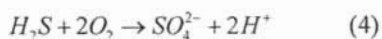
#### **1.1.2. Oxidación bacteriana del azufre.**

Diversas bacterias pueden oxidar los distintos compuestos reducidos de azufre, por ejemplo, sulfuro, azufre elemental, o tiosulfato. La oxidación del sulfuro al

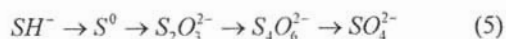
azufre elemental es realizada por las bacterias autotróficas. La (Ecuación 1) da la estequiometría del proceso químico-autotrófico, que procede de forma aerobia o micro-aerobia. Además, la oxidación fotoautotrófica del sulfuro puede también ocurrir bajo condiciones anaerobias. Las bacterias fotosintéticas del azufre son capaces de fotoreducir el  $CO_2$ , mientras que oxidan el  $H_2S$  a  $S^0$  (Ecuación 2), en una analogía similar a la fotosíntesis de los eucariontes (Ecuación 3).



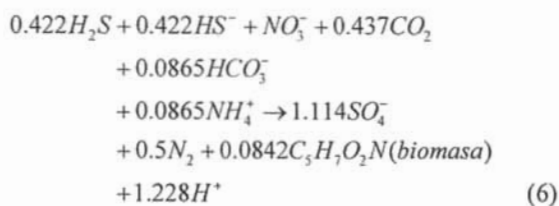
El sulfuro se puede también oxidar totalmente a sulfato. La (Ecuación 4) da una fórmula para el proceso químico-autotrófico, aunque la oxidación fotoautotrófica del sulfuro a sulfato también puede ocurrir.



Esta reacción de la oxidación, catalizada con, por ejemplo, *Thiobacillus* implica a una serie de intermediarios como se ve en la (Ecuación 5), incluyendo el sulfuro, azufre elemental, tiosulfato, tetrationato y sulfato: <sup>[17]</sup>



Eventualmente, la oxidación del sulfuro puede proceder en condiciones libres de oxígeno, usando el nitrato como el receptor de electrones (Ecuación 6). La oxidación del sulfuro en condiciones anóxicas es realizada sobre todo por las bacterias del género *Thiobacillus*, tal como *T. albertis* y *T. neapolitanus*.



El azufre elemental se puede oxidar a sulfato por medio de microorganismos quimicoautotróficos o fotoautotróficos. La estequiometría del proceso quimicoautotrófico se da en la (Ecuación 7).



### 1.1.3. Riesgos ambientales.

Las transformaciones microbianas de los compuestos reducidos de azufre en estado sólido que se utiliza por actividades antropogénicas representan riesgos ambientales importantes. Los materiales tales como combustibles fósiles, minerales, sedimentos anaerobios, o basura sólida pueden experimentar cambios oxidantes, dando por resultado una solubilidad del azufre a partir de la fase sólida. Así, las cantidades grandes de ácido sulfúrico que se forman, del supuesto

drenaje ácido se transportan al sitio donde se encuentra la mina. <sup>[10]</sup> El ácido inhibe el crecimiento vegetal y la vida acuática. Sin embargo, su consecuencia ambiental es la solubilidad de pesados metales catiónicos.

En las regiones tropicales del mundo, la inundación y el drenaje periódico de los suelos a las embocaduras marítimas conducen a la acumulación del azufre reducido y de su subsiguiente oxidación. <sup>[6]</sup> Esto da lugar a la producción del ácido sulfúrico y del aspecto de los suelos ácidos del sulfato. En muchos casos se requiere, el tratamiento (neutralización) de estos sitios.

Las aguas residuales ricas en sulfato son generadas por muchos procesos industriales que utilizan la acción del ácido sulfúrico o de la alimentación rica en sulfato (ejemplo; industrias de procesos de comida marina o la fermentación). También, el uso de los compuestos reducidos de azufre en procesos industriales, como, sulfuro (en curtidurías, en la producción del papel tipo Kraft), sulfito (en la producción del papel tipo sulfito), el tiosulfato (en la fijación de fotografías), o el ditionito (en la producción del papel), contaminan las aguas residuales con los compuestos sulfurosos. <sup>[20]</sup>

La contaminación producida por los seres humanos ha aumentado grandemente los niveles del dióxido de azufre en la atmósfera. Cuando está disuelto con agua en las nubes, el  $\text{SO}_2$  acidifica el agua de lluvia. La precipitación ácida ha estado implicada en la reducción del crecimiento de bosques en Norteamérica y Europa. La lluvia ácida también tiene un efecto perjudicial en edificios y construcciones.

Muchos de los compuestos orgánicos e inorgánicos volátiles del azufre son extremadamente olorosos.

## 1.2. REACTORES QUÍMICOS

Un reactor químico es un aparato o equipo industrial en el que se realiza la transformación química en la mejor forma posible, es decir que tenga un mejor rendimiento y que se lleve a cabo en el mínimo tiempo, siendo el equipo reducido y de tan bajo costo como sea posible, además de que se consuma el mínimo de energía. Los reactores químicos pueden tener una gran variedad de tamaños, formas y condiciones de operación. Uno de los más comunes es el pequeño matraz o vaso que se usa en el laboratorio químico para las reacciones en fase líquida. El otro extremo en cuanto a tamaño lo constituyen los grandes recipientes cilíndricos empleados en la industria del petróleo. <sup>[28]</sup>

### 1.2.1. Tipo de reactores químicos.

Existe una gran variedad de diseños que no siempre tiene una relación específica con el tipo de reacción o de operación que se realiza. Con frecuencia se emplean equipos distintos con diseños diferentes para una misma reacción.

Los reactores químicos se han clasificado de la siguiente manera:

- En base a su tipo de operación y,
- En base a sus características de diseño (la forma del reactor).

La primera clasificación se asocia principalmente con las reacciones homogéneas y divide a los reactores en los siguientes tipos:

- Reactor por lotes.
- Reactor continuo.
- Reactor semicontinuo.

La segunda clasificación de los reactores, es decir, en base a las características de su diseño, divide a los reactores en los siguientes tipos:

- Reactor tanque.
- Reactor tubular.
- Reactor de lecho fijo.
- Reactor de lecho fluidizado.
- Reactor en torre.
- Reactor para fases dispersas.

#### 1.2.1.1. Reactor por lotes.

En este tipo de reactor todos los reactivos se introducen al principio y se procesan según su curso determinado de reacción durante el cual no se alimenta o se extrae algún material, es decir, el producto no se descarga hasta que concluye el proceso, en este tipo de reactor existe una variación en el grado de reacción y en las propiedades de la mezcla reaccionante con el transcurso del tiempo. Por lo general, el reactor tiene la forma de tanque, puede tener agitación o no, y se utiliza principalmente en la producción a pequeña escala.

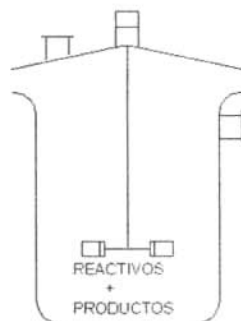


Figura 2. Reactor por lote.

#### **1.2.1.2. Reactor continuo.**

En este tipo de reactores los reactivos se introducen y los productos se extraen simultáneamente y de manera continua. La forma de este tipo de reactor puede ser de tanque, de una estructura tubular o de torre y tiene una multitud de aplicaciones en planta a gran escala con el propósito de reducir los costos de operación y de facilitar el control de la calidad del producto.

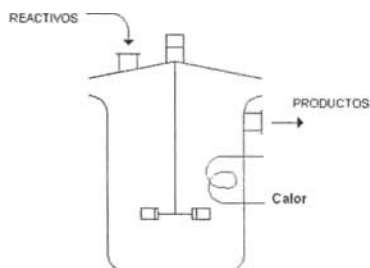
#### **1.2.1.3. Reactor semicontinuo.**

Es el tipo de reactor cuyo funcionamiento no se ajusta por completo al de tipo lote o batch ni al continuo. En uno de los casos, alguno de los reactivos se carga al principio, en tanto que los restantes se dosifican conforme se desarrolla la reacción. Otro tipo es similar al reactor por lote con la variación de que uno de los demás reactivos se extrae en forma continua.

#### **1.2.1.4. Reactor tanque.**

Este tipo de reactor es probablemente el de mayor empleo en la industria química. En la mayoría de los casos, está equipado con algún mecanismo de agitación (centrifugación, agitación o sacudidas), así como con elementos de transferencia de calor (por ejemplo intercambiadores de calor de chaqueta o serpentín, externos o internos), ver Figura 3.

Puede operar tanto como de tipo lote como tipo continuo así como con amplias gamas de temperatura y de presión, produciendo un mezclado casi perfecto (retro mezclado) con excepción de fluidos muy viscosos.



**Figura 3. Reactor continuo de tanque agitado (R.C.T.A)**

### 1.2.1.5. Reactor tubular.

Este tipo de reactor está constituido por un solo tubo continuo o por varios tubos en paralelo. Los reactivos ingresan al reactor por un extremo y el producto se obtiene por el otro, con una variación continua en la composición de la mezcla de reacción entre estos dos puntos. El grado de la reacción puede variar con respecto a la posición del reactor, pero no en función del tiempo.

La transferencia de calor hacia el reactor o desde este, se logra por medio de una camisa o diseño de tubos y coraza. Los tubos del reactor pueden estar empacados con granos del catalizador o sólidos inertes.

El reactor de flujo tubular o de flujo pistón es en el que la masa reaccionante consiste en elementos de flujo que son dependientes entre sí, teniendo cada uno diferente composición, temperatura, etc.

Se puede lograr una gran aproximación con una buena condición de mezclado, usando un reactor tubular con recirculación.



#### **1.2.1.6. Reactor de lecho fijo.**

Este reactor es un sistema heterogéneo muy común en el cual el fluido reaccionante fluye a través de un lecho de partículas catalíticas relativamente grandes (de orden de un centímetro) que se mantienen en posición estacionaria.

#### **1.2.1.7. Reactor de lecho fluidizado.**

Este tipo de reactor consta de un depósito cilíndrico vertical que contiene partículas sólidas finas que son catalizadores o reactivos. La corriente del fluido reactivo se introduce en la base del reactor a una velocidad tal que los sólidos flotan en la corriente del fluido sin salir del sistema. En estas condiciones, las partículas del lecho tienden a igualar la composición y la temperatura de la mezcla de reacción, es decir, se crea cierto grado de retro mezclado.

#### **1.2.1.8. Reactor en torre.**

Este tipo de reactor se caracteriza por su estructura cilíndrica vertical con una relación grande entre la altura y el diámetro. Puede tenerse desviadores o rellenos sólidos (reactivos, catalizadores e inertes), o bien, quizá se alimente sencillamente a una torre vacía y se utiliza para procesos continuos de reacciones heterogéneas.

#### **1.2.1.9. Reactor en fases dispersas.**

Este tipo de reactor se caracteriza por una columna vertical que contiene partículas muy finas de catalizador suspendidas en un medio líquido (por ejemplo aceite), que puede ser uno de los reactivos. El reactivo gaseoso que se burbujea por la suspensión se disuelve en el medio líquido en donde se producen las

reacciones catalizadas. Una aplicación de este tipo de reactor esta en la hidrodesintegración de aceites combustibles residuales.

### **1.3. REACTORES BIOLÓGICOS (BIOREACTORES)**

El pan, el queso, el vino y la cerveza fueron posibles por el proceso conocido tradicionalmente como fermentación. Dado que se presentó frustración en la producción de vinos franceses ya que encontraron vinagre y no vino, el famoso microbiólogo francés Luis Pasteur estudió el proceso necesario de fermentación. Lo que Pasteur descubrió era que la fermentación ocurría como resultado de la actividad biológica de una especie microscópica llamada levadura. Cuando microbios indeseados infiltraron el vino dañaron el sabor. A partir del trabajo de Pasteur se inició la investigación de los bioreactores como los conocemos hoy. Una vez que el proceso fue identificado y entendido, pudo ser controlado. Con el fin de controlar las reacciones dentro de los procesos lo cual les corresponde a los ingenieros químicos. El alcance de la bioingeniería ha crecido, de la simple microbiología en la botella de vino a la industrialización no solamente de la cerveza, vino, queso y leche, sino también se han desarrollado productos nuevos en biotecnología como (antibióticos, enzimas, hormonas, vitaminas, azúcares y ácidos orgánicos).<sup>[45]</sup>

Por definición, un bioreactor es un sistema en el cual se efectúa una conversión biológica pero esta definición puede aplicarse a cualquier conversión que implique enzimas, microorganismos, y células de animales o de plantas. Por lo tanto, los bioreactores son referidos solamente a los recipientes mecánicos en los cuales: (a) los organismos se cultivan de una manera controlada y/o, (b) los materiales se

convierten o se transforman vía reacciones específicas. Absolutamente similar a los reactores químicos convencionales, los bioreactores se diferencian en que están diseñados específicamente para influenciar caminos metabólicos. El término "bioreactor" se utiliza a menudo como sinónimo de "fermentador"; sin embargo, en la definición más terminante, un fermentador es un sistema que proporciona un proceso anaerobio para producir el alcohol del azúcar.<sup>[45]</sup>

Los bioreactores se diferencian de los reactores químicos convencionales en que estos soportan y controlan entidades biológicas, los sistemas del bioreactor se deben diseñar para proporcionar un grado más alto de control sobre trastornos y contaminaciones en el proceso, puesto que los organismos son más sensibles y menos estables que los productos químicos. Los organismos biológicos, por su naturaleza, se transforman y puede alterar la bioquímica de la bioreacción o las características físicas del organismo. Aunque la mayoría de las reproducciones fundamentales de la ingeniería y del diseño de bioreactores es el mantener estable la actividad biológica deseada y eliminar las actividades indeseadas lo cual representa a menudo un mayor desafío que los reactores químicos requieren típicamente.

Los organismos, influenciados por su morfología y el medio de bioreacción, son sensiblemente sesgados en los grados de su variación. Un número de bacterias, de levadura y de hongos en los cultivos puede ser relativamente tolerante a ambientes altamente sesgados estos exhiben vitalidad en recipientes que se mezclan con gran energía. Las células animales de pescados e insectos y de las plantas son delicadas y requieren generalmente ambientes de bajo sesgo para poder ser viables.

Otras diferencias importantes entre los reactores químicos y los bioreactores son la selectividad y el tipo. Los bioreactores, tienen una selectividad más alta, es decir, la medida de la capacidad del sistema para producir el producto deseado (sobre otros resultados), es de importancia primaria. De hecho, la selectividad es especialmente importante en la producción de moléculas relativamente complejas tales como los esteroides de los antibióticos, proteínas de las vitaminas y ciertos ácidos del azúcar. Frecuentemente, la actividad y la selectividad deseadas ocurren en un rango substancialmente más pequeño de lo que se presentan en reactores químicos. Pero, la desactivación de la biomasa plantea a menudo consecuencias más severas que un trastorno en algún producto químico.

El tipo del reactor es de importancia secundaria. Para muchos sistemas biológicos, un período de incubación es necesario para preparar un cultivo que será usado para inocular al bioreactor con los microbios que producen en el cultivo. Aunque una bioreacción puede ser breve, en sistemas donde es necesario el crecimiento del organismo o de la biomasa, la bioreacción puede tomar de 10 a 20 días para la terminación de la producción. Además, el bioreactor no se debe mirar como unidad aislada, sino como parte de una unidad de operación integrada con corriente ascendente (preparación) y de unidad de operaciones de corrientes descendientes (recuperación).

### **1.3.1. Productos de las bioreacciones.**

Los productos de las bioreacciones se forman por tres procesos básicos:

1. Los procesos en los cuales el producto se obtiene de las células como por ejemplo, alcoholes extracelulares o ácido cítrico, o materiales intracelulares,

como, un metabolito o una enzima. La obtención de productos celulares se dividen en dos tipos, cuando se producen dentro de un ciclo biológico. Los metabolitos primarios se producen durante el crecimiento y son esenciales para el continuo crecimiento. Los metabolitos secundarios son producidos después de que el crecimiento haya cesado. Los metabolitos primarios incluyen los aminoácidos, nucleótidos, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos. Los productos primarios para el uso industrial incluyen por ejemplo; etanol, ácido cítrico, acetona, butanol, lisina, polisacáridos y vitaminas.

Los productos celulares secundarios son una especie o grupo de organismos formados de los intermediarios y de los productos del metabolismo primario. No todos los microorganismos producen metabolitos secundarios. Muchos productos secundarios tienen características tóxicas o antibióticas y son, la base de muchas de las industrias de antibióticos. La producción de enzimas vía bioreacciones ha desplazado las técnicas ineficaces de mutaciones y manipulación genética.

2. Procesos que originan una masa celular. Un ejemplo de la producción de la masa celular es la fabricación del pan en la cual usan las levaduras. Otros procesos incluyen proteínas unicelulares como fuentes de alimento.
3. Procesos que modifican un compuesto que se agrega a la fermentación o biotransformaciones. Las biotransformaciones ocurren con las enzimas inherentes de las células. Las células de todos los tipos se pueden emplear como biocatalizadores para transformar ciertos compuestos vía deshidratación, oxidación, hidroxilación, aminación o isomerización. Las conversiones enzimáticas frecuentemente exhiben energías más bajas de

activación y una selectividad más alta que sus contrapartes químicas. Los esteroides, antibióticos y las prostaglandinas se producen por medio de biotransformaciones. <sup>[45]</sup>

### **1.3.2. Diseño y operación del bioreactor.**

La meta de un bioreactor eficaz es el control, para lograr esto, el ingeniero químico debe tomar en cuenta dos áreas:

Una son los parámetros convenientes para el reactor biológico, sistema químico y físico (macro-cinética). El sistema macro-cinético incluye un crecimiento celular y una producción del metabolito. Los microbios pueden incluir bacterias, levaduras, hongos, también se pueden usar las células de animales (pescados e insectos) y plantas, así como otros materiales biológicos como enzimas. <sup>[45]</sup>

La otra área de importancia en el diseño del bioreactor implica los parámetros de bioreacción, incluyendo:

- control de la temperatura
- pH óptimo
- sustrato suficiente (usualmente una fuente de carbono)
- disponibilidad de agua
- sales como nutrientes
- vitaminas
- oxígeno (para procesos aerobios)
- evolución del gas y
- retiro del producto y del subproducto

Además, el bioreactor debe diseñarse para promover la formación de la morfología óptima del organismo y eliminar o reducir la contaminación por los organismos o la mutación indeseada del organismo.

### **1.3.3. Bioreacciones en lote.**

La mayoría de las bioreacciones es por lote. La primera fase de la bioreacción en lote es comúnmente la esterilización, después de lo cual el medio de cultivo estéril se inocula con los microorganismos que se han cultivado para alcanzar un resultado específico. Durante este período dinámico de la reacción, las células, los substratos (incluyendo sales nutrientes y vitaminas) y las concentraciones de los productos varían con el tiempo. Al mezclarse apropiadamente mantiene las diferencias de composición y de temperatura en los niveles aceptables.

Para promover el cultivo aerobio, el medio se airea proporcionando un flujo continuo de oxígeno. Los subproductos gaseosos formados son retirados, por ejemplo, el CO<sub>2</sub> y tanto el proceso como el retiro de subproductos se llevan a cabo semicontinualmente.

Después, se agrega un ácido o un álcali para controlar el pH. Para mantener la espuma en niveles aceptables, los agentes antiespumantes son agregados cuando el sensor de espuma lo indica. Cuando la bioreacción es completa, el producto final es retirado. Pero este método es ineficaz para producir grandes cantidades comerciales.

Todos, los sistemas de bioreacción en lotes proporcionan un número de ventajas, incluyendo las siguientes:

- Reducción de riesgos en la mutación de la célula o de contaminación, debido a un período relativamente breve de crecimiento.
- Baja inversión de capital cuando se compara a los procesos continuos para un mismo volumen de bioreactor.
- Mayor flexibilidad en la operación del equipo.
- Niveles más altos de conversión de la materia prima, resultado a partir de un período controlado de crecimiento.

Las desventajas incluyen:

- Productividad más baja debido al tiempo para refrescarse, calentarse, esterilizar, vaciar y limpiar el reactor.
- Incremento en la instrumentación debido a la frecuente esterilización.
- Riesgos mayores en la higiene industrial debido al contacto potencial con los microorganismos o las toxinas patógenas.

Los usos comunes para los bioreactores en lotes incluyen:

- Productos que se deben fabricar con un mínimo riesgo de contaminación o de mutación de organismos.
- Operaciones en las cuales se producen pequeñas cantidades de producto.

#### **1.3.4. Cultivo continuo.**

La definición característica de un cultivo o quimiostato continuo es el proceso de alimentación ininterrumpida. Un medio de cultivo que es estéril se alimenta continuamente en el bioreactor para mantener el estado del sistema estable. Por supuesto, el producto también se obtiene continuamente del reactor. Las variables



de la reacción y los parámetros de control siguen siendo constantes estableciendo un estado de tiempo constante dentro del reactor. El resultado es de productividad y de salida continua. Estos sistemas proporcionan un número de ventajas incluyendo:

- Potencial creciente para automatizar el proceso.
- Costo de trabajo reducido, debido a la automatización.
- Menos tiempo perdido en esterilizar, llenar y vaciar el reactor.
- Calidad constante del producto debido a los parámetros de funcionamiento invariable.
- Menores riesgos de toxicidad en el personal, debido a la automatización.
- Es obligatoria la calidad de la materia prima y es necesario asegurarse de que el proceso sigue siendo continuo.

Las desventajas del cultivo continuo incluyen:

- Flexibilidad mínima, puesto que solamente son posibles variaciones leves en el proceso (rendimiento del proceso, composición del medio de cultivo, concentración de oxígeno y temperatura).
- Costos de inversión más altos en el equipo de control y de automatización, y costos crecientes para la esterilización continua del medio.
- Mayores costos en la elaboración de relleno continuo de substratos sólidos insolubles, tales como la paja.
- Un riesgo más alto de mutación de la célula y de contaminación, debido al período relativamente breve de cultivo.

### 1.3.5. Bioreacciones semicontinuas.

Este híbrido de lotes y de operaciones continuas se encuentra en muchos tipos de procesos. El sustrato se alimenta al reactor como en los de lotes y se mantiene entonces por un período extendido de cultivo continuo. Para la producción secundaria del metabolito, en la cual el crecimiento de la célula y la formación del producto ocurren a menudo en fases separadas, el sustrato se agrega típicamente en una tasa específica. Como los reactores por lotes, los reactores semicontinuos son móviles. Estos sistemas proporcionan un número de ventajas incluyendo las siguientes:

- Producción más alta, a partir de un período definido de cultivo durante el cual no se agrega ni se quita ninguna célula.
- Oportunidades crecientes para optimizar las condiciones ambientales de los microorganismos en vista de la fase de crecimiento o de la producción y la edad del cultivo.

Las desventajas incluyen:

- Niveles de productividad más baja debido a los procedimientos para llenar, calentar, esterilizar, refrescar, vaciar y limpiar el reactor.
- Costos en el control del proceso de trabajo y/o dinámico para el proceso.

Los bioreactores semicontinuos se utilizan típicamente cuando los métodos continuos no son factibles, por ejemplo, en los cuales la mutación o la contaminación leve del microorganismo ocurren. Tales bioreactores también se utilizan cuando los métodos por lotes no ofrecen los niveles deseados de productividad. <sup>[45]</sup>

#### 1.4. MICROORGANISMOS ALCALÓFILOS COMO BIOCATALIZADORES.

Los microorganismos son empleados por su gran utilidad en biotecnología para prevenir o minimizar efectos de contaminación y además, son utilizados como biocatalizadores para llevar a cabo la obtención de algún producto deseado.

Los microorganismos empleados en un proceso son seleccionados de acuerdo a las características del efluente y por ellos se determinan el diseño y el proceso a emplear. [14, 24]

La oxidación biológica del  $\text{HS}^-$  al  $\text{SO}_4^{2-}$  es realizada por microorganismos sulfoxidantes.

Anteriormente se habían clasificado de acuerdo con la taxonomía que presentaban, a las bacterias litotróficas por su capacidad de oxidar a los compuestos azufrados. Pero numerosas bacterias sulfoxidantes pueden crecer de una manera organoheterotrófica, por lo que, el término bacteria sulfoxidante ya no tiene significado taxonómico, sin embargo, se usa para describir al grupo fisiológico de bacterias que son encontradas en lugares que contienen sulfuro. Estas bacterias sulfoxidantes crecen en intervalos de pH de 1 a 10 con una temperatura de 4 a 95 °C. [19]

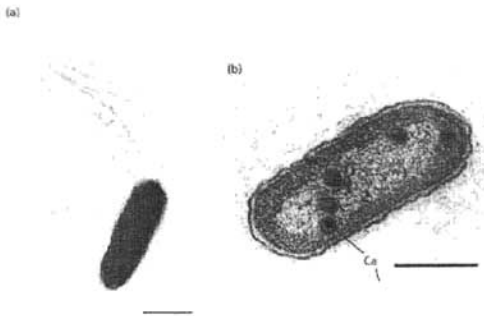
De igual forma hay microorganismos extremófilos los cuales son capaces de desarrollarse de manera normal en condiciones extremas, sabiendo que las condiciones normales son entre los 10 y 40 °C con un pH de 5 a 8 y 1 atm de presión por lo que todo lo que se encuentra fuera de estos rangos son condiciones extremas. [7]

### 1.4.1. Microorganismos alcalófilos.

El término alcalófilo se emplea para caracterizar a los microorganismos que se desarrollan en ambientes con valores altos de pH por arriba de 9, con frecuencia entre los valores de 10 y 12 (alcalófilos extremos), pero no pueden crecer en valores cercanos al neutro 6.5 [13]

Los microorganismos alcalófilos sulfoxidantes pueden clasificarse como quimiolitotóxicos alcalófilos. Tienen la particularidad de oxidar compuestos reducidos de azufre y su estudio sistemático fue iniciado en los últimos años. Su aplicación más estudiada se ha relacionado a la oxidación de compuestos reducidos de azufre presentes en efluentes o emisiones que lo contienen. [22] Se han dado a conocer dos grupos metabólicos que se muestran en la Figura 4 y sus propiedades en la Tabla 3, formando dos nuevos géneros de bacterias autótrofas alcalófilas que realizan la oxidación del sulfuro:

#### *Thioalkalimicrobium*



#### *Thioalkalivibrio*

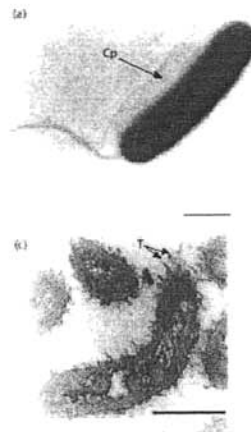


Figura 4. Grupos metabólicos [36]

Tabla 3. Características de los grupos metabólicos. [36]

PROPIEDADES	<i>Thioalkalivibrio</i> (25 especies)	<i>Thioalkalimicrobium</i> (18 especies)
Fuente del aislado	Kenia (21) y Siberia (4) lagos salinos	Siberia (15) y Kenia (3) lagos salinos
DNA GC (mol %)	61±0±65±6	48±0±51±2
Morfología de la célula	De las barras al espiral	De las barras al espiral
Flagelación	Polar simple	Polar 1-3 de un lado
<b>Periplasmico</b>		
Morfología de la colonia	Acuerdo, a menudo con el azufre (blanco) y polisulfuro (amarillo)	Acuerdo o el separarse, sin el azufre, rosado
<b>Crecimiento</b>		
Intervalo de pH	7.50-10.65	7.5-10.6
pH Óptimo (quimiostato)	10.00-10.2	9.8-10.0
Límite superior de temperatura (°C)	47	41
Límite superior de sal [NaCl o carbonatos de sodio; total Na+(M)]	4.0-4.3	1.2-1.5
Rendimiento celular del tiosulfato	> 6 g proteína mol <sup>-1</sup>	> 3.5 g proteína mol <sup>-1</sup>
Tasa de crecimiento	> 0.18 h	> 0.33 h
Influencia del Mg <sup>+2</sup>	Estímulo de crecimiento	Estabilización de la pared de la célula, estímulo de crecimiento
<b>Potencial de oxidación del azufre</b>		
Sulfuro y tiosulfato	Moderado	Alto
Azufre	Moderado	Muy bajo
Tetrationato	Alto	Moderado
Tritonato y pentationato	Moderado	Muy bajo
Sulfito	Moderado	Muy bajo
Mayor ubiquinone	Q-8	Q-8
Dominación citocromo	c y b	c
Citocromo c oxidado	¿?	cbb <sub>3</sub>

Los parámetros cinéticos de los microorganismos autótrofos haloalcalófilos moderadamente tolerantes a las sales del sulfuro crecidos con el tiosulfato o el

sulfuro en medio mineral de carbonato de sodio de pH 10 y 0.5-0.6 M total de Na+ se muestran el en la tabla 4.

**Tabla 4. Parámetros cinéticos de los microorganismos.** <sup>[30]</sup>

Parámetros	Dimensión	<i>Thioalkalimicrobium</i>		<i>Thi alkalivibrio</i>	
		Batch	Quimiostato	Batch	Quimiostato
Y	mg proteína (mmol S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ) <sup>-1</sup>	2.3 (20)	Máximo 3.5 (2)	6.0 (15)	5.5 (5)
K (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> , HS <sup>-</sup> )	μM	3.5±1.5(5)		2.8±0.8(6)	
m <sub>S</sub>	μM S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (mg proteína h) <sup>-1</sup>	n.d.	6 (1)	n.d.	2 (1)
q <sub>max</sub> (S)		n.d.	94±2 (1)	n.d.	25±1(5)
(Tiosulfato)	(mg proteína)h <sup>-1</sup>				
μ <sub>max</sub>	h <sup>-1</sup>	0.23 (20)	0.33 (2)	0.10 (15)	0.12 (5)

## 1.5. RELACIÓN ENTRE COMPUESTOS REDUCIDOS DE AZUFRE Y pH.

Cuando se encuentra con pH ácido o cercano a la neutralidad en los sistemas biológicos de remoción de H<sub>2</sub>S, este tipo de pH favorece el crecimiento y la actividad de los microorganismos, pero limita la transferencia del H<sub>2</sub>S, debido a su baja solubilidad.

### 1.5.1. Ácido sulfúrico y pH.

Para el H<sub>2</sub>S la constante H (constante de Henry) es de (0.41 (mol/m<sup>3</sup>)<sub>aire</sub> / (mol/m<sup>3</sup>)<sub>agua</sub>, a 25 °C), limitando de esta forma el transporte interfacial y por consecuencia las capacidades de eliminación.

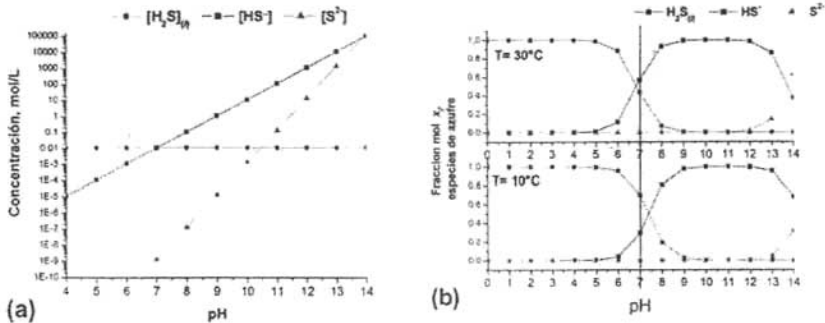
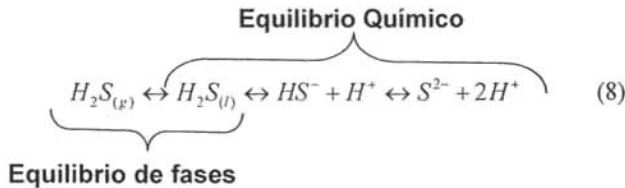


Figura 5. (a) Solubilidad del  $H_2S_{(g)}$  en función del pH para una presión parcial de 0.1 atm y 25 °C, (b) Fracciones mol en equilibrio en función del pH y temperatura.

El aumento en la capacidad de remoción puede lograrse mejorando la eficiencia en la absorción del  $H_2S$ , por medio del incremento en el pH. En la Figura 5(a), se nota que la solubilidad del  $H_2S$ , tiene una fuerte dependencia en el pH de la disolución. Y para este caso la temperatura tiene poca influencia en la solubilidad, por lo que el control de pH en una solución acuosa, puede ser una opción de gran utilidad para mejorar las capacidades de remoción del  $H_2S$  en bioreactores. A partir de la definición de la constante H mostrada en la (Ecuación 9), se propone una definición de "H modificada" (Ecuación 10), contabilizando todas las especies de azufre existentes en solución (equilibrio químico) y que se encuentran en equilibrio de fase con el  $H_2S_{(g)}$  (Ecuación 8).



Con el aumento del pH, la constante H disminuye su valor, y por lo tanto se incrementa el gradiente de concentraciones entre las fases gas y líquida, es decir, la fuerza motriz de la transferencia de masa.

$$H = (\text{mol } H_2S_{(g)} / m^3)_{\text{aire}} / (\text{mol } H_2S_{(l)} / m^3)_{\text{agua}} \quad (9)$$

$$H_{\text{mod}} = (\text{mol } H_2S_{(g)} / m^3)_{\text{aire}} / (\text{mol } (H_2S_{(l)} + HS^- + S^{2-}) / m^3)_{\text{agua}} \quad (10)$$

De esta forma se obtiene un valor para  $H_{\text{mod}} = 0.0004 \text{ (mol/m}^3\text{)}_{\text{aire}} / \text{(mol/m}^3\text{)}_{\text{agua}}$ , a 25 °C y pH = 10, que es 1,000 veces más pequeño (es decir el  $H_2S_{(g)}$  es 1,000 veces más soluble) que  $H_{\text{mod}}$  para un pH < 5.

## 1.6 OXIDACIÓN DE COMPUESTOS REDUCIDOS DE AZUFRE A SULFATO Y/O AZUFRE ELEMENTAL EN CONDICIONES NEUTRAS

La importancia en la formación del azufre elemental se debe a que es un elemento que se encuentra en la naturaleza, no es contaminante del ambiente y puede ser utilizado como materia prima en la fabricación de ácido sulfúrico el cual es un compuesto muy utilizado en la industria papelera entre otras.

Stefess y col. <sup>[41]</sup> estudiaron la medición cuantitativa del azufre formado por cultivos continuos de *Thiobacillus sp.* autotrófico en estado continuo y en estado transitorio. Para la formación de azufre por el quimolitotrófico *Thiobacillus o* y *Thiobacillus neapolitanus* fueron estudiados en condiciones aerobias, limitando el sustrato en cultivos continuos. Realizaron la comparación de la participación de cultivos transitorios y en estado continuo usando diferentes métodos de medición



para el azufre producido. Bajo una tasa de dilución ( $D$ ) de  $0.3 \text{ h}^{-1}$  (con 50 % de aire saturado), obtuvieron en estado continuo sulfato y crecimientos de los cultivos con sulfuro o tiosulfato (con  $D = 0.06 \text{ h}^{-1}$ ) el azufre elemental se produce mejor sobre una  $D = 0.3 \text{ h}^{-1}$ , pero los estados continuos son difíciles de realizar por la adherencia del azufre al fermentador y por la acumulación de sulfuro. Estos problemas pudieron ser evitados usando estados transitorios. Encontraron azufre elemental bajo condiciones de oxígeno limitado y una alta carga de sustrato. Determinaron que el sulfuro y tiosulfato pueden ser sustratos equivalentes para el *Thiobacillus sp.* durante la formación del azufre bajo las condiciones dichas.

Visser <sup>[44]</sup> realizó experimentos en estado transitorio con *Thiobacillus sp.* autotrófico produciendo azufre de manera independiente a la tasa de crecimiento. Demostraron la formación de azufre cuando se acerca la máxima capacidad oxidativa del cultivo. Realizaron mediciones del grado de reducción del depósito del citocromo tal como función del incremento de sulfuro sugiriendo una relación redox de baja regulación de la tasa de oxidación de azufre. De los diferentes mecanismos significativos en producción de azufre obtuvieron alta producción de azufre con *Thiobacillus sp.* W5 y moderada producción de azufre con *T. neapolitanus sp.* La limitada capacidad de oxidación de sulfuro del *T. neapolitanus* mostraron que puede convertir solo el 50 % del sulfuro alimentado a azufre elemental.

Velasco <sup>[42]</sup> realizó el estudio de un bioreactor con una sección de sedimentación para llevar a cabo la oxidación parcial del tiosulfato a azufre elemental y que este último sedimentara, el diseño del sistema consta de dos recipientes uno el bioreactor con una zona de flujo dinámico y otra zona estática el otro recipiente es

el de aireación. Para realizar el trabajo utilizaron un consorcio sulfoxidante compuesto principalmente por *Thiobacilli* que usa al tiosulfato como fuente de energía, descrito por Alcántara, <sup>[3]</sup> con condiciones de operación durante el proceso de pH de 5.0 y 30 °C de temperatura. Durante la investigación en el sistema en estado continuo se establecieron diferentes relaciones molares de  $O_2/S_2O_3^{2-}$ . En relaciones molares cercanas a 1 fue cuando observaron la formación de azufre elemental obteniendo una máxima formación del 60 % de azufre a una relación molar de 0.98 y un tiempo de retención hidráulica (HRT) de 2 min, el azufre sedimentado era removido a diario obteniendo una recuperación eficiente del 70 %, el sedimento consistía de un 90 % de azufre y un 6 % de biomasa.

Alcántara <sup>[1]</sup> estudió la formación de azufre elemental con limitaciones de oxígeno y la eliminación de fenoles a través de sulfuro de hidrógeno en un bioreactor con recirculación. La relación de oxígeno y el sulfuro se determinó calculando la tasa de carga  $O_2/S^{-2}$  ( $QO_2/QS^{-2} = R_{mt}$ ) la cual define adecuadamente las condiciones de operación para controlar la oxidación del sulfuro. La producción de azufre en estado continuo fue realizado en el rango de  $R_{mt}$  de 0.5 a 1.5 obteniendo la máxima formación de azufre elemental en una  $R_{mt}$  de 0.5 donde el 85 % del total de azufre alimentado al bioreactor como sulfuro es transformado a azufre y el 92 % es recuperado del fondo del bioreactor. En el estudio de los efectos de compuestos fenólicos en el consorcio autotrófico sulfoxidante en un bioreactor de tanque agitado a una tasa de dilución de  $1 d^{-1}$ , una carga de sulfuro de  $2 gL^{-1}d^{-1}$  y un  $R_{mt}$  de 2, se obtiene una completa oxidación del sulfuro a sulfato en relaciones de 1.5 a 2. El fenol, o-, m-, y p-cresol son manejados a varias tasas de carga

orgánica. Bajo estas condiciones de estudio, el sulfuro es completamente oxidado a sulfato, igual cuando una mezcla de compuestos fenólicos se encuentra presente en el medio.

Christian Plas <sup>[27]</sup> estudió la oxidación química y biológica del sulfuro en un rango de pH de 1 a 9, esta investigación fue realizada por medio de respirometría utilizando medio mineral el cual constó de:  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ( $1.5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{K}_2\text{HPO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $7.9 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{MgCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$  ( $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$  ( $0.055 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  ( $0.8 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y el pH es ajustado a 7.2 por medio de NaOH (1 M). Los resultados que obtuvieron presentan un pH óptimo de oxidación biológica con un valor de 7. Y observaron que la tasa de oxidación química del sulfuro ascendió con los incrementos del pH. Y dados estos resultados concluyeron que el cultivo investigado (*Thiobacillus sp.* separador y un heterotrófico contaminante), muestra pequeñas tolerancias a las condiciones alcalinas.

Alcántara <sup>[2, 3]</sup> estudió un consorcio sulfoxidante el cual pudiera ser aplicado en la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre, teniendo como resultados que el cultivo del consorcio debe tener las siguientes condiciones: un pH de entre 5.5 a 7, una temperatura de 30 °C, el consorcio requiere de una concentración mínima de 0.2 mg/L de oxígeno disuelto para poder llevar a cabo la oxidación completa del tiosulfato a sulfato. Dados los experimentos realizados estimó una tasa de dilución crítica para el consorcio cercana a  $3.4 \text{ d}^{-1}$  con concentraciones superiores a 0.4 g/L de oxígeno disuelto, donde el consorcio oxida completamente el tiosulfato a sulfato. Evaluaron el efecto que tienen algunos inhibidores de la cadena respiratoria en el consorcio y, dadas las

características de crecimiento, proponen que la ruta de oxidación más representativa para el consorcio es el sistema multienzimático de oxidación de tiosulfato.

Velasco, <sup>[43]</sup> empleando el mismo consorcio que Alcántara, <sup>[2]</sup> desarrolló su trabajo con un sistema continuo con recirculación, y con este sistema pudo maximizar la producción y recuperación de azufre elemental por medio de un módulo de aireación, que está separado del reactor y logró mantener condiciones de limitación de oxígeno y minimizar la turbulencia en el reactor. Separó el reactor en dos zonas para minimizar la turbulencia aun más. Esta configuración del sistema experimental permitió ajustar la relación molar por cargas de tiosulfato y oxígeno y aproximarla a la relación estequiométrica de 0.5, que favorece la formación del  $S^0$ . Además, debido a su escasa turbulencia se reportó la recuperación de  $S^0$  por sedimentación.

González, <sup>[12]</sup> usando el sistema sulfoxidante que Velasco <sup>[43]</sup> reportó, demostró que la oxidación biológica del  $S_2O_3^{2-}$  a  $S^0$  se favorece manteniendo condiciones microaerobias (oxígeno disuelto < 0.1 mg/L) en el sistema. El consorcio trabajando bajo estas condiciones, posee una  $\mu_{m\acute{a}x}$  cercana a  $0.8\text{ d}^{-1}$  que es baja comparada con la reportada para este mismo consorcio bajo condiciones de exceso de oxígeno disuelto. Para incrementar las tasas de remoción de  $S_2O_3^{2-}$  en estas condiciones, sugiere el uso de soportes para fijar la biomasa. Mostró que el monitoreo del potencial de oxido-reducción, puede ser una herramienta útil en el conocimiento del estado del sistema, debido a que se encontró una correlación entre las concentraciones de  $S_2O_3^{2-}$ , el oxígeno

disuelto y el pH, con el potencial de oxido-reducción.

Medina Díaz <sup>[23]</sup> operó un bioreactor empacado para el tratamiento biológico de los compuestos reducidos de azufre transformándolos en compuestos más estables como el sulfato. Utilizó como modelo de estudio el tiosulfato de sodio y en dicho trabajo realizó la comparación y caracterización de distintos tipos de soportes (bagazo de caña, espuma de poliuretano, roca tezontle y anillos de cerámica) encontrando que la roca tezontle es el mejor soporte dado que presenta una actividad específica de 10.51  $\mu\text{g O}_2/\text{mg proteína}\cdot\text{min}$ , el doble de células que presentaron la espuma de poliuretano y los anillos cerámicos y seis veces mayor que el bagazo de caña. Con el reactor empacado con roca tezontle, obtuvo una oxidación completa del tiosulfato a sulfato con una tasa de dilución menor o igual a  $6\text{ d}^{-1}$  y un tiempo de residencia de 4 horas.

## 1.7 OXIDACIÓN DE COMPUESTOS REDUCIDOS DEL AZUFRE EN CONDICIONES ALCALINAS

Sorokin <sup>[29, 31, 32, 33, 35, 38]</sup> aisló varias bacterias quimiolitotóxicas a partir de lagos carbonatados (pH alcalino y altas concentraciones de  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ ) de Siberia, Mongolia, Kenya, y Estados Unidos; usando un procedimiento de enriquecimiento específico a pH 10.

El grupo de trabajo de Sorokin ha aislado y purificado enzimas involucradas en la oxidación de  $\text{HS}^-$ . <sup>[39, 40]</sup> Así mismo han estudiado la capacidad de *Thioalkalivibrio denitrificans* de crecer aneróticamente en condiciones de desnitrificación, <sup>[30]</sup> otras tres cepas fueron estudiadas por su capacidad de utilizar al tiocianato

(SCN<sup>-</sup>)<sup>[34]</sup> y otro microorganismo fue estudiado por su capacidad de obtener la energía de crecimiento a partir de la oxidación de hidrógeno y/o compuestos reducidos de azufre.<sup>[37]</sup>

Actualmente, se estudia la capacidad de la cepa *Thioalkalivibrio versutus* de oxidar H<sub>2</sub>S en condiciones haloalcalófilas, por su alto potencial para aplicarse en un proceso biotecnológico de remoción de HS<sup>-</sup> en corrientes gaseosas.<sup>[4, 5]</sup>

Entre las bacterias alcalófilas sulfoxidantes reportadas, las cepas del género *Thioalkalimicrobium* son adecuadas para aplicarse en el tratamiento de sosas gastadas diluidas o gases contaminados por H<sub>2</sub>S (biogas, gas natural) que son pobres en CO<sub>2</sub>, mientras que las cepas de *Thioalkalivibrio* son adecuadas para el tratamiento de sosa gastada concentrada y gases que contienen CO<sub>2</sub>. Se pueden usar mezclas de *Thioalkalimicrobium* y *Thioalkalivibrio* para el tratamiento de corrientes variables de H<sub>2</sub>S.

Espinosa Márquez,<sup>[11]</sup> realizó el estudio de dos consorcios a partir de muestras provenientes de distintos suelos alcalinos de México, obteniendo los consorcios (C1 y C2) que contienen bacterias alcalófilas sulfoxidantes. Los cuales, utilizaron como fuente de energía al tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup>) y como fuente de carbono al CO<sub>2</sub>, por lo que, se consideran microorganismos quimiolitótrofos sulfoxidantes. La tasa de oxidación qO<sub>2máx</sub> en mmoles O<sub>2</sub>/g proteína\*min HS<sup>-</sup> de (0.59) fue 2.4 veces mayor que la del S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup> el cual fue de (0.24) y tuvo una constante afinidad por el sustrato con una K<sub>s</sub> de 0.037 mmoles para el HS<sup>-</sup> y de 0.01 mmoles para el S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup>. La velocidad específica de crecimiento (μ) durante el cultivo por lote se estimó de 0.076 h<sup>-1</sup>. El intervalo de pH óptimo tanto para el crecimiento como para la sulfoxidación, se encuentra entre los valores de 9.5 y 10.0. Cuando se limitó la

cantidad de oxígeno, la formación de azufre elemental aumentó. El consorcio C1 en cultivo continuo oxidó el 100% del  $S_2O_3^{2-}$  alimentado a sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) durante el estado estacionario y se estimó un rendimiento celular ( $Y_{X/S}$ ) de 2 g proteína/mol  $S_2O_3^{2-}$ . Aisló las cepas AA y AB a partir del consorcio C1, ambas son Gram negativas y tienen la capacidad de oxidar  $S_2O_3^{2-}$  a  $SO_4^{2-}$ . El aislado AB fue identificado como *Thioalcalovibrio nitratis* (98.7% de homología) y el AA no pudo ser identificada. La velocidad específica de crecimiento durante el cultivo por lotes lo estimó para AA de  $0.035\text{ h}^{-1}$  y para AB de  $0.074\text{ h}^{-1}$ .

## **2. HIPÓTESIS.**

Es posible oxidar los compuestos reducidos de azufre como el tiosulfato de sodio en condiciones de pH 10 empleando microorganismos sulfoxidantes como biocatalizadores y utilizando bioreactores en cultivo continuo.



### **3. OBJETIVOS.**

#### **3.1. OBJETIVO GENERAL.**

Determinar las condiciones de un sistema continuo para poder llevar a cabo la oxidación de compuestos reducidos de azufre en condiciones de alta alcalinidad.

#### **3.2. OBJETIVOS PARTICULARES.**

1. Estudiar la oxidación química y biológica del sulfuro y del tiosulfato en una solución amortiguadora de carbonatos en un sistema aerobio de pH 10.
2. Caracterizar y operar bioreactores utilizando un catalizador biológico en condiciones alcalinas.
3. Operar y comparar los sistemas implementados.
4. Evaluar el efecto de una alcohol-amina en el crecimiento del biocatalizador y la oxidación de compuestos reducidos de azufre.

## 4. MATERIAL Y MÉTODOS.

### 4.1. Biocatalizador.

El biocatalizador alcalófilo sulfoxidante a utilizar para el trabajo experimental es un consorcio de microorganismos sulfoxidantes alcalófilos empleados para llevar a cabo la oxidación de compuestos reducidos de azufre.

### 4.2. Medio mineral.

El medio mineral cuenta con tiosulfato de sodio el cual actúa como fuente de alimentación para el desarrollo y subsistencia de los microorganismos este medio mineral será la fuente de alimentación para los sistemas a estudiar y cuenta con los siguientes componentes:

COMPUESTO	CANTIDAD (g/L)
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	14
Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O	10
NaHCO <sub>3</sub>	9
NaCl	5
KNO <sub>3</sub>	0.5
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
Elementos Traza	2 (mL/L)
MgCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.2

### 4.3. Características de los bioreactores empleados.

Se implementarán tres bioreactores en los cuales el biocatalizador y medio mineral serán los mismos pero se diferenciarán en sus características físicas y de control. En los tres sistemas el control de temperatura y pH se realizará a través del empleo de un biocontrolador Applikon ADI 1030.

El primer bioreactor será un tanque vertical con agitación continua el cual contará con las siguientes características: Una capacidad de volumen de 3 litros se mantendrá cerrado herméticamente, con un pH de 10 y una temperatura de 30 °C y contará con aireación suministrada por bombas de aire.

El segundo y tercer bioreactor serán dos tanques verticales cilíndricos con fondo cónico, uno con una capacidad de 1.55 L y el otro con una capacidad de 1.63 L, los cuales serán los tanques de reacción en ambos sistemas y se les adaptarán los sensores de pH y de redox. Estos sistemas contarán con otro tanque que será el de aireación con una capacidad de 0.5 L de esta manera se tendrá para el segundo bioreactor un volumen total de 2.05 litros y para el tercer bioreactor un volumen total de 2.13 litros.

#### **4.4. Equipos a utilizar en el control de variables.**

##### **4.4.1. Biocontrolador ADI 1030.**

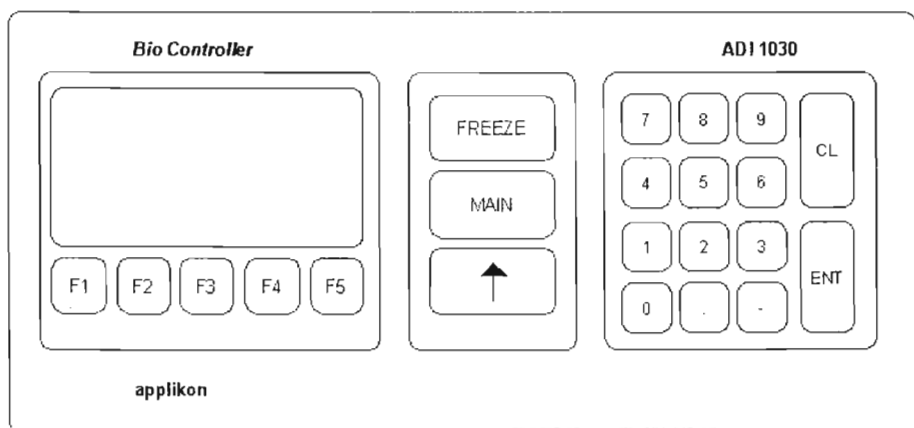
Este equipo se empleará para llevar a cabo el control de la temperatura y del pH durante la operación de los sistemas. En el caso del sistema de tanque agitado se controlará su temperatura a 30 °C y su pH a 10. En los dos sistemas con recirculación a través de este equipo se controlará sólo su pH a 10 ya que se operarán a temperatura ambiente.

A continuación se presenta la descripción y operación del biocontrolador ADI 1030.

El biocontrolador ADI 1030 es un equipo de control del proceso, capaz de medir y controlar hasta cuatro parámetros a la vez. El equipo de control contiene un

microprocesador de 8-bits, con soportes lógicos flexibles inalterables que pueden controlar hasta cuatro parámetros a once salidas (nueve salidas digitales y dos analógicas).

La interfase física, como se ve en la Figura 6, consiste en una presentación alfa numérica de (4 líneas, 40 caracteres cada uno) y un teclado, dividido en 3 porciones (teclas de función, teclas especiales y teclas numéricas).



**Figura 6. Interfase física del biocontrolador.**

Las teclas función permiten la programación y la operación del controlador.

Las teclas numéricas permiten incorporar valores numéricos.

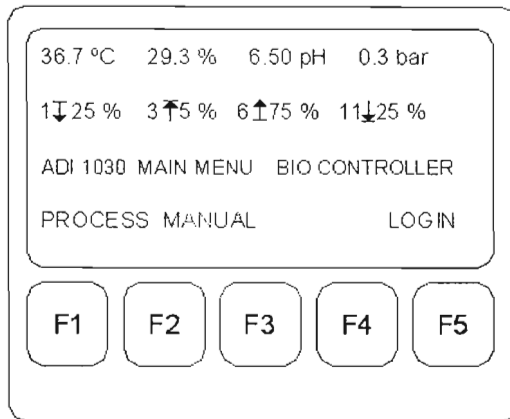
Las teclas especiales son:

**FREEZE** utilizado en caso de que un sensor no funcione de manera correcta o se presente alguna emergencia.

**MAIN** con la cual se regresa al menú principal.

↑ (**nivel anterior**), con la cual se regresa al menú anterior.

La pantalla del ADI 1030 consiste de cuatro líneas (como se demuestra en la figura 7):



**Figura 7. Exhibición del ADI 1030.**

La línea 1 muestra las "variables medidas en el proceso", estas son cuatro como máximo.

La línea 2 muestra para cada variable medida la siguiente información:

- el número de la salida del controlador.
- la tendencia del valor de proceso (debajo o arriba del punto de control, cerca del punto de control o lejos del punto de control):

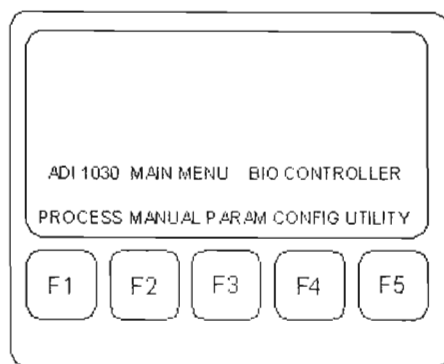


- el valor de la salida de controlador en (%).

La línea 3 muestra el menú de los soportes lógicos inalterables.

La línea 4 muestra las operaciones de las teclas de función las cuales son de F1 a F5 (estas operaciones dependen de las FUNCIONES disponibles del MENÚ).

El menú principal presenta cinco menús accesibles *PROCESS*, *MANUAL*, *PARAM*, *CONFIG*, *UTILITY* como se aprecia en la figura 8:



**Figura 8. Menús principales del biocontrolador.**

El menú **PROCESS** (accesible para las acciones del operador) se utiliza para manipular los lazos de control (inicio, paro, memoria y cambio de punto de control) y para exhibir la información relevante.

El menú **MANUAL** (accesible para las acciones del operador) se utiliza para:

- Calibrar las señales del sensor (pH, temperatura, CO<sub>2</sub>),
- Reiniciar los valores de dosificación al monitor,
- Manipular las salidas que se presentan como TIMER (control de tiempo) automático o en modo MANUAL,
- Acción manual de impresión.

El menú **PARAM** (no accesible para las acciones del operador, requiere de un código de password) y se utiliza para especificar los parámetros de "entrada" y de "control" que se requieren para el equipo de control del proceso.

El menú **CONFIG** (no accesible para las acciones del operador, también requiere el código de password) y se utiliza para especificar:

- La disposición (asignación de la salida a los lazos de control, a las alarmas, a los contadores de tiempo, a los registradores y a las acciones manuales),

- Los ajustes seriales de la comunicación (selección de computadora / impresión, tipo de interfase y datos formato/valor),
- La dosis MN (monitor de dosis) factor y asignación.

El menú **CONFIG** contiene una opción de presentación que se puede utilizar para verificar la definición del sistema real.

El menú **UTILITY** (no accesible para las acciones del operador, también requiere el código de password) y se utiliza en funciones adicionales como: sistema de apoyo al código de hora, de fecha y del código de password, verifica la información como: componentes de la versión de los soportes lógicos inalterables, la memoria de prueba y el canal serial y los parámetros de reajuste o el sistema completo.

El menú **UTILITY** también se utiliza para el registro del estado de la máquina; consecuentemente, la configuración y los ajustes del parámetro son asegurados contra cambios por personal sin capacitación y sin autorización.

#### **4.4.2. Analizador capilar de iones (Waters).**

Este equipo se emplea para el análisis y determinación de iones  $\text{SO}_4^{-2}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ , por medio de electroforesis capilar.

Las concentraciones de iones sulfato ( $\text{SO}_4^{-2}$ ) y tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ ), se analizan por medio del analizador capilar de iones (Waters), utilizando las condiciones para el análisis general de aniones, que a continuación se presentan:

- Columna de sílice fundida de 60 cm de largo X 70  $\mu\text{m}$  de diámetro interno.

- Temperatura de la columna: 25 °C.
- Suministro de energía: negativa, con un voltaje de 15 kV.
- Corriente de 18 a 20 ( $\mu$ A).
- Lámpara de mercurio, UV a 154 nm.
- Modo de inyección: hidrostática a 10 cm. de altura por 30 segundos.

Para la operación de este equipo se debe contar con una solución de electrolito para la calibración y el funcionamiento adecuado del equipo.

**Preparación de la solución de electrolito:** En un matraz volumétrico de 100 mL, adicionar 2.3 mL de la solución de CIA-Pak OFM anion-BT (Waters), 4.6 mL de la solución de cromato de sodio 4.6 mM, aforar con agua desionizada a 100 mL. Mezclar y filtrar en membrana de 0.45 micras antes de su uso. También en lugar de la solución mencionada se puede utilizar el electrolito del distribuidor comercial High mobility electrolite.

#### **4.4.3. Cromatógrafo de gases.**

Este equipo se empleará para el análisis y medición del alcohol-amina por conducción térmica en una columna capilar de 53 m, a una temperatura de 250 °C en el horno, en el detector y en el inyector, el volumen de muestra del bioreactor en fase líquida es de 1 mL y el volumen de inyección es de 1  $\mu$ L. Su forma de operación es la siguiente:

1. Abrir la válvula de aire a 6 psia.
2. Encender el cromatógrafo.
3. Abrir las válvulas de H<sub>2</sub> y He.



4. Esperar a que realice su chequeo, hasta que aparece en el cromatógrafo  
POWER ON RESTART.
5. Cargar el programa (Instrument 1 on line) en la computadora.
6. Cargar el método en este caso es Amina.M
7. Cargar la secuencia con las muestras a analizar tanto en el programa como en el equipo.
8. Después de que dé un flamazo verificar que estén estables los flujos de H<sub>2</sub> y aire a 30 y 300 mL/min respectivamente.
9. Iniciar el análisis automáticamente.

#### **4.5. MÉTODOS ANALÍTICOS.**

##### **4.5.1. Determinación de sulfatos por turbidimetría.**

El ion sulfato con HCl y cloruro de bario, forma cristales uniformes de sulfato de bario. La absorbancia de la solución estándar se mide por nefelometría y la concentración del ion sulfato se determina por comparación de la lectura con una curva estándar.

Reactivos:

- Mezcla de reacción: Mezclar 30 mL de HCl concentrado, con 300 mL de H<sub>2</sub>O destilada, 100 mL de alcohol isopropílico o etílico al 95 % y 75 g de NaCl. Posteriormente se mezclan con 50 mL de glicerol.
- Cloruro de bario: cristales de tamaño de malla 20 o 30.

- Solución estándar de sulfato: Se disuelven 147.9 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro en 1,000 mL de  $\text{H}_2\text{O}$ . Se hace una curva estándar o de calibración con incrementos de concentración de 5 mg/L en un rango de 0-40 mg/L, alrededor de 40 mg/L la exactitud del método decrece y la suspensión de  $\text{BaSO}_4$  pierde estabilidad.

Procedimiento:

1. Colocar 99 mL de  $\text{H}_2\text{O}$  en un matraz erlenmeyer de 250 mL.
2. Adicionar 1 mL de muestra.
3. Agregar 5 mL de mezcla de reacción.
4. Agitar durante minuto y medio.
5. Adicionar 1 g de cristales de  $\text{BaCl}_2$ .
6. Agitar por un minuto exactamente a una velocidad constante.
7. Medir la absorbancia a 420 nm. Medir la turbidez generada a intervalos de 30 segundos durante 4 minutos porque el máximo de turbidez ocurre durante los 2 primeros minutos y la lectura constante de 3 a 10 minutos.

#### **4.5.2. Determinación de iones $\text{SO}_4^{-2}$ , $\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$ , por electroforesis capilar.**

Como se vio en la descripción del analizador capilar de iones (Waters). Este se emplea para el análisis de los iones sulfato y tiosulfato de una manera automática.

Procedimiento.

1. Centrifugar las muestras en viales Eppendorf a 1200 rpm durante 10 minutos.
2. Filtrar el sobrenadante en membranas de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45  $\mu\text{m}$  de tamaño de poro.

3. El filtrado se coloca en los viales Eppendorf del equipo.
4. El análisis se lleva a cabo de forma automática.

#### **4.5.3. Determinación de proteína por el método de Lowry.**

Esta técnica se emplea para conocer la cantidad de biomasa que se encuentra en los sistemas a estudiar. Se analiza por la absorbancia y la concentración de biomasa se determina por comparación de la lectura con una curva estándar de solución de albúmina bovina en concentraciones de 50 a 250  $\mu\text{g/mL}$ .

Reactivos:

- Reactivo A: Sulfato de cobre pentahidratado al 1 % en agua.
- Reactivo B: Tartrato doble de sodio y potasio al 2 %.
- Reactivo C: Carbonato de sodio al 2 % en hidróxido de sodio 0.1 N.
- Reactivo D: 1A + 1B preparar cuando se va a utilizar.
- Reactivo E: 1D + 50C preparar cuando se va a utilizar.
- Reactivo Folin: Solución folin 1:1 con agua se prepara cuando se va a utilizar.

Procedimiento.

1. Centrifugar 1 mL de la alícuota a 10,000 rpm durante 10 minutos.
2. Eliminar el sobrenadante y agregar 1 mL de NaOH 1 N agitar y colocar en un tubo de ensaye (18 x 150).
3. Colocar las muestras en baño María de 5 a 10 minutos.
4. Colocar las muestras en el refrigerador.
5. Agregar 5 mL de reactivo E y agitar vigorosamente.

6. Reposar cada tubo durante 10 minutos.
7. Agregar 0.5 mL de reactivo de Folin y agitar.
8. Reposar las muestras en la oscuridad durante 30 min.
9. Leer la absorbancia a 590 nm.

#### **4.5.4. Respirimetría.**

Se basa en la medición del consumo de oxígeno como una medida indirecta de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre en presencia del biocatalizador empleado. El oxígeno se mide utilizando un oxímetro YSI modelo 5300. El procedimiento es el siguiente:

- a. En un matraz se airea la solución buffer o amortiguadora de fosfatos a pH de 10 por aproximadamente 30 minutos. Esto con el propósito de saturarlo de oxígeno.
- b. Se calibra el equipo y en frascos con una capacidad cada uno de 1500  $\mu\text{L}$ , se colocan 1300  $\mu\text{L}$  de buffer, más 100  $\mu\text{L}$  de cada sustrato a evaluar, y 100  $\mu\text{L}$  de células suspendidas en solución salina al 0.85 %.
- c. Se mantiene el frasco en agitación, a temperatura de 30 °C y un pH de 10.
- d. Se mide el consumo de oxígeno contra el tiempo.
- e. Se calcula la tasa de consumo de oxígeno ( $\text{mg O}_2/\text{min}$ ) por medio de la pendiente del consumo respecto al tiempo.
- f. Finalmente se calculan las velocidades de oxidación de los sustratos ( $\text{mg de tiosulfato/g proteína}\cdot\text{min}$ ) de acuerdo a la estequiometría global de la reacción de oxidación de los compuestos reducidos de azufre considerando la biomasa y la corrección para la respiración endógena. Esta última se

calcula midiendo el consumo de oxígeno sin sustrato, es decir al medio mineral con células sin fuente de alimentación (tiosulfato) se mide el consumo de oxígeno con respecto al tiempo.

#### **4.5.5. Determinación del 2-metilaminoetanol.**

A un bioreactor se le administrará medio mineral con una concentración de 10 mM de 2-metilaminoetanol con el fin de observar el comportamiento del sistema. Para determinar la concentración del alcohol-amina tanto en la alimentación como en la salida del bioreactor se empleará el cromatógrafo de gases antes descrito.

Para este análisis las concentraciones en las muestras serán comparadas con las de una curva patrón la cual estará formada por concentraciones de 10, 30, 50, 70 y 100 mM.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Oxidación química.

#### 5.1.1 Oxidación química del tiosulfato.

Por pruebas de respirometría se determinó la velocidad de oxidación química del tiosulfato. Los resultados se presentan en la Figura 9.

Se observa que la velocidad de oxidación química del tiosulfato es de alrededor de 0.0077 mg O<sub>2</sub>/min a una concentración de 0.1 mM. Por medio de la reacción de oxidación total de tiosulfato  $S_2O_3^{-2} + 2O_2 + H_2O \rightarrow 2SO_4^{-2} + 2H^+$  se determinó la conversión de tiosulfato a sulfato teniendo una cantidad de 0.006 mg de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>-2</sup> y de 0.348 mg de O<sub>2</sub> en un volumen de 0.06 L de medio mineral con pH 10, se obtuvo una conversión de 0.0192 mg de SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>, suponiendo una oxidación completa del compuesto. Esto representa el 100 % de tiosulfato oxidado. De acuerdo a estos resultados, se puede afirmar que el tiosulfato es estable no presentando variaciones en presencia de oxígeno aún en bajas concentraciones y en valores de pH alcalinos (pH 10). En un trabajo reportado por Velasco,<sup>[43]</sup> se encontró que el tiosulfato es un compuesto estable, también en condiciones neutras.

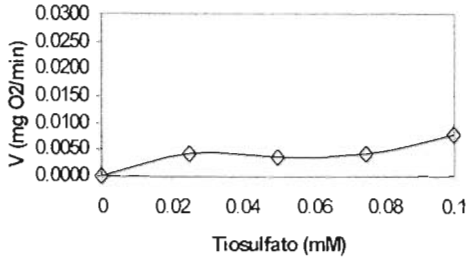


Figura 9. Velocidad de oxidación química del tiosulfato.

### 5.1.2 Oxidación química del sulfuro.

La oxidación química del sulfuro se determinó por respirometría a las mismas condiciones que para el tiosulfato. Los resultados se presentan en la Figura 10. Se observa que tiene un comportamiento en tres fases, a un intervalo de concentración de 0.1 mM a 0.4 mM se tiene la primera fase, donde los incrementos en la velocidad de oxidación muestran una tendencia lineal teniendo una velocidad máxima de 0.61 mg O<sub>2</sub>/min, después al incrementar la concentración del sulfuro la velocidad de oxidación aumenta formando la segunda fase de 0.5 mM a 1.5 mM intervalo en el cual la velocidad de oxidación se mantiene prácticamente constante a 1.17 mg O<sub>2</sub>/min, la tercera fase esta formada por concentraciones de sulfuro en un intervalo de 2 mM a 3 mM presentando velocidades de oxidación constantes a 1.58 mg O<sub>2</sub>/min. La velocidad de oxidación por O<sub>2</sub> resultó significativamente mayor a la representada por el tiosulfato, teniendo una velocidad máxima de 1.58 mg O<sub>2</sub>/min con una concentración de 3 mM de sulfuro. Los resultados reportados por Plas <sup>[27]</sup> señalan una alta demanda de oxígeno por parte del sulfuro a 30 °C y a un pH de 7.

Esto demuestra la inestabilidad del compuesto en presencia del oxígeno, es decir, que el sulfuro tiene una alta demanda de oxígeno lo que explica parte de la toxicidad del compuesto y la necesidad de evitar su descarga en mantos acuíferos.

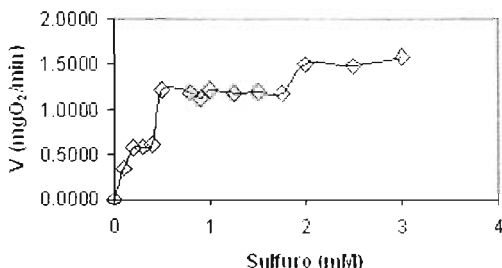


Figura 10. Velocidad de oxidación química del sulfuro

## 5.2 Oxidación biológica de sulfuro y tiosulfato. Estudios de respirometría.

### 5.2.1 Biocatalizador.

Como se mencionó en la introducción, en la naturaleza existen microorganismos que oxidan compuestos reducidos de azufre en condiciones tanto ácidas, como neutras y alcalinas. Para el desarrollo de este trabajo, el grupo de laboratorio aisló de suelos alcalinos de zonas áridas diferentes microorganismos con capacidad sulfoxidante en condiciones de alta alcalinidad.

Se utilizó en el desarrollo experimental de este trabajo un consorcio de microorganismos que son bacterias Gram-negativas y oxidan al sulfuro y al tiosulfato para obtener su energía de crecimiento.

Al consorcio se le denominó "biocatalizador".



### 5.2.2. Oxidación biológica del tiosulfato.

Con el fin de determinar los parámetros cinéticos de oxidación del tiosulfato por el biocatalizador, se determinó la velocidad de oxidación del sustrato (tiosulfato) por respirometría. La Figura 11 muestra el efecto del biocatalizador en distintas concentraciones de tiosulfato. Teniendo una  $V$  máxima de oxidación de 15.58 mg  $O_2/g$  proteína·min, mientras la concentración de sustrato ( $K_M$ ) fue de 0.21 mM.

La concentración de tiosulfato que permite una actividad máxima es de 1 mM. No hay efecto tóxico del tiosulfato en el dominio experimental, 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  $V_{m\acute{a}x}$  obtenida es similar a los valores obtenidos por Sorokin y colaboradores <sup>[30]</sup> con el género *Thioalkilivibrio* (17.6 mg  $O_2/g$  proteína·min). Sin embargo, se alejan del género *Thioalkalimicrobium* (120 mg  $O_2/g$  proteína·min).

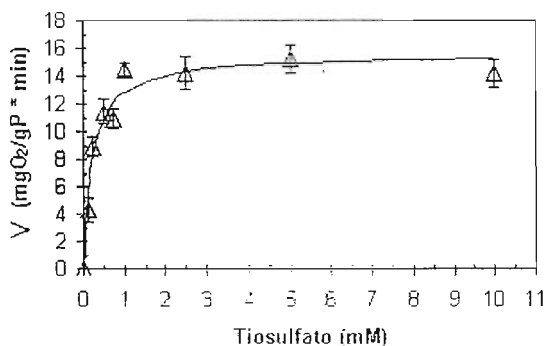


Figura 11. Velocidad de oxidación biológica del tiosulfato.

### 5.2.3. Oxidación biológica del sulfuro.

La velocidad de oxidación del sulfuro por el biocatalizador, se determinó mediante pruebas de respirometría. La Figura 12 muestra el comportamiento del sulfuro para el sistema. Se obtuvo una  $V$  máxima de oxidación de 11.4 mg  $O_2/g$  proteína·min, mientras la constante de saturación del sustrato ( $K_s$ ) fue de 0.4 mM.

La concentración de sulfuro que permite una actividad máxima es de 0.7 mM.

Plas, <sup>[27]</sup> en su trabajo reportaron una máxima actividad biológica a una concentración de 3 mM de sulfuro con un pH 7 y 30 °C y al incrementar la concentración de sulfuro se mostraron efectos tóxicos y un decaimiento en la actividad biológica.

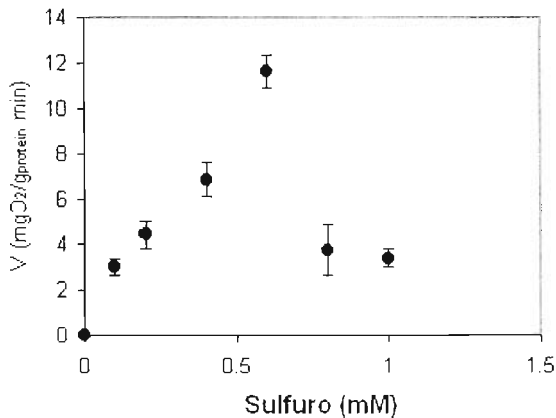


Figura 12. Velocidad de oxidación biológica del sulfuro.

### **5.3 Reactor agitado.**

#### **5.3.1 Arranque del sistema.**

Para el desarrollo de este trabajo se puso en operación un bioreactor con agitación con las siguientes características: 3 L de volumen, con sensores de temperatura y pH, agitación y aireación constante. El volumen de llenado fue del 80%. Y para la posible operación del bioreactor este se inoculó con 5 mL del biocatalizador y se operó el sistema a 30 °C, 400 rpm de agitación y con un pH de 10, tanto el pH como la temperatura fueron controladas por el biocontrolador ADI 1030.

#### **5.3.2. Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento microbiano y la oxidación del tiosulfato.**

Una vez estabilizado el sistema se estudió el efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento y la actividad sulfoxidante del consorcio, los resultados se presentan en la Tabla 5 y la Figura 13.

Se encontró que el consorcio oxida completamente al tiosulfato hasta una tasa de dilución de  $1\text{ d}^{-1}$ , teniendo una carga de sulfato ( $\text{QSO}_4^{2-}$ ) de  $6.7\text{ g/L}\cdot\text{d}$  y una eficiencia de oxidación del 97.7 %.

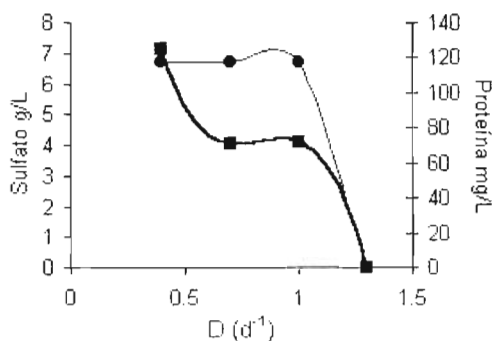
El incremento en la tasa de dilución de  $1\text{ d}^{-1}$  a  $1.3\text{ d}^{-1}$  provocó el lavado del reactor, por lo que la velocidad máxima de crecimiento se encuentra cercana a  $0.054\text{ h}^{-1}$ .

El desarrollo del consorcio presentó una disminución del valor de proteína cuando se incrementó la tasa de dilución (D) de  $0.4\text{ d}^{-1}$  a  $0.7\text{ d}^{-1}$ , pasando de  $125\text{ mg/L}$  a  $71\text{ mg/L}$  respectivamente. Este comportamiento es similar a los reportados por

Alcántara, <sup>[1]</sup> para un consorcio sulfoxidante que crece en valores de pH cercanos a la neutralidad. El rendimiento del consorcio fue de 7 g<sub>biomasa</sub>/mol<sub>tiósulfato</sub>, que es comparable a lo reportado por Sorokin, <sup>[30]</sup> para estos microorganismos sulfoxidantes.

**Tabla 5. Balance del azufre en el cultivo continuo del consorcio sulfoxidante. La concentración de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> utilizada fue de 4.0 g/L.**

D	QS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (e) g/Ld	QS (e) g/Ld	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (s) g/L	QSO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (s) g/Ld	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (s) g/L	QS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> (s) g/Ld	S (s) g/L	QS (s) g/Ld	Proteína mg/Ld
0.4	1.6	0.9	6.7	2.7	0	0	2.22	0.89	125
0.7	2.8	1.6	6.7	4.7	0	0	2.14	1.5	71
1	4.0	2.3	6.7	6.7	0	0	2.0	2.0	72
1.3	5.2	2.9	0	0	4	9.6	4.16	5.41	0



**Figura 13. Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento y producción de sulfato del biocatalizador (■ sulfato, ● proteína).**

## **5.4. Reactor con recirculación.**

### **5.4.1. Descripción del sistema con recirculación.**

Los sistemas de recirculación se han implementado con el fin de favorecer la oxidación parcial de los compuestos reducidos de azufre a azufre elemental estos sistemas cuentan con dos recipientes uno que representa el tanque de reacción y el otro es el tanque de aireación. El tanque de reacción es el recipiente que recibe la alimentación y el flujo de líquido saturado de aire proveniente del tanque de aireación, en el tanque de reacción es donde se realiza la oxidación de los compuestos reducidos de azufre, y en el cual se lleva a cabo la sedimentación del azufre debido a que presenta una zona en la que no hay turbulencia. El tanque de aireación es en el cual el líquido se satura de aire.

### **5.4.2. Tanque de aireación. El oxígeno como una variable controlable.**

En el trabajo realizado en el laboratorio la aireación es suministrada por una bomba de aire y por un difusor manteniendo una cantidad de oxígeno controlada en 0.005 g/L. Este tanque tiene como función la de saturar de aire una determinada cantidad de líquido para posteriormente recircularlo al tanque de reacción y de esta manera permitir la oxidación de los compuestos reducidos de azufre.

### 5.4.3. Relación molar $O_2/S_2O_3^{2-}$

El flujo de líquido que pasa por el tanque de aireación es saturado de oxígeno y recirculado al bioreactor a través de una bomba de velocidad variable, por lo que, pueden tenerse varias cargas de oxígeno ( $Q_{O_2}$ ) al ser diferente el flujo de líquido recirculado ( $F_R$ ) como se describe en la (Ecuación 11).

La (Ecuación 12) muestra la carga de tiosulfato ( $Q_{S_2O_3^{2-}}$ ) en función del flujo de alimentación y el volumen del reactor ( $D, d^{-1}$ ). Consecuentemente en un sistema continuo la relación molar  $O_2/S_2O_3^{2-}$  puede ser teóricamente controlada y así el nivel de oxidación (parcial formando azufre elemental o completa a sulfato) del tiosulfato.

$$Q_{O_2} = \left( \frac{F_R}{V_r} \right) (C_{O_2}) \quad (11)$$

$$Q_{S_2O_3^{2-}} = \left( \frac{F_A}{V_r} \right) (C_{S_2O_3^{2-}}) \quad (12)$$

Donde  $V_r$  es el volumen del reactor,  $C_{O_2}$  es la concentración de oxígeno en el tanque de aireación,  $C_{S_2O_3^{2-}}$  es la concentración de tiosulfato presente en la alimentación,  $F_R$  es el flujo de líquido recirculado al tanque de reacción y  $F_A$  es el flujo de alimentación.

La relación teórica  $O_2/S_2O_3^{2-}$  ( $R_{mt}$ ) se define como:

$$R_{mt} = \frac{Q_{O_2}}{Q_{S_2O_3^{2-}}} = \frac{\left( \frac{F_R}{V_r} \right) (C_{O_2})}{\left( \frac{F_A}{V_r} \right) (C_{S_2O_3^{2-}})} \quad (13)$$

#### **5.4.4. Tanque de reacción y sedimentación.**

En los bioreactores con recirculación el tanque de reacción y sedimentación es donde se mezcla la alimentación fresca con el líquido saturado de oxígeno. Esta mezcla reacciona con el biocatalizador llevando a cabo la oxidación completa del tiosulfato a sulfato y la oxidación parcial del tiosulfato a azufre elemental.

En este tanque regularmente se genera una diferencia de turbulencias de manera que en la parte inferior se obtenga la menor para permitir la sedimentación de azufre.

#### **5.4.5. Descripción de los sistemas estudiados.**

Los sistemas estudiados cuentan con un tanque de reacción y con otro tanque, el de aireación. Estos sistemas se diferencian por el volumen del tanque de reacción ya que el primero es de 1.55 litros y el segundo es de 1.63 litros y el volumen del tanque de aireación es de 0.5 litros, teniendo de esta forma volúmenes totales de 2.05 litros para el primer sistema y 2.13 litros para el segundo sistema, los dos sistemas operan a temperatura ambiente y pH 10. El pH es controlado por el equipo de control ADI 1030 a través de un sensor de pH. Como otra variable de medición se les colocó un sensor para medir su potencial redox por un equipo de ORP.

## 5.4.6. Oxidación completa a sulfato.

### 5.4.6.1. Sistema 1.

Para el arranque de este sistema se le alimentó el medio mineral con tiosulfato descrito en material y métodos y se inoculó con 5 mL de biocatalizador manteniéndose solo con recirculación a través de una bomba (B2) y aireación hasta que se estabilizó el sistema.

Una vez estabilizado el sistema ver Figura 14 se comenzó a alimentar el medio mineral fresco de forma continua al tanque de reacción a través de la bomba (B1) operando diariamente a condiciones de pH 10 y temperatura ambiente.

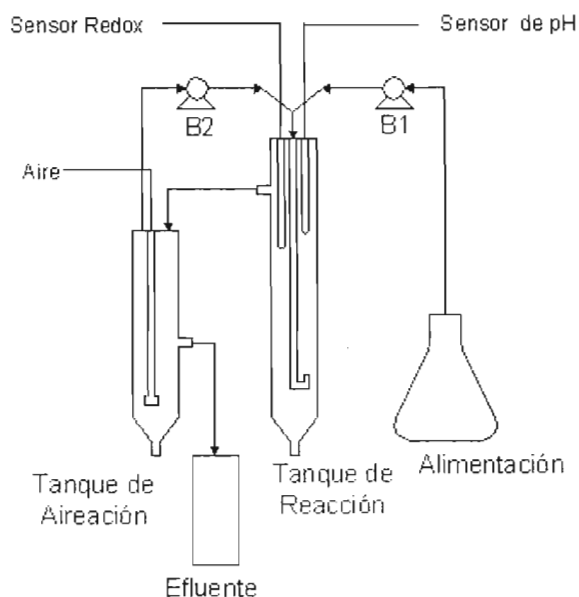


Figura 14. Diagrama del primer sistema con recirculación.



Posteriormente se estudió el efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento y la actividad del biocatalizador, los resultados se presentan en la Tabla 6.

Los resultados muestran que el biocatalizador oxida completamente al tiosulfato en una tasa de dilución de 0.9 d<sup>-1</sup> y una R<sub>mt</sub> de 2, de esta forma se obtiene una carga de sulfato de 6.12 g/Ld teniendo una eficiencia de oxidación del 100%. A esta tasa de dilución se obtuvo un potencial redox de -0.3112 V.

El biocatalizador presente a una tasa de dilución de 0.9 d<sup>-1</sup> y una R<sub>mt</sub> de 2 es de 23.9 mg/L y se observa que al incrementar la tasa de dilución la cantidad de proteína disminuye hasta llegar a 12.9 mg/L a una tasa de dilución de 1.1 d<sup>-1</sup> por lo que se aprecia que a tasas de dilución superiores de 1 d<sup>-1</sup> el sistema comienza a perder proteína y a lavarse el sistema.

**Tabla 6. Balance del azufre en el primer sistema con recirculación. La concentración de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> utilizada fue de 4.0 g/L.**

D	QS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	QS	SO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	QSO <sub>4</sub> <sup>-2</sup>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	QS <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup>	S	QS	Prot	Redox
d <sup>-1</sup>	(e) g/Ld	(e) g/Ld	(s) g/L	(s) g/Ld	(s) g/L	(s) g/Ld	(s) g/L	(s) g/Ld	mg/L	mV
0.6	2.4	1.37	6.8	4.0	0.0	0.0	2.30	1.38	19.9	-314.4
0.7	2.8	1.6	7.0	4.9	0.0	0.0	2.33	1.63	28.9	-311.2
0.9	3.6	2.06	6.8	6.1	0.0	0.0	2.28	2.05	23.9	-289.1
1.1	4.4	2.51	5.4	5.9	0.9	0.99	2.31	2.55	12.9	-268.1

#### 5.4.6.2. Sistema 2.

Este sistema como se observa en la Figura 15, para su puesta en arranque se alimentó con medio mineral rico en tiosulfato, se inoculó con biocatalizador y se mantuvo con recirculación por medio de la bomba (B2) y con aireación.

El bioreactor empezó a operar en estado continuo una vez estabilizado el sistema con mediciones de sulfatos, biomasa y redox a condiciones de operación de pH 10 y temperatura ambiente.

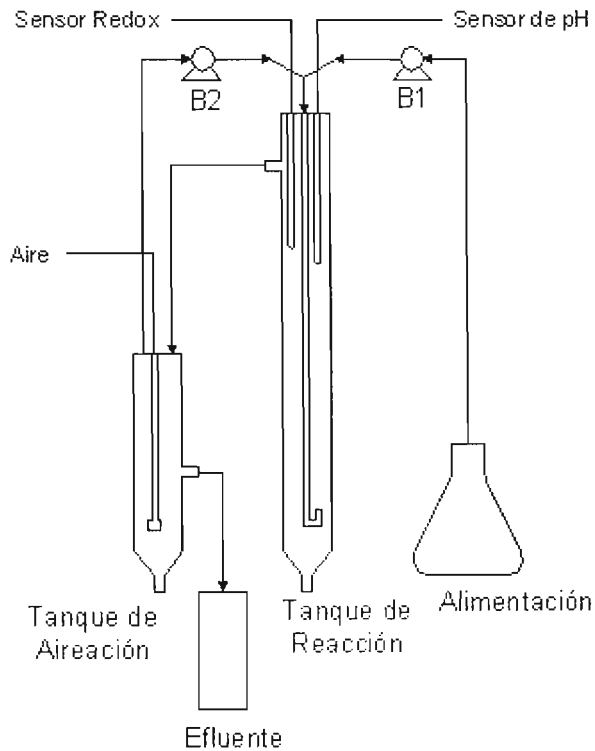


Figura 15. Diagrama del segundo sistema con recirculación.

Una vez en operación se llevó a cabo el estudio del efecto de la tasa de dilución sobre la oxidación del tiosulfato y la actividad del biocatalizador en el sistema, los resultados se presentan en la Tabla 7.

Los resultados muestran que el consorcio sulfoxidante oxida completamente al tiosulfato en una tasa de dilución de  $0.7 \text{ d}^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 2 teniendo una carga de sulfato de  $4.76 \text{ g/Ld}$  con una eficiencia de oxidación del 92 % y un potencial redox de  $-0.2647 \text{ V}$ .

El biocatalizador presente en este sistema fue de  $11.2 \text{ mg/L}$  a una tasa de dilución de  $0.6 \text{ d}^{-1}$  y al aumentar la tasa de dilución aumentó la cantidad de proteína dentro del sistema llegando como máximo a  $21.5 \text{ mg/L}$  y después vuelve a decrecer hasta  $14.3 \text{ mg/L}$  por lo que corroborando los resultados anteriores a una  $D$  mayor a  $1 \text{ d}^{-1}$ , el sistema entra en condiciones de lavado.

**Tabla 7. Balance del azufre en el segundo sistema con recirculación. La concentración de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  utilizada fue de  $4.0 \text{ g/L}$ .**

D	$\text{QS}_2\text{O}_3^{-2}$	QS	$\text{SO}_4^{-2}$	$\text{QSO}_4^{-2}$	$\text{S}_2\text{O}_3^{-2}$	$\text{QS}_2\text{O}_3^{-2}$	S	QS	Prot	Redox
$\text{d}^{-1}$	(e) g/Ld	(e) g/Ld	(s) g/L	(s) g/Ld	(s) g/L	(s) g/Ld	(s) g/L	(s) g/Ld	mg/ L	mV
0.6	2.4	1.37	6.3	3.78	0.0	0.00	2.10	1.26	11.2	-264.7
0.7	2.8	1.6	6.8	4.76	0.0	0.42	2.28	1.59	21.5	-265.5
1.1	4.4	2.51	6.1	6.71	0.5	0.55	2.32	2.55	19.2	-322.0

#### **5.4.7. Formación de azufre elemental.**

Como se esperaba, la disminución de la  $R_{mt}$  permitió favorecer la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Se observó en ambos sistemas que una relación molar teórica oxígeno/sustrato cercano a 0.2 disminuyó la producción de sulfato en los sistemas. Los resultados se presentan a continuación.

##### **5.4.7.1. Sistema 1.**

La cantidad de azufre dentro del primer sistema se mantuvo en suspensión debido a que no se puede formar una diferencia de turbulencias dentro del tanque de reacción debido posiblemente a la altura del mismo. Esto provoca que se presente turbulencia en todo el tanque e impide la sedimentación de azufre elemental. Como se observa en la Tabla 8, a una  $D = 0.6 \text{ d}^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 0.2, se obtiene una cantidad de azufre elemental en suspensión el cual fue obtenido a través de la centrifugación de 1 L de líquido del efluente del sistema, de la pastilla obtenida de esta centrifugación se considera de acuerdo a la literatura, <sup>[42]</sup> que un 90 % es azufre y un 6 % es biomasa. De esta forma se llega a obtener una cantidad máxima de 1.35 g/L de azufre elemental junto con 90 mg/L de biomasa.

##### **5.4.7.2. Sistema 2.**

Este sistema contó con mayor altura en el tanque de reacción y esto permitió crear una diferencia de turbulencias dentro del tanque generando menos turbulencia en la parte inferior permitiendo de esta forma la sedimentación de azufre elemental. La cantidad de azufre obtenida dentro del segundo sistema se muestra en la Tabla 9. En este sistema se obtuvo azufre tanto en sedimentación como en suspensión.

De la muestra total obtenida se considera de acuerdo con la literatura, <sup>[42]</sup> que un 90 % es azufre y un 6 % es biomasa. Por lo que, se obtiene una cantidad máxima de azufre elemental (sedimentado mas suspendido) de 2.4 g/L y una cantidad máxima de biomasa de 125 mg/L dentro del sistema.

**Tabla 8. Azufre elemental y biomasa en el primer sistema con recirculación a una tasa de dilución de  $0.6 \text{ d}^{-1}$  y un  $R_{mt}$  de 2 y 0.2.**

Azufre (g/L)		Biomasa (mg/L)	$R_{mt}$
Sedimentado	En suspensión	Total	
0.0	1.35	90	0.2
0.0	0.0	20	2

**Tabla 9. Azufre elemental y biomasa en el segundo sistema con recirculación a una  $D = 0.9 \text{ d}^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 2 y 0.2.**

Azufre (g/L)		Biomasa (mg/L)	$R_{mt}$
Sedimentado	En suspensión	Total	
2.0	0.44	125	0.2
0.0	0.0	20	2

## 5.5. Efecto del 2-metilaminoetanol.

Se puso en operación el segundo sistema con recirculación con una carga de tiosulfato de 4 g/Ld y una  $R_{mt}$  de 0.2, es decir de oxidación completa a sulfato. Una vez estabilizado el sistema se le adicionó al medio mineral en la alimentación una concentración de 10 mM/L de 2-metilaminoetanol y se puso en operación a temperatura ambiente, pH 10 y una tasa de dilución de  $0.6 \text{ d}^{-1}$ .

El 2-metilaminoetanol es un compuesto que se utiliza como solución de absorción en los procesos de endulzamiento de gas natural, y presenta las siguientes características: <sup>[46, 47]</sup>

- Fórmula  $\text{CH}_3\text{NHCH}_2\text{CH}_2\text{OH}$
- Peso Molecular de 75.11
- Toxicidad oral, rat. LD50: 1390 mg/kg
- Líquido viscoso de color ligeramente amarillento.
- Su punto de ebullición es de 155-156 °C.
- Su punto de ignición es de 349 °C.
- Densidad de 0.94
- Es miscible en agua bajo condiciones normales.

Los resultados mostrados en esta parte del estudio demuestran que en concentraciones muy bajas de 2-metilaminoetanol 10 mM/L afectan al sistema. Como se ve en la Tabla 10 y en la Figura 16 a los pocos días de operación el biocatalizador fue afectado negativamente, disminuyendo la formación de sulfato de 7.9 g/L, condiciones sin la alcohol-amina, a valores de 1.7 g/L con la adición del alcohol-amina.

Tabla 10. Operación del sistema con una concentración 10 mM de 2-metilaminoetanol en condiciones de alta alcalinidad y una  $D = 0.6 \text{ d}^{-1}$ .

DIA	$\text{SO}_4^{2-}$ g/L	Proteína mg/L
0	0.00	0.00
1	7.03	17.02
2	7.87	18.13
3	7.90	11.7
4	6.47	1.94
5	6.28	0.00
6	6.14	0.00
7	3.29	0.00
8	1.72	0.00

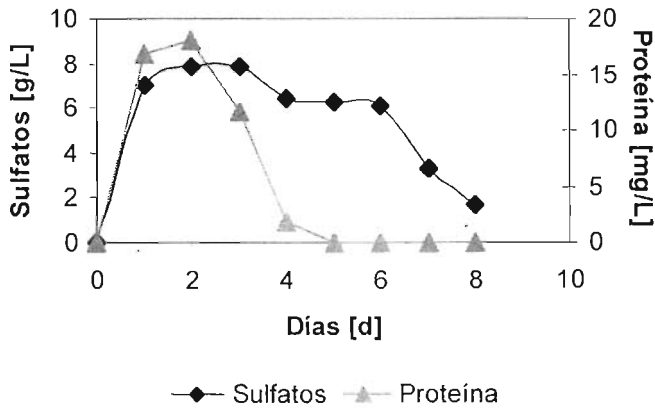


Figura 16. Efecto del 2-metilaminoetanol en un bioreactor con recirculación.

Durante la operación del sistema con la alcohol-amina se analizaron las muestras obtenidas del sistema en el cromatógrafo de gases para su determinación. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

En estos resultados se muestra que la concentración en la alimentación es mucho mayor que el de la salida podría sugerirse que a bajas concentraciones del alcohol-amina reacciona con los compuestos dentro del sistema.

**Tabla 11. Datos del cromatógrafo de gases. Días de la operación del sistema con la alcohol-amina tanto en la alimentación como en la salida.**

<b>DIA</b>	<b>ALIMENTACIÓN</b>	<b>SALIDA</b>
	<b>mM</b>	<b>mM</b>
1	9.8	3.2
2	9.9	4.2



## 6. CONCLUSIONES.

1. La velocidad de oxidación química mostró que el tiosulfato no muestra variaciones en presencia de oxígeno en condiciones alcalinas pH 10 teniendo una  $V_{max}$  de 0.0077 mg  $O_2$ /min. El mismo comportamiento se ha reportado en condiciones de neutralidad.
2. El sulfuro presentó inestabilidad ya que mostró tres fases en su velocidad de oxidación en presencia del oxígeno a un pH 10 siendo la velocidad máxima de oxidación de 1.58 mg  $O_2$ /min.
3. En la oxidación biológica para el tiosulfato se tuvo una  $V_{max}$  de 15.58 mg  $O_2$ /g proteína·min a una concentración de 0.21 mM y para el sulfuro se tuvo una  $V_{max}$  de 11.4 mg  $O_2$ /g proteína·min a una concentración de 0.4 mM. De esta manera se verificó que al utilizar microorganismos, estos aceleran el consumo de oxígeno desarrollando velocidades de oxidación mayores. Debido a la inestabilidad del sulfuro y su difícil manejo se empleó el tiosulfato para realizar el estudio con los sistemas sulfoxidantes.
4. El bioreactor con agitación tuvo una eficiencia del 97.7 % de conversión de tiosulfato a sulfato en las tasas de dilución de 0.4 a 1  $d^{-1}$ . Al incrementar la tasa de dilución a 1.3  $d^{-1}$  el sistema se lavó, encontrándose una velocidad máxima de crecimiento cercana a 0.054  $h^{-1}$ . A una tasa de dilución de 1  $d^{-1}$  se obtiene la mayor carga de sulfato de 6.7 g/Ld con una carga de azufre elemental de 2 g/Ld y 72 mg/L de proteína.
5. Para el primer sistema con recirculación se obtuvo la mayor eficiencia a una tasa de dilución de hasta 0.9  $d^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 2 presentando una oxidación completa a sulfato teniendo una  $QSO_4^{2-}$  de 6.12 g/Ld y 23.9 mg/Ld de

proteína. En este sistema no hubo sedimentación de azufre pero presentó azufre en suspensión de esta manera se encontró una máxima cantidad de 1.35 g/L de azufre junto con 90 mg/L de biomasa a una tasa de dilución de  $0.6 \text{ d}^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 0.2 y se comprueba que a una  $R_{mt}$  alta se lleva a cabo la oxidación completa del tiosulfato formando menor cantidad de azufre elemental.

6. El segundo sistema con recirculación se utilizó para poder llevar a cabo la sedimentación del azufre que no se obtuvo con el sistema anterior obteniendo para este sistema una eficiencia de 92 % de conversión a  $\text{SO}_4^{2-}$  a una tasa de dilución de  $0.7 \text{ d}^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 2 presentando una  $Q_{\text{SO}_4^{2-}}$  de 4.76 g/Ld y 21.5 mg/Ld de proteína. En este sistema se presentó azufre elemental tanto en sedimentación como en suspensión a una tasa de dilución de  $1.2 \text{ d}^{-1}$  y una  $R_{mt}$  de 0.2 teniendo de esta forma una cantidad máxima de 2.44 g/L de azufre elemental y 125 mg/L de biomasa.
7. Para ambos sistemas con recirculación se consideró el potencial redox, el cual fue útil para poder corroborar la similitud tanto de los potenciales obtenidos experimentalmente, en este trabajo, como en los de la reacción teórica en la cual se produce sulfato, obteniendo de esta forma potenciales experimentales de -0.3112 V y de -0.2647 V respectivamente donde el primer sistema es el que presenta una mayor aproximación al valor de la media reacción el cual es de -0.356 V.
8. El compuesto 2-metilaminoetanol resultó tóxico para el biocatalizador, provocando un lavado del sistema aún a bajas concentraciones de la amina. Lo que indica su nivel de toxicidad para sistemas vivos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA.

1. Alcántara S; Velasco A; Muñoz A; Cid J; Revah S; Razo-Flores E. Hydrogen sulfide oxidation by a microbial consortium in a recirculation reactor system: Sulfur formation under oxygen limitation and removal of phenols. *Environmental Sci. Technol* **38**, (2004). 918-923.
2. Alcántara S. 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 de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. (2000). pp. 138.
3. Alcántara S., Estrada I., Vasquez M., Revah S, Carbon disulfide oxidation by a microbial consortium from a trickling filter. *Biotechnology Letters*. **21**, (1999). 810-819.
4. Banciu H., Sorokin D. Y., Kleerebezem R., Muyzer J. G., Galinski E. A., Kuenen J. G, Growth kinetics of haloalkaliphilic, sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio versutus* strain ALJ f15 in continuous culture. *Extremophiles*. **8** (3), (2004b). 185-192.
5. Banciu H., Kleerebezem R., Muyzer J. G., Sorokin D. Y. Application of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria for the removal of H<sub>2</sub>S from gas streams. *European Symposium on Environmental Biotechnology*. Taylor & Francis Group. London. (2004a). pp. 345-348.

6. Begheijn, L. T., van Breemen, N., and Velthorst, E. J. Analysis of sulfur compounds in acid sulfate soils and other marine soils. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 9, (1978). 873-882.
7. Bertoldo C., Gorte R., Antranikan G. *Extremophiles: Life in Extreme Environments. Encyclopedia of Environmental Microbiology.* (2002).
8. Biller Kai F; Kato I; Märkl H. Effect of glucose, maltose, soluble starch, and CO<sub>2</sub> on the growth of the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *Extremophiles* 6, (2002). 161-166.
9. Bloemendal G, Nederland J. Survey of H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> removal process. *Sulfur Cycle in Enviromental Technology.* Wageningen, Uninersity. (2002).
10. Dvorak, D. H., Hedin, R. S., Edenborn, H. M., and McIntire, P. E. Treatment of metal-contaminated water using bacterial sulfate reduction: Results from pilot-scale reactors. *Biotechnology Bioengineering* 40, (1992). 609-616.
11. Espinosa Márquez J. Oxidación biológica de compuestos reducidos de azufre en condiciones alcalinas: Enriquecimiento y caracterización de consorcios. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. (2004). 79 pp.
12. González S. Operación, caracterización y modelado de un sistema de oxidación biológica de tiosulfato a azufre elemental. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México (2002). 108 pp.
13. Horikoshi K., Alkalophiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63 (4). (1999). 735-750.

14. Janssen A.J.H.; Ruitenbergh R.; Buiman C.J.N.; Industrial applications of new sulphur biotechnology. *Water Science and technology* Vol 44 #8, (2001). 85-90.
15. Janssen A.J.H.; Dijkman H.; Janssen G. Novel biological processes for the removal of H<sub>2</sub>O and SO<sub>2</sub> for gas stream, *Environmental technologies to treat sulfur pollution principles and engineering*, IWA Publishing London. (2000). 265-279.
16. Jensen A.B.; Webb Colin. Treatment of H<sub>2</sub>S: containing gases: A review of microbiological alternatives, *Enzyme and Microbial Technology* 17, (1995). 2-10.
17. Kelly D., Sergill J., Lu W., Wood A. P. Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 71, (1997). 95-107.
18. Lagas JA, Survey of H<sub>2</sub>S and SO<sub>2</sub> removal processes (1999) 237-263.
19. Lens P.N.L.; Kuenen J.G. The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology, *Water Science and Technology*, Vol 44 8, (2001). 57-66.
20. Lens P.; Pol L.; Tichy R.; Sulfur Cycle. *Encyclopedia of Microbiology*, Vol. 4, Segunda Edición, (2000). 495-505.
21. Levenspiel Octave. *Ingeniería de las reacciones químicas*. Reverte. Segunda edición. (1987).
22. Lomans B., Sorokin Y., Janssen A., kuenen J. Application of alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria for the removal of H<sub>2</sub>S from gas streams. *Seminario Latinoamericano de Digestión Anaerobia*. Recife, Brasil. (2000). 154-161.

23. Medina Díaz M. Selección y caracterización de un bio-reactor sulfoxidante empacado, utilizando roca tezontle como soporte. Tesis de maestría. Instituto Politécnico Nacional. E.S.I.A.-U.Z. México. (2003). 78 pp.
24. Morgan J., Revah D., Noyola A. Algunas tecnologías para la remoción de H<sub>2</sub>S por vía fisicoquímica y microbiológica. Revista del IMIQ 9-12, (2001) 207-215.
25. Oprime M.; Garcia O.; Cardoso A. Oxidation of H<sub>2</sub>S in acid solution by *Thiobacillus ferrooxidans* and *Thiobacillus thiooxidans*, Process Biochemistry **37**, (2001) 111-114.
26. Pethkar A.V.; Paknikar K.M. Thiosulfate biodegradation-silver biosorption process for the treatment of photofilm processing wastewater, Process Biochemistry **38**, (2003). 855-860.
27. Plas C.; Harant H.; Danner H.; Jelinek E.; Wimmer K.; Holubar P.; Braun R. Ratio of biological and chemical oxidation during the aerobic elimination of sulphide by colourless sulphur bacteria, Applied and Microbiology Biotechnology **36**, (1992). 817-822.
28. Smith J.M. Ingeniería de la cinética química. McGraw-Hill. (1991). pp 47-54.
29. Sorokin D. Y., Tourova T. P., Sjollem K. A., Kuenen J. G. 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**, (2003b). 1779-1783.
30. Sorokin D. Y., Antipov A. N., Kuenen J. G. Complete denitrification in coculture of obligately chemolithoautotrophic haloalkaliphilic sulfur-oxidizing

- bacteria from a hypersaline soda lake. Archives of Microbiology. 180, (2003a). 127-133.
31. Sorokin D. Y., Tourova T. P., Lysenco A. M., Mityushina L. L., Kuenen J. G. Thioalkalivibrio thiocyanoxidans sp. nov. And Thioalkalivibrio paradoxus sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 52, (2002c). 657-664.
32. Sorokin D. Y., Tourova T. P., Kolganova T. V., Sjollem K. S., Kuenen J. G. Thioalkalispira microaerophila gen. nov., sp. Nov., a novel lithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from a soda lake. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52, (2002b). 2175-2182.
33. Sorokin D. Y., Gorlenko V. M., Tourova T. P., Tsapin A. I., Nealson K. H., Kuenen J. G. Thioalkalimicrobium cyclicum sp. nov. and Thioalkalivibrio jannaschii sp. nov., novel species of haloalkalophilic, obligately chemolithoautotrophic sulfur oxidizing bacteria from hypersaline alkaline Mono Lake (California). International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52, (2002a). 913-920.
34. Sorokin D. Y., Tourova T. P., Lysenco A. M., Kuenen J. G. Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions. Applied and Environmental Microbiology. 67 (2), (2001b). 528-538.
35. Sorokin D. Y., Lysenko A. M., Mityushina L. L., Tourova T. P., Jones B. E., Rainey L. A., Kuenen G. J. Thioalkalimicrobium aerophilum gen. nov., sp. nov. and Thioalkalivibrio versutus gen. nov., sp. nov., Thioalkalivibrio

- nitratis 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**, (2001a) 565-580.
36. Sorokin D.; Lysenko M.; Mityushina L.; Tourova T.; Jones B.; Rainey F.; Robertson L.; Kuenen G. *Thioalkilimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. Nov. and *Thioalkilimicrobium sibericum* sp. Nov., and *Thioalkilivibrio nitratis* sp. Nov. and *Thioalkilivrio denitrificans* sp. Nov., novel obligately alkaliphilic and obligatelychemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* **51**, (2001). 565-580.
37. Sorokin D. Y., Tourova T. P., Kuenen j. G. A new facultatively autotrophic hydrogen- and sulfur-oxidizing bacterium from an alkaline environment. *Extremophiles*. **4** (4), (2000b). 237-245.
38. Sorokin D. Y., Robertson L. A., Kuenen J. L. Isolation and characterization of obligately chemolithoautotrophic alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* **77**, (2000a). 251-262.
39. Sorokin D.; Robertson L.A.; Kuenen J.G. Isolation and characterization of alkaliphilic, chemolithoautotrophic, sulphur-oxidizing bacteria. (1999).
40. Sorokin D. Y., Robertson L. A., Kuenen J.G. Purification and characterization of sulfide dehydrogenase from alkaliphilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria. *FEBS Letters*. **427**, (1998). 11-14.



41. Stefess G.; Torremans R.; Schrijver R.; Robertson L.; Kuenen J. Quantitative measurement of sulphur formation by steady-state and transient-state continuous cultures of autotrophic *Thiobacillus* species. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, (1996). 169-175 .
42. Velasco A.; Alcántara S.; Flores R.; Revah S. Partial thiosulfate oxidation by steady-state continuous culture in a bioreactor-settler system. *Chemical Technology Biotechnology* **79**, (2004). 132-139.
43. Velasco A. Evaluación de parámetros que determinan la oxidación biológica del tiosulfato en azufre elemental. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. (2001). 89 pp.
44. Visser J.; Robertson L.; Van Verseveld H.; Kuenen J. Sulfur Production by Obligately Chemolithoautotrophic *Thiobacillus* Species. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol 63 **6**, (1997). 2300-2305.
45. Williams J. Keys to bioreactor selections. *Chemical Engineering Progress*, Vol 98 **3**, (2002). 34-46.
46. [www.cdc.gov/niosh/ipcsnfrn/nfrn1336.html](http://www.cdc.gov/niosh/ipcsnfrn/nfrn1336.html)
47. [www.chemicalland21.com/arokorhi/industrialchem/solalc/2-METHYLAMINOETHANOL.htm](http://www.chemicalland21.com/arokorhi/industrialchem/solalc/2-METHYLAMINOETHANOL.htm)