



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

IZTAPALAPA

"ESTUDIO DE LA OXIDACION BIOLÓGICA DE LOS
COMPUESTOS REDUCIDOS DE AZUFRE UTILIZANDO
UN CONSORCIO DE MICROORGANISMOS
SULFOXIDANTES. EVALUACION DE LOS
PARAMETROS QUE DETERMINAN LA OXIDACION
PARCIAL DEL TIOSULFATO EN AZUFRE ELEMENTAL"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A :

SERGIO JULIAN ALCANTARA PEREZ

MEXICO, D.F.

2000

La tesis se realizó en el laboratorio de tratamiento de emisiones gaseosas (T-166 y W-107) de la Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa bajo la supervisión del Dr. Sergio Revah Moiseev. Asimismo, fue supervisada, como parte del comité tutorial, por el Dr. Jorge Gómez y el Dr. Gerardo Saucedo.

La realización del doctorado fue económicamente sostenida por la Beca-crédito otorgada por el CONACyT, así como por el apoyo económico otorgado por el grupo CyDSA, la OEA y por el Dr. Jorge Gómez.

El Doctorado en Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluido en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio PFP-20-93

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

DENOMINACION DE LA TESIS

STUDIO DE LA OXIDACION
BIOLOGICA DE LOS
COMPUESTOS REDUCIDOS
DE AZUFRE UTILIZANDO UN
CONSORCIO DE
MICROORGANISMOS
ULFOXIDANTES.
VALUACION DE LOS
PARAMETROS QUE
DETERMINAN LA OXIDACION
PARCIAL DE TIOSULFATO EN
AZUFRE ELEMENTAL



SERGIO JULIAN ALCANTARA PEREZ
FIRMA DEL INTERESADO

REVISOR

DR. ANTONIO AGUILAR AGUILAR
DIRECCION DE SISTEMAS ESCOLARES

VISTO BUENO

DR. JOSE LUIS ARREDONDO FIGUEROA
DIRECTOR DE DIVISION

VOCAL

DR. SERGIO REVAH MOISEEV

PRESIDENTE

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO
CASTAÑEDA

VOCAL

DR. MARCOS GUSTAVO MONROY
FERNANDEZ

SECRETARIO

DR. ELIAS RAZO FLORES

VOCAL

DR. GREGORIO JORGE GOMEZ
HERNANDEZ

En México, D.F. se presentaron a las 15:00 horas del día 31 del mes de ENERO del año 2000 en la Unidad IZTAPALAPA de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del Comité del Posgrado.

DR. JESUS GERARDO SAUCEDO CASTAÑEDA;
DR. SERGIO REVAH MOISEEV;
DR. MARCOS GUSTAVO MONROY FERNANDEZ;
DR. GREGORIO JORGE GOMEZ HERNANDEZ Y
DR. ELIAS RAZO FLORES

bajo la Presidencia del primero y con carácter de Secretario el último se reunieron a la presentación de la Disertación Pública para la obtención del Grado de

Doctor en: CIENCIAS BIOLÓGICAS

de: SERGIO JULIAN ALCANTARA PEREZ

quien presentó una tesis producto de una investigación original cuya denominación aparece al margen y de acuerdo con el artículo 78 fracciones I, II, IV y V del Reglamento de Estudios Superiores de esta Universidad, los miembros del Comité resolvieron:

APROBARLO

Acto continuo, el Presidente del Comité comunicó al interesado el resultado y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

Resumen

Dentro de los contaminantes de importancia en el ámbito mundial, los que contienen azufre tienen gran relevancia debido al impacto ambiental adverso que provocan en los ecosistemas naturales. Su emisión al ambiente está asociada a la lluvia ácida, fenómenos de corrosión, mal olor y daños a la salud debido a la toxicidad de algunos de estos contaminantes. El azufre y los compuestos que forma se intercambian en la naturaleza, por reacciones de oxido-reducción tanto químicas como biológicas que constituye el ciclo del azufre. Este consta de dos componentes: una etapa de reducción y una etapa de oxidación.

En el presente trabajo, se estudió la parte oxidativa del ciclo con el fin de establecer las condiciones que favorecen la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre, así como la identificación de los parámetros que favorecen su oxidación parcial, formando azufre elemental. Lo cual permitió, de manera general: incrementar el conocimiento de la fisiología, metabolismo, formación de biopelícula y técnicas microbiológicas de los microorganismos sulfoxidantes y de la población heterótrofa del consorcio, así como proponer algunos parámetros para su posible aplicación en el tratamiento de aire y agua contaminada con sulfuros.

Las condiciones de cultivo que favorecen la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre fueron: un intervalo de pH entre 5.5 y 7, temperatura de 30 °C y para la oxidación completa a sulfatos una concentración de O₂ disuelto superior a 0.2 mg/l para el consorcio y superior a 1.5 mg/l para *T. thioparus*. Mediante pruebas de respirometría, se observó que el sulfato en concentraciones superiores a 20 g/l afecta negativamente la oxidación de CS₂, debido posiblemente al estrés iónico provocado por el ion sobre las células. Sin embargo, en cinéticas de crecimiento el consorcio puede adaptarse a las concentraciones de sulfatos de hasta 40 g/l de sulfatos.

Al evaluar el efecto de la fuente de amonio sobre el crecimiento y oxidación del tiosulfato por el consorcio, se observó que el NH₄Cl tiene un efecto positivo sobre la oxidación del compuesto. Sin embargo los experimentos realizados no permiten concluir el tipo de efecto, ni si es el amonio *per se* o bien un producto de su metabolismo. Por otra parte, el extracto de levadura en concentraciones de 0.5 g/l no presentó un efecto sobre la oxidación de tiosulfato por el consorcio a pesar de haber favorecido su crecimiento. En tanto, las concentraciones mayores de 0.5 g/l de extracto de levadura afectaron negativamente la oxidación y el consorcio no presentó actividad. Lo cual permitió suponer que los microorganismos sulfoxidantes pierden actividad litótrofa en presencia de compuestos orgánicos, debido a una posible inhibición del sistema enzimático como se ha reportado en bacterias nitrificantes.

El consorcio presentó un comportamiento característico de crecimiento en cultivo continuo. La Dc se encuentra cercana a 3.4 d⁻¹, mientras que en valores de 3 d⁻¹ y concentraciones de oxígeno disuelto superiores a 0.2 mg/l, el cultivo oxidó completamente el tiosulfato a sulfato. En tanto, las concentraciones de oxígeno disuelto de 0.2 mg/l favorecieron la acumulación de azufre elemental. De la misma forma, la cepa de *T. thioparus* presentó un comportamiento característico de crecimiento en cultivo continuo. La Dc se encuentra cercana a 1.8 d⁻¹. A una D de 0.9 d⁻¹ y concentraciones de O₂ disuelto superiores a 1.5 mg/l, el cultivo oxidó completamente el tiosulfato a sulfato; en tanto que a concentraciones de 1.5 mg/l se afectó negativamente el crecimiento.

Al comparar los rendimientos del crecimiento de ambos cultivos se observaron rendimientos (Y_{x/s}) para una D=0.4 d⁻¹ de: 7.5 y 2.5 g_{biomasa}/mol_{tiosulfato} para el cultivo puro y el consorcio, respectivamente. Sin embargo, la eficiencia oxidativa fue 5 veces mayor para el consorcio (250 vs 56 g_{sulfato}/g_{proteína} d).

Abstract

The emission of sulfur compounds to the ambient is associated with the rain acid, corrosion phenomena, bad odour and toxicity risk. These compounds are exchanged in the nature, by redox reactions so chemical as biological, which constitutes the sulfur cycle. The cycle consists of two stages: a reductive and an oxidative stage.

In the present work, was studied the oxidative stage of the cycle in order to establish the conditions that favored the biological oxidation of the reduced sulfur compounds. As well as the identification of the parameters that permit the partial oxidation of these compounds, forming elemental sulfur. The investigation permitted: to increase the knowledge of the physiology, metabolism and microbiological techniques of the sulfoxidizing bacteria. As well as to propose some parameters for its possible application at full scale in the treatment of gases and water contaminated with sulfur compounds.

The culture conditions that favored the biological oxidation of the reduced sulfur compounds were: pH range between 5.5 and 7, temperature of 30 °C. For the oxidation to sulfates a dissolved oxygen concentration higher to 0.2 mg/l for the consortium and higher to 1.5 mg/l for *Thiobacillus thioeparus*. Through respirometric tests, was observed that the sulfate in concentrations higher to 20 g/l affects negatively the biological oxidation of carbon disulfide, possibly to the ionic stress provoked by the ion. However in growth kinetics, the consortium can be adapted to the sulfate concentrations up to 40 g/l of sulfates, which permits to consortium maintain its sulfoxidizing activity.

Upon evaluating the effect of the ammonium source on the growth and tiosulfate oxidation for the consortium, was observed that the ammonium chloride has a positive effect on the oxidation. However the accomplished experiments do not permit defined the effect neither if it is due to ammonium *per se* or well a product of its metabolism. On the other hand, the yeast extract in concentrations of 0.5 g/l did not present an effect on the biological tiosulfate oxidation for the consortium in spite of have favored its growth. However, the greater concentrations of 0.5 g/l of yeast extract affected negatively the oxidation and the consortium did not present sulfoxidizing activity. The results permitted to suppose that the microorganisms are mixotrophic and that in organic compounds presence grow better, though the enzymatic activity is inhibited as has been reported with nitrifying microorganisms.

The sulfoxidizing consortium presented a characteristic growth behavior in chemostate. The critical dilution rate is found nearby a D of 3.4 d^{-1} , while in values of $D=3 d^{-1}$ and dissolved oxygen concentrations higher 0.2 mg/l, the cultivation oxidized thoroughly the tiosulfate to sulfates. While the dissolved oxygen concentrations of 0.2 mg/l was observed elemental sulfur accumulation. In the same form, *Thiobacillus thioeparus* presented a characteristic growth behavior in chemostate. The critical dilution rate is found nearby a D of 1.8 d^{-1} . In values of $D=0.9 d^{-1}$ and dissolved oxygen concentrations higher to 1.5 mg/l, the cultivation oxidized thoroughly the tiosulfate to sulfate. While the oxygen concentrations of 1.5 mg/l the growth was affected negatively.

Upon comparing the yields of the growth of both cultures, were observed yields ($Y_{x/s}$) for a $D=0.4 d^{-1}$ of: 7.5 and 2.5 $g_{biomass}/mol_{tiosulfate}$ for the pure culture and the consortium, respectively. However, the oxidative efficiency was 5 greater times for the consortium (250 vs 56 $g_{sulfate\ produced}/g_{protein\ d}$). Finally, according to the growth characteristics observed for the consortium, is possible to indicate that the oxidation pathway more important (representative) of the culture is the tiosulfate oxidation multienzymatic system (TOMES). In so for *Thiobacillus thioeparus* is the mechanism of the rhodanasa, which is comparable to data reported in the literature for these kinds of thiobacilli.

Indice	página
Resumen	4
Abstract	5
I. Introducción	
I.1 Los contaminantes del ambiente	13
I.2 Los contaminantes del aire	13
I.3 Química del azufre	15
I.4 El ciclo de azufre y su relación con la contaminación con compuestos de azufre	19
I.4.1 Importancia del ciclo del azufre	21
I.4.2 Contaminación con compuestos de azufre	22
I.4.2.1 Oxidos de azufre	22
I.4.2.2 Acido sulfhídrico	23
I.4.2.3 Tiosulfato	24
I.4.2.4 Compuestos orgánicos volátiles de azufre	24
I.5 Procesos biológicos de eliminación de compuestos azufrados	25
I.6 Bacterias sulfoxidantes	26
I.6.1 Bacterias "incolores de azufre"	26
I.6.2 Energía de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre	29
I.6.3 Estructura celular de los thiobacilli	30
I.6.4 El periplasma: sitio de oxidación litotrófica	31
I.6.5 Sistema de transporte de electrones en <i>Thiobacillus</i>	33
I.7 Rutas bioquímicas de la oxidación de compuestos reducidos de azufre	34
I.7.1 Sulfuro	34
I.7.2 Azufre	38
I.7.3 Tiosulfato	39
I.7.3.1 Sistema multienzimático (TOMES)	39
I.7.3.2 Mecanismo de acción de TOMES en <i>Paracoccus versutus</i>	41
I.7.3.3 El papel central del azufre en la conversión de sulfano-azufre a sulfato	44
I.7.3.4 Ruta de los politionatos	45
I.7.4 Sulfito	48
I.8. Oxidación Biológica de los compuestos reducidos de azufre (H ₂ S)	49
I.8.1 Oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas	50

I.8.2 Oxidación por microorganismos denitrificantes	51
I.8.3 Oxidación por un proceso químico-biológico	52
I.8.4 Oxidación por bacterias "incoloras del azufre"	53
I.8.5 Recuperación de azufre de la oxidación parcial de H ₂ S	58
II. Objetivos	65
III. Material y Métodos	65
IV. Resultados y Discusión	
IV.1 Tasas relativas de oxidación de compuestos de reducidos de azufre.	74
IV.2 Tasas de oxidación de sulfuros (H ₂ S, CS ₂)	75
IV.3 Efecto de diferentes concentraciones de tiosulfato.	76
IV.4 Efecto del nitrógeno inorgánico.	83
IV.5 Efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura	90
IV.6 Cinéticas de crecimiento y producción de sulfatos del consorcio en un fermentador agitado	94
IV.7 Efecto de inhibidores de crecimiento sobre la actividad sulfoxidante del consorcio	97
IV.8 Cultivo continuo del consorcio	99
IV.9 Cultivo continuo de <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 26345	102
IV.10 Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento y la oxidación en el consorcio y <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 26345	104
IV.11 Recuperación de azufre por la oxidación parcial de tiosulfato	111
IV.12 Utilización de mezclas de O ₂ para el estudio de oxidación parcial de tiosulfato	112
IV.13 Saturación por sustrato	116
IV.14 Efecto de inhibidores en la oxidación de tiosulfato	118
IV.15 Oxidación del azufre elemental acumulado	121
V. Conclusiones	124
VI Bibliografía	127

Indice de figuras	página
Figura I.1 Ciclo del azufre	20
Figura I.2 Representación esquemática del periplasma bacteriano	32
Figura I.3 Arreglo de las enzimas involucradas en la oxidación de los compuestos reducidos de azufre	37
Figura I.4 Mecanismo propuesto de la oxidación de tiosulfato (TOMES) de <i>Paracoccus versutus</i> .	40
Figura I.5 Mecanismo propuesto para la oxidación de tiosulfato por <i>Thiobacillus lapidarius</i> .	46
Figura I.6 Modelo propuesto para el metabolismo de los compuestos reducidos de azufre por <i>Thiobacillus caldus</i>	63
Figura IV.1 Velocidades relativas de oxidación de los compuestos reducidos de azufre determinadas por respirometría para el consorcio, en concentraciones de 1 mM ($CS_2=1$)	74
Figura IV.2 Velocidades de oxidación en concentraciones crecientes de H_2S y CS_2 , determinadas por respirometría para el consorcio a 30 °C y pH de 7	75
Figura IV.3 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B) y pH (C) del consorcio crecido en concentraciones crecientes de tiosulfato	77
Figura IV.4 Efecto de la concentración de tiosulfato, debido a la producción de sulfatos, sobre el crecimiento del consorcio. Los datos fueron obtenidos a las 60 horas de cultivo	79
Figura IV.5 Efecto de sulfato sobre la oxidación de bisulfuro de carbono por el consorcio a pH 7 30 °C en pruebas de respirometría	80
Figura IV.6 Producción de azufre por el consorcio crecido en concentraciones de 30 y 50 g/l de tiosulfato	81
Figura IV.7 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B), consumo de amonio (C) y pH (D) del consorcio crecido en diferentes concentraciones de nitrato de amonio	85
Figura IV.8 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B), consumo de amonio (C) y pH (D) del consorcio crecido en diferentes concentraciones de sulfato de amonio	86

Figura IV.9 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B), consumo de amonio (C) y pH (D) del consorcio crecido en diferentes concentraciones de cloruro de amonio	88
Figura IV.10 Crecimiento (A) y producción de sulfatos (B) del consorcio crecido en diferentes concentraciones de nitrato de potasio	89
Figura IV.11 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B) y pH del consorcio crecido en diferentes concentraciones de extracto de levadura (EL), utilizando una concentración de tiosulfato de 20 g/l	92
Figura IV.12 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B) y pH (C) del consorcio crecido en un fermentador agitado en cultivos en batch sin control de pH, oxígeno disuelto de 1.6 mg/l y 30 °C de temperatura	95
Figura IV.13 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B) del consorcio crecido en un fermentador agitado en cultivos en batch con control del pH 7, oxígeno disuelto 1.6 mg/l y 30 °C de temperatura	96
Figura IV.14 Cultivo continuo del consorcio a lo largo del estudio, el pH fue controlado en 5.5 y 30 °C de temperatura.	100
Figura IV.15 Crecimiento y producción de sulfatos en quimiostato del consorcio en 90 días de cultivo	102
Figura IV.16 Crecimiento y producción de sulfatos en quimiostato de <i>Thiobacillus thioeparus</i> ATCC 26345 en 78 días de cultivo	103
Figura IV.17 Estados estacionarios de diferentes tasas de dilución vs. crecimiento y compuestos reducidos de azufre del consorcio	105
Figura IV.18 Estados estacionarios de diferentes tasas de dilución vs. crecimiento y compuestos reducidos de azufre de <i>Thiobacillus thioeparus</i> ATCC 26345	107
Figura IV.19 Producción de azufre a partir de la oxidación parcial de tiosulfato, utilizando una concentración de oxígeno de 2 mg/l y diferentes tasas de dilución	115
Figura IV.20 Producción de azufre por el consorcio por saturación de sustrato, a partir de diferentes cargas de tiosulfato obtenidas al incrementar la concentración del sustrato en el medio de cultivo	117
Figura IV.21 (A) Crecimiento, (B) consumo de azufre y producción de sulfatos del consorcio sulfoxidante.	122

Indice de tablas	página
Tabla I.1 Grupos de contaminantes	14
Tabla I.2 Criterios de evaluación de la calidad del aire	15
Tabla I.3 Estados de oxidación del azufre	16
Tabla I.4 Compuestos poliméricos del azufre	16
Tabla I.5 Formación y propiedades de los polisulfuros	24
Tabla I.6 Niveles de toxicidad del H ₂ S y su efecto en la salud	23
Tabla I.7 Capacidad de eliminación de las técnicas biológicas de tratamiento de aire contaminado con compuestos de azufre	27
Tabla I.8 Bacterias quimiolitótrofas oxidantes de azufre, fuente de energía y pH de crecimiento	28
Tabla I.9 Enzimas involucradas y mecanismos de oxidación de los compuestos de azufre reducidos por especies microbianas	36
Tabla III.1 Crecimiento de cepas puras de <i>Thiobacillus</i> y del consorcio en cultivo sólido utilizando diferentes tipos de gelificante	70
Table IV.1 Crecimiento microbiano y actividad sulfoxidante del consorcio en medios suplementados con inhibidores de crecimiento.	98
Tabla IV.2 Balance de la oxidación de tiosulfato en el cultivo continuo del consorcio	105
Tabla IV.3 Balance de la oxidación de tiosulfato en el cultivo continuo de <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 26345	107
Tabla IV.4 Rendimiento del crecimiento y eficiencia oxidativa de <i>Thiobacillus thioparus</i> y el consorcio en quimiostato	109
Tabla IV.5 Efecto del oxígeno disuelto sobre el crecimiento y la actividad sulfoxidante del consorcio, D=2.4 d ⁻¹ y de <i>Thiobacillus thioparus</i> ATCC 23645 D=0.9 d ⁻¹	112
Tabla IV.6 Efecto de la concentración de oxígeno sobre el crecimiento y producción de azufre elemental del consorcio utilizando concentraciones conocidas de oxígeno	114
Tabla IV.7 Balance de la oxidación de tiosulfato del consorcio en estado estacionario en diferentes tasas de dilución y 2 mg/l de O ₂ disuelto	115
Tabla IV.8 Producción y azufre y crecimiento del consorcio a las 60 h de cultivo crecido en diferentes inhibidores de cadena respiratoria	118

I. Introducción

El interés de la contaminación ambiental es relativamente reciente si consideramos que es a partir de los años 70 cuando cobra importancia como fenómeno social¹. Se afirma también que es "reciente" pues aunque el término existe desde hace 30 años, las acciones para su prevención y control han sido escasas y limitadas, siendo en los últimos años cuando se le ha dado mayor importancia a las medidas de control de contaminantes, lo cual es palpable en las grandes ciudades, como el D.F., en los días de contingencia ambiental. Las causas del constante deterioro del ambiente es complejo y su estudio, para su entendimiento, se realiza por los teóricos de las ciencias sociales. En una revisión de las teorías antropológicas relacionada al estudio de la interacción del hombre con la naturaleza, Bennet (Bernstein, 1981) delinea tres aspectos básicos de esta relación que es implícita del deterioro ambiental: (a) la tendencia a buscar siempre una mayor cantidad de energía para satisfacer las necesidades humanas; (b) el incremento del tamaño de la sociedad y sus sistemas de comunicación; y (c) la creciente incorporación de la naturaleza dentro de los sistemas humanos de cultura.

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

Entre las fuentes de contaminantes se pueden distinguir: a) los naturales como la proveniente de volcanes, incendios forestales; y b) los no naturales divididos en dos tipos: los móviles como los vehículos automotores y los fijos como el proveniente de industrias, oficinas y hogares entre otros. En la ciudad de México, por ejemplo, se reportó que en el año de 1992 (SGEEyPA, 1992) funcionaban diariamente 3 millones de vehículos automotores, operaban más de 30 mil empresas industriales y 12 mil establecimientos de servicios que, sumado a las actividades domésticas y áreas ecológicamente degradadas, dieron como resultado la emisión de 4 millones 300 mil toneladas de contaminantes emitidos a la atmósfera.

¹En nuestro país la legislación ambiental inició en 1971 con la promulgación de la Ley Federal para Prevenir y Controlar la Contaminación. A esta ley le han seguido dos más, a saber: La Ley Federal de Protección del Ambiente en 1982 y reformada en 1984; y la Ley General de Equilibrio Ecológico y la Protección del Ambiente en 1988, vigente hasta la fecha. Esta última se encuentra integrada por 194 disposiciones permanentes y seis títulos cuyo contenido es: las disposiciones generales, las áreas naturales protegidas, el aprovechamiento racional de los elementos naturales, la protección del ambiente, la participación social, y las medidas de control de seguridad y sanciones.

Cabe señalar que en las grandes ciudades, las fuentes no naturales rebasan significativamente a las provenientes de fuentes naturales. Al respecto se reporta que en el caso del bióxido de azufre se emiten anualmente en la ciudad de México, en forma global, aproximadamente 205 725 toneladas, de las cuales menos del 0.5% proviene de fuentes naturales (SGEEyPA, 1992).

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

En la actualidad el enfoque para resolver los problemas de contaminación se ha modificado y los procesos fisicoquímicos en uso, con altos consumos de energía y generación de contaminantes secundarios, empiezan a tener un complemento y alternativa en los procesos biotecnológicos, particularmente en concentraciones de contaminantes, donde los procesos fisicoquímicos son ineficientes. Estos procesos han cobrado cada vez mayor interés y la investigación desarrollada ha sido aplicada a procesos industriales con resultados exitosos. Por ejemplo, en el país se desarrolló y patentó un proceso biológico para eliminar ácido sulfhídrico y bisulfuro de carbono provenientes de una industria de fabricación de rayón y celofán con una capacidad para tratar hasta 700 m³/min de aire contaminado (Torres y col., 1993).

La investigación de la eliminación biológica de compuestos reducidos de azufre se puede integrar en tres etapas: (a) la investigación básica; (b) el trabajo de ingeniería y el desarrollo de equipo a nivel laboratorio y planta piloto; y (c) la aplicación a gran escala. La dinámica de trabajo del laboratorio, para el tratamiento de emisiones gaseosas de la UAM-I, donde fue realizado el proyecto de investigación, permite una interacción en los tres niveles mencionados. El propósito ha sido: (a) incrementar el conocimiento de la fisiología y metabolismo microbiano, formación de biopelícula y técnicas microbiológicas de los microorganismos sulfoxidantes; (b) el diseño de equipo que permita la oxidación parcial de los compuestos reducidos de azufre de interés; y (c) su aplicación a nivel industrial, e.g. en la industria del petróleo para el tratamiento de "aguas amargas".

Dentro de este marco de referencia la finalidad del trabajo que a continuación se presenta fue: a) estudiar las condiciones ambientales que favorecen la oxidación de los compuestos reducidos de azufre en cultivos en lote y en cultivos en continuo; y b) estudiar las condiciones ambientales que favorecen la acumulación de azufre elemental a partir de la oxidación parcial de tiosulfato, mediante un proceso biológico que utiliza microorganismos sulfoxidantes. Estos

microorganismos, principalmente del género *Thiobacillus*, presentan la característica de oxidar compuestos reducidos de azufre, como ácido sulfhídrico, bisulfuro de carbono, dimetil sulfuro, azufre, tiosulfato y sulfito entre otros, para obtener energía. El producto final de la oxidación es sulfato pero bajo ciertas condiciones de cultivo la oxidación puede ser parcial, permitiendo la acumulación de azufre elemental, lo cual constituye una ventaja tanto económica y de reducción de contaminantes secundarios (sulfato). Este tema de investigación se inscribe en los proyectos de investigación tanto de interés mundial como nacional y ubica al grupo de trabajo como punto de referencia en América Latina.

1.1 Los contaminantes del medio ambiente

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

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

1.2 Los contaminantes del aire

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

Tabla 1.1 Grupos de contaminantes

Grupos	Orgánicos o inorgánicos
<u>Orgánicos</u> PCBs, hidrocarburos, pesticidas	
<u>Inorgánicos</u> Sales, nitrato, metales	Las sales y el nitrato son inorgánicos, pero los metales pueden existir como contaminantes organometálicos (e.g. metilmercurio, pirita en el carbón)
<u>Acidos</u> Sulfúrico, sulfhídrico, nítrico	Los ejemplos mencionados son ácidos inorgánicos. Los ácidos orgánicos se producen en pequeñas cantidades
<u>Partículas</u> Suelos, cenizas	Tanto los suelos como las cenizas tienen una composición variable de componentes orgánicos e inorgánicos
<u>Radiológicos</u> Radón, radio, uranio	Los ejemplos son elementos inorgánicos
<u>Biológicos</u> Microorganismos patógenos	Los organismos vivos son básicamente orgánicos, pero contienen componentes inorgánicos que se presentan en los procesos de mineralización

Fuente. Hill, 1997b.

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

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

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

- El ozono, otros oxidantes fotoquímicos.

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

Tabla 1.2. Criterios de evaluación de la calidad del aire

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

SEDUE, 1989-90,

* Criterio internacional

I.3 Química del azufre

La química del azufre es sumamente compleja. Su estudio permite entender la diversidad de compuestos y sus propiedades químicas, que se detectan en las reacciones tanto químicas como enzimáticas del ciclo del azufre. Podría afirmarse que su complejidad se presenta debido a los diferentes estados de oxidación del azufre (Tabla 1.3), así como por su característica de formar cadenas poliméricas (Tabla 1.4).

I.3.1 Los estados de oxidación del azufre

Los principales estados de oxidación del azufre son -2, 0, +4 y +6, lo que permite encontrar

muchas especies importantes de azufre como los que se muestran en la Tabla I.3, las cuales se describen a continuación:

Tabla I.3 Estados de oxidación del azufre

Estado de oxidación	Ejemplo	Formula
+6	sulfato	SO_4^{2-}
+5	ditionato	$\text{S}_2\text{O}_6^{2-}$
+4	sulfito	SO_3^{2-}
+4	disulfito	$\text{S}_2\text{O}_5^{2-}$
+3	ditionito	$\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$
+2	tiosulfato	$\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$
0	azufre	S
-2	sulfuro	S^{2-}

Tabla I.4 Compuestos poliméricos del azufre

Compuesto	Fórmula
Polisulfanos	$\text{H-S}_n\text{-H}$
Polisulfuros	S_n^{2-}
Polisulfanos orgánicos	$\text{R-S}_n\text{-R}$
Politionatos	$^-\text{O}_3\text{S-S}_n\text{-SO}_3^-$
Azufre polimérico	S^0

Azufre elemental. El azufre es el segundo elemento del grupo VI de la tabla periódica, que contiene en secuencia oxígeno, azufre, selenio, telurio y polonio. Se encuentra naturalmente como una mezcla de cuatro isótopos ^{32}S , ^{33}S , ^{34}S y ^{36}S . La abundancia natural es 95.1%, 0.74%, 4.2% y 0.016%, respectivamente

El azufre es un sólido amarillo, que forma cristales ortorrómbicos (azufre rómbico). Es muy poco soluble en agua ($5 \mu\text{g/l}$ de S_8 a 25°C) pero muy soluble en bisulfuro de carbono, tetracloruro de carbono y disolventes no polares análogos, disoluciones a partir de las cuales se pueden obtener cristales de azufre perfectamente formados. El azufre ortorrómbico se funde a 112.8°C , formando un líquido color pajizo. Este líquido cristaliza formando cristales de azufre β . Las moléculas de ambas formas cristalinas, así como las del líquido son moléculas S_8 , que tienen la configuración de un anillo en zigzag. La formación de esta molécula grande es resultado de la covalencia de los elementos del grupo sexto de la tabla periódica, con la

formación de dos enlaces covalentes sencillos, en lugar de un doble enlace. Las moléculas diatómicas S_2 se forman calentando el vapor de azufre, sin embargo estas moléculas son menos estables que las moléculas grandes que contienen enlaces sencillos. Este comportamiento se debe a que en general, los doble y triples enlaces estables los forman fácilmente los elementos ligeros como el carbono, nitrógeno y oxígeno, pero no los elementos más pesados. El bisulfuro de carbono de estructura electrónica $S=C=S$ y otros compuestos que contienen un doble enlace carbono-azufre son las principales excepciones de esta regla (Huxtable y Lafronconi, 1987; Pauling, 1964).

La capacidad del azufre para formar cadenas es la mayor diferencia con el oxígeno, para el cual el ozono, O_3 , es el mayor polímero formado.

Sulfuro de hidrógeno. El sulfuro de hidrógeno, H_2S , es análogo al agua, sin embargo es mucho más volátil (punto de fusión de $-85.6\text{ }^\circ\text{C}$ y punto de ebullición de $-60.7\text{ }^\circ\text{C}$ debido a su menor tendencia de formar puentes de hidrógeno. El H_2S es la forma más reducida de azufre y es tóxico, inflamable y es también altamente soluble en agua (aproximadamente 0.1M a $25\text{ }^\circ\text{C}$) con un pK_1 alrededor de 7 y un pK_2 de 13.

El sulfuro de hidrógeno se prepara tratando el sulfuro de hierro II, con ácido sulfúrico:



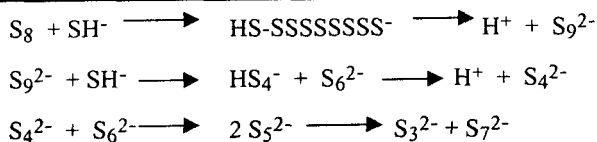
Esta reacción sirve para producir al mismo tiempo el sulfato de hierro II hidratado utilizado en la elaboración de tintas azules (Choppin y col., 1977).

Las sales de éste ácido son los sulfuros, muchos de los cuales se encuentran en la naturaleza y constituyen minerales importantes como la galena, PbS ; blenda de cinc, ZnS ; cinabrio, HgS y calcocita, CuS .

Polisulfuros. Una de las propiedades que definen la química del azufre es su estructura ortorrómbica. Los compuestos nucleófilos rompen esta estructura de acuerdo a su carácter de mayor o menor nucleofilicidad. De acuerdo a Davis (1968), ésta característica está parcialmente relacionada a las constantes de disociación y los ácidos débiles son las más fuertes nucleófilos. Así por ejemplo, el cianuro, un nucleófilo menos fuerte que el sulfuro, puede reaccionar con el azufre elemental disuelto en petróleo convirtiendo todos los átomos de azufre a tiocianato. Asimismo, el azufre (S_8) se disuelve en una disolución de sulfuro (HS^-) formando una mezcla de polisulfuros (S_n^{2-}) como se muestra en la Tabla I.4 (Stuedel, 1998). Tienen un color amarillo intenso y sus propiedades cambian en función del pH como se indica en la misma Tabla I.5. Se pueden definir los polisulfuros como aniones de azufre de diferente longitud que tienden a

tienden a oxidarse fácilmente en el ambiente, lo que les confiere su carácter inestable.

Tabla 1.5 Formación y propiedades de los polisulfuros



pH alcalino: aniones pequeños

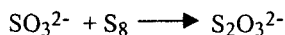
pH cercano a 7: aniones grandes

pH < 6 formación de H₂S y S₈

Fuente: Steudel, 1998

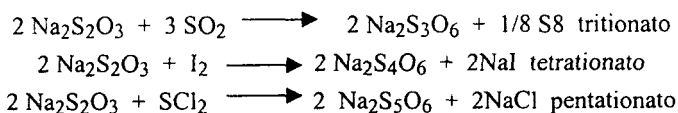
Bióxido de azufre. El bióxido de azufre es un gas no flamable, es altamente soluble en agua (alrededor de 1.5 M a 25 °C) y forma ácido sulfuroso, H₂SO₃, el cual libera protones para dar el ion hidrosulfito o bisulfito, HSO₃⁻, y después el ion sulfito, SO₃²⁻, con un pK₁ de 2 y un pK₂ de 7 respectivamente. El estado más oxidado del azufre con una valencia de +6 es el trióxido de azufre formado del dióxido de azufre y oxígeno en presencia de un catalizador. Su forma hidratada es el ácido sulfúrico el cual disocia protones para formar el ion hidrosulfato o bisulfato, HSO₄⁻, con un pK de 2, al ion sulfato, SO₄²⁻ (Suzuki, 1999).

Tiosulfato. El tiosulfato tiene dos átomos de azufre no equivalentes. Este ion es un ion sulfato, SO₄²⁻, en el que uno de los átomos de oxígeno ha sido desplazado por un azufre. El átomo de azufre central tiene un número de oxidación de +6 y el átomo de azufre unido, el número de oxidación de -2. El ion tiosulfato se obtiene haciendo hervir una solución de sulfito de sodio con azufre:



El ácido tiosulfúrico H₂S₂O₃ es inestable y cuando se trata el ion tiosulfato con un ácido, se forman azufre y dióxido de azufre. Este ácido es un ejemplo de una clase general de ácidos, llamados tioácidos o sulfoácidos, en los que uno o más átomos de oxígeno de un oxácido están remplazados por átomos de azufre (Suzuki, 1999; Dhawale, 1993).

Politionatos. El ion tiosulfato se oxida fácilmente con diferentes compuestos para formar diferentes moléculas denominadas politionatos ($^{-}O_3S-Sn-SO_3^{-}$) como se muestra a continuación:

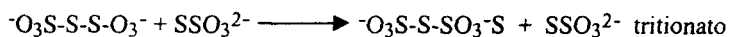
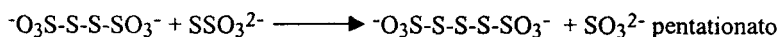
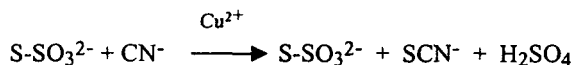


La principal característica de estas moléculas es la presencia de grupos sulfanos ($^{-}O_3S-Sn$) de cadenas poliméricas de azufre de valencia cero (Stuedel, 1998).

En estas moléculas, por ejemplo el tetracionato pierde un azufre sulfano con cianuro para formar tiocianato, liberando tiosulfato del grupo sulfonato y sulfato del otro azufre de acuerdo a:



El tiosulfato puede ser cianolizado a tiocianato y sulfito solamente en la presencia de iones de Cu^{+2} como catalizador. El tiosulfato es un nucleófilo más débil que el sulfito y cerca de un pH de 7 el sulfito corta la cadena de pentacionato a tetracionato, pero abajo de un pH de 7 el tiosulfato incrementa la cadena de tritionato a tetracionato y a pentacionato. Los mecanismos pueden involucrar ácidos polisulfano monosulfónico ($HSn-SO_3H$):



El tetracionato tiene cuatro átomos de azufre y sus propiedades sugieren que los dos átomos de azufre de enmedio tienen valencia cero y los dos externos son +4 (sulfito) y +6 (trióxido de azufre) respectivamente (Suzuki, 1999; Stuedel, 1998; Pauling, 1964).

I.4 El ciclo de azufre y su relación con la contaminación de compuestos de azufre

El azufre se encuentra en la naturaleza en diferentes estados de oxidación, por lo tanto formando diferentes compuestos que se intercambian por procesos químicos o biológicos de oxidación-

reducción, constituyendo un ciclo denominado ciclo biogeoquímico del azufre (Takasuwa, 1992; Robertson y Kuenen, 1991). Una utilidad del término está relacionada con la medición de la cantidad de azufre, en todas sus formas tanto de fuentes naturales como antropogénicas, que se encuentra en la naturaleza (Mackenzie, 1995).

Debido a la variedad de estados de oxidación del azufre, sus transformaciones son complejas. En la Figura 1.1 se presenta un esquema que muestra las transformaciones biológicas que corresponden al ciclo biológico del azufre. En este ciclo, aunque son posibles varios estados de oxidación, tres de ellos tienen, por su estabilidad, una mayor importancia en la naturaleza: -2 (sulfhidrilo R-SH y sulfuro HS⁻), 0 (azufre elemental, S⁰) y +6 (sulfato).



Figura 1.1. Ciclo biológico del azufre

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

- i. una etapa reductiva
- ii. una etapa oxidativa

i. Etapa reductiva. En los procesos biológicos se encuentran dos formas bioquímicas de reducción de los compuestos de azufre inorgánicos: la reducción asimilativa y la reducción desasimilativa. La primera la presentan tanto eucariotes como procariotes y en ésta, el sulfato es

reducido a sulfuro (H_2S) para la biosíntesis de compuestos que contienen azufre necesarios para el crecimiento celular. La reducción desasimilativa la presentan principalmente los procariotes y en ella el sulfato es reducido a sulfuro por microorganismos sulfato reductores en condiciones anóxicas, donde el sulfato es utilizado como aceptor último de electrones. Esta reducción está acoplada con la oxidación de varios ácidos grasos volátiles, lactato y piruvato que generan ATP y poder reductor necesarios para el crecimiento celular.

ii. Etapa oxidativa. La segunda etapa del ciclo la constituyen las reacciones de oxidación de los compuestos reducidos de azufre. De igual manera, esta etapa puede dividirse en dos: las reacciones de oxidación en condiciones anaerobias efectuados por microorganismos fotótrofos (Cork y col. 1983) y facultativos (Sublette, 1987) y la oxidación aerobia por microorganismos del género *Thiobacillus* (Alcántara y col. 1999; Kelly, 1990, 1982; Buisman y col, 1989).

1.4.1 Importancia del ciclo de azufre

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

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

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

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

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

Como se señaló en el apartado 1.1, el deterioro ambiental debido a las emisiones antropogénicas de compuestos que contienen azufre orgánico e inorgánico provoca lluvia ácida, toxicidad,

corrosión y mal olor (McEldowney y col. 1993; Manion, 1992).

1.4.2 Contaminación con compuestos de azufre

Entre los compuestos de azufre de mayor importancia que se emiten a la atmósfera se encuentran el SO_2 , el $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, el H_2S , el CS_2 y los compuestos orgánicos volátiles de azufre. La forma como se emiten y otras características de estos compuestos se explican a continuación.

1.4.2.1 Oxidos de azufre

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

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

I.4.2.2 Acido sulfhídrico (H₂S)

El H₂S se emite al ambiente por un gran número de industrias como la petroquímica, tanerías, producción de viscosa y celofán, como resultado del tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato, de la extracción de gas natural y es un intermediario de la oxidación biológica de CS₂ (Groenestijn y col., 1998; Revah y col., 1995; Torres y col., 1993; Buisman y col., 1989; Sublette y col., 1987). Sus propiedades corrosivas están relacionadas con el daño a paredes de concreto de los reactores, sistemas de drenaje, y tuberías de acero; su emisión al ambiente además de su toxicidad genera olores desagradable y lluvia ácida. Su característico olor a huevo-podrido es perceptible en aire fresco en diluciones de 1 ppm de aire. En la Tabla 1.6 se muestran los niveles de toxicidad del ácido sulfhídrico y sus efectos sobre la salud. Es de destacar las bajas concentraciones en que el compuesto es tóxico.

Tabla 1.6 Niveles de toxicidad del H₂S y su efecto en la salud

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

Janssen A., (1996).

Por ejemplo, en el caso del gas natural, este debe contener niveles aceptables de sustancias tóxicas antes de su distribución y venta. Se ha establecido que este producto destinado al

mercado de combustibles debe contener no más de 0.18 M de H₂S bajo condiciones estándar de 101.3 kPa y 0 °C. De acuerdo a Sublette (1987) el problema más común de esta industria es la eliminación y manejo del H₂S, por los problemas de corrosión debido al contacto con hierro y acero en tanques, tuberías, válvulas y bombas. Para resolver este problema, este autor propone la utilización de un sistema biológico de oxidación con *Thiobacillus denitrificans* (Sublette, 1987).

I.4.2.3 Tiosulfato

El tiosulfato (S₂O₃²⁻) es un anión metaestable que tiende a su descomposición química en soluciones acuosas. Las soluciones diluidas del compuesto, 0.01 M o menores, se descomponen más rápidamente que las soluciones concentradas, 0.1 M o mayores. Junto con otros compuestos de azufre el tiosulfato es altamente "agresivo" por los problemas de corrosión asociados al mismo. El tiosulfato se utiliza en la industria de la fotografía, en la industria del papel y en la industria farmacéutica. Por lo tanto se encuentra como contaminante en las aguas de desecho de estas industrias. La industria del petróleo, de acuerdo a Khana y col. (1996), también emite como contaminante a este compuesto. Es claro que por sí mismo el tiosulfato no es un factor de deterioro ambiental sin embargo, sus productos de la oxidación biológica o química (SO₄²⁻), o bien su reducción biológica en condiciones anaerobias (H₂S) tienen fuerte impacto ambiental (Suzuky, 1999; Dhawale, 1993).

I.4.2.4 Compuestos orgánicos volátiles de azufre.

Además de las formas inorgánicas de azufre, existe un amplio conjunto de compuestos orgánicos de azufre que son sintetizados por los seres vivos, y que también desempeñan un papel en el ciclo biogeoquímico del azufre. El compuesto orgánico de azufre más abundante en la naturaleza es el dimetil sulfuro (H₃C-S-CH₃), el cual se origina principalmente en ambientes marinos como producto de la degradación de propionato de dimetil sulfonato, que es uno de los principales osmoreguladores de las algas marinas. La producción de este compuesto es muy abundante y se producen más de 45 millones de toneladas anuales. El dimetil sulfuro que se difunde en la atmósfera experimenta una oxidación fotoquímica que produce ácido metanosulfónico (CH₃SO₃⁻), SO₂ y SO₄²⁻. Existen muchos otros compuestos de azufre orgánicos entre los que se pueden señalar: el metanotiol (CH₃SH), el dimetildisulfuro (CH₃-S-S-CH₃) y el bisulfuro de carbono (Madigan y col., 1999).

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

Por otro lado, el bisulfuro de carbono también es un compuesto azufrado de importancia industrial. Este compuesto se utiliza en la fabricación de viscosa (precursor de rayón y esponjas) y celofán así como en la producción de fertilizantes. Se ha reportado que en la industria de viscosa y celofán se emiten a la atmósfera concentraciones del compuesto de hasta 4000 ppm (Estrada, 1998).

I.5 Procesos biológicos de eliminación de compuestos azufrados

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

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

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

concentraciones de 3500 ppm sobre los tratamientos fisicoquímicos.

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

En el caso del tratamiento de gases contaminados (incluido el "biogás" proveniente del tratamiento de aguas contaminadas con sulfato, sulfuro, bisulfuro y VOCS) los sistemas que se han utilizado son principalmente biofiltros y biolavadores de lecho escurrido (BLE) (Tabla 1.7). Una revisión de estas técnicas, sus límites de operación y su aplicación, fue hecha por Groenestijn y Hesselink (1993). Asimismo, Torres (1999), revisó los conceptos básicos de funcionamiento y operación de estos sistemas, especialmente de los biolavadores de lecho escurrido para el tratamiento de CS_2 y H_2S en corrientes gaseosas.

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

1.6 Bacterias sulfoxidantes

1.6.1 Bacterias "incolores" del azufre

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

Existe una gran diversidad de bacterias sulfoxidantes con muy diferentes propiedades morfológicas, fisiológicas y ecológicas y de igual manera diversos requerimientos ambientales para su crecimiento. En la Tabla 1.8 se enlistan algunos géneros de estos microorganismos, la fuente de energía que utilizan, así como el intervalo de pH en el cual crecen.

Tabla I.7 Capacidad de eliminación de las técnicas biológicas de tratamiento de aire contaminado con compuestos de azufre

Reactor	Material de empaque	Microorganismos	CE (kg/m ³ d)	Fuente
H₂S				
BF	turba	<i>Thiobacillus thioparus</i> DW 44	2.25	Cho y col., 1992
BF	composta	<i>Thiobacillus</i> sp?	3.12	Yang y Allen, 1994
BLE	PVC	<i>Thiobacillus</i> sp (consorcio)	7.2	Revah y col., 1994
BLE	polipropileno	<i>Thiobacillus</i> sp	1.70	Berzaczy y col., 1988
BF	lodo activado	<i>Thiobacillus</i> sp	3.0	Degorce-Dumas y col., 1997
CS₂				
BLE	PVC	<i>Thiobacillus</i> sp (consorcio)	4.32	Revah y col., 1994
BLE	polipropileno polietileno	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	1.70	Berzaczy y col., 1988
Me₂S				
BLE	polipropileno	<i>Thiobacillus thioparus</i> Tk-m	0.23	Tanji y col., 1989
BF	turba	<i>Thiobacillus thioparus</i> DW 44	0.10	Cho y col. 1992
BF	turba	<i>Hyphomicrobium</i> VS	0.33	Pol y col., 1994
BF	composta	<i>Hyphomicrobium</i> MS3	0.68	Smet y col., 1996

CE: capacidad de eliminación; Me₂S: dimetil sulfuro; BF: Biofiltro; BLE: Biolavador de lecho escurrido

Tabla 1.8 Bacterias quimiolitótrofas oxidantes de azufre, fuente de energía y pH de crecimiento.

Género y Especie	Donador de electrones litotrófico	pH para crecimiento
<u>Crecimiento deficiente en medios orgánicos</u>		
<i>Thiobacillus thioeparus</i>	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiobacillus neapolitanus</i>	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	S ⁰	2-5
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	S ⁰ , H ₂ S, Fe ²⁺ , sulfuros metálicos	1.5-4
<u>Crecimiento en medios orgánicos</u>		
<i>Thiobacillus novellus</i>	S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiobacillus intermedius</i>	S ₂ O ₃ ²⁻	3-7
<u>Litótrofos filamentosos</u>		
<i>Beggiatoa</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiothrix</i>	H ₂ S	6-8
Otros géneros		
<i>Thiomicrospira</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiosphera</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , H ₂	
<i>Thermothrix</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₂ ³⁻	6.5-7.5
<i>Thiovolum</i>	H ₂ S, S ⁰	6-8
<i>Acidianus</i>	S ⁰	1-5
<i>Sulfolobus</i>	H ₂ S, S ⁰	1-4

Madigan y col. (1999)

La mayor parte de los conocimientos fisiológicos de estos microorganismos proviene del estudio de un número limitado de géneros. Los thiobacilli, son los más estudiados debido a que pueden cultivarse fácilmente en el laboratorio. Su estudio ha permitido entender de manera más

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

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

Estas son:

1. Quimiolitótrofos obligados.

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

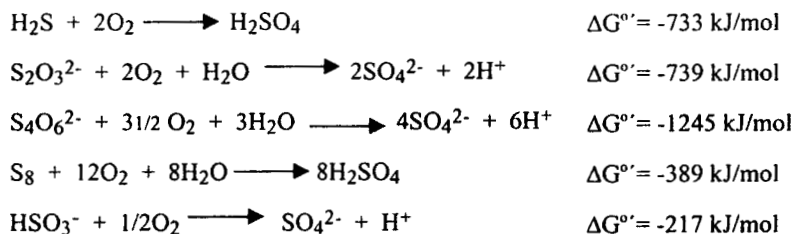
2. Quimiolitótrofos facultativos.

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

I.6.2 Energía de oxidación de compuestos reducidos de azufre

Una considerable variedad de microorganismos conservan energía de las oxidaciones quimiolitótróficas (Tabla I.8). Los mejor estudiados son las especies de thiobacilli, pero existe información sobre el crecimiento de *Thiomicrospira*, *Sulfolobus*, *Beggiota*, algunos fotótrofos oxidantes de tiosulfato incluyendo a *Thiocapsa* y *Chromatium* y algunos heterótrofos oxidantes de hidrógeno incluyendo a *Paracoccus denitrificans*, los cuales pueden crecer autotróficamente en la oscuridad cuando se utilizan como sustrato los compuestos reducidos de azufre. Esto indica una unidad bioquímica respiratoria básica, en la cual se presenta una gran diversidad de

sistemas enzimáticos oxidantes de azufre por medio de las cuales estas bacterias son capaces de generar electrones y obtener energía de crecimiento. Las oxidaciones mejor estudiadas son (Kelly, 1990):



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



I.6.3 Estructura celular de los thiobacilli

La estructura de la envoltura celular de las bacterias gram-negativas, el caso de los thiobacilli, está más diferenciada que la de las gram-positivas ya que cuentan con una membrana extra alrededor de la capa de peptidoglicanos. Una diferenciación de sistemas de membrana similar se observa en células animales las cuales contienen, en adición a la membrana citoplásmica, una membrana lisosomal, una membrana mitocondrial, retículo endoplásmico y una membrana nuclear. La función de la membrana externa es, en parte, muy similar a aquella de la membrana lisosomal de eucariotes. Los lisosomas de los eucariotes son organelos rodeados por una membrana simple y es llamada "bolsa suicida" ya que contiene enzimas hidrolíticas, fosfatasas, glicosidasas, nucleasas, proteasas y lipasas, capaces de hidrolizar toda clase de componentes que entran en la célula. Estas enzimas son usadas para digerir toda materia extraña que entra en la célula, tales como bacterias (Alberts y col, 1994). Las bacterias también necesitan esta clase de enzimas hidrolíticas para utilizar los nutrimentos necesarios para su crecimiento. Sin embargo,

ya que las bacterias no contienen lisosomas, estas enzimas se deben mantener separadas de los otros componentes celulares para prevenir su propia digestión. Las bacterias gram-positivas simplemente excretan estas enzimas fuera de la célula, mientras las bacterias gram-negativas elaboran dentro de la célula estas enzimas en el espacio situado entre la membrana externa y la membrana citoplásmica. Este espacio es llamado el espacio periplásmico y tiene un papel vital en el crecimiento celular y puede representar entre el 20 y 40 % de la masa celular (Ferguson, 1991).

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

Los principales componentes de la membrana externa son lipopolisacáridos, y se encuentran exclusivamente en esta membrana, que además de prevenir la entrada de ciertos compuestos desempeñan un papel importante en la interacción con el ambiente de la célula (Figura I.2).

I.6.4 El periplasma: sitio de oxidaciones quimiolitotróficas

Como se mencionó, los thiobacilli son bacterias gram negativas que poseen una región denominada periplasma como parte de su envoltura celular. El periplasma está situado entre la membrana citoplásmica y la membrana externa de la célula, mide aproximadamente 65 Å, y puede representar 20 % del volumen celular. El periplasma se presenta como una fase gel que contiene peptidoglicanos y es ahí donde se localizan numerosas proteínas del transporte de electrones. La mayoría de los citocromos c se encuentran en el periplasma (Figura I.2). Los otros citocromos (b, a, a₃ y otras oxidasas) así como otros acarreadores de electrones y protones y las enzimas como la ATPasa están localizadas en la membrana citoplásmica. La reducción de oxígeno y la síntesis de ATP toma lugar sobre la superficie interna de la membrana citoplásmica en función del movimiento de electrones y protones a través de la membrana (Kelly, 1990, Hooper y DiSpirito, 1985; Volkmar, B. 1978).

Muchos de los sistemas enzimáticos para la oxidación de sustratos inorgánicos por quimiolitótrofos están localizados en el lado periplásmico de la membrana citoplásmica. Esto se

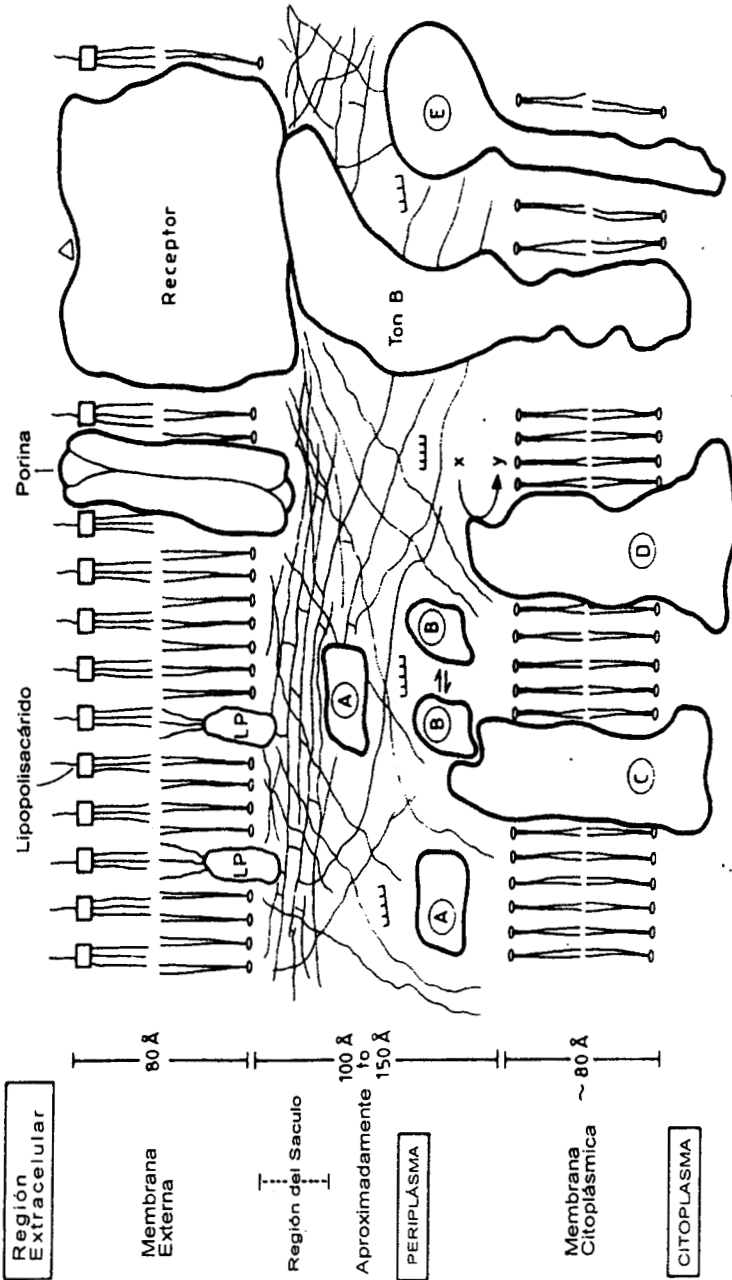


Figura 1.2. Representación esquemática del periplasma bacteriano. La región del sacúculo se muestra como un enlace comprimido de peptidoglicano o mureína. La región interna (al borde de las membranas citoplásmicas) se piensa que contiene cadenas de glicano que corren del sacúculo junto con la membrana derivada del oligosacárido (L.L.L.L.L). Las proteínas pueden localizarse ampliamente en esta región la cual se piensa que es viscosa. Sin embargo, las proteínas pueden ser capaces de llegar a la membrana externa a través de las regiones del sacúculo. La proteína A puede llegar a transportar un electrón (citocromo) como puede también difundirlo libremente en el periplasma o bien una enzima soluble en agua tal como la fosfatasa alcalina. La proteína B puede ser una proteína disuelta enlazada a una membrana limitrofe receptor o poro C. Alternativamente B y C pueden ser transportadores de electrones de proteínas. La proteína D representa una proteína de membrana interna en la cual el sitio activo, que cataliza, la reacción $X \rightarrow Y$, se localiza en el periplasma. La proteína E es un ejemplo de proteína que tiene un dominio mayor en el periplasma y está anclada a la membrana por una hélice alfa. La proteína Ton B se muestra como un ejemplo del sistema interactivo con un receptor de la membrana externa. Las dimensiones del periplasma son aproximaciones, LP es lipoproteínas. (Ferguson, 1991)

ha propuesto como un principio general en bacterias que generan gradientes de protones de la oxidación de sustratos simples, incluyendo compuestos de un átomo de carbono (CO). El sistema multienzimático de la oxidación de tiosulfato de *Thiobacillus versutus* (*Paracoccus versutus*) se ha localizado completamente en el periplasma (Kelly, 1997)

1.6.5 Sistema de transporte de electrones en *Thiobacillus*

Los thiobacilli quimiolitotróficos (obligados o facultativos) contienen todos los componentes del transporte de electrones necesarios para enlazar el NAD(P) al oxígeno (o compuestos oxidados de nitrógeno, como en el caso de *Thiobacillus A2* y *Thiobacillus denitrificans*), ya que su metabolismo endógeno básico es similar al de cualquier otra bacteria. En el sistema de transporte de electrones de los thiobacilli se ha encontrado que las oxidaciones del azufre no reducen directamente el NAD⁺ y que la reducción del NAD⁺ requiere de un flujo de electrones dependiente de energía, desde los citocromos hasta el NAD.

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

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

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

I.7 Rutas Bioquímicas de la Oxidación de Compuestos Reducidos de Azufre

La complejidad y el número de reacciones involucradas en las transformaciones químicas y biológicas de los compuestos de azufre hace complejo el estudio de las reacciones bioquímicas llevadas a cabo por los microorganismos para la oxidación biológica de estos compuestos (Tabla I.9). Kelly y col. (1997) sostienen que posiblemente existen 2 procesos básicos de oxidación de compuestos reducidos de azufre (azufre, sulfuro y tiosulfato). Estos son los siguientes:

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

A continuación se presentan las rutas bioquímicas de la oxidación de sulfuro (H_2S), CS_2 , S^0 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y SO_3^{2-} por thiobacilli (Figura I.3), que son uno de los sistemas más estudiados y donde algunas enzimas de la oxidación se han caracterizado parcialmente. (Suzuki, 1999; Kelly, 1997, 1990, 1982; Kuenen y col., 1993; Takakuwa, 1992; Kuenen y Robertson, 1991; Hooper y DiSpirito, 1985).

I.7.1 Sulfuro

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

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

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

Tabla I.9 Enzimas involucradas y mecanismos de oxidación de los compuestos reducidos de azufre por especies microbianas.

Sustrato	Especie	Sitio de la oxidación	Tipo de enzima	Ubicación de la enzima	Mecanismo de reacción
Sulfuro					
	<i>Thiobacillus</i> sp.	Superficie celular	Sulfuro oxidasa	Periplasma	$HS^- + 1/2O_2 \rightarrow S^0$ $S^0 + O_2 \rightarrow SO_4^{2-}$
	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Superficie celular	Sirohemo sulfito reductasa	Periplasma	$HS^- + 3H_2O \rightarrow SO_3^{2-} + 6H^+$
	<i>Thiobacillus denitrificans</i> RT	Superficie celular	Sulfuro oxidasa	Enzima unida a membrana	$HS^- + 3H_2O \rightarrow SO_3^{2-} + 6H^+$
	<i>Chlorobium limicola</i>	Periplasma?	Flavocitocromo c553	Enzima unida a membrana	$HS^- + CO_2 \rightarrow S^0 + \text{biomasa}$
Azufre					
	<i>Thiobacillus</i> sp, <i>Thiobacillus novellus</i> , <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Superficie celular (contacto directo)	Oxigenasas (glutacion como cofactor)	Extracitoplásmica	$S^0 + O_2 + H_2O \rightarrow SO_3^{2-} + 2H^+$ $1/8 S_8 + 3/2O_2 \rightarrow H_2SO_4$
	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i> , <i>Thiobacillus thiooxidans</i>	Superficie celular (contacto directo)	Sistema multienzimático	Unido a membrana?	$1/8 S_8 + 3/2O_2 \rightarrow H_2SO_4$
Thiosulfato					
	<i>Thiobacillus thioparus</i>	Citoplasma	Rodanasa	Citoplásmica unida a membrana?	$S_2O_3^{2-} \rightarrow 2SO_4^{2-} + S^0$
	<i>Paracoccus versutus</i>	Periplasma	TOMES	Periplasma, unida a membrana	$S_2O_3^{2-} \rightarrow 2SO_4^{2-} + 4H^+ + 5H_2O$
	<i>Thiobacillus tepidarius</i>	Periplasma, citoplasma	Sistema multienzimático	Periplasma, unidas a membrana	formación de politionatos

Tabla I.9 (continuación) Enzimas involucradas y mecanismos de oxidación de los compuestos de azufre reducidos por especies microbianas.

Sulfito	<i>Thiobacillus thioparus</i>	Citoplasma	Aps reductasa Adp sulfurilasa	Unidad a membrana?	$SO_3^{2-} + AMP \rightarrow ADP + SO_4^{2-}$
	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Citoplasma	Aps reductasa Adp sulfurilasa	Unidad a membrana?	$SO_3^{2-} + AMP \rightarrow ADP + SO_4^{2-}$
	<i>Thiobacillus novellus</i>	Periplasma	Sulfito citocromo c oxidoreductasa	Periplasma	$SO_3^{2-} + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$
	<i>Thiobacillus versutus</i>	Periplasma	Sulfito citocromo c oxidoreductasa	Periplasma	$SO_3^{2-} + H_2O \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$
	<i>Thiobacillus thioparus</i> TK5	Citoplasma	oxigenasa	unida a membrana?	$CS_2 + H_2O + NADH + H^+ \rightarrow COS + (S) + H_2O + NAD$
Bisulfuro de carbono	<i>Paracoccus denitrificans</i>				$(COS + H_2O \rightarrow CO_2 + H_2S)$ química
	<i>Paracoccus versutus</i>				$2H_2S + O_2 \rightarrow 2S^0 + H_2O$
					$2S^0 + 2H_2O + 3 O_2 \rightarrow 2H_2SO_4$
Dimetil sulfuro	<i>Hhypomicrobium</i>	Citoplasma	monooxigenasa	?	$CH_3SCH_3 + O_2 + NADH + H^+ \rightarrow CH_3SH + HCHO + H_2O + NAD^+$
	<i>Thiobacillus thioparus</i> Tk-m				
	<i>Paracoccus denitrificans</i> <i>Paracoccus versutus</i>	Citoplasma	Metil transferasa	?	Enzima $CH_3SCH_3 \rightarrow CH_3S + XCH_3$
Metano-thiol	<i>Hhypomicrobium</i> <i>Thiobacillus thioparus</i> Tk-m	Citoplasma	Oxidasa	?	$CH_3SCH_3 + O_2 + H_2O \rightarrow HCHO + H_2S + H_2O_2$

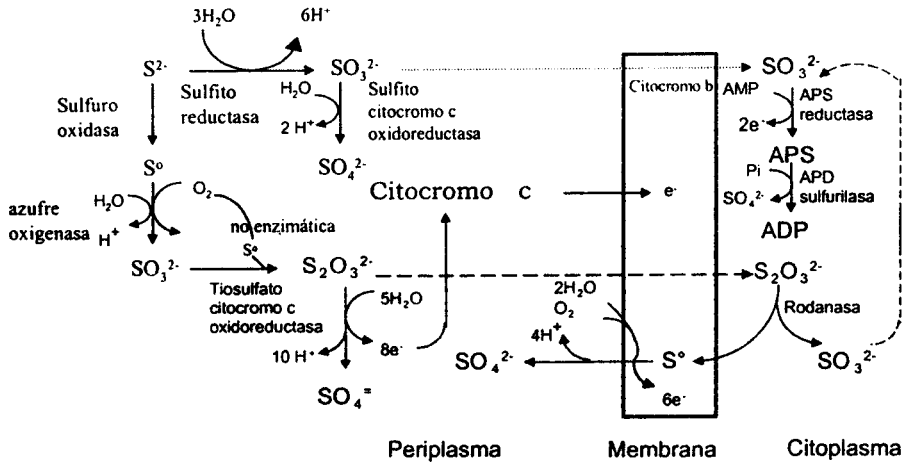


Figura I.3. Arreglo de las enzimas involucradas en la oxidación de compuestos de azufre reducidos. El esquema está compuesto de las reacciones catalizadas por diferentes especies de thiobacilli. (Hooper y DiSpirit, 1985).

sulfuro oxidasa en estos microorganismos se localiza en la fracción de membrana. Por otro lado, se ha confirmado que las condiciones ambientales son determinantes para la oxidación parcial de sulfuro en azufre elemental por la oxidación biológica aerobia del sulfuro (Janssen, 1997).

Se ha observado que los flavocitocromos c de la bacterias fotosintéticas *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* *Chromatium vinosum* (c₅₅₃), *Chlorobium limicola* 6330 (c₅₅₃), y *Chromatium vinosum* (c₅₅₂) llevan a cabo una reacción tipo (a) de oxidación de azufre (Kusai y Yamanaka, 1973a, 1973b). La sulfuro-citocromo c reductasas de *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum* se han purificado y caracterizado bioquímicamente. Estas consisten de una subunidad hemo de un peso molecular de 11 000 D y una subunidad flavin de peso molecular de 47 000 D que

contiene una mol de FAD (Kusai y Yamanaka, 1973a).

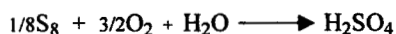
El sulfuro también es oxidado de forma directa a sulfito que a su vez se oxida a sulfato (reacción tipo b):



La enzima involucrada, sulfito reductasa, fue purificada en *Thiobacillus denitrificans* (Schedel y Truper, 1979). Es una enzima insoluble y su sitio de localización en la célula es incierto. Sin embargo, debido a que la reacción libera 6 protones del agua, se ha propuesto que la enzima se encuentra en el periplasma (Hooper y DiSpirito, 1985).

1.7.2 Azufre

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



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

- i. Enzimas solubles tipo oxigenasa (azufre oxidasa) reportada en *Thiobacillus thioparus*, *Thiobacillus novellus* y *Thiobacillus thiooxidans*.
- ii. Sistema multienzimático de membrana, reportado en *Thiobacillus ferrooxidans*

En el primero, las enzimas oxidantes de azufre que se han purificado parcialmente en

Thiobacillus thiooxidans, *T. thioparus* y *T. novellus*, son oxigenasas que contienen hierro. En forma soluble requieren glutatión reducido para su actividad. La localización de la azufre oxigenasa no se ha determinado, sin embargo si se encuentra en la región extracitoplásmica puede eliminarse la necesidad de transportar un sustrato insoluble (S^0) hacia la célula (Takakuwa, 1992).

En el sistema multienzimático se ha identificado tres fracciones necesarias para la oxidación: una fracción de membrana, una fracción soluble y un cofactor piridin nucleotido (Corbett y col., 1987).

I.7.3 Tiosulfato

Las enzimas periplásmicas involucradas específicamente en la oxidación de tiosulfato por *Paracoccus versutus* (enzima A, enzima B, citocromo c_{551} , citocromo c_{552} , citocromo $c_{552.5}$ y oxidoreductasa sulfito:citocromo c) también han sido llamadas sistema multienzimático oxidante de tiosulfato o TOMES (por sus siglas en inglés, Figura I.4 El TOMES permite a *Paracoccus versutus* crecer autotróficamente con compuestos como el tiosulfato o sulfito como única fuente de energía. Este sistema ha sido caracterizado bioquímicamente lo que ha permitido aclarar el sistema de oxidación de tiosulfato (Kelly, 1997).

I.7.3.1 Sistema multienzimático de oxidación del tiosulfato (TOMES) de *Thiobacillus (Paracoccus) versutus*

Este sistema ha sido descrito con detalle y se ha purificado casi hasta la homogeneidad (Kelly, 1997, Takakuwa, 1992). Está compuesto por una enzima que se une al tiosulfato (Proteína A, 16 kDa) la cual se une a una mol de enzima por una mol de tiosulfato, e interactúa con una segunda enzima (Proteína B; 61 kDa) y citocromos c_{551} (260 kDa) que contiene de cuatro a cinco grupos hemo y c_{552} (56 kDa; que contiene unos tres grupos hemo) para llevar a cabo la producción estequiométrica de sulfato a partir de tiosulfato. Se requiere de los cuatro componentes del sistema para la oxidación del tiosulfato, y cada uno de los componentes comprende del 1 al 2% del total de la proteína de la célula. Los dos componentes multihemo tipo c, son esenciales para el sistema y, aparentemente, funcionan como acarreadores obligados de electrones en el TOMES para transferir los electrones de la oxidación de tiosulfato a los citocromos nativos convencionales tipo c (de los cuáles *Paracoccus versutus* contiene tres: dos

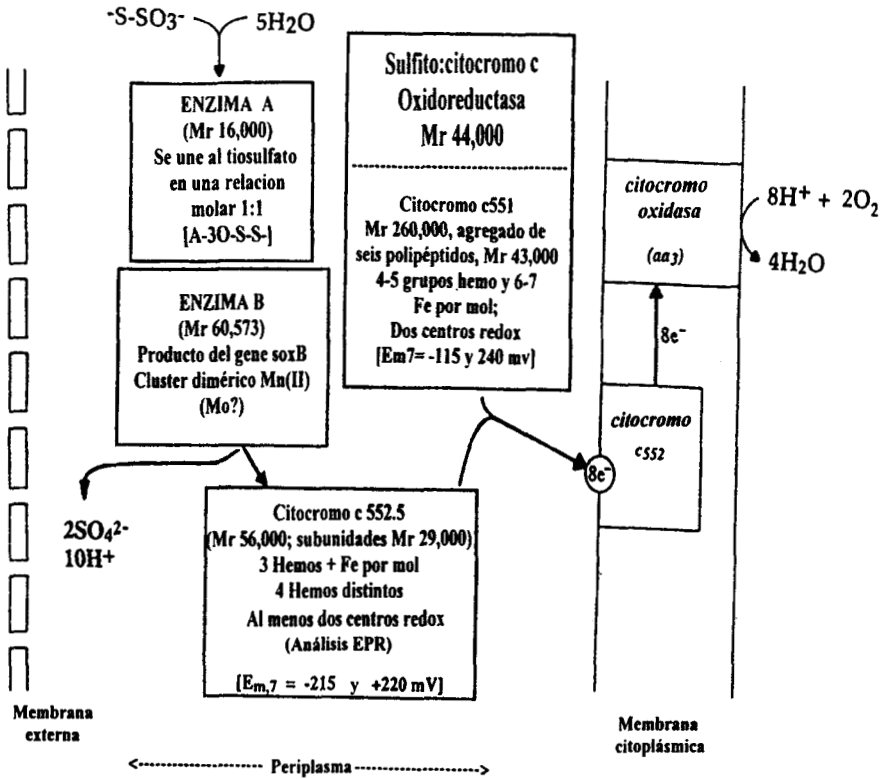


Figura I.4.- Mecanismo propuesto de oxidación de tiosulfato (TOMES) de *Paracoccus versutus*. (Kelly y col. 1997)

solubles y uno unido a membrana) ó al citocromo c de corazón de caballo (el citocromo de caballo actúa como aceptor de electrones en el sistema de ensayo). El proceso total, catalizado por el TOMES, se lleva a cabo de una manera integrada, sin que se hayan identificado intermediarios libres. No se ha detectado actividad individual en ninguno de los cuatro componentes al ser incubados, cada uno por separado, con tiosulfato (solamente se ha observado la unión del sustrato con la enzima A sin que aparentemente haya transformación). Se cree que los complejos proteína-proteína se forman cuando los cuatro componentes actúan coordinadamente para llevar a cabo la catálisis de la oxidación del tiosulfato. La falta de cualquiera de los componentes da como resultado la pérdida total de actividad o bien, una oxidación extremadamente lenta. La actividad específica en términos de la proteína total de los cuatro componentes utilizados, depende del volumen de reacción. En volúmenes pequeños se han observado valores altos de actividad específica, lo que nuevamente es consistente con la formación de complejos proteína-proteína dependientes de la concentración.

La enzima B contiene un "cluster" inusual de manganeso (dimérico, acoplado a un spin), el cual se cree que es un componente clave del centro de reacción de la enzima. Una hipótesis, aún por confirmarse, sugiere que el centro Mn está involucrado en la unión de las moléculas de agua requeridas como donadoras de oxígeno para la conversión del sulfano-azufre (y el grupo SO_3) del tiosulfato al sulfato. También podría estar involucrado un cofactor de molibdeno en el funcionamiento de la enzima B, ya que espectrofotométricamente se han detectado pequeñas cantidades de Mo y, además, la proteína exhibe espectros de fluorescencia similares a los de las oxidasas que contienen molibdopterinas. Se ha observado que ciertas mutantes de *Thiosphaera* (ahora *Paracoccus*) *pantotropha*, una especie relacionada, tienen dañada su capacidad de oxidación de tiosulfato (así como de formato y xantina). Estas mutantes son ineficaces en la síntesis del cofactor de molibdeno requerido para la oxidación de estos sustratos. Se han identificado los genes que codifican para la oxidación de azufre en *Paracoccus denitrificans* y la enzima B de *Paracoccus versutus* es idéntica al producto del gene *soxB* de *Paracoccus denitrificans*. Esto ha permitido una mejor comprensión de las estructuras de la proteína, la cuál se piensa que es un monómero con un peso molecular de 61 kDa (Wodara y col., 1994).

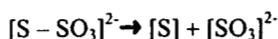
1.7.3.2 Mecanismo de acción del TOMES de *Paracoccus versutus*

Actualmente se proponen dos mecanismos de acción del TOMES, el cual es común en *Paracoccus denitrificans*, *Paracoccus versutus*, *Paracoccus pantotropha* y algunos otros oxidadores facultativos del tiosulfato.

En el modelo 1, el paso inicial es el rompimiento hidrolítico de la unión S-S para liberar el sulfato y una forma unida de [S]. En el modelo 2, el ion S-S completo se une a la enzima B y el grupo sulfano posiblemente es oxidado hasta $[\text{SO}_3]^{2-}$ antes del rompimiento del enlace S-S. Los dos modelos se presentan a continuación (Kelly, 1997, Takakuwa, 1992).

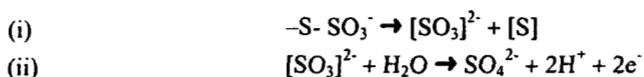
Los compuestos en los corchetes representan posibles intermediarios unidos a proteínas.

Modelo 1, A y B:

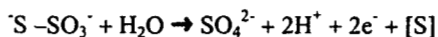


Esto puede ocurrir con o sin la producción del ion sulfito (unido a la enzima) como un intermediario

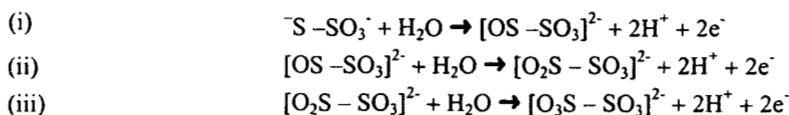
En 1 A:



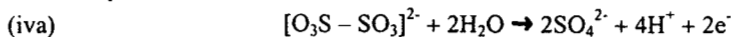
O 1B



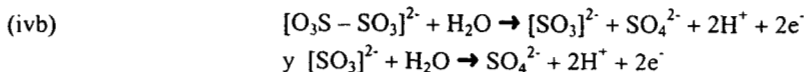
Modelo 2



Entonces puede ocurrir:

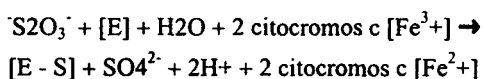


o

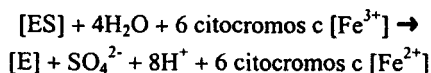


En el modelo 2, el rompimiento del enlace S-S, para liberar el grupo SO_3^- original del tiosulfato como sulfato, puede ocurrir en cualquier paso intermedio, más que ser acarreado lo más posible hasta el estado $[\text{O}_3\text{S} - \text{SO}_3]^{2-}$. Al medir mediante pruebas de tiempos cortos en el sistema

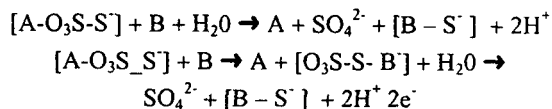
completo, la reducción inicial del citocromo c de corazón de caballo, se observó en tiempos de 1 y 2 segundos una explosiva reducción del citocromo seguida por un incremento lineal lento de la absorbancia a 550 nm. Esta reducción inicial rápida corresponde entre 10 y 20 % del total de la reducción del citocromo c registrada y puede dar una clave del mecanismo inicial de ataque. La observación es semejante al ejemplo clásico de la hidrólisis del acetato *p*-nitrofenil catalizado por la quimi tripsina, donde la formación del primer producto es sumamente rápida, seguida por la lenta formación de un segundo producto. Así la oxidación del tiosulfato y la concomitante reducción del citocromo c de corazón de caballo (y por tanto la liberación de electrones) puede ocurrir en dos pasos, uno lento precedido por uno rápido: en el estado estacionario del ensayo, solo la velocidad de reacción del paso lento puede ser medida. Esto puede aplicarse al mecanismo de acción del modelo uno, en el cual, la rápida unión inicial del tiosulfato (enzimas A y B), el rompimiento del enlace S-S y la producción de sulfato a partir de la oxidación del sulfonato va acompañado por una explosiva reducción del citocromo c:



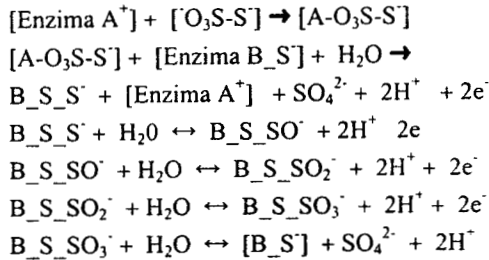
(donde [E] = TOMES) y este paso inicial puede ser seguido por un lento paso de reducción de citocromo:



Los trabajos de Wood y Kelly (1987); Kelly y Wood (1994) indican que la unión de tiosulfato a la enzima A, probablemente sea a través del grupo sulfonato [A₃OS-S⁻]: consecuentemente, la transferencia de S- a la enzima B puede resultar en una liberación temprana del grupo sulfonato como sulfato (por una variante del modelo 1):

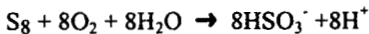


En general, la posible secuencia de oxidación, (para el modelo 1), puede ser la siguiente:

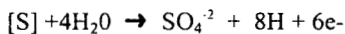


I.7.3.3 El papel central del azufre y la conversión del sulfano azufre a sulfato

Los antiguos esquemas de la ruta de los politionatos y la mayoría de los estudios bioquímicos relacionados, no han podido explicar la oxidación del azufre a nivel de oxidación [S] (el estado de oxidación cero, como en el átomo central sulfano de los politionatos: $\text{O}_3\text{S-S-Sn-SO}_3^-$, y en el azufre mismo a sulfito o sulfato. La única enzima caracterizada de varias fuentes es la azufre oxidasa de varios thiobacilli y *Sulfolobus*, la cual cataliza la oxidación directa del azufre para producir sulfito.



El significado fisiológico de esta enzima en la oxidación del azufre es incierta, ya que no puede soportar la síntesis de ATP o la generación de equivalentes reductores para la biosíntesis y puede verse como un "deshecho" de energía libre potencialmente disponible para la oxidación del azufre del nivel 0 al nivel 4 de oxidación. También es obvio que no tiene significancia en bacterias como *Thiobacillus denitrificans*, el cual puede oxidar anaerobicamente compuestos de azufre inorgánico a expensas de la reducción de nitrato o de otros compuestos de nitrógeno aceptores oxidados (por ejemplo N_2O). El TOMES de *Paracoccus versutus* no contiene a la azufre oxidasa, ya que la enzima B del sistema parece llevar acabo la conversión sulfano azufre (o tiosulfato o sulfuro) a sulfito/sulfato por medio de una secuencia de pasos de hidratación y deshidrogenación en la superficie de la enzima



De manera similar Beffa y col. (1991, 92,93) han publicado argumentos consistentes basándose

en gran medida en la actividad oxidadora del azufre y el efecto de inhibidores, sobre el papel del azufre elemental como un intermediario común en la oxidación de compuestos de azufre en varias cepas de *thiobacilli* y *Paracoccus*. Estos autores también proporcionan evidencia de que la oxidación de este "azufre" intermediario no es catalizado por una oxigenasa, sino por las reacciones oxidativas de la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, posiblemente a diferentes niveles redox, dependiendo del organismo involucrado (por ejemplo en quinona/citocromo b o en citocromo c) como se ha demostrado previamente. El problema central del mecanismo de oxidación de azufre, que aún está por resolverse, es el medio por el cual el azufre (a nivel de oxidación del azufre) es transformado a SO_3^{2-} (o posiblemente directamente a SO_4^{2-}). Las enzimas del TOMES de *Paracoccus versutus* (y *Paracoccus denitrificans*) producen sulfato a partir del tiosulfato, pero el mecanismo detallado del proceso aún permanece sin resolver. Schneider y Friedrich (1994) reportaron una sulfuro deshidrogenasa en *Paracoccus denitrificans*, la cual es copurificada con la proteína sox B, lo cual sugiere que esta actividad enzimática es una función de la enzima B de *Paracoccus*. La oxidación del sulfuro por la deshidrogenasa produce sulfato como único producto detectable, con la reducción de ocho moles de citocromo c_{550} de corazón de caballo por mol de sulfato formado, lo cual es consistente con la liberación de ocho electrones por mol, que son requeridos para la oxidación completa de sulfato de cada ion sulfuro.

1.7.3.4 Ruta de los politionatos: La complejidad de la oxidación del proceso de oxidación de tiosulfato: observaciones con células completas de *Thiobacillus neapolitanus* oxidadoras de ^{35}S -tiosulfato

En los ahora estudios clásicos de la oxidación de ^{35}S -tiosulfato por *Thiobacillus neapolitanus*, Kelly y Syrett (1966) reportaron una producción más rápida de sulfato del grupo sulfonato del tiosulfato que del átomo sulfano y que "nuevo" tiosulfato fue formado durante la oxidación del tiosulfato, en el cual ambos átomos del tiosulfato derivaron del azufre-sulfano del sustrato inicial. Esto significa que en las últimas etapas de la oxidación del tiosulfato, el tiosulfato inicial marcado que proporciona un $-\text{S}_*-\text{SO}_3^-$ (donde * señala la posición del ^{35}S) no se detectó en el medio, sin embargo si se detectaron concentraciones de tiosulfato de "novo"

Kelly y col. (1997) estudió la oxidación de tiosulfato marcado (^{35}S) por *Thiobacillus neapolitanus* y mostró los diferentes intermediarios que se detectaron. Una secuencia de las reacciones por este microorganismo se puede observar en la Figura 1.5. Se puede agregar lo siguiente: en muestras que se tomaron entre los 4 y 5 minutos el único tiosulfato presente derivó

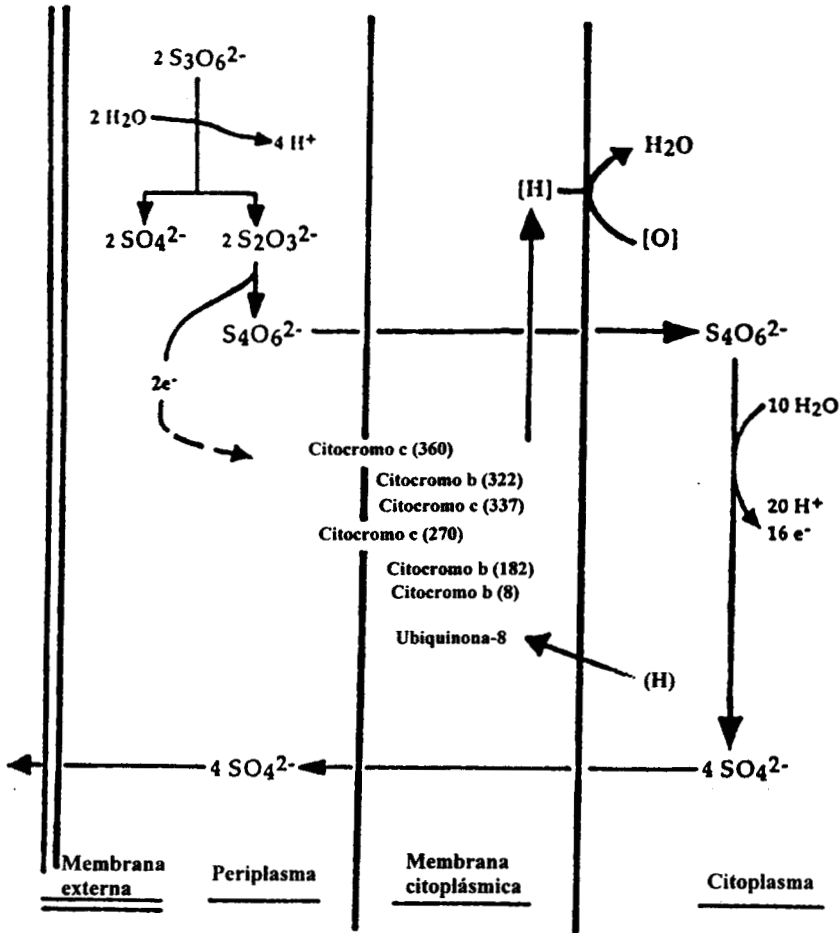
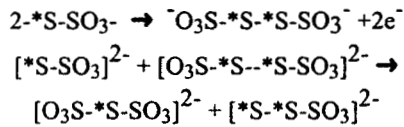


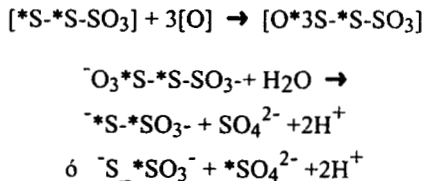
Figura I.5. Mecanismo propuesto para la oxidación de tiosulfato por *Thiobacillus lapidarius*. El número en los paréntesis después del nombre del citocromo indica los potenciales medios (E_m). (Kelly y col. 1997)

exclusivamente del grupo *S de (*S-SO₃)²⁻. La formación de tritronato fue mayor a partir de la forma (*S-SO₃)²⁻ que de la forma -S-*SO₃⁻ y terminó la formación, cuando se agotó el tiosulfato marcado. La degradación del tritronato derivado de -S-*SO₃⁻ no mostró movimiento del átomo S marcado. Sin embargo con (*S-SO₃)²⁻ se presentó un marcado progresivo del grupo -SO₃⁻ del -*S que alcanzó su máximo valor en el tiempo en el que se agotó el tiosulfato.

Mientras que estas observaciones no excluyen la posibilidad de azufre elemental como un intermediario en la oxidación del [S-] del tiosulfato, y no hay evidencia directa que explique el mecanismo de conversión de [S-] a [-SO₃], una explicación alternativa puede ser la producción de [S-S-SO₃]²⁻ por una reacción de condensación catalizada por una enzima entre el tetratronato (producido de la oxidación de tiosulfato) y tiosulfato.



Un intermediario podría ser el ácido monosulfónico disulfano (HSSSO₃⁻) ya que se ha propuesto que esta involucrado en la oxidación de sulfuro inorgánico en los thiobacilli acidofilicos. La oxidación de este intermediario monosulfonato disulfano (marcado en dos posiciones) a tritronato puede ocurrir seguido de un rompimiento para dar sulfato y tiosulfato y la producción de tiosulfato marcado: ^-*S-SO₃⁻



Este sistema podría ser análogo al propuesto para la oxidación del sulfano unido a la enzima en el sistema de *Paracoccus*, y podría no requerir azufre libre como un intermediario (Baker y col., 1988).

Cuando *Thiobacillus neapolitanus* oxida -*S-SO₃⁻ en presencia de azufre elemental no marcado, el ³⁵S no puede ser recuperado de la "trampa" de exceso de azufre elemental, aunque ambos sustratos se oxidan simultáneamente y la marca se distribuye entre los grupos ^-S y -SO₃ del

tiosulfato y tritionato igual que lo hacen en ausencia de azufre. Esto no excluye la posibilidad de encontrar al azufre elemental intracelular como un intermediario, pero se puede inferir que el azufre externo entra a la célula en una forma soluble que posteriormente no puede ser intercambiable con el azufre que esta fuera de la célula.

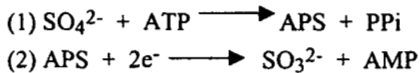
Estos datos sirven para mostrar que no hay una manera simple de probar la verdadera naturaleza química de los intermediarios de la oxidación inorgánica del azufre.

I.7.4 Sulfito

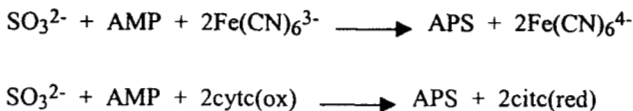
Se han establecido dos mecanismos básicos para la oxidación microbiana de sulfito a sulfato. Uno es la oxidación de sulfito dependiente de AMP, catalizada por la reductasa Adenosina-5-fosfosulfatasa (APS). El otro mecanismo es la oxidación de sulfito independiente de AMP, catalizada por la sulfito-citocromo c oxidoreductasa, o bien sulfito-férrica oxidoreductasa (Lyric y Suzuki, 1970, Suzuki 1999)

- Oxidación de sulfito dependiente de AMP

La APS reductasas, descubierta en *Desulfovibrio desulfuricans*, cataliza la reducción de APS, formado por la APS sulfurilasa, a sulfito de acuerdo con las siguientes reacciones:



En la dirección contraria, la APS reductasa participa en la oxidación de sulfito a sulfato en ciertos thiobacilli y algunas bacterias fotosintéticas. Esta oxidación de sulfito a APS, dependiente de AMP, por la APS reductasa generalmente es medida por la reducción dependiente de AMP de ferrocianuro o ferrocitocromo c en presencia de sulfito, como se muestra en las siguientes reacciones:



El potencial redox ($E_0=60$ mV) de la segunda reacción es suficiente para reducir tanto el ferriciacuro como el ferricitocromo c, sin embargo no se conoce su aceptor fisiológico de electrones.

Entre las bacterias del azufre incoloras, la actividad de APS-reductasa dependiente de AMP ha

sido observada en *Thiobacillus denitrificans* y *Thiobacillus thioeparus*. y en *Thiobacillus thiooxidans* (Lyric y Suzuki, 1970; Adachi y Suzuki, 1977)

La enzima purificada de *Thiobacillus thioeparus* contiene 1FAD, de 8 a 5 fierros inestables por enzima de 170 000 Da. Una enzima similar se obtuvo de *Thiobacillus denitrificans*. Es interesante que el contenido intracelular de la APS reductasa sea muy alto, aproximadamente el 3% del total de la proteína celular en *Thiobacillus thioeparus* y del 4 al 5% en *Thiobacillus denitrificans*, similar al encontrado para *Desulfovibrio desulfuricans*. No se conoce el significado fisiológico de este alto contenido intracelular de la APS.

- Oxidación de sulfito independiente de AMP

La oxidación de sulfito, independiente de AMP, fue observada por primera vez en *Thiobacillus novellus*, un autótrofo facultativo (Lyric y Suzuki, 1969). La enzima reduce, estequiométricamente, ferrocianuro o citocromo c por oxidación de sulfito, sin AMP de acuerdo con la siguiente ecuación:



Posteriormente, se demostró que el citocromo c_{551} es parte integral de la enzima ya que la separación del citocromo c_{551} de la enzima purificada, provoca la pérdida completa de su actividad. Esto confirma que los electrones son transferidos del sulfito al oxígeno molecular a través de la reductasa sulfito-citocromo c, c_{550} (Yamanaka y col., 1981).

Toghrol y Southerland (1983) purificaron la sulfito oxidasa de *Thiobacillus novellus* y se encontraron que es una molibdeno proteína de peso molecular de 40 kD. La presencia del molibdeno como un componente activo de la enzima fue demostrada por estudios espectroscópicos de resonancia magnética electrónica. En tanto la oxidoreductasa sulfito-citocromo c (sulfito deshidrogenasa) de *Thiobacillus thioeparus* tiene un peso molecular aproximado de 54kD y contiene un grupo fierro no hemo.

1.8 Métodos biológicos de eliminación de compuestos reducidos de azufre

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

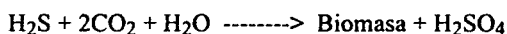
- oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas.
- oxidación anaerobia por microorganismos denitrificantes

- oxidación por un proceso químico-biológico
- oxidación aerobia por bacterias incoloras del azufre.

I.8.1 Oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas

Cork y Col. (1986) propusieron el uso del microorganismo anaerobio fotosintético *Chlorobium limicola* var. *thiosulfatum* que oxida al H₂S a azufre elemental. Al utilizar cultivos en lote y en continuo mostraron que el control de las velocidades de entrada del gas y la cantidad de luz del bioreactor son determinantes para la optimización de la eliminación del compuesto. El gas tratado tuvo la siguiente composición: 3.0% de H₂S, 9.2% de CO₂, 86.4% de N₂ y 0.5% de H₂. Se encontró que 67.1 % del H₂S fue convertido a azufre elemental mientras 32.9% permaneció como compuestos azufrados solubles en agua.

Kim y Col. (1990) inmovilizaron células de *Chlorobium limicola* var. *thiosulfatum* en un soporte inerte para oxidar H₂S en azufre elemental. Observaron acumulación de sulfato debido a la siguiente reacción:



Reportaron que la acumulación de azufre o sulfato está en relación de la energía lumínica y la velocidad de alimentación de H₂S.

Khana y col. (1996) proponen un proceso de recuperación de azufre elemental a partir de la oxidación de tiosulfato de aguas "amargas". Para ello utilizan bacterias fotótrofas y bacterias sulfato reductoras. El proceso consiste en la oxidación del tiosulfato en azufre elemental y sulfato por la bacteria *Chlorobium limicola* f. *thiosulfatophilum*. El azufre se recupera, mientras el sulfato se reduce a sulfuro por la bacteria sulfato reductora: *Desulfovibrio desulfuricans*. Finalmente el sulfuro se fotooxida a azufre elemental por *Chlorobium limicola*. Ambos microorganismos coexisten simbióticamente en el reactor fotosintético

Sánchez y col. (1996) reportan la operación de un sulfidostato (quimiostato con control de concentración de sulfuro) para la oxidación de H₂S con la bacteria fotótrofa *Chromatium vinosum*. El control se logró mediante una sonda redox y diferentes niveles de luminosidad.

La mayor desventaja en el uso de bacterias fotosintéticas a gran escala se debe a sus requerimientos de energía radiante y por lo tanto a la necesidad de una gran superficie de contacto con ella en los reactores.

1.8.2 Oxidación por un microorganismos denitrificantes

Thiobacillus denitrificans es un microorganismo autótrofo estricto y de respiración facultativa. Bajo condiciones anaerobias el nitrato se utiliza como un aceptor final de electrones con reducción a nitrógeno molecular, con el tiosulfato, azufre elemental y el ácido sulfhídrico como fuentes de electrones con la oxidación a sulfato (Sublette y Silvester, 1987).

Sublette y Silvester (1987) reportaron el crecimiento anaerobio de *Thiobacillus denitrificans* sobre ácido sulfhídrico en un reactor continuo de tanque agitado. Encontraron que la eliminación del H₂S del gas alimentado nunca fue menor al 2% y que la concentración de la biomasa así como las condiciones ambientales del proceso respiratorio anóxico son las variables más importantes para la maximización de la desulfuración del gas. Por otro lado observaron que la contaminación con organismos heterótrofos no tuvo un efecto importante sobre el crecimiento de *Thiobacillus denitrificans*, lo que hizo innecesario las operaciones de esterilización del cultivo.

Ongcharit y Col. (1989) desarrollaron un procedimiento de inmovilización de células para *Thiobacillus denitrificans* en un cultivo mixto con bacterias heterótrofas cuya característica es la formación de agregados con buenas características de sedimentación. El cultivo mixto fue crecido en condiciones aerobias sobre tiosulfato como única fuente de energía y sin ninguna fuente de carbono orgánica en un cultivo en lote. Se supuso que los heterótrofos utilizan los productos de desecho de *Thiobacillus denitrificans* o bien los productos de la lisis celular como fuente de carbono y energía. Los agregados fueron posteriormente utilizados para la eliminación de H₂S de una corriente de aire en un reactor continuo de tanque agitado con reciclado de la biomasa. Debido a que el H₂S es un inhibidor del crecimiento de *Thiobacillus denitrificans* el reactor de células inmovilizadas fue operado en condiciones limitadas de sulfuro. La velocidad de acumulación de la biomasa fue mucho menor que la esperada bajo condiciones de operación óptimas. La probable explicación fue la muerte celular por la limitación de nutrientes y las elevadas concentraciones de biomasa que provocaron limitaciones en la transferencia de masa. Observaron una productividad volumétrica máxima de 3.2 mmol H₂S/l h con una eficiencia de eliminación de H₂S del 90.7%. Se encontró también que la acumulación de sulfato en el medio puede provocar un efecto inhibitorio de oxidación de H₂S aparentemente debida a un fuerte efecto iónico.

Sublette (1990) aplicó un proceso de planta piloto para el tratamiento de biogas producido en un digestor anaerobio. El bioreactor consistió de una columna que recibió una corriente gaseosa compuesta del biogas mas aire. El gas alimentado contenía menos de 9% de oxígeno, ya que la

combinación con otros compuestos del biogas, como el metano, puede ser peligrosa debido a la naturaleza explosiva de tales mezclas. La productividad volumétrica fue de 1.1 mmol(H₂S oxidado)/l h, alcanzándose un eficiencia solo de un 0.15% de eliminación del ácido.

Candenhead y Sublette (1990) describieron un estudio donde evaluaron especies de *Thiobacillus* (*Thiobacillus thioparus*, *Thiobacillus versutus*, *Thiobacillus neopolitanus* y *Thiobacillus thiooxidans*) con el propósito de determinar si alguno de ellos presentaba ventajas sobre *Thiobacillus denitrificans* en la oxidación aerobia del H₂S. La estequiometría de la oxidación de H₂S fue determinada en un reactor en lote de 1.5 l suministrado con un gas compuesto de 1% de H₂S, 5% de CO₂ y el balance de nitrógeno adecuado. Ninguno de los organismos estudiados ofreció clara ventaja sobre *Thiobacillus denitrificans* ya que todos los microorganismos estudiados mostraron bajos rendimientos de crecimiento.

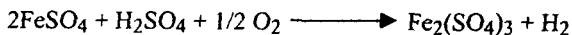
I.8.3 Oxidación por un proceso químico-biológico

Imazumi (1986) describió un proceso de eliminación de H₂S utilizando un proceso químico-biológico utilizando una solución férrica y el microorganismo *Thiobacillus ferrooxidans*.

El proceso es básicamente dependiente de la reacción del H₂S inyectado en una solución férrica donde se produce un precipitado de azufre elemental:



El azufre elemental es separado y recuperado de la solución reducida de sulfato ferroso. Por su parte el sulfato férrico Fe₂(SO₄)₃ es regenerado a partir de la solución de sulfato ferroso por la oxidación biológica, en un bioreactor aireado, efectuada por *Thiobacillus ferrooxidans*:



La solución oxidada se recicla para repetición del proceso. Se ha reportado una eficiencia del 99% de eliminación del sulfhídrico en su aplicación industrial.

Schäfer-Treffenfeldt y col. (1984) propusieron un proceso para la eliminación de sulfuro de hidrógeno de gases residuales, mediante la oxidación microbiana de acuerdo al siguiente procedimiento: primero, el gas con sulfuro de hidrógeno es disuelto dentro de una solución acuosa de sales de un metal pesado; el H₂S precipita inmediatamente como un sulfuro metálico insoluble. Por ejemplo, cuando se usa sulfato cúprico como sal metálica, precipitará el sulfuro

de cobre. Este sulfuro de cobre puede ser oxidado biológicamente por *Thiobacillus ferrooxidans*. Los resultados obtenidos en estos experimentos fueron, una velocidad de oxidación de sulfuro de cobre de 200 mg $\text{Cu}^{2+}/\text{l}\cdot\text{h}$, esto es aproximadamente 100 mg $\text{S}^{2-}/\text{l}\cdot\text{h}$ y con una velocidad de aireación de 1 vvm se tiene una capacidad de eliminación de 1.75 g $\text{H}_2\text{S}/\text{m}^3\text{gas h}$.

I.8.4 Oxidación por bacterias "incoloras" del azufre

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

Un factor importante a considerar del proceso a desarrollar es si estas bacterias almacenan o no el azufre de la oxidación parcial de los compuestos reducidos de azufre dentro de la célula. Especies del género *Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Thiospira* acumulan el azufre producido en la célula, consecuentemente dificultan cualquier proceso ya que por una parte deberá de producirse una gran cantidad de biomasa por eliminada y el azufre no puede fácilmente separarse de la biomasa. Por esta razón las bacterias son seleccionadas con la característica de que el azufre producido sea excretado al medio, un ejemplo son los microorganismos del género *Thiobacillus*. No se necesitan factores ambientales especiales para el crecimiento de este género de microorganismos. Diferentes especies tienen actividad en intervalos de pH que van de 0.5 a 10 con temperaturas entre 20 y 75 °C. La mayoría son autótrofas, pero también pueden crecer heterotróficamente. Se encuentran en diferentes ambientes: suelo, agua, desechos ácidos y aguas sulfurosas. Estos microorganismos pueden obtener energía de diferentes compuestos como el H_2S , CS_2 , tiocianato, azufre elemental, tiosulfato, politionatos y sulfito. El producto final de la oxidación es sulfato pero el azufre y los politionatos se acumulan bajo ciertas condiciones de crecimiento.

Buisman y Col. (1989) desarrollaron un proceso biotecnológico para la eliminación de H_2S utilizando microorganismos del género *Thiobacillus*. El proceso está basado en la oxidación del H_2S y su conversión en azufre elemental, el cual puede ser recuperado por sedimentación. Encontraron que el azufre elemental y el sulfato son los principales productos de la oxidación biológica del H_2S . Utilizaron dos reactores con agitación y alimentación continua de igual

construcción variando exclusivamente el volumen y las cantidades de partículas de soporte inerte (poliuretano) para los microorganismos. La etapa de arranque de este sistema biológico fue muy corta, sólo son necesarios cuatro días para reducir la concentración de sulfuro de 100 a 2 mg/l con un tiempo de residencia de 22 minutos. Evaluaron algunos factores ambientales reportando los siguientes datos: el pH óptimo se encontró de 8.0 a 8.5; la temperatura en el intervalo de 25 a 35 °C. No se observó inhibición por H₂S a concentraciones superiores de 100 mg/l del ácido. Reportaron también que al incrementar la concentración del oxígeno las velocidades de oxidación del H₂S se incrementaron proporcionalmente, reportando que a una concentración de 3 mg/l de O₂ y a un pH de 8.5 la capacidad de eliminación del H₂S fue de 99 mg/l h con una eficiencia del 95%.

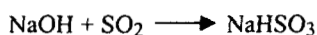
Buisman y col. (1990) estudiaron el efecto de diversos factores sobre el cultivo con la finalidad de determinar su importancia en la optimización de la producción de azufre. Los factores evaluados fueron: la concentración de oxígeno, la concentración de H₂S y la utilización de un sistema con partículas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

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

Buisman y Col. (1994), reportaron un proceso biológico para la desulfuración de gas de combustión (SO₂), a nivel planta piloto y con proyecciones a su aplicación industrial en una termoeléctrica con capacidad de producción de 600 MW. El proceso consta de cuatro secciones, en ese orden:

- una sección de absorción del SO₂
- un reactor biológico anaerobio
- un reactor biológico aerobio
- una sección de recuperación de azufre.

En la sección de absorción el SO₂ es solubilizado en una corriente acuosa básica produciéndose una solución rica en sulfito, de acuerdo a la siguiente reacción:



En el primer bioreactor, en condiciones anaerobias, se lleva a cabo un proceso de reducción del SO₃ con la formación de H₂S de acuerdo a la siguiente reacción (en esta etapa es necesario adicionar determinados compuestos que sirvan como donadores de electrones, básicamente compuestos orgánicos como etanol, los cuales son transformados en bióxido de carbono y biomasa):



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



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

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

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

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

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

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

Cho y col. (1995) compararon la capacidad de dos cepas para oxidar H₂S, *Thiobacillus denitrificans* (cepa F) y un consorcio (LACT-10) aislado de aguas "amargas". Se caracterizó el consorcio con respecto a la oxidación de H₂S, respuesta al oxígeno, pH, temperatura y tolerancia al sulfuro. El consorcio mostró ser estrictamente aerobio y crecer en H₂S como fuente de energía con la oxidación completa a sulfatos. El consorcio LACT-10 presentó tanto ventajas como desventajas respecto a la cepa F para la remediación del agua amarga. Por ser LACT-10 estrictamente aerobia (no creció bajo condiciones anaerobias) su uso está limitado para ambientes con suficiente oxígeno o que pueden ser aireados eficientemente. La cepa F puede ser utilizada en ambientes anóxicos con nitrato como aceptor final de electrones. Bajo condiciones

aeróbicas, LACT-10 ofrece la ventaja de una temperatura más alta (35 C) y un intervalo de pH más amplio (3.5-10) con respecto a la cepa F (30 C y pH 6-8.8). Tanto LACT-10 (3.1 mM) y *Thiobacillus denitrificans* cepa F (2.5 mM) tienen una tolerancia al sulfuro comparable y mayor que la cepa de *Thiobacillus denitrificans* (0.1-0.2 mM).

Degorce-Dumas y col. (1997) estudiaron la oxidación biológica de sulfuro de hidrógeno en un biofiltro empacado con sedimento de aguas residuales seco (BSE), caracterizaron la microbiología del biofiltro y estudiaron los efectos de algunos parámetros sobre la colonización y sobre la eficiencia del biofiltro. El efecto de la acidificación (causada por la acumulación de los productos de oxidación) también fue estudiado. Finalmente, la población microbiológica de los biofiltros utilizando turba y lodo activado como soporte fueron comparadas, así como su eficiencia de eliminación. La eficiencia de eliminación de H₂S del biofiltro puede ser correlacionada con la población inicial y su evolución. Los estudios concernientes a la evolución de thiobacilli en el biofiltro mostraron que los autótrofos no acidófilos son capaces de multiplicarse dependiendo de la velocidad volumétrica de carga. La velocidad de oxidación decrece cuando ocurre la acidificación del empaque, seguido por la multiplicación de autótrofos acidófilos. Amortiguando el pH del empaque cercano a un pH neutro se duplica el periodo de alta eficiencia (95%). Bajo estas condiciones se favorece el crecimiento de thiobacilli no acidófilos, sugiriendo la correlación entre la eficiencia de eliminación y la presencia de bacterias no acidófilas. La baja eficiencia de los biofiltros convencionales empacados (materia orgánica, por ejemplo turba) comparado con BSE, se puede explicar por su baja población inicial. La biomasa requiere de 2-4 semanas para adaptarse a las condiciones de operación. Sin embargo, el BSE contiene más nutrientes disponibles para el crecimiento microbiano, por lo tanto, su adición no es necesaria. La eficiencia de remoción completa fue obtenida en el intervalo de 2-3 kg H₂S/m³d, con azufre elemental y sulfato como productos principales. La heterogeneidad del empaque es útil para varias aplicaciones industriales, por ejemplo, para el tratamiento de corrientes gaseosas que contengan compuestos azufrados, mercaptanos ó VOC's.

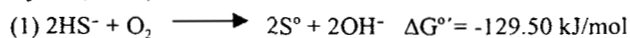
Konishi y col. (1994) estudiaron la cinética de la oxidación de azufre elemental por *Thiobacillus ferrooxidans* en un reactor lote midiendo la concentración de células adsorbidas a la superficie del azufre, la concentración de células en el medio líquido y la cantidad de azufre oxidado. Como el azufre elemental fue oxidado a sulfatos, la concentración de células libres en la fase líquida aumentó con respecto al tiempo, mientras que la concentración de células adsorbidas por unidad de peso tienen un valor límite. Durante la oxidación de azufre hubo una correlación cercana entre la concentración de las células adsorbidas y libres, estos datos fueron correlacionados con un modelo cinético de crecimiento y oxidación relacionados a la adsorción

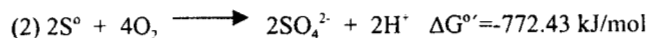
de células (isoterma de Langmuir). Las velocidades observadas del crecimiento por lotes y la oxidación de azufre elemental fueron consistentes con el modelo cinético, asumiendo que la velocidad de crecimiento de las bacterias adsorbidas es proporcional al producto de la concentración de células adsorbidas y la fracción de sitios de adsorción desocupados por las células. Los parámetros cinéticos y estequiométricos que aparecen en el modelo fueron evaluados usando datos experimentales. La concentración de células adsorbidas está relacionada con la concentración de células libres, aunque la isoterma de Langmuir demostrara que la adsorción bacteriana estaba en equilibrio durante la oxidación de azufre. Las velocidades de crecimiento y oxidación de azufre observadas fueron cuantitativamente explicadas por el modelo cinético. Los parámetros cinéticos fueron $\mu_A = 1.6 \text{ d}^{-1}$ y $Y_A = 6.25 \cdot 10^{14} \text{ cél./Kg S}^0$. Revah y Col. (1995) y Torres y col. (1993) describieron un proceso biológico de eliminación de CS_2 y H_2S de un gas proveniente de la fabricación de celofán y rayón con la conversión a azufre y sulfato. Utilizaron una población mixta de microorganismos aislados de fuentes azufradas y plantas de tratamiento de aguas residuales, enriquecida por inoculaciones sucesivas. Esta población mixta de microorganismos contenía bacterias del género *Thiobacillus*. Las concentraciones de los compuestos azufrados llegaron hasta 1000 ppm de cada uno, alcanzado una eficiencia del 98% de eliminación del H_2S y mayor a 80% de CS_2 . Los estudios en condiciones aerobias permitieron diseñar y construir equipos hasta de $800 \text{ m}^3/\text{min}$ y que llevan operando varios años.

Recientemente se reportan nuevas configuraciones de equipos que permiten tratar altas concentraciones (hasta 2500 ppmv.) de H_2S en aire. Se propuso (Hugler y col., 1999) que dos biolavadores de lecho escurrido (BLE) en serie permiten mantener altas tasas de reacción facilitando el control de la oxidación. Bajo estas condiciones en donde se solubiliza el H_2S del aire existe una alta conversión hacia sulfato. Otras configuraciones de BLE permiten tratar olores de plantas de tratamiento de aguas. Estas corrientes tienen concentraciones muy diluidas de H_2S , otros sulfuros, COVs y compuestos nitrogenados. Las configuraciones del BLE han sido estudiadas por Lobo y col. (1999) en donde se pone en relieve el efecto de los fenómenos de transferencia gas- líquido y reacción.

1.8.5 Recuperación de azufre (S^0) de la oxidación parcial de H_2S

La oxidación biológica de H_2S por microorganismos sulfoxidantes se presenta en dos etapas (Janssen y col., 1997):





Como se observa, debido a que la oxidación a sulfato genera mayor energía útil a los microorganismos, esta reacción es más conveniente para los mismos, ya que es la única forma que tienen de obtener energía para su crecimiento.

1.8.5.1 Condiciones ambientales

La formación de S^0 se prefiere por varias razones observadas en el laboratorio y reportadas en la bibliografía (Janssen, 1997): a) el azufre es insoluble en agua por lo tanto se puede separar de la corriente acuosa que lo contiene; b) asimismo este azufre se puede purificar y reutilizar, lo que le da un valor agregado al proceso; c) evita la acumulación de sulfatos que en concentraciones mayores a 30 g/l tienen un efecto negativo sobre la oxidación, y; d) asimismo la formación de sulfatos necesita de 4 veces más oxígeno y en consecuencia una mayor demanda de energía por la aireación.

Los reportes de Buisman y col. fueron los primeros que se publicaron con este fin (antes señalados). Sin embargo fue hasta 1997, en los trabajos de Janssen y col., que pertenecen al mismo grupo de investigación, donde se reportó un sistema que favoreció la acumulación de S^0 de la oxidación del H_2S .

Janssen y col. (1995) encontraron que bajo condiciones limitadas de O_2 , abajo de 0.1 mg/l, el azufre es el producto final de la oxidación del H_2S , mientras que la formación de sulfato se favoreció por concentraciones limitadas de H_2S . Posteriormente estos autores, (Janssen y col., 1997) reportaron un proceso biotecnológico de máxima recuperación de azufre a partir de la oxidación del H_2S . En este trabajo se diseñó un reactor donde los compartimentos de aireación de la fase líquida y la oxidación de sulfuro a azufre están separados, evitando de esta manera la turbulencia debida a la aireación de la fase líquida. Bajo condiciones autotróficas, y velocidades de carga de sulfuro excedentes a 3.4 g/l d, casi toda la biomasa presente en el reactor se inmoviliza dentro del sedimento de azufre, que consiste principalmente de azufre elemental (92%) y biomasa (2.5%). Ya que la biomasa se retiene en el reactor, se pueden tener velocidades de carga más altas de sulfuro que en los sistemas convencionales de células libres. La velocidad de carga máxima estudiada fue de 14 g HS^- /l d, mientras que para sistemas de células libres la velocidad de carga máxima es 6 g HS^- /l d. Cuando con el influente se adicionaron ácidos grasos volátiles, se acumularon dentro del sedimento bacterias de azufre heterotróficas y bacterias sulfato reductoras, y posiblemente también thioacilli mixótrofos, los cuales utilizan productos

de excreción microbiana como fuente de carbono. La presencia de estos microorganismos reductores provocó un deterioro del sistema. Debido a la actividad anaerobia de las sulfato reductoras, el azufre formado fue parcialmente reducido a sulfuro, lo cual incrementó el nivel de sulfuro en el efluente por lo cual, la velocidad de formación del sedimento de azufre disminuyó. Por esta razón, el principal campo de aplicación de este diseño es en el tratamiento de aguas residuales con sulfuros que no contengan materia orgánica, por ejemplo, aguas de minas y emisiones con ácido sulfhídrico.

Por su parte Visser y col. (1997) observaron que en una cepa pura de *Thiobacillus* sp. W5, aislada de un consorcio de microorganismos sulfoxidantes, la saturación del transporte de electrones se llevó a cabo por la concentración de sustrato (H_2S) en el medio. Así, hasta concentraciones de 10 mmol/lh y menores, la oxidación fue completa hasta sulfatos, sin embargo después de esta concentración el azufre se empezó a acumular en el medio. La concentración máxima, sin que fuera tóxica para la cepa, fue de 30 mmol/l h que a la máxima acumulación de azufre, 28 mmol/l h. Los autores suponen que la oxidación se detiene debido a la regulación de la enzima que oxida al azufre, la cual no actúa debido a que a nivel de citocromos la capacidad máxima de transporte de electrones se encuentra saturada. En este caso el requerimiento de electrones para la generación de energía se satisface con la oxidación del HS^- a S^0 . Takeuchi y Suzuki (1997) han demostrado que la adherencia de *Thiobacillus thiooxidans* al azufre elemental está determinado por la hidrofobicidad de la bacteria y puede ser controlado por la formulación de medio. La adherencia es importante en el paso de oxidación del azufre.

1.8.5.2 Utilización de inhibidores de cadena respiratoria

La oxidación de compuestos reducidos de azufre, el transporte de electrones y el crecimiento están relacionados. Así, cuando se utilizan inhibidores de cadena respiratoria, el crecimiento microbiano se reduce, debido a que se inhibe el sistema del transporte de electrones. De esta manera se satura el transporte de electrones y la oxidación se realiza a menor velocidad, permitiendo la acumulación de S^0 . Varios autores han utilizado el N-etilmaleimida (NEM) para la caracterización de enzimas y para establecer las rutas metabólicas de la oxidación de compuestos reducidos de azufre. En general solamente los grupos sulfhidrilos más reactivos de las proteínas se combinan con compuestos que contienen un enlace doble activado para formar tioéteres estables. El NEM ha demostrado ser muy útil para este propósito. (Riordan y Vallee, 1971).

Lyric y Suzuki (1969) estudiaron las enzimas relacionadas con la oxidación de tiosulfato en extractos de *Thiobacillus thioparus*. Evaluaron diferentes inhibidores de la oxidación de la sulfito oxidasa. La enzima se inhibió fuertemente por inhibidores de grupos sulfhidrilos como el cloruro de mercurio y el p-cloromercuriobenzoato; mientras el NEM presentó un efecto considerablemente menor. La inhibición por arsenito indicó posiblemente la presencia de un grupo ditiol indispensable para la enzima. Los agentes quelantes como el 2,2'-bipiridil y el EDTA resultaron muy potentes inhibidores de la enzima. Lo cual sugirió que hierro "no hemo" presente en la enzima es muy importante para su actividad.

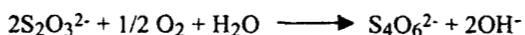
Lyric y Suzuki (1970) aislaron la enzima de oxidación de tiosulfato de *Thiobacillus thioparus* y estudiaron algunas propiedades: efecto de inhibidores, desacoplantes, producto final, pH. La enzima tiene un peso molecular de 15 kD y contiene dos moles de hierro no hemo. Encontraron que el ferrocianuro resulta más eficiente como aceptor de electrones que el citocromo c, lo cual cambia el efecto del pH sobre la enzima. Al respecto, la enzima presentó actividad en un intervalo de pH de 4.5 a 10.0, sin embargo utilizando ferricianuro como aceptor de electrones el pH óptimo fue de 5, mientras que con el citocromo c fue de 7. Cuando utilizaron diferentes inhibidores de la oxidación: NEM, arseniato de sodio, p-cloromercuriobenzoato, 2,2'-bipiridil, EDTA, así como el intermediario y el producto final de la oxidación: sulfito y sulfato respectivamente, encontraron que el sulfito presentó el efecto más interesante. Este intermediario de la oxidación de tiosulfato, en concentraciones de 5 μ M inhibió la actividad en 50%. Proponen una ruta de oxidación donde el tiosulfato se oxida a tetrionato por la enzima de oxidación de tiosulfato, o bien puede seguir otra vía donde el compuesto se oxida a sulfito y azufre elemental, por una enzima no identificada (actualmente se sabe que es la enzima rodanasa).

Hazeu y col. (1988) señalan que una cepa de *Thiobacillus ferrooxidans*, produce extracelularmente azufre elemental a partir de la oxidación de tiosulfato, tritronato, tetrionato y sulfuro en concentraciones entre 10 y 30 μ M. Estas concentraciones de sustrato, no permitieron observar al azufre en microscopía de luz. Sin embargo, cuando se utilizaron concentraciones de 400 μ M fue posible observarlas con esta técnica óptica. Por estudios de respirometría encontraron que la oxidación del tiosulfato, tetrionato y sulfuro fue parcialmente inhibida por NEM. Similares resultados observaron cuando se utilizaron los desacoplantes: cianuro de carbonilo m-clorofenil hidrazona (CCCP) o el 2,4 dinitrofenol. La inhibición por NEM sugirió que las enzimas que contienen grupos sulfhidrilo pueden estar relacionadas en la oxidación de estos compuestos reducidos de azufre. Mientras que la inhibición por desacoplantes señala que la condiciones de la membrana celular o de la proteínas de membrana

desempeñan un papel fundamental de la oxidación. Esto sugiere además que un mecanismo de transporte activo está involucrado en la reacción oxidativa. Evidenciaron además que la ausencia de sulfato o selenato disminuyó la velocidad de oxidación del azufre.

Chan y Suzuki (1993) establecieron la oxidación estequiométrica de sulfuro a azufre por *Thiobacillus thiooxidans*. Este microorganismo oxida al sulfuro en tres distintas etapas de consumo de oxígeno, en cualquiera de los dos valores de pH 2.3 y 6.5, de acuerdo a la oxidación del sulfuro reportada por Suzuki y col (1988): ($S^{2-} \rightarrow S^0 \rightarrow SO_3^- \rightarrow SO_4^{2-}$). Ello hasta completar un consumo de aproximadamente 2 mol de O_2 /mol de sulfuro. La diferencia la establecen en cuanto a rapidez del consumo de oxígeno: una rápida fase inicial donde el sulfuro se oxida a azufre elemental, seguida por una fase lenta y finalmente una fase muy lenta para la conversión a sulfito y sulfato. En presencia de NEM la oxidación de sulfuro se detiene en azufre elemental pues este inhibidor evita la oxidación del azufre. El consumo de 0.5 mol O_2 /mol S^{2-} experimental, coincidió con la estequiometría de oxidación del sulfuro a azufre elemental: $S^{2-} + 1/2O_2 \rightarrow S^0$.

Chan y Suzuki (1994) estudiaron la oxidación de tiosulfato por *Thiobacillus thiooxidans* cultivado en azufre elemental. El sistema fue implementado en células tratadas con inhibidor así como con extractos libres de células. Utilizaron el NEM para establecer la ruta de oxidación del tiosulfato, reportando que las células tratadas con NEM consumen 0.5 mol O_2 /mol de tiosulfato para formar tetratiónato de acuerdo con la ecuación:



Además observaron que el NEM inhibe la oxidación de azufre elemental. Por otro lado reportan que las células de *Thiobacillus thiooxidans* pueden oxidar tiosulfato solamente bajo condiciones ácidas con un consumo de 2 mol O_2 /mol tiosulfato.

Hallberg y col. (1996) estudiaron la oxidación de compuestos reducidos de azufre por *Thiobacillus caldus* KU, utilizando sistemas de células en reposo. La velocidad de consumo de oxígeno y el oxígeno total consumido fueron determinadas para tiosulfato, tetratiónato, azufre, sulfuro, y sulfito en ausencia y presencia de inhibidores y desacoplantes. Los desacoplantes 2,4 dinitrofenol (DNP, 200 M) y cianuro de carbonilo m-clorofenil hidrazona (CCCP, 20 M) no tuvieron efecto sobre la oxidación del tiosulfato, sugiriendo que el tiosulfato es metabolizado en el periplasma. Por el contrario inhibieron completamente la oxidación de tetratiónato, sulfuro, azufre y sulfito, indicando que estos compuestos son metabolizados en el citoplasma. El NEM, en concentraciones de 6 mM, inhibió la oxidación de tetratiónato y tiosulfato en la etapa de

azufre elemental y redujo la velocidad de oxidación de compuestos de azufre en *Thiobacillus caldus* más que en otros acidófilos, mientras que el N-óxido 2 heptil, 4 hidroxiquinolina (HQNO, 10 M) detuvo la oxidación de tetrationato, tiosulfato y azufre elemental en la etapa de sulfito. Encontraron los siguientes intermediarios en la oxidación de compuestos reducidos de azufre: el tiosulfato fue oxidado a tetrationato, el azufre elemental fue formado durante la oxidación de tetrationato y tiosulfato, y el sulfito fue encontrado como intermediario del metabolismo de tetrationato y azufre. Estos datos sugieren que el tetrationato es oxidado a sulfato vía S^0 y SO_3^{2-} por *Thiobacillus caldus*. La secuencia de inhibición de la oxidación de los diferentes compuestos de azufre se representan en la Figura 1.6.

Membrana externa

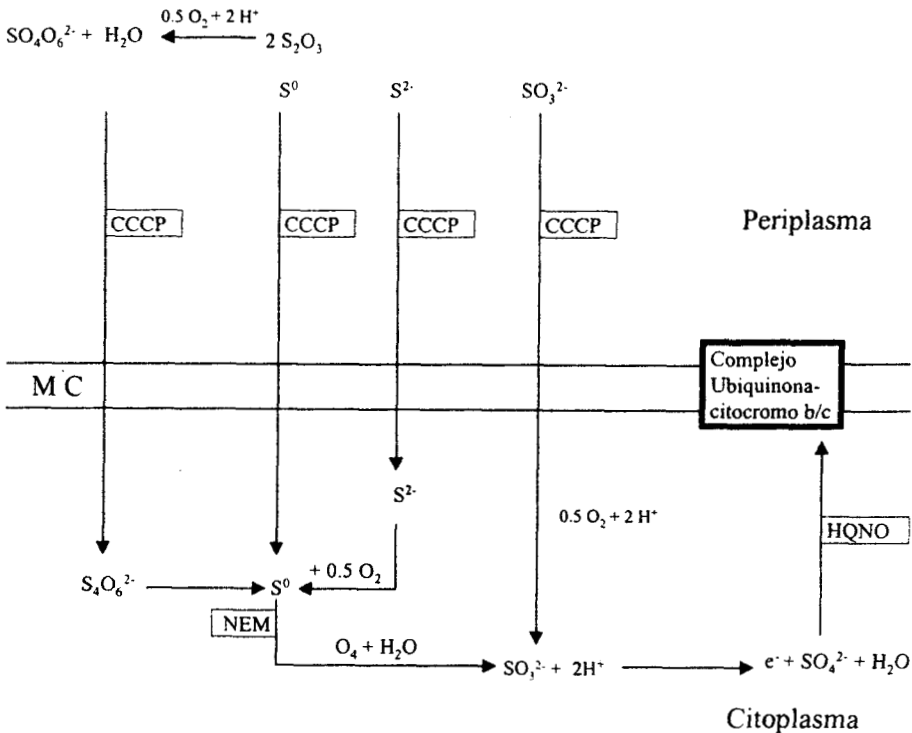


Figura 1.6 Modelo propuesto para el metabolismo de los compuestos reducidos de azufre por *Thiobacillus caldus* (Hallberg y col., 1996).

Visser y col. (1997-a) estudiaron el efecto de inhibidores, entre ellos el NEM (1 mM) y el cianuro de potasio (1 mM), sobre la actividad enzimática de la tiosulfato deshidrogenasa aislada de *Thiobacillus sp W5*, sus resultados muestran que la adición de NEM o cianuro de potasio no inhibieron su actividad. La tiosulfato deshidrogenasa cataliza la reacción de oxidación del tiosulfato a tetrionato. Estos mismos autores (Visser y col., 1997-b) reportan que no hubo inhibición del NEM (1 mM) sobre la actividad de la flavocitocromo c sulfuro deshidrogenasa de *Thiobacillus sp W5*, aún preincubando con el inhibidor durante 5 minutos a 25 °C. En tanto la adición de 25, 100 y 500 μM de cianuro de potasio dio una inhibición de 5, 75, y 95% respectivamente, deteniendo la oxidación en azufre elemental.

II. Objetivos

• Objetivos generales

1. Estudiar la oxidación de los compuestos reducidos de azufre bajo condiciones de quimiolitotrofia utilizando un consorcio sulfoxidante y la cepa de colección *Thiobacillus thioparus* ATCC 26345.
2. Estudiar la regulación de la oxidación de tiosulfato por los microorganismos sulfoxidantes bajo condiciones que permitan la oxidación parcial del compuesto en azufre elemental.

• Objetivos particulares

1. Estudiar las condiciones ambientales que favorecen la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre en condiciones de crecimiento quimiolitotróficas utilizando un consorcio sulfoxidante.
2. Evaluar las tasas de oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre: CS_2 , H_2S , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$, SO_3^{2-} y S^0 utilizando la técnica de respirometría.
3. Evaluar el efecto de la concentración de la fuente de energía sobre el crecimiento y la oxidación de tiosulfato por el consorcio sulfoxidante
4. Evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno sobre la oxidación de tiosulfato por el consorcio sulfoxidante.
5. Evaluar la influencia de sustratos orgánicos sobre el crecimiento y oxidación de tiosulfato por el consorcio sulfoxidante.
6. Identificar los parámetros de control para favorecer la acumulación de azufre elemental por el consorcio sulfoxidante.
7. Evaluar el crecimiento y la oxidación de tiosulfato por el consorcio sulfoxidante en un cultivo continuo utilizando un fermentador agitado.
8. Evaluar el crecimiento y la oxidación de tiosulfato por *Thiobacillus thioparus* ATCC 26345 en un cultivo continuo utilizando un fermentador agitado.
9. Evaluar el efecto de la concentración de oxígeno disuelto sobre la oxidación parcial del tiosulfato de los cultivos sulfoxidantes en quimiostato.
10. Evaluar la influencia de los inhibidores de cadena respiratoria y de las enzimas de oxidación de tiosulfato y azufre elemental sobre la oxidación de tiosulfato por el consorcio sulfoxidante.

III. Material Y Métodos

III.1 Material Biológico

Se utilizó un consorcio de microorganismos sulfoxidantes, el cual se obtuvo de un biolavador de lecho escurrido empacado con un soporte inerte de pvc. Este equipo se utiliza para la eliminación de bisulfuro de carbono y ácido sulfhídrico y estuvo en operación aproximadamente 4 años. Se utilizó además una cepa de colección *Thiobacillus thioeparus* ATCC 23645 obtenida de la American Type Collection.

III.2 Medio de cultivo

Los microorganismos se crecieron en un medio descrito por Sublette (1987), utilizando a los diferentes compuestos reducidos de azufre como fuente de energía: H_2S , CS_2 , SO_3^{2-} , $S_2O_3^{2-}$, S^0 y S_4O_6 . El tiosulfato de sodio se utilizó como modelo de estudio en gran parte del trabajo, dado que permite su manipulación sin riesgos asociados a toxicidad. Es importante señalar que este compuesto se ha utilizado como modelo para estudios de la sulfoxidación (Sublette, 1987; Steffes y col., 1996; Kelly y col., 1997).

La composición del medio es la siguiente (g/l): Na_2HPO_4 1.2, KH_2PO_4 1.8, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1, NH_4Cl 0.5, $CaCl_2$ 0.03, $MnSO_4$ 0.02, $FeCl_3$ 0.02, $NaHCO_3$ 1.0. El tiosulfato se utilizó en una concentración de 20 g/l. Asimismo, para la comparación de las tasas relativas de oxidación la concentración de los compuestos reducidos de azufre fue de 1mM, en las condiciones indicadas en respirometría. Las concentraciones de sulfuro de hidrógeno y bisulfuro de carbono evaluadas fueron de 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mM.

Utilizando al tiosulfato como fuente de energía, las condiciones de cultivo en lote fueron : a) Matraces Erlenmeyer de 100 ml con 20% de volumen de llenado, 10% de inóculo, 30 °C, pH 7 y 180 rpm de agitación. Asimismo se utilizó un fermentador agitado BioFlo New Brunswick III que cuenta con control de oxígeno disuelto (3.8 mg/l), temperatura (30 °C), agitación (variable), pH (7) con 2.5 l de medio.

Las tasas de oxidación fueron calculadas por respirometría.

III.3 Inóculo

Los microorganismos se adaptaron a tiosulfato de acuerdo al siguiente procedimiento: En matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio, se inóculó con 10 ml de licor proveniente del biolavador. Se dejaron crecer por 2 días a pH de 7, temperatura 30 C y 180 rpm de agitación. A continuación, cuando el pH medido se encontraba en 5, los cultivos provenientes de 2

matraces se centrifugaron y se resuspendieron en solución salina estéril. Se llevó a una DO de 1 para posterior inoculación de matraces y fermentador. Igual procedimiento se utilizó para la cepa pura, con un pH inicial de 6 y el pH de recolección fue de 4.

Para el estudio de las velocidades de oxidación de los compuestos de azufre, el inóculo se preparó de la siguiente manera: los microorganismos se tomaron del biolavador de lecho escurrido y se inocularon en matraces Erlenmeyer de rosca de 125 ml utilizando válvulas mininert. Se adicionaron 50 ml de medio, 10% de inóculo, utilizando como fuente de energía al H₂S ó CS₂, 100 mg/l.

III.4 Evaluación del efecto de tiosulfato, extracto de levadura y nitrógeno

En el consorcio se evaluaron concentraciones crecientes de tiosulfato, extracto de levadura y nitrógeno. Para estas evaluaciones se utilizó el medio mineral en matraces Erlenmeyer según las condiciones señaladas en 2.

Las concentraciones de tiosulfato fueron: 0, 10, 20, 30 y 50 g/l.

Las concentraciones de extracto de levadura: 0, 0.1, 0.2, 0.5 y 1.5 g/l.

Para la evaluación de diferentes concentraciones de nitrógeno inorgánico se utilizaron las siguientes sales en las concentraciones indicadas:

Cloruro de amonio 0, 10, 20, 40 y 60 mM.

Nitrato de amonio 0, 10, 20, 40 y 60 mM.

Sulfato de amonio 0, 5, 10, 20 y 30 mM.

Finalmente se evaluó el nitrato de potasio para determinar si se utiliza como fuente de nitrógeno, las concentraciones evaluadas fueron: 0, 10, 20, 40 y 60 mM.

En el fermentador agitado se evaluaron diferentes concentraciones de extracto de levadura en cultivos en lote en concentraciones de 0.5, 1 y 1.5 g/l.

III.5 Efecto de inhibidores de cadena respiratoria.

En cultivos en lote en el consorcio sulfoxidante, se evaluaron los siguientes inhibidores: N-etimaleimida (NEM), un inhibidor de las enzimas de oxidación de azufre elemental y de tiosulfato; cianuro de sodio un inhibidor de cadena respiratoria a nivel de citocromo aa₃; y tiocianato de amonio (SCN), que puede ser utilizado como fuente de energía por algunas especies de thiobacilli. Se cuantificó la acumulación de intermediarios y producto final de la oxidación del tiosulfato en 48 horas de crecimiento.

Las concentraciones evaluadas fueron:

NEM: 0, 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mM

CN: 0, 0.5, 1.0, 2.0 y 2.5 mM

SCN: 0, 10, 20, 30 y 50 mM

En tanto que en cultivo continuo se evaluaron el NEM 0.1 y 0.5 mM, cianuro 0.1 y 0.5 mM y tiocianato de amonio, 10 y 30 mM.

III.6 Cultivo continuo

a. Consorcio. Utilizando un fermentador agitado, BioFlo New Brunswick III, se inició el cultivo continuo del consorcio. Se utilizó una concentración inicial de tiosulfato de 20 g/l y a los 14 días se disminuyó dicha concentración a 10 g/l. El cultivo se inició en lote y cuando se alcanzó la fase estacionaria se inició la alimentación de medio de cultivo. Se evaluaron:

Diferentes tasas de dilución: 0.2, 0.4, 1.2, 2.4, 3 y 3.4 d⁻¹.

Diferentes concentraciones de oxígeno disuelto: 3.4, 2, 1, 0.8, 0.38, 0.2, 0.1 y 0.07 mg/l.

Se evaluó el efecto de la velocidad de carga incrementando la concentración de tiosulfato en el medio a 15, 17.5 g/l.

Se evaluó el efecto de los inhibidores de cadena respiratoria: NEM 0.1 y 1 mM, cianuro 0.1 mM, tiocianato 0-30 mM.

Los estados estacionarios se tomaron cuando se tuvieron como mínimo 2 tiempos de residencia.

b. *Thiobacillus thioeparus*. Se utilizó el fermentador BioFlo New Brunswick para el cultivo continuo del *Thiobacillus thioeparus*. La concentración de tiosulfato utilizado fue de 10 g/l. Se inició el cultivo en lote y cuando entró en fase estacionaria se inició la alimentación de medio de cultivo. Se evaluó:

Diferentes tasas de dilución: 0.2, 0.4, 0.9, 1.2 y 1.8 d⁻¹.

Diferentes concentraciones de oxígeno disuelto: 3.4, 2, 1, 0.8, 0.38, 0.2 mg/l.

III.7 Microorganismos del consorcio

Para los estudios de las poblaciones microbianas del consorcio sulfoxidante, se utilizaron medios de cultivo a los que se adicionaron inhibidores de crecimiento. En el medio líquido para el crecimiento de hongos se utilizó el medio Sabouraud con cloranfenicol a una concentración de 1.25 U/ml. Para el crecimiento de bacterias se utilizó el medio mineral utilizando bisulfuro de carbono como fuente de energía y se adicionaron 8 µg/ml de nistatina.

Por último se realizaron ensayos de respirometría para obtener la capacidad de oxidación de los microorganismos obtenidos en ambos medios de cultivo.

Al mismo tiempo para la observación al microscopio, las bacterias fueron teñidas de acuerdo a la tinción Gram.

III.8 Estudios de respirometría

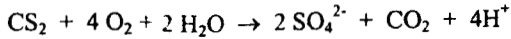
El inóculo utilizado para los estudios en respirometría fue el descrito en 3. Los compuestos reducidos de azufre se adicionaron en una concentración de 1 mM y las tasas de oxidación del sulfuro de hidrógeno y del bisulfuro de carbono fueron calculadas en concentraciones crecientes de los compuestos: 0, 1, 2, 3, 4 y 5 mM.

La técnica se basa en la medición del consumo de oxígeno como una medida indirecta de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre en los microorganismos aerobios estudiados.

El oxígeno se midió utilizando un oxímetro YSI modelo 50 B. El procedimiento se describe a continuación:

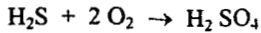
1. En botellas para DBO se aireó el medio de cultivo durante el tiempo necesario para saturarlo de oxígeno, aproximadamente 30 minutos.
2. Se inóculó la botella con 10 % v/v de células centrifugadas y lavadas con solución salina al 0.85 %
3. Se adicionaron los sustratos a evaluar. Asimismo se evaluó la oxidación química de los sustratos, para esto en el medio sin células se determinó el consumo de oxígeno respecto al tiempo.
4. Se dejaron las botellas en agitación a temperatura de 30° C y pH 7
5. Se midió el consumo de oxígeno en el tiempo
6. Se calculó la tasa de consumo de oxígeno ($\text{mg O}_2 / \text{min}$) por medio de la pendiente del consumo respecto al tiempo.
7. Finalmente las velocidades de oxidación de los sustratos ($\text{mg compuestos azufrados/g proteína min}$) de acuerdo a la estequiometría global de la reacción de oxidación de los compuestos reducidos de azufre considerando la biomasa y la corrección para la respiración endógena. Esta última se calculó midiendo el consumo de oxígeno sin sustrato, es decir al medio con células sin fuente de energía se le midió el consumo del oxígeno respecto al tiempo.
8. Para los cálculos de las tasa relativas de oxidación a partir del oxígeno consumido se consideraron los siguientes factores de la relación sustrato/oxígeno de acuerdo a la estequiometría de la oxidación:

Para CS₂



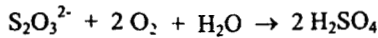
Factor: 0.59 mg CS₂/mg O₂ (a partir de la relación molar de las moléculas

Para H₂S



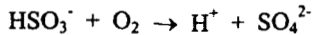
Factor: 0.53 mg H₂S/mg O₂

Para tiosulfato



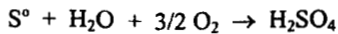
Factor: 1.75 mg S₂O₃²⁻ / mg O₂

Para sulfito



Factor: 5.06 mg HSO₃/mg O₂

Para azufre



Factor: 0.67 mg S⁰/mg O₂

III.9 Cultivo de cepas puras de *Thiobacillus*

El cultivo en placa y aislamiento de cepas de microorganismos quimiolitotróficos es particularmente difícil de realizar debido a sus características de crecimiento lo cual ha sido ampliamente documentado. Los trabajos de Jhonson y col. (1995, 1997) son un punto de referencia en cuanto a la formulación de medios sólidos para el aislamiento de cepas de *Thiobacillus* y otros acidófilos de interés. Básicamente sus resultados muestran la importancia de eliminar cualquier sustancia orgánica del medio de cultivo, para lo cual utilizan diferentes gelificantes, así como medios sólidos de doble capa donde en una de las capas se favorece el crecimiento de los heterótrofos que consumen la materia orgánica y en la capa externa los organismos quimiolitotrófos.

El cultivo en sólido consistió en crecer el consorcio, así como el crecimiento de *Thiobacillus*

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

Tabla 3.1. Crecimiento de cepas puras de *Thiobacillus* y consorcio sulfoxidante en cultivo sólido utilizando diferentes tipos de gelificante.

Medio de Cultivo	<i>T. thioparus</i>	<i>T. thiooxidans</i>	Consorcio
(Medio mineral +	ATCC 26345	ATCC 21835	sulfoxidante
Agar bacteriológico (1.5 %)	+	+	+
Agar bacteriológico 1%)	+	+	+
Agar bacteriológico (1%) lavado	+	+	+
Agar Bacteriológico + Extracto de levadura (0.5 g/l)	+	+	Hongos (++) Bacterias (+)
Goma Gellan (1%)	++	++	++
Agarosa ultrapurificada	++++	++++	--

+ Escaso crecimiento

III.10 Métodos analíticos.

III.10.1 Biomasa

La biomasa se determinó indirectamente por su contenido de proteína. Esta fue cuantificada por el método de Lowry (1951) utilizando una curva patrón con albúmina de 0 a 500 µg/ml.

III.10.2 Cuantificación de azufre elemental

Se determinó azufre elemental por espectrofotometría (Bartlett, y Skoog., 1954). Este método se basa en la reacción de cianuro de sodio con azufre elemental para formar tiocianato de sodio. En una solución de acetona, el azufre elemental reacciona rápida y cuantitativamente con cianuro

para dar el complejo tiocianato. El tiocianato puede ser determinado colorimétricamente por la adición de acetona con cloruro férrico. El método es sensible para concentraciones de 2 ppm de azufre elemental. Los peróxidos, sulfuros, bisulfuros y mercaptanos no interfieren cuando están presentes en grandes cantidades. El método alcanza una precisión del 98-99%.

III.10.3 Cuantificación de $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} , SO_4^{2-} y $S_4O_6^{2-}$

La detección y cuantificación de $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} , SO_4^{2-} y $S_4O_6^{2-}$ se ha podido realizar también en forma rápida y precisa por cromatografía de líquidos (HPLC). Este método se realizó con un detector PDA (Photo Diode Array 996, Waters) con una longitud de onda de 308 nm. Se usó ftalato de potasio (0.04 M pH 4) como fase móvil a un flujo de 0.8 ml/min., con una columna (IonoSpher-A) de intercambio iónico de 250 mm de longitud y 4.5 mm de diámetro interno, empacada con sílica. La temperatura a la cual se realizó la detección fue de 30 °C y 1500 psi de presión

A partir de una solución 10 mM de sulfito, sulfato, tiosulfato y tetrionato (por separado), preparada con sulfito, sulfato, tiosulfato y tetrionato de sodio en agua desionizada, se hicieron diluciones para tener soluciones con diferentes concentraciones de los compuestos y determinar la linealidad de la respuesta, encontrándose que el área bajo la curva fue directamente proporcional a la concentración.

Preparación de la muestra para el análisis en el HPLC. Se hace una dilución de la muestra (1:10) y se filtra 1 ml de la misma con una membrana de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45 µm de tamaño de poro. Se aplican 20 µl de la muestra y se hace la inyección.

III.10.4 Cuantificación de amonio.

El amonio se determinó por el método de Berthelot (Neatherbun, 1967).

III.10.5 Concentración de CS_2 y H_2S en gas

Las concentraciones de CS_2 y H_2S en gas se determinaron por cromatografía de gases utilizando un cromatógrafo HP 5890 II, que cuenta con un detector fotométrico de flama y una columna de teflón de 1m X 3 mm, empacada con super Q. Las condiciones de operación fueron las siguientes: volumen de muestra de 400 µl; temperatura de inyección de 150 °C; temperatura de columna de 130 °C; temperatura del detector de 220° C; flujo del gas acarreador de 20 ml/min.

10.6 Mezclas de oxígeno.

Se utilizaron mezclas certificadas de oxígeno al 5%. Para obtener oxígeno a diferentes concentraciones se utilizó un mezclador de gases Matheson modelo 8259 y nitrógeno como gas diluyente. La concentraciones de oxígeno disuelto fueron 0.8, 0.4, 0.2, 0.1, 0.075 mg/l.

IV. Resultados

IV.1 Tasas relativas de oxidación de compuestos reducidos de azufre

Con la finalidad de evaluar y comparar las velocidades de oxidación de diferentes compuestos reducidos de azufre, H_2S , CS_2 , SO_3 , $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y S^0 , se determinaron sus tasas de oxidación por medio de respirometría en concentraciones de 1 mM, a 30 °C y un pH de 7. Los resultados se presentan en la Figura IV.1.

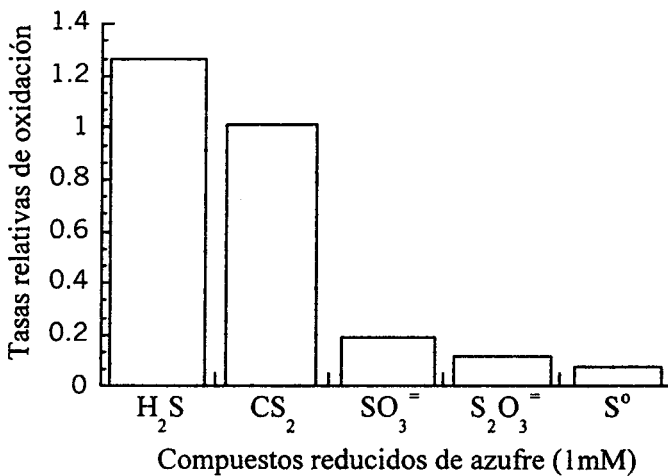


Figura IV.1 Velocidades relativas de oxidación de los compuestos reducidos de azufre determinadas por respirometría para el consorcio sulfoxidante, en concentraciones de 1 mM ($\text{CS}_2=1$).

Como se observa el consorcio sulfoxidante es capaz de oxidar al compuesto orgánico de azufre CS_2 . Kelly (1998) indicó que pocas especies de microorganismos son capaces de oxidar este compuesto. En este sentido, se ha observado que, si bien la mayoría de microorganismos sulfoxidantes pueden utilizar como fuente de energía al tiosulfato, una menor diversidad microbiana es capaz de utilizar compuestos como el H_2S , CS_2 , seguramente debido a las características altamente tóxicas de estos compuestos. Al respecto, en diferentes trabajos sobre la selección de microorganismos capaces de oxidar compuestos orgánicos de azufre, se han identificado cepas puras de *Thiobacillus thioparus* Tkm (Smith y Kelly, 1988) así como un

consorcio de *Thioabacillus* sp. que pueden oxidar al CS_2 (Plas y col., 1992).

De acuerdo a la Figura IV.1, la velocidad de oxidación del azufre elemental fue la más baja comparada con la de los otros compuestos de azufre: $\text{H}_2\text{S} > \text{CS}_2 > \text{SO}_3 > \text{S}_2\text{O}_3^{2-} > \text{S}^0$. La velocidad de oxidación observada fue de $0.06 \text{ mg S}^0/\text{g proteína min}$ y una K_s de 4.2 mM S que son valores similares a los obtenidos para cepas puras de *Thiobacillus* (Jordan y col. 1995). Esta baja velocidad es atribuida a la insolubilidad de azufre elemental, lo que hace que los microorganismos tengan que adherirse al sólido para iniciar la oxidación. El tiosulfato y el sulfito fueron oxidados a velocidades aproximadamente 5 veces más lentas que los sulfuros. Sin embargo, mientras que los primeros no presentan problemas de toxicidad y los microorganismos pueden crecer en concentraciones altas (por ejemplo de 30 g/l de tiosulfato) las concentraciones de sulfuros de 200 mg/l son severamente tóxicas inhibiendo la actividad sulfoxidante de las especies microbianas.

IV.2 Tasas de oxidación de sulfuros (H_2S , CS_2)

Con la finalidad de determinar las tasas de oxidación de H_2S y CS_2 , se utilizaron concentraciones crecientes de estos compuestos y se cuantificó la actividad sulfoxidante por medio de respirometría a 30°C y pH inicial de 7. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura IV.2.

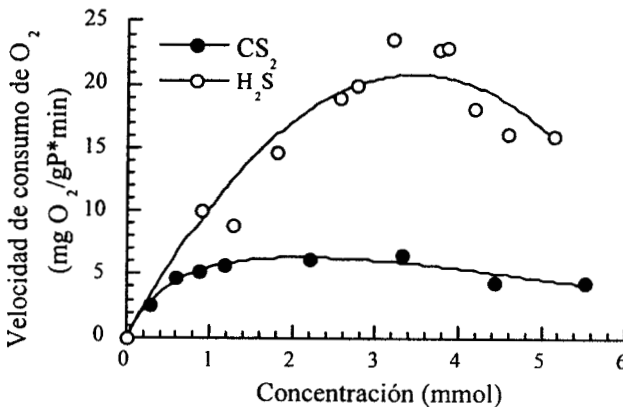


Figura IV.2 Velocidades de oxidación en concentraciones crecientes de H_2S y CS_2 determinadas por respirometría para el consorcio sulfoxidante a 30°C y pH de 7.

Se observó una mayor actividad sulfoxidante para H_2S debido probablemente a que este compuesto es producido como un intermediario en la oxidación de CS_2 . Por otro lado, existen evidencias de que el sulfuro es preferido como sustrato inorgánico por un mayor número de especies oxidantes del azufre, lo que permitiría al consorcio, o bien a un mayor número de especies de este, oxidarlo en preferencia al bisulfuro. Las máximas velocidades de oxidación observadas fueron de $3.4 \text{ mgCS}_2/\text{g proteína min}$ y $13.8 \text{ mgH}_2\text{S}/\text{g proteína.min}$. Por otra parte las constantes de saturación (Ks) para H_2S y CS_2 fueron respectivamente, de 0.19 mM y 1.3 mM . Estos valores son similares a los reportados en la literatura (Smith y Kelly, 1988; Plas y col. 1993; Jordan y col., 1995).

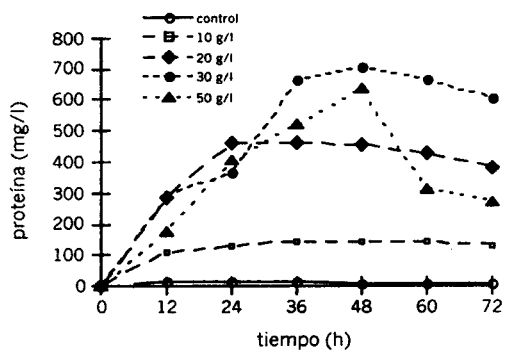
Finalmente se puede observar que ambos compuestos presentan baja inhibición de la actividad sulfoxidante del consorcio, aproximadamente 5 mM , mientras que de acuerdo a Plas y col. (1993) en concentraciones superiores a 2 mM se observa una inhibición completa de la actividad microbiana.

IV.3 Efecto de diferentes concentraciones de tiosulfato

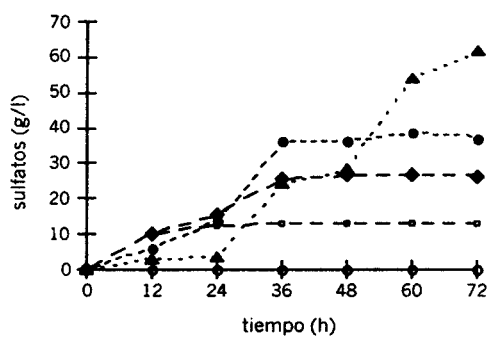
Con la finalidad de observar el efecto que tiene la fuente de energía sobre el crecimiento, producción de sulfatos y pH del consorcio sulfoxidante se evaluaron concentraciones crecientes de tiosulfato en el medio de cultivo. Esto permitió observar posibles efectos regulatorios además del comportamiento del consorcio crecido en esta fuente de energía. Las concentraciones evaluadas fueron: $10, 20, 30$ y 50 g/l . Los resultados se presentan en las Figura IV.3.

En la Figura IV.3(A), donde se presenta el efecto global de las concentraciones crecientes de tiosulfato se puede observar que el incremento de la concentración de tiosulfato de 10 a 20 g/l estimuló el crecimiento del consorcio en casi 3.6 veces su valor. Si en 10 g/l y 24 horas de cultivo el valor de proteína fue de 126 mg/l , en 20 g/l y mismo tiempo de cultivo su valor fue de $460 \text{ mg proteína/l}$. Los valores de crecimiento para la concentración de 30 g/l de tiosulfato, si bien presentaron un aumento respecto a los valores anteriores, el incremento no fue proporcional al señalado para el cambio de 10 a 20 g/l de la fuente de energía. Se observó, a las 36 horas de cultivo un valor de proteína de 660 mg/l que representa un aumento de 1.4 veces el valor para 20 g/l . Al parecer en esta concentración de tiosulfato se presenta una limitación en el crecimiento del consorcio.

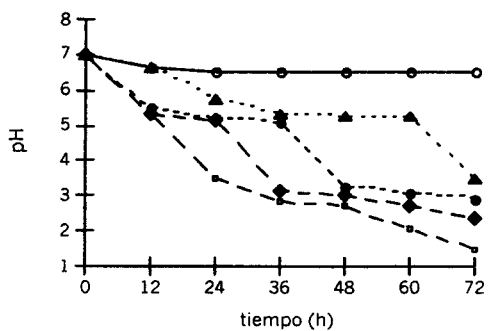
Para la concentración de $50 \text{ g tiosulfato/l}$ el crecimiento del consorcio fue claramente afectado. Los valores máximos de proteína fueron de 636 mg/l a las 48 h de cultivo que fueron menores a los encontrados, para el mismo tiempo, en la concentración de 30 g/l de tiosulfato (702 mg



(A)



(B)



(C)

Figura IV.3 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B) y pH (C) del consorcio sulfoxidante crecido en concentraciones crecientes de tiosulfato.

proteína/l). Se observa entonces un efecto negativo de la fuente de energía sobre el crecimiento celular en concentraciones mayores a 20 g/l. Sin embargo dicho efecto se presenta como consecuencia de la acumulación de sulfato en el medio de cultivo

Con relación a la producción de sulfatos los resultados se presentan en la Figura IV.3(B). Los valores máximos de oxidación de tiosulfato corresponden a 13, 26, 39 y 65 g/l de sulfatos, para cada una de las concentraciones de 10, 20, 30 y 50 g tiosulfato/l. Mientras que para las dos primeras concentraciones de la fuente de energía estos valores se alcanzaron a las 24 horas de cultivo, para la concentración de 30 g/l fue a las 36 horas; en tanto para la concentración más alta esto fue posible hasta las 72 horas de cultivo. Esto a pesar del efecto negativo sobre el crecimiento, aunque como se observa en la Figura IV.3(A) éste no se vio completamente abatido.

Se puede observar también, que para las concentraciones de 30 y 50 g/l de tiosulfato hasta las 24 horas de cultivo, donde no se presenta un efecto negativo del sulfato sobre el crecimiento, la acumulación de sulfatos es más lenta que las observadas para las concentraciones "bajas" del compuesto. De esta manera, las velocidades de producción de sulfato encontradas para las concentraciones de 10 y 20 g/l de tiosulfato fueron de 0.83 y 0.76 g sulfato/l h, mientras que para 30 y 50 g/l fueron de 0.56 y 0.153 g sulfato/ l h, respectivamente. Los resultados mostraron que este comportamiento se presentó asociado a la acumulación de azufre elemental observada para las "altas" de tiosulfato, lo cual se puede atribuir a la saturación por sustrato o bien al agotamiento del O₂ disuelto.

La disminución del pH, como se observa en la Figura IV.3(C), está relacionada con la acumulación de sulfatos en el medio de cultivo. De esta manera se presenta una caída progresiva del pH en función de la concentración de tiosulfato. Así en "bajas" de tiosulfato un pH de aproximadamente 2.5 se detectó a las 36 de cultivo, mientras en "altas" de tiosulfato se detectó un pH de alrededor de 3 a las 48 y 72 h para 30 y 50 g tiosulfato/l, respectivamente.

a. El efecto del sulfato sobre el crecimiento

Esta ampliamente documentado que la oxidación de los diferentes compuestos reducidos de azufre por microorganismos sulfoxidantes, produce diferentes intermediarios (S₄O₆²⁻, SO₃²⁻, COS, S° entre otros) y sulfato como producto final (Suzuky, 1999). Este último, en determinadas concentraciones en el medio de cultivo, tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de los microorganismos sulfoxidantes, como lo muestran los resultados para el consorcio crecido en tiosulfato. En la Figura IV.4, se puede observar que las 60 horas de cultivo

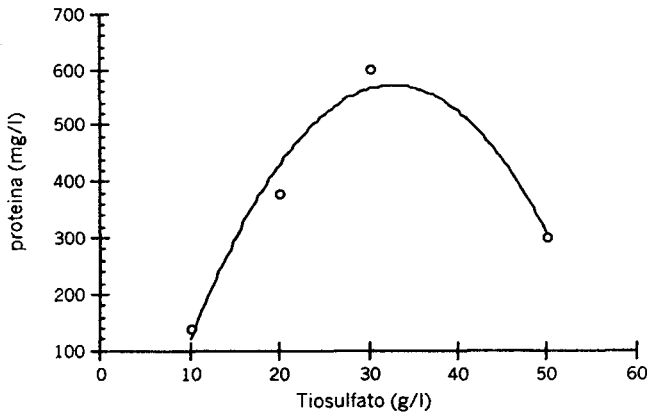


Figura IV.4 Efecto de la concentración de tiosulfato, debido a la producción de sulfatos, sobre el crecimiento del consorcio sulfoxidante. Los datos fueron obtenidos a las 60 horas de cultivo, de acuerdo a la Figura IV.3.

de acuerdo a la Figura IV.3, las concentraciones de hasta 30 g tiosulfato/l no afectan el crecimiento del consorcio. Sin embargo, cuando se incrementa la concentración del compuesto el crecimiento comienza a ser afectado negativamente y disminuye drásticamente en 50 g tiosulfato/l. Este efecto es debido a la concentración de sulfatos en el medio. Las concentraciones de este ion para 30 y 50 g/l de tiosulfato fueron respectivamente 36 y 55 g sulfato/l.

Es conveniente señalar que la disminución del crecimiento no se puede atribuir al pH ya que en las condiciones de 30 y 50 g tiosulfato/l la disminución de este parámetro fue gradual con el tiempo. Así, para la mayor concentración de tiosulfato, se alcanzaron valores de pH de alrededor de 3 a las 72 horas de cultivo. Es decir que el efecto del sulfato es independiente del pH. Esto se corroboró al evaluar las velocidades de oxidación de bisulfuro por el consorcio a pH de 7, por medio de respirometría como se muestra en la Figura IV.5. Como se observa en dicha figura, en concentraciones mayores de 25 g/l de sulfato disminuyó la actividad sulfoxidante del consorcio en aproximadamente 50%. La diferencia en las concentraciones de sulfato que son negativas para el crecimiento del consorcio, pudiera atribuirse a una posible adaptación de los microorganismo en el caso de la cinéticas de crecimiento con tiosulfato, lo cual no podría observarse en la evaluación por respirometría dado el tiempo de la prueba.

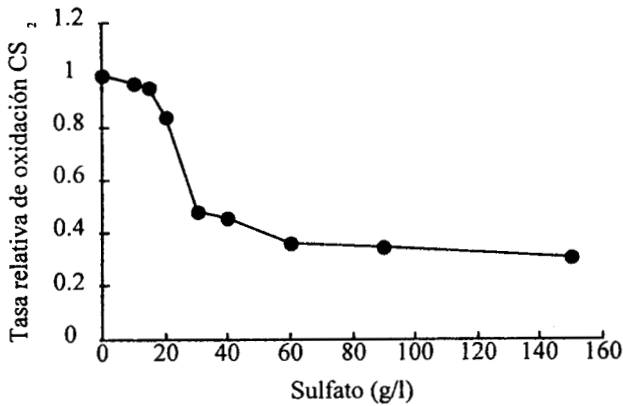


Figura IV.5 Efecto de sulfato sobre la oxidación de bisulfuro de carbono por el consorcio sulfoxidante a pH 7 30 °C en pruebas de respirometría.

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

Desde otra perspectiva, Yamanaka y Fukumori (1995) reportaron un trabajo relacionado a los aspectos moleculares de sistema de transporte de electrones en *Thiobacillus ferrooxidans*. Después de aislar el ferrocitocromo c_{552} realizaron ensayos para determinar el efecto del sulfato sobre la actividad del sistema citocromo c oxidasa-ferrocitocromo c_{552} . Encontraron que la oxidación se estimula en presencia del sulfato en concentraciones de 0.75 mM (0.072 g/l), en tanto la actividad se inhibe en concentraciones superiores a 100 mM del ion (9.6 g/l). Señalan que la estimulación se debió posiblemente al requerimiento de *Thiobacillus ferrooxidans* de sulfato para su crecimiento. Sin embargo, no se explica el efecto negativo del sulfato sobre la actividad de la citocromo-oxidasa

b. Acumulación de azufre elemental.

Como se mencionó anteriormente, en concentraciones de tiosulfato de 30 y 50 g/l se observó la acumulación de azufre elemental en el medio de cultivo (Figura IV.6). Se encontraron respectivamente, 0.6 y 0.8 g azufre/l. Existen dos factores que influyen en esta respuesta. La saturación por sustrato y los niveles de oxígeno disuelto. Bajo las condiciones de crecimiento del consorcio en 30 g/l de tiosulfato, es posible atribuir la acumulación del azufre elemental a una falta de O₂ en el medio. Esto se puede afirmar ya que en condiciones controladas de O₂ no se observó la acumulación de azufre elemental. El control se realizó utilizando un fermentador agitado que permite el control de oxígeno disuelto del medio de cultivo, los resultados se presentan en el apartado 13. Por otro lado en la concentración de 50 g/l, bajo estas condiciones de crecimiento es probable que la acumulación de azufre se deba al agotamiento del oxígeno, sin embargo en condiciones adecuadas de aireación el mecanismo es el de saturación.

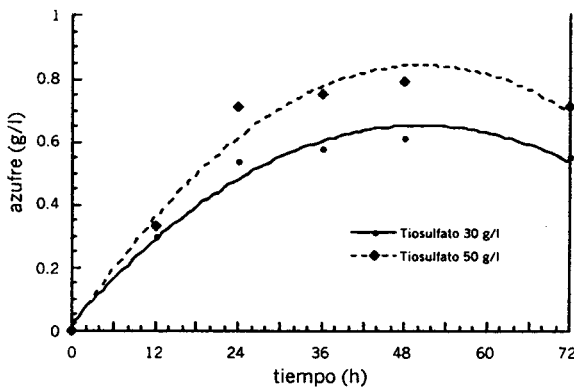
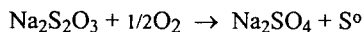


Figura IV.6 Producción de azufre por el consorcio sulfoxidante crecido en concentraciones de 30 y 50 g/l de tiosulfato.

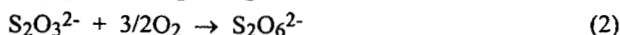
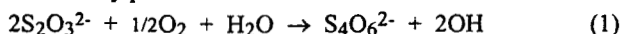
Nathansoh (1902) demostró la producción extracelular de azufre elemental en un cepa marina de *Thiobacillus neapolitanus* crecido en tiosulfato. Lo atribuyó al rompimiento del tiosulfato en azufre y sulfito, con la posterior oxidación a sulfato, dando una equivalencia entre la precipitación de azufre elemental y la producción de ácido sulfúrico.



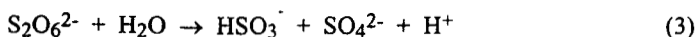
Como señalan Kelly y col. (1997) existen dos mecanismos básicos de oxidación de tiosulfato. El primero se presenta en cultivos puros de thiobacilli que se caracteriza por la formación de politionatos. El segundo se lleva a cabo por microorganismos mixótrofos y se caracteriza por la oxidación directa a sulfato mediante la formación del sulfano-azufre, que en condiciones de oxigenación adecuadas se oxida completamente a sulfato. En tanto, la oxidación parcial en azufre elemental no es aún completamente entendida. Un tercer mecanismo es el reportado por Suzuki y col. (1969) en *Thiobacillus thioparus*, donde el tiosulfato forma azufre elemental y sulfito. Mientras el azufre se oxida a sulfato por la azufre oxidasa, el sulfito formado se oxida a sulfato por un mecanismo de fosforilación a nivel de sustrato para la obtención de energía.

El mecanismo donde se presenta la formación de politionatos es complejo, como ya se ha dicho anteriormente. Al respecto, el trabajo de Wentzien y col. (1994) es ilustrativo de ello. Los autores realizaron un trabajo de oxidación de tiosulfato con cepas puras de *Thiobacillus*, donde se observó la formación de politionatos y azufre elemental como intermediarios. Proponen que el primer paso de reacción en la oxidación del tiosulfato a sulfato puede ser (i) la formación de ditionato o (ii) la formación de tetracionato de acuerdo a lo siguiente:

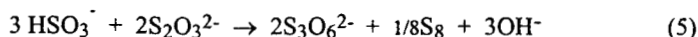
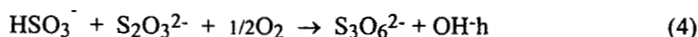
i. formación de tetracionato y posible formación de ditionato



Mientras que la reacción (1) es conocida en el metabolismo del azufre por los microorganismos, la reacción (2) sólo se ha observado por reacción química (p. ej. H_2O_2 , ozono, y bromato oxidan el tiosulfato a ditionato). El ditionato se oxida directamente a sulfato o bien puede hidrolizarse de acuerdo a:

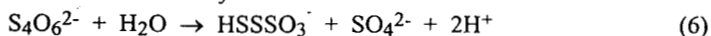


El sulfito puede ser posteriormente oxidado enzimáticamente a sulfato o reaccionar con tiosulfato para formar tritionato y posiblemente azufre:



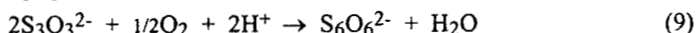
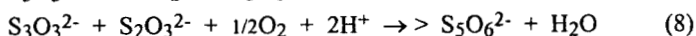
ii. posible formación de tetracionato:

Si el tetracionato es el primer producto de reacción de la oxidación de tiosulfato (1), este puede ser posteriormente transformado enzimáticamente con la formación de disulfano-monosulfonato como se ha observado en *Thiobacillus ferrooxidans* de acuerdo a:



El anión HSSSO_3^- es altamente reactivo y puede oxidarse de acuerdo a las reacciones (7) a (9)

donde se observa la formación de politionatos:

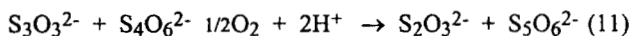


En las reacciones (6) a (9) se observa la formación de politionatos en *Thiobacillus intermedius* durante la oxidación de tiosulfato a tetracionato. El azufre elemental fue siempre detectado, lo que se explica de acuerdo a (5) o bien por descomposición química de acuerdo a:

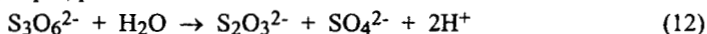


Las reacciones (5) a (10) presentan la complejidad de la oxidación via politionatos.

El tritionato es menos reactivo que los politionatos y por ello puede acumularse y medirse. En el caso de *Thiobacillus intermedius* el ion HSSSO_3^- puede reaccionar con el tetracionato por una reacción no enzimática de acuerdo a:



Las reacciones (11) y las reacciones (6) a (9) dan una posible explicación de la presencia de tiosulfato y pentacionato. Además de (11) el tiosulfato se puede formar en una reacción análoga a (3) y (6). Por ejemplo, por hidrólisis de tritionato:



Todas las reacciones señaladas dependen del pH, así: las reacciones (1), (4), (5), (8) y (9) son favorecidas a pH ácidos, mientras que las reacciones (3), (6) y (12) se presentan en pH neutros o alcalinos.

4. Efecto del nitrógeno inorgánico.

En general se desconocen estudios sobre la influencia del nitrógeno inorgánico en la oxidación de los compuestos reducidos de azufre por los thiobacilli y otros sulfoxidantes. Los trabajos publicados están enfocados a la influencia del nitrógeno orgánico (materia orgánica) sobre el crecimiento quimiolitotrófico de este género de microorganismos (Kelly, 1972). Por otro lado se ha reportado que en las bacterias la síntesis de citocromos está regulada, entre otros factores como el O_2 y el uso de inhibidores de cadena respiratoria, por los nutrientes utilizados para el crecimiento. Esto es importante cuando se considera que el sistema respiratorio es fundamental en la estructura y metabolismo de los litótrofos sulfoxidantes y por tanto su estudio es necesario en el entendimiento de su metabolismo. Un ejemplo se presenta en *Bacillus cereus*, una bacteria Gram positiva, donde la síntesis de citocromos está regulada de manera negativa por la velocidad de crecimiento. Así, cuando este microorganismo crece en una fuente pobre de

carbono, lo que se traduce en una lenta velocidad de crecimiento, se favorece la síntesis de citocromos tipo a y disminuye la síntesis de citocromos tipo aa₃ y tipo c (García-Horsman y col., 1991). Por su parte, en *Acetobacter diazotrophicus*, una bacteria Gram negativa, fijadora de nitrógeno, se encontró que es necesario adicionar (NH₄)₂SO₄ al medio para que exista actividad de la nitrogenasa. Por otro lado, al caracterizarse el sistema respiratorio de la bacteria se observó que en células crecidas con 1 mM de sulfato de amonio la síntesis de citocromos tipo b, c, a y ba fue favorecida. En tanto en las células crecidas en 40 mM de la sal, no se detectaron los citocromos tipo c y ba. En cambio se detectó la presencia de citocromo tipo bd como oxidasa terminal (Flores-Encarnación, 1999). En bacterias oxidantes de nitrito, Prosser (1989) señala diferencias en la síntesis de citocromos. Afirma que *Nitrobacter hamburgensis* tiene dos cadenas respiratorias en función de las condiciones de crecimiento; de tal manera que al crecer el microorganismo en condiciones de autotrofia se sintetizaban los citocromos tipo b₅₆₂₋₅₆₄. En cambio en condiciones de heterotrofia hubo síntesis de los citocromos tipo b, en tanto en *Paracoccus denitrificans* se ha reportado que el citocromo c₅₅₀ se deja de sintetizar en medios con fuente de carbono orgánico (Stell y col., 1996).

Desde otra perspectiva, se ha reportado que los microorganismos consumen preferentemente ciertas sales de amonio, lo cual determina un efecto sobre su crecimiento, así como en la síntesis de metabolitos secundarios (Islas, 1991). También se ha observado que uno de los niveles desde el cual el nitrógeno ejerce su influencia, es a través de la modulación del crecimiento y el metabolismo primario de la célula. Además, existe una relación estrecha entre la nutrición, la velocidad de crecimiento del microorganismo y el metabolismo primario y secundario (González, 1993).

De esta manera, con la finalidad de evaluar el efecto de la fuente de nitrógeno inorgánico sobre el crecimiento, producción de sulfato y pH del medio; y de este modo observar posibles efectos regulatorios sobre la oxidación del tiosulfato, se probaron diferentes concentraciones de la siguientes sales de amonio:

Cloruro de amonio: 10, 20, 40 y 60 mM

Nitrato de amonio: 10, 20, 40 y 60 mM

Sulfato de amonio: 5, 10, 20 y 30 mM

Posteriormente se evaluó al nitrato de potasio para determinar si el nitrato podría ser utilizado como fuente de nitrógeno. Se probaron para ello diferentes concentraciones de la sal: 10, 20, 40 y 60 mM. Los resultados se presentan a continuación.

En las Figuras IV.7, IV.8 y IV.9, donde se presentan los resultados de las sales de amonio, se observa que al incrementar la concentración del amonio en el medio, el crecimiento presenta un

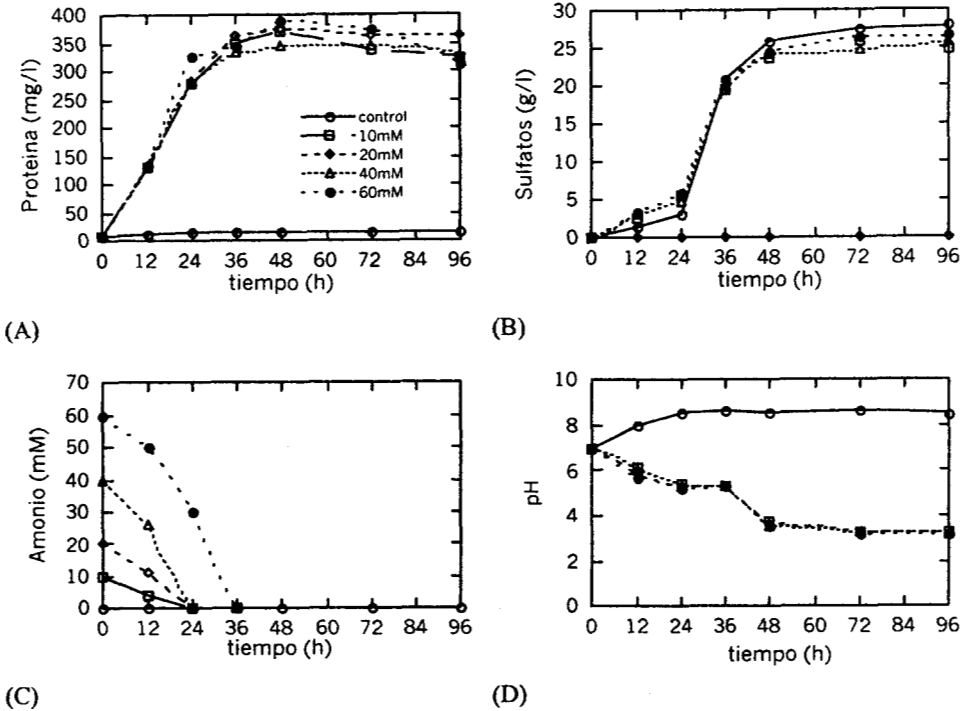
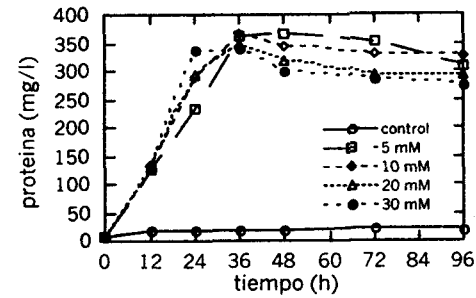


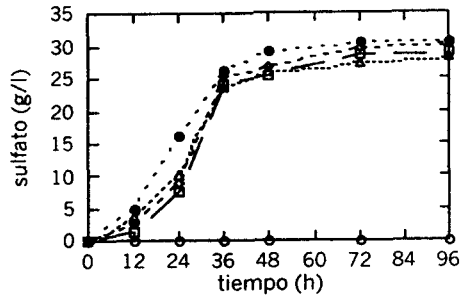
Figura IV.7 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B), consumo de amonio (C) y pH (D) del consorcio crecido en diferentes concentraciones de nitrato de amonio.

patrón similar en todas las condiciones evaluadas. Así, en las diferentes concentraciones de las sales de amonio, la fase estacionaria de crecimiento se alcanza aproximadamente a las 36 horas de cultivo. Lo que indica que el consorcio sulfoxidante utiliza para su crecimiento

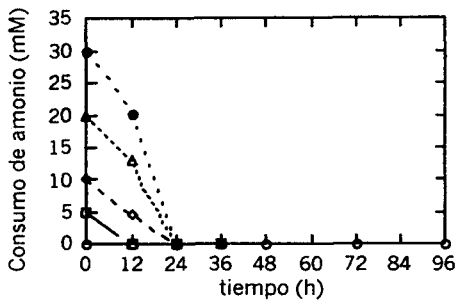
Respecto a la producción de sulfatos se observó que el consorcio presenta un comportamiento similar de oxidación entre el sulfato de amonio y el nitrato de amonio (fig. 5.7(B) y 5.8(B)). En ambos casos la máxima oxidación (26 g/l de sulfato) se alcanza a las 48 h del cultivo, que corresponde a la fase estacionaria del consorcio. Se observa además que existe una fase lenta de acumulación de sulfato, hasta que la pendiente cambia a las 24 horas de crecimiento. En este momento la oxidación del tiosulfato, medida como acumulación de sulfatos, se incrementa notablemente. Así, mientras que hasta las 24 horas de cultivo el sulfato formado alcanza valores cercanos a 10 g/l (40% de conversión), de las 24 a las 36 horas se incrementa la concentración



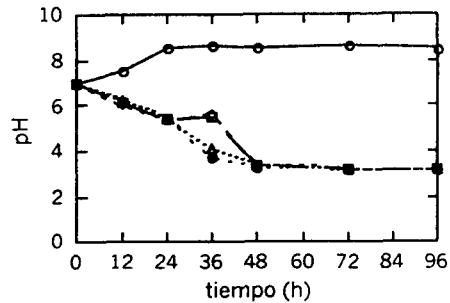
(A)



(B)



(C)



(D)

Figura IV.8 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B), consumo de amonio (C) y pH (D) del cultivo mixto crecido en diferentes concentraciones de sulfato de amonio.

de 10 a 26 g/l de sulfato que representa el 60% de oxidación del tiosulfato.

Los resultados obtenidos por Barton y Shively (1968), en un trabajo pionero del estudio de la oxidación a lo observado en el consorcio. Así, durante las primeras 36 h de cultivo la producción de sulfato por la cepa pura fue de 0.196 g/l, en tanto que entre las 36 y 48 h se acumulan 3.5 g/l del compuesto. Por su parte Wentzien y col. (1994), utilizando una cepa de *Thiobacillus intermedius*, reportaron que durante las primeras 50 h de cultivo sólo se alcanza el 10 % de conversión de tiosulfato a sulfato. Posteriormente, de las 50 a las 70 h de cultivo se alcanza el 90% de oxidación a sulfato, lo cual coincidió también con la fase estacionaria de crecimiento. Esto se presentó, de acuerdo a los autores, como consecuencia de la formación de distintos intermediarios de la oxidación (politionatos) como se mostró en el Apartado IV.1b.

Sin embargo, en el caso del consorcio, que probablemente sigue un ruta de oxidación directa a sulfato, dadas sus características mixotróficas (Kelly, 1997), no se detectó la presencia de intermediarios de la oxidación (tetrionato y sulfito) lo que permite suponer que es otro factor el que determina este comportamiento. Probablemente una limitación de oxígeno en concentraciones mayores de 10 g/l de sustrato.

Por otro lado, en la Figura IV.9 se observa que el cloruro de amonio, en concentraciones de 10 y 20 mM, el consorcio alcanza los máximos valores de oxidación a las 48 horas de cultivo, de manera similar a lo señalado para las otras sales de amonio. Sin embargo el comportamiento presentó un cambio para las concentraciones de 40 y 60 mM de cloruro de amonio. En estas concentraciones la oxidación completa del tiosulfato se obtuvo 12 horas antes. Es decir los 26 g/l de sulfato fueron detectadas a las 36 horas de cultivo, que corresponde también a la entrada en la fase estacionaria de crecimiento. Debido a que este efecto, como se observa en 9(A) no se debió a un efecto sobre el crecimiento del consorcio, es posible señalar que el amonio en forma de cloruro de amonio es un efector positivo de la oxidación. Los experimentos hasta aquí realizados no permiten determinar el nivel ni el tipo de estimulación encontrada, como tampoco si es el amonio *per se* o bien un producto de su metabolismo. O bien si este nutrimento tiene efecto a nivel de síntesis de citocromos.

Al observar el consumo de amonio del consorcio en las diferentes condiciones de cultivo (Figuras IV.4C, IV.5C y IV.6C) se observa que el amonio se consumió completamente en todas las concentraciones de las sales de amonio evaluadas. Esto coincidió en general también con la entrada en la fase estacionaria de crecimiento.

Un aspecto que es importante señalar, respecto al crecimiento en diferentes sales de amonio en este sistema, es el exceso de nitrógeno en el medio de cultivo, el cual no se traduce en un incremento del crecimiento celular. Seguimos la siguiente explicación:

1. Al parecer el transporte de amonio a las células no está limitado ya que en todos los casos el amonio se agotó del medio de cultivo (Figuras IV.7C, IV.8C y IV.9C), sin embargo no parece ser utilizado por los microorganismos para su crecimiento.
2. El exceso de nitrógeno se calcula de acuerdo a las siguientes consideraciones: El consorcio tiene 50% de proteína y 10 % de nitrógeno, entonces 0.1 g/l de proteína corresponden a 0.2 g/l de células por lo que el nitrógeno consumido es de 0.02 g/l. En la Figura IV.7A, IV.8A y IV.9A se observa que el crecimiento en las diferentes concentraciones de las sales de amonio fue de alrededor de 350 mg proteína/l, lo que corresponde a 700 mg/l de células. Por lo tanto, el nitrógeno consumido fue igual a 70 mg/l, 5 mmol. En cambio el nitrógeno mínimo adicionado fue de 140 mg/l, 10 mmol. Esto indica que en ninguna condición el consorcio estuvo limitado

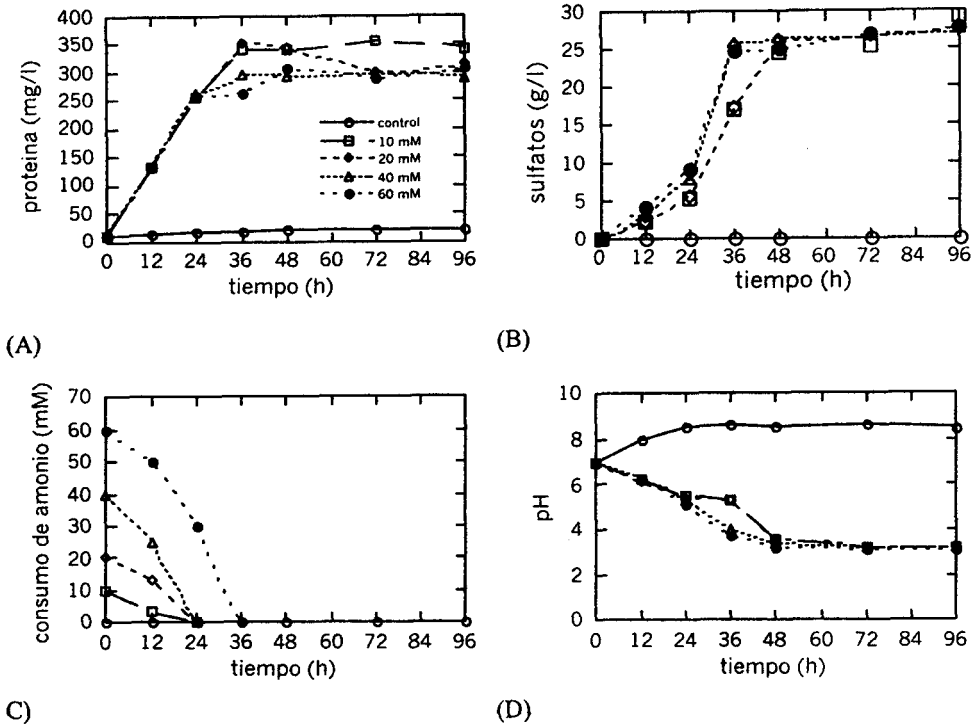


Figura IV.9 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B), consumo de amonio (C) y pH (D) del consorcio crecido en diferentes concentraciones de cloruro de amonio.

por nitrógeno, sino más bien siempre hubo exceso del mismo.

3. Se plantean tres hipótesis para entender este comportamiento, y que dados los alcances del trabajo no permiten una conclusión al respecto, estas son:

- i. Dado que el nitrógeno no es limitante, es posible que otro nutriente sea el que limite el crecimiento celular.
- ii. Que el consorcio tenga capacidad nitrificante por lo que el amonio en exceso esté siendo oxidado por alguna especie microbiana para la obtención de energía.
- iii. La tercera posibilidad está relacionada al mecanismo de asimilación de amonio. Esto es, que al no haber problemas de transporte de amonio las células sean deficientes en la enzima

glutamato deshidrogenasa (GDH), ya que la glutamato sintetasa (GS) es inactiva en medios con exceso de amonio, mientras que por el contrario GDH es inactiva en bajas de amonio (1 mM) y activa en altas de amonio (10 mM). En tanto glutamato sintasa (GOGAT), la tercera vía de asimilación de nitrógeno, se ha reportado que necesita de glutamina para su inducción. (Rawlings y Kusano, 1994, Tyler, 1978)

En referencia al pH se puede señalar que presenta un comportamiento característico del crecimiento del consorcio. Se observa así en todos los casos una disminución del pH debido a las formación de sulfatos. Se observa además que después de las 24 horas de cultivo, el pH presenta el mayor cambio de su valor, esto debido a que el punto de equivalencia del amortiguador de fosfatos que se utilizó se encuentra a un valor de pH de 4, que aproximadamente corresponde al comportamiento observado en las cinéticas de crecimiento.

Efecto del nitrato de potasio

Finalmente se evaluó el efecto del nitrato de potasio sobre el crecimiento del consorcio. Como se observa en la Figura IV.10 en las diferentes concentraciones del nitrato no se presentaron diferencias en crecimiento ni en la actividad sulfoxidante. Es decir que los microorganismos pueden llevar a cabo la reducción del nitrato vía asimilativa. El nitrato es determinante en ciertos microorganismos facultativos como *Thiobacillus denitrificans*. Este microorganismo tiene la capacidad de utilizar al nitrato como aceptor de electrones lo que le permite crecer en condiciones anaerobias.

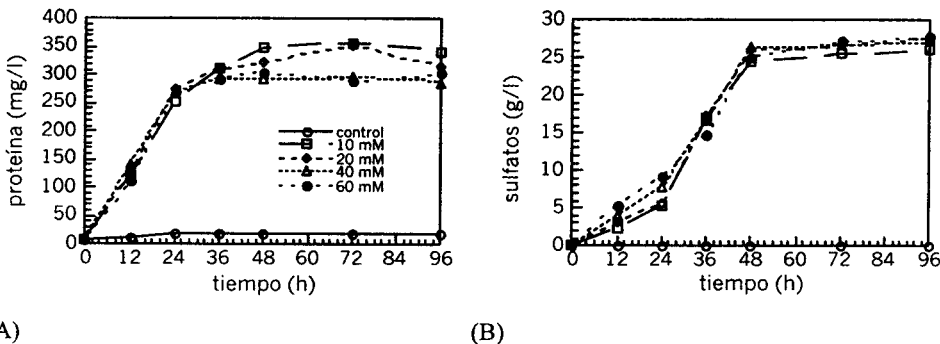


Figura IV.10 Crecimiento (A) y producción de sulfatos (B) del consorcio crecido en diferentes concentraciones de nitrato de potasio.

IV.5 Efecto de diferentes concentraciones de extracto de levadura

El cultivo de consorcios microbianos implica un manejo de ciertas condiciones de cultivo distintas a las utilizadas en cepas puras. Una de estas diferencias es que no son necesarias condiciones de esterilidad en el manejo del consorcio. En el caso del consorcio sulfoxidante, el medio mineral utilizado, que emplea como fuente de energía algún compuesto reducido de azufre, impone condiciones nutricionales adecuadas para el crecimiento de estos microorganismos.

Por otro lado, la coexistencia con microorganismos heterótrofos, o bien condiciones en las cuales el medio contenga materia orgánica, es común en los procesos de eliminación de contaminantes con estos microorganismos.

En el consorcio sulfoxidante utilizado en este estudio, se ha observado la presencia de hongos, levaduras y bacterias. Se ha observado que los hongos y levaduras desempeñan un papel determinante en la formación de la biopelícula en biolavadores de lecho escurrido, utilizados para la oxidación de H_2S y CS_2 (Hugler y col, 1996). En tanto, las bacterias desempeñan la principal actividad oxidante del sistema (Alcántara y col, 1999).

Sublette y Sylvester (1987) reportaron que, aunque *Thiobacillus denitrificans* es capaz de crecer en medios inorgánicos, se presenta una contaminación por heterótrofos si el cultivo no se opera bajo condiciones de asepsia. Sin embargo, el crecimiento de heterótrofos estuvo aparentemente limitado por la disponibilidad de carbón orgánico derivado de los productos de desecho o bien de la lisis celular de los autótrofos. Asimismo, estos autores aportaron evidencia de que la presencia de microflora heterotrófica no tuvo efecto sobre la oxidación de H_2S por el microorganismo.

En el tratamiento de "aguas amargas" proveniente de los procesos de refinación de petróleo, se observó que la presencia de compuestos orgánicos como benceno (5mg/l), tolueno (2mg/l), fenol (5 mg/l) y ácidos carboxílicos (400 mg/l), no afectó la actividad de *Thiobacillus denitrificans* para oxidar al sulfuro de hidrógeno (Sublette y col., 1998; Rajganes y col, 1995). De acuerdo a Madigan y col. (1999), en los ambientes naturales (microhábitats) se presentan dos formas de vida microbiana: de competición o bien de cooperación microbiana. En el caso de la cooperación microbiana se ha observado que los microbios heterótrofos utilizan la materia orgánica del hábitat mientras los litótrofos utilizan los compuestos inorgánicos, incluido aquellos que pueden ser tóxicos para los heterótrofos como el H_2S . Otro caso que señalan es la coexistencia de bacterias sulfato reductoras y sulfuro oxidantes; en este caso el producto de un organismo (H_2S de la reducción de SO_4^{2-}) es el sustrato del otro microbio ($H_2S + O_2 \rightarrow S^0 +$

H₂O).

Dada la importancia de las condiciones de cultivo en cuanto a sus características de heterotrofia, se estudió el efecto del extracto de levadura sobre el crecimiento, producción de sulfato y pH del consorcio. Se evaluaron concentraciones crecientes del extracto de levadura: 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1 y 1.5 g/l y como control el medio mineral. Se eligió este componente también como posible aporte de factores de crecimiento, de acuerdo a los medios de cultivo señalados para thiobacilli por ATCC. Los resultados se presentan en la Figura IV.11.

Como se observa el extracto de levadura a una concentración de 0.5 g/l favorece, sin perder la actividad sulfoxidante, el crecimiento del consorcio alcanzando valores de crecimiento de 641 mg proteína/l. El incremento es de aproximadamente 2.3 veces respecto al control (300 mg proteína/l a las 48 h de cultivo). Sin embargo, como se observa en la Figura IV.11(B), no se observó ningún efecto sobre la oxidación del tiosulfato, medida como formación de sulfato. Las concentraciones menores del extracto levadura, de 0.1 y 0.2 g/l, si bien permitieron un mejor crecimiento (350 y 380 mg proteína/l) del consorcio, no presentaron un incremento de la oxidación (no mostrados).

Las condiciones de extracto de levadura de 1 y 1.5 g/l permiten obtener un incremento notable de la biomasa respecto al control. Así, se observaron datos de 726 mg/l de proteína en 1.5 g/l del extracto. En cambio la oxidación de tiosulfato se vio completamente abatida.

Al comparar los valores de crecimiento debidos a la adición de nitrógeno del extracto de levadura se obtiene lo siguiente: Si se considera que el extracto de levadura contiene 8% de nitrógeno total, entonces las cantidades adicionadas de nitrógeno fueron 8, 16, 40, 80 y 120 mg/l. Para los casos de 8 y 16 mg/l el incremento de biomasa fue de aproximadamente 50 y 80 mg/l respectivamente. Es decir que sin afectar la actividad sulfoxidante, el extracto de levadura (8 y 16 mg/l) adicionado al medio mineral con 140 mg/l (10 mM) de amonio de los cuales se consumieron 70 mg/l, favorecen el crecimiento microbiano. Esto posiblemente debido al aporte de vitaminas por el extracto de levadura. En algunas cepas puras de *Thiobacillus* se ha recomendado la adición de vitaminas para su cultivo como lo muestran los medio de ATCC.

Al adicionar 40 mg/l de nitrógeno del extracto de levadura, el crecimiento se incrementó 2.3 veces aunque la actividad sulfoxidante no fue afectada. Nuevamente el medio no está limitado por nitrógeno, y en total se adicionaron 180 mg/l del mismo. Es decir que el extracto de levadura está aportando algún nutrimento al medio mineral que favorece el crecimiento celular, sin embargo al no observarse un incremento de la actividad sulfoxidante es posible que no sean las bacterias sulfoxidantes las que presenten un mayor crecimiento. Lo que permite suponer la presencia de mixótrofos, o bien que la población sulfoxidante en estas condiciones aún mantiene

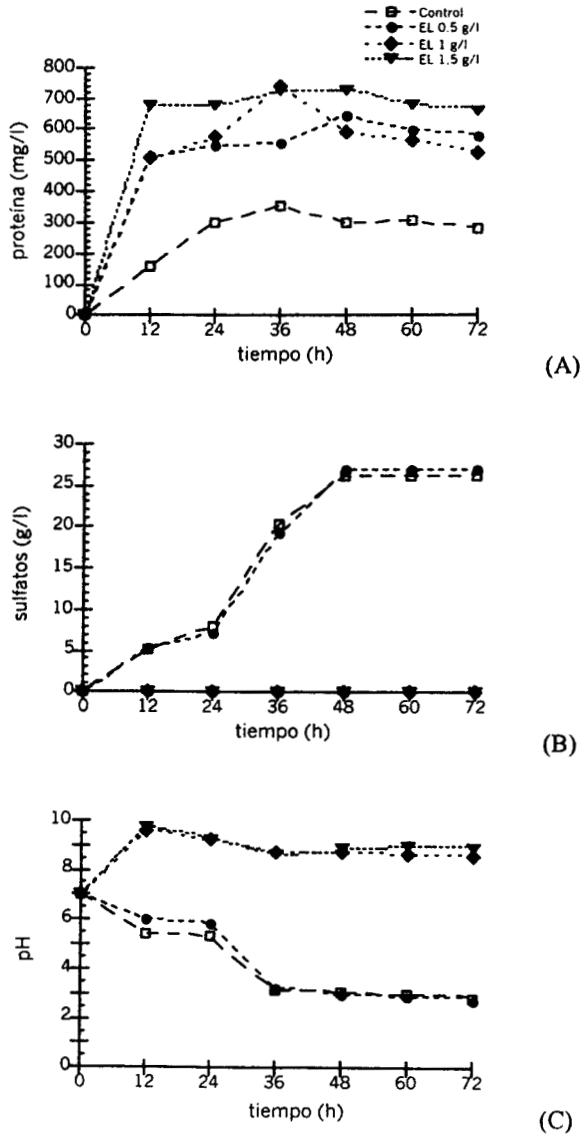


Figura IV.11 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B) y pH del consorcio crecido en diferentes concentraciones de extracto de levadura (EL), utilizando una concentración de tiosulfato de 20 g/l.

un equilibrio con los microorganismos heterótrofos. Este equilibrio se pierde al adicionar 80 y 120 mg/l de nitrógeno a partir del extracto.

De esta manera, se puede considerar que hasta concentraciones de 0.5 g/l de extracto de levadura los microorganismos heterótrofos presentes en el consorcio son los que consumen la materia orgánica, lo que se ve reflejado en el incremento del crecimiento. Por tanto, la actividad sulfoxidante no resulta afectada. Asimismo, permite suponer que los thiobacilli del consorcio son mixótrofos por lo cual crecen en estas condiciones de cultivo, aunque si se estimula su crecimiento esto no se vio reflejado por un incremento de la actividad sulfoxidante. Steinmuller y Bock (1976) reportaron un crecimiento mixotrófico de bacterias oxidantes de nitrito que estimuló tanto el crecimiento específico como el rendimiento celular. tiosulfato de 20 g/l.

Observaron, en diferentes cepas de *Nitrobacter*, cultivadas con filtrados de cultivos de microorganismos heterótrofos crecidos en extracto de levadura-peptona, que la oxidación de nitrito se incrementó hasta un 200% y el rendimiento de biomasa en 40%. Desconocen el mecanismo de estimulación, aunque señalan que este pudiera estar relacionado con el consumo de componentes inhibitorios del crecimiento de *Nitrobacter* por parte de los heterótrofos. Sin embargo, sus resultados mostraron que la presencia de acetato o piruvato en el medio de cultivo inhibía el crecimiento de los quimiolitotrofos. Afirman entonces que la inhibición se presenta en función del tipo de compuestos utilizado así como de la cepa nitritoxidante. Cuando los cultivos que perdieron actividad fueron nuevamente crecidos en el medio mineral, los autores observaron que los microbios recuperaron la actividad quimiolitotrófica en tiempos de entre 3 y 4 semanas, lo cual les permitió concluir que los microorganismos mixótrofos pierden actividad cuando disponen de ciertas fuentes orgánicas para su crecimiento.

En este estudio, para poder concluir y siguiendo los estudios de Steinmuller y Bock (1976), los cultivos crecidos en 1 y 1.5 g/l de extracto de levadura se transfirieron a medios inorgánicos. Se encontró que la actividad sulfoxidante fue recuperada después de la segunda semana de cultivo, lo que hace suponer que en el consorcio las bacterias sulfoxidantes presentan características mixotróficas y que al crecer con fuentes orgánicas, en concentraciones mayores de 0.5 g/l de extracto de levadura, pierden actividad quimilitotrófica. Al respecto, Steinmuller y Bock (1976) señalan que cepas de *Nitrobacter* crecidas heterotróficamente presentaron bajos niveles de nitrito oxidoreductasa, lo que indica que las enzimas son inducibles por las condiciones de cultivo. Reportaron además que el microorganismo necesita de 3 a 4 semanas para la inducción de la enzima antes de iniciar su actividad sulfoxidante. Explicación que puede extrapolarse al comportamiento del consorcio estudiado.

Los resultados mostraron que: a) la influencia de materia orgánica puede estar relacionada tanto

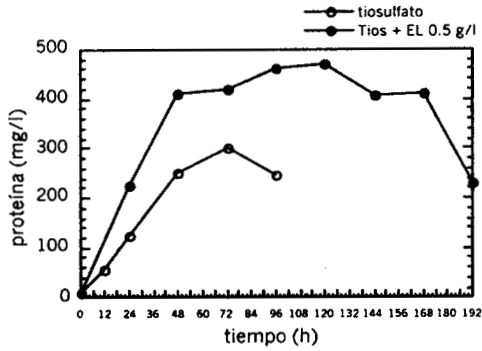
con el crecimiento como con la actividad quimiolitotrófica; b) Se puede estimular el crecimiento lo cual no implica que la actividad se vea afectada positiva o negativamente; c) El efecto esta en función de las concentraciones y tipos de compuestos orgánicos adicionados al medio de cultivo. d) Existen autótrofos facultativos (mixótrofos) que pueden crecer heterotróficamente y perder su capacidad sulfoxidante, pero recuperan esta en condiciones de cultivo adecuadas; finalmente e) esta capacidad es característica del género y especie microbiana.

IV.6 Cinéticas de crecimiento y producción de sulfatos del consorcio en un fermentador agitado

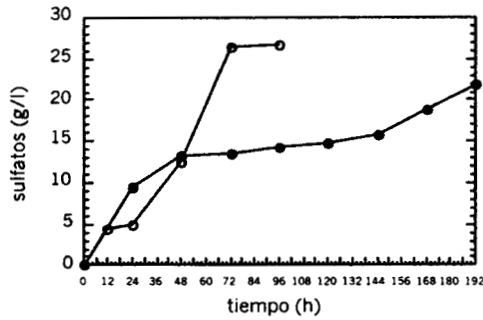
Para iniciar el estudio de la oxidación de compuestos azufrados en condiciones controladas de oxígeno, pH y temperatura se utilizó un fermentador agitado. Los primeros experimentos para el consorcio, consistieron en evaluar el crecimiento y producción de sulfatos en un medio con 20 g/l de tiosulfato, con y sin extracto de levadura (0.5 g/l), controlando el oxígeno disuelto en 1.6 mg/l. En los experimentos el pH en un caso no fue controlado y en otro se controló en 7.0. En el primero se siguió su tendencia a través del tiempo. Los resultados se presentan en la Figura IV.12 (sin control de pH) y IV.13 (pH=7.0).

Como se observa en la Figura IV.12 para el consorcio la fase estacionaria se alcanzó aproximadamente a las 48 horas de cultivo. Esto coincidió con la caída de pH del sistema y la oxidación completa del tiosulfato. El comportamiento es parecido al observado en matraz, sin embargo la fase estacionaria se alcanzó 12 h más tarde. El crecimiento del consorcio se vio favorecido cuando al medio se adicionaron 0.5 g/l de extracto de levadura, incrementándose de 300 mg proteína/l a 629 mg proteína/l. La fase estacionaria se alcanzó aproximadamente a las 72 h y la biomasa disminuye disminuir el crecimiento a las 132 horas aproximadamente. Respecto a la formación de sulfatos se observa que en condiciones de heterotrofia la acumulación del compuesto fue lenta respecto al control. Así, para alcanzar el máximo de oxidación de tiosulfato (26 g/l de sulfato), el consorcio necesitó de aproximadamente 192 h de cultivo. En tanto en el medio de tiosulfato la oxidación completa de la fuente de energía se observó a las 72 h. La disminución del pH coincide con el incremento de la concentración de sulfatos, sin embargo en ambas condiciones de cultivo se observó un incremento del pH para iniciar su disminución después de 24 h y 120 h para los medios de tiosulfato y extracto de levadura respectivamente. El caso del extracto de levadura, el mayor incremento del pH se debe a la desaminación de los aminoácidos del extracto. Los resultados anteriores difieren de lo observado en los cultivos en matraz. Se puede suponer que la diferencia se pudiera deber al

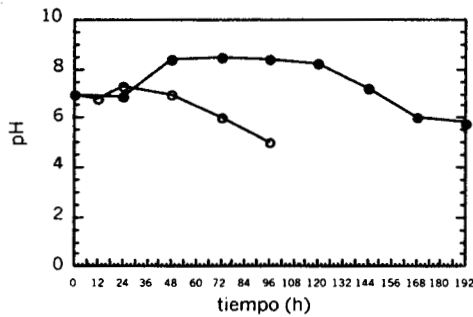
cambio de condiciones de cultivo



(A)



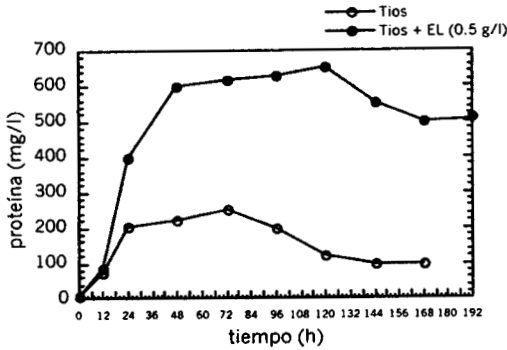
(B)



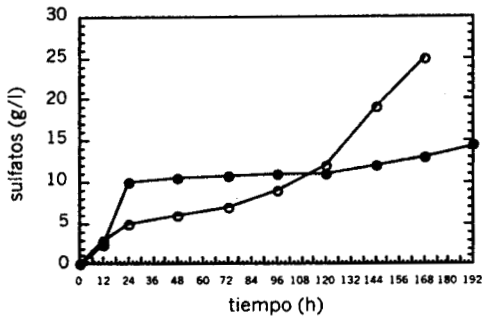
(C)

Figura IV.12 Crecimiento (A), producción de sulfatos (B) y pH (C) del consorcio crecido en un fermentador agitado en cultivos en lote sin control de pH, oxígeno disuelto de 1.6 mg/l y 30 °C de temperatura. Las condiciones evaluadas fueron: tiosulfato (20 g/l) y tiosulfato (20 g/l) más

extracto de levadura (EL, 0.5 g/l).



(A)



(B)

Figura IV.13. Crecimiento (A), producción de sulfatos (B) del consorcio crecido en un fermentador agitado en cultivos en lote con control del pH 7, oxígeno disuelto 1.6 mg/l y 30 °C de temperatura. Las condiciones evaluadas fueron: tiosulfato (20 g/l) y tiosulfato (20 g/l) más extracto de levadura (EL) 0.5 g/l.

del consorcio. Entre estos cambios, la oxigenación es un factor a considerar en el sentido que posiblemente permita mejores condiciones de crecimiento de los microorganismos del consorcio (heterótrofos y sulfoxidantes) por lo que el equilibrio de las poblaciones puede cambiar. Por otro lado el pH desempeña un factor importante de la oxidación. De acuerdo a los resultados se puede afirmar que bajo estas condiciones de cultivo el extracto de levadura en concentraciones de 0.5 g/l retrasa la oxidación de tiosulfato sin afectar el crecimiento de los heterótrofos del consorcio (Figura IV.12A).

En la Figura IV.13 donde se muestran los resultados obtenidos en los experimentos de control de pH, se observa que tanto la condición de tiosulfato de sodio y tiosulfato más extracto de levadura, los tiempos de la fermentación se incrementaron considerablemente. Esto se observa claramente en la oxidación del tiosulfato a sulfato, ya que en condiciones quimilitótrofas el consorcio necesitó de aproximadamente 168 horas para alcanzar los máximos de conversión (26 g/l de sulfato). En tanto, en el cultivo con extracto de levadura solamente se logró un 43 % de oxidación (15 g/l de sulfatos) a las 192 h. Al parecer el pH es un factor importante de la oxidación y como se puede concluir el pH de 7 no favorece la oxidación de tiosulfato. Por otro lado, utilizando el mismo consorcio se reportó (Alcántara y col., 1999) que la oxidación de bisulfuro de carbono fue mejor a valores de pH entre 6 y 7. Robertson y Kuenen (1991) señalan que la actividad sulfoxidante de los thiobacilli, en relación al pH, está en función de la especie. Por su parte Buisman y col (1989) encontraron que los valores de pH en intervalos de 7 a 9 fueron los óptimos para un consorcio sulfuro oxidante. El consorcio de este estudio fue evaluado para la oxidación de bisulfuro de carbono y se encontró que la mayor actividad se obtuvo en valores pH de 6 y 7 (Alcántara y col., 1999). Por su parte Sublette (1987), en trabajos con *Thiobacillus denitrificans*, encontró que este microorganismo presentó actividades de sulfoxidación óptimas a un pH de 7. Los resultados observados condujeron a disminuir el pH de control a 5.5 para las posteriores evaluaciones en cultivo continuo.

IV.7. Efecto de inhibidores de crecimiento sobre la actividad sulfoxidante del consorcio

De acuerdo a los estudios sobre la composición de las especies microbianas del consorcio sulfoxidante proveniente de los biolavadores de lecho escurrido, efectuados por Hugler y col. (1996), el consorcio esta constituido por una comunidad microbiana heterogénea, hongos, levaduras y bacterias. Esta diversidad microbiana es conveniente tanto para la formación de la biopelícula en el soporte del biolavador, como en la oxidación de los compuestos reducidos de azufre.

Con la finalidad de evaluar la actividad sulfoxidante que presentan tanto heterótrofos (hongos) como litótrofos (bacterias) del consorcio se utilizaron inhibidores del crecimiento para ambas especies microbianas. Para ello, en el medio Sabouraud con 10 mg/l de cloramfenicol y en el medio mineral con 5 mg/l de nistatina fue crecido el consorcio, utilizando CS₂ como fuente de energía. La actividad sulfoxidante fue determinada por respirometría y las bacterias fueron identificadas por tinción Gram, además de observar preparaciones de los cultivos en el

microscopio de luz. Los resultados se muestran en la Tabla IV.1.

El medio Sabouraud más cloramfenicol presentó buen crecimiento para los microorganismos heterótrofos, hongos y levaduras y no se observó crecimiento bacteriano. La actividad sulfoxidante que presentan estas especies fue de 0.3 mg CS₂/g proteína min. Por otro lado en el medio mineral más nistatina se observó el crecimiento de bacterias gram negativas, muy posiblemente del género *Thiobacillus*. La actividad de oxidación de CS₂ fue aproximadamente 7 veces mayor a la observada para los hongos y levaduras, 2 mg CS₂/g proteína min. La importancia de los microorganismos heterótrofos en el consorcio, se ha relacionado a la formación de biopelícula en sistemas como los biolavadores de lecho escurrido lo que señala su importancia de formar parte del consorcio.

Tabla IV.1. Crecimiento microbiano y actividad sulfoxidante del consorcio en medio suplementados con inhibidores de crecimiento, utilizando CS₂ (100 mg/l) como sustrato a 30 °C y pH 7.

Microorganismos/ Medio	Hongos	Levaduras	Bacterias	Actividad mg CS ₂ /gproteínamin
Sabouraud+				0.3
Cloramfenicol (1.25 U/ml)	(+++)	(+++)	(-)	
Mineral Media +			(+++)	2.0
Nistatina (8 µg/ml)	(-)	(-)	Gram-negativas	

CULTIVO EN QUIMIOSTATO.

Una de las finalidades de realizar estudios a nivel laboratorio sobre procesos de eliminación biológica de contaminantes es el escalamiento para su posterior aplicación industrial. Es necesario para ello establecer el tipo de reactor que presente las mejores características de eliminación del contaminante. En el caso de los compuestos reducidos de azufre se han utilizado los reactores totalmente agitados, que utilizan un consorcio sulfoxidante (Buisman y col. 1989) o cepas puras de *Thiobacillus* (Sublette, 1987; Visser y col, 1997), para la eliminación de sulfuro de corrientes acuosas. Este sistema se utiliza también para el tratamiento de corrientes acuosas contaminadas con tiosulfato y tiocianatos de la industria fotográfica (Robertson y Kuenen, 1991). Por su parte Janssen y col. (1997) reportaron que al separar la agitación y la aireación del reactor donde se efectúa la oxidación de sulfuro por un consorcio sulfoxidante, se favoreció una máxima acumulación de azufre elemental. Asimismo, Gommer y col. (1988a, 1988b) sugieren la utilización de reactores de lecho fluidificado para un proceso simultáneo de desnitrificación y sulfuroxidación. Se identificó a *Thiomicrospira* sp. como uno de los microorganismos del consorcio. En el caso del tratamiento de gases contaminados con sulfuros (H_2S y CS_2) se han utilizado biolavadores de lecho escurrido (Revah y col., 1995; Torres y col., 1993) así como biofiltros (Yang y Allen, 1994; Duma-Degorce y col., 1997). En ambos procesos se utilizaron consorcios sulfoxidantes.

De esta manera el cultivo continuo en un reactor completamente agitado del consorcio sulfoxidante y de *Thiobacillus thioeparus* ATCC 23645 fue la siguiente etapa de estudio de la oxidación de tiosulfato. El objetivo fue evaluar el comportamiento y características de los microorganismos que intervienen en la oxidación de los compuestos reducidos de azufre en quimiostato. Esto con la finalidad de establecer las condiciones bajo las cuales se favorece la oxidación parcial del tiosulfato a azufre elemental. Para ello se evaluó el efecto de la concentración de oxígeno, el uso de inhibidores de cadena respiratoria (tiocianatos y cianuro) y el uso de inhibidores de actividad enzimática (NEM), que inhibe la oxidación del azufre.

IV.8 Cultivo continuo del consorcio.

En las Figuras IV.14 y IV.15 se presenta el comportamiento del consorcio sulfoxidante en quimiostato. En la Figura IV.14 el tiempo que se gráfica es de 1000 días y corresponde a

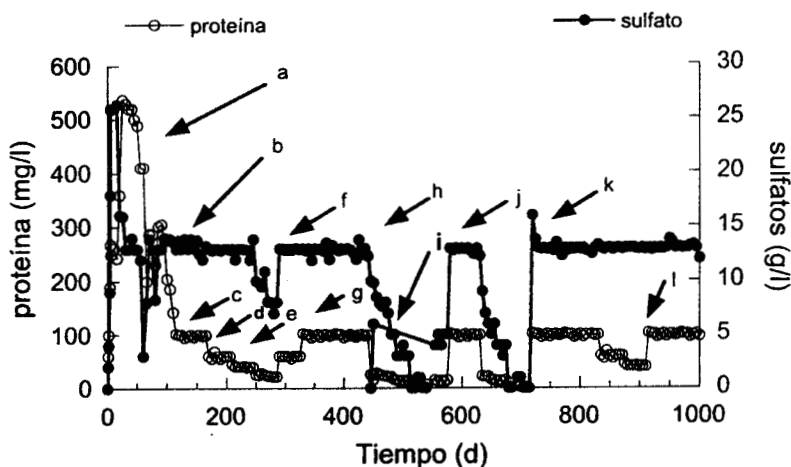


Figura IV.14. Cultivo continuo del consorcio sulfoxidante a lo largo del estudio, el pH fue controlado en 5.5 y 30 °C de temperatura. (→ a) arranque del cultivo; (→ b, → c) estabilización, crecimiento de 100 mg/l de proteína, en tasas de dilución de 0.5 d⁻¹; (→ d) D= 3 d⁻¹; (→ e) valores cercanos a la tasa de dilución crítica D=3.4 d⁻¹; (→ f) D=2.4 d⁻¹; (→ g) oxígeno disuelto 1.6 mg/l a una D= 3 d⁻¹; (→ h) limitación por oxígeno, concentraciones de 0.1mg/l, 0.085 mg/l y 0.07 mg/l (→ i) ; (→ j) uso de los inhibidores cianuro y NEM en concentraciones de 1 mM; (→ k), estabilización; (→l) D= 3 d⁻¹.

una representación del consorcio a lo largo del estudio, aunque cabe señalar que el reactor continúa en operación. En la Figura IV.15 el tiempo que se gráfica es de 90 días de cultivo y representa el arranque del reactor, mostrándose además algunos cambios de la tasa de dilución así como de la concentración de tiosulfato del medio. El pH se controló en 5.5 y el oxígeno disuelto en 3.8 mg/l en los 90 días de cultivo. La concentración inicial de tiosulfato fue de 20 g/l. El cultivo se inició en lote y al momento de alcanzar la fase estacionaria se cambió a continuo utilizando una D de 0.2 d⁻¹. Posteriormente se redujo la concentración del tiosulfato en el medio a 10 g/l, con esto se varió la carga de entrada del tiosulfato.

En la Figura IV.14 de manera general, se observan diferentes condiciones de operación del quimostato. El consorcio alcanza una estabilidad después de que el reactor operó en tasas de dilución mayores de 1 y concentraciones de tiosulfato de 10 g/l. Esto, teniendo en cuenta las condiciones de arranque del reactor, principalmente la concentración de sustrato inicial (20 g/l). De esta manera, el consorcio presentó valores de crecimiento de 100 mg/l para

valores de $D = 0.4 \text{ d}^{-1}$, disminuyendo este a 60 mg/l en tasas de dilución mayores e iguales a $D = 1.2 \text{ d}^{-1}$. En tanto a una $D = 3.4 \text{ d}^{-1}$, el consorcio no fue capaz de oxidar todo el tiosulfato de entrada, lo que indicó la cercanía a la tasa de dilución crítica, por lo cual el crecimiento disminuye a valores de 30 mg/l de proteína. Cuando se evaluaron diferentes concentraciones de oxígeno se observó que el cultivo fue capaz de crecer en 0.2 mg de O_2/l con la acumulación de azufre elemental en el medio. En tanto las concentraciones menores de oxígeno, 0.07 mg/l y menores afectaron el crecimiento del consorcio y por lo tanto la oxidación del tiosulfato. El uso de inhibidores mostró o el efecto negativo sobre el crecimiento del consorcio, en tanto que el tiocianato no afectó la oxidación del tiosulfato.

En la Figura IV.15 donde se presenta 90 días de operación, se observa que el consorcio después de la fase exponencial de crecimiento alcanza un estado estacionario en aproximadamente 2 días de cultivo. En este tiempo oxida todo el tiosulfato presente y se alcanza el máximo de conversión a sulfato (26 g/l). En este momento se inició la alimentación de medio. A un valor de $D = 0.2 \text{ d}^{-1}$ todo el tiosulfato de entrada ($Q_{\text{S}_2\text{O}_3^{2-}} = 1.8 \text{ g/l d}$) fue oxidado a sulfatos ($Q_{\text{SO}_4^{2-}} = 2.5 \text{ g/l d}$). El consorcio alcanzó un estado estacionario y a los 14 días de cultivo se cambió la concentración de tiosulfato en el medio a 10 g/l ($\rightarrow a$) utilizando la misma tasa de dilución. Como se puede observar la concentración de sulfatos empezó a disminuir con el tiempo hasta alcanzar el estado estacionario aproximadamente a los 12 días de cultivo, con oxidación completa del tiosulfato.

Al disminuir la concentración de tiosulfato, disminuyó la concentración del sulfato y el crecimiento del consorcio fue estimulado. En estas condiciones se alcanzaron valores de aproximadamente 550 mg proteína/l mientras que en 20 g/l de tiosulfato los valores fueron de aproximadamente 300 mg/l . Los valores de crecimiento observados son similares a los obtenidos en matraz (aprox. 380 mg proteína/l) en concentraciones de sulfato de 26 g/l . Sin embargo para 13 g/l de sulfatos el valor de proteína en el fermentador agitado fue 3 veces mayor (150 mg/l en matraz vs 550 mg/l en fermentador). Al parecer el crecimiento del consorcio presenta una compensación de este parámetro al salir de condiciones de cultivo de estrés iónico y posiblemente exista también una adaptación de los microorganismos a las condiciones de concentraciones altas de sulfato, lo cual permitió observar un aumento significativo en su valor. Un resultado similar es el reportado por Janssen (1997) donde un consorcio sulfoxidante presentó una actividad compensatoria cuando se interrumpió la alimentación de sulfuro y se utilizó azufre elemental como fuente de energía. El efecto se vio reflejado a su vez en un incremento del crecimiento respecto al crecimiento en azufre elemental donde no se utilizó sulfuro de hidrógeno.

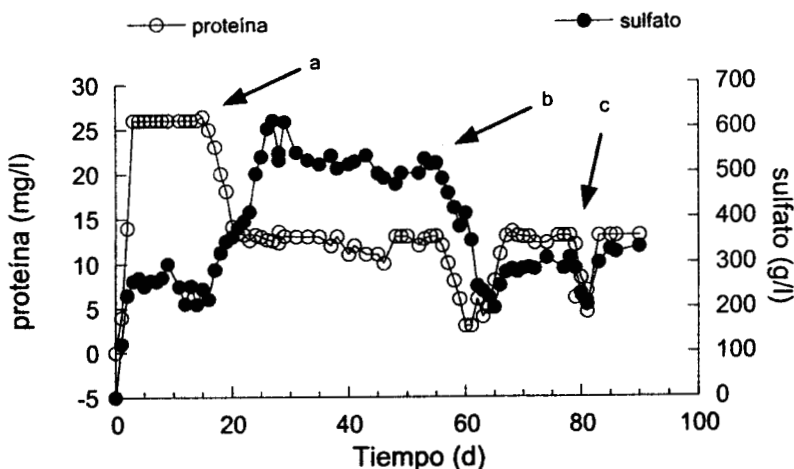


Figura IV.15. Crecimiento y producción de sulfatos en quimostato del consorcio en 90 días de cultivo. (→ a) cambio de concentración de tiosulfato de 20 a 10 g/l. (→ b) cambio de tasa de dilución de 0.2 a 0.5 d⁻¹. (→ c) cambio de tasa de dilución de 0.5 a 0.1 d⁻¹.

Finalmente en la Figura IV.15 se observan dos estados estacionarios al cambiar la tasa de dilución. El primer cambio fue el paso de $D = 0.2$ d a una $D = 0.5$ d⁻¹ (→ b), mientras que el segundo cambio fue al pasar de $D = 0.5$ d⁻¹ a $D = 1$ d⁻¹. Ambas condiciones presentan estados estacionarios en aproximadamente 14 y 8 días con oxidación completa del tiosulfato.

No se detectaron intermediarios de la oxidación lo que hace suponer que el consorcio sigue una vía oxidativa directa a sulfato.

IV.9 Cultivo continuo de *Thiobacillus thioparus* ATCC 26345

En la Figura IV.16 se presenta el comportamiento de *Thiobacillus thioparus* en quimostato. El tiempo que se gráfica es de 78 días de cultivo, con cambios en D . El pH se controló en 6 de acuerdo a las características señaladas para esta cepa por ATCC. El oxígeno se controló en 3.8 mg/l y la concentración de tiosulfato fue de 10 g/l. El cultivo se inició en lote y al momento de alcanzar la fase estacionaria se cambió a cultivo continuo con una tasa de dilución $D=0.2$ d⁻¹. Aproximadamente a los 6 días de cultivo *Thiobacillus*

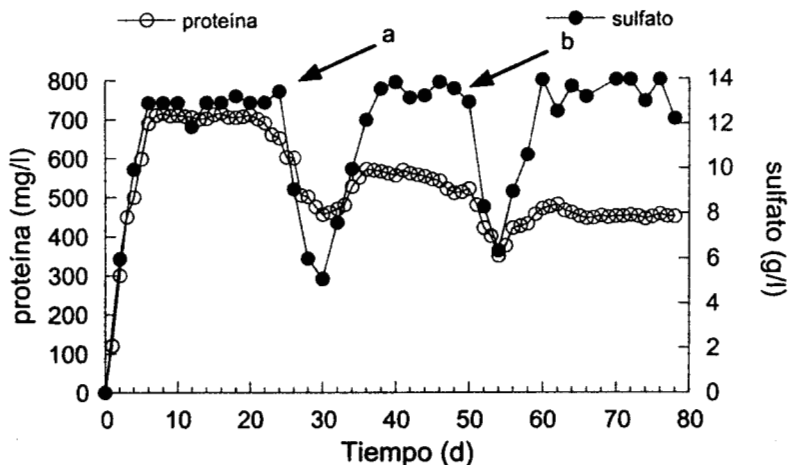


Figura IV.16. Crecimiento y producción de sulfatos en quimiostato de *Thiobacillus thioparus* ATCC 26345 en 78 días de cultivo. (→ a) cambio de tasa de dilución de 0.2 a 0.5 d^{-1} . (→ b) cambio de tasa de dilución de 0.5 a 0.9 d^{-1} .

thioparus entró en fase estacionaria de crecimiento alcanzando valores máximos de oxidación (13 g/l de sulfato) y un crecimiento de 700 mg proteína/l. En general se observó que este microorganismo presentó valores de crecimiento mayores que el consorcio. Al parecer una mayor cantidad de energía esta disponible para el crecimiento del microorganismo. Como se ha reportado (Robertson y Kuenen, 1991) el crecimiento de las diferentes especies de thiobacilli es función de la cepa.

Se observan también dos estados estacionarios por el cambio de la tasa de dilución. El primer cambio fue de el paso de $D = 0.2 d^{-1}$ a una $D = 0.4 d^{-1}$ (→a) alcanzando un estado estacionario a los 16 días de cultivo, con la oxidación total del sustrato (5.2 g/l d de sulfatos). El segundo cambio fue de $D=0.4$ a una $D = 0.9$ (→ b) y el estado estacionario se observó aproximadamente a los 8 días del cultivo, presentado también oxidación completa del tiosulfato.

Se detectó al sulfito como intermediario de la oxidación. Lo que hizo suponer un comportamiento diferente de este microorganismo respecto al consorcio con relación al metabolismo oxidativo de tiosulfato.

IV.10 Efecto de la tasa de dilución sobre el crecimiento y la oxidación en el consorcio y *Thiobacillus thioparus* ATCC 26345.

a) Consorcio.

Bajo las mismas condiciones señaladas en IV.9, se evaluaron diferentes tasas de dilución sobre la actividad sulfoxidante y el crecimiento del consorcio. Para ello se incrementó la tasa de dilución hasta valores cercanos a la tasa de dilución crítica, graficando los estados estacionarios para cada D. Los resultados se presentan en la Figura IV.17. Asimismo el balance de la oxidación se presenta en la Tabla IV.2.

Como se observa el consorcio presenta un comportamiento característico en quimiostato y a valores de $D=3.4 \text{ d}^{-1}$ nos acercamos a la tasa de dilución crítica donde el reactor se empieza a lavar.

De acuerdo a la Tabla IV.2 se puede señalar que, hasta una $D=3 \text{ d}^{-1}$ todo el tiosulfato es oxidado a sulfatos. Así, para una carga de tiosulfato de $Q_{S_2O_3^{2-}} = 27 \text{ g/l d}$ se encuentra a la salida una carga de sulfatos de $Q_{SO_4^{2-}} = 40.2 \text{ g/l d}$.

Como se indicó, a una $D=3.4 \text{ d}^{-1}$ el consorcio se acerca a su tasa de dilución crítica (D_c). A este valor de D el crecimiento disminuye y se detecta tiosulfato a la salida del consorcio ($Q_{S_2O_3^{2-}} = 5 \text{ g/l d}$). La eficiencia oxidativa (g sulfato/mg proteína día) parece estar cerca del límite en función del tiempo de residencia del medio (aprox. 7h)

El cultivo continuo del consorcio muestra su baja capacidad de crecimiento, indicando que gran parte de la energía generada a partir de la oxidación de tiosulfato se utiliza para la fijación de CO_2 . Este factor puede favorecer una mayor capacidad respiratoria, relacionada a una necesidad de producir ATP para utilizarlo en el flujo inverso de electrones. Por otro lado, es notorio la disminución del crecimiento al pasar de una $D=0.4 \text{ d}^{-1}$ a una $D=1.2 \text{ d}^{-1}$, que puede atribuirse a una mayor selección de los microorganismos sulfoxidantes, es decir que los heterótrofos que son poco efectivos en la oxidación tienen una menor posibilidad de crecimiento a mayor tasa de dilución.

Los resultados de la cuantificación de intermediarios y producto final de la oxidación de tiosulfato mostraron que no se formaron intermediarios de la oxidación. De este modo, bajo las condiciones de estudio evaluadas, se detectó únicamente sulfato. Dadas las características de cultivo del consorcio, como capacidad mixotrófica, y de acuerdo a lo señalado por Kelly y col. (1997) es posible que la ruta de oxidación utilizada sea la vía directa a sulfatos (TOMES).

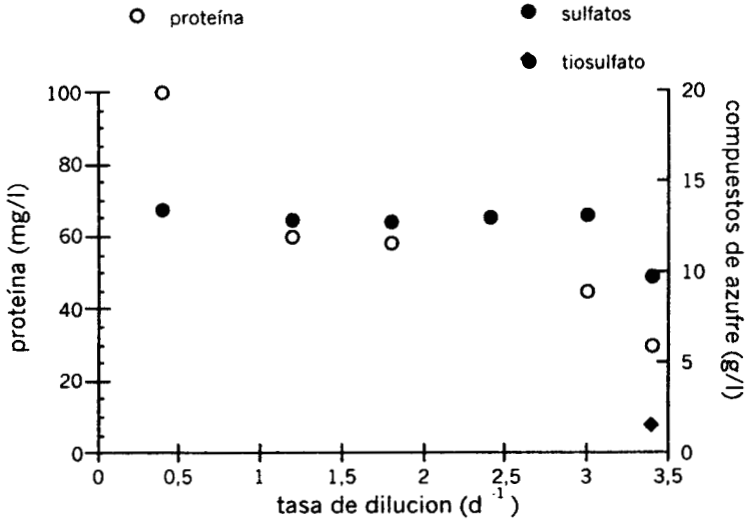


Figura IV.17 Estados estacionarios de diferentes tasas de dilución vs. crecimiento y compuestos reducidos de azufre del consorcio sulfoxidante.

Tabla IV.2 Balance de la oxidación de tiosulfato en el cultivo continuo del consorcio.

D (d ⁻¹)	QS ₂ O ₃ ²⁻ (g/l d)	S ⁰ (e) (g/l)	SO ₄ ²⁻ (s) (g/l)	QSO ₄ ²⁻ (s) (g/l d)	S ₂ O ₃ ²⁻ (s) (g/l)	QS ₂ O ₃ ²⁻ (s) (g/l d)	S ⁰ (s) (g/l)	Proteína (mg/l)
0.4	3.6	1.5	13.0	5.2	0	0	1.3	100
1.2	10.8	4.5	13.2	15.6	0	0	4.3	60
1.8	16.2	6.8	12.9	23.04	0	0	6.3	60
2.4	21.6	9.1	12.8	30.14	0	0	8.8	60
3.0	27.0	11.3	13.4	40.2	0	0	10.8	50
3.4	30.6	12.9	10.0	30.6	1.5	5	12.04	30

b) *Thiobacillus thioparus* ATCC 26345

Bajo las mismas condiciones señaladas en 10, se evaluó el efecto del incremento de la tasa de dilución sobre el crecimiento y actividad sulfoxidante de *Thiobacillus thioparus* ATCC 26345. Para ello se incremento D hasta detectar la proximidad de la tasa de dilución crítica (Dc). Los resultados se presentan en la Figura IV.18. En la Tabla IV.3 se presenta el balance obtenido de la oxidación del tiosulfato.

Se puede observar en la figura que a una $D=0.9 \text{ d}^{-1}$ ($Q_{S_2O_3^{2-}} = 8.1 \text{ g/l d}$) la cepa pura presenta una oxidación completa del sustrato. De esta manera, todo el tiosulfato de entrada es oxidado a sulfato y sulfito ($Q_{SO_4^{2-}} = 11.9 \text{ g/l d}$, $Q_{SO_3^{2-}} = 0.9 \text{ g/l d}$). Sin embargo al incrementar la tasa de dilución a $D= 1.2 \text{ d}^{-1}$ este microorganismo ya no es capaz de utilizar todo el sustrato de entrada. Por lo tanto se detecta este compuesto a la salida del reactor en una carga de ($Q_{S_2O_3^{2-}} \text{ salida}$) 1.2 g/l d y el crecimiento a su vez empieza a disminuir. Cuando se incrementó aún más la tasa de dilución este efecto es más evidente. Así, para una $D= 1.9 \text{ d}^{-1}$ el crecimiento disminuye notablemente, pasando de 280 mg/l para una $D=0.9 \text{ d}^{-1}$ a 160 mg/l para una $D=1.9 \text{ d}^{-1}$.

Como se señaló anteriormente *Thiobacillus thioparus* tiene la capacidad de crecer más que el consorcio sulfoxidante. Esto puede observarse si se compara los valores de crecimiento observados en ambos (Figura IV.15 y IV.16). Así a una misma $D=1.2 \text{ d}^{-1}$ los valores de crecimiento fueron para el consorcio de 60 mg/l , mientras que para la cepa pura fue de 250 mg/l . *Thiobacillus thioparus* crece 4 veces más que el consorcio. Sin embargo presenta una menor eficiencia de oxidación ($\text{g sulfato/mg proteína d}$) que lo limita para crecer en tiempos de residencia cortos. Así, para la misma $D=1.2 \text{ d}^{-1}$ el consorcio tiene una eficiencia oxidativa 10 veces mayor.

Este comportamiento se puede relacionar a una menor capacidad respiratoria del *Thiobacillus thioparus*, como se explica a continuación:

En primera instancia se puede deducir de estos experimentos que la cepa de *Thiobacillus thioparus* es más eficiente para utilizar la energía disponible para su crecimiento. No así el consorcio sulfoxidante que al parecer gran parte de la energía no va a crecimiento sino posiblemente se "gaste" en el flujo inverso de electrones. Esto hace que el consorcio necesite de un mecanismo más eficiente de generación de energía para su crecimiento y conservación, es decir oxidar más y en mayor cantidad al sustrato. La manera en que un microbio tiene mayor eficiencia de oxidación se puede relacionar a una mayor capacidad respiratoria. Esto es que oxidan mayor cantidad de sustrato por una mayor capacidad de incorporar electrones a la cadena respiratoria para la generación de ATP. Para ello es

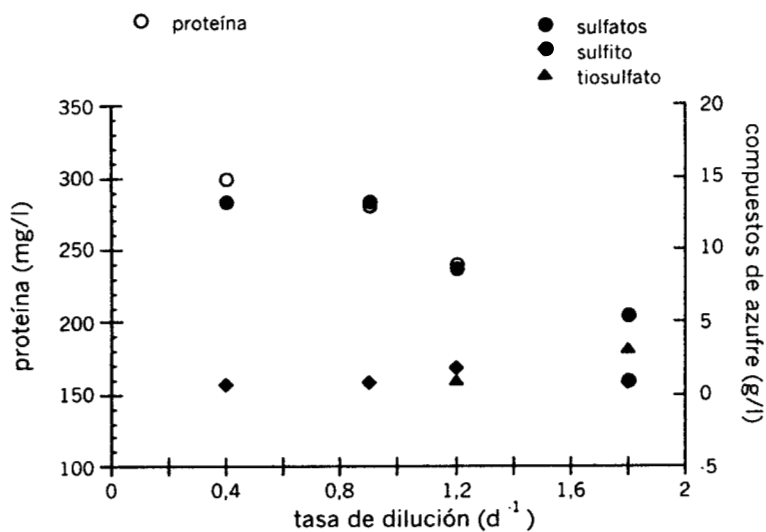


Figura IV.18. Estados estacionarios de diferentes tasas de dilución vs. crecimiento y compuestos reducidos de azufre de *Thiobacillus thioeparus* ATCC 26345.

Tabla IV.3. Balance de la oxidación de tiosulfato en el cultivo continuo del *Thiobacillus thioeparus* ATCC 26345.

D	Q _{S₂O₃²⁻}	S ^o (e)	SO ₄ ²⁻ (s)	Q _{SO₄²⁻(s)}	SO ₃ ²⁻ (s)	Q _{SO₃²⁻(s)}	S ₂ O ₃ ²⁻ (s)	Q _{S₂O₃²⁻(s)}	S ^o (s)	Prot
(d ⁻¹)	[g/l d]	[g/l]	[g/l]	[g/l d]	[g/l]	[g/l d]	[g/l]	[g/l d]	[g/l]	[mg/l]
0.4	3.6	1.5	13.5	5.4	1.6	0.6	0	0	1.5	300
0.9	8.1	3.2	13.3	11.9	1.9	0.9	0	0	3.1	280
1.2	10.8	4.5	8.6	10.3	1.5	1.8	1.0	1.2	4.3	250
1.8	16.2	6.8	5.4	9.7	1.0	1.8	3.2	5.7	6.7	160

necesario que dispongan de diferentes oxidasas terminales (citocromos) que tengan alta afinidad por el oxígeno. Un mecanismo de referencia es el reportado para *Azotobacter vinelandii*, el cual necesita de una alta tasa respiratoria para la generación de ATP útil para la fijación de nitrógeno. Por lo tanto, sintetiza oxidasas con alta afinidad por el oxígeno que le permiten una mayor eficiencia para la generación de energía no reflejada en crecimiento (Linkerhägner y Oelze, 1997).

De lo anterior se puede deducir que posiblemente el consorcio sulfoxidante, específicamente los microorganismos encargado de la oxidación del tiosulfato, disponga de oxidasas terminales de alta afinidad por el oxígeno. De esta manera al parecer el consorcio se "satura" menos, es decir acarrea más rápidamente los electrones, que *Thiobacillus thioparus* por lo que oxida mejor el tiosulfato, esto es, no sólo en mayor cantidad sino más rápido.

Finalmente como se observa en la Tabla IV.3, la oxidación de tiosulfato por *Thiobacillus thioparus* forma al sulfito como intermediario. De acuerdo a estos resultados se puede proponer que este microorganismo sigue una ruta de oxidación vía formación de azufre y sulfito antes de la oxidación completa a sulfato. Lyric y Suzuki (1969); Suzuky, (1999) y Hooper y DiSpirito (1985) han reportado este mecanismo en un cepa de *Thiobacillus thioparus*. Han propuesto que el sulfito formado se oxida completamente a sulfato vía fosforilización de sustrato, mientras el azufre se oxida a sulfato por la azufre oxidasa.

c). Comparación de parámetros del consorcio y *Thiobacillus thioparus* del cultivo continuo.

En la Tabla IV.4 se presenta la comparación del crecimiento (Y_x , mg/l) rendimiento en crecimiento ($Y_{x/s}$, g_{proteína}/g_{tiosulfato}) y eficiencia de oxidación ($P D/Y_x$, g_{sulfatos}/g_{proteína} d) de ambos cultivos. Se puede observar que en todos los casos la eficiencia oxidativa es mayor para el consorcio sulfoxidante. Este comportamiento se presenta tanto porque el consorcio crece menos y a que en general oxida más y a mayor velocidad el sustrato. Así, para una tasa de dilución de 1.2 d⁻¹, donde ambos cultivos oxidan completamente el tiosulfato de entrada, la eficiencia es 5 veces mayor para el consorcio (56 g_{sulfatos}/g_{proteína} d para *Thiobacillus thioparus* contra 250 g_{sulfatos}/g_{proteína} d para el consorcio). La diferencia es aun mayor cuando se incrementa la tasa de dilución ya que la cepa empieza a no oxidar completamente el tiosulfato. De esta manera para una D= 1.8 d⁻¹ la eficiencia oxidativa para *Thiobacillus thioparus* fue de 96 g_{sulfatos}/g_{proteína} d y para el consorcio de 380

$g_{\text{sulfatos}}/g_{\text{proteína d}}$, 4 veces mayor para el consorcio. Al parecer la diferencia disminuye, lo cual se explica por la disminución del crecimiento de *Thiobacillus thioparus* dado que el reactor se empieza a lavar. Kelly (1988), en una revisión de la bioenergética de los thiobacilli, reporta rendimientos de crecimiento ($Y_{x/s}$ max en $g_{\text{biomasa}}/\text{mol}_{\text{tiosulfato}}$) para diferentes microorganismos de este género bacteriano crecidos en quimiostato, entre ellos se puede mencionar: *Thiobacillus versutus* $8.10 g_{\text{biomasa}}/\text{mol}_{\text{tiosulfato}}$; *Thiobacillus tepidarius* $11 g_{\text{biomasa}}/\text{mol}_{\text{tiosulfato}}$ y *Thiobacillus denitrificans* $14.7 g_{\text{biomasa}}/\text{mol}_{\text{tiosulfato}}$. De acuerdo a los resultados obtenidos si se considera que la biomasa contiene 50% de nitrógeno los gramos de biomasa observados en el quimiostato ($D=0.4 d^{-1}$) fueron: para *Thiobacillus thioparus* $0.120 g_{\text{proteína}}/l d$ que es igual a $0.240 g_{\text{biomasa}}/l d$ que al dividirlos entre la carga de tiosulfato $0.022 \text{ mol}_{\text{tiosulfato}}/l d$, dan un rendimiento igual a $7.5 g_{\text{biomasa}}/\text{mol}_{\text{tiosulfato}}$. En tanto para el consorcio es de $2.5 g_{\text{biomasa}}/\text{mol}_{\text{tiosulfato}}$. En la bibliografía se ha reportado que *Thiobacillus denitrificans* en general presenta mayor capacidad de crecimiento, lo cual para Sublette (1987) es una característica que le confiere ventajas sobre otras cepas quimiolitotróficas. Sin embargo en

Tabla IV.4 Rendimiento del crecimiento y eficiencia oxidativa de *Thiobacillus thioparus* y el consorcio sulfoxidante en quimiostato

Microorganismo	Th	Mx	Th	Mx	Th	Mx
D, d^{-1}		0.4		1.2		1.8
$Q_{S_2O_3^{2-}}, g/l d$		3.6		10.8		16.2
$P_{SO_4^{2-}}, g/l$	13.5	13	13.3	12.9	8.6	12.8
$Y_x, g/l$	0.3	0.1	0.28	0.060	0.16	0.060
$Y_{x/s}, g_{\text{proteína}}/g_{S_2O_3^{2-}}$	0.033	0.011	0.031	0.006	0.017	0.006
$P \cdot D (Q_{SO_4^{2-}}), g/l d$	5.4	5.2	15.9	15.5	15.4	23.0
$Y_x \cdot D, mg/l d$	0.12	0.040	0.336	0.072	0.288	0.108
$*Q_{SO_4^{2-}}/Y_x, g_{\text{sulfatos}}/g_{\text{proteína d}}$	18	52	56	250	96	380

Th, *Thiobacillus thioparus*; Mx, consorcio sulfoxidante; *eficiencia oxidativa

condiciones aerobias, posiblemente la mayor limitante de este microorganismo es que la oxidación del sulfuro es directa a sulfatos, es decir no permite la oxidación parcial del sulfuro permitiendo así la acumulación de azufre elemental.

IV.10.1 Balance de carbono

Como se ha mencionado los microorganismos sulfoxidantes utilizan CO_2 como fuente de carbono. Bajo determinadas condiciones de crecimiento este nutrimento pudiera ser limitante del crecimiento, por ejemplo en medios sin fuente de CO_2 y con poca aireación del cultivo. En el caso del quimiostato en condiciones de adecuada aireación, de acuerdo al siguiente balance la fuente de carbono no esta limitando el crecimiento de los microorganismos:

De acuerdo a la producción de biomasa y la adición de CO_2 por la aireación se tiene:

a) Consorcio. Para una $D=3 \text{ d}^{-1}$ se tienen, $Y_x=0.05 \text{ g/l}$ de proteína, por lo cual $Y_x D=0.15 \text{ g}_{\text{proteína}}/\text{l d}$. Considerando que la biomasa contiene 50% de proteína entonces la biomasa formada es igual a $Y_x D=0.30 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{l d}$. Si ahora se considera que la biomasa contiene 50% de carbono se tienen entonces $0.15 \text{ g}_{\text{carbono}}/\text{l d}$ que son necesarios para el crecimiento celular obtenido.

b) *Thiobacillus thioparus*. En el caso de *Thiobacillus thioparus* para una $D=1.2 \text{ d}^{-1}$ se tiene, $Y_x=0.28 \text{ g/l}$ proteína y $Y_x D=0.33 \text{ g/l d}$. Considerando que la biomasa contiene 50% de proteína entonces $Y_x D=0.66 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{l d}$. Considerando que la biomasa contiene 50% de carbono se tienen $0.33 \text{ g}_{\text{carbono}}/\text{l d}$.

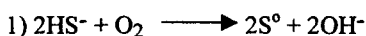
c) La adición de CO_2 en el aire es: con un flujo de aire de 1 vvm entonces se adicionan $0.2 \text{ gC}/\text{l}_{\text{medio}} \text{ d}$, de acuerdo a:

$1 \text{ vvm}=1 \text{ l}_{\text{aire}}/\text{l}_{\text{medio}} \text{ min}=1.44 \text{ m}^3_{\text{aire}}/\text{l}_{\text{medio}} \text{ d}$; si se tiene que el CO_2 por metro cúbico de aire es igual a $0.035 \text{ l CO}_2/\text{m}^3_{\text{aire}}$ entonces se adicionan $0.5 \text{ l CO}_2/\text{l}_{\text{medio}} \text{ d}$. Conociendo que aproximadamente se tienen $12 \text{ g C}/30 \text{ l CO}_2$ entonces los $0.5 \text{ l CO}_2/\text{l}_{\text{medio}} \text{ d}$ aportan 0.2 g $0.2 \text{ gC}/\text{l}_{\text{medio}} \text{ d}$.

Es decir que la aireación de 1 vvm aporta el suficiente carbono para el crecimiento celular del consorcio sulfoxidante, sin embargo dado que se encuentra muy cerca del limite se adicionó fuente de carbono 0.5 g/l de bicarbonato. En tanto que para el caso de *Thiobacillus thioparus* la sola aireación no aporta el suficiente carbono de crecimiento para lo cual se adicionó bicarbonato en una concentración de 1 g/l que aporta $(1.2 \text{ g/l d}) 0.48 \text{ gC}/\text{l}_{\text{medio}} \text{ día}$.

IV.11 Recuperación de azufre por la oxidación parcial de tiosulfato

Se ha documentado en la bibliografía que la oxidación del sulfuro de hidrógeno está regulada por la concentración de oxígeno en el medio de cultivo (Buisman y col., 1989; Stefess y col., 1996; Jansen y col., 1997; Visser y col., 1997). Dicha regulación se establece a nivel de la enzima azufre oxidasa, lo que permite la oxidación parcial del sulfuro, obteniendo azufre elemental como intermediario de la oxidación de acuerdo a:



$$\Delta G^{\circ} = -129.50 \text{ kJ/mol HS}^-$$



$$\Delta G^{\circ} = -772.43 \text{ kJ/mol HS}^-$$

Los niveles de oxígeno que favorecen la oxidación hasta azufre elemental se han reportado menores de 1 mg/l. Como se observa, la oxidación completa a sulfato requiere de 4 veces más oxígeno que la oxidación parcial a azufre elemental. Sin embargo es claro que la energía disponible para el microorganismo se reduce en aproximadamente 83 %. Es decir que el crecimiento microbiano está en desventaja cuando se regula la actividad metabólica por oxígeno.

Con el fin de evaluar el efecto del oxígeno disuelto sobre el crecimiento y metabolismo oxidativo del tiosulfato se procedió a regular su concentración en el medio de cultivo del consorcio y de *Thiobacillus thioeparus*. La primera etapa consistió en evaluar concentraciones hasta 0.2 mg/l de oxígeno disuelto, donde el sensor de oxígeno y su control por agitación en el fermentador resultan todavía posibles. En el consorcio, a una $D=2.4 \text{ d}^{-1}$, se observa que hasta esos niveles de oxígeno disuelto no se afectó la oxidación del tiosulfato. En tanto en la cepa pura, a una $D=0.9 \text{ d}^{-1}$, la oxidación resultó afectada negativamente desde una concentración de 1.5 mg/l de oxígeno disuelto (Tabla IV.5).

La capacidad de crecer en ambientes con baja tensión de oxígeno depende del género y especie microbiana, como se observa en estos resultados. En este sentido se ha reportado que *Rhizobium* y *Azotobacter vinelandii* (bacterias diazotrofas) presentan sistemas respiratorios ramificados que se expresan diferencialmente en función de la concentración de O_2 en el medio. En *Rhizobium*, el citocromo aa_3 , la oxidasa terminal expresada bajo condiciones aerobias, tiene menor afinidad al O_2 que el citocromo b el cual se expresa bajo

Tabla IV.5 Efecto del oxígeno disuelto sobre el crecimiento y la actividad sulfoxidante del consorcio, $D=2.4 \text{ d}^{-1}$, y de *Thiobacillus thioeparus* ATCC 23645 $D=0.9 \text{ d}^{-1}$.

Oxígeno disuelto (mg/l)	Actividad sulfoxidante SO_4^{2-} (g/l)	Tiosulfato salida (g/l d)	Proteína (mg/l)	Azufre (g/l)
Consorcio				
3.8	13.3	0	59	0
1.5	13.1	0	56	0
0.8	13.5	0	62	0
0.2*	12.0	0	58	0.2
<i>Thiobacillus thioeparus</i>				
3.8	12.8	0	290	0
1.5	6.2	4.1	110	0
0.8	0	8.1	0	0

* Difícil control

condiciones microaerofílicas. En el caso de *Azotobacter vinelandii* ocurre lo contrario: el citocromo bd, cuya expresión aumenta al incrementar el abastecimiento de O_2 al medio, tiene mayor afinidad al O_2 que las oxidasas terminales, que se expresan en bajas concentraciones de oxígeno. Este patrón de expresión de oxidasas terminales le permite a *Rhizobium* mantener funcionando su sistema respiratorio aún en bajas concentraciones de oxígeno, mientras que en *Azotobacter vinelandii*, el citocromo que favorece una alta actividad respiratoria evita la inhibición de la nitrogenasa en presencia de altas concentraciones de O_2 (Barquera y col., 1991; Poole y Hill, 1997)

IV.12 Utilización de mezclas de O_2 para el estudio de oxidación parcial de tiosulfato

Como se indicó anteriormente, la capacidad de crecer en baja tensión de oxígeno es dependiente del género y especie microbiana. Se ha establecido en este sentido la existencia de sistemas respiratorios ramificados, relacionados a una síntesis de citocromos con mayor afinidad al oxígeno. En este sentido, la concentración de O_2 puede regular la expresión de diferentes citocromos, ya sea de manera positiva o negativa. La regulación por O_2 de los

componentes del sistema respiratorio se han evidenciado en *Rhizobium*, *Azotobacter vinelandii*, *Escherichia coli* y *Paracoccus denitrificans*.

La bacteria *Escherichia coli* puede respirar aerobia o anaerobiamente utilizando diferentes oxidasas terminales para la síntesis de ATP. En presencia de oxígeno, el aceptor final de electrones puede ser el citocromo *o* (*cyoABCDE*) ó el citocromo *d* oxidasa (*cydAB*). El mecanismo de regulación por oxígeno de los genes que participan en las vías respiratorias aerobia y anaerobia, está mediado por dos distintos sistemas reguladores compuestos de los productos de los genes *fnr* y *arcA-arcB*. El Fnr es un regulador transcripcional de diferentes genes de la vía respiratoria, se activa cuando las células pasan de condiciones de crecimiento aerobias a anaerobias; entonces, reprime los genes de la respiración aerobia *cyoABCDE* y *cydAB* y activa diversos genes de la respiración anaerobia (Tseng y col., 1996).

En cuanto al género *Paracoccus*, que incluye especies que pertenecían al género *Thiobacillus*, algunos genes involucrados en la respiración con oxígeno son regulados en respuesta a la concentración del O₂, por arriba del punto de inicio de la anaerobiosis. *Paracoccus denitrificans* posee tres diferentes oxidasas terminales que se expresan bajo diferentes concentraciones de O₂. Al parecer, el operón de la oxidasa *cbb₃*, el cual tiene una alta afinidad hacia el oxígeno y es igual de eficiente como la oxidasa tipo *aa₃*, se encuentra bajo control del regulador FnrP. La síntesis de esta oxidasa aumenta al disminuir la concentración de oxígeno (Baker y col., 1998).

La segunda etapa de experimentación de control de oxígeno, consistió en utilizar un sistema que permitiera un control más preciso del O₂ disuelto, en concentraciones menores a 0.8 mg/l. Para ello se utilizaron mezclas certificadas de O₂ balance nitrógeno. Se usó una agitación de 500 rpm y un flujo de la mezcla de 500 ml/min. Se asumió que todo el O₂ de la mezcla se disolvió en el líquido. Se obtuvieron las siguientes concentraciones de oxígeno: 0.38, 0.3, 0.2, 0.1 y 0.07 mg/l.

Los resultados con 0.2 mg/l de O₂ y una $D=3 \text{ d}^{-1}$ mostraron que el consorcio no perdió actividad sulfoxidante y permitió la acumulación de azufre elemental en el medio. En tanto las concentraciones de 0.38 mg/l no se observó la acumulación del elemento. Por su parte, *Thiobacillus thioeparus*, $D=0.9 \text{ d}^{-1}$, en concentraciones de oxígeno de 0.8 mg/l no presentó crecimiento.

A continuación a una misma tasa de dilución ($D=3 \text{ d}^{-1}$), se probaron diferentes concentraciones de oxígeno disuelto: 0.2 mg/l, 0.1 mg/l y 0.70 mg/l. Se evaluó su efecto

sobre el crecimiento y la acumulación de azufre en el consorcio. Los resultados se presentan en la Tabla IV.6.

Tabla IV.6. Efecto de la concentración de oxígeno sobre el crecimiento y producción de azufre elemental del consorcio sulfoxidante utilizando concentraciones conocidas de oxígeno.

Oxígeno (mg/l)	$Q_{S_2O_3^{2-}(e)}$ (g/l d)	$Q_{S_2O_3^{2-}(e)}$ (g/l d)	S^o (g/l)	$Q_{S^o(s)}$ (g/l d)	Proteína (mg/l)
0.4	27	0	0	0	60
0.2	27	0	0.35	1	58
0.1	27	5	0.27	0.8	39
0.2	27	7	0.25	0.7	22

La oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental y sulfato más adecuada se encontró en 0.2 mg/l de oxígeno. Un incremento de la concentración a 0.4 mg/l no permite observar la acumulación del azufre, mientras que al disminuir el O_2 el crecimiento se afecta negativamente. Tanto en 1 y 0.75 mg/l el crecimiento del consorcio se vio afectado negativamente, aunque aún presenta actividad sulfoxidante y acumulación de azufre elemental.

Al evaluar diferentes valores de D 2.4, 3 y $3.4 d^{-1}$ se observó (Figura IV.19, Tabla IV.7) que la mayor cantidad de azufre fue encontrada en $D=3 d^{-1}$, encontrando una $Q_{S^o}=1 g/l d$.

Una constante en los experimentos fue la detección de bajas concentraciones de sulfito, menores a $Q_{SO_3^{2-}}=0.5 g/l d$, seguramente proveniente de la oxidación del azufre elemental formado. Por otra parte, no se observó una conversión estequiométrica del tiosulfato en azufre elemental y sulfato, lo que es un factor limitante para establecer algún tipo de relación en las condiciones evaluadas, ello debido principalmente a la poca diferencia del azufre elemental cuantificado.

Es importante señalar que al sustituir el aire utilizado para la oxigenación del sistema por las mezclas O_2/N_2 fue necesario suministrar una fuente alternativa de CO_2 . Ya que su ausencia provocó el lavado del cultivo continuo. Esto se resolvió adicionando bicarbonato como fuente de carbono (1g/l) Stefess y col. (1996) reportaron que *Thiobacillus neapolitanus* y *Thiobacillus o* oxidaron al sulfuro o al tiosulfato indistintamente como

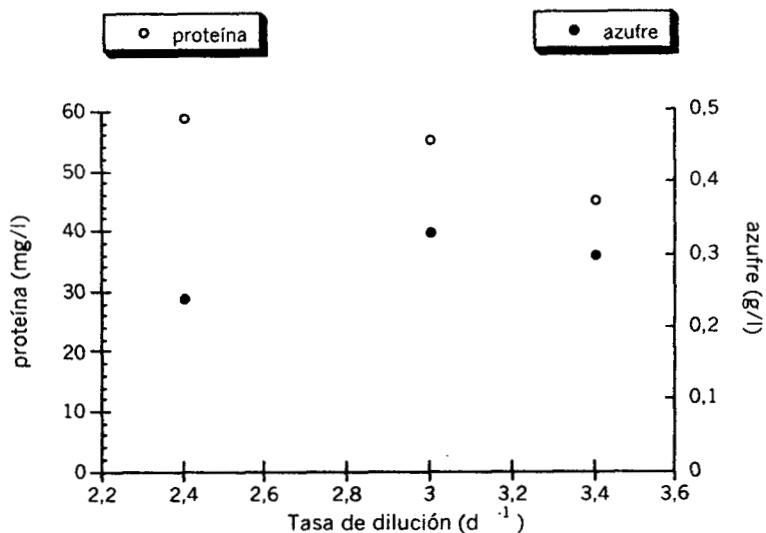


Figura IV.19. Producción de azufre a partir de la oxidación parcial de tiosulfato, utilizando una concentración de oxígeno de 2 mg/l y diferentes tasas de dilución.

Tabla IV.7. Balance de la oxidación de tiosulfato del consorcio en estados estacionario en diferentes tasas de dilución y 2 mg/l de oxígeno disuelto.

D (d ⁻¹)	QS ₂ O ₃ ²⁻ (g/l d)	S ^{o(e)} (g/l)	SO ₄ ²⁻ (g/l d)	QSO ₄ ²⁻ (g/l d)	S ^o (g/l)	QS ^o (g/l d)	S ^{o(s)} (g/l)	Proteína (mg/l)
2.4	21.6	9.1	11.1	26.6	0.24	0.58	8.60	59
3.0	27.0	11.3	10.4	31.2	0.33	1	10.36	45
3.4	30.6	12.9	8.0	24.4	0.30	0.9	8.24*	13

* El faltante es el del tiosulfato de salida (no oxidado) que fue de 12.4 g/l d

fuerza de energía. La acumulación de azufre por oxidación parcial se observó en concentraciones limitadas de oxígeno, abajo de 0.1 mg/l y cargas de sulfuro o tiosulfato de 3 mmol/l. En el caso del sulfuro no se detectaron otros intermediarios de la oxidación, en tanto que en presencia de tiosulfato el sulfito fue detectado en el medio. Por su parte Jansen (1997) encontró que bajo condiciones limitadas de oxígeno, concentraciones de 0.1 mg/l, el azufre es el producto final en mayor concentración de la oxidación de sulfuro de hidrógeno por un consorcio sulfoxidante. Indicaron que a cargas de sulfuros de 3.4 g/l d y bajo condiciones autotróficas, el 92% del sulfuro se oxida a azufre elemental. Kelly y col. (1997) observaron que la oxidación directa de tiosulfato a sulfato puede acumular azufre bajo ciertas condiciones de cultivo, sin que se establezca el mecanismo involucrado en el proceso. Los datos obtenidos indican que la mejor concentración de oxígeno fue de 0.2 mg/l que es comparable a lo reportado en la bibliografía.

IV.13 Saturación por sustrato

Otro mecanismo por el cual es posible observar la oxidación parcial de los compuesto reducidos de azufre, como el sulfuro y el tiosulfato, es por saturación de sustrato. Esto se ha reportado por Visser y col. (1997), Steffes y col. (1996). Este mecanismo se presenta cuando en el medio de cultivo los microbios encuentran una concentración del compuesto azufrado tal que su oxidación parcial aporta el máximo número de electrones para su transporte en el sistema respiratorio. Entonces las enzimas de oxidación de los intermediarios son reguladas negativamente. Esto sin afectar el crecimiento de los microorganismos.

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

En experimentos previos (Apartado IV.3) se observó que el consorcio sulfoxidante crecido en concentraciones de 30 y 50 g/l de tiosulfato oxidó parcialmente al compuesto en azufre

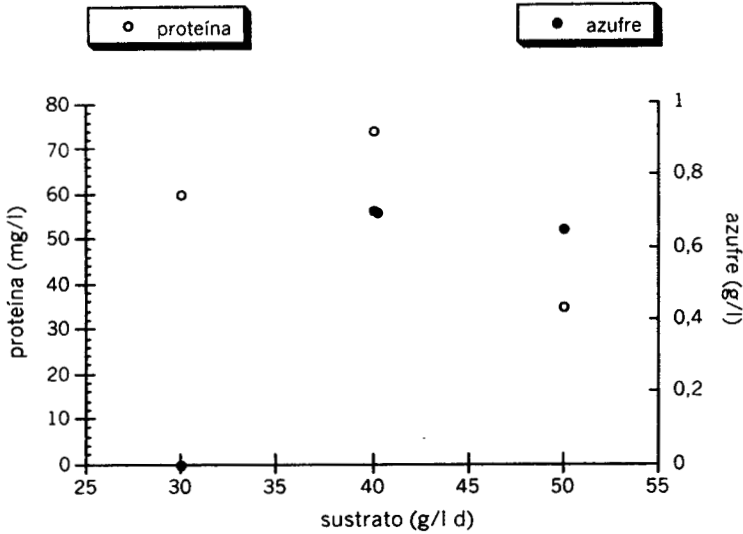


Figura IV.20. Producción de azufre por el consorcio sulfoxidante por saturación por sustrato, a partir de diferentes cargas de tiosulfato obtenidas al incrementar la concentración del sustrato en el medio de cultivo.

elemental y sulfato. Se procedió en este experimento a fijar en 3.8 mg/l el oxígeno disuelto del reactor y evaluar concentraciones en un intervalo de 30, 40 y 50 g/l d de la fuente de energía. Para lo cual, a una tasa de dilución $D=3 \text{ d}^{-1}$ se incrementó la carga de sustrato incrementando la concentración de tiosulfato del medio de cultivo. Las concentraciones del medio fueron: 10, 13.2 y 16.7 g/l de tiosulfato.

Los resultados se presentan en la Figura IV.19. Como se observa a una carga de sustrato de 30 g/l y oxígeno disuelto de 0.38 mg/l no se detectó azufre elemental en el medio de cultivo, lo cual concuerda con los datos obtenidos en los experimentos de la evaluación de diferentes

niveles de oxígeno disuelto. Es importante señalar que las cargas de sulfatos en estas condiciones de cultivo son del orden de 40 g/l y el consorcio no se ve afectado en su crecimiento. Esto supone, como se había indicado con anterioridad, que el consorcio tiene la capacidad de adaptarse a estas concentraciones de sulfatos, lo cual señala que se cuenta con un sistema "robusto".

Cuando se incrementó la carga de tiosulfato a 40 g/l d, se observó la acumulación de azufre elemental en el medio de cultivo (0.7 g/l). Se observó además un pequeño incremento del crecimiento del consorcio, pasando de valores de 60 mg/l para 30 g/l de tiosulfato a 75 mg/l con 40 g/l del sustrato. Todo el tiosulfato fue oxidado a sulfato y azufre elemental, obteniéndose una carga de sulfatos de 53.3 g/l d que puede explicar el escaso incremento del crecimiento del consorcio. Un incremento adicional de tiosulfato a 50 g/l d, si bien permitió la acumulación de azufre elemental, el crecimiento del consorcio se vio afectado negativamente debido a la alta carga de sulfatos 60 g/l d.

En relación al mecanismo de saturación por sustrato, Stefess y col. (1996) reportaron que los cultivos en continuo de *Thiobacillus neapolitanus* y *Thiobacillus o*, en estado estacionario acumularon azufre elemental a cargas de 18 mmol sulfuro/l h y de 18 mmol tiosulfato/l h. La concentración de oxígeno se mantuvo en 4 mg/l. El 20 % y 42 % de oxidación de sulfuro a azufre elemental fue observado para *Thiobacillus o* y *Thiobacillus neapolitanus* respectivamente. No se reportaron los porcentajes de conversión de tiosulfato. Por su parte, Visser y col. (1997) reportaron que la cepa de *Thiobacillus* sp W5 fue capaz de acumular azufre elemental de la oxidación de sulfuro de hidrógeno independientemente del crecimiento celular, es decir que no hubo limitación de energía en el medio. Reportaron que la saturación por sustrato se presentó en cargas de 3.6 $\mu\text{mol/mg proteína min}$. Todo el sulfuro fue convertido en azufre elemental bajo estas condiciones de cultivo. Esta capacidad está en función de la cepa, ya que observaron que *Thiobacillus neapolitanus* solo convierte el 50 % del sulfuro a azufre elemental.

Los resultados obtenidos indican que la saturación por sustrato en el consorcio se presentó en cargas de tiosulfato de 14.8 mmol/l h o bien en 3.7 $\mu\text{mol/mg}_{\text{proteína min}}$. Sin embargo, un bajo porcentaje tiosulfato fue convertido en azufre elemental, 2.1 g/l d que representa un 2% de conversión.

IV.14 Efecto de inhibidores en la oxidación de tiosulfato

El uso de inhibidores de cadena respiratoria ha sido ampliamente utilizado para el estudio de las rutas de oxidación de los compuestos reducidos de azufre. La existencia de vías alternas de transporte de electrones en los sistemas respiratorios se puede deducir a partir de la acción diferencial de inhibidores. La inhibición casi total y monofásica del inhibidor, al incrementar su concentración, indica que a ese nivel solo hay un camino para el flujo de electrones. En tanto, una inhibición parcial o bifásica indicará que en ese punto existe un

camino alternativo poco sensible al inhibidor respiratorio (Flores-Encarnación y col., 1999; Aleem, 1987). Existen inhibidores que bloquean el transporte electrónico entre la NADH y la ubiquinona: la rotenona, el amital y la piericidina, los cuáles posiblemente actúan sobre la NADH-deshidrogenasa. Otro inhibidor característico es la antimicina A, que bloquea el transporte de electrones entre el citocromo b y el citocromo c. Una tercera clase de inhibidores bloquea el transporte electrónico desde el citocromo aa₃ hacia el oxígeno, en este grupo se encuentran el cianuro, el sulfuro de hidrógeno y el monóxido de carbono (Lehninger, 1983; Madigan y col, 1998). Se ha reportado que el cianuro actúa inhibiendo a la citocromo oxidasa (Aleem, 1987; Lehninger y col, 1993).

Para el estudio del efecto de los inhibidores sobre la oxidación de tiosulfato se utilizaron los siguientes compuestos: N-etilmaleimida (NEM), cianuro y tiocianato de amonio. El primero es inhibidor de la actividad de la azufre oxidasa y en algunas especies microbianas de la tiosulfato deshidrogenasa. El cianuro es un inhibidor de cadena respiratoria en la etapa final del transporte de electrones. El tiocianato (TCN) presenta la particularidad de ser utilizado como fuente de energía por algunos thiobacilli, se pensó que su oxidación podría modular el flujo de electrones por el CN⁻. Se evaluaron diferentes concentraciones de cada inhibidor en tiempos de cultivo de 48 horas. Las concentraciones evaluadas fueron:

NEM: 0.01, 0.25, 0.5, 1.0 y 1.5 mM

Cianuro: 0, 0.5, 1, 1.5 y 2.5 mM

Tiocianato: 0, 10, 20, 30 y 50 mM

Los resultados se presentan en la Tabla IV.8. Se observa que el NEM y el cianuro afectaron en todas las concentraciones el crecimiento del consorcio. Al mismo tiempo se acumuló azufre elemental en concentraciones de 60 mg/l para 1 mM de NEM y de 40 mg/l en 0.5 mM del cianuro. Las concentraciones de 1.5 mM de NEM y 2.5 mM de cianuro abatieron completamente el crecimiento microbiano.

Una posible relación entre la concentración de NEM y acumulación de azufre elemental se observó al incrementar la concentración del inhibidor y cuantificar mayor acumulación del azufre. No se observó el mismo comportamiento para el cianuro.

En el caso del tiocianato no se observó efecto alguno sobre el crecimiento o acumulación de azufre. Al parecer el compuesto no fue oxidado por el microorganismo, debido probablemente a que no estuvo limitado por fuente de energía.

Se puede concluir que el uso de cianuro y NEM afectan principalmente el crecimiento del microorganismo, interrumpiendo posiblemente el transporte de electrones e inhibiendo la

Tabla IV.8. Producción y azufre y crecimiento del consorcio a las 60 h de cultivo crecido en diferentes inhibidores de cadena respiratoria.

NEM (mM)	S ^o (mg/l)	Proteína (mg/l)	CN ⁻ (mM)	S ^o (mg/l)	Proteína (mg/l)	SCN ⁻ (mM)	S ^o (mg/ml)	Proteína (mg/l)
0	0	300	0	0	305	0	0	300
0.25	35	91	0.5	26	77	10	0	290
0.5	52	94	1.0	40	72	20	0	310
1.0	60	74	2.0	41	58	30	0	280
1.5	0	0	2.5	0	0	50	0	320

enzima de oxidación de tiosulfato y azufre elemental, respectivamente. Lo cual puede detener la oxidación de los intermediarios como el azufre elemental, interrumpiendo la síntesis de ATP y por lo tanto de la energía de crecimiento y de fijación de CO₂. Sin embargo los experimentos realizados no permiten definir el mecanismo de acción.

Cuando los inhibidores fueron evaluados en quimiostato a una D=3 d⁻¹, el crecimiento del consorcio se interrumpió en concentraciones de NEM de 0.5 mM y de cianuro 1M. Por otro lado, al disminuir la concentración de los inhibidores en 0.1 mM y 0.2 mM respectivamente, el crecimiento y oxidación del tiosulfato no se vio afectado. Al parecer en la concentraciones más altas de los inhibidores, el flujo constante de inhibidor al reactor no permite a las células reproducirse por lo que se puede señalar que los sistemas enzimáticos son completamente afectados. En cambio las concentraciones mas bajas al parecer no son inhibitorias de estos sistemas. En el caso del tiocianato se observó que en cultivo continuo no presentó efecto alguno sobre el crecimiento o la oxidación del sustrato. Se puede asumir que no utilizan al compuesto, al no estar limitados por tiosulfato.

El uso de cianuro, entre otros inhibidores, en el estudio del sistema respiratorio lo han descrito por García-Horsman y col.(1991). La finalidad fue establecer si en *Bacillus cereus* el transporte de electrones es monofásico o ramificado. Los autores encontraron una inhibición bifásica solamente con KCN: a concentraciones menores de 10 micromolar se identificó una oxidasa muy sensible (25% de inhibición) y a concentraciones mayores de 1 mM una segunda oxidasa resistente al KCN (activa). Sus resultados sugieren que en *Bacillus cereus*, la vía de transporte de electrones se divide en dos rutas en el sitio sensible al cianuro. Por otra parte, estudios realizados con células de *Nitrosobacter* (bacteria

nitrificante) utilizando diferentes inhibidores, señalan que su sistema respiratorio es altamente sensible al cianuro, ya que una concentración de 0.05 mM inhibe totalmente la actividad de su nitrato oxidasa (Aleem, 1987).

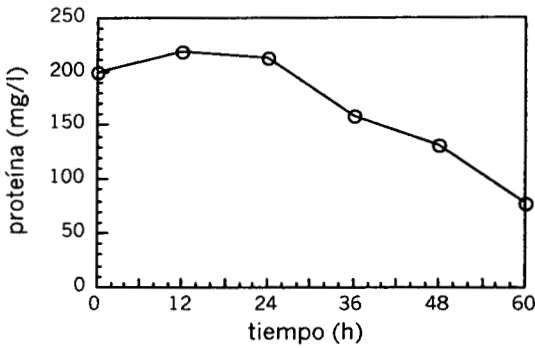
Como se indicó el NEM es un agente sulfhidrilo que inhibe la actividad de la azufre oxidasa y en algunos casos la tiosulfato deshidrogenasa. La inhibición por NEM sugiere la presencia de tioles o grupos sulfhidrilos en la molécula inhibida ya que en general, solo los grupos sulfhidrilos más reactivos de las proteínas reaccionan con compuestos como el NEM, que contienen un doble enlace activado para formar enlaces tiol-eter estables. La formación de un derivado alquil estable, que resiste la hidrólisis ácida, es una característica importante de este agente, particularmente cuando se contempla el análisis de aminoácidos. (Chan y Suzuki, 1994;). En estudios realizados con *Thiobacillus caldus*, Hallberg y col (1996) señalan que el NEM, a concentración 4 mM redujo parcialmente la oxidación del azufre formado durante la oxidación del HS⁻, mientras que a concentración 6 mM fue total la inhibición de la oxidación del azufre acumulado. En el caso de *Thiobacillus thiooxidans*, Chan y Suzuki (1994) señalan que el NEM tuvo un efecto negativo en la oxidación de tiosulfato, mientras que para *Thiobacillus* sp W5 (Visser y col., 1997) la actividad enzimática de la tiosulfato deshidrogenasa no se vio inhibida por la presencia de NEM ni de cianuro.

Los experimentos realizados con inhibidores no permiten obtener información contundente sobre su efecto. El trabajo con inhibidores debe realizarse desde otra perspectiva. Por ejemplo si se sabe que el NEM inhibe la oxidación de azufre, entonces es más importante establecer las condiciones que favorezcan la acumulación del elemento para después evaluar el uso del inhibidor. Por otro lado es recomendable cuantifica el consumo de oxígeno y la actividad de citocromos entre otros elementos para poder realizar un estudio más completo del efecto de los inhibidores sobre la sulfoxidación.

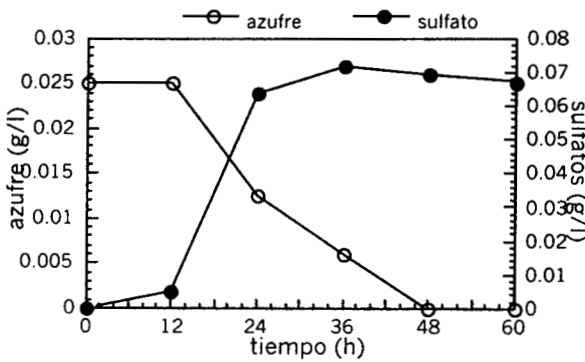
IV.15 Oxidación del azufre elemental acumulado

De acuerdo a los resultados mostrados, en concentraciones de 0.16 mg/l de oxígeno en el medio, se detiene la oxidación del tiosulfato en dos productos: azufre elemental y sulfato. Con la finalidad de evaluar la velocidad de consumo del azufre elemental en condiciones de agotamiento de tiosulfato, se procedió a cuantificar su oxidación con respecto al tiempo. De esta manera una vez formado el azufre se detuvo la entrada de medio y se cuantificó el consumo de azufre, la formación de sulfato y el crecimiento del consorcio. En el supuesto

de que el interés es acumular azufre elemental en el reactor una velocidad baja de oxidación de este permitiría máxima acumulación. Entre otros factores que intervienen en la oxidación del elemento se encuentran: la adherencia de los microorganismos al azufre y el transporte del mismo al interior de la célula, la agitación, la aireación y limitación de sustrato.



(A)



(B)

Figura IV.21. (A) Crecimiento, (B) consumo de azufre y producción de sulfatos del consorcio sulfoxidante. El azufre fue producido por el consorcio.

La concentración inicial de azufre fue de 0.025 g/l y como se observa en la Figura IV.21, en las primeras 12 h de cultivo no se alcanza a observar consumo de azufre, debido básicamente al cambio de régimen, ya que se eliminó la entrada de tiosulfato. Por otro lado, se sabe que es necesario que los microorganismos se adhieran, lo que supondría un

retramiento en su consumo, debido a la baja solubilidad del mismo. Sin embargo, una de las características que azufre se presentó de una manera lineal hasta su agotamiento. Lo cual coincide con el decaimiento del crecimiento y la acumulación del sulfato (0.8 g/l).

La velocidad de oxidación alcanzada fue de 1.15 g S/l h, que es menor a la reportada por Jansen y col (1997) que observaron un velocidad de consumo de 3.16 g S/l H. Los autores suponen que encuentran una velocidad mayor de oxidación debido a que se deja de alimentar sulfuro al medio. Lo que permite al consorcio salir de un ambiente de estrés, dada la toxicidad de esta fuente de energía, y sufre una compensación que le permite presentar velocidad mayor de oxidación.

V. Conclusiones

1. Se establecieron las condiciones de cultivo que favorecen la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes. Las condiciones más favorables fueron: intervalo de pH entre 5.5 y 7, temperatura de 30 C y para la oxidación completa a sulfatos a partir de tiosulfato, una concentración de oxígeno disuelto superior o igual a 0.2 mg/l para el consorcio y de 1.5 mg/l para *Thiobacillus thiooparus* mg/l. En el caso del CS₂ y el H₂S los valores de K_s obtenidos fueron de 0.19 y 1.3 mM, respectivamente. Se observó también una baja inhibición por estos compuestos (aproximadamente de 5 mM) comparada con lo reportado en la literatura, donde a valores superiores a 2 mM de bisulfuro de carbono se inhibe completamente la oxidación biológica. Por otro lado, cabe mencionar la capacidad del consorcio de llevar a cabo la oxidación en valores de pH ácidos de alrededor de 2 y 3. Posiblemente por la presencia de bacterias acidófilas azufre-oxidantes como *Thiobacillus thiooxidans* y *Thiobacillus ferrooxidans*. Se puede mencionar además que, mediante pruebas de respirometría, el sulfato en concentraciones superiores a 20 g/l afecta negativamente la oxidación biológica de bisulfuro de carbono debido posiblemente al estrés iónico provocado por el ion. Sin embargo se pudo observar que el consorcio crecido en concentraciones de tiosulfato de 30 g/l, puede adaptarse a las concentraciones de sulfatos de hasta 40 g/l de sulfatos, lo que le permite mantener su actividad sulfoxidante. Con relación a las condiciones de cultivo se puede afirmar finalmente, que el comportamiento de los microorganismos sulfoxidantes evaluados es comparable a lo reportado en la bibliografía de acuerdo a diferentes autores.
2. Los inhibidores de crecimiento evaluados, nistatina y cloramfenicol, permitieron observar la presencia de hongos y bacterias. Estas últimas, gram negativas a partir de la tinción Gram, de 0.5 a 1.3 µm, bacillus muy probablemente del género *Thiobacillae*, son las encargadas de llevar a cabo la oxidación de los compuestos reducidos de azufre. Estos resultados no difieren de lo reportado en la bibliografía en el sentido de que no se han reportado microorganismos heterótrofos (hongos y levaduras) capaces de oxidar moléculas inorgánicas para obtener energía de crecimiento. Sin embargo, son importantes en la formación de biopelícula en los sistemas de biofiltración (biofiltros y biolavadores de lecho escurrido). Aunque no se puede descartar que los thiobacilli también son capaces de generar por si mismos biopelícula como se ha observado en fotografías de microscopía electrónica en estudios realizados en el laboratorio (1999, no publicados).

2. Al evaluar el efecto de la fuente de amonio sobre el crecimiento y oxidación del tiosulfato por el consorcio, se observó que el cloruro de amonio tiene un efecto positivo sobre la oxidación del compuesto. Sin embargo los experimentos realizados no permiten concluir que tipo de efecto se presenta ni si es el amonio *per se* o bien un producto de su metabolismo. Por otro lado, dado que en un exceso de amonio, los microorganismos no presentan un incremento del crecimiento se plantearon las siguientes hipótesis: i) que sea otro nutrimento el limitante del crecimiento; ii) que el consorcio presente actividad nitrificante, ya que el amonio desaparece del medio de cultivo; y iii) que exista una deficiencia en la asimilación de amonio, por una baja actividad de la enzima GDH.
3. El extracto de levadura en concentraciones de 0.5 g/l no presentó un efecto sobre la oxidación biológica de tiosulfato por el consorcio. Esto a pesar de que se observó un incremento del crecimiento microbiano, lo cual sugiere que son los microorganismos heterótrofos (que no presentan actividad sulfoxidante) los que se ven favorecidos por esta fuente compleja de nutrimentos. Las concentraciones mayores del extracto afectaron negativamente la oxidación y el consorcio no presentó actividad. Nuevamente, es posible que los heterótrofos se vean favorecidos en estas condiciones de crecimiento. Sin embargo no se descarta la posibilidad de que los microorganismos sulfoxidantes sean mixótrofos y que en presencia de compuestos orgánicos crezcan mejor aunque la actividad quimiolitotrófica sea inhibida, como se ha reportado con microorganismos nitrificantes. En este sentido se puede entender que el consorcio recupere su actividad sulfoxidante en medios donde se eliminó la fuente orgánica.
4. El consorcio sulfoxidante presentó un comportamiento característico de crecimiento en cultivo continuo. La tasa de dilución crítica se encuentra cercana a una D de 3.4 d^{-1} . Mientras que a valores de $D=3 \text{ d}^{-1}$, en concentraciones de oxígeno disuelto superiores a 0.4 mg/l , el cultivo oxidó completamente el tiosulfato a sulfato.
5. De la misma forma, la cepa pura de *Thiobacillus thioparus* presentó un comportamiento característico de crecimiento en cultivo continuo. La tasa de dilución crítica se encuentra cercana a una D de 1.2 d^{-1} . De esta manera a valores de $D=0.9 \text{ d}^{-1}$, en concentraciones de oxígeno disuelto superiores a 1.5 mg/l , el cultivo oxidó completamente el tiosulfato a sulfato.
6. Cuando se compararon los rendimientos del crecimiento de ambos cultivos, se observó que la cepa pura presenta valores mayores de este parámetro que el consorcio sulfoxidante. Así, se observaron rendimientos ($Y_{x/s}$) para una tasa de dilución $D=0.4 \text{ d}^{-1}$ de $7.5 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{mol}_{\text{tiosulfato}}$ y $2.5 \text{ g}_{\text{biomasa}}/\text{mol}_{\text{tiosulfato}}$ para el cultivo puro y el consorcio, respectivamente. Resultados que son comparables a los reportados en la literatura. Sin embargo, la eficiencia oxidativa fue 5 veces mayor para el consorcio (250 vs $56 \text{ g}_{\text{sulfatos}}$

- producidos/proteína d). Este comportamiento se puede explicar por las características de crecimiento de ambos cultivos. Se puede afirmar en este sentido que el consorcio oxida más y a mayor velocidad el tiosulfato que la cepa pura.
7. Cuando se evaluaron diferentes concentraciones de oxígeno disuelto en el medio de cultivo se observó que en concentraciones de 0.2 mg/l de oxígeno, el consorcio oxida parcialmente el tiosulfato en azufre elemental y sulfatos. En tanto *Thiobacillus thioparus* en concentraciones de 0.8 mg/l no fue capaz de crecer. La capacidad de crecer en bajas concentraciones de oxígeno, observada en el caso del consorcio, se puede atribuir a una síntesis de citocromos con alta afinidad al oxígeno, como se ha demostrado para *Paracoccus denitrificans* que también utiliza compuestos reducidos de azufre como fuente de energía. Sin embargo los experimentos hasta aquí realizados no permiten una conclusión definitiva.
 8. El uso de inhibidores de cadena respiratoria permitió observar un efecto negativo parcial, tanto sobre el crecimiento como sobre la oxidación de tiosulfato en concentraciones de 0.5 mM de cianuro en cultivos en lote. En tanto en el cultivo continuo una concentración de cianuro de 0.5 mM inhibió completamente el crecimiento microbiano. Es decir que a esta concentración se inhibe completamente el transporte de electrones y por lo tanto la generación de energía. Sin embargo en concentraciones de 0.1 mM el crecimiento del consorcio no resultó afectado. Por lo que es probable que a esta concentración de inhibidor las citocromo-oxidasas de los thiobacilli no son inhibidas y por lo tanto no se ven afectadas en su actividad. Por otro lado, el NEM afectó negativa y parcialmente la oxidación del tiosulfato a una concentración de 0.25 mM en cultivos en lote. En tanto en una concentración de NEM de 0.5 mM inhibió completamente la actividad biológica en el cultivo continuo del consorcio. Se puede inferir que NEM provoca una fuerte inhibición del sistema multienzimático de oxidación de tiosulfato en el consorcio. A pesar de los resultados obtenidos, el trabajo hasta aquí realizado no permite definir el efecto de los inhibidores utilizados, por lo cual es necesario implementar otro tipo de experimentación para lograr conclusiones más contundentes.
 9. Finalmente, dadas las características de crecimiento observadas para el consorcio sulfoxidante es posible señalar que la ruta de oxidación más importante (representativa) del cultivo es el sistema multienzimático de oxidación de tiosulfato (TOMES, por sus siglas en inglés). En tanto para *Thiobacillus thioparus* es el mecanismo de la rodanasa, que es el que se ha reportado en la bibliografía para estas especies de thiobacilli.

VI. Bibliografía

- Acosta C, Walter H, Benavente JL, Revah S (1999) Biological treatment of a waste gas pollution with carbon disulfide from sponge manufacturing facility. *Environm. Progress.* (accepted).
- Adachi K, Suzuki I (1977) A study on the reaction mechanism of adenosine 5'-phosphosulfate reductase from *Thiobacillus thioparus*, an iron-sulfur flavoprotein. *Can. J. Biochem.* **55**, 91-95.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson J (1994) Introduction to the cell. In: *Molecular Biology of the Cell*. Garland Pub., N.Y. pp 3-41.
- Alcántara S, Estrada I, Vásquez M, Revah S (1999) Carbon disulfide oxidation by a microbial consortium from a trickling filter. *Biotechnol. Lett.* **21**, 815-819.
- Aleem M (1987) *Microbial Energetics*. Ed. Haddock, B.A. y Hamilton, W.A., 27 Symposium the Society for General Microbiology held at Imperial College London, U.K.
- Asai S, Konishi Y, Yabu T (1990) Kinetics of absorption of hydrogen sulfide into aqueous ferric sulfate solutions. *AIChE J.* **36**, 1331-1338.
- Bailey R, Clark H, Feris J, Strong L, Krause, S (1978) The environmental chemistry of some important elements. In *Chemistry of the environment*. Academic Press, NY. pp. 361-406
- Baldensperger J, Guarraia L, Humphreys W (1974) Scanning microscopy of grown on colloidal sulfur. *Arch. Microbiol.* **99**, 323-329.
- Baker B, Ferguson S, Ludwig B, Page D, Oliver H, Spanning R (1998) Molecular genetics of the genus *Paracoccus*: Metabolically versatile bacteria with bioenergetic flexibility. *Microbiol. Molecular Biol. Rev.* **62**(4), 1046-1078.
- Barquera B, García A, Escamilla E (1991) Cytochrome d expression and regulation pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*. *Arch. Microbiol.* **155**, 1124-129.
- Barton L, Shively M (1968) Thiosulfate utilization by *Thiobacillus thiooxidans* ATCC 8085. *J. Bacteriol.* **95**, 720.
- Bartlett J, Skoog D (1954) Colorimetric Determination of Elemental Sulfur in Hydrocarbons. *Anal. Chem.* **26**(6), 1008.
- Beffa T, Berczy M, Aragno M (1991a) Chemolithoautotrophic growth on elemental sulfur (So) and respiratory oxidation of So by *Thiobacillus versutus* and another sulfur-oxidizing bacterium. *FEMS Microbiol. Lett.* **84**, 285-290.
- Beffa T, Berczy M, Aragno M (1991b) Growth and respiratory oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus novellus* (type strain) grown on thiosulfate.

- Curr. Microbiol.* **26**, 323-326.
- Beffa T, Berczy M, Aragno M (1991c) Respiratory oxidation of reduced sulfur compounds by intact cells of *Thiobacillus tepidarius* (type strain). *Arch. Microbiol.* **158**, 456-458.
- Bettelheim, J Billinge, H (1983) Eliminación de óxidos de azufre de los gases de chimenea de las centrales de energía y las calderas industriales. En Contaminación del aire por la industria. Parker, A. comp. Td. José Costa L. Ed. Reverté, España. pp. 295-321.
- Bernstein B (1981) Ecology and economics: complex systems in changing environments. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* **12**, 309-330.
- Berzaczy L, Niedermayer E, Kloimstein L, Windsperger A (1988) Biological exhaust gas purification in the rayon fiber manufacture. *Chem. Biochem. Eng.* **2**, 201-204.
- Bishop P, Kinner N (1986) Aerobic Fixed-Film Processes. In Biotechnology, V. 8, Cap. 3, VCH Verlagsgesellsch Weinheim.
- Bock E (1976) Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter II. Chemoorganotrophic growth of *Nitrobacter agilis*. *Arch. Microbiol.* **108**, 305-312.
- Buisman C (1998) Industrial applications of new sulphur biotechnology. The Biological Sulphur Cycle: Environmental Science and Technology. Wageningen, The Netherlands, April 19-24.
- Buisman C, Prins, W (1994) New process for biological (flue) gas desulfurization. Symposium on Biological Waste Gas Cleaning. Heidelberg, FRG. pp. 95-103.
- Buisman C, Ijspeert P, Janssen A, Lettinga G (1990) Kinetics of chemical and biological sulphide Oxidation in aqueous solutions. *Wat. Res.* **24**(5), 667-671.
- Buisman C, Geraats B, Ijspeert P, Lettinga G (1990) Optimization of sulfur production in a biotechnological sulfide removing reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 50-56.
- Buisman C, Wit B, Lettinga G, (1990), Biotechnological sulphide removal in three polyurethane carrier reactors: stirred reactor, biorotor reactor and upflow reactor. *Wat. Res.* **24**(2), 245-251.
- Buisman C, Post R, Ijspeert P, Geraats G, Lettinga G (1989) Biotechnological Process for Sulfide Removal with Sulphur Reclamation. *Acta Biotechnol.* **9**(3), 255-267.
- Chan C, Suzuki I (1994) Thiosulfate oxidation by sulfur-grown *Thiobacillus thiooxidans* cells, cell free extracts and thiosulfate-oxidizing enzyme. *Can. J. Microbiol.* **40**, 816-822.
- Chan C, Suzuki I (1993) Quantitative extraction and determination of elemental sulfur and stoichiometric oxidation of sulfide to elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*. *Can. J. Microbiol.* **39**, 1166-1168.
- Cho J, Sublette K, Raterman K (1995) Oxidation of Hydrogen Sulfide by an Enrichment from

- Sour Water Coproduced with Petroleum. *Appl. Biochem. Biotech.* **51**, 761-770.
- Cho K, Hirai M, Shoda M (1992) Enhanced Removal Efficiency of Malodorous Gases in a Pilot-Scale Peat Biofilter Inoculated with *Thiobacillus thioeparus* DW44. *J. Ferment. Bioeng.* **73**(1), 46-50.
- Cho K, Hirai M, Shoda M (1991) Degradation characteristics of hydrogen sulfide, methanethiol, dimethyl sulfide and dimethyl disulfide by *Thiobacillus thioeparus* DW44 isolated from peat biofilter. *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 384-389.
- Cho K, Kuniyoshi I, Hirai M, Shoda M (1991) A newly isolated heterotrophic bacterium, *Xanthomonas* sp DY44, to oxidize hydrogen sulfide to polysulfide. *Biotech. Lett.* **13**(12), 923-928.
- Choppin G, Jaffe B, Summerlin, L Jackim L (1977) Azufre y elementos del grupo VI. En: Química. Pub. Cultural, Mexico. pp. 486-499.
- Corbett C, Ingledew W (1987) Is $Fe^{3+}/2+$ cycling an intermediate in sulphur oxidation by Fe^{2+} grown *Thiobacillus ferrooxidans*? *FEMS Microbiol. Lett.* **41**, 1-6.
- Cadenhead P, Sublette K (1990) Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacilli*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 1150-1154.
- Comisión Metropolitana para la Prevención y Control de la Contaminación Ambiental en el Valle de México. 1992. ¿Que estamos haciendo para combatir la contaminación ambiental en el Valle de México. 20 pp.
- Cork DJ, Jerger DE, Maka A (1986) Biocatalytic production of sulfur from process waste streams. *Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser.* **16**, 149-162.
- Cork D, Garunas R, Sajjad A (1983) *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*: Biocatalyst in the production of Sulfur and Organic Carbon from a Gas Stream Containing H_2S and CO_2 . *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(3), 913-918.
- Dhawale S (1993) Thiosulfate. An interesting sulfur oxoanion that is useful in both medicine and industries -but is implicated in corrosion. *J. Chem. Education.* **70**(1), 12-14.
- Degorce-Dumas J, Kowai S, Le Cloirec P (1997) Microbiological oxidation of Hydrogen sulphide in a biofilter. *Can. J. Microbiol.* **43**, 264-271.
- De Ley J, Van Poucke M (1961) The formation of sulphite during the oxidation of thiosulfate by *Thiobacillus novellus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **50**, 371-373.
- Estrada I (1998) Aspectos microcinéticos de la oxidación de compuestos azufrados. Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa México. 60 pp.
- Ferguson SJ (1991) The periplasm. In Prokaryotic Structure and Function. Ed. Mohan C..D. and Coles J.A. pp.310-339.

- Flores-Encarnación M, Soto M, Contreras Z, Aguilar G, Baca E, Escamilla E (1999) The respiratory system of *Acetobacter diazotrophicus* PAL5 under nitrogen fixing conditions. *J. Bacteriol.* Accepted.
- García-Horsman, Barquera B, Gonzáles H, Escamilla E (1991) Purification and characterization of two-subunit cytochrome aa3 from *Bacillus cereus*. *Molecular Microbiol.* **5**(1), 197-205.
- Gommers P, Bijlereld W, Zuijderwijk F, Kuenen J (1988a) Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-I. *Wat. Res.* **22**(9), 1075-1083.
- Gommers P, Bijlereld W, Zuijderwijk F, Kuenen J (1988b) Simultaneous sulfide and acetate oxidation in a denitrifying fluidized bed reactor-II. *Wat. Res.* **22**(9), 1055-1092.
- Gonzáles C M (1993) Regulación por nitrógeno de la síntesis de gentamicina por *Micromonospora purpurea* NRRL-2953. Tesis de Maestría, UNAM. 100 pp.
- Groenestijn Koot D, Hark S (1998) Sulfur recovery from tannery wastewater, a pilot plant demonstration in the Netherlands. In: Cycle: Environmental Science and Technology, Wageningen, The Netherlands, April 19-24.
- Groenestijn J, Hesselink, P (1993) Biotechniques for air pollution control. *Biodegradation*, **4**, 283-301.
- Gromova L, Karavaiko G, Sevtsov A, Pereverzev N (1983) Identification and distribution of sulfur in *Thiobacillus ferrooxidans* cells. *Microbiology.* **52**(3), 455-459.
- Hallberg K, Dopson M, Lindström E (1996) Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*. *J. Bacteriol.* **178**(1), 6-11.
- Hazeu W, Batenburg-van der Vegte W, Bos P, van der Pas R, Kuenen J (1988) The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch Microbiol.* **150**, 574-579.
- Hill M (1997a) Energy production and use. In: Understanding environmental pollution. Cambridge University Press, SA. pp. 260-280.
- Hill M (1997b) Understanding pollution. In: Understanding environmental pollution. Cambridge University Press, SA. pp. 260-280.
- Hooper A, DiSpirito A (1985) In bacteria which grow on simple reductants, generation of a proton gradient involves extracitoplasmic oxidation of substrate. *Microbiol. Rev.* **49**(2), 140-157.
- Hugler W, Acosta C, Revah S (1999) Biological removal of Carbon Disulfide from waste air streams. *Environm. Progress.* Accepted.
- Hugler W, Cantú-De la Garza J, Villa-García M (1996) Biofilm analysis from an odor-removing trickling filter. *Proceedings of the Air & Waste Management Association's Annual*

Meeting & Exhibition. Paper 96-WP87A.04.

- Huxtable R, Lafranconi W (1986) The chemistry of sulfur. In: *Biochemistry of sulfur*. Plenum Press, N.Y. pp. 1-6.
- Inouye M (1979) What is the outer membrane. In *Bacterial Outer Membranes*. Ed. Inouye M. . pp. 1-12.
- Islas L (1991) Efecto de la fuente de nitrógeno en la producción fermentativa de gentamicina. Tesis de Maestría, UNAM. 98 pp.
- Jagow G, Link Th (1986) Use of specific inhibitors on the mitochondrial bc1 complex. *Methods Enzimology*. **126**, 253-271.
- Janssen A, Ma S, Lens P, Lettinga G (1997) Performance of a Sulfide-Oxidizing Expanded-Bed Reactor Supplied with Dissolved Oxygen. *Biotechnol. Bioeng* **53**:32-40.
- Janssen A (1996) Formation and colloidal behavior of elemental sulphur produced from the biological oxidation of hydrogensulphide. PhD thesis, Wageningen, The Netherlands.
- Janssen A, Sleyster R, van der Kaa C, Jochemsen A, Bontsema J, Lettinga G (1995) Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor. *Biotechnol. Bioeng*. **47**, 327-333.
- Jensen A, Webb C (1995) Treatment of H₂S-containing gases: A review of microbiological alternatives. *Enzyme Microbiol. Technol.* **17**, 2-10.
- Jhonson D B (1995) Selective soil media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *J. Microbiol. Meth.* **23**, 205-218.
- Jordan S, Kraczkiewicz-Dowjat A Kelly D and Wood A (1995) Novel eubacteria able to growth on carbon disulfide. *Arch. Microbiol.* **163**, 131-137.
- Kanagawa T, Mikami E (1989) Removal of Methanetiol, Dimethyl Sulfide, Dimethyl Disulfide and Hydrogen Sulfide from Contaminated Air by *Thiobacillus thioparus* TK-m. *App. Enviromen. Microbiol.* **55**(3), 555.
- Kelly D, Shergill J, Lu W, Wood A (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek*. **71**, 195-107.
- Kelly P, Wood A (1994) Enzymes involved in the microbiological oxidation of thiosulfate and polithionates. *Methods in Enzymology*. **243**, 510-520.
- Kelly D, Wood A, Jordan S, Padden A, Gorlenko V, Dubinina G (1994) Biological Production and Consumption of Gaseous Organic Sulphur Compounds. *Atmospheric Gas Production and Consumption*. **22**, 1011.
- Kelly D (1990) Energetics of Chemolithotrophs. In *The Bacteria*, vol. XII, Ed. T.A. Krulwich, Academic Press, Inc. USA. pp. 479-501.
- Kelly D, (1982) Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur. *Phil.Trans*

- R. Soc. Lond.* **238**, 499-528.
- Kenneth W, Warner C (1990) Control de los óxidos de azufre. En Contaminación del Aire: Origen y Control. Td. Carlos A. García. Noriega Editores. pp. 433-465.
- Kim, B W, Kim I K, Chang H N (1990) Bioconversion of hydrogen sulfide by free and immobilized cells of *Chlorobium thiosulfatophilum*. *Biotechnol. Lett.* **12**, 381-386.
- Kong S, Allen E (1997) Control of Organo-Sulfur Emissions Using Biofiltration: Dimethyl Sulfide, Air & Waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition, Toronto, Ontario, Canadá.
- Konishi Y, Takasaka Y, Asai S (1994) Kinetics of Growth and Elemental Sulfur Oxidation in Batch Culture of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Biotech. Bioeng.* **44**, 667-673.
- Kuenen JG, Pronk JT, Hazeu, Meulenbergh R, Bos P (1993) A review of bioenergetics and enzymology of sulfur compound oxidation by acidophilic thiobacilli. In Biohydrometallurgical Technologies. Torma AE and Lakshman VL. TMS press. pp. 487-493.
- Kusai K, Yamanaka T (1973) Cytochrome c (553, *Chlorobium thiosulfatophilum*) is a sulphide-cytochrome c reductase. *FEBS lett.* **34**. 235-239.
- Kusai K, Yamanaka T (1973) The oxidation mechanisms of thiosulfate and sulphide in *Chlorobium thiosulfatophilum*: role of cytochrome c-557 and cytochrome c-553. *Biochim. Biophys. Acta.* **325**, 304-310.
- Lehninger A, Nelson D, Cox M (1993) Principles of bioenergetics. In: Principles of biochemistry. Worth Pub. N.Y. pp. 364-369.
- Lehninger A (1983) Enzimas de oxidación-reducción y transporte electrónico. En: Bioquímica. Omega Ed. pp. 487-517.
- Lee M, Senios J, Grossman M (1995) Sulfur-specific Microbial Desulfurization of Sterically Hidered Analogs of Dibenzothiphene. *App. Environ. Microbiol.* **61**, 4362-66.
- Lizama H, Sankey B (1993) Conversion of hydrogen sulphide by acidophilic bacteria. *Appl Microbiol. Biotechnol.* **40**, 438-441.
- Lobo R, Revah S, Viveros G (1999) An analysis of a trickle bed bioreactor: Carbon disulfide removal. *Biotechnol. Bioeng.* **63**,1, 98- 109.
- López A (1985) Contaminación atmosférica. Gas natural y gas L.P. IPN, México. pp. 25-29.
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randal R J (1951) Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lu W P, Kelly D P (1988) Kinetic and energetic aspects of inorganic sulphur compounds oxidation. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 865-876.

- Lyric R M, Suzuki I (1970) Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*. III. Properties of thiosulfate-oxidizing enzyme and proposed pathway of thiosulfate oxidation. *Can. J. Biochem.* **48**, 355-363.
- Lyric R M, Suzuki I (1970) Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*. II. Properties Properties of adenosine-5'-phosphosulfate reductasa. *Can. J. Biochem.* **48**, 344-354.
- Mackenzie F (1995) Biogeochemistry. In: Encyclopedia of Environmental Biology. Vol. I. Academic Press, USA. pp. 249-276.
- Madigan M, Martinko J, Parker J (1999) Diversidad metabólica de los microorganismos. En: *Biología de microorganismos*. Prentice Hall Iberia. pp. 473-531.
- Manion A M (1992) Acidification and Eutrophication. In: Environmental Issues in the 1990's. Eds. Mannion A M and Bowley S R. Jhon Wiley, Chichester. pp. 177-197.
- McEldowney S, Hardman D, Waite S (1993) Pollution: Ecology and Biotreatment. Logman Sci. and Tech., Singapore. pp. 193-230.
- Monticello D, Finnerty R (1985) Microbial desulfurization of fossil fuels. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 371-389.
- Moore W, Frisch N (1974) Sistemas y programas para el control de la contaminación del aire. En: Manual para el Control de la Contaminación Industrial. Herbert Lund, compilador. Tr. Aurora Bernáldec y Carlos Blasco. pp. 95-145.
- Nagl G (1997) Controlling H₂S emissions. *Chemical Engineering.* **3**, 125-127.
- Otero A, Curutchet G, Donati E, Tedesco P (1995) Action of *Thiobacillus thiooxidans* on sulphur in the presence of a surfactant agent and its application in the indirect dissolution of phosphorus. *Process Biochem.* **30** (8), 747-750.
- Ongcharit C, Dauben P, Sublette K (1989) Immobilization of an autotrophic bacterium by coculture with floc forming heterotrophs. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 1077-1080.
- Ongcharit C, Sublette K, Shah Y (1991) Oxidation of hydrogen sulfide by flocculated *Thiobacillus denitrificans* in a continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 497-504.
- OPS, OMS (1976) Diseño de programas de vigilancia del aire para zonas urbanas e industriales. Washington D.C. 30 pp.
- Pauling L (1964) In: College Chemistry: An introductory text book of general chemistry. S. Fco. Freeman. pp
- Pesic B (1933) Redox potential technique to study the factors of importance during reactions of *Thiobacillus ferrooxidans* with Fe²⁺. In Biohydrometallurgical Technologies. Torma AE and Lakshman VL. TMS press. pp. 545-549.

- Plas C, Harant H, Danner H, Jelinek E., Wimmer K, Holubar P, Braun R (1992) Ratio of biological and chemical oxidation during the aerobic elimination of sulphide by colorless sulphur bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 817-822.
- Plas C, Wimmer K, Holubar P, Mattanovich D, Danner H, Jelinek E, Harant H, Braun R (1993) Degradation of carbon disulphide by a *Thiobacillus* isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 820-823.
- Pol A, Op den Camp H, Mees S, Kersten A, Van Der Drift (1994) Isolation of a dimethylsulfide-utilizing *Hyphomicrobium* species and its applications in biofiltration of polluted air. *Biodegradation.* **5**, 102-112.
- Pol R, Hill S (1997) Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii*-Roles of the terminal oxidases. *Bioscience Reports.* **17**(3), 303-317.
- Prosser J (1989) Autotrophic nitrification in Bacteria. In: *Advances in microbial physiology.* Vol. 30, 125-177.
- Quadri S (1992) La contaminación atmosférica en la ZMCM. En: la Ciudad de México y la contaminación atmosférica. Ed. Limusa-Noriega. pp.20-40.
- Rajganesh B, Sublette K, Camp C (1995) Pilot-scale biotreatment of refinery spent sulfidic caustics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51/52**, 661-672.
- Rawlings D E, Kusano T (1994) Molecular Genetics of *Thiobacillus ferrooxidans*. *Microbiol Rev.* **58**, 39-55.
- Revah S, Hinojosa A, Morales V (1994) Air biodesulfurization in process plants. Presented at: Meeting on bioremediation. OECD.
- Revah S, Acosta M, Hugler W, Trinidad R, Avila C, Estrada I, Hinojosa A, (1995) Air Biodesulfuration from Viscose Plants: Carbon Disulfide Elimination, Conference On Biofiltration (an Air Pollution Control Technology), Los Angeles, California, Oct. 5-6.
- Riveros H, (1996), Contaminación Atmosférica en la Ciudad de México, Primer Coloquio Binacional México-Japón sobre Gestión Ambiental: Contaminación Atmosférica, México, enero 25-26.
- Robertson L, Kuenen J (1991) The colorless sulfur bacteria, In: Balows A, Trüper H, Dworkin M, Harder H, Schleifer K (eds) *The prokaryotes*, vol. 1, Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 385-413.
- Sánchez O, van Gemerden H, Más J (1996) Description of a redox controlled sulfidostat for the growth of sulfide- oxidizing phototrophs. *Appl. Environm. Microbiol.* **62**, 3640- 3645
- Sam L, Rema V, Davasia P, Natarajan K (1993) Surface properties of *Thiobacillus ferrooxidans* and its adhesion to mineral surfaces. *Current Science.* **65**(12), 974-978

- Satoru A, Konishi Y, Yabu T (1990) Kinetics of absorption of hydrogen sulfide into aqueous ferric sulfate solutions. *AIChE J.* **36**, 1331-1337.
- Schäfer-Treffenfeldt W, Engel R, Onken U (1984) Removal of hydrogen sulfide from exhaust gas by microbial oxidation, In Proceedings, 3th, Europ. Cong. Biotech. Munich DECHEMA, Frankfurt, pp. 3123-3128.
- Schedel M, Truper H (1979) Purification of *Thiobacillus denitrificans* siroheme sulfite reductase and investigation of some molecular and catalytic properties. *Biochim. Biophys Acta.* **56**, 454-467.
- Schneider A, Friedrich C (1994) Sulfide dehydrogenase is identical with the *soxB* protein of the thiosulfate-oxidizing enzyme system of *Paracoccus denitrificans* GB17. *FEBS Lett.* **350**, 61-65.
- Sistema General en Materia de Equilibrio Ecológico y Protección del Ambiente (SGEEyPA). (1992). Calidad Ambiental. Informe 1989-1990. Comisión Nacional de Ecología, México. pp. 70-106.
- Smet E, Chasaya G, Van Langenhove (1996) The effect of inoculation and the type of carrier material used on the biofiltration of methyl sulphides. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 293-298.
- Smet E, Van Langenhove (1998) Abatement of volatile organic sulfur compounds in odorous emissions from the bio-industry. *Biodegradation.* **9**, 273-284.
- Smith N, Kelly D (1988) Oxidation of carbon disulphide as the sole source of energy for the autotrophic growth of *Thiobacillus thioparus* strain Tk-m. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 3041-3048.
- Smith N, Kelly D (1988) Mechanism of Oxidation of Dimethyl Disulfide by *Thiobacillus thioparus* Strain E6. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 3031-3039.
- Steffes G, Torremans A, Schrijver R, Robertson L, Kuenen J (1996) Quantitative measurement of sulphur formation by steady-state and transient-state continuous cultures of autotrophic *Thiobacillus* species. *App. Microbiol. Biotechnol.* **45**, 169-175.
- Steinmüller W, Bock E (1976) Growth of *Nitrobacter* in the presence of organic matter I. Mixotrophic growth. *Arch. Microbiol.* **108**, 299-304.
- Stoll R, Page D, Sambongi Y, Ferguson S (1996) Cytochrome *c*₅₅₀ expression in *Paracoccus denitrificans* strongly depends on growth conditions: identification of promoter region for *cycA* by transcription start analysis. *Microbiology.* **142**, 2577-2585.
- Studel R, (1996), The Yellow Element and Its Astounding Complexity. *Anorganische Chemie.* **5**, 226-234.

- Steudel R (1998) Sulfur chemistry: Speciation, natural occurrence, redox reactions and colloidal aspects. In: Cycle: Environmental Science and Technology, Wageningen, The Netherlands, April 19-24.
- Sublette K, Kolhalkar B, Ratermank, K (1998) Technological aspects of the microbial treatment of sulfide-rich wastewaters: A case study. *Biodegradation*. **9**, 259-271.
- Sublette K L (1990) Microbial treatment of sour gases for the removal and oxidation of hydrogen sulphide. *Gas. Sep. Purif.* **4**, 91-96.
- Sublette K (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: desulfurization of natural gas. *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 249-257.
- Sublette K, Sylvester N (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by mixed cultures of *Thiobacillus denitrificans* and heterotrophs. *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 759-761.
- Sublette K, (1987), Aerobic Oxidation of Hydrogen Sulfide by *Thiobacillus denitrificans*, *Biotech. Bioeng.* **29**, 690-695.
- Suzuki I, Chan C, Takeuchi T (1992) Oxidation of elemental sulfur to sulfite by *Thiobacillus thiooxidans* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(11), 3767-3769.
- Suzuki I (1999) Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* **45**, 97-105.
- Takakuwa S (1992) Biochemical Aspects of microbial oxidations of inorganic sulfur compounds. In: Organic sulfur chemistry: Biochemical Aspects. Eds. Oae S, Okuyama T CRC Press, USA. pp. 1-44.
- Takakuwa S, Fujimori S, Iwasaki H (1979) Some properties of cell-sulfur adhesion in *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**, 21-30.
- Takeuchi T, Suzuki I (1997) Cell hydrophobicity and Sulfur Adhesion of *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2058- 2061.
- Tanji Y, Kanagawua T, Mikami E (1989) Removal of dimethyl sulfide, methyl mercaptan and hydrogen sulfide by immobilized *Thiobacillus thiooparus* TK-m. *J. Ferment. Bioeng.* **67**, 280-285
- Tano T, Kitaguchi H, Harada M, Nagasawa T, Sugio T (1996) Purification and some properties of a tetrathionate decomposing enzyme from *Thiobacillus thiooxidans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**(2), 224-227.
- Tichy R, Lens P, Grotenhuis J, Bos P, (1998), Solid state reduced sulfur compounds: Environmental aspects and bio-remediation. *Critical Rev. Environ. Sci. Technol.* **28**(1), 1-40.
- Toghrol F, Southerland W (1983) Purification of *Thiobacillus novellus* sulfite oxidase. Evidence

- for the presence of heme and molybdenum. *J. Biol. Chem.* **258**, 6762-6778.
- Torres P, (1998), Estudio del efecto de algunos factores de operación en la oxidación biológica de CS₂ en un biolavador de lecho escurrido (BLE), Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Torres C M, Revah S, Hinojosa M A, Paez M F, Morales V (1993) Biological Process for the elimination of sulphur compounds present in gas mixture. U.S. Patent 5,236,677.
- Trinidad R, (1996), Estudios de remoción de CS₂ de corrientes gaseosas en un Biolavador de Lecho Escurrido (BLE), Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Tseng Ch, Albertcht J, Gunsalus R (1996) Effect of microaerophilic cell growth conditions on expression of the aerobic (*cyo ABCDE and cydAB*) and anaerobic (*narGHIIJ, frdABCD and dmsABC*) respiratory pathway genes in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **174**(4), 1094-1908.
- Tyagi RD, Blais FJ, Deschnes L, Lafrance P, Villeneuve JP (1994) Comparison of microbial sulfuric acid production in Sewage Sludge from added sulfur and thiosulfate. *J. Environ. Qual.* **23**, 1065-1070.
- Visser J, Jong G, Robertson L, Kuenen J (1997) Purification and characterization of a periplasmic thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus* sp. W5. *Arch. Microbiol.* **166**, 372-378.
- Visser J, Jong G, Robertson L, Kuenen J (1997) A novel membrane-bound flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5. *Arch Microbiol.* **167**, 295-301.
- Visser J, Robertson L, Verseveld H, Kuenen J (1997) Sulfur Production by Obligately Chemolithoautotrophic *Thiobacillus* Species. *Appl. Environmental. Microbiol.* **63**(6), 2300-2305.
- Volkmar, B. Structure-function relationship of the gram-negative bacterial cell envelope. In Relations between structure and function in the prokariotic cell. Eds. Stainer R.Y, Rogers H.G and Word J.B. 1978. pp. 111-137.
- Warner P (1980) Orígenes y medida de los contaminantes inorgánicos del aire. En: Análisis de los contaminantes del aire. Ed. Paraninfo. pp. 115-182
- Wentzien S, Samd W, Albertsen A, Steudel R (1994) Thiosulfate and tetrathionate degradation as well as biofilm generation by *Thiobacillus intermedius* and *Thiobacillus versutus* studied by microcalorimetry, HPLC and ion-pair chromatography. *Arch. Microbiol.* **161**, 116-125.

- Wodara C, Kostaka S, Egert M, Kelly P, Friedrich C (1994) Identification and sequence analysis of the *soxB* gene essential for sulfur oxidation of *Paracoccus denitrificans* GB17. *J. Bacteriol.* **176**, 6188-6191
- Wood A, Kelly P (1987) Chemolithotrophic metabolism of the newly-isolated moderately thermophilic, obligately autotrophic *Thiobacillus tepidarius*. *Arch. Microbiol.* **144**, 71-77.
- Yamanaka T, Fukumori Y (1995) Molecular aspects of the electron transfer system which participates in the oxidation of ferrous ion by *Thiobacillus ferrooxidans*. *FEMS Microbiol. Rev.* **17**, 401-413.
- Yamanaka T, Yoshioka T, Kimura K (1981) Purification of sulphite cytochrome c reductase of *Thiobacillus novellus* and reconstitution of its sulphite oxidase systems with the purified constituents. *Plant Cell Physiol.* **22**, 613-619.
- Yang Y, Allen E (1994) Biofiltration control of hydrogen sulfide 1. Design and operational parameters. *J. Air and Waste Manage. Assoc.* **44**: 863-868.
- Zhang L, Hirai M, Shoda M (1991) Removal characteristics of dimethyl sulfide, methanethiol and hydrogen sulfide by *Hyphomicrobium* sp 155 isolated from peat biofilter. *J. Ferment. Bioeng.* **75**(5), 392-396