



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

*Iztapalapa*

“OXIDACIÓN BIOLÓGICA  
DE COMPUESTOS REDUCIDOS DE AZUFRE  
EN CONDICIONES ALCALINAS:  
Enriquecimiento y caracterización de  
consorcios”

**T E S I S**

Propuesta para obtener el grado de

**Maestro en Biotecnología**

P R E S E N T A :

Jesús Espinosa Márquez

DIRECTOR:

Sergio Revah M.

MEXICO, D.F.

Julio, 2004



“La Maestría en Biotecnología de la Universidad Autónoma Metropolitana está incluida en el Padrón de Posgrados de Excelencia del CONACyT y además cuenta con apoyo del mismo Consejo, con el convenio **471-0/Maestría en Biotecnología**”

Iztapalapa D.F. a 29 de Julio del 2004

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis  
“Oxidación biológica de compuestos reducidos de azufre en condiciones alcalinas:  
Enriquecimiento y caracterización de consorcios”  
que presentó:  
Jesús Espinosa Márquez

Director: Dr. Sergio Revah M.

---

Jurado:

Sinodal: Dra. Florina Ramírez Vivez

---

Presidenta

Sinodal: Dra. Flor de Maria Cuervo López

---

Secretaria

Asesor: Dra. Laura Kawasaki Watanabe

---

Vocal

Asesor: Dr. Sergio J. Alcántara Pérez

---

Vocal

Gracias

A todos....

## RESUMEN

El incremento en las actividades industriales altera el ciclo natural del azufre. En una variedad de industrias este elemento se emite a la atmósfera en diferentes formas de compuestos contaminantes, por lo que tienen que ser removidos para disminuir el impacto negativo sobre los ecosistemas. De esta manera el estudio del ciclo del azufre resulta de gran importancia tanto a nivel básico como de proceso con el fin de proponer alternativas de manejo de los compuestos relacionados. En este sentido, en este trabajo se propuso la obtención y caracterización de consorcios microbianos con actividad sulfoxidante en condiciones de alta alcalinidad, con el fin de integrar en el futuro, nuevas propuestas de procesos relacionados al ciclo del azufre.

A partir de muestras provenientes de distintos suelos alcalinos de México, se obtuvieron dos consorcios (C1 y C2) que contienen bacterias alcalófilas sulfoxidantes. Estos consorcios utilizaron tiosulfato ( $S_2O_3^{2-}$ ) como fuente de energía y bióxido de carbono ( $CO_2$ ) como fuente de carbono, por lo que se consideran microorganismos quimiolitótrofos sulfoxidantes.

El consorcio C1 oxida  $S_2O_3^{2-}$  y sulfuro de hidrógeno ( $HS^-$ ). La tasa máxima de consumo de oxígeno ( $qO_{2máx}$ ) para el  $HS^-$  fue 2 veces mayor (0.51 mmoles  $O_2/g$  proteína\*min) que la del  $S_2O_3^{2-}$  (0.23 mmoles  $O_2/g$  proteína\*min) y tiene una constante de afinidad aparente por el sustrato ( $K_S$ ) de 22  $\mu M$  y de 10  $\mu M$  para el  $HS^-$  y el  $S_2O_3^{2-}$  respectivamente. El intervalo de pH donde se encontraron las tasas de consumo de oxígeno ( $qO_2$ ) más altas, está entre los valores 8.5 y 9.5. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) en cultivo por lote se estimó de  $0.08 h^{-1}$ . La formación de  $S^0$  aumentó cuando el cultivo se limitó en  $O_2$ . El consorcio C1 en cultivo continuo oxidó el 100% del  $S_2O_3^{2-}$  alimentado a sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) durante el estado estacionario y se estimó un rendimiento celular ( $Y_{X/S}$ ) de 2 g proteína/mol  $S_2O_3^{2-}$ . Los resultados son comparables con los reportados para microorganismos sulfoxidantes y alcalófilos sulfoxidantes

Se aislaron las cepas AA y AB a partir del consorcio C1, ambas bacterias son Gram negativas y tienen la capacidad de oxidar  $S_2O_3^{2-}$  a  $SO_4^{2-}$ . Filogenéticamente la cepa AA difiere en más del 6% con bacterias halófilas, por lo que se sugiere que pertenece a un género todavía no descrito. El aislado AB fue identificado como miembro del género *Thioalkalovibrio*. La velocidad específica de crecimiento durante el cultivo por lote se estimó para AA de  $0.05 h^{-1}$  y para AB de  $0.07 h^{-1}$ . A partir del cultivo por lote de las cepas AA y AB a diferentes concentraciones NaCl se sugiere que ambas cepas son halófilas discretas.

## ABSTRACT

Increase of industrial activities alters the natural sulfur cycle. A lot of industries emit this element to the atmosphere in different forms of pollutants and these should be removed to diminish the negative impact against the ecosystems. In order to propose some alternatives to manage this pollutants in laboratory scale and also in industrial scale, the study of the sulfur cycle has taken great importance. In this work we studied the obtention and characterization of sulfur-oxidizing microbial consortia in high alkaline conditions, in order to hold out, in the future, industrial bioprocesses related to the sulfur cycle.

The sulfur-oxidizing consortia (C1 and C2) were obtained from alkaline soils. As both consortia can metabolize thiosulfate ( $S_2O_3^{2-}$ ) as energy and carbon dioxide ( $CO_2$ ) as carbon sources they are called chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing microorganisms.

Consortium C1 was able to oxidize  $S_2O_3^{2-}$  and hydrogen sulfide ( $HS^-$ ). The maximum oxygen consumption rate ( $qO_{2max}$ ) for  $HS^-$  was 2 times higher (0.51 mmol  $O_2$  / g protein\*min) than the one found for  $S_2O_3^{2-}$  (0.23 mmol  $O_2$  / g protein\*min). The apparent affinity constant ( $K_S$ ) was 22  $\mu M$  and 10  $\mu M$  for  $HS^-$  and  $S_2O_3^{2-}$  respectively. The highest oxygen consumption rate ( $qO_2$ ) was found over a pH range between 8.5 and 9.5. The specific growth rate ( $\mu$ ) during batch growth was 0.08  $h^{-1}$ . The production of  $S^0$  increased when the culture was  $O_2$  limited. The consortium C1, during stationary growing phase in continue growth, oxidized 100% of the  $S_2O_3^{2-}$  into sulfate ( $SO_4^{2-}$ ) and the estimated growth yield ( $Y_{X/S}$ ) was 2 g protein/ mol  $S_2O_3^{2-}$ . The results were comparable with those reported for sulfur-oxidizing microorganisms and alkaliphilic sulfur-oxidizing microorganisms.

Two isolates from consortium C1, currently known as strains AA and AB, were both Gram negative and they could oxidized  $S_2O_3^{2-}$  into  $SO_4^{2-}$ . Phylogenetically, strain AA differs in more than 6% with halophilic bacteria which suggest that it belongs to a genus not yet described. Strain AB was identified as a member of the *Thioalkalovibrio* genus. The specific growth rate during batch growth was 0.05  $h^{-1}$  for strain AA and 0.07  $h^{-1}$  for strain AB. As a result of the batch growth culture with different concentrations of NaCl, it was suggested that both strains are slightly halophilic.

# CONTENIDO

<b>RESUMEN.....</b>	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>vii</b>
<b>1 INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
1.1 Contaminación ambiental y compuestos de azufre.....	2
1.2 Química del azufre.....	3
1.2.1 Ácido sulfhídrico (H <sub>2</sub> S).....	4
1.2.1.1 Solubilidad de sulfuros en función del pH.....	5
1.2.1.2 Toxicidad del H <sub>2</sub> S.....	7
1.2.1.3 Fuentes naturales y antropogénicas de H <sub>2</sub> S.....	8
1.2.1.4 Acciones ambientales.....	9
1.2.2 Tiosulfato (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ) y compuestos orgánicos de azufre.....	10
1.3 Microorganismos en la eliminación de contaminantes.....	11
1.3.1 Ciclo biogeoquímico del azufre.....	13
1.3.1.1 Bacterias sulfooxidantes.....	16
1.3.1.2 Bioquímica de la sulfooxidación.....	18
1.3.2 Microorganismos extremófilos.....	18
1.3.2.1 Microorganismos alcalófilos.....	20
1.3.2.2 Bacterias alcalófilas sulfooxidantes.....	22
1.4 Procesos de remoción de H <sub>2</sub> S.....	25
<b>2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
2.1 Justificación.....	30
2.2 Objetivo general.....	31
2.3 Objetivos específicos.....	31
<b>3 MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
3.1 Medio de cultivo.....	32
3.2 Origen de las muestras.....	33
3.3 Enriquecimiento.....	34
3.4 Caracterización del consorcio C1.....	35
3.4.1 Cultivo en lote.....	35
3.4.2 Estudios de respirometría.....	35
3.4.3 Cultivo en continuo.....	37
3.5 Aislamiento de cepas.....	38

3.5.1	Caracterización de las cepas .....	38
3.5.2	Amplificación y secuenciación del fragmento 16S ARNr.....	39
3.6	Métodos analíticos .....	40
3.6.1	Cuantificación de biomasa .....	40
3.6.2	Cuantificación de sulfatos .....	40
3.6.3	Cuantificación de $\text{SO}_4^{2-}$ y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ .....	41
3.7	Análisis cinético.....	41
<b>4</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>44</b>
4.1	Cultivo de microorganismos en condiciones de pH extremo.....	44
4.1.1	Capacidad amortiguadora del medio mineral.....	44
4.1.2	Contaminación con protozoarios.....	45
4.1.3	Medio sólido para el cultivo de bacterias sulfoxidantes alcalófilas .....	47
4.1.4	Oxidación química y biológica de $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ y $\text{HS}^-$ en condiciones alcalinas.....	48
4.2	Consortios alcalófilos sulfoxidantes.....	49
4.2.1	Obtención de consorcios.....	49
4.2.1.1	Enriquecimiento de las muestras M1, M2, M3 y M4.....	49
4.2.1.2	Enriquecimiento de las muestras M5, M6, M7 y M8.....	51
4.2.1.3	Consortio C1 .....	52
4.2.1.4	Consortio C2 .....	53
4.2.2	Caracterización del consorcio C1 en cultivo por lote.....	54
4.2.2.1	Efecto del pH sobre la tasa de consumo de oxígeno .....	55
4.2.2.2	Parámetros cinéticos de oxidación.....	56
4.2.2.3	Curvas de crecimiento del consorcio C1 .....	59
4.2.3	Cultivo en continuo del consorcio C1 .....	63
4.3	Cepas puras .....	65
4.3.1	Aislamiento.....	65
4.3.2	Identificación .....	66
4.3.3	Caracterización de las cepas AA y AB .....	68
4.3.3.1	Tolerancia a la salinidad .....	68
4.3.3.2	Curvas de crecimiento de las cepas AA y AB .....	70
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>73</b>
	<b>Bibliografía.....</b>	<b>75</b>



# 1 INTRODUCCIÓN

La contaminación es un problema ambiental que actualmente afecta gravemente a nuestro planeta, surge cuando se produce un desequilibrio como resultado de la adición de sustancias contaminantes al medio ambiente, en cantidades que provoquen efectos adversos en los organismos vivos o materiales expuestos a dosis que sobrepasen los niveles aceptables en la naturaleza. La contaminación surge a partir de ciertas manifestaciones de la naturaleza (fuentes naturales) o bien, debido a los diferentes procesos productivos del hombre (fuentes antropogénicas) que conforman las actividades de la vida diaria (Erkerlin, 1997). Cabe señalar que en las grandes ciudades, las fuentes antropogénicas rebasan significativamente a las provenientes de fuentes naturales.

La contaminación por compuestos de azufre representa un problema de relevancia mundial, con graves efectos al equilibrio ambiental y a la salud. Este elemento es esencial para la vida en la tierra, sus complejas conversiones óxido reductivas son el motor del ciclo biogeoquímico del azufre, las cuales involucran el metabolismo de diferentes grupos de bacterias, especializadas en usar compuestos azufrados en sus distintos estados de oxidación y en diversas condiciones ambientales (temperatura, salinidad y pH).

Actualmente se desarrollan diversas tecnologías biológicas para prevenir, minimizar o remediar los efectos de la contaminación por compuestos de azufre, basándose en las conversiones que realizan naturalmente ciertas bacterias en el ciclo biogeoquímico del azufre.

El ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) es un sustancia muy volátil, que se encuentra entre los compuestos azufrados más emitidos en el mundo y es el compuesto reducido de azufre que ejerce el mayor impacto adverso al medio ambiente, debido a que es altamente reactivo y tóxico.

Las emisiones contaminantes que contienen  $H_2S$  pueden tener características muy variadas (temperatura, pH, salinidad y compuestos orgánicos) que dependen del tipo de proceso industrial que las origina. Algunos de estos procesos para mejorar su eficiencia requieren de condiciones de operación extremas (temperatura o pH), las cuales pueden estar lejos de los óptimos fisiológicos para el promedio de las bacterias sulfoxidantes. Entonces el tratamiento de éstas, implica modificar las características de la corriente hacia los óptimos fisiológicos o el uso de bacterias naturalmente adaptadas a ambientes extremos (extremófilas), las cuales pueden usarse en un tratamiento biotecnológico directamente a la corriente de desecho. Por ejemplo; la eficiencia de la absorción del  $H_2S$  en corrientes gaseosas es mejorada por la operación de lavadores a altos valores de pH. Este tipo de problema ambiental, sugiere la factibilidad de un proceso de desulfurización alcalina, que deberá su viabilidad en parte a la búsqueda de bacterias alcalófilas sulfoxidantes, capaces de sobrevivir en las condiciones del proceso y la elección de las bacterias apropiadas; cuyas características cinéticas satisfagan las necesidades de un proceso de remoción.

## 1.1 Contaminación ambiental y compuestos de azufre.

Dentro de los contaminantes de importancia a escala mundial, los compuestos azufrados tienen gran relevancia debido al impacto ambiental adverso que provocan en la naturaleza, el cual se ha incrementado significativamente a causa de las diversas fuentes antropogénicas. La emisión al ambiente de dichos compuestos es indeseable por sus características acidificantes, además está asociada a la lluvia ácida, mal olor, fenómenos de corrosión, problemas de partículas respirables y de visibilidad, y daños a la salud debido a la toxicidad de algunos de estos compuestos (Alcántara, 2000; Janssen y col., 2001; Lens y Kuenen, 2001).

Entre los compuestos de azufre de mayor importancia que se emiten a la atmósfera se encuentran el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ), el ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ), el disulfuro de carbono ( $\text{CS}_2$ ) y los compuestos orgánicos volátiles de azufre.

El problema de la contaminación por compuestos de azufre se debe principalmente a la utilización de combustibles fósiles (principalmente carbón y crudos de petróleo ácidos), la descomposición de materia orgánica y a diversas actividades industriales (la refinación de petróleo, la producción de ácido sulfúrico, la minería, la metalurgia, la industria petroquímica, la papelera, la alimentaria, del procesamiento fotográfico, los ingenios azucareros, el tratamiento del gas natural, etc.). Estos compuestos emitidos pueden reaccionar fotoquímica, catalítica y biológicamente en el medio ambiente con otras sustancias y producirse toda una gama nueva de contaminantes, debido a la compleja química de este elemento.

## 1.2 Química del azufre.

Químicamente el azufre es uno de los elementos más interesantes debido a los diferentes estados de oxidación que puede asumir, a la tendencia que tiene el azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) de formar cadenas y anillos concatenados, así como a las complejas reacciones de equilibrio de algunos compuestos de azufre. El azufre y el oxígeno poseen la misma configuración electrónica y ambos actúan como motores de la vida en la tierra.

El azufre tiene nueve estados de oxidación (Tabla 1.1) y la mayoría de ellos existen en sistemas acuosos, en los cuales las reacciones de oxidorreducción ocurren ya sea por actividad microbiana o químicamente. El equilibrio entre los compuestos de azufre en un sistema acuoso, depende del potencial redox, el valor de pH, la temperatura, y la concentración, siendo los compuestos relativamente más estables el sulfuro de hidrógeno ( $\text{HS}^-$ ), azufre elemental ( $\text{S}_8$ ) y sulfato ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) o sulfato ácido ( $\text{HSO}_4^-$ ) (Steudel, 2000).

**Tabla 1.1** Estados de oxidación del azufre. (\*) Compuestos inorgánicos de relevancia biológica.

Estado de oxidación	Compuestos
-2	ácido sulfhídrico (H <sub>2</sub> S), ion sulfuro de hidrogeno* (HS <sup>-</sup> ), ion sulfuro (S <sup>2-</sup> )
-1	disulfano (H <sub>2</sub> S <sub>2</sub> ), disulfuro (S <sub>2</sub> <sup>2-</sup> ), polisulfuros*(S-S <sub>n</sub> -S <sup>-</sup> ), tiosulfato* (S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )
0	azufre elemental* (S <sub>n</sub> ), polisulfanos orgánicos (R-S <sub>n</sub> -R), politionatos* (O <sub>3</sub> S-S <sub>n</sub> -SO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
+1	diclorurodisulfano (Cl-S-S-Cl)
+2	dicloruro de azufre(SCl <sub>2</sub> ), sulfoxilato (SO <sub>2</sub> <sup>2-</sup> )
+3	ditionito (S <sub>2</sub> O <sub>4</sub> <sup>2-</sup> )
+4	dióxido de azufre (SO <sub>2</sub> ), sulfito (SO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> ), bisulfito* (HSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
+5	ditionato (S <sub>2</sub> O <sub>6</sub> <sup>2-</sup> ), sulfonato (RSO <sub>3</sub> <sup>-</sup> )
+6	tríoído de azufre (SO <sub>3</sub> ), sulfato* (SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ), peroxosulfato (SO <sub>5</sub> <sup>2-</sup> )

Tabla adaptada a partir de Steudel, 2000 y Brüser y col., 2000.

Los compuestos reducidos de azufre son aquellos que tienen estados de oxidación -2 y -1; los estados de oxidación intermedios 0, +2, +4 tienen solo una existencia transitoria geoquímicamente y la forma más oxidada del azufre (+6) se encuentra en el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> (Middelburg, 2000).

### 1.2.1 Ácido sulfhídrico (H<sub>2</sub>S).

El H<sub>2</sub>S es un gas altamente reactivo, corrosivo, tóxico, inflamable, mal oliente, y soluble en agua, alcohol y bisulfuro de carbono. Es análogo al agua, sin embargo es mucho más volátil (punto de fusión de -85.6 °C y punto de ebullición de -60.7 °C) debido a su menor tendencia de formar puentes de hidrógeno. Es el compuesto de azufre más reducido (Alcántara, 2000).

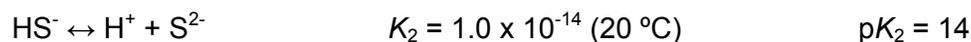
Entre sus efectos ambientales el H<sub>2</sub>S provoca lluvia ácida; mal olor que genera en ríos contaminados, rellenos sanitarios o sistemas de tratamiento; fenómenos de corrosión de acero y concreto; y daños a la salud debido a su toxicidad. El H<sub>2</sub>S gaseoso emitido a la atmósfera se oxida en el aire produciendo SO<sub>2</sub>, el que provoca otra serie de daños ambientales.

Las soluciones alcalinas de aniones sulfuro y el mismo Na<sub>2</sub>S•9H<sub>2</sub>O sólido, son oxidados por el aire a polisulfuros (cadenas cortas), tiosulfato y eventualmente a sulfato. La velocidad de auto oxidación de las soluciones de sulfuro depende de la concentración, el valor de pH y la temperatura (Steudel, 2000).

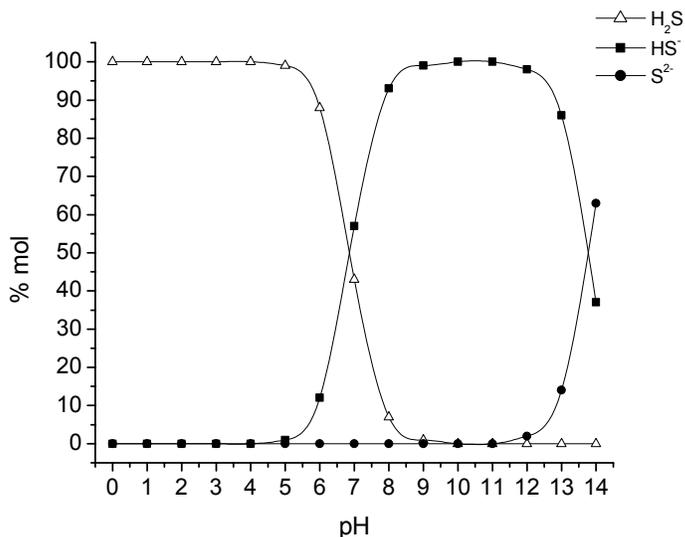
Sus propiedades corrosivas ocasionan daños en infraestructura industrial, tanto en procesos donde se libera, como en aquellos diseñados para removerlo, provocando deterioro de paredes de concreto en reactores y sistemas de drenaje; y corroe tuberías, tanques, válvulas y bombas de acero. Por lo tanto la eliminación y manejo del H<sub>2</sub>S, es tanto un problema ambiental como económico que afecta directamente a una amplia variedad de procesos.

#### 1.2.1.1 Solubilidad de sulfuros en función del pH.

Una propiedad característica del H<sub>2</sub>S es su solubilidad en agua, siendo de solo 0.40g / 100g H<sub>2</sub>O (0.12 M) a 20 °C, a una presión total (H<sub>2</sub>S + H<sub>2</sub>O) de 1.013 bar. Como es de esperarse, la solubilidad disminuye con el incremento de la temperatura. En soluciones acuosas la acidez muy débil del H<sub>2</sub>S se disocia, más o menos, dependiendo del pH .



El valor extremadamente bajo de  $K_2$  excluye la formación del ion sulfuro  $S^{2-}$  en casi todas las soluciones excepto a valores de pH cercanos a 14. Entonces si se habla de “soluciones de sulfuro” generalmente se refiere a soluciones que contienen casi exclusivamente  $H_2S$  y  $HS^-$  en fracciones que dependen del pH, y un poco del ion  $S^{2-}$  solo en condiciones altamente alcalinas (Steudel, 2000).



**Figura 1.1** Distribución de las especies de sulfuro en función del pH, a 30° C (comunicación personal, Gonzáles S. A.)

En una solución 1 mM de sulfuro total a 30 °C, sus distintas especies (ionizadas y no ionizada) se distribuyen en función del pH como se muestra en la Figura 1.1, donde presenta un ejercicio con base en la Ley de Henry en el que se calculó el % mol de las especies de sulfuro en la fase líquida en función de la temperatura y el pH. Se observa que a un valor de pH de 7, se encuentra que el 57% del sulfuro está presente como  $HS^-$  y el resto como  $H_2S$ ; a pH de 10 prácticamente todo el sulfuro está presente como  $HS^-$ .

Entonces el  $HS^-$  y  $S^{2-}$  son muy hidrosolubles (18.6 g  $Na_2S$  / 100g  $H_2O$  a 20 °C), pero el  $H_2S$  no lo es, y se volatiliza fácilmente. Incluso a pH neutro puede producirse la volatilización de

alguna cantidad de  $\text{H}_2\text{S}$  procedente de  $\text{HS}^-$ , porque estas dos formas se encuentran en equilibrio y al producirse la volatilización, el equilibrio se desplaza hacia el  $\text{H}_2\text{S}$  (Madigan y col., 1999). Por lo tanto, ciertas tecnologías de remoción de sulfuros (sistemas de absorción) usan solventes alcalinos, con valores de  $\text{pH} > 8$  (Janssen y col., 2001; Lens y Kuenen, 2001).

#### 1.2.1.2 Toxicidad del $\text{H}_2\text{S}$ .

Como se ha mencionado el  $\text{H}_2\text{S}$  es tóxico y puede ser fatal para los microorganismos, plantas y animales; pero el mecanismo exacto de la toxicidad del  $\text{H}_2\text{S}$  no está todavía bien esclarecido. Se han propuesto los siguientes mecanismos:

- Desnaturalización de proteínas por medio de la formación de enlaces sulfuro y bisulfuro entre las cadenas polipeptídicas.
- Interferencia del  $\text{H}_2\text{S}$  con las coenzimas A y M a través de la formación de enlaces con el sulfuro, obstaculizando la vía de la acetil coenzima A para la fijación de  $\text{CO}_2$ .
- Puede afectar el  $\text{pH}$  intracelular.
- Puede combinarse con el hierro de los citocromos (Madigan y col., 1999).

La toxicidad del sulfuro es observada como el comienzo de la dependencia al  $\text{pH}$  porque solo la molécula no disociada  $\text{H}_2\text{S}$  puede pasar a través de la membrana celular. Como se explicó previamente, en condiciones alcalinas por encima de valores de  $\text{pH}$  entre 8.0 y 9.0, virtualmente todo el sulfuro está disuelto en su forma ionizada  $\text{HS}^-$ , y asumiendo que la forma inhibitoria del sulfuro es la no disociada  $\text{H}_2\text{S}$ , uno podría esperar una correlación directa entre la concentración de  $\text{H}_2\text{S}$  y el efecto inhibitorio. Esta relación necesita otros parámetros como la concentración total de sulfuro para correlacionarse con la inhibición observada. Estudios

muestran que el  $H_2S$  puede ser más tóxico en valores altos de pH, posiblemente por el desarrollo de fuertes gradientes de pH a través de la membrana que puede afectar las propiedades de difusión de la molécula  $H_2S$ . Alternativamente se sugiere que ambas formas tanto el  $H_2S$  como el sulfuro total, pueden tener efecto inhibitorio. Los organismos por lo tanto pueden poseer dos umbrales de inhibición uno para  $H_2S$  y otro para el sulfuro total (O'Flaherty y Collieran, 2000).

El  $H_2S$  posee un característico olor a huevo podrido que es perceptible en el aire en concentraciones de 0.02 hasta 100 ppm, porque esta sustancia provoca la pérdida del sentido del olfato. La exposición del ser humano a concentraciones de  $H_2S$  de 10 ppm es el máximo permitido en áreas de trabajo por 8 horas, a concentraciones mayores de 20 ppm se requiere de equipo de protección. Una exposición de 15 minutos a 100 ppm puede causar dolores de cabeza, náuseas, pérdida del sentido del olfato, irritación de ojos y garganta. La exposición a concentraciones superiores a 700 ppm puede causar parálisis del sistema respiratorio que resulta en la pérdida inmediata del conocimiento y sin un tratamiento adecuado la muerte en pocos minutos. (Alcántara, 2000; Morgan y col., 2001).

### 1.2.1.3 Fuentes naturales y antropogénicas de $H_2S$ .

En la naturaleza el  $H_2S$  se encuentra entre los productos de la putrefacción o descomposición de materia orgánica, es un constituyente de ciertos tipos de gas natural ("gas amargo"), también está presente en las exhalaciones volcánicas y es abundante en los efluentes de las fuentes hidrotermales submarinas. En ambientes acuosos anaerobios el  $H_2S$  puede formarse por bacterias sulfato reductoras (Steudel, 2000) y también es producido como un intermediario de la oxidación biológica de  $CS_2$ .

Los sulfuros son componentes frecuentes en efluentes y emisiones industriales, encontrándose como  $\text{HS}^-$  y  $\text{S}^{2-}$  en corrientes líquidas o como  $\text{H}_2\text{S}$  en las gaseosas. Estos compuestos se liberan al ambiente por un gran número de industrias, como las refinerías de petróleo, la extracción y tratamiento de gas natural, las fábricas de papel y pulpa, las plantas productoras de celofán y rayón a partir de viscosa, las tenerías, en los efluentes gaseosos de hornos de coke, producción de caucho, en la fundición de mineral de hierro, en los sistemas anaerobios de tratamiento de aguas residuales y producción de metano (biogas) por digestión anaerobia de efluentes líquidos, entre otras. (Buisman y col, 1991; Janssen y col., 2001; Morgan y col., 2001; Steudel, 2000;).

#### 1.2.1.4 Acciones ambientales.

En la última década se han tomado acciones para disminuir los efectos de las emanaciones de  $\text{H}_2\text{S}$ . A partir de diciembre de 1991 se prohibió en la Ciudad de México el uso de combustibles con más de 2% de azufre, y comenzó la producción de diesel y combustóleo con bajo contenido de azufre (0.1 y 0.8 por ciento, respectivamente). En las industrias y centrales generadoras de electricidad fue emprendida la sustitución del combustóleo por gas natural. Este representa aproximadamente el 47% de los combustibles utilizados en el país y el 72% de nuestra petroquímica se deriva del metano y etano contenido en el gas (<http://www.imp.mx/petroleo/apuntes/gas.htm>). El gas natural ha adquirido gran importancia como energético y petroquímico; y por consecuencia, también los procesos de desulfurización.

El gas natural amargo contiene impurezas y sustancias indeseables tales como:  $\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{N}_2$ ,  $\text{CO}_2$ , y He. La Tabla 1.2 muestra los principales componentes del gas natural y el biogas; sus concentraciones promedio y las especificaciones que debe de cumplir para su transporte en tuberías y consumo.

**Tabla 1.2** Composición promedio encontrada en el gas natural y biogas.

Componente	Gas natural		Biogas
	Gas amargo (promedio)	Gas dulce (especificación)	Composición promedio
CH <sub>4</sub>	72 a 96% vol	98% vol	40 a 70% vol.
H <sub>2</sub> S <sub>(g)</sub>	Hasta 30% vol.	3 ppmv	0 a 3% vol.
CO <sub>2</sub>	3% vol.	1 a 2% vol.	30 a 60% vol.

Construida a partir de Janssen y col., 2001 y Morgan y col., 2001.

El tratamiento que recibe el gas natural antes de su distribución y venta, se le conoce como “endulzamiento” que consiste en la eliminación de compuestos ácidos (H<sub>2</sub>S y CO<sub>2</sub>) que contiene el gas amargo, mediante el uso de diversas tecnologías.

La oxidación del H<sub>2</sub>S es la segunda fuente más importante para la obtención de S<sup>0</sup>, ya sea por medios fisicoquímicos o biológicos. Por tanto la simple remoción u oxidación del H<sub>2</sub>S contenido en corrientes acuosas y gaseosas, es importante no solo para producir S<sup>0</sup>, sino por razones de salud, seguridad, corrosión y contaminación (Morgan y col., 2001).

### 1.2.2 Tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>) y compuestos orgánicos de azufre.

El S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> es un anión metaestable formado por dos átomos de azufre no equivalentes que tiende a su descomposición química en soluciones acuosas. Las soluciones diluidas de este compuesto, 0.01 M o menores, se descomponen más rápidamente que la soluciones concentradas, 0.1 M o mayores.

Una reacción altamente característica del anión S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> es su fácil oxidación a tetratiónato (S<sub>4</sub>O<sub>6</sub><sup>2-</sup>), el cual es un ión estable en soluciones neutras y ácidas; en condiciones alcalinas y

en presencia de nucleófilos fuertes como los aniones sulfuro o sulfito, los politionatos como el tetrionato son inestables y degradables (Steudel, 2000).

Junto con otros compuestos de azufre el  $S_2O_3^{2-}$  es altamente agresivo por los problemas de corrosión asociados al mismo. El  $S_2O_3^{2-}$  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, también emite como contaminante este compuesto. Es claro que por sí mismo el  $S_2O_3^{2-}$  no es un factor de deterioro ambiental sin embargo, los productos de su oxidación biológica o química ( $SO_4^{2-}$ ), o bien su reducción biológica en condiciones anaerobias ( $H_2S$ ) tienen fuerte impacto ambiental (Alcántara, 2000).

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 como contaminantes ambientales. La descomposición de aminoácidos que contienen azufre (metionina y cisteína) de la materia orgánica, produce 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. Entre los compuestos que se han identificado se encuentra: el metanotiol ( $CH_3SH$ ), el dimetil sulfuro ( $CH_3-S-CH_3$ ), dimetilpolisulfuros ( $_3HC-S_n-CH_3$ ) y el bisulfuro de carbono ( $CS_2$ ).

### 1.3 Microorganismos en la eliminación de contaminantes.

La biotecnología usa la capacidad que una reacción metabólica o grupo de ellas, le dan a algunos agentes biológicos (microorganismos, enzimas, tejidos vegetales o animales, etc.) para generar o transformar compuestos útiles para diversos campos industriales (químico, farmacéutico, alimentario, ambiental, etc.) (Alvero, 1998).

Los microorganismos son usados por la biotecnología ambiental para prevenir, minimizar o biorremediar los efectos de la contaminación, y en ocasiones para producir simultáneamente compuestos con un valor agregado, mediante la capacidad de diversos microorganismos para consumir o transformar los compuestos contaminantes en biomasa o compuestos menos nocivos. Para lograrlo, la biotecnología ambiental hace uso de principios de ingeniería y microbiología (Rittmann y MacCarty, 2001)

Para que un compuesto pueda ser removido biológicamente de un efluente, depende de que exista un microorganismo capaz de metabolizarlo. Es necesario que la especie en cuestión presente propiedades cinéticas que satisfagan las necesidades del proceso, como una velocidad de crecimiento lo suficientemente rápida para que sea mantenida en el sistema de tratamiento (Rittmann y McCarty, 2001). El tipo de microorganismo usado en un proceso será establecido por las características de la corriente a tratar, pero estos determinan en definitiva el diseño y tipo de procesos a utilizar (Janssen y col., 2001; Morgan y col., 2001).

Como ya se mencionó no todos los microorganismos pueden tener una aplicación industrial o como en este caso, ambiental, los que se utilizan con este objetivo son el resultado de cuidadosos procesos de selección que conducen a una especialización metabólica (Alvero, 1998). Entre estos procesos de selección se encuentra el enriquecimiento que usa un medio de cultivo y condiciones de incubación selectivos para el tipo de organismos que se desean obtener a partir de un inóculo apropiado. Por tanto, el enriquecimiento se inicia con la selección del hábitat adecuado donde se toman las muestras para obtener dicho inóculo (Madigan y col., 1999).

### 1.3.1 Ciclo biogeoquímico del azufre.

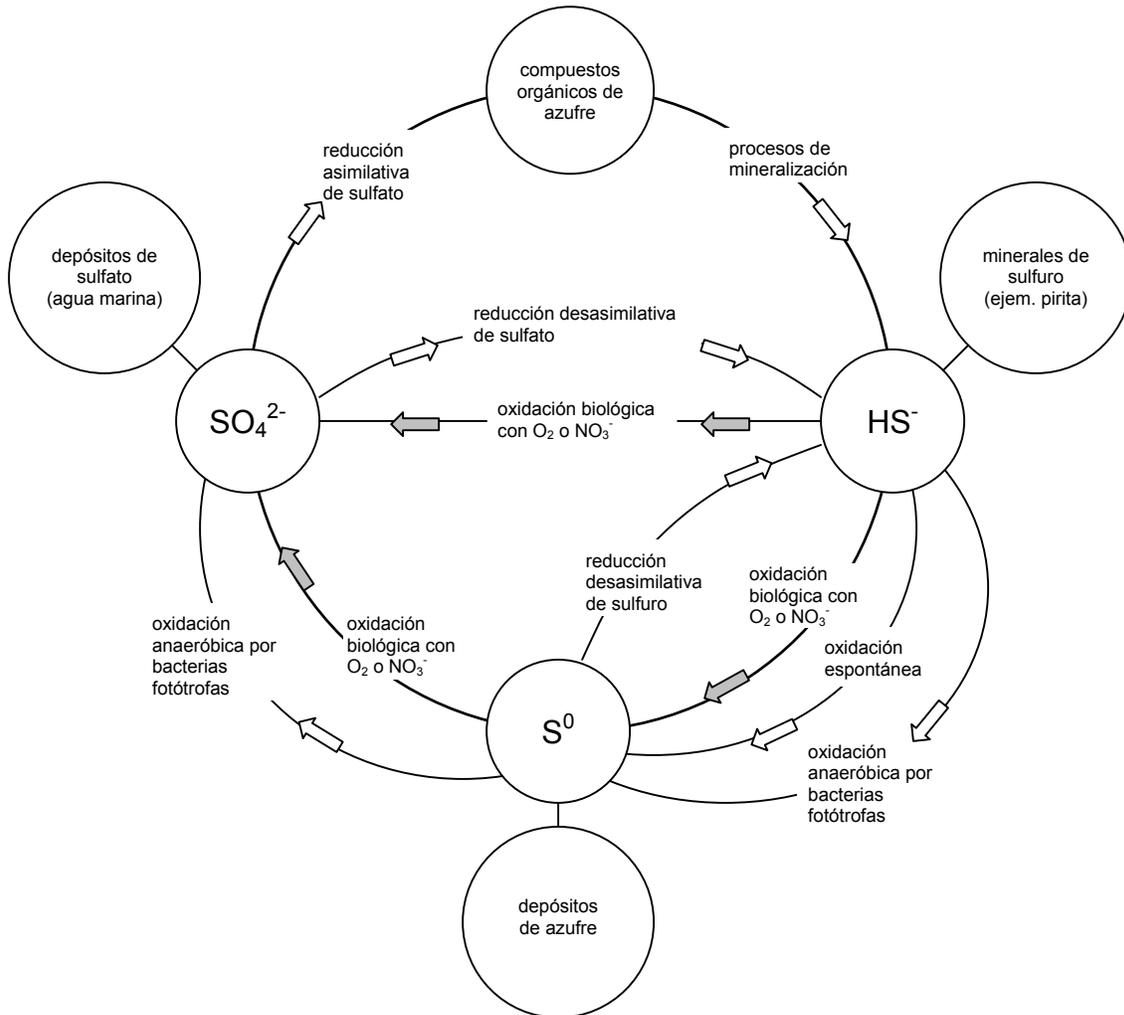
Bioquímicamente el azufre es muy importante dado que es abundante en todos los organismos, aparece en muchos compuestos orgánicos, donde en algunos de ellos poseen funciones estructurales, catalíticas o regulatorias. En contraste, los compuestos inorgánicos de azufre, tienen un papel biológico muy restringido, sirven como fuente para la asimilación de azufre e incorporarlo en los compuestos orgánicos, o son empleados como donadores o aceptores de electrones para el transporte desasimilativo de electrones.

Geoquímicamente el azufre es abundante. Sus principales depósitos son los sedimentos y rocas en forma de minerales de sulfato (principalmente yeso,  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), minerales de sulfuro (principalmente pirita,  $\text{FeS}_2$ ) y azufre elemental ( $\text{S}^0$ ); aunque el mar constituye el mayor reservorio de azufre para la biosfera en forma de  $\text{SO}_4^{2-}$  inorgánico (Madigan y col., 1999; Middelburg, 2000). Algunos de estos depósitos de azufre parecen ser de origen biogénico. La materia orgánica viva y muerta constituye un reservorio menor de azufre pero de reciclado más rápido (Atlas y Richard, 2002).

El ciclo biogeoquímico del azufre (Figura 1.2) describe las oxidaciones y reducciones que suceden química y bioquímicamente (biosíntesis, biodegradación y biotransformaciones); así como, las transformaciones físicas (disolución, precipitación, volatilización y fijación) de los compuestos azufrados, que se llevan a cabo en la atmósfera, la hidrósfera y la litósfera, donde el azufre experimenta cambios en su estado de oxidación de -2 ( $\text{HS}^-$ ) a +6 ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), cíclicamente. Dichos eventos pueden provocar translocaciones espaciales del azufre y pueden afectar significativamente la geología y el ambiente de nuestro planeta.

El ciclo está impulsado directa o indirectamente por la energía radiante del sol, o por la energía de los compuestos inorgánicos reducidos de azufre. Todos los organismos vivos

participan en los ciclos biogeoquímicos, pero los microorganismos debido a su ubicuidad, diversas capacidades metabólicas y altas tasas de actividad enzimática, desempeñan el papel principal (Atlas y Richard, 2002).



**Figura 1.2** Ciclo biogeoquímico del azufre (Lens y Kuenen, 2001).

Los compuestos inorgánicos de azufre más comunes en la naturaleza son: el sulfuro de hidrogeno (HS<sup>-</sup>), polisulfuros (S-S<sub>n</sub>-S<sup>-</sup>), tiosulfato (S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>), politionatos (O<sub>3</sub>S-S<sub>n</sub>-SO<sub>3</sub><sup>-</sup>), azufre elemental (S<sup>0</sup>) bisulfito (HSO<sub>3</sub><sup>-</sup>) y sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), los cuales pueden ser usados por muchos organismos para propósitos asimilativos o desasimilativos (Brüser y col., 2000). Una amplia

variedad de bacterias adquieren energía metabólica a partir de la oxidación o la reducción de éstos (Janssen, 2001).

Algunos compuestos de azufre entre los que sobresalen el  $\text{HS}^-$  y sulfuros metálicos, reaccionan espontáneamente con el oxígeno, sin embargo en muchos casos las reacciones biológicas pueden competir exitosamente con las reacciones espontáneas a velocidades que pueden llegar a ser de 100 a 1000 veces mayores (Lens y Kuenen, 2001).

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

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  $\text{SO}_4^{2-}$  es reducido a  $\text{HS}^-$  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  $\text{SO}_4^{2-}$  es reducido a  $\text{HS}^-$  por microorganismos sulfato reductores en condiciones anóxicas, donde el  $\text{SO}_4^{2-}$  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.

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

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

Mediante el uso de microorganismos que participan en este ciclo, los compuestos reducidos y oxidados de azufre pueden ser convertidos a productos útiles, como el  $S^0$  (Janssen, 2001), el cual puede usarse como fertilizante o como materia prima en la producción de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ) que es indispensable para sintetizar muchos compuestos orgánicos e inorgánicos (Lens y Kuenen, 2001; Alcántara, 2000; Morgan y col., 2001).

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

#### 1.3.1.1 Bacterias sulfooxidantes.

La oxidación biológica de  $HS^-$  a  $SO_4^{2-}$  es una de las principales reacciones del ciclo biogeoquímico del azufre. Los compuestos inorgánicos reducidos de azufre son oxidados exclusivamente por procariotes, y el  $SO_4^{2-}$  es el principal producto de oxidación. La sulfoxidación en los eucariotes sucede solo en endosimbiosis con bacterias litoautotróficas. Los procariotes sulfooxidantes son filogenéticamente diversos. En el dominio *Arquea* la sulfoxidación aeróbica está restringida a los miembros del orden *Sulfolobales*, y en el

dominio *Bacteria* el azufre es oxidado por litótrofos aerobios o por fotótrofos anaerobios (Friedrich y col., 2001).

Los procariotes oxidan  $\text{HS}^-$ ,  $\text{S}^{2-}$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , y varios politionatos ( $^-\text{O}_3\text{S-S}_n\text{-SO}_3^-$ ), en condiciones alcalinas, neutras o ácidas. Los procariotes aerobios sulfoxidantes pertenecen a los géneros *Acidianus*, *Acidithiobacillus*, *Aquaspirillum*, *Aquifex*, *Bacillus*, *Beggiatoa*, *Methylobacterium*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Starkeya*, *Sulfolobus*, *Thermithiobacillus*, *Thiobacillus*, y *Xanthobacter*; y son principalmente mesofílicos.

Las bacterias fototróficas anaerobias son principalmente neutrófilas y mesófilas y pertenecen a géneros como *Allochomatium*, (formalmente *Chromatium*), *Chlorobium*, *Rhodobacter*, *Rhodopseudomonas*, *Rhodovulum*, y *Thiocapsa*. El crecimiento litoautótrofo en la oscuridad ha sido descrito para *Thiocapsa roseopersicina*, *Allochomatium vinosum*, y otras bacterias púrpuras de azufre, (Friedrich y col., 2001).

En el pasado el término “bacteria sulfoxidante” fue usado para clasificar taxonómicamente a las bacterias litotróficas capaces de oxidar compuestos azufrados. Tradicionalmente las bacterias sulfoxidantes incluyen las bacterias verdes, púrpuras e incoloras del azufre que pertenecen tanto a las proteobacterias como a las arqueobacterias. Por otra parte, numerosas bacterias sulfoxidantes tradicionales pueden crecer organoheterotróficamente, por lo tanto el término bacteria sulfoxidante ya no tiene significado taxonómico, sin embargo, es usado para describir al grupo fisiológico de bacterias que son encontradas en lugares que contienen sulfuro. Muchos de los estudios fisiológicos y enzimáticos de las vías oxidativas de compuestos de azufre se han centrado en el estudio de las especies que oxidan  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  y  $\text{S}^{2-}$  (Brüser y col., 2000).

Los intervalos de pH y temperatura que permiten crecer a las bacterias sulfoxidantes son de 1 a 10 y de 4 a 95 °C, respectivamente. La mayoría de las bacterias incoloras del azufre

usan oxígeno molecular como aceptor final de electrones, pero muchas especies son también capaces de desnitrificar (Lens y Kuenen, 2001).

#### 1.3.1.2 Bioquímica de la sulfooxidación.

Las bacterias autótrofas fijan el CO<sub>2</sub> tanto por la vía reductiva de las pentosas como por la vía reductiva de los ácidos tricarbóxicos. La reductancia emitida a partir de la sulfooxidación es usada en las bacterias litótrofas para la respiración aeróbica y para la reducción del CO<sub>2</sub>, mientras que en las bacterias fotótrofas anaerobias es usada principalmente para la fijación del carbono (Friedrich y col., 2001).

La complejidad y el número de reacciones involucradas en las transformaciones químicas y biológicas de los compuestos de azufre dificulta el estudio de las reacciones bioquímicas llevadas a cabo por los microorganismos para la oxidación biológica de estos compuestos. Dos grupos de bacterias litótrofas sulfooxidantes pueden distinguirse por el mecanismo de oxidación de los compuestos reducidos de azufre (S<sup>0</sup>, S<sup>2-</sup> y S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>).

- i. Un grupo que involucra un mecanismo de formación de politionatos, presente en todos los thiobacilli que son quimiolitotróficos obligados y otros como *Thiobacillus acidophilus*.
- ii. Un grupo que no involucra un mecanismo de formación de politionatos observado en *Paracoccus* spp. Es probable que la ruta encontrada en *Paracoccus* prevalezca en los heterótrofos facultativos (mixotróficos).

#### 1.3.2 Microorganismos extremófilos.

Hasta hace unos 50 años, se pensaban que la vida, por definición, sólo podía existir en un número muy limitado de ambientes. Los extremófilos son organismos que pueden sobrevivir y crecer óptimamente bajo condiciones extremas (Tabla 1.3).

**Tabla 1.3** Extremófilos.

<b>Parámetro</b>	<b>Tipo</b>	<b>Condiciones óptimas de crecimiento</b>
Temperatura	Psicrófilos	< 15 °C
	Termófilos	> 45 °C
	Hipertermófilos	> 80 °C
pH	Acidófilos	pH < 5
	Alcalófilos	pH > 9
Salinidad	Discretamente halófilos	1 a 5% NaCl
	Moderadamente halófilos	5 a 15% NaCl
	Halófilos extremos	15 a 30% NaCl
Presión	Barófilos	1 a 400 atm
	Barófilos extremos	700 a 800 atm
Desecación	Xerófilos	$a_w$ entre 0.750 y 0.700

Construida a partir de Madigan y col., 1999.

En contraposición se entiende por condiciones normales, aquellos ambientes con una temperatura entre los 10 y los 40 °C, un pH de 5.0 a 8.0, una presión de 1 atm, y una salinidad que corresponde entre el agua dulce y el agua marina (menores a 1% de NaCl). Muchas regiones en el mundo son consideradas extremas e incluyen ambientes como geotermas, regiones polares, fuentes ácidas y alcalinas, así como el frío y presurizado fondo del mar. Cuando las condiciones del ambiente comienzan a ser más demandantes, la diversidad de las especies disminuye y empiezan a ser exclusivamente poblados por microorganismos pertenecientes a los dominios bacteria y arquea (procariotes) (Bertoldo y col., 2002).

Los microorganismos extremófilos poseen gran interés debido a que con frecuencia filogenéticamente son taxones nuevos, sus biomoléculas son resistentes a condiciones extremas y por lo general no se comprenden sus mecanismos de resistencia, pero también

por su perspectiva en aplicaciones industriales, dado que las propiedades catalíticas de estos microorganismos pueden ser óptimas para las condiciones extremas comúnmente necesarias en procesos industriales.

### 1.3.2.1 Microorganismos alcalófilos.

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

No existe una definición precisa de qué características debe tener un organismo alcalófilo o alcalotolerante. Muchos microorganismos presentan más de un pH óptimo de crecimiento dependiendo de las condiciones de cultivo, particularmente nutrientes, iones metálicos, y temperatura. Pero por lo general el término “alcalófilos” se usa para microorganismos que crecen de manera óptima o muy bien a valores de pH superiores de 9, con frecuencia entre los valores de 10 y 12 (alcalófilos extremos), pero no pueden crecer a valores cercanos al neutro 6.5 (Horikoshi, 1999).

Tomando en cuenta que los ecosistemas se regulan por la dinámica de sus componentes bióticos y abióticos, y que las poblaciones desarrollan estrategias adaptativas para vivir en tales condiciones, se ha considerado que los microorganismos alcalófilos pueden encontrarse con mayor frecuencia en ecosistemas salino-alcalinos (Horikoshi,1999). Un ejemplo son los suelos del exlago de Texcoco, que según la literatura tiene un valor de pH que varía de 7.8 a 11.0, siendo los más frecuentes de 9 - 10. La conductividad eléctrica, que indica la salinidad del suelo, puede variar de 0.4 a 160  $\text{dSm}^{-1}$ , siendo los más frecuentes entre 60 y 100, la materia orgánica y las sales varían entre 4.3-7 y 0.9-4%, respectivamente.

Las sales que predominan son carbonato de sodio y calcio, así como bicarbonato de sodio (González, 1996; Barrera, 2000).

**Tabla 1.4** Microorganismos alcalino-tolerantes reportados en la literatura.

Alcalófilos aerobios	Es el grupo de microorganismos alcalino-tolerantes más estudiado. Para su aislamiento se usan medios alcalinos con carbonatos de sodio que permiten alcanzar valores de pH alrededor de 10. muchas clases de microorganismos alcalófilos aerobios incluyendo bacterias pertenecientes al género <i>Bacillus</i> , <i>Micrococcus</i> , <i>Pseudomonas</i> y <i>Streptomyces</i> , también eucariotes como levaduras y hongos filamentosos se han aislado de estos ambientes extremos.
Alcalófilos anaerobios	El primer reporte de un alcalófilo anaerobio fue hecho por Nimura y col. (1987). Después de este trabajo se han aislado una gran variedad de microorganismos por métodos convencionales y sus aplicaciones han sido poco exploradas. Destacan el aislamiento de especies hipertermófilas alcalófilas del género <i>Thermococcus</i> que tiene la capacidad de crecer en polisulfuros a pH alcalino y a temperaturas entre 56 y 90 °C.
Haloalcalófilos	Los microorganismos alcalófilos consisten de dos principales grupos fisiológicos: los alcalófilos y los haloalcalófilos. Los alcalófilos requieren de un pH de 9 o mayor para crecer y tienen un pH óptimo de crecimiento de alrededor de 10, mientras que los haloalcalófilos requieren de un pH mayor a 9 y alta salinidad (hasta 33% p/v NaCl). Haloalcalófilos se han aislado en ambientes alcalo-salinos extremos, como lagos carbonatados y desiertos alcalinos, por ejemplo los lagos Magadi en Kenia y Wadi Natrum en Egipto, que son probablemente los ambientes alcalinos más estables sobre la tierra (Ito, 2002).
Metanógenos	Boone y col. (1993) aislaron un metanógeno haloalcalófilo a partir de ambientes naturales salinos y salinos neutros. Las cepas crecieron a temperaturas cercanas a 40 °C, en un medio que contenía de 0.5 a 2.5 M de NaCl, a pH cercano a 7. Un género metilotrófico y metanogénico <i>Methanosalsus zhilinaeae</i> , fue aislado. La cepa no requiere Cl <sup>-</sup> pero es dependiente de Na <sup>+</sup> y HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> y crece en pH de 8 a 10.
Cianobacterias	Gerasimenko y col. (1996) reportó el aislamiento de una amplia diversidad de cianobacterias alcalófilas (16 géneros y 34 especies). No se han reportado aplicaciones industriales aunque señala su potencial para la producción de hidrógeno.
Alcalófilos sulfoxidantes y/o desnitrificantes	Estos microorganismos pueden clasificarse como quimiolitotrofos alcalófilos. Tienen la particularidad de oxidar compuestos reducidos de azufre y su estudio sistemático fue iniciado en los últimos años. Su aplicación más estudiada se ha relacionado a la oxidación de compuestos reducidos de azufre presentes en efluentes y/o emisiones que lo contienen. En el caso de los microorganismos desnitrificantes se observó que estos microorganismos obtienen su energía de la oxidación de compuestos reducidos de azufre mientras los óxidos nitrogenados se reducen a nitrógeno molecular.

(Lomans y col., 2000)

Una aproximación de los grupos de microorganismos alcalófilos sulfoxidantes que crecen en ambientes alcalinos extremos se presenta en la Tabla 1.4. Entre estos se reportan géneros con capacidad sulfoxidante en condiciones óxicas y anóxicas que tienen importancia en la industria del petróleo (Lomans y col., 2000).

La mayor parte de las bacterias alcalófilas son Gram positivas, formadoras de esporas de forma helicoidal o cilíndrica, central o terminal, flagelo polar, tienen motilidad y son catalasas positivas. Estas bacterias requieren del ion sodio ( $\text{Na}^+$ ) para su crecimiento, germinación y esporulación (Horikoshi, 1991; Krulwich, 2001).

Las aplicaciones industriales de estos microorganismos son ampliamente estudiadas y algunas de sus enzimas, como las alcalino proteasas, alcalino amilasas y alcalino celulasas, ya se aplican a escala industrial. Las enzimas alcalófilas se usan principalmente en la industria de los detergentes y en menor grado en la industria alimentaria. Sus perspectivas abarcan la síntesis de moléculas quirales, producción biológica de pulpa de madera y la producción de enzimas detergentes más sofisticadas (Horikoshi, 1991; Horikoshi, 1999).

#### 1.3.2.2 Bacterias alcalófilas sulfoxidantes.

Sorokin y colaboradores (2000a, 2001a, 2002a, 2002b, 2002c, 2003b) aislaron varias bacterias quimiolitautótrofas a partir de lagos carbonatados (pH alcalino y altas concentraciones de  $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3/\text{NaCl}$ ) de Siberia, Mongolia, Kenya, y E.U.; usando un procedimiento de enriquecimiento específico a pH 10.

Tres nuevos géneros han sido definidos *Thioalkalimicrobium*, con tres especies *Thioalkalimicrobium aerophilum*, *Thioalkalimicrobium sibericum* y *Thioalkalimicrobium cyclicum* (Sorokin y col., 2001a; Sorokin y col., 2002a); *Thioalkalivibrio*, con siete especies *Thioalkalivibrio versutus*, *Thioalkalivibrio denitrificans*, *Thioalkalivibrio nitratis*, *Thioalkalivibrio*

*jannaschii*, *Thioalkalivibrio thicyanoxidans*, *Thioalkalivibrio paradoxus*, y *Thioalkalivibrio nitratireducens* (Sorokin y col., 2001a; Sorokin y col., 2002a; Sorokin y col., 2002c; Sorokin y col., 2003b) y *Thioalkalispira*, con una especie *Thioalkalispira microaerophila* (Sorokin y col., 2002b).

Los análisis filogenéticos revelan que los tres grupos *Thioalkalimicrobium*, *Thioalkalivibrio* y *Thioalkalispira* pertenecen a las  $\gamma$ -Proteobacterias. Los tres géneros son Gram negativas. La especie *Thioalkalimicrobium* están cercanamente relacionadas con las bacterias del azufre quimiolitotróficas neutrofilicas del género *Thiomicrospira*, formando un nuevo linaje de alcalófilos en este grupo. En cambio, el género *Thioalkalivibrio* no fue relacionado con ninguna otra taxa quimiolitotrófica, pero fue asociada distantemente con bacterias del azufre púrpuras del género *Ectothiorhodospira* (Sorokin y col., 2001a).

Cepas de los géneros *Thioalkalimicrobium* y *Thioalkalivibrio* aisladas de las diferentes fuentes naturales, se encontraron fuertemente relacionadas. Miembros del género *Thioalkalimicrobium*, poseen altas velocidades de crecimiento y de oxidación correspondiendo con bajos rendimientos molares en  $S_2O_3^{2-}$  y  $HS^-$ . En contraste, miembros del género *Thioalkalivibrio* tienen bajas velocidades de oxidación y crecimiento, correspondiendo a altos rendimientos molares en  $S_2O_3^{2-}$  y  $HS^-$ . Ambos comportamientos pueden ser relacionados a ciclos estacionales que ocurren en el hábitat natural.

Las bacterias del género *Thioalkalimicrobium* toman ventaja de periodos en condiciones con un exceso de sustrato, mientras que los miembros del género *Thioalkalivibrio* están bien adaptados para sobrevivir en condiciones limitadas de sustrato. Ambos géneros tienen la menor velocidad de crecimiento y rendimiento a alta salinidad, probablemente debido a la mayor energía de mantenimiento que la bacteria debe de invertir en estas condiciones para mantener su homeostasis (Lens y Kuenen, 2001).

Estos organismos son únicos en comparación a los microorganismos quimiolitautótrofos debido a su capacidad para crecer a pH mayores a 9 y que oxidan compuestos reducidos de azufre  $S_2O_3^{2-}$ ,  $HS^-$ , polisulfuros ( $-S-S_n-S-$ ), tetrionato ( $S_4O_6^{2-}$ ) y tiocianato ( $SCN^-$ ) hasta pH 11. Otra característica de estos organismos es su capacidad de crecer en ambientes salinos con concentraciones de 0.6 a 4 M de  $Na^+$  total. Los parámetros cinéticos de oxidación de compuestos reducidos de azufre por las especies reportadas se presentan en la Tabla 1.5.

**Tabla 1.5** Propiedades cinéticas de bacterias alcalófilas sulfooxidantes. (\*) A alta aireación.

	<i>Thioalkalimicrobium</i>	<i>Thioalkalivibrio</i>	<i>Thioalkalispira</i>
$\mu_{m\acute{a}x}$ quimiostato ( $h^{-1}$ )	0.33	< 0.2	0.08
$Y_{X/S}$ máx (g prot / mol $S_2O_3^{2-}$ )	2 - 3	4 - 6	5.9
$qO_2$ máx (mmol $O_2$ / g prot*min)	2.5 a 5 ( $S_2O_3^{2-}$ y $S^{2-}$ )	0.3 a 0.8 ( $S_2O_3^{2-}$ y $S^{2-}$ )	0.31 ( $S_2O_3^{2-}$ ) 0.37 ( $S^{2-}$ )
$K_S$ ( $\mu M$ )	3 - 5	1 - 3	nd
Producción de azufre*	No	Si	nd
Diversidad del grupo	Homogéneo	Heterogéneo	Única especie
Tolerancia al $Na^+$ (M)	0.2 a 1.2	0.2 a 4	0.3 a 1.5
pH	7.5 a 10.6 (óptimo 9.0 – 10.0)	7.5 a 10.6 (óptimo 10.0 – 10.2)	8.0 a 10.4 (óptimo 9.5 – 10.0)
Crece en	$S^{2-}$ , $S_2O_3^{2-}$	$S^{2-}$ , $S_2O_3^{2-}$ , $SCN^-$ , $S^0$	$S^{2-}$ , $S_2O_3^{2-}$
Resistencia a la conservación	baja	alta	nd

Construida a partir de Sorokin y col., 2001a; Sorokin y col., 2002 y; Banciu y col. 2004a.

El grupo de trabajo de Sorokin y colaboradores ha aislado y purificado enzimas involucradas en la oxidación de  $HS^-$  (Sorokin y col., 1998; Sorokin y col., 1999). Así mismo han estudiado

la capacidad de *Thioalkalivibrio denitrificans* de crecer aneróticamente en condiciones de desnitrificación (Sorokin y col., 2003a), otras tres cepas fueron estudiadas por su capacidad de utilizar  $\text{CNS}^-$  (Sorokin y col., 2001b) y otro microorganismo fue estudiado por su capacidad de obtener la energía de crecimiento a partir de la oxidación de hidrógeno y/o compuestos reducidos de azufre (Sorokin y col., 2000b).

Actualmente se estudia la capacidad de la cepa *Thioalkalivibrio versutus* de oxidar  $\text{H}_2\text{S}$  en condiciones haloalcalófilas, por su alto potencial para aplicarse en un proceso biotecnológico de remoción de  $\text{HS}^-$  en corrientes gaseosas (Banciu y col., 2004a; Banciu y col., 2004b).

#### 1.4 Procesos de remoción de $\text{H}_2\text{S}$ .

El enfoque para resolver los problemas de contaminación por compuestos de azufre se ha modificado en las últimas décadas. Los procesos fisicoquímicos (que involucran absorción, adsorción, condensación, precipitación u oxidación) se usan sobre todo en corrientes con altas concentraciones de contaminantes pero conllevan altos consumos de energía y generación de contaminantes secundarios. Los procesos biotecnológicos (que se basan en la oxidación biológica del contaminante) empiezan a ser un complemento y alternativa, particularmente en corrientes con altos flujos y bajas concentraciones de contaminantes, donde los procesos fisicoquímicos son ineficientes. Los procesos biotecnológicos han cobrado cada vez mayor interés y la investigación desarrollada ha sido aplicada a procesos industriales con resultados exitosos. Aunque todavía no son usados extensivamente, son una alternativa viable. Los procesos comerciales más utilizados para la remoción  $\text{H}_2\text{S}$  del gas natural y otras corrientes de aire contaminado son los procesos de absorción con aminas y el lavado cáustico (Alcántara, 2000; Morgan, 2001).

Muchas emisiones industriales líquidas o gaseosas contienen por lo general bajas cantidades de materia orgánica pero altas concentraciones de compuestos reducidos de azufre. Por lo tanto, los sistemas son selectivos hacia bacterias quimiolitotróficas obligadas. Se han descrito métodos biotecnológicos para la remoción de sulfuro basados en el cultivo de *Thiobacillus*, bacterias por lo general acidófilas y neutrófilas, donde se usa la capacidad de éstas para oxidar parcialmente el  $\text{HS}^-$  a  $\text{S}^0$ .

Usualmente las bacterias incoloras del azufre oxidan completamente el  $\text{HS}^-$  a  $\text{SO}_4^{2-}$ , generando más energía metabólica útil en comparación con la oxidación parcial (Lens y Kuenen, 2001; Janssen y col., 2001). Para obtener de  $\text{S}^0$  como producto, la sulfuro-oxidación debe ser forzada en esta dirección, por ejemplo usando altas cargas de sulfuro o bajas concentraciones de oxígeno. La producción de azufre puede ser regulada por la dosificación estequiométrica de oxígeno o mediante el monitoreo del potencial redox.

A grandes rasgos la remoción biológica de  $\text{H}_2\text{S}$  del gas amargo se realiza por la integración de un lavador húmedo con un biorreactor para oxidar el  $\text{HS}^-$ . En el lavador, el  $\text{H}_2\text{S}$  contenido en el gas se pone en contacto con una solución un poco alcalina de lavado (pH 8-8.5). Se consume hidróxido para absorber  $\text{H}_2\text{S}$  gaseoso durante la formación de sulfuro de hidrogeno:  $\text{H}_2\text{S} + \text{OH}^- \rightarrow \text{HS}^- + \text{H}_2\text{O}$ . El líquido de lavado contiene el sulfuro disuelto, entonces va al biorreactor. En este paso biológico se forma  $\text{S}^0$ , acompañado por la regeneración de iones hidróxido:  $\text{HS}^- + 0.5 \text{O}_2 \rightarrow \text{S}^0 + \text{OH}^-$ . Es preferible la formación de  $\text{S}^0$  debido a que el efluente puede ser reutilizado como líquido de lavado para la absorción de  $\text{H}_2\text{S}$ . Comparado con el proceso convencional de lavado cáustico este conduce a la reducción del consumo de sosa en un 95%. El aire descargado del biorreactor no contiene  $\text{H}_2\text{S}$  y puede ser liberado directamente a la atmósfera (Janssen, 2001).

Lens y Kuenen reportaron en el 2001 que la producción biológica de  $S^0$  es estable y posee buenas características de sedimentación en las condiciones fisiológicamente óptimas para el crecimiento y actividad de las bacterias sulfoxidantes neutrófilas y alcalófilas (30 a 47 °C, pH de 7 a 10). Entre las bacterias alcalófilas sulfoxidantes reportadas, las cepas del género *Thioalkalimicrobium* son adecuadas para aplicarse en el tratamiento de sosas gastadas diluidas o gases contaminados por  $H_2S$  (biogas, gas natural) que son pobres en  $CO_2$ , mientras que las cepas de *Thioalkalivibrio* son adecuadas para el tratamiento de sosa gastada concentrada y gases que contienen  $CO_2$ . Mezclas de *Thioalkalimicrobium* y *Thioalkalivibrio* pueden ser usadas para el tratamiento de corrientes variables de  $H_2S$ .

Los estudios previos del grupo de investigación donde se realizó este trabajo incluyen estudios básicos de la oxidación biológica de compuestos azufrados, producción y acumulación de  $S^0$  y el desarrollo de un proceso biotecnológico para la eliminación de  $CS_2$  y  $H_2S$ , con la conversión a  $S^0$  y  $SO_4^{2-}$  (Torres y col., 1993). Se utilizó un biolavador de lecho escurrido el cual contenía una población mixta de microorganismos aislados de fuentes azufradas y plantas de tratamiento de aguas residuales. Esta población mixta de microorganismos contenía bacterias del género *Thiobacillus*. Las concentraciones de los compuestos azufrados en el aire llegaron hasta 1000 ppm de cada uno, alcanzando 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  $m^3/min$  y que llevan operando varios años.

Alcántara (1999 y 2000) estableció las condiciones de cultivo que favorecen la oxidación biológica de compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio sulfoxidante. Las condiciones halladas fueron un pH entre 5.5 y 7, una temperatura de 30°C, y para la oxidación completa a  $SO_4^{2-}$  a partir de  $S_2O_3^{2-}$  que es necesaria una concentración de oxígeno

disuelto superior o igual a 0.2 mg/L para el consorcio. Encontró que en concentraciones de  $\text{SO}_4^{2-}$  de hasta 40 g/L el consorcio puede adaptarse y mantener su actividad sulfoxidante y que la fuente de amonio presenta un efecto positivo sobre su crecimiento y la oxidación del  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . La presencia de extracto de levadura de 0.5 g/L, no presentó ningún efecto sobre la oxidación del  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  a pesar del incremento en la población bacteriana, por lo que asumió que este incremento se debió al crecimiento de organismos heterótrofos no oxidantes del  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . Estimó una tasa de dilución crítica para el consorcio cercana a  $3.4 \text{ d}^{-1}$  en concentraciones de oxígeno disuelto superiores a 0.4 g/L, donde el consorcio oxida completamente el  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  a  $\text{SO}_4^{2-}$ . Calculó el rendimiento del consorcio de 0.02 g biomasa/g  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  para una tasa de dilución de  $0.4 \text{ d}^{-1}$ . Evaluó el efecto que tienen algunos inhibidores de cadena respiratoria en el consorcio y, finalmente, dadas las características de crecimiento, propone que la ruta de oxidación más representativa para el consorcio es el sistema multienzimático de oxidación de tiosulfato (TOMES por sus siglas en inglés).

Posteriormente Velasco (2001), que trabajó con el mismo consorcio que Alcántara (2000), reportó un sistema continuo y con recirculación, que permitió maximizar la producción y recuperación de azufre elemental por medio de un módulo de aireación, separado del reactor y logró mantener condiciones de limitación de oxígeno y minimizar la turbulencia en el reactor. Sin embargo para minimizar aún más la turbulencia (que favorece la sedimentación del  $\text{S}^0$ ), se implementó un dispositivo en la parte media baja del reactor que permite la separación de dos zonas en el reactor (una sin turbulencias en la parte baja y otra con turbulencias en la parte alta). Esta configuración del sistema experimental permitió ajustar la relación molar por cargas de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  y oxígeno y aproximarla a la relación estequiométrica de 0.5, que favorece la formación del  $\text{S}^0$ . Además, debido a su escasa turbulencia se reportó la recuperación de  $\text{S}^0$  por sedimentación.

González (2002), usando el mismo sistema sulfoxidante que Velasco (2001) reportara, demostró que la oxidación biológica del  $S_2O_3^{2-}$  a  $S^0$  se favorece manteniendo condiciones micro aerobias (oxígeno disuelto  $< 0.1$  mg /L) en el sistema. El consorcio trabajado bajo estas condiciones, posee una  $\mu_{\text{máx}}$  cercana a  $0.8 \text{ d}^{-1}$  que es baja comparada con la reportada para este mismo consorcio bajo condiciones de exceso de oxígeno disuelto. Para incrementar las tasas de remoción de  $S_2O_3^{2-}$  en estas condiciones, sugiere el uso de soportes para fijar la biomasa. Mostró que el monitoreo del potencial de oxidorreducción, puede ser una herramienta útil en el conocimiento del estado del sistema, debido a que se encontró una correlación entre las concentraciones de  $S_2O_3^{2-}$ , oxígeno disuelto y pH, con el potencial de oxidorreducción. Propone un modelo matemático del sistema que predice en forma satisfactoria la concentración de  $S^0$ , presentando ligeras desviaciones en la concentración de  $SO_4^{2-}$  con relación a los datos experimentales para una serie de estados estacionarios.

## **2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS**

### **2.1 Justificación**

El incremento en las actividades industriales altera el ciclo natural del azufre provocando a su vez un desequilibrio en los ciclos del carbono y del nitrógeno. En una variedad de industrias este elemento se emite a la atmósfera en forma de diferentes compuestos contaminantes, por lo que tienen que ser removidos para disminuir el impacto negativo sobre los ecosistemas. De ésta manera el estudio y manejo del ciclo del azufre resulta de gran importancia tanto a nivel básico como de proceso con el fin de proponer alternativas de manejo de los compuestos relacionados.

En el laboratorio de Emisiones Gaseosas de la Universidad Autónoma Metropolitana donde se llevó a cabo este trabajo, se han realizado estudios de oxidación de compuestos azufrados básicamente en condiciones neutras de pH. El grupo de investigación ha desarrollado tanto investigación básica como aplicada que incluye un proceso biotecnológico para la eliminación de  $\text{CS}_2$  y  $\text{H}_2\text{S}$ , con la conversión a  $\text{S}^0$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ .

En determinados procesos industriales, los compuestos reducidos de azufre se encuentran en condiciones extremas de pH (como el  $\text{HS}^-$  en los procesos de endulzamiento del gas natural) por lo que la investigación en la oxidación de estos compuestos a valores de pH 10 por microorganismos es un tema relevante.

En este sentido, en este trabajo se propuso la obtención y caracterización de consorcios de especies microbianas con capacidad sulfoxidante en condiciones de alta alcalinidad, con el fin de integrar en el futuro, nuevas propuestas de procesos relacionados al ciclo del azufre. Se usó  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  como compuesto modelo del  $\text{HS}^-$ , por su estabilidad química y baja toxicidad.

## 2.2 Objetivo general

Obtener y caracterizar consorcios de microorganismos alcalófilos a partir de suelos alcalinos que utilicen como fuente de energía compuestos reducidos de azufre.

## 2.3 Objetivos específicos

- Establecer las condiciones de enriquecimiento de consorcios alcalófilos sulfoxidantes a partir de suelos alcalino-salinos.
- Determinar las condiciones de cultivo (pH, salinidad, sustrato) que favorecen el crecimiento y la sulfoxidación de los consorcios alcalófilos.
- Determinar los parámetros cinéticos de oxidación de los sustratos.
- Determinar los rendimientos celulares en cultivo por lote y en continuo.
- Aislar bacterias alcalófilas sulfoxidantes a partir de los consorcios enriquecidos.
- Identificar y caracterizar a los microorganismos aislados.

### 3 MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1 Medio de cultivo

El medio mineral utilizado fue el reportado por Sorokin y colaboradores (2001), que es específico para bacterias alcalófilas quimiolitotróficas sulfoxidantes (contiene  $S_2O_3^{2-}$  40 mM como donador de electrones y un amortiguador de carbonatos de pH 10.2). El medio usado está compuesto como lo describe la Tabla 3.1 y tiene una concentración total de  $Na^+$  de 0.6 M.

**Tabla 3.1** Medio mineral para bacterias alcalófilas sulfoxidantes.

<b>Base mineral</b>		<b>Solución de elementos traza *</b>	
<b>Compuesto</b>	<b>g/L</b>	<b>Compuesto</b>	<b>mg/L</b>
$Na_2CO_3$	20	EDTA	5
$NaHCO_3$	7	$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	2
$NaCl$	5	$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	100
$K_2HPO_4$	1	$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	30
<b>Soluciones estériles</b>	<b>mL/L</b>	$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	200
$KNO_3$ , 1 M, (101 g/L)	10	$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	20
$MgCl_2 \cdot 6H_2O$ , (200 g/L)	1	$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	30
Solución de elementos traza	2	$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	10
$Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$ , 2 M, (496 g/L)	20	$H_3BO_3$	300

\* El pH final de la solución de elementos traza debe de ser de 3, ajustar con solución diluida de HCl.

El amortiguador tiene la función de aportar los carbonatos necesarios que suelen predominar en las fuentes alcalinas donde se encuentran naturalmente estos microorganismos (González, 1996; Barrera, 2000), además del sodio requerido debido a la dependencia de los microorganismos alcalófilos al ion  $\text{Na}^+$  (Krulwich, 2001), asimismo permite mantener el pH estable dentro de un pequeño intervalo de variación.

El medio está formulado con cinco soluciones que se esterilizaron por separado (110 °C, durante 20 min) para evitar la precipitación de las sales. Cabe mencionar que la solución estéril de  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  no debe de almacenarse por más de dos semanas, para minimizar la oxidación química.

El medio sólido se preparó mezclando agar al 3% (p/v) estéril con medio mineral preparado al doble (2X), ambos a una temperatura de entre 45 y 50 °C para prevenir la caramelización del agar a altos valores de pH.

## 3.2 Origen de las muestras

Los consorcios se obtuvieron a partir de muestras de suelos alcalinos y del sedimento superficial de una laguna carbonatada. Las muestras tenían valores de pH entre 9 y 11 (Tabla 3.2) y eran procedentes de tres diferentes sitios alcalinos en México: de distintos puntos del exlago de Texcoco, de la planta de Sales del Bajío (que produce bicarbonato de sodio desde 1974) en Salamanca, Guanajuato y del sedimento superficial de la laguna de Cuitzeo, Michoacán.

**Tabla 3.2** Muestras usadas para enriquecimiento de bacterias alcalófilas sulfoxidantes.

<b>INOCULO</b>	<b>pH</b>	<b>Nomenclatura</b>
Exlago de Texcoco, Mex. (A)	11.0	M1
Exlago de Texcoco, Mex. (B)	11.0	M2
Exlago de Texcoco, Mex. (C)	9.8	M3
Exlago de Texcoco, Mex. (D)	9.0	M4
San Bernardino, Tex, Mex.	10.1	M5
Salamanca, Gto.	10.2	M6
Laguna de Cuitzeo frente a Huandacareo, Mich.	10.3	M7
Laguna de Cuitzeo frente a San Agustín, Mich.	10.3	M8

### 3.3 Enriquecimiento

El enriquecimiento de consorcios de bacterias alcalófilas sulfoxidantes se realizó, inoculando 1 g de muestra en 100 mL de medio mineral en matraces Erlenmeyer de 250 mL y estos se incubaron a 30 °C en un agitador rotatorio a 150 rpm. Se siguió la evolución del cultivo por la disminución del pH de la suspensión. Las condiciones selectivas de enriquecimiento fueron el pH de 10.2 y el  $S_2O_3^{2-}$  como fuente de energía.

Se realizó un primer enriquecimiento a partir de las muestras de suelos M1, M2, M3 y M4. La mezcla de los cultivos que disminuyeron el pH (M1, M2 y M3) se mezclaron para formar el consorcio denominado C1. La mezcla se realizó de la siguiente manera. El cultivo de cada muestra se centrifugó, sus precipitados se resuspendieron en 10 ml de medio mineral y la mezcla de las suspensiones formó el inóculo C1, del cual se usaron 1.5 mL para inocular un matraz de 250 mL con 100 mL de medio mineral.

Un segundo enriquecimiento se realizó a partir de las muestras M5, M6, M7 y M8. La mezcla del consorcio C1 y del los cultivos de las muestras M5, M6, M7 y M8, dieron origen al consorcio denominado C2, de la misma forma en la que se creó el consorcio C1.

La conservación del material biológico obtenido se hizo como se indica a continuación, para periodos no mayores de 2 meses se realizó en medio mineral (líquido o sólido) bajo refrigeración a 4 °C. Para periodos largos de conservación, la biomasa se concentró centrifugando el cultivo a 9000 rpm durante 20 minutos, se mezcló con una solución de glicerol al 30% y se almacenó a -20 °C.

### 3.4 Caracterización del consorcio C1

#### 3.4.1 Cultivo en lote

Se realizaron cultivos en matraces Erlenmeyer conteniendo 40% del volumen total de medio mineral. Se inocularon con 5% (v/v) de un cultivo previo (consorcio C1) con 48 horas de crecimiento. Las condiciones de cultivo fueron: incubación a 30 °C y agitación a 150 rpm.

También se realizaron cultivos por lote en un reactor Bioflo New Brunswick III de 3 L y 2.5 L volumen de trabajo, con temperatura y pH controlado a 30 °C y pH 10.0 respectivamente, se usó agitación a 300 rpm y aireación variable. Se utilizó  $S_2O_3^{2-}$  como donador de electrones en concentración de 40 mM.

#### 3.4.2 Estudios de respirometría

Se estimaron las tasas de consumo de oxígeno biológica y química, en presencia de  $S_2O_3^{2-}$  y  $HS^-$ , mediante el uso de un oxímetro YSI modelo 5300. En trabajos previos se ha

demostrado que esta técnica, denominada respirometría, es confiable y los datos reproducibles en los estudios de oxidación de los compuestos reducidos de azufre (Velasco y col., 2004). El  $O_2$  disuelto se midió cada segundo en un periodo de 4 a 12 minutos dentro de una cámara de 1500  $\mu\text{L}$  (volumen de trabajo) con agitación, a temperatura controlada de 30 °C y dentro de un intervalo de pH de 6.0 a 11.5. A todas las tasas específicas ( $qO_2$ ) presentadas se les resta la velocidad endógena y la tasa de oxidación química.

Las células usadas (consorcio C1) para cada prueba provinieron de un cultivo por lote en medio mineral líquido con tiosulfato (40 mM) y pH 10, después de que todo el  $S_2O_3^{2-}$  fue consumido (80 horas aproximadamente). Se centrifugó el cultivo a 9000 rpm durante 20 minutos, se lavaron las células dos veces y se resuspendieron en forma concentrada con amortiguador de carbonatos del medio mineral sin  $S_2O_3^{2-}$ . Las células se agregaron a la cámara en una alícuota de 100  $\mu\text{L}$ , la concentración final de proteína en la cámara fue de entre 80 – 100 mg proteína/L.

El  $S_2O_3^{2-}$  y el  $HS^-$  se agregaron en alícuotas (entre 10 a 100  $\mu\text{L}$ ) de soluciones concentradas de 1, 10 y 100 mM. El  $HS^-$  concentrado (100 mM) se preparó en una solución 0.1 M de Tris/HCl, pH 10, con EDTA 5 mM y se le burbujeó  $N_2$  dentro una botella serológica para reducir la auto oxidación (Sorokin y col., 2001).

La tasa específica de consumo de oxígeno ( $qO_2$ ) se estimó a partir de la pendiente máxima que se obtuvo por linealización para cada experimento. La pendiente con unidades de permiles por minuto ( $\text{‰}/\text{min}$ ) fue convertida a unidades de mmoles  $O_2/\text{mg}$  proteína\*min. Cada pendiente se dividió entre 1000, se multiplicó por la solubilidad del  $O_2$  (aire 21%  $O_2$ ) en agua a 30 °C y una atmósfera, posteriormente por la densidad y se corrigió de acuerdo a la temperatura y la altitud. Finalmente se dividió entre la concentración final de proteína en la cámara para los casos bióticos.

% <sub>o</sub>		5.48 mL O <sub>2</sub>	0.045 mmoles O <sub>2</sub>	273 K	0.77 atm	L	=	mmoles O <sub>2</sub>
min	1000	L * atm	mL	303 K		mg prot		mg prot * min

La respiración endógena se estimó midiendo la  $qO_2$  de una alícuota de células en amortiguador de carbonatos pH 10.0 en ausencia de sustrato. Para medir la oxidación química de los sustratos se evaluó la velocidad volumétrica de consumo de O<sub>2</sub> ( $dO_2/dt$ ) usando solo S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> o HS<sup>-</sup> (1 y 10 mM) en amortiguador sin células.

La tasa específica máxima de consumo de O<sub>2</sub> ( $qO_{2\text{ máx}}$ ) y la constante de afinidad aparente por el sustrato ( $K_S$ ) para S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> y HS<sup>-</sup>, se evaluaron en un intervalo de concentraciones entre 0.01 a 0.3 mM. Los resultados fueron ajustados por el modelo de Monod ( $V=V_{\text{máx}}*S/K_S+S$ ), para el HS<sup>-</sup> se utilizó también el modelo de Monod con inhibición por sustrato ( $V=V_{\text{máx}}*S/(K_I*[S]+1)*K_S+S$ ). Se usó la herramienta SOLVER del programa Microsoft Excel, para estimar los parámetros cinéticos de oxidación  $qO_{2\text{ máx}}$  y  $K_S$ .

Se evaluó la tasa de consumo de oxígeno ( $qO_2$ ) en valores de pH entre 6 a 11.5, tanto en presencia de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> como de HS<sup>-</sup>, en una concentración de 1 mM. En este estudio el concentrado de células se diluyó 5 veces dos horas antes para su adaptación en el amortiguador que iba a probarse. Los amortiguadores empleados contenían una concentración total de Na<sup>+</sup> 0.6 M. Para el pH de 6.0 y 7.0 se usaron amortiguadores de fosfatos y para valores de pH entre 8.0 – 11.5 se usaron amortiguadores de CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>.

### 3.4.3 Cultivo en continuo

Se usó un reactor Bioflo New Brunswick III de 3 L y 2.5 L volumen de trabajo, con temperatura y pH controlado a 30 °C y pH 10.0 respectivamente, se usó agitación a 300 rpm y aireación 1 vvm. Se utilizó S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> como donador de electrones en concentraciones de 80 y 40 mM, con un tiempo de retención hidráulica (TRH) de 3.

### 3.5 Aislamiento de cepas

El aislamiento de bacterias alcalófilas sulfoxidantes a partir del consorcio C1, se realizó por diluciones del cultivo, en medio mineral. Las diluciones (1:100, 1:1,000 y 1:10,000) se sembraron en placas y se incubaron a 30 °C durante un periodo de entre 5 y 7 días.

#### 3.5.1 Caracterización de las cepas

Se realizaron cinéticas de crecimiento en cultivo por lotes de las cepas AA y AB, con el fin de evaluar su comportamiento (crecimiento, consumo de  $S_2O_3^{2-}$  y producción de  $SO_4^{2-}$ ), en matraces Erlenmeyer conteniendo 40% del volumen total de medio mineral. El inóculo consistió en el 5% (v/v) de un cultivo previo con 48 horas de crecimiento. Las condiciones de cultivo fueron: incubación a 30 °C y agitación a 150 rpm. La conservación de las cepas aisladas se realizó como se indica previamente para los consorcios tanto en medio mineral a 4° C como en glicerol a -20° C.

Para los estudios de tolerancia a la salinidad se realizaron cultivos por lote en donde se probó el medio mineral en ausencia de NaCl y adicionado con hasta 200 g NaCl/L, lo que equivale a concentraciones totales de ion  $Na^+$  de entre 0.5 a 4.0 M. Se midió la producción de  $SO_4^{2-}$  y proteína por los aislados después de 72 horas de cultivo.

### 3.5.2 Amplificación y secuenciación del fragmento 16S ARNr

El estudio filogenético de las cepas aisladas en este trabajo, lo realizó Laurence Casalot, del Instituto de Investigación para el Desarrollo (IRD por sus siglas en francés). El protocolo usado fue el siguiente.

El ADN genómico se extrajo a partir de 4 mL de cultivo de las cepas aisladas con el kit Wizard Genomic ADN Purification (Promega). Las células se pretrataron con lisosimas por 30 minutos con la finalidad de incrementar la eficiencia de la lisis alcalina (1.2 mg/mL). Los genes del fragmento 16S ARNr se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR por sus siglas en inglés) utilizando iniciadores universales de eubacterias Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG- 3') y R6 (5'-TACGGCTACCTTGTTACG- 3'), que permitieron la amplificación de casi todo el gen. Las condiciones de amplificación fueron las siguientes: 96 °C por 2 min, 40 ciclos de 30s a 96 °C, 30s a 50 °C, 2 min a 72 °C y una extensión final de 7 min a 72 °C. Los productos de PCR de las cepas se clonaron en un vector PGEM-T Easy vector (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Después de la transformación, los clones recombinantes que contienen un inserto de la longitud correcta fueron seleccionados por amplificación directa de PCR utilizando los oligonucleótidos universales T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') y Sp6 (5'-ATTTAGGTGACACTATAG-3'), iniciadores específicos para el plásmido. Los clones seleccionados se secuenciaron (Genome Express, Grenoble, France). Las secuencias se alinearon utilizando Ribosomal Database Project (<http://rdp.cme.msu.edu/html>) y se analizaron utilizando BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit.html>). Las secuencias se verificaron manualmente y se construyeron los árboles filogenéticos 100-bootstrapped con 1318 y 1113 pb no ambiguas, para las cepas AA y BB respectivamente, utilizando Treecon (<http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/evolve/draw/treecon>).

## 3.6 Métodos analíticos

### 3.6.1 Cuantificación de biomasa

La biomasa se estimó indirectamente por su contenido de proteína. Esta se cuantificó por el método colorimétrico DC Protein Assay de BIO RAD, que esta basado en el método de Lowry (1951). El fundamento de ambos es la reacción de la proteína con el tartrato de cobre en medio alcalino y la subsiguiente reducción del reactivo de Folin por el complejo tartrato de cobre-proteína, produciéndose el característico color azul, que posee un máximo de absorbancia a 750 nm.

Procedimiento: Centrifugar 1 mL de muestra a 9000 rpm durante 20 minutos, desechar el sobrenadante para eliminar la interferencia de los compuestos solubles, agregar 1 mL de NaOH 0.2 N a la pastilla, agitar, calentar en agua hirviendo durante 10 minutos, enfriar los tubos en hielo; tomar 200  $\mu$ L de muestra, agregar 100  $\mu$ L de reactivo A, agitar, añadir 800  $\mu$ L del reactivo B, agitar y esperar 15 minutos, leer absorbancia a 750 nm, usar un blanco de agua, tratado de la misma manera. Correlacionar con una curva patrón de albúmina bovina de 50 a 250 mg/L. Para las muestras que contienen  $S^0$  extraerlo de la pastilla con acetona durante toda una noche, antes del tratamiento con NaOH (Banciu y col., 2004a).

### 3.6.2 Cuantificación de sulfatos

Se utilizó un método turbidimétrico que se basa en precipitar el ion sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) con cloruro de bario en medio ácido. Se lee la absorbancia de la muestra tratada en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 420 nm y se correlaciona con una curva patrón de  $NaSO_4$  anhidro de 0-40 mg/L.

Soluciones: Para la mezcla de reacción, mezclar 50 mL de glicerol con una solución que contenga 30 mL de HCl concentrado, 300 mL de agua destilada, 100 mL de alcohol isopropílico o etílico al 95 % y 75 g de NaCl. Para la solución estándar de sulfato (100 mg/L), disolver 147.9 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro en 1000 mL de agua destilada.

Procedimiento: Colocar 100 mL de muestra diluida (1:100) en un matraz Erlenmeyer de 250 mL. Agregar 5 mL de mezcla de reacción. Agitar durante 1 min. Mientras la solución está agitándose, añadir una cucharada de cloruro de bario. Leer la absorbancia a 420 nm, durante los primeros cuatro minutos en intervalos de 30 segundos. Tomar la lectura de absorbancia que sea mayor y leer en la curva estándar. Corregir por el factor de dilución.

### 3.6.3 Cuantificación de $\text{SO}_4^{2-}$ y $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$

El contenido de los iones  $\text{SO}_4^{2-}$  y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  se determinó por electroforesis capilar en un equipo Waters Capillary Ion Analyzer (Milford, USA), se usó un capilar de 75  $\mu\text{m}$  de diámetro y 60 cm de longitud; empleándose un electrolito de cromato. Las muestras se centrifugaron a 9000 rpm durante 20 minutos. Se usó el sobrenadante, diluido (1:25) con agua destilada y desionizada, y filtrado por una membrana de 0.2  $\mu\text{m}$ .

## 3.7 Análisis cinético

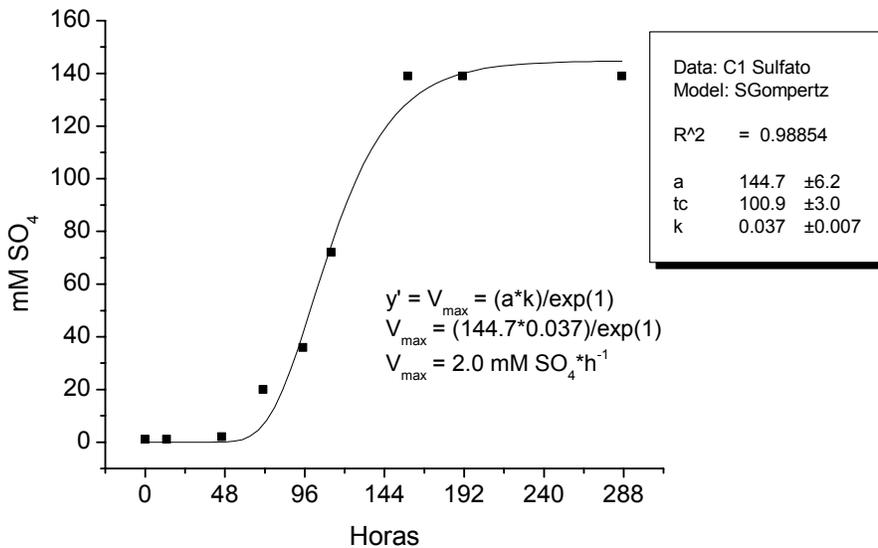
Las cinéticas de cultivo tanto para los consorcios y las cepas puras se realizaron midiendo a intervalos de tiempo de entre 6 a 24 horas, el valor de pH, la densidad óptica (540 nm) de la suspensión, la concentración de proteína y de los aniones  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  y  $\text{SO}_4^{2-}$ . Se estimaron rendimientos de crecimiento en tiosulfato ( $Y_{X/S} = [\text{mg proteína}/\text{mmoles } \text{S}_2\text{O}_3^{2-}]$ ), velocidades

específicas de crecimiento ( $\mu = [1/h]$ ) y velocidades volumétricas máximas de consumo de  $S_2O_3^{2-}$  ( $r_S = [mmoles S_2O_3^{2-}/L \cdot h]$ ) y producción de  $SO_4^{2-}$  ( $r_P = [mmoles SO_4^{2-}/L \cdot h]$ ).

Los  $Y_{X/S}$  se estimaron usando la concentración de proteína cuando todo el  $S_2O_3^{2-}$  se había consumido ( $Y_{X/S} = (X-X_0)/(S_0-S)$ ).

La  $\mu$  fue estimada por medio de la linealización del logaritmo natural de las concentraciones de proteína en la fase exponencial ( $\ln(X/X_0) = \mu \cdot t$ ).

Las velocidades volumétricas  $r_S$  y  $r_P$  se calcularon mediante el ajuste del modelo de Gompertz (Acuña, 1999). Se usó el programa Microcoal Origin 6.0 que ajusta la serie de datos a la ecuación ( $y = a \cdot \exp(-\exp(-k \cdot (t - t_c)))$ ), para obtener los parámetros  $a$ ,  $k$  y  $t_c$ , donde ( $a$ ) es la concentración máxima, ( $k$ ) es un coeficiente que tiene unidades de  $h^{-1}$  y ( $t_c$ ) corresponde al tiempo donde sucede la velocidad máxima. Estos parámetros al evaluarse en la primera derivada de la ecuación del modelo ( $y' = a \cdot k / \exp(1)$ ), estiman la velocidad máxima. Como lo muestra el ejemplo en la Figura 3.1.



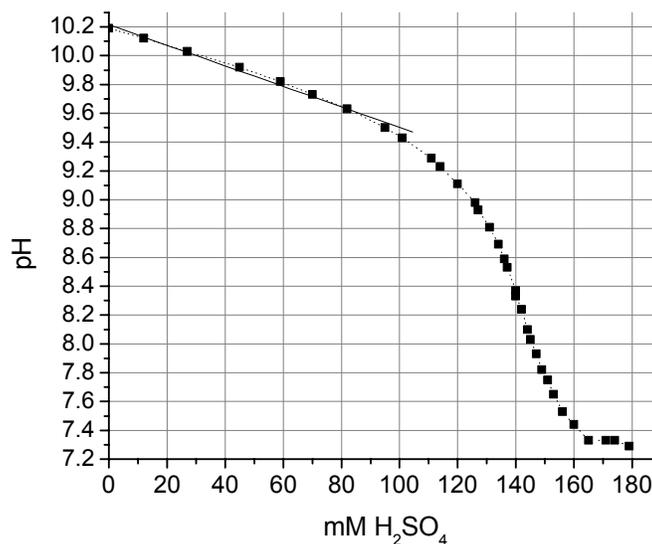
**Figura 3.1** Ejemplo de una serie de datos y el ajuste del modelo de Gompertz.

## 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 Cultivo de microorganismos en condiciones de pH extremo.

#### 4.1.1 Capacidad amortiguadora del medio mineral.

El medio mineral descrito en materiales y métodos tiene en su composición  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (20 g/L) y  $\text{NaHCO}_3$  (7 g/L), compuestos que le confieren la propiedad amortiguadora que se evaluó experimentalmente con el fin de estudiar su comportamiento ante la producción de ácido sulfúrico, producto final de la oxidación de tiosulfato llevada a cabo por los microorganismos sulfoxidantes. Los resultados se presentan a continuación (Figura 4.1).



**Figura 4.1** Titulación del medio mineral con  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .

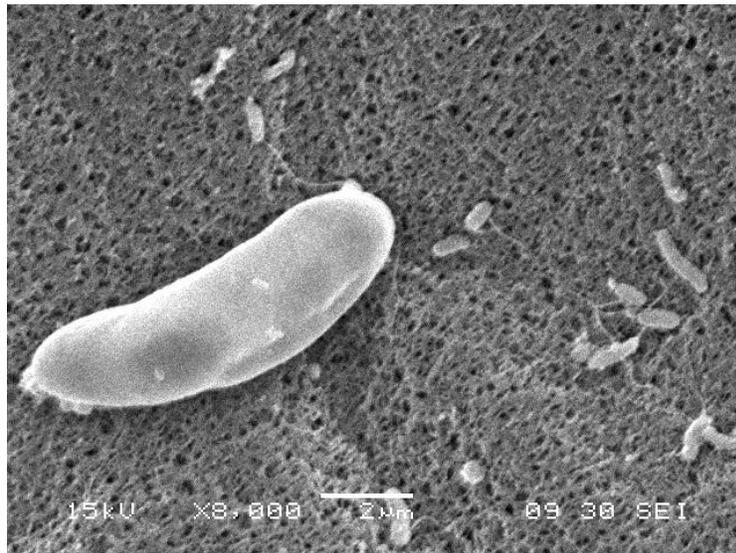
De acuerdo a la figura, la evolución del pH en el intervalo de concentraciones de 0 a 95 mM de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  tiene un comportamiento lineal que corresponde a:  $y = -0.0071x + 10.22$  ( $R^2 = 0.99$ ). Este cálculo permitió predecir la concentración de  $\text{SO}_4^{2-}$  a partir del valor de pH del

medio. La disminución del pH a 9.6 equivale a 80 mmoles de  $\text{SO}_4^{2-}$  que se producen al oxidarse completamente 40 mmoles de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  alimentado, de acuerdo a la ecuación estequiométrica:  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + 2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{SO}_4^{2-}$ .

#### 4.1.2 Contaminación con protozoarios

La presencia de protozoarios, que son organismos unicelulares heterotróficos es común y ha sido reportada en la literatura (Koneman y col., 1999). La desventaja de su crecimiento en un medio mineral sin fuente de carbono orgánico, es que estos organismos pueden crecer a expensas de otros organismos como la bacterias.

Durante las transferencias consecutivas del consorcio C1 en medio mineral con la intención de obtener un cultivo libre de restos de suelo, se observó la presencia de protozoarios (Figura 4.2), con un tamaño aproximado de 8 a 10  $\mu\text{m}$  de largo y 2 a 3  $\mu\text{m}$  de ancho, que provocaron la disminución de la población y la producción de  $\text{SO}_4^{2-}$ , comúnmente observada.



**Figura 4.2** Microfotografía del cultivo del consorcio C1 contaminado con protozoarios.

Se utilizaron tres metodologías para el control de los protozoarios: uso de metronidazol, cultivo en continuo a altas tasas de dilución para lavarlos y filtración. Los resultados fueron los siguientes:

El uso de metronidazol (SIGMA, reactivo analítico) permitió el control del crecimiento de los protozoarios más no su eliminación, debido a la posible formación de quistes (Koneman y col., 1999) e inclusive se observó que afectó la capacidad sufoxidante de las muestras (Tabla 4.1). El compuesto se adicionó al medio mineral cuando se apreció la presencia de protozoarios, en una concentración de 1 g/L. La tabla muestra el valor de pH del medio mineral adicionado con metronidazol después de seis días de cultivo de las muestras M5, M6, M7 y M8. Se observa que la producción de  $\text{SO}_4^{2-}$  fue de un 40% de lo esperado teóricamente (80 mmoles  $\text{SO}_4^{2-}$ /L) para las muestras M5 y M6, en cambio las muestras M7 y M8 procedentes de la laguna de Cuitzeo, presentaron resistencia al inhibidor de protozoarios.

**Tabla 4.1** Efecto del metronidazol después de seis días de cultivo.

Medio mineral + metronidazol		
Muestra	pH	mmoles $\text{SO}_4^{2-}$ *
M5	10.03	27
M6	10.01	30
M7	9.71	72
M8	9.69	75

\* Producción de  $\text{SO}_4$  estimada a partir del cambio del pH inicial.

El cultivo en continuo permitió el control del crecimiento de los organismos heterotróficos al incrementar la tasa de dilución del sistema (hasta  $0.16 \text{ d}^{-1}$ ). La diferencia de las velocidades

de crecimiento permitió la selección de los consorcios microbianos, sin embargo al evaluar tasas de dilución menores ( $0.042 \text{ d}^{-1}$ ), el cultivo volvió a contaminarse.

Finalmente el uso de un medio físico (filtración) mostró ser el método más eficaz para la eliminación de los protozoarios. En la literatura se reporta que el tamaño de los estos organismos difiere entre 4 y 60  $\mu\text{m}$  en promedio, muchos de los cuales tienen la capacidad de producir quistes que varían entre 4 a 20  $\mu\text{m}$ , algunos de ellos es posible encontrarlos en condiciones alcalinas (Koneman y col., 1999). A partir de lo anterior se utilizaron filtros de fibra de vidrio con un tamaño de poro de 1.2  $\mu\text{m}$  por los que se hizo pasar la suspensión de cultivo y se observaron resultados satisfactorios en la eliminación de los protozoarios.

#### 4.1.3 Medio sólido para el cultivo de bacterias sulfoxidantes alcalófilas

El cultivo en placa y aislamiento de cepas de microorganismos quimiolitotróficos es particularmente difícil de realizar debido a sus características de crecimiento. Los trabajos de Jhonson y col. (1995) 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. En trabajos previos se ha reportado que los organismos quimiolitotróficos crecieron utilizando goma gellan (1%) y no en agar bacteriológico, como agentes gelificantes.

Sin embargo en este trabajo se utilizó agar bacteriológico como agente gelificante de acuerdo al trabajo de Sorokin (2001). La particularidad fue que el medio sólido se preparó mezclando agar al 3% (p/v) estéril con medio mineral preparado al doble (2X), ambos a una temperatura de entre 45 y 50 °C para prevenir la caramelización del agar a altos valores de

pH. Los resultados mostraron que algunas especies de microorganismos alcalófilos sulfoxidantes pueden crecer en este medio de cultivo sólido. Esto puede indicar una menor susceptibilidad a los compuestos orgánicos que en el caso de los quimiolitótrofos de pH neutro.

#### 4.1.4 Oxidación química y biológica de $S_2O_3^{2-}$ y $HS^-$ en condiciones alcalinas

Por respirometría se comprobó que la actividad de las bacterias predominaba frente a la oxidación química. Para este estudio se usaron controles químicos para determinar la velocidad de consumo de  $O_2$  para cada uno de los sustratos usados. La Tabla 4.2 muestra la relativa estabilidad química de una solución de  $S_2O_3^{2-}$  que permanece constante a concentraciones de 1 y 10 mM (1.9  $\mu$ moles  $O_2/L \cdot \text{min}$ ), en cambio la oxidación química del  $HS^-$  a una concentración de 1 mM es de 2.1  $\mu$ moles  $O_2/L \cdot \text{min}$  y aumenta en un 60% cuando la concentración de  $HS^-$  es de 10 mM (5.4  $\mu$ moles  $O_2/L \cdot \text{min}$ ). Se observó que la respiración endógena es significativamente mayor a la oxidación química.

**Tabla 4.2** Velocidades de consumo de  $O_2$  por respiración endógena y controles químicos.

Respiración endógena		92 $\mu$ moles $O_2$ / g proteína * min (promedio)
Controles químicos		
$S_2O_3^{2-}$	1 mM	2 $\mu$ moles $O_2$ / L * min
	10 mM	2 $\mu$ moles $O_2$ / L * min
$HS^-$	1 mM	2 $\mu$ moles $O_2$ / L * min
	10 mM	5 $\mu$ moles $O_2$ / L * min

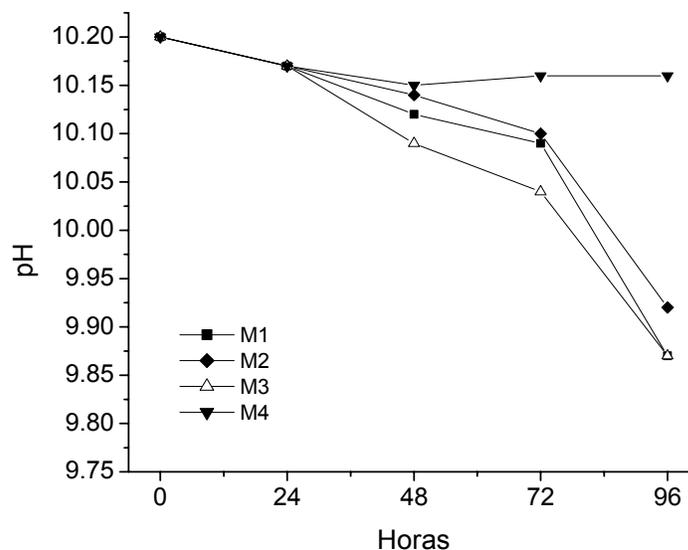
## 4.2 Consorcios alcalófilos sulfoxidantes.

A partir de 8 muestras de suelos alcalinos provenientes de distintos sitios de México, se realizó el enriquecimiento de los consorcios sulfoxidantes. El pH de los suelos utilizados se muestra en el apartado de materiales y métodos. Para el enriquecimiento, se usaron matraces Erlenmeyer de 250 mL llenados al 40% con medio mineral a los cuales se les agregó 1 g de suelo, se incubaron a una temperatura de 30° C y agitación a 150 rpm.

### 4.2.1 Obtención de consorcios

#### 4.2.1.1 Enriquecimiento de las muestras M1, M2, M3 y M4

En una primera etapa del enriquecimiento de los consorcios se determinó la variación de pH respecto al tiempo, dato que se utilizó como un indicador indirecto del crecimiento de los consorcios sulfoxidantes, ya que está asociado a la producción de  $H_2SO_4$ .



**Figura 4.3** Comportamiento del pH durante el enriquecimiento.

Durante el enriquecimiento de las muestras M1, M2, M3 y M4, se observó que en un lapso de 96 horas el pH disminuyó de un valor de 10.2 a 9.85, cambio que equivale a la producción de 50 mmoles de  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$ , como puede apreciarse en la Figura 4.3 y la Tabla 4.3. La formación de precipitados blanquecinos sugiere que las muestras M1, M2 y M3 poseen la capacidad de oxidar parcialmente el  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  alimentado a  $\text{S}^0$ .

**Tabla 4.3** Producción  $\text{SO}_4^{2-}$  estimada a partir del cambio de pH.

Horas	mmoles $\text{SO}_4^{2-}$			
	M1	M2	M3	M4
0	0	0	0	0
24	8	8	8	8
48	15	12	19	10
72	19	17	26	9
96	50	43	50	9

En una segunda etapa del enriquecimiento y mediante resiembras sucesivas, las muestras que disminuyeron significativamente el pH (M1, M2 y M3), se fueron depurando de los residuos de suelo hasta obtener los consorcios microbianos. La presencia de microorganismos alcalófilos sulfoxidantes antes sugerida por la disminución del pH y en consecuencia la formación de sulfatos se confirmó por observaciones macro y microscópicas. Por otra parte se apreció un color rosado de los precipitados al centrifugar la suspensión, característica de los microorganismos sulfoxidantes por su alto contenido de citocromos (Kelly y col., 1997). Posteriormente, al realizar la tinción se observó que son bacterias Gram negativas, lo cual coincide con lo reportado por Sorokin y colaboradores (2001a).

Los cultivos de las muestras M1, M2 y M3 se usaron para formar el consorcio denominado C1 como se detalla en el capítulo de material y métodos. Posteriormente se describe su comportamiento.

#### 4.2.1.2 Enriquecimiento de las muestras M5, M6, M7 y M8.

A partir de nuevas muestras de suelos alcalinos se inició el enriquecimiento y aislamiento de nuevos consorcios sulfoxidantes, las muestras utilizadas tuvieron un pH mayor de 10.0. Su comportamiento se comparó con el con el consorcio denominado C1. Los resultados se presentan en la Tabla 4.4. Como se observa, las cuatro muestras disminuyeron el pH en un periodo de tiempo de seis días de un valor inicial de 10.2 a un promedio de 9.73. La producción de sulfato correspondió a un promedio de 70 mmoles  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}$ .

**Tabla 4.4** Segundo enriquecimiento, pH y  $\text{SO}_4$  después de 6 días de cultivo. El pH inicial de 10.2.

Muestra	pH	* mmoles $\text{SO}_4^{2-} / \text{L}$
M5	9.73	70
M6	9.75	67
M7	9.71	72
M8	9.74	68
C1	9.68	77

\* Producción de  $\text{SO}_4$  estimada a partir del cambio del pH inicial.

Posteriormente se realizaron cinéticas de oxidación de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , donde se determinaron experimentalmente la oxidación del sustrato y la producción de  $\text{SO}_4^{2-}$  respecto al tiempo (96 horas de cultivo). Los resultados se presentan en la Tabla 4.5. La velocidades volumétricas máximas de producción  $\text{SO}_4^{2-}$  ( $r_p$ ) estimadas demostraron que la muestra M6 presentó el valor más alto de velocidad volumétrica entre las muestras enriquecidas (2.56 mmoles  $\text{SO}_4^{2-}$

L\*h), mientras que el valor más bajo fue el de la muestra M8 (1.27 mmoles  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}\cdot\text{h}$ ). Cuando se compararon los datos con el consorcio C1, se encontró que este tuvo una velocidad mayor (3.06 mmoles  $\text{SO}_4^{2-}/\text{L}\cdot\text{h}$ ) que para el resto de las muestras y se atribuye a la adaptación previa.

Estas cuatro muestras enriquecidas (M5, M6, M7 y M8) muestran al igual que las anteriores (M1, M2 y M3) que están compuestas principalmente por bacterias Gram negativas, con un alto contenido de citocromos (precipitado rosado) y mostraron capacidad sulfooxidante. Se observó la formación de precipitados blanquecinos que sugieren la generación de  $\text{S}^0$ .

La mezcla del consorcio C1 y las muestras de suelos M5, M6, M7 y M8, dieron origen al consorcio denominado C2, de la misma forma en la que se obtuvo el consorcio C1.

**Tabla 4.5** Velocidades volumétricas ( $r_p$ ) de las muestras enriquecidas y de C1.

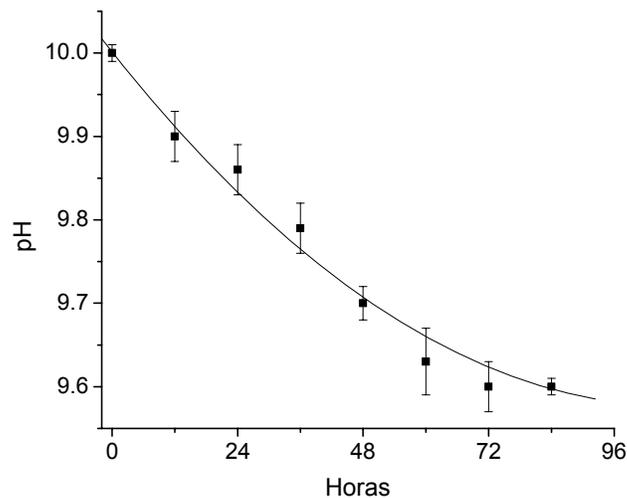
Muestra	$r_p$ (mmoles $\text{SO}_4^{2-} / \text{L}\cdot\text{h}$ )	$t_c$ (h)
M5	1.86	43
M6	2.56	49
M7	1.41	57
M8	1.27	62
C1	3.06	44

#### 4.2.1.3 Consorcio C1

Como se mencionó anteriormente, a partir de las muestras de suelos M1, M2 y M3 se creó el consorcio denominado C1. Su cultivo se realizó en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 40% de volumen de llenado y un inóculo con el 5% de un cultivo anterior. Se siguió la producción

de sulfatos a partir del cambio del pH del medio durante 96 horas de cultivo. Los resultados se presentan en la Figura 4.4.

Como se muestra en la figura el pH disminuyó a 9.6 en un tiempo de 72 horas que equivale a la oxidación completa del  $S_2O_3^{2-}$  (40 mM) a  $SO_4^{2-}$  (80 mM). Este comportamiento se observó durante un periodo de 1 mes antes de su conservación en glicerol.



**Figura 4.4** Comportamiento del pH durante el cultivo del consorcio C1.

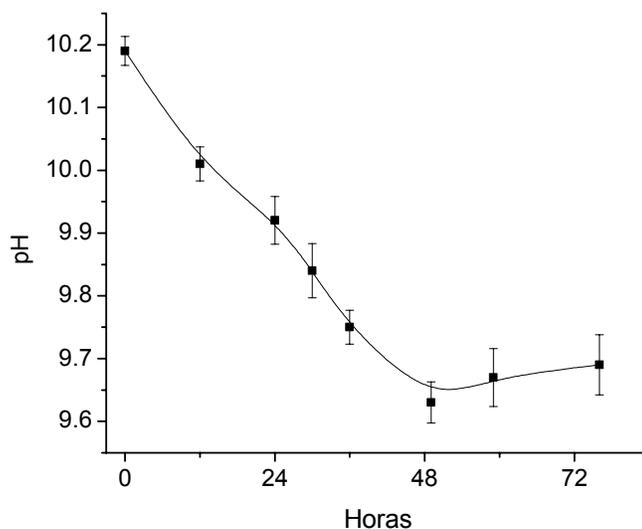
#### 4.2.1.4 Consorcio C2

A partir de la mezcla del consorcio C1 y las muestras de suelos M5, M6, M7 y M8 se creó el consorcio denominado C2. Se estimó su crecimiento determinando la producción de sulfatos a partir del cambio del pH del medio. Los resultados se presentan en la Figura 4.5.

Como se muestra en la figura el pH disminuyó a 9.63 en un tiempo de 48 horas que equivale a la oxidación completa del  $S_2O_3^{2-}$  (40 mM) a  $SO_4^{2-}$  (80 mM). Estos datos sugieren que la velocidad de crecimiento de C2 es mayor que para el consorcio C1.

De igual manera este consorcio se conservó en glicerol después de observarse un comportamiento estable durante un mes de reinoculaciones.

Actualmente se está estudiando el crecimiento y la oxidación del  $\text{HS}^-$  de este consorcio en cultivo en continuo por otro de los miembros de este grupo de investigación.



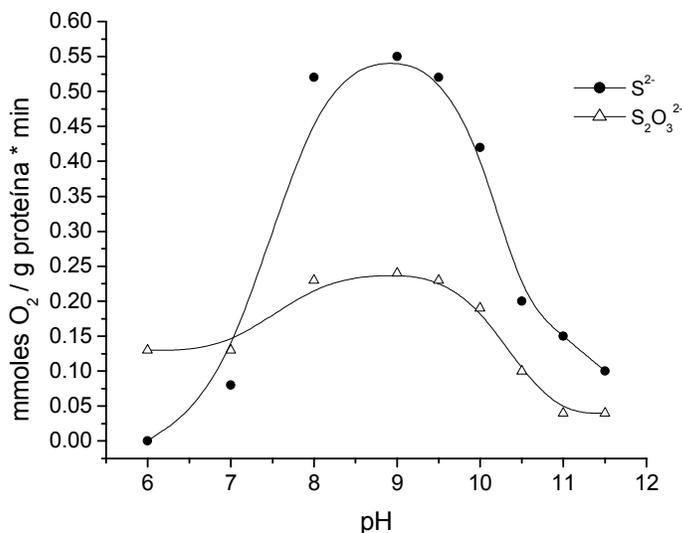
**Figura 4.5** Comportamiento del pH durante el cultivo del consorcio C2.

#### 4.2.2 Caracterización del consorcio C1 en cultivo por lote

El consorcio C1 originado de la mezcla de las muestras M1, M2 y M3, está constituido por bacterias Gram negativas sulfoxidantes, que obtienen su energía de crecimiento a partir de la oxidación del  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ . La principal condición de cultivo (pH, para los fines de este trabajo) y los parámetros cinéticos de oxidación se determinaron como parte de la caracterización del consorcio. Para ello se realizaron tanto cinéticas de crecimiento como estudios de respirometría. Los resultados se describen a continuación.

#### 4.2.2.1 Efecto del pH sobre la tasa de consumo de oxígeno

El efecto del pH sobre la capacidad de oxidar el sustrato ( $S_2O_3^{2-}$  o  $HS^-$ ) por el consorcio C1 se estudió determinando las tasas específicas de consumo de oxígeno ( $qO_2$ ) a distintos valores de pH a partir de estudios de respirometría. Se evaluaron valores crecientes de pH en un intervalo de 6 hasta 11.5. Se analizó el efecto del  $S_2O_3^{2-}$  y  $HS^-$  en una concentración de 1 mM y los datos obtenidos se presentan en la Figura 4.6.



**Figura 4.6** Efecto del pH en la tasa específica de consumo de oxígeno de C1

Como se observa en la figura tanto para el  $HS^-$  como para el  $S_2O_3^{2-}$  la tasa de consumo de oxígeno más alta se encontró en un pH de 9.0. A este pH la actividad para el  $HS^-$  fue de 0.55  $mmol O_2 / g \text{ proteína} \cdot \text{min}$  y para el  $S_2O_3^{2-}$  fue de 0.24  $mmol O_2 / g \text{ proteína} \cdot \text{min}$ . Sin embargo, no existe una clara diferencia para los valores de pH de 8, 9, 9.5 y 10 para el caso del  $S_2O_3^{2-}$ . En el caso de la oxidación de  $HS^-$  en valores de pH de 8, 9 y 9.5 tampoco se encuentra una diferencia evidente.

Estudios realizados por Sorokin y col., (2000a) muestran que los tres géneros de bacterias alcalófilas sulfoxidantes tienen un intervalo óptimo de actividad dentro de los valores 9.0 a 10.2. Como se aprecia en la introducción la tasa  $q_{O_{2max}}$  para cualquiera de los dos sustratos  $S_2O_3^{2-}$  o  $HS^-$  es de 2.5 a 5  $mmolO_2/g$  proteína\*min en las cepas del género *Thioalkalimicrobium* y de 0.3 a 0.8  $mmolO_2/g$  proteína\*min en las del género *Thioalkalivibrio* (Banciu y col., 2004a).

La tasa  $q_{O_2}$  estimada para el consorcio C1 en el valor de pH de 9, en presencia de los sustratos  $S_2O_3^{2-}$  y  $HS^-$  representa entre el 10% y el 20% de lo reportado para las cepas del género *Thioalkalimicrobium*, mientras que equivale al 69% del valor más alto reportado para las cepas del género *Thioalkalivibrio*.

#### 4.2.2.2 Parámetros cinéticos de oxidación

Se determinaron los parámetros cinéticos de oxidación  $q_{O_{2max}}$  y  $K_S$  tanto para  $HS^-$  como para  $S_2O_3^{2-}$  mediante pruebas de respirometría. Se utilizaron concentraciones crecientes de  $S_2O_3^{2-}$  y  $HS^-$  en un intervalo de 0 a 0.5 mM. Los resultados fueron ajustados por el modelo de Monod.

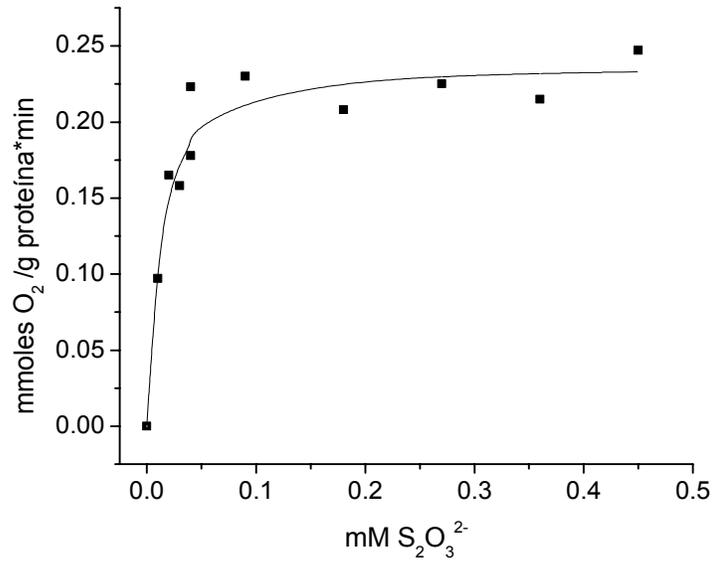
Se observa en la Figura 4.7, que al incrementar la concentración de  $S_2O_3^{2-}$  en el intervalo de 0 a 0.3 mM, la tasas de consumo de oxígeno ( $q_{O_2}$ ) tienen un comportamiento de orden 1. Al incrementar la concentración de 0.3 a 5 mM, la tasas se mantienen constantes (reacción de orden cero), debido a la saturación del sistema enzimático. La velocidad máxima de oxidación ( $q_{O_{2max}}$ ) fue de 0.23  $mmol O_2/g$  proteína\*min. Por la estequiometría de la reacción ( $S_2O_3^{2-} + 2 O_2 + H_2O \rightarrow 2H_2SO_4$ ) se tiene que este valor equivale a 0.42  $mmol S_2O_3^{2-}/g$  proteína\*min. Por otra parte la constante de afinidad ( $K_S$ ) para el tiosulfato fue de 10  $\mu M$ .

En la Figura 4.8 se presentan las tasas específicas de consumo de oxígeno utilizando concentraciones de  $\text{HS}^-$  entre 0 y 3 mM. y el ajuste de las tasas al modelo de Monod con inhibición por sustrato, que considera un factor de inhibición. Como se ha reportado en la literatura, el  $\text{HS}^-$  es un inhibidor del crecimiento celular (O'Flaherty y Colleran, 2000). Los resultados indican que al aumentar la concentración de 0 a 0.3 mM, el comportamiento es de orden 1. Mientras que la concentración de 0.3 a 1.5 la reacción es de orden cero. Finalmente una concentración mayor a 1.5 se presenta un efecto inhibitorio de la oxidación. La  $q_{\text{O}_2\text{max}}$  fue de 0.51  $\text{mmolO}_2/\text{g proteína}\cdot\text{min}$ . lo que equivale a 0.3  $\text{mmol HS}^-/\text{g proteína}\cdot\text{min}$ , de acuerdo a la estequiometría de reacción. La  $K_S$  fue de 22  $\mu\text{M}$ .

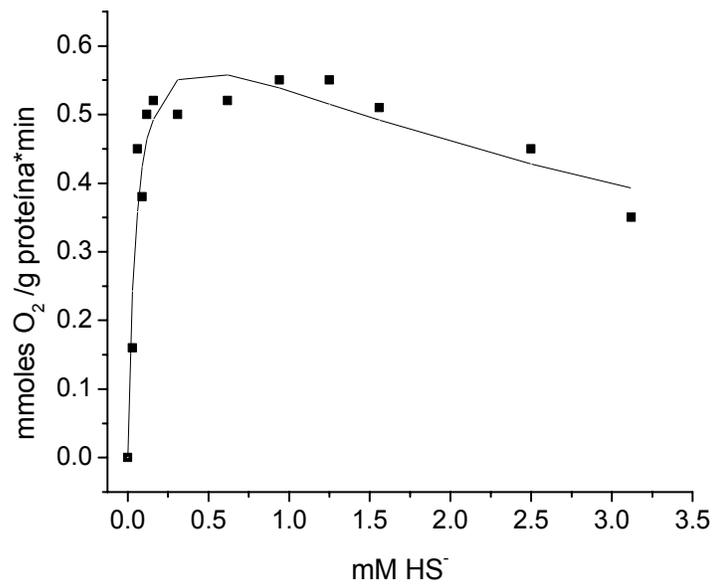
Como se ha mencionado para las cepas del género *Thioalkalimicrobium* y *Thioalkalivibrio* en presencia de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  o  $\text{HS}^-$ , la tasa  $q_{\text{O}_2\text{max}}$  es de 2.5 a 5  $\text{mmolO}_2/\text{g proteína}\cdot\text{min}$  para las primeras y de 0.3 a 0.8  $\text{mmolO}_2/\text{g proteína}\cdot\text{min}$  en las segundas, y la constante de afinidad ( $K_S$ ) para los géneros mencionados tiene valores que van de 3 a 5 y de 1 a 3  $\mu\text{M}$  respectivamente (Banciu y col., 2004a). En la literatura se encuentra que para microorganismos quimiolitótrofos sulfoxidantes de pH neutro, se ha reportado un intervalo de velocidades de oxidación del  $\text{HS}^-$  entre 0.03 a 1.86  $\text{mmoles HS}^-/\text{g proteína}\cdot\text{min}$ . (Takashima y col., 2000). Para un consorcio sulfoxidante adaptado a la oxidación de  $\text{HS}^-$  se obtuvo una velocidad de 0.4  $\text{mmoles HS}^-/\text{g proteína}\cdot\text{min}$ . (Alcántara y col. 1999). También se ha obtenido una  $q_{\text{O}_2\text{max}}$  para *Thiobacillus denitrificans* en condiciones aeróbicas de 0.71  $\text{mmoles HS}^-/\text{g proteína}\cdot\text{min}$ ., y en anaeróbicas de 0.26  $\text{mmoles HS}^-/\text{g proteína}\cdot\text{min}$ . (Mc Comas y col., 2001).

La tasa  $q_{\text{O}_2\text{max}}$  de  $\text{HS}^-$  (en  $\text{mmoles HS}^-/\text{g proteína}\cdot\text{min}$ ) estimada en este trabajo para el consorcio C1 (0.69) y que se muestra en la Tabla 4.6 es comparable con los valores reportados tanto para el género *Thioalkalivibrio* (0.3 a 0.8) como para microorganismo

sulfoxidantes de pH neutro como *Thiobacillus denitrificans* (0.71) o el consorcio adaptado (0.4) por Alcántara y col. (1999).



**Figura 4.7** Capacidad sulfoxidante del consorcio C1 con  $S_2O_3^{2-}$ .



**Figura 4.8** Capacidad sulfoxidante del consorcio C1 con  $S^{2-}$ .

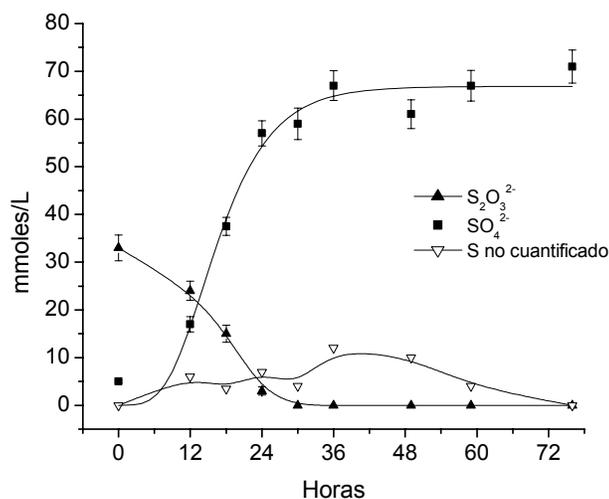
**Tabla 4.6** Parámetros cinéticos de oxidación  $q_{O_2\text{máx}}$  y  $K_S$  para el consorcio C1.

	$S_2O_3^{2-}$	$HS^-$
$q_{O_2\text{ máx}}$ mmoles $O_2$ /g proteína*min	0.23	0.51
$K_S$ ( $\mu\text{M}$ )	10	22

#### 4.2.2.3 Curvas de crecimiento del consorcio C1

Se realizaron cinéticas de crecimiento del consorcio C1, con el fin de evaluar su comportamiento (crecimiento, consumo de  $S_2O_3^{2-}$  y producción de  $SO_4^{2-}$ ) y determinar los rendimientos por mol de sustrato. Para ello, el consorcio se creció en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 40% de volumen de llenado, 5% de inóculo y 40 mM de tiosulfato. Se cultivó por un espacio de 72 horas y se determinaron los parámetros antes indicados. Los resultados se presentan en la Figura 4.9.

Como se observa en la figura, la producción de  $SO_4^{2-}$  inicia después de 6 horas de cultivo, probablemente debido a una fase de adaptación de los microorganismos. Después la producción del compuesto es lineal hasta aproximadamente las 24 horas del cultivo, donde se alcanza el valor máximo de conversión (64 mmol  $SO_4/L$ ). El consumo de  $S_2O_3^{2-}$  está relacionado con la producción de  $SO_4^{2-}$  y en la gráfica se observa claramente que a las 24 horas del cultivo el  $S_2O_3^{2-}$  se agotó completamente del medio. El tiosulfato se oxidó completamente a sulfato a las 72 horas de cultivo.



**Figura 4.9** Cinéticas de consumo de  $S_2O_3^{2-}$  y producción de  $SO_4^{2-}$  del consorcio C1.

Los datos obtenidos a partir de las cinéticas de cultivo realizadas, fueron usadas para estimar las velocidades volumétricas máximas de producción de sulfato. La Tabla 4.7 muestra que la velocidad para la producción de  $SO_4^{2-}$  es mayor para el consorcio C1 (3.1 mmoles  $SO_4^{2-}$  /L\*h) en cambio para el caso de la velocidad de oxidación de  $S_2O_3^{2-}$  es mayor para el consorcio C2 (2.1 moles  $S_2O_3^{2-}$  /L\*h).

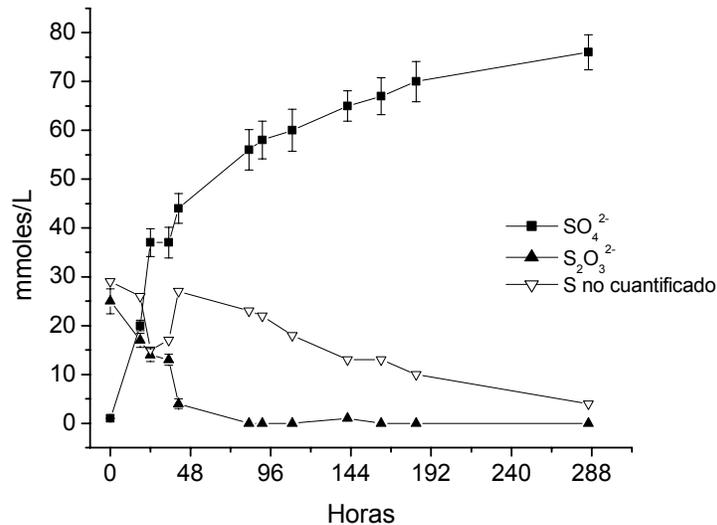
**Tabla 4.7** Velocidades estimadas durante el cultivo por lotes.

Consorcio	Velocidad $r_s$		Velocidad $r_p$	
	(mmoles $S_2O_3^{2-}$ / L*h)	$t_c$ (h)	(mmoles $SO_4^{2-}$ / L*h)	$t_c$ (h)
C1	$1.8 \pm 0.08$	13	$3.1 \pm 0.14$	13
C2	$2.1 \pm 0.10$	13	$2.8 \pm 0.17$	12

#### 4.2.2.3.1 Reactor sin aireación

El consorcio C1 se cultivó por lotes en un reactor de 3 litros, un volumen de llenado de 83 % (2.5 L), una temperatura de 30 °C, 300 rpm de agitación, pH de 10 (controlado por la adición

de NaOH 1 N) y sin aireación. Esto con el fin de estudiar su comportamiento en crecimiento, producción de sulfato y consumo de tiosulfato. Los resultados se presentan en la Figura 4.10



**Figura 4.10** Cultivo en lote del consorcio C1 sin aireación forzada.

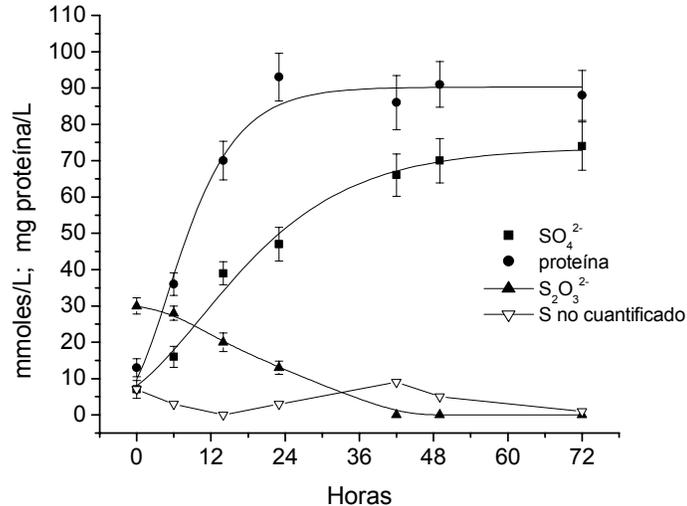
Como se observa en la figura, la producción de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> se fue incrementando linealmente hasta las 72 horas de cultivo alcanzando una concentración de 45 mmol SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>/L. Posteriormente la velocidad de producción disminuye y alcanza el máximo valor a las 192 horas de cultivo. El S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> se consume completamente a las 96 horas de cultivo.

El azufre no cuantificado se encontró en parte como azufre elemental, a las 109 horas de cultivo donde se registró la turbidez más alta de la suspensión, en este tiempo se cuantificaron 60 mM de SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 0 mM de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> y 2 mM de S<sup>0</sup> (mediante cianolisis). El balance de azufre en este tiempo equivale al 77% del azufre total del que se agregó como S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Pero a las 286 horas el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> producido equivalió al 95% del azufre total. El azufre faltante tanto a las 0, 109 y 286 horas puede explicarse si se considera la auto oxidación de soluciones de S<sub>2</sub>O<sub>3</sub><sup>2-</sup> a tetrationato y polisulfuros (Steudel, 2000) y la capacidad de ciertas

bacterias sulfoxidantes de oxidar parcialmente compuestos reducidos de azufre a  $S^0$ . Estos compuestos también pueden ser llevados hasta  $SO_4^{2-}$  por las mismas bacterias. Se confirmó la capacidad de producir  $S^0$  por el consorcio C1, que sugería la observación de precipitados blancos. Cabe señalar que a pesar de la agitación del cultivo, el tanque estaba lleno en un 83% de su capacidad condición que limitaba la transferencia de oxígeno y que favoreció la oxidación parcial del  $S_2O_3^{2-}$  para producir  $S^0$  (Janssen, 2001).

#### 4.2.2.3.2 Reactor con aireación

El consorcio C1 se cultivó nuevamente en el reactor agitado bajo las condiciones de cultivo y con aireación de 1 vvm. Se estudió también, su comportamiento en crecimiento, producción de  $SO_4^{2-}$ , consumo de  $S_2O_3^{2-}$ . Los resultados se presentan en la Figura 4.11.



**Figura 4.11** Cultivo en lote del consorcio C1 con aireación forzada (1vvm).

Como puede observarse la producción de  $SO_4^{2-}$  incrementó linealmente durante las primeras 24 horas de cultivo y se alcanzó una concentración de 70 mmoles  $SO_4^{2-}$ /L. A partir de este

tiempo la velocidad de producción disminuye a las 42 horas hasta que se alcanzó el máximo a las 72 horas de cultivo. El  $S_2O_3^{2-}$  se consume completamente a las 48 horas. La proteína se produjo linealmente durante 12 horas sin observarse una previa etapa de adaptación que se atribuye como un efecto de la aireación (1 vvm) y a la agitación que mantenían una buena transferencia de oxígeno dentro del tanque, después de 24 horas de cultivo se encontró su fase de mantenimiento.

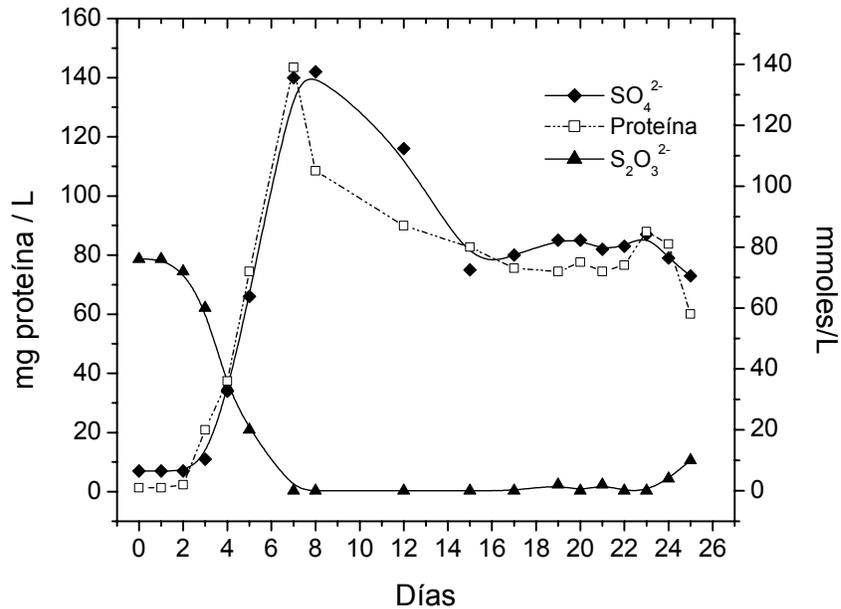
A partir de las curvas cinéticas que se muestran en la Figura 4.11 se estimó que el  $SO_4^{2-}$  se produjo a una velocidad volumétrica máxima de 2.2 mmoles  $SO_4^{2-}/L \cdot h$ , a las 15 horas de cultivo ( $t_c$ ).

Se estimó una velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) de  $0.08 \text{ h}^{-1}$  para el consorcio C1 en las condiciones descritas. El rendimiento de crecimiento ( $Y_{X/S}$ ) estimado fue de 2.3 g proteína/moles  $S_2O_3^{2-}$ . De acuerdo a los trabajos de Sorokin y col, los rendimientos reportados fueron de 2 a 3 g proteína/mol  $S_2O_3$  para *Thioalkalimicrobium* y de 4 a 6 g proteína/mol  $S_2O_3$  para *Thioalkalivibrio*. Las velocidades específicas para el género *Thioalkalimicrobium* es de 0.33 y para *Thioalkalivibrio* de valores menores que  $0.2 \text{ h}^{-1}$ . Los datos estimados en este trabajo están por debajo de los reportados, sin embargo hay que tomar en cuenta que el grupo de Sorokin los llevó a cabo en cultivo en continuo y con cepas puras.

#### 4.2.3 Cultivo en continuo del consorcio C1

Con el fin de evaluar el comportamiento del consorcio en cultivo continuo, se creció el consorcio en un reactor de 4 litros con un volumen de 2.5 litros de medio mineral, agitación de 300 rpm, pH controlado a 10.0 con la adición de NaOH 1 N,  $30^\circ \text{ C}$  de temperatura y aireación de 1 vvm. El cultivo se inició en lote y al acercarse al máximo de  $SO_4^{2-}$  producible

(día 7) se cambió a cultivo continuo utilizando un tiempo de retención hidráulico (TRH) de 3 días (tasa de dilución de  $0.3 \text{ d}^{-1}$ ). En ese momento, la concentración de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  en el medio alimentado se disminuyó de 80 a 40 mmoles/L, es decir la carga de tiosulfato fue de 12 mmoles  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}/\text{L} \cdot \text{d}$ . Los resultados se presentan en la Figura 4.12.



**Figura 4.12** Arranque y monitoreo del cultivo en continuo del consorcio C1.

El sistema alcanzó un estado estacionario después de 14 días con concentraciones de proteína de 82 mg/L. La carga de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  alimentado fue oxidada completamente a  $\text{SO}_4^{2-}$  produciendo 80 mmol/L (una carga de sulfato de 24 mmol/L\*d). El rendimiento de crecimiento ( $Y_{X/S}$ ) fue de 2.0 g proteína/mol  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  (que equivale 4 g de biomasa/mol de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , si se toma que el 50% del peso seco es proteína).

Estos datos son comparables con los resultados reportados para un consorcio sulfoxidante  $Y_{X/S}$  de 1.25 g proteína/mol  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  a pH 5 (Alcántara y col., 1999), pero menor a lo reportado por Sorokin y col. (2004) 7.9 g proteína/mol  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  con un cultivo de *Thioalkalivibrio versutus*.

### 4.3 Cepas puras

Los resultados obtenidos con los consorcios microbianos muestran que los microorganismos alcalófilos obtenidos tienen la capacidad de oxidar tanto  $S_2O_3^{2-}$  como  $HS^-$ . Por lo tanto, estos consorcios tienen una potencial aplicación biotecnológica en el desarrollo de procesos como el endulzamiento de gas natural. Sin embargo, para entender los mecanismos de oxidación, comparar las velocidades de oxidación reportadas en la bibliografía e identificar las especies bacterianas, es necesario el aislamiento de cepas puras. Este fue el objetivo de la tercera parte del trabajo, de esta manera se inició el aislamiento de bacterias alcalófilas sulfoxidantes para su caracterización e identificación. Se utilizó la técnica aislamiento por dilución y el sembrado en medio sólido. Para su caracterización se realizaron cinéticas de crecimiento y finalmente, para su identificación se utilizaron herramientas de biología molecular y microscopía de luz y electrónica.

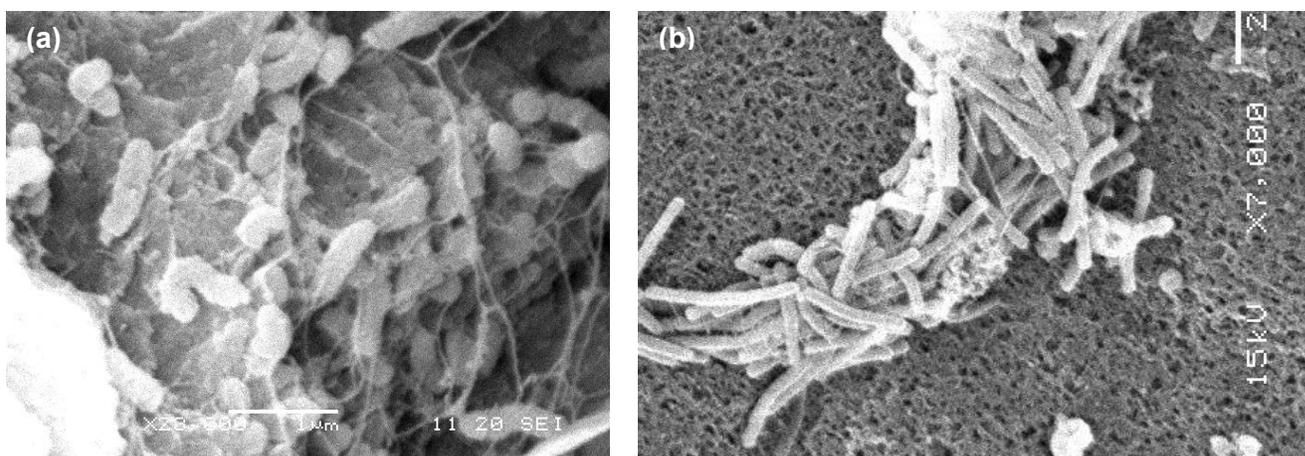
#### 4.3.1 Aislamiento

El aislamiento por dilución permitió la obtención de dos colonias diferentes entre sí, que formaban parte del consorcio C1. Las condiciones selectivas de aislamiento como se ha mencionado fueron, pH 10.2 y  $S_2O_3^{2-}$  como donador de electrones. Las cepas se denominaron AA y AB. Las características morfológicas (macroscópicas) observadas durante el cultivo en placa permitieron diferenciar a las cepas, posteriormente en las observaciones en microscopio óptico se comprobó que se trataba de bacilos Gram negativas de diferente tamaño. Su descripción se presenta en la Tabla 4.8.

**Tabla 4.8** Características microbiológicas de los aislados AA y AB

Características	Aislado AA	Aislado AB
Morfología de colonias	Colonias amarillas, opacas, con formación de azufre	Colonias blancas, puntiformes
Morfología celular	Bacilos cortos, móviles, aprox. 1 $\mu\text{m}$ de largo	Bacilos largos, móviles, aprox. 2 $\mu\text{m}$ de largo
Gram	Negativo	Negativo

A través de microfotográficas se observó claras diferencias en su morfología celular (Figura 4.13), en la microfotografía del consorcio C1 Figura 4.2 se observan ambas cepas y la relación de tamaño que conservan entre si.

**Figura 4.13** Microfotográficas de las cepas aisladas AA (a) y AB (b).

Durante el cultivo de las cepas en medio mineral líquido se observó la formación de precipitados blanquecinos posiblemente  $\text{S}^0$ , visiblemente más abundante en la cepa AB.

#### 4.3.2 Identificación

Por amplificación y secuenciación del fragmento 16S ARNr (1526 pares de bases) y comparando las secuencias (Blast) con las  $\gamma$ -Proteobacterias se determinó lo siguiente:

La cepa AA, Figuras 4.13a y 4.14. El mayor porcentaje de homología lo conserva con la cepa modificada ML-173 (95.3%) y consecutivamente con bacterias halófilas (menor del 94%). Por lo que se sugiere que puede pertenecer a un genero de bacterias alcalófilas sulfoxidantes no descrito todavía.

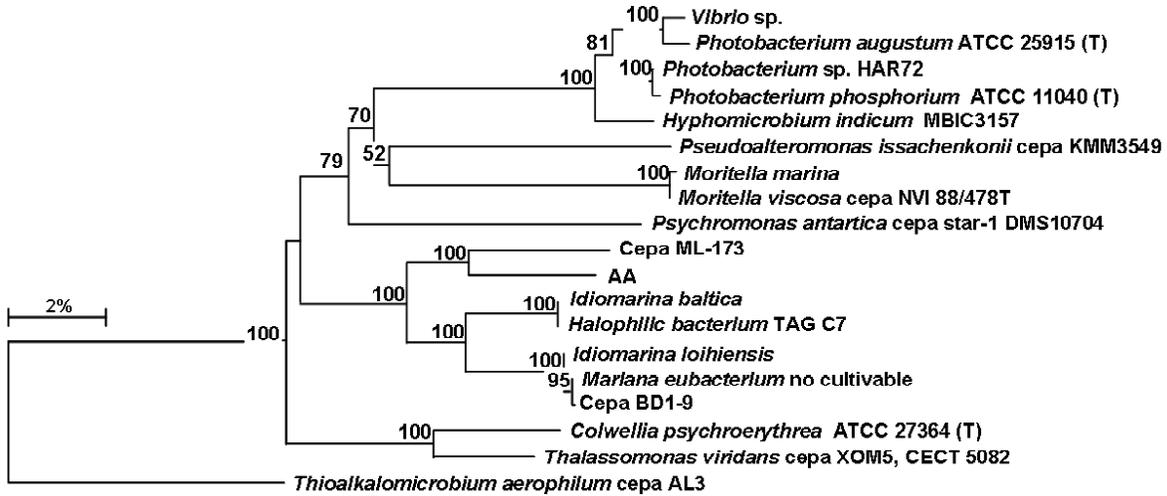


Figura 4.14 Árbol filogenético de la cepa AA.

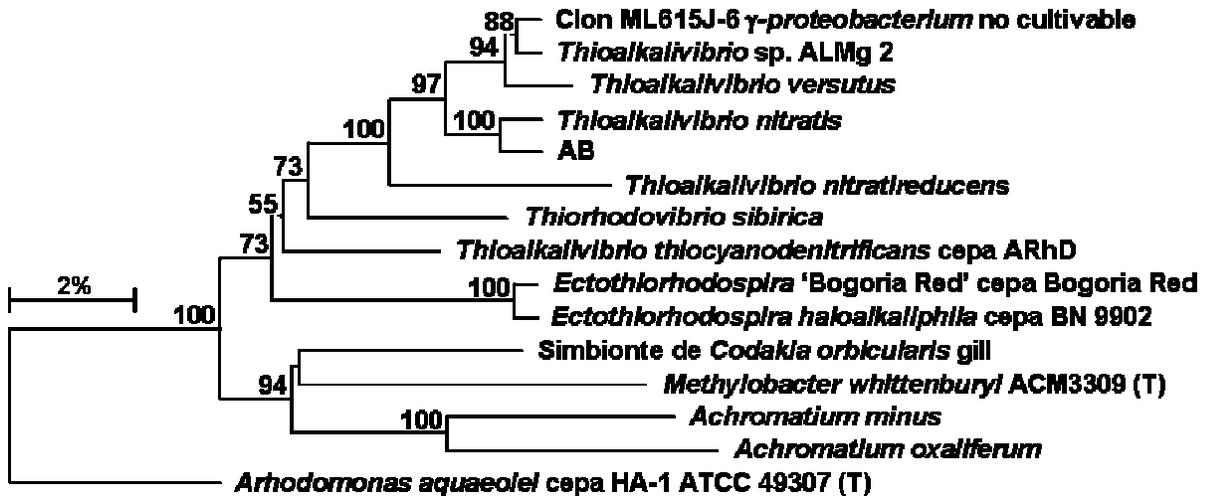


Figura 4.15 Árbol filogenético del aislado AB.

La cepa AB, Figuras 4.13b y 4.15, tiene una homología del 98.7% con *Thioalkalovibrio nitratis* por lo que puede tratarse del mismo género y especie, reportado por Sorokin y col., en 2001, sin embargo para tener un porcentaje mayor de certeza se requieren de otros estudios como la hibridación.

### 4.3.3 Caracterización de las cepas AA y AB

Para los estudios de caracterización de las cepas se consideraron: el efecto del cloruro de sodio sobre la actividad y crecimiento bacteriano y la cinéticas de crecimiento (rendimientos y velocidades de oxidación del sustrato).

#### 4.3.3.1 Tolerancia a la salinidad

Se estimó la tolerancia a la salinidad de las cepas AA y AB en cultivo por lote en donde se probó el medio mineral (pH 10.2 y  $S_2O_3^{2-}$  40 mM), en ausencia de NaCl y adicionado con hasta 200 g NaCl/L, lo que equivale a concentraciones totales de ion  $Na^+$  de entre 0.5 a 4.0 M. El medio mineral se inoculó con el 5% v/v de un cultivo crecido previamente (48 horas de cultivo) en presencia de  $S_2O_3^{2-}$  40 mM y 0.6 M de  $Na^+$  total. Se midió la producción de  $SO_4^{2-}$  y proteína por los aislados después de 72 horas de cultivo (Tabla 4.9).

Como se muestra en la tabla, las cepas AA y AB, pueden crecer en concentraciones de hasta 1.4 M  $Na^+$  total que equivale a 5% de NaCl. Las mayores concentraciones producidas de  $SO_4^{2-}$ , (52 y 61 mmoles  $SO_4^{2-}$ /L) y de proteína (390 y 465 mg/L) para las cepas AA y AB, se encontraron en las concentraciones más bajas 0.5 y 0.6 M

Para concentraciones de 0.5 mM de  $Na^+$  se determinó el  $SO_4^{2-}$  en 49 y 61 mmoles  $SO_4^{2-}$ /L para las cepas AA y AB respectivamente. En cambio para 1.4 M de  $Na^+$ , se midieron

concentraciones de 28 y 26 mmoles  $\text{SO}_4^{2-}$ /L respectivamente. Los resultados observados permiten sugerir que ambas cepas son halófilas discretas de acuerdo a Madigan y col., (1999).

**Tabla 4.9** Efecto de la salinidad, en el crecimiento y producción de  $\text{SO}_4^{2-}$  a las 72 horas de cultivo.

% NaCl	M $\text{Na}^+$ total	mM $\text{SO}_4^{2-}$		mg proteína / L	
		AA	AB	AA	AB
0	0.5	49	61	390	465
0.5	0.6	52	55	205	444
3.5	1	40	38	154	398
5	1.4	28	26	126	342
10	2	18	2	80	65
15	3	17	1	4	6
20	4	7	1	3	0

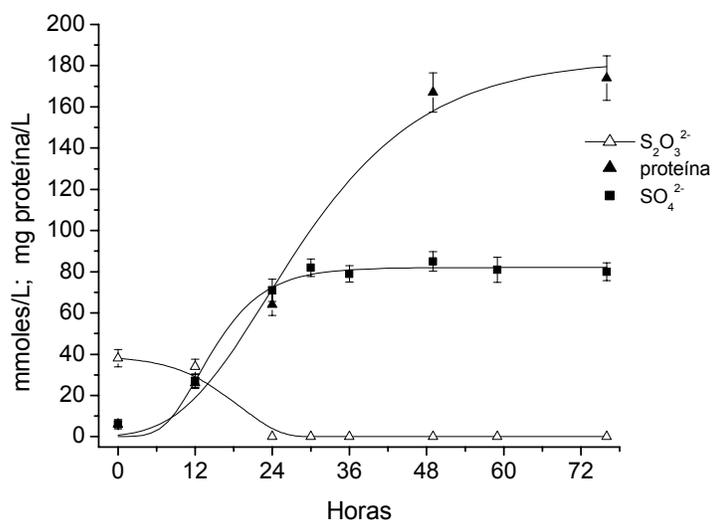
Durante los experimentos se realizaron controles abióticos, donde no se presentó oxidación química en los controles con  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  a las distintas concentraciones de NaCl.

En la literatura se reporta que los géneros de bacterias alcalófilas sulfooxidantes tienen una tolerancia al ion  $\text{Na}^+$  que va desde 0.2 a 1.2 M para *Thioalkalimicrobium* y de 0.2 a 4 M para *Thioalkalivibrio*. En este experimento se observa que el crecimiento y la producción de  $\text{SO}_4^{2-}$  disminuye al aumentar la concentración de  $\text{Na}^+$ . En los trabajos reportados por Banciu y col., (2004a) se observa el mismo comportamiento y demuestra que puede ser contrarrestado con la adaptación de las bacterias y alcanzar las mismas tasas de oxidación inclusive a concentraciones de 2 M de  $\text{Na}^+$ .

#### 4.3.3.2 Curvas de crecimiento de las cepas AA y AB

Se realizaron cinéticas de crecimiento en cultivo por lotes de las cepas AA y AB, con el fin de evaluar su crecimiento, consumo de tiosulfato y producción de sulfato. Se determinaron a su vez, los rendimientos por mol de sustrato. Para ello, las cepas se crecieron en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo medio mineral ( $\text{Na}^+$  total 0.6 M) en un 40% de volumen de llenado, 5% de inóculo y 40 mM de tiosulfato. Se cultivó a  $30^\circ\text{C}$  y 150 rpm, durante 72 horas, los resultados se presentan a continuación.

Las curvas de crecimiento para la cepa AA pueden observarse en la Figura 4.16, donde la producción de  $\text{SO}_4^{2-}$  incrementó linealmente durante las primeras 24 horas de cultivo. A partir de este tiempo la velocidad de producción disminuyó hasta que se alcanzó la máxima concentración a las 48 horas de cultivo. El  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  se consume completamente a las 24 horas. La proteína se produjo linealmente durante el periodo de 12 a 48 horas, después de las 48 horas de cultivo se encontró su fase de mantenimiento.



**Figura 4.16** Cinéticas de cultivo, cepa AA.

Para la cepa AB, se observa en la Figura 4.17 que la producción de  $\text{SO}_4^{2-}$  inicia después de 12 horas de cultivo, probablemente debido a una fase de adaptación de los microorganismos. Después la producción del compuesto aumenta poco a poco y de las 30 a las 36 horas de cultivo, la velocidad aumenta súbitamente donde se alcanza el valor máximo de conversión (80 mmol  $\text{SO}_4^{2-}$ /L). Se observa que a las 36 horas del cultivo el  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  se agotó completamente del medio.

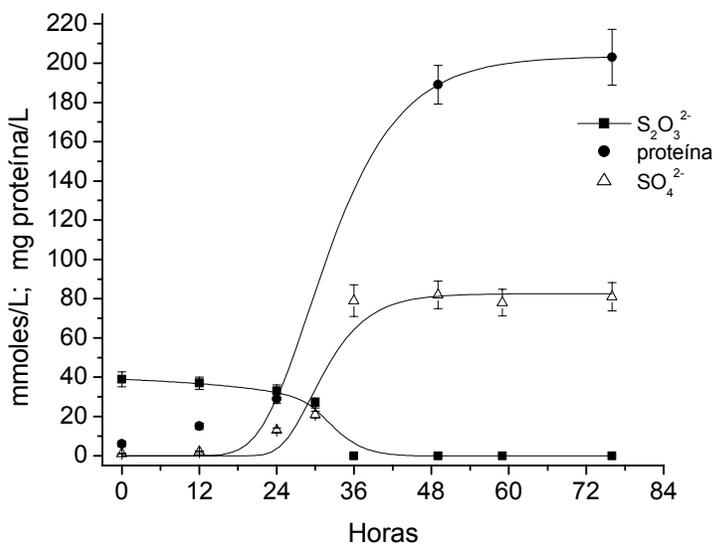


Figura 4.17 Cinéticas de cultivo, cepa AB.

En la Tabla 4.10 se muestra las velocidades volumétricas de consumo de  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ , para la cepa AA la velocidad de producción de  $\text{SO}_4^{2-}$  (4.9 mmol  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  /L\*h) es significativamente mayor que para la AB (2.1 mmol  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$  /L\*h) en cambio para la producción de  $\text{SO}_4^{2-}$  se estimó una velocidad de 3.1 mmol  $\text{SO}_4^{2-}$  /L\*h para AA y de 3.5 mmol  $\text{SO}_4^{2-}$  /L\*h, que no tienen diferencia significativa entre sí.

La Tabla 4.11 muestra para las cepas AA y AB los rendimientos de crecimiento ( $Y_{X/S}$ ) 4.2 y 4.9 (g proteína/mol  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) respectivamente y la velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ),

estimada para estas condiciones de cultivo, para la cepa AA es de  $0.05 \text{ h}^{-1}$  y  $0.07 \text{ h}^{-1}$  para AB, ambas velocidades son menores a las reportadas por Sorokin (2001) y por Alcántara (1999). Cabe señalar que los parámetros obtenidos para las cepas aisladas se estimaron en cultivo por lote y en las condiciones previamente mencionadas, por lo que se sugiere el estudio del óptimo de crecimiento de las cepas AA y AB en función del pH, la temperatura y salinidad. Los parámetros cinéticos estimados en las condiciones óptimas de crecimiento podrán ser comparados con los valores reportados.

**Tabla 4.10** Velocidades estimadas durante el cultivo por lotes.

Cepa	Velocidad $r_s$		Velocidad $r_p$	
	(mmoles $\text{S}_2\text{O}_3^{2-} / \text{L}\cdot\text{h}$ )	$t_c$ (h)	(mmoles $\text{SO}_4^{2-} / \text{L}\cdot\text{h}$ )	$t_c$ (h)
AA	$4.9 \pm 0.33$	13	$3.1 \pm 0.22$	12
AB	$2.1 \pm 0.12$	30	$3.5 \pm 0.17$	29

**Tabla 4.11** Parámetros cinéticos de las cepas aisladas.

	$Y_{X/S}$ (g proteína / mol $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ )	$\mu$ ( $\text{h}^{-1}$ )
AA	4.2	0.05
AB	4.9	0.07
<i>Thioalkalovibrio versutus</i> <sup>a</sup>	4 - 6	0.29 *
<i>Thiobacillus sp.</i> <sup>b</sup>	1.25	0.14 *

\* determinados en cultivo en continuo, <sup>a</sup> (Banciu y col., 2004a) y <sup>b</sup> (Alcantara y col., 1999)

## **5 CONCLUSIONES**

1. Los suelos alcalinos y las condiciones de cultivo propuestas en el trabajo, permitieron el enriquecimiento de consorcios alcalófilos sulfoxidantes. Se comprobó que la probabilidad de encontrar microorganismos alcalófilos en una muestra aumenta en función del pH del suelo.
2. Se enriquecieron dos consorcios (C1 y C2) que contienen bacterias alcalófilas con capacidad sulfoxidante, en un medio mineral a un pH de 10 con  $S_2O_3^{2-}$  como fuente de energía y carbonatos como fuente de carbono y sistema de amortiguación. La formación de  $SO_4^{2-}$  fue un buen indicador de la presencia de estos microorganismos de los suelos y un parámetro indirecto de crecimiento de los microorganismos. No existen reportes en la literatura sobre consorcios alcalófilos sulfoxidantes.
3. El consorcio alcalófilo sulfoxidante C1 evaluado en cultivo continuo fue capaz de oxidar el 100% del  $S_2O_3^{2-}$  alimentado, se consiguió la máxima conversión a  $SO_4^{2-}$  durante el estado estacionario y se estimó un  $Y_{X/S}$  de 2 g Proteína/mol  $S_2O_3^{2-}$ . Se demostró por estudios de respirometría que oxida  $S_2O_3^{2-}$  y  $HS^-$ . La tasa máxima de consumo de oxígeno ( $qO_{2max}$ ) del  $HS^-$  como fuente de energía (0.51 mmoles  $O_2$ /g proteína\*min) es 2 veces mas alta que en presencia de  $S_2O_3^{2-}$  (0.23 mmoles  $O_2$ /g proteína\*min). Los resultados son comparables con los reportados para microorganismos neutrófilos sulfoxidantes y alcalófilos sulfoxidantes.

4. Se aislaron las cepas AA y AB a partir del consorcio C1, ambas con capacidad de oxidar  $S_2O_3^{2-}$  a  $SO_4^{2-}$ . Estas bacterias son Gram negativas y pertenecen a las  $\gamma$ -Proteobacterias. La cepa AA son bacilos con motilidad, tiene pigmentación amarilla y filogenéticamente difiere en más del 6% con bacterias halófilas, por lo que se sugiere que pertenece a un género todavía no descrito. El aislado AB tiene forma de barra, motilidad y fue identificado como miembro del género *Thioalkalovibrio*, posee un 98.7% de semejanza con *Thioalkalovibrio nitratis*.
5. El estudio de las cepas puras permitió estimar algunos parámetros importantes de las mismas: la velocidad específica de crecimiento de  $0.05\text{ h}^{-1}$  (cepa AA) y de  $0.07\text{ h}^{-1}$ , (cepa AB), y a partir del cultivo de los aislados en diferentes concentraciones de NaCl se sugiere que las dos cepas son halófilas discretas.
6. Este trabajo permitió desarrollar metodologías microbiológicas para la obtención de microorganismos alcalófilos sulfoxidantes.

## Bibliografía

- Acuña, M., Pérez, F., Auria, R., Revah S. (1999) Microbiological and Kinetic Aspects of a Biofilter for the Removal of Toluene from Waste Gases. *Biotechnology and Bioengineering*, 63 (2), 175-184.
- Alcántara, S. (2000). Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Tesis de Doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 138 pp.
- Alcántara, S., Estrada, I., Vasquez, M., Revah, S. (1999). Carbon disulfide oxidation by a microbial consortium from a trickling filter. *Biotechnology Letters*. 21, 810-819.
- Alvero, C. C. (1998). Biología de los microorganismos y células de interés industrial. En: *Ingeniería bioquímica*. Gòdia, C. F. y Santín, L. J. (Editores). Editorial Síntesis. Madrid. pp. 15-54
- Atlas, R. M. y Richard, B. (2002). Ciclos biogeoquímicos. En: *Ecología microbiana y Microbiología ambiental*. Pearson Educación, Madrid. pp. 381-455.
- Banciu, H., Kleerebezem, R., Muyzer, J. G., Sorokin, D. Y. (2004a). Application of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria for the removal of H<sub>2</sub>S from gas streams. *European Symposium on Environmental Biotechnology*. Taylor & Francis Group, London. pp. 345-348.
- Banciu, H., Sorokin, D. Y., Kleerebezem, R., Muyzer, J. G., Galinski, E. A., Kuenen, J. G. (2004b). Growth kinetics of haloalkaliphilic, sulfur-oxidizing bacterium *Thioalkalivibrio versutus* strain ALJ 15 in continuous culture. *Extremophiles*. 8 (3), 185-192.

- Barrera, F. M. (2000). Distribución espacio temporal de la salinización y sodificación del suelo en la zona federal de exlago de Texcoco. Tesis Biología, UNAM, México.
- Bertoldo, C., Grote, R., Antranikian, G. (2002). Extremophiles: Life in Extreme Environments. En: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*.  
<http://www.mrw.interscience.wiley.com/eem/articles/env099/frame.html>
- Boone, D. R., Mathrani, I. M., Menaia, R. A., Boone J. E. (1993). Isolation and characterization of *Methanohalophilus portucalensis* sp. nov. and DNA reassociation study of genus *Methanohalophilus*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 43. 430-437.
- Brüser, T., Lens, P., Truper, H. (2000). The biological sulfur cycle. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering*. Lens P. N. L y Hulshoff Pol L. (Editores). International Water Association, London. pp. 47-85.
- Buisman, C., IJssper, P., Hof, A., Janssen, A., Hagen, R., Lettinga, G. (1991) Kinetic Parameters of a Mixed Culture Oxidizing Sulfide and Sulfur with Oxygen. *Biotechnology and Bioengineering*. 38, 813-820.
- Friedrich, C. G., Rother, D., Bardischewsky, F., Quentmeier, A., Fischer J. (2001). Oxidation of reduced inorganic sulfur compounds by Bacteria: Emergence of a common mechanism? *Applied and Environmental Microbiology*. 67(7). 2873-2882.
- Erkerlin E., Cano G., Garza R., Vogel E. (1997). Ciencia ambiental y desarrollo sostenible. Internacional Thomson Editores, México, D.F.
- Gerasimenko, L. M., Jaroszewicz, M., Ito, M., Sturr, M., Krulwich, T., Kolsto, A. (1996). Alkaliphilic cyanobacteria from soda lakes of Tuva and their ecophysiology. *Microbiology*. 65. 736-740.

- González, F. G. (1996). Aislamiento y caracterización parcial de tres poblaciones de bacterias extremófilas del suelo del exlago de Texcoco. Tesis Biología, UNAM, México.
- González, S. A. (2002). Operación, caracterización y modelado de un sistema de oxidación biológica de tiosulfato a azufre elemental. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 108 pp.
- Horikoshi, K. (1991). Microorganisms in Alkaline Environments. Kodansha. Tokio. pp 1-4, 5-24, 187-246
- Horikoshi, K. (1999). Alkaliphiles: Some applications of their products for biotechnology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 63(4). 735-750.
- Ito, M. (2002). Alkaliphilic Microorganisms. En: *Encyclopedia of Environmental Microbiology*. <http://www.mrw.interscience.wiley.com/eem/articles/env123/frame.html>
- Janssen, A. J. H., Ruitenberg, R., Buisman, C.J.N. (2001). Industrial applications of new sulfur biotechnology. *Water Science Technology*. 44. 85-90.
- Jhonson, D. B. (1995). Selective soil media for isolating and enumerating acidophilic bacteria. *Journal of Microbiology Methods*. 23, 205-218.
- Kelly, D., Sergill, J., Lu, W., Wood, A. P. (1997). Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*. 71, 95-107.
- Koneman, E., Allen, S., Janda, W., Schereckenberger, P., Winn, W. (1999). Parasitología. En: Diagnóstico microbiológico. Ed. Panamericana, 5ta edición. pp. 1040-1129.
- Krulwich, T. A., Ito, M., Guffanti, A. A. (2001). The Na<sup>+</sup>-dependence of alkaliphily in *Bacillus*. *Biochimica et Biophysica Acta 1505*. 158-168.

- Lens, P. N. L. y Kuenen, J. G. (2001). The biological sulfur cycle: novel opportunities for environmental biotechnology. *Water Science Technology*. 44. 57-66.
- Lomans, B., Sorokin, Y., Janssen, A., Kuenen, J. (2000). Application of alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria for the removal of H<sub>2</sub>S from gas streams. Seminario Latinoamericano de Digestión Anaerobia. Recife, Brasil. 154-161.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J. (1951). Protein measurement with Folin phenol reagent. *Journal of Biology Chemistry*. 193, 265-275.
- Madigan, M. T., Martinko, L. M., Parker, J. (1999). Ecología microbiana En: *Biología de los microorganismos*. 8ª ed. Prentice Hall Iberia Madrid, España. pp 532-605.
- Middelburg, J. (2000). The geochemical sulfur cycle. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering*. Lens P. N. L y Hulshoff Pol L. (Editores). International Water Association, London. pp. 33-46.
- Morgan. J., Revah, S., Noyola, A. (2001) Algunas tecnologías para la remoción de H<sub>2</sub>S por vía fisicoquímica y microbiológica. *Revista del IMIQ*. 9-12, 207-215.
- Nimura, Y., Yanagida, F., Uchimura, T., Ohara, N., Suzuki, K., Kozaki, K. (1987). A new facultative anaerobic xylan-using alkalophile lacking cytochrome, quinone and catalase. *Agriculture Biology Chemistry*. 51, 2271-2275.
- O'Flaherty, V. y Colleran, E. (2000). Sulfur problems in anaerobic digestion. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering*. Lens P. N. L y Hulshoff Pol L. (Editores). International Water Association, London. pp. 467-489.
- Rittmann, B. E. y McCarty, P. L. (2001). Fundamentos de microbiología. En: *Biotecnología del medio ambiente principios y aplicaciones*. McGraw Hill Madrid, España. pp 1-116.

- Schinner, F. y Marguesin, R. (2001). Potential of Halotolerant an halophilic microorganism for biotechnology. *Extremofiles*. 5, 73-83.
- Sorokin, D. Y., Antipov A. N., Kuenen, J. G. (2003a). Complete denitrification in coculture of obligately chemolithoautotrophic haloalkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria from a hypersaline soda lake. *Archives of Microbiology*. 180, 127-133.
- Sorokin, D. Y., Cherepanov, A., de Vries, S., L. A., Kuenen, J. G. (1999). Identification of cytochrome c oxidase in the alkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium '*Thioalkalimicrobium aerophilum*' strain AL 3. *FEMS Microbiology Letters*. 179 (1), 91-99.
- Sorokin, D. Y., de Jong, G. A. H., Robertson, L. A., Kuenen, J. G. (1998). Purification and characterization of sulfide dehydrogenase from alkaliphilic chemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria. *FEBS Letters*. 427, 11-14.
- Sorokin, D. Y., Gorlenko, V. M., Tourova, T. P., Tsapin, A. I., Nealson, K. H., Kuenen, J. G. (2002a). *Thioalkalimicrobium cyclicum* sp. nov. and *Thioalkalivibrio jannaschii* sp. Nov., novel species of haloalkaliphilic, obligately chemolithoautotrophic sulfur oxidizing bacteria from hypersaline alkaline Mono Lake (California). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 913-920.
- Sorokin, D. Y., Lysenko, A. M., Mityushina, L. L., Tourova, T. P., Jones, B. E., Rainey L. A., Kuenen G. J. (2001a). *Thioalkalimicrobium aerophilum* gen. nov., sp. nov. and *Thioalkalivibrio versutus* gen. nov., sp. nov., *Thioalkalivibrio nitratis* sp. nov., and *Thioalkalivibrio denitrificans* sp. nov., novel obligately alkaliphilic and obligatelychemolithoautotrophic sulfur-oxidizing bacteria from soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 51, 565-580.

- Sorokin, D. Y., Robertson, L. A., Kuenen, J. G. (2000a). Isolation and characterization of obligately chemolithoautotrophic alkaliphilic sulfur-oxidizing bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek* 77, 251-262.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Kolganova, T. V., Sjollema, K. S., Kuenen, J. G. (2002b). *Thioalkalispira microaerophila* gen. nov., sp. nov., a novel lithoautotrophic, sulfur-oxidizing bacterium from a soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 2175-2182.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Kuenen, J. G. (2000b). A new facultatively autotrophic hydrogen- and sulfur-oxidizing bacterium from an alkaline environment. *Extremophiles*. 4 (4), 237-245.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenco, A. M., Kuenen, J. G. (2001b). Microbial thiocyanate utilization under highly alkaline conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 67(2). 528-538.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Lysenco, A. M., Mityushina, L. L., Kuenen, J. G. (2002c). *Thioalkalivibrio thiocyanoxidans* sp. nov. and *Thioalkalivibrio paradoxus* sp. nov., novel alkaliphilic, obligately autotrophic, sulfur-oxidizing bacteria capable of growth on thiocyanate, from soda lakes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 657-664.
- Sorokin, D. Y., Tourova, T. P., Sjollema, K. A., Kuenen J. G. (2003b). *Thioalkalivibrio nitratireducens* sp. nov., a nitrate-reducing member of an autotrophic denitrifying consortium from a soda lake. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1779-1783.

- Steudel, R. (2000). The chemical sulfur cycle. En: *Environmental Technologies to Treat Sulfur Pollution – Principles and Engineering*. Lens P. N. L y Hulshoff Pol L. (Editores). International Water Association, London. pp. 1-31.
- Torres, C., Revah, S., Hinojosa, A., Paez, F., Morales, V. (1993) Biological process for the elimination of sulfur compounds present in gas mixture. U.S. Patent 5,236,677.
- Velasco, A. (2001). Evaluación de parámetros que determinan la oxidación biológica del tiosulfato en azufre elemental. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Metropolitana. Unidad Iztapalapa. México. 89 pp.
- Velasco, A., Alcántara S., Razo-Flores E., Revah S, (2004) Partial thiosulfate oxidation by steady-state continuous culture in a bioreactor-settler system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 79, 132-139.

Iztapalapa D.F. a 29 de Julio del 2004

El jurado designado por la  
División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis  
"Oxidación biológica de compuestos reducidos de azufre en condiciones alcalinas:  
Enriquecimiento y caracterización de consorcios"

que presentó:

Jesús Espinosa Márquez

Director: Dr. Sergio Revah M.

Jurado:

Sinodal: Dra. Florina Ramírez Vivez

Sinodal: Dra. Flor de Maria Cuervo López

Asesor: Dra. Laura Kawasaki Watanabe

Asesor: Dr. Sergio J. Alcántara Pérez



---



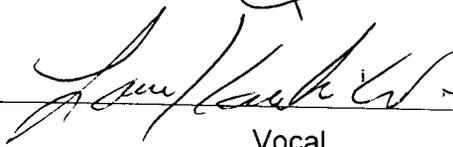
---

Presidenta



---

Secretaria



---

Vocal



---

Vocal