



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA

Casa abierta al tiempo

IZTAPALAPA

“EFECTO DEL USO DE INHIBIDORES SOBRE LA
OXIDACION BIOLÓGICA DE COMPUESTOS
REDUCIDOS DE AZUFRE EN UN CONSORCIO
MICROBIANO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN BIOTECNOLOGIA

P R E S E N T A :

MARIA SOLEDAD VASQUEZ MURRIETA

MEXICO, D.F.

2000

INDICE

página

RESUMEN

1. INTRODUCCIÓN	01
1.1 Métodos de eliminación de compuestos azufrados	03
1.1.1 Métodos fisicoquímicos	03
a) absorción	03
b) adsorción	03
c) combustión	04
1.1.2 Métodos biológicos	04
a) biofiltros	04
b) biolavadores	05
c) biolavador de lecho escurrido	06
1.2 Ciclo del azufre	07
1.3 Bacterias sulfooxidantes	08
1.4 Fijación de CO ₂	11
1.5 Rutas metabólicas oxidativas de los compuestos azufrados	13
2. ANTECEDENTES	17
2.1 Oxidación de H ₂ S	17
2.2 Oxidación de azufre elemental	19
2.3 Oxidación parcial de compuestos reducidos de azufre	20
2.3.1 Uso de surfactantes	20
2.3.2 Uso de inhibidores	22
3. OBJETIVOS	29
4. MATERIAL Y MÉTODOS	30
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	34
5.1 Oxidación de tiosulfato	34
5.1.1 Consorcio sulfooxidante	34
5.1.2 <i>Thiobacillus thioparus</i>	36
5.2 Adición de surfactante	38
5.2.1 Consorcio sulfooxidante	39

5.2.2 <i>Thiobacillus thioeparus</i>	41
5.3 Aireación	44
5.4 Adición de inhibidores	46
5.4.1 Cianuro de sodio	47
5.4.1.1 Consorcio sulfooxidante	47
5.4.1.2 <i>Thiobacillus thioeparus</i>	49
5.4.2 N-etilmaleimida	51
5.4.2.1 Consorcio sulfooxidante	51
5.4.2.2 <i>Thiobacillus thioeparus</i>	52
5.4.3 Tiocianato de amonio	54
5.5 Oxidación de azufre elemental biológico	57
6. CONCLUSIONES	58
7. BIBLIOGRAFÍA	61

FIGURAS

Figura 1.1 Ciclo biológico del azufre (Janssen, 1996).	8
Figura 1.2 Transporte de electrones en <i>Thiobacillus</i> .	11
Figura 1.3 Ciclo de Calvin a partir del carbono de CO ₂ .	12
Figura 1.4 Mecanismo propuesto para la oxidación de tiosulfato por <i>Paracoccus versutus</i>	14
Figura 1.5 Oxidación periplásmica de tiosulfato por <i>Thiobacillus tepidarius</i> .	15
Figura 1.6 Posible arreglo de las enzimas envueltas en la oxidación de compuestos reducidos de azufre.	16

TABLAS

Tabla 1.1 Descripción general de un biofiltro	5
Tabla 1.2 Descripción general de un biolavador	6
Tabla 1.3 Descripción general de un biolavador de lecho escurrido	7
Tabla 1.4 Donador de electrones para algunas especies litótrofas	9
Tabla 5.1 Velocidades del consorcio sulfooxidante con surfactante	40
Tabla 5.2 Velocidades de <i>T. thioparus</i> con surfactante	42
Tabla 5.3 Velocidades con diferentes niveles de aireación	45
Tabla 5.4 Velocidad de crecimiento del consorcio y acumulación de azufre elemental con NaCN	49
Tabla 5.5 Velocidad de crecimiento y acumulación de azufre elemental con NaCN en <i>T. thioparus</i>	50
Tabla 5.6 Velocidad de crecimiento del consorcio y acumulación de azufre elemental con NEM	52
Tabla 5.7 Velocidad de crecimiento de <i>T. thioparus</i> y acumulación de azufre elemental con NEM	54

GRÁFICAS

Gráfica 5.1	pH y acumulación de sulfato por el consorcio sulfooxidante	35
Gráfica 5.2	Crecimiento del consorcio sulfooxidante	36
Gráfica 5.3	pH y acumulación de sulfatos por <i>T. thioparus</i> .	37
Gráfica 5.4	Crecimiento de <i>T. thioparus</i>	37
Gráfica 5.5	Efecto del surfactante sobre el pH y la producción de sulfatos en el consorcio sulfooxidante	39
Gráfica 5.6	Efecto del surfactante sobre el crecimiento en el consorcio sulfooxidante	40
Gráfica 5.7	Efecto del surfactante sobre el pH y la producción de sulfatos en <i>T. thioparus</i>	41
Gráfica 5.8	Efecto del surfactante sobre el crecimiento de <i>T. thioparus</i> .	42
Gráfica 5.9	Efecto del NaCN sobre el pH y el crecimiento del consorcio sulfooxidante	48
Gráfica 5.10	Efecto del NaCN sobre el pH y el crecimiento de <i>Thiobacillus thioparus</i> .	50
Gráfica 5.11	Efecto del NEM sobre el pH y el crecimiento del consorcio sulfooxidante	52
Gráfica 5.12	Efecto del NEM sobre el pH y el crecimiento de <i>T. thioparus</i> .	53
Gráfica 5.13	Comportamiento del pH con NH ₄ SCN en el consorcio sulfooxidante.	55
Gráfica 5.14	Efecto del NaCN y del NEM sobre la oxidación de azufre elemental	57

RESUMEN

Para la eliminación de compuestos de azufre orgánicos e inorgánicos de efluentes gaseosos y acuosos, se han implementado métodos biológicos basados en la capacidad de los microorganismos quimiolitótrofos de oxidar compuestos de azufre. La oxidación biológica de estos compuestos genera como producto final sulfato, prefiriéndose la formación de azufre elemental porque es insoluble en agua y puede ser recuperado. En este trabajo se estudia la oxidación parcial del tiosulfato hasta azufre elemental en un cultivo mixto y en *T. thioparus*, usando sustancias inhibidoras de la cadena respiratoria y de la enzima azufre oxidasa y sustancias que modifican la membrana celular. La adición de 50 a 200 ppm de un surfactante no iónico, no tiene efecto alguno sobre la oxidación de tiosulfato, ni en el crecimiento, ni en la acumulación de azufre. La adición de 0.5 a 2.0 mM de cianuro de sodio y 0.01 a 1.5 mM de N-etilmaleimida (NEM) sí favorecen la acumulación de azufre. Sin embargo, la adición de cianuro retarda el crecimiento en ambos cultivos. La inhibición es parcial porque permite la oxidación del tiosulfato y el crecimiento; esto no sucede cuando se utilizan concentraciones más altas (10 ó 50 mM) lo que representa una inhibición completa. La acumulación de S⁰ se puede atribuir al escaso crecimiento del consorcio y a una posible saturación por sustrato, más que al inhibidor mismo. Por otro lado, el efecto que observamos con la adición de NEM es debido a su poder inhibitorio sobre la enzima azufre oxidasa. Con respecto a la adición de tiocianato de amonio, observamos que no fue utilizado por ambos cultivos, posiblemente porque el cultivo no se encontraba bajo condiciones limitantes de sustrato. Al evaluar el efecto de la aireación, se observó que una menor aireación favorece la acumulación de azufre elemental pero disminuye el crecimiento. Finalmente, el azufre presentó una tasa de oxidación menor respecto al tiosulfato, esto debido a la característica de insolubilidad del azufre en agua. Sin embargo, la velocidad de oxidación del azufre biológico es mayor a la velocidad de oxidación de azufre elemental comercial, debido a que el azufre biológico tiene la particularidad de estar hidratado y facilitar su transporte al interior de la célula.

INTRODUCCIÓN

Las emisiones de compuestos azufrados orgánicos e inorgánicos, tanto de origen natural como industrial, por ejemplo, mercaptanos (R-SH), dióxido de azufre (SO₂), ácido sulfhídrico (H₂S) y bisulfuro de carbono (CS₂) (Kong y Allen, 1997) están relacionados con problemas de contaminación ambiental. La emisión global de azufre en 1989 se estimó entre 93 y 200 millones de toneladas por año (Janssen, 1996). Las emisiones naturales de H₂S y CS₂ son el resultado de actividades volcánicas y de evaporación de aguas oceánicas (Godish, 1997). En tanto las emisiones industriales provienen de plantas petroquímicas, plantas de extracción de gas natural, fabricación de rayón y celofán, en la industria de pulpa de papel y como resultado de un tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato (SO₄⁻). Debido a la toxicidad y propiedades corrosivas del sulfuro de hidrógeno (H₂S) se tiene un estricto control en su descarga al ambiente. En la atmósfera el H₂S causa lluvia ácida debido a una compleja serie de reacciones con el ozono que forman ácido sulfúrico (Janssen, 1996; Buisman *et al.*, 1989; Sublette y Sylvester, 1987).

Los patrones de consumo en México se reflejan en los problemas ambientales a los que nos enfrentamos actualmente. Dicha problemática se origina por las relaciones e interacciones entre los asentamientos humanos, uso de recursos y procesos de producción. Un gran porcentaje de emisión de contaminantes es producto de la utilización de combustibles fósiles, ya que en México más del 90% de la energía utilizada proviene de los hidrocarburos. Se estima que el sector transporte consume 54% de los combustibles, la industria y servicios 28%, las termoeléctricas 7% y el sector residencial 11%. El 97% del bióxido de carbono (CO₂) es emitido por el sector transporte y 75% del SO₂ es emitido por la industria y los servicios.

Los óxidos de azufre son producto de la combustión del diesel, gasolina y combustóleo utilizados en la industria y en el transporte. El diesel, la gasolina y el combustóleo contienen cantidades variables de azufre que van de un 0.05 a 3.5% en peso. El SO_2 reacciona con el ozono formando sulfatos, que al reaccionar con la humedad del ambiente forman ácidos (Riveros, 1996).

El CS_2 se genera de forma natural en océanos, suelos, pantanos y volcanes, aunque también puede producirse por algunas plantas como el roble *Quercus Lobata* y el árbol tropical *Stryphno dendron*. Los pantanos salinos y los sedimentos marinos son fuentes de CS_2 , producido probablemente por las actividades de bacterias anaerobias (Taylor 1993). La cantidad de producción anual de CS_2 por fuentes naturales es aproximadamente 1.56 millones de toneladas (Kelly *et al.*, 1994). El CS_2 es un excelente solvente de muchos compuestos orgánicos. De la producción total en el mundo, cerca del 2-2.5 millones de toneladas por año, del 50 al 60% es usado para la producción de viscosa (precursor de rayón y de esponjas) y otro 10 a 15% es empleado para la producción de celofán. También se usa en la agricultura (fumigantes), en la producción de gomas químicas, como agente en tratamiento de metales y plantación, en la producción de adhesivos, para extraer el aceite de oliva y como precursor del tetracloruro de carbono (Mannsville, 1993). Algunos de los efectos por exposición prolongada son artereosclerosis general y degeneración grasa del hígado (Plunket, 1979).

El ácido sulfhídrico es un gas de olor desagradable, en forma natural se genera a partir de la descomposición de materia vegetal. Industrialmente se emite en los procesos de extracción y refinación del petróleo y en plantas de tratamiento de aguas negras. Es un gas irritante que afecta el sistema respiratorio y el sistema nervioso central (Plunket, 1979).

1.1 Métodos de eliminación de compuestos azufrados

Las alternativas para el tratamiento de gases que contienen azufre son los métodos fisicoquímicos y los métodos biológicos. A continuación se describen ambos métodos de tratamiento.

1.1.1 Métodos Fisicoquímicos

a) Absorción

En este método los gases se ponen en contacto con un líquido, en el cual se absorben los contaminantes. La absorción puede ser un fenómeno puramente físico o incluir la disolución del material en el líquido, seguida por una reacción con uno o más constituyentes en la solución líquida. Existen muchos equipos para llevar a cabo esta operación como son las columnas empacadas, las columnas de spray y los recipientes agitados. El efluente líquido necesita un post-tratamiento para eliminar los componentes absorbidos, lo cual ofrece la posibilidad de recuperar componentes valiosos. Sin embargo, el proceso de absorción es aplicable sólo en el caso de componentes con alta solubilidad en la fase líquida. Para componentes con baja solubilidad se aplica si la absorción es acompañada por una reacción química en el líquido (Perry *et al.*, 1984).

b) Adsorción

En este proceso, el gas residual se pone en contacto con un sólido adsorbente, las moléculas del contaminante se condensan en la superficie del adsorbente donde se enlazan por adsorción física o quimioadsorción y se eliminan del gas residual. Los adsorbentes son materiales naturales o sintéticos de estructura microcristalina, cuyas superficies porosas internas son accesibles para la combinación selectiva del soluto (Perry *et al.*, 1994; Peavy *et al.*, 1985; Smet, 1998).

c) Combustión

En este proceso, el objetivo es convertir los contaminantes a CO_2 y H_2O con temperaturas altas. Sin embargo, los costos de energía son considerables, debido a que los niveles de concentración de los componentes presentes en los gases residuales generalmente son bajos, lo cual hace necesaria una flama externa en la combustión (Peavy *et al.*, 1985).

En general, los procesos de combustión son los más empleados para la eliminación de CS_2 y de compuestos orgánicos azufrados de corrientes gaseosas, pero su principal desventaja es que resultan costosos debido a los altos consumos de combustible, así como a la regeneración de los catalizadores.

1.1.2 Métodos Biológicos

En la última década, los métodos biológicos se han aplicado para el tratamiento de gases con bajas concentraciones de sulfuros. Su preferencia en comparación con los métodos fisicoquímicos se debe a su bajo costo, a su simplicidad operacional, a que son tecnologías limpias, a tener un mínimo de requerimientos de energía y de materia prima y a una mínima producción de desechos (Groenestijn y Hesselink, 1993; Cho *et al.*, 1992).

De acuerdo al estado en que se encuentran la fase líquida y los microorganismos, los sistemas biológicos de purificación de corrientes gaseosas pueden clasificarse en tres grupos: biofiltros, biolavadores y biolavadores de lecho escurrido.

a) Biofiltros

Los equipos más sencillos de operar y más empleados para la purificación biológica de gases de desecho son los biofiltros. Estos sistemas biológicos

(Tabla 1.1) se aplican desde 1920 para eliminar compuestos con malos olores y en la década de 1980 su aplicación se extendió para eliminar otro tipo de compuestos. Los biofiltros consisten en un compartimento empacado con algún material inerte a través del cual se hace subir la corriente gaseosa. El material de empaque sirve como soporte para los microorganismos y puede ser composta, turba sola o mezclada con partículas de madera, plástico o algún otro material con objeto de aumentar áreas de contacto y reducir la caída de presión (Leson y Winer, 1991; Bohn, 1992; Williams y Miller, 1992; Devinny, 1995; Smet, 1998).

Tabla 1.1 Descripción general de un biofiltro

Características	Ventajas
Biomasa inmovilizada	Área de contacto gas/liquido alta
Fase acuosa inmóvil	Fácil arranque y operación
Reactor unitario	Bajos costos de operación
Área de aplicación	Desventajas
Concentraciones de contaminantes < 1g/m ³	Poco control de condiciones de reacción
Coefficiente de Henry < 10	Lento proceso de adaptación al flocular
	Requiere de grandes áreas

b) Biolavadores

Un biolavador es un sistema que trabaja con la biomasa suspendida. Los biolavadores generalmente consisten de dos compartimentos. Un lavador donde se realiza la transferencia de masa de contaminante y oxígeno hacia la fase líquida y un regenerador en donde se encuentra la biomasa, cuya función es oxidar al contaminante. (Tabla 1.2). En estos sistemas también es necesario ajustar las condiciones físicas y químicas tales como la temperatura, el pH, la relación carbono/nitrógeno, para obtener una mayor eficiencia de remoción (Kohler, 1982; Lebeault, 1990, Groenestijn y Hesselink, 1993; Smet, 1998).

Tabla 1.2 Descripción general de un biolavador

Características	Ventajas
Biomasa suspendida en su mayoría	Buen control de las condiciones de reacción
Fase acuosa móvil	Posibilidades de evitar la acumulación de productos
Dos reactores	Equipo compacto
	Baja caída de presión
Área de aplicación	Desventajas
Concentración de contaminantes <5 g/m ³	Baja superficie para la transferencia de masa
Coefficiente de Henry <0.10	Lavado de microorg. de lento crecimiento
	Alta generación de lodos
	Sistema de arranque complicado
	Requerimiento extra de aire para concentraciones mayores de contaminante
	Costos de inversión, operación y mantenimiento elevados

c) Biolavador de lecho escurrido (BLE)

Los BLE se presentan como una alternativa a los biofiltros cuando aparecen problemas de inhibición debido a la generación de metabolitos ácidos en el proceso, los cuales tienen que neutralizarse y con este fin es necesario recircular la fase líquida. Además, esta recirculación permite el drenado de los productos de la neutralización. Comparados con los biolavadores, tienen la ventaja de efectuar las dos operaciones (absorción del contaminante y regeneración del líquido) en un solo compartimiento.

Un BLE consiste básicamente de una columna empacada con un material inerte (cerámica, plástico, etc.), sobre el que se soporta una película de microorganismos y a través del cual se hace pasar la corriente gaseosa contaminada; también, a través de este empaque baja el líquido que contiene los nutrientes necesarios para los microorganismos. Dentro de los parámetros importantes a manejar en estos equipos, se encuentran el pH, la temperatura y la concentración de entrada del contaminante, los cuales

dependen del microorganismo utilizado; así como la velocidad de entrada del líquido y el área superficial de contacto (Tabla 1.3) (Bishop y Kinner, 1986; Diks y Ottengraf, 1991; Smet, 1998).

Tabla 1.3 Descripción general de un biolavador de lecho escurrido

Características	Ventajas
Biomasa inmovilizada	Comparables a los filtros de escurrimiento
Fase acuosa móvil	Mejor retención de microorganismos de lento crecimiento
Reactor unitario	Reactor unitario
Área de aplicación	Desventajas
Concentración de contaminantes < 0.5 g/m ³	Baja superficie para la transferencia de masa
Coefficiente de Henry < 1	Generación alta de lodos
	Complicado sistema de arranque
	Costos de operación elevados

El principio del proceso biotecnológico para la remoción de sulfuros está basado en la conversión del sulfuro por oxidación a azufre elemental, donde el azufre puede ser removido por sedimentación. Las ventajas de este proceso son los bajos requerimientos de oxígeno, la posibilidad de recuperar el azufre elemental y la reducción de sulfatos en la descarga. La remoción de compuestos azufrados de corrientes gaseosas puede hacerse a través de las bacterias involucradas en el ciclo natural del azufre. (Buisman *et al.*, 1989)

1.2 Ciclo del azufre

Los compuestos azufrados que se emiten a la atmósfera son eliminados por la comunidad microbiana ecológica presente en el ambiente, capaz de oxidar o reducir dichos compuestos por medio del ciclo biológico del azufre (Figura 1.1). Este ciclo está compuesto por una parte oxidativa y otra parte reductiva. En la parte reductiva, el sulfato y el azufre funcionan como aceptores de electrones en las rutas metabólicas usadas por las bacterias

sulfatorreductoras. En la parte oxidativa del ciclo, la oxidación de los compuestos reducidos de azufre en sulfato bajo condiciones aerobias o anaerobias, se realiza por medio de las bacterias sulfooxidantes (Robertson y Kuenen, 1992; Janssen, 1996; Hurst, C.J., 1997; Buisman, 1998).

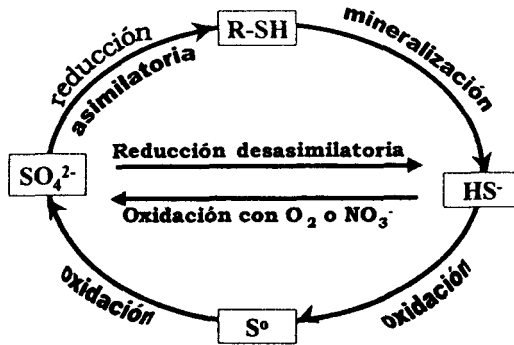


Figura 1.1 Ciclo biológico del azufre (Janssen, 1996).

1.3 Bacterias sulfooxidantes

En la eliminación de compuestos reducidos de azufre como el CS_2 y H_2S , se han identificado microorganismos que son capaces de oxidarlos a compuestos menos tóxicos, en corrientes gaseosas y acuosas. Se pueden mencionar a *Hyphomicrobium sp* (Kuenen *et al.*, 1986), *Thiobacillus thioeparus* (Kanagawa y Mikami, 1989; Cho *et al.*, 1992), *Pseudomonas acidovorans* (Zhang *et al.* 1991) y diferentes cepas de hongos (Ishikawa *et al.*, 1980).

Algunos de los microorganismos capaces de oxidar este tipo de compuestos, presentan la característica de producir azufre de manera intracelular (*Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Thiospira*) y tiene que ser separado de la biomasa. Por otra parte, las bacterias del género *Thiobacillus* son capaces de oxidar este tipo de compuestos y producir azufre extracelularmente. Los *Thiobacilli* son los más estudiados, tanto en cultivos puros como en consorcios, en procesos de eliminación de compuestos reducidos de azufre (Steudel, 1998; Buisman, 1989).

El género *Thiobacillus* es importante en el ciclo del azufre, por su habilidad celular para obtener energía para su crecimiento y mantenimiento de la oxidación de compuestos reducidos de azufre (Tabla 1.4), tales como azufre elemental, tiosulfato, tetracionato, sulfito, sulfuros politionatos y sulfuros metálicos (Tano *et al.* 1996; Buisman *et al.* 1989; Kelly, 1988; Sublette, 1987; Aleem, 1977). Los *Thiobacillus* son bacterias gram negativas, pequeñas, en forma de bastoncillos, móviles gracias a un flagelo polar (aunque también pueden ser inmóviles).

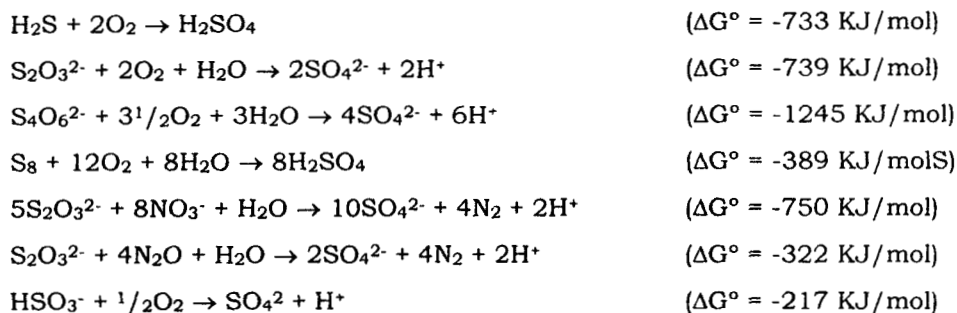
Tabla 1.4 Donador de electrones para algunas especies de microorganismos litotróficos

Especie	Donador de electrones	pH para el crecimiento
<i>Crecimiento deficiente en medios orgánicos</i>		
<i>T. thioparus</i>	H ₂ S, S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>T. thiooxidans</i>	S ⁰	2-5
<i>T. ferrooxidans</i>	S ⁰ , H ₂ S, Fe ²⁺	1.5-4
<i>Crecimiento bueno en medios orgánicos</i>		
<i>T. novellus</i>	S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>T. intermedius</i>	S ₂ O ₃ ²⁻	3-7
<i>Litótrofos filamentosos sulfurosos</i>		
<i>Beggiatoa</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻	6-8
<i>Thiothrix</i>	H ₂ S	6-8
<i>Otros géneros</i>		
<i>Thermothix</i>	H ₂ S, S ₂ O ₃ ²⁻ , SO ₃ ²⁻	6.5-7.5
<i>Sulfolobus</i>	H ₂ S, S ⁰	1-4

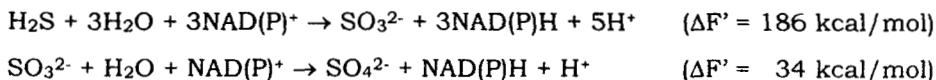
Fuente: Janssen, 1996.

Las bacterias que tienen este tipo de metabolismo, oxidan compuestos reducidos de azufre a sulfato, bajo condiciones aerobias o anaerobias y transfieren los electrones al oxígeno (o nitrato), que actúa como aceptor final de electrones. Esto conlleva a una formación directa de ATP, mientras que el NAD(P)H es sintetizado por el consumo de energía del flujo inverso de electrones. El ATP y el NAD(P)H son necesarios para la fijación de CO₂.

En los microorganismos del género *Thiobacilli* hay tres sistemas potenciales de oxidación de azufre, los dos primeros sistemas involucran reacciones de rendimiento de energía a partir de la oxidación de compuestos inorgánicos de azufre, donde el aceptor final de electrones es el oxígeno molecular en sistemas aerobios y por oxianiones del nitrógeno, como nitrato, nitrito, bajo condiciones anaerobias. Mientras todos los *Thiobacilli* catalizan la oxidación aerobia de compuestos inorgánicos de azufre, la oxidación anaerobia con nitrato o nitrito como aceptor final de electrones ocurre solamente en *Thiobacillus denitrificans*. Las reacciones involucradas son las siguientes:



El tercer sistema de oxidación de azufre es altamente endergónico, pero es de gran importancia fisiológica ya que es el generador de poder reductor, esencial para la asimilación reductiva de bióxido de carbono para la biosíntesis celular. (Aleem, 1977; Kelly, 1990)



1.4 Fijación de CO₂

Los electrones provenientes de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre, entran a la cadena respiratoria en diferentes puntos (dependiendo del potencial de reducción del compuesto) y son transportados al oxígeno molecular (Figura 1.2), generando un potencial de membrana que lleva a la síntesis de ATP mediante una fosforilación oxidativa. Los electrones necesarios para la fijación de bióxido de carbono (CO₂) provienen del transporte inverso de electrones que finalmente producen NADPH. Los potenciales de reducción relativamente elevados del S₂O₃²⁻ o del S⁰ dan por resultado una cadena de transporte de electrones más bien abreviada con fines de energía y una ruta más bien larga para la reducción de NADPH. Esta última es, desde luego, una serie de reacciones que dependen de la energía. Estas limitaciones bioquímicas son en parte responsables de las tasas de crecimiento relativamente pobres de la mayoría de los litótrofos de azufre (Madigan *et al.* 1999).

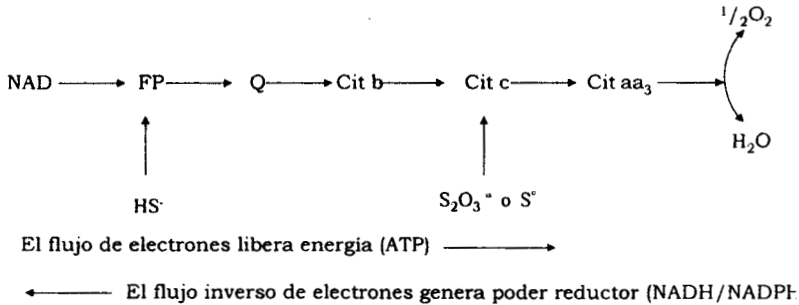


Figura 1.2 Transporte de electrones en *Thiobacillus* (Madigan *et al.* 1999)

El género *Thiobacilli* es capaz de crecer autotróficamente con CO₂ como única fuente de carbono. Los estudios sobre fijación de CO₂ han demostrado que las reacciones del Ciclo de Calvin (Figura 1.3) son las responsables de la fijación de CO₂ en este litótrofo.

El primer paso en la reducción del CO_2 es la reacción catalizada por la enzima *ribulosa bifosfato carboxilasa*, que participa en la reacción entre el CO_2 y la ribulosa bifosfato, dando lugar a la formación de dos moléculas de ácido 3-fosfoglicérico (PGA), uno de los cuales contiene el átomo de carbono proveniente del CO_2 . El PGA constituye el primer intermediario identificable en el proceso reductivo del CO_2 . El átomo de carbono en el PGA está todavía al mismo nivel de oxidación que estaba en el CO_2 ; los dos pasos siguientes implican la reducción del PGA a un nivel de oxidación del carbohidrato. En estos pasos, el ATP y el NADPH son necesarios. El primero participa en la reacción de fosforilación que activa al grupo carboxilo, mientras que el segundo participa en la reducción misma. Tenemos entonces que el átomo de carbono proveniente de CO_2 está ahora en un nivel de reducción de carbohidrato (CH_2O) pero sólo uno de los átomos de carbono de gliceraldehido fosfato ha derivado del CO_2 , los otros dos provienen de la ribulosa bifosfato. La mayor parte de las reacciones que restan en el ciclo de Calvin implican reacomodamientos para producir nuevas moléculas de ribulosa bifosfato con parte del carbono que va a la síntesis de nuevas células (Madigan *et al.*, 1999)

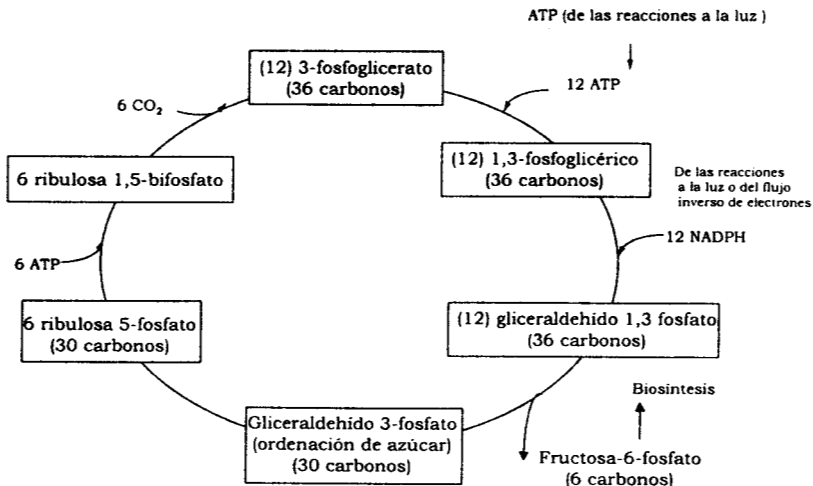


Figura 1.3 Ciclo de Calvin a partir del carbono de CO_2

1.5 Rutas metabólicas oxidativas de los compuestos azufrados

La transformación biológica de los compuestos de azufre inorgánico es difícil de estudiar, debido a la reactividad química del sustrato y a los intermediarios metabólicos. El reciente desarrollo en bioquímica, enzimología y biología molecular de la oxidación de azufre en bacterias litótrofas facultativas y obligadas se resume con la existencia de al menos dos rutas principales de oxidación de tiosulfato (azufre y sulfuro). Éstas son identificadas como la ruta de oxidación de azufre de *Paracoccus* (PSO) y la ruta del intermediario S₄ (S4I). La primera ocurre en organismos tales como *Paracoccus* (*Thiobacillus*) *versutus* y *P. denitrificans* y posiblemente en *Thiobacillus novellus* y *Xanthobacter* spp. (no forman politionatos). La última ruta es característica de los quimiolitótrofos obligados (por ejemplo, *Thiobacillus tepidarius*, *T. neapolitanus*, *T. ferrooxidans*, *T. thiooxidans*) y especies facultativas tales como *T. acidophilus* y *T. aquaesulis*. Esta ruta incluye la formación de politionatos (Kelly *et al.* 1997).

La ruta identificada como la ruta de oxidación de azufre por *Paracoccus versutus* se presenta en la Figura 1.4. El sistema multienzimático tiosulfato oxidasa (TOMES) consiste de una enzima (enzima A), que une una mol de tiosulfato por mol de enzima e interactúa con una segunda enzima (enzima B) y los citocromos c₅₅₁ y c_{552.5} para la conversión estequiométrica del tiosulfato a sulfato. Los cuatro componentes son requeridos para la oxidación de tiosulfato, los dos componentes multihem tipo c son esenciales para el sistema, ya que aparentemente funcionan como acarreadores de electrones en el TOMES, para transferir electrones de la oxidación del tiosulfato a los citocromos c. Todo el proceso catalizado por TOMES procede de una manera integrada sin intermediarios libres (Kelly *et al.* 1997).

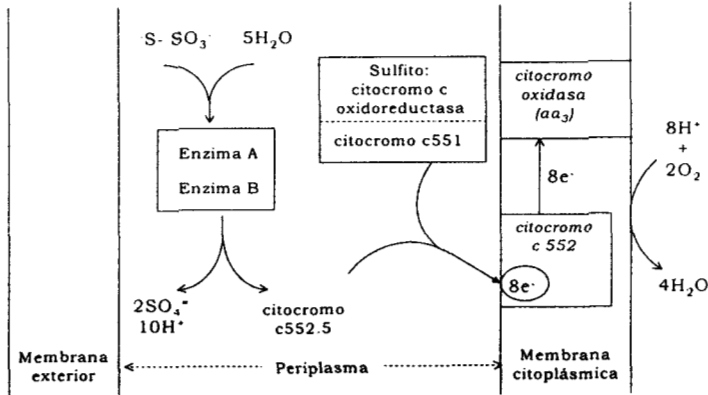


Figura 1.4 Mecanismo propuesto para la oxidación de tiosulfato por *P. versutus* (Kelly, 1988, Kelly 1989, Kelly et al. 1997).

La ruta de oxidación periplásmica de tiosulfato y oxidación citoplásmica de tetrionato por *Thiobacillus tepidarius* se presenta en la Figura 1.5. Esta ruta conserva el concepto de las interacciones químicas extracelulares de politionatos, pero de manera intracelular involucra al tetrionato como intermediario de la oxidación del tiosulfato. En primer lugar, el tiosulfato es oxidado a tetrionato en el periplasma del microorganismo, donando sus electrones directamente al citocromo c. Después, el tetrionato es oxidado a sulfito en el citoplasma, que a su vez es oxidado a sulfato liberando 8 electrones que se incorporan a nivel de citocromo c. Es posible que el citocromo c pueda tener una función sólo en la oxidación terminal.

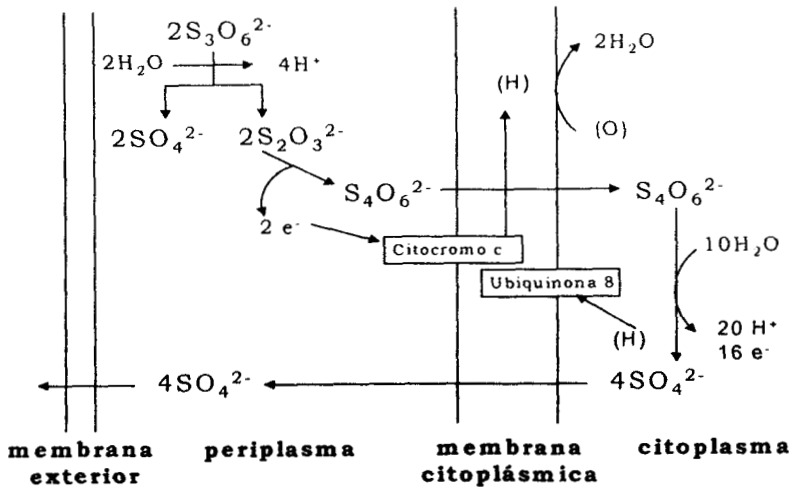


Figura 1.5 Oxidación periplásmica de tiosulfato por *T. tepidarius* (Kelly 1989, Kelly *et al.* 1997).

Suzuki (1999) propone un mecanismo de oxidación de tiosulfato (Figura 1.6), involucra el rompimiento inicial del enlace S-S por la enzima rodanasa con la formación de sulfito y azufre elemental. La rodanasa es una enzima soluble pero se desconoce su localización en la célula. El azufre se encuentra como un coloide asociado a la membrana y puede a su vez ser oxidado posteriormente cuando se ha agotado el tiosulfato disponible. Si es baja la concentración del tiosulfato, el azufre elemental no es acumulado, sino probablemente es oxidado tan pronto como se forma, aunque este mecanismo no está bien establecido. El sulfito reacciona con el AMP, se separan dos electrones y se forma fosfosulfato de adenosin (APS). Los electrones separados son transferidos al oxígeno a través del sistema citocromo, lo cual conduce a la formación de enlaces fosfato de alta energía mediante la fosforilación oxidativa. Después ocurre una fosforilación a nivel de sustrato en la que el APS reacciona con Pi y se convierte en ADP y sulfato. El segundo mecanismo envuelve al tiosulfato citocromo c oxidoreductasa, los intermediarios (S° y SO_3^-) propuestos no son detectados en la reacción.

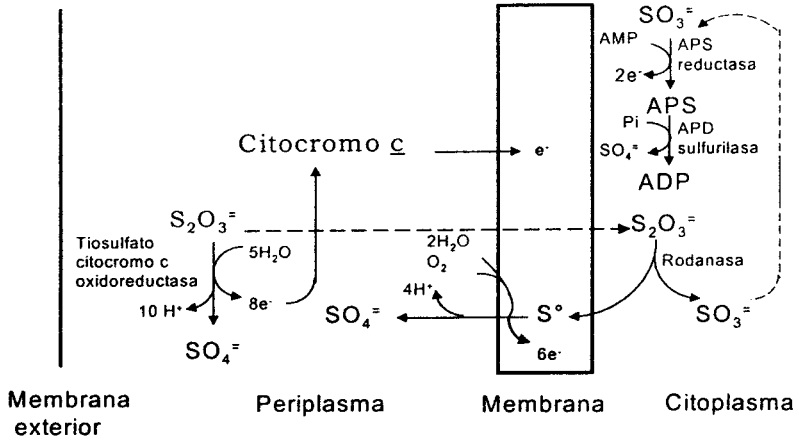
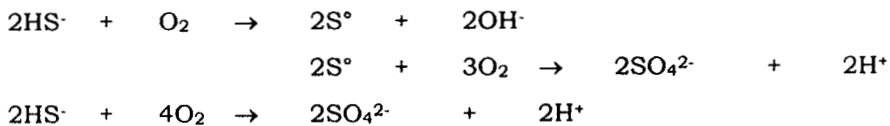


Figura 1.6 Oxidación de tiosulfato por la vía de la enzima rodanasa (Suzuki, 1999).

2. ANTECEDENTES

2.1 Oxidación de H₂S

La oxidación biológica del sulfuro a sulfato procede en dos etapas. En la primera etapa, el sulfuro pierde dos electrones y en la segunda etapa, el azufre es oxidado a sulfito y después a sulfato. Las siguientes reacciones ocurren en un sistema aerobio de remoción de sulfuros (Buisman *et al.* 1990).



En plantas de tratamiento biológico la formación de azufre elemental es preferida sobre la formación de sulfatos por varias razones. Primera, el azufre elemental es insoluble en agua y puede ser removido de la corriente acuosa; el azufre recuperado puede ser purificado y reutilizado como materia prima, por ejemplo, en procesos de biolixiviación. Segunda, la formación de sulfato requiere cuatro veces más oxígeno y en consecuencia un alto consumo de energía para su aireación (Janssen *et al.* 1997).

Sublette (1987) realizó un estudio sobre la eliminación biológica de ácido sulfhídrico (H₂S), utilizando un cultivo de *Thiobacillus denitrificans*. Demostró que el contenido de H₂S en corrientes gaseosas puede ser reducido a concentraciones muy bajas, si el reactor es operado bajo condiciones limitantes de sulfuro. El H₂S es un sustrato inhibitorio, pero la inhibición del crecimiento se observó en concentraciones mayores a 200 µM. Durante la oxidación de H₂S no se detectó azufre elemental.

Buisman *et al.* (1989, 1990a, 1990b), implementaron un proceso biotecnológico para la eliminación de sulfuros, basándose en el principio de que el sulfuro es convertido a azufre elemental y puede separarse por sedimentación. Sus resultados mostraron que una concentración inicial alta de sulfuros (100 mg/L) en el reactor, aparentemente no inhibe la oxidación de sulfuros tan seriamente que sea necesaria la dilución de las aguas residuales. Observaron que la tasa de producción de sulfatos puede ser limitada controlando la concentración de oxígeno y que la producción de azufre es máxima a concentraciones de oxígeno de 1 mg/L.

Ongcharti *et al.* (1989) inmovilizaron *T. denitrificans* en un cocultivo con heterótrofos formadores de flóculos para la remoción de ácido sulfhídrico (H₂S) en un reactor batch. Presumiblemente, los heterótrofos obtienen carbón orgánico para su mantenimiento y crecimiento de los productos de excreción de *T. denitrificans* y de la lisis celular. La estequiometría y cinética de la oxidación de H₂S por células inmovilizadas fueron comparables a los reportados anteriormente para cultivos con células libres.

Lizama y Sankey (1993) estudiaron la conversión de sulfuro de hidrógeno (H₂S) a azufre elemental y sulfato por *Thiobacillus thiooxidans*. La conversión inicial de azufre fue mucho más rápida que la subsecuente oxidación a sulfato. La velocidad de remoción de H₂S se incrementó con el área superficial y con el tiempo. El número de bacterias aumentó lentamente con el tiempo, teniendo una gran importancia la concentración inicial de bacterias en la columna. La velocidad total de formación de sulfatos fue cuatro veces más lenta que la oxidación de H₂S y con acumulación de azufre en el sistema.

2.2 Oxidación de azufre elemental

Konishi *et al.* (1994) estudiaron la cinética de la oxidación de azufre elemental por *Thiobacillus ferrooxidans* en un reactor batch midiendo la concentración de células adsorbidas a la superficie del azufre, la concentración de células en el medio líquido y la cantidad de azufre oxidado. La velocidad de crecimiento de las bacterias adsorbidas es proporcional al producto de la concentración de células adsorbidas y la fracción de sitios de adsorción desocupados por las células. La concentración de células adsorbidas está relacionada con la concentración de células libres, aunque el isoterma de Langmuir demostrara que la adsorción bacteriana estaba en equilibrio durante la oxidación de azufre.

Tichý *et al.* (1998) estudiaron el posible uso de azufre elemental, producido biológicamente, como sustrato para *Thiobacilli* acidófilos en biolixiviación. La velocidad de oxidación del azufre elemental se ve seriamente afectada por su limitada disponibilidad a los microbios; esta disponibilidad está determinada por el estado sólido del sustrato, que consiste en partículas de diferentes tamaños. Concluyeron que los dos procesos del ciclo microbiano de azufre, la sulfato-reducción y la oxidación parcial del sulfuro, pueden llevarse a cabo con velocidades considerablemente altas.

Sam *et al.* (1993) estudiaron el papel de las propiedades de la superficie en la adhesión de *Thiobacillus ferrooxidans* sobre los minerales. Existen dos mecanismos responsables de la biodisolución de sulfuros metálicos, el indirecto y el directo. El mecanismo indirecto opera por la acción química del sulfato férrico producido por el metabolismo bacteriano. En este mecanismo no se requiere la adhesión de la bacteria a la superficie del mineral. El mecanismo directo, por otro lado, comprende el ataque enzimático, por lo tanto, se requiere del contacto y la adhesión; después de que la bacteria está en contacto con el mineral, las enzimas presentes en la membrana exterior

llevan a cabo la disolución del mineral. Las propiedades superficiales de las bacterias que afectan la adhesión son la hidrofobicidad de la superficie celular y el potencial electrocinético.

2.3 Oxidación parcial de compuestos reducidos de azufre

2.3.1 Surfactantes

Las moléculas de los surfactantes consisten en una parte hidrofóbica y una hidrofílica. Los surfactantes tienden a concentrarse en la superficie e interfase de una solución acuosa y alterar las propiedades superficiales. El marcado efecto del surfactante sobre la tensión superficial, es debido a la tendencia de las moléculas de surfactantes a congregarse en la superficie.

La tensión superficial *per se* podría afectar el crecimiento de algunos microorganismos. El uso de Tween (ej. Tween 80, un surfactante no iónico) adicionado al medio líquido de cultivo permite el crecimiento de micobacterias suspendidos uniformemente. Al contrario, los surfactantes pueden servir como agentes antimicrobianos altamente efectivos. Los agentes catiónicos son particularmente efectivos si están acoplados con un grupo hidrofílico cargado positivamente. Agentes de este tipo rompen la membrana celular porque reaccionan con los fosfolípidos cargados negativamente, mientras que la porción no polar de la molécula penetra a la capa hidrofóbica de la membrana (Moat y Foster, 1995).

Generalmente el efecto inhibitorio de los surfactantes aniónicos es evidente en el intervalo de 100-1000 ppm. Los límites varían dependiendo de condiciones específicas como es el tipo de surfactante, la presencia de sustrato, de proteínas o de otro material, de la especie y concentración del microorganismo y del grado de aclimatación. En algunos casos el límite superior puede ser extremadamente alto.

un factor limitante para la población bacteriana. Existe una posibilidad de que la capacidad de adhesión bacteriana pudiera ser modificada después, por ejemplo, con la producción de fosfolípidos. Estos fosfolípidos contribuirían a la disolución del azufre cambiando su carácter hidrofóbico. También notaron que concentraciones mayores a 1000 ppm de Tween (con igual o ligeramente mayor adhesión inicial), la producción de ácido sulfúrico se detiene rápidamente. Esto sugiere que los efectos tóxicos de Tween 80 en concentraciones mayores a 1000 ppm podrían interferir con el crecimiento normal de *T. thiooxidans*.

2.3.2 Inhibidores

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

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

Varios autores han utilizado el NEM para la caracterización de enzimas y para establecer las rutas metabólicas de la oxidación de compuestos reducidos de azufre. En general, solamente los grupos sulfhidrilos de las proteínas más reactivos se combinan con compuestos que contienen un

enlace doble activado para formar tioéteres estables; el NEM ha demostrado ser muy útil para este propósito (Riordan y Vallee, 1971).

Lyric y Suzuki (1970a) Purificaron una enzima tiosulfato oxidasa de *T. thioparus* que cataliza la reacción de oxidación de tiosulfato a tetrionato. Los inhibidores sulfhidrilos como el p-cloromercuribenzoato (1mM) reducen aproximadamente 73% de la actividad enzimática. Los agentes quelantes (bipiridil 1 mM) reducen en 50% la actividad de la enzima. La inhibición con sulfito fue extremadamente fuerte causando una pérdida de actividad del 50% con 5 μ M. Los autores reportaron un efecto menos inhibitorio del NEM (1 mM) con respecto a otros inhibidores sulfhidrilos sobre la actividad de la enzima sulfito oxidasa en extractos de *Thiobacillus thioparus*. Asimismo, estos autores (1970b) estudiaron el efecto del NEM (1-5 mM) sobre la actividad de la tiosulfato oxidasa de *Thiobacillus thioparus*, reportando que fue necesario un periodo de incubación de 15 minutos para incrementar la inhibición. Finalmente propusieron una ruta de oxidación para compuestos inorgánicos de azufre. Cuando se utiliza tiosulfato como fuente de energía, éste puede ser metabolizado de dos formas, 1) convertido a tetrionato por la enzima tetrionato oxidasa o 2) dividido para formar azufre y sulfito. La tetrionato oxidasa parece iniciar una ruta secundaria, con altas concentraciones iniciales de tiosulfato.

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

Chan y Suzuki (1993) establecieron la oxidación estequiométrica de sulfuro a azufre por *Thiobacillus thiooxidans*. En el experimento control no se detectó azufre, pero las mezclas de reacción con células pretratadas contenían aproximadamente 1 mol S⁰/mol S²⁻ oxidado. Los resultados coinciden con la estequiometría supuesta de la oxidación, con un consumo de 0.5 mol O₂/mol S²⁻. El consumo de O₂ coincide con la oxidación de sulfuro a azufre elemental debido a la inhibición de la oxidación de azufre ($\text{H}_2\text{S} + \frac{1}{2} \text{O}_2 \rightarrow \text{S}^0 + \text{H}_2\text{O}$). Los *Thiobacilli* son capaces de oxidar sulfuro a sulfato con azufre elemental y sulfito como intermediarios ($\text{S}^{2-} \rightarrow \text{S}^0 \rightarrow \text{SO}_3^- \rightarrow \text{SO}_4^{2-}$).

Chan y Suzuki (1994) estudiaron la oxidación de tiosulfato por *T. thiooxidans* creciendo sobre azufre con células, extractos libres de células y enzima tiosulfato oxidasa. Usaron el NEM para establecer la ruta de oxidación del S₂O₃²⁻, reportando que las células tratadas con NEM no fueron capaces de oxidar azufre. Las células de *T. thiooxidans* pueden oxidar tiosulfato con un consumo de 2 mol O₂/mol S₂O₃²⁻. Las células tratadas con NEM consumieron solamente 0.5 mol O₂/mol S₂O₃²⁻ de acuerdo con la ecuación $2\text{S}_2\text{O}_3^{2-} + \frac{1}{2} \text{O}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{S}_4\text{O}_6^{2-} + 2\text{OH}^-$. Los extractos libres de células de *T. thiooxidans* oxidaron tiosulfato en altas concentraciones con 0.25 mol O₂/mol S₂O₃²⁻.

Hallberg *et al.* (1996) estudiaron la oxidación de compuestos reducidos de azufre en un sistema de células en reposo con *Thiobacillus caldus* KU, en ausencia y presencia de inhibidores y desacoplantes. Los desacoplantes 2,4 dinitrofenol (DNP, 200 μM) y cianuro de carbonilo m-clorofenil hidrazona (CCCP, 20 μM) no tuvieron efecto sobre la oxidación del tiosulfato, sugiriendo que el tiosulfato es metabolizado periplásmicamente. Por el contrario, estos desacoplantes inhibieron completamente la oxidación de S₄O₆²⁻, S²⁻, S⁰ y SO₃⁻ indicando que estos compuestos son metabolizados en el citoplasma de *T. caldus* KU. El NEM (6 mM) inhibió la oxidación de tetracionato y tiosulfato en la etapa de azufre elemental, mientras que el N-óxido 2 heptil 4

hidroxiquinolina (HQNO, 10 μM) detuvo la oxidación de tetrionato, tiosulfato y azufre elemental en la etapa de sulfito. Encontraron los siguientes intermediarios en la oxidación de compuestos reducidos de azufre: el tiosulfato fue oxidado a tetrionato, el azufre elemental fue formado durante la oxidación de tetrionato y tiosulfato y el sulfito fue encontrado como intermediario del metabolismo de tetrionato y azufre.

Visser *et al.* (1997-a) estudiaron el efecto de inhibidores, entre ellos el NEM (1 mM) y el cianuro de potasio (1 mM), sobre la actividad enzimática de la tiosulfato deshidrogenasa aislada de *Thiobacillus sp* W5. La tiosulfato deshidrogenasa cataliza la reacción de oxidación del tiosulfato a tetrionato. Sus resultados mostraron que la adición de NEM o cianuro de potasio, no inhiben la actividad enzimática. Estos mismos autores (Visser *et al.*, 1997-b) reportan que no hubo inhibición del NEM (1 mM) sobre la actividad de la flavocitocromo c sulfuro deshidrogenasa de *Thiobacillus sp* W5, aún preincubando con el inhibidor durante 5 minutos a 25 °C. La adición de 25, 100 y 500 μM de cianuro de potasio dio una inhibición sobre la actividad de 5, 75, y 95% respectivamente. El cianuro ha sido reportado como inhibidor de las enzimas de bacterias fotótrofas del azufre.

Visser *et al.* (1997-c) estudiaron la producción de azufre por *Thiobacillus* en experimentos en estado transiente. Sus experimentos demostraron que *Thiobacillus sp* cepa W5, fue capaz de convertir casi estequiométricamente el sulfuro a azufre, bajo condiciones aerobias. La presencia del sulfuro en el medio disminuye la capacidad oxidativa de la biomasa, por lo tanto acelera la acumulación de sulfuro y deteriora el sistema. Esta disminución en la capacidad oxidativa es causada probablemente por los efectos tóxicos del sulfuro, el cual ha sido reportado como un inhibidor de los *Thiobacilli* en concentraciones arriba de 150 μM . El sulfuro es acumulado cuando la conversión de azufre a sulfito es más baja que la conversión de sulfuro a azufre. Los experimentos indicaron que la formación de azufre comienza

cuando los citocromos llegan a estar saturados. Es por lo tanto tentador especular que las señales fisiológicas para la regulación de la oxidación de azufre está relacionada al grado de reducción de la cadena de citocromos. Una posibilidad es que la caída del equilibrio redox de los citocromos podrían donar electrones del par sulfuro-azufre para entrar a la cadena respiratoria, mientras la entrada de los electrones del par azufre-sulfito llega a ser más difícil. El punto medio estándar del potencial del par sulfuro-azufre es más bajo ($E_o' = -260$ mV) que el del par azufre-sulfito ($E_o' = -45$ mV). Otra posibilidad es que la enzima sulfooxidante es redox sensible y es controlada por el nivel redox de la cadena respiratoria. La sugerencia de que la actividad de la enzima sulfooxidante está regulada por redox es respaldada por la observación de que la formación de azufre ocurre bajo condiciones limitantes de oxígeno. La disponibilidad limitada de oxígeno aumentará el grado de reducción del citocromo, por lo tanto bloquea la conversión de azufre a sulfito.

Suzuki (1999) hace una revisión sobre la oxidación microbiana de compuestos inorgánicos de azufre, tanto de reacciones químicas como enzimáticas. La oxidación de tiosulfato es más compleja, existen al menos dos posibles rutas. Una es la ruta que comienza con la división del enlace S-S por la rodanasa, seguido por la enzima azufre oxidasa. En presencia de HQNO, dos moles de sulfito se acumularían por un mol de tiosulfato con el consumo de un mol de oxígeno. En presencia NEM el tiosulfato es oxidado a azufre más sulfato con $\frac{1}{2}$ mol de oxígeno. En ausencia de inhibidores, ambos átomos de azufre son oxidados a sulfato con el consumo de dos moles de oxígeno. La segunda ruta comienza con la condensación de dos moles de tiosulfato a tetratonato por la tetratonato hidrolasa. Estas dos reacciones dan la oxidación de tiosulfato a azufre y sulfato con el consumo de $\frac{1}{2}$ mol de oxígeno en presencia de NEM para inhibir la oxidación de azufre, un resultado idéntico a la primera ruta. Si están presentes ambos inhibidores, NEM y HQNO, en la primera ruta la oxidación de tiosulfato se detendría ya

que ambas reacciones de oxidación de azufre y sulfito son inhibidas, pero no en la segunda ruta, ya que la oxidación de tiosulfato no es inhibida.

En el grupo de investigación del Dr. Revah (UAM-Iztapalapa) se han realizado varios trabajos sobre el estudio de la oxidación de compuestos reducidos de azufre. Revah *et al.* (1995) utilizaron un consorcio sulfooxidante para la oxidación de bisulfuro de carbono (CS_2) y ácido sulfhídrico (H_2S). Observaron que el consorcio crece y oxida dichos compuestos a un pH de 7 y a una temperatura de 30°C , obteniéndose como producto final SO_4^{2-} (H_2SO_4). Observaron que concentraciones mayores de $20 \text{ gSO}_4^{2-} / \text{L}$ tienen un efecto negativo sobre la oxidación, por lo que es necesario neutralizar el medio de cultivo. Determinaron algunos parámetros cinéticos como K_s ($9.03 \text{ mg CS}_2/\text{L}$) y $V_{\text{máx}}$ ($3.4 \text{ mg CS}_2/\text{gprot}\cdot\text{min}$).

Dentro de la aplicación de los procesos biológicos de eliminación de compuestos reducidos de azufre, Trinidad (1996) estudió la oxidación de CS_2 en un biolavador de lecho escurrido (BLE) a nivel planta piloto. En el sistema trataron flujos de 150 L/min de CS_2 con un 93% de eficiencia de eliminación y se alcanzó una tasa de degradación de $300 \text{ gCS}_2/\text{m}^3\cdot\text{h}$.

Asimismo, Torres (1998) llevó a cabo estudios en un biolavador de lecho escurrido (BLE). Los resultados mostraron que el tiosulfato de sodio puede ser utilizado como fuente alterna de azufre sin alterar la actividad sulfooxidante. Al utilizar medio de cultivo con extracto de levadura observó un crecimiento de la población pero no de la sulfooxidante, pues no hubo un incremento en la oxidación de CS_2 . El antiespumante mostró un efecto negativo sobre la actividad sulfooxidante y no observó S^0 como esperaba. Al operar el sistema por pulsos, observó que en periodos similares de encendido y apagado, el sistema tiene una actividad biológica constante sin mostrar variaciones.

En los estudios realizados por Estrada (1998) y Alcántara (1999) se evaluó el efecto de algunos factores que interfieren en el proceso de eliminación de compuestos azufrados, utilizando como modelo al CS_2 por medio de un consorcio sulfooxidante. El cinc en concentraciones hasta de 150 mg/L no presentó efecto alguno sobre la oxidación de CS_2 . En cuanto al tipo de poblaciones encontradas en el consorcio observó la presencia de hongos, levaduras y bacterias, siendo estas últimas las que presentaron mayor capacidad sulfooxidante ($1.8 \text{ mgCS}_2/\text{gP}^*\text{min}$). Los intermediarios de la oxidación biológica del CS_2 realizada por el consorcio sulfooxidante son, en la fase gaseosa, el sulfuro de carbonilo (COS) y el ácido sulfhídrico (H_2S); en la fase líquida, azufre (S^0) y sulfato (SO_4^*) como producto final. En estos trabajos se compararon las velocidades de oxidación de diferentes compuestos azufrados y se observó que el sulfhídrico y bisulfuro de carbono son oxidados rápidamente con respecto a los otros.

El consorcio utilizado en los estudios anteriores se adaptó a tiosulfato de sodio en un reactor en continuo. Este sistema ha estado en operación aproximadamente 3 años. Durante la oxidación de los compuestos reducidos de azufre se obtiene sulfato como producto final; sin embargo, se prefiere la formación de azufre elemental, porque el azufre es insoluble y por lo tanto puede ser removido de la corriente acuosa y reutilizado, y porque la formación de sulfato requiere cuatro veces más oxígeno y en consecuencia un alto consumo de energía para su aireación.

Por lo anterior se planteó estudiar el efecto de la adición de inhibidores de cadena respiratoria y de actividad enzimática, surfactantes y el efecto de la aireación. La finalidad del estudio fue la oxidación parcial de tiosulfato con la posterior recuperación de azufre elemental sin alterar la eficiencia de la oxidación.

OBJETIVOS

General

Estudiar el efecto de surfactantes, inhibidores de cadena respiratoria, e inhibidores de actividad enzimática sobre la acumulación de azufre elemental durante la oxidación de compuestos azufrados en Thiobacilli sulfooxidantes utilizando como modelo al $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$.

Particulares

1. Evaluar el efecto de la adición del surfactante no iónico H-10 sobre la acumulación de azufre elemental durante la oxidación de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilizando un consorcio sulfooxidante y *T. thioparus* ATCC 23645.
2. Evaluar el efecto de la adición del cianuro, como inhibidor de cadena respiratoria, sobre la acumulación de azufre elemental durante la oxidación de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilizando un consorcio sulfooxidante y *T. thioparus* ATCC 23645.
3. Evaluar el efecto de la adición de la N-etilmaleimida, como inhibidor de la actividad de las enzimas tiosulfato oxidasa y azufre oxidasa, sobre la acumulación de azufre durante la oxidación de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilizando un consorcio sulfooxidante y *T. thioparus* ATCC 23645.
4. Evaluar el efecto de la aireación sobre la acumulación de azufre durante la oxidación de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ utilizando un consorcio sulfooxidante y *T. thioparus* ATCC 23645.

MATERIAL Y MÉTODOS

Inóculo y medio de cultivo

Los inóculos que se utilizaron fueron un consorcio sulfooxidante proveniente de un cultivo continuo adaptado a tiosulfato, que se encuentra operando desde 1996 y la cepa de *Thiobacillus thioparus* ATCC 23645. Los microorganismos se crecieron aeróbicamente a 30 °C en un medio con tiosulfato reportado por Sublette (1987), el pH se ajustó a 6 (Tabla 4.1). El tiosulfato se usó como única fuente de energía en una concentración de 20 g/L. La fuente de *T. thioparus* y del consorcio fueron preparados del medio con tiosulfato, previamente crecidos por 48 horas y mantenidos en medio mineral con tiosulfato a 0 °C. El cultivo de donde se obtenía el inóculo para los experimentos fue desarrollado inoculando 2 ml de una suspensión de células (DO_{540} ajustada a 0.5 con solución salina) en un matraz Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 100 ml de medio. Los cultivos se incubaron a 180 rpm y después de 48 horas (fase estacionaria de crecimiento), se centrifugaron (10 000 rpm) y se lavaron con solución salina y diluidos a una DO_{540} de 1.0. Estos microorganismos autótrofos utilizan como fuente de energía $Na_2S_2O_3$ y como fuente de carbono al $NaHCO_3$ (CO_2). Para la cepa pura se utilizaron condiciones estériles de crecimiento, por ello el tiosulfato $Na_2S_2O_3$ y el $NaHCO_3$ fueron esterilizados por filtración y adicionados antes de la inoculación. Para el consorcio no se implementaron condiciones de esterilidad.

Sistema experimental

Para los estudios de oxidación de tiosulfato se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml, conteniendo 100 ml de medio mineral y 5 % (v/v) del inóculo preparado anteriormente, incubados a una temperatura de 30 °C y 180 rpm de agitación.

Tabla 4.1 Medio de cultivo (Sublette, 1987)

Ompuesto	Concentración (g/L)	Solución de elementos traza	
Na ₂ HPO ₄	1.20	Compuesto	g/L
KH ₂ PO ₄	1.80	AlCl ₃ *6H ₂ O	0.51
MgCl ₂ *7H ₂ O	0.40	KI	0.14
NH ₄ Cl	0.50	KBr	0.14
MnCl ₂	0.02	H ₃ BO ₃	3.06
CaCl ₂	0.03	ZnCl ₂	0.28
FeCl ₃	0.02	CuCl ₂ *2H ₂ O	0.33
NaHCO ₃	1.00	NiCl ₂ *6H ₂ O	0.51
Solución de metales pesados	15 ml	CoCl ₂ *6H ₂ O	0.51
Agua mineral	50 ml	SnCl ₂ *2H ₂ O	0.14
Na ₂ S ₂ O ₃	20	BaCl ₂ *2H ₂ O	0.16
Solución de metales pesados		Na ₂ MoO ₄ *2H ₂ O	0.16
EDTA	1.50 g/L	CuSeO ₄ *2H ₂ O	0.14
ZnSO ₄ *7H ₂ O	0.10 g/L	NaVO ₃	0.024
Solución de elementos traza	6.0 ml/L.		

Efecto de surfactante (H-10) sobre la acumulación de azufre

Para evaluar el efecto del surfactante se adicionaron al sistema experimental concentraciones de 50, 100 y 200 ppm de surfactante y un sistema control. El surfactante utilizado es una emulsión de silicón H-10, catalogado como no iónico de la marca Dow Corning.

Efecto de inhibidores sobre la acumulación de azufre

Para evaluar el efecto de inhibidores como N-etilmaleimida (0.01-1.25 mM), cianuro de sodio (0.5-2 mM) y tiocianato de amonio (10-50 mM), se adicionaron las diferentes concentraciones al sistema experimental.

Efecto de la aireación sobre la acumulación de azufre

Para evaluar el efecto de la aireación sobre el crecimiento y la acumulación de azufre se varió el volumen de medio en los matraces Erlenmeyer de 250 ml entre 50-200 ml de medio.

Métodos de Análisis

Biomasa

La biomasa se determinó indirectamente por su contenido de proteína, ésta fue cuantificada por el método de Lowry (1951).

Azufre elemental

Se determinó azufre elemental por espectrofotometría (Bartlett y Skoog, 1954). Este método se basa en la reacción de cianuro de sodio con azufre elemental para formar tiocianato de sodio. En una solución de acetona, el azufre elemental reacciona rápida y cuantitativamente con cianuro para dar el complejo tiocianato; el tiocianato puede ser determinado colorimétricamente por la adición de acetona con cloruro férrico. El método es sensible para concentraciones de 2 ppm de azufre elemental. El método alcanza una precisión del 98-99%.

$S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} , SO_4^{2-} y $S_4O_6^{2-}$

La detección y cuantificación de $S_2O_3^{2-}$, SO_3^{2-} , SO_4^{2-} y $S_4O_6^{2-}$ se realizó por cromatografía de líquidos (HPLC), utilizando un detector PDA (Photo Diode Array 996, Waters) con una longitud de onda de 308 nm. Se usó biftalato de potasio (0.04 M, pH 4) como fase móvil a un flujo de 0.8 ml/min. Se utilizó una columna de intercambio iónico (IonoSpher-A), de 250 mm x 4.5 mm, empacada con sílica. La temperatura a la cual se realizó la detección fue de 30 °C y se utilizó una presión de 1500 psi. Obteniendo los siguientes tiempos de retención $t_{rSO_3^{2-}} = 5.5$ min, $t_{rSO_4^{2-}} = 8.5$ min, $t_{rS_2O_3^{2-}} = 9.5$ min y $t_{rS_4O_6^{2-}} = 10.5$ min.

Se realizaron curvas estándar de los compuestos con las siguientes concentraciones, SO_3^{2-} (126-1260 mg/L), SO_4^{2-} (14.2-142 mg/L), $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ (24.8-248 mg/L) y $\text{S}_4\text{O}_6^{2-}$ (30.6-306 mg/L), obteniendo en todos los casos una relación lineal.

Preparación de la muestra

Para el análisis en el HPLC, se hace una dilución de la muestra (1:10) y se filtra con una membrana de nylon de 13 mm de diámetro y 0.45 μm de tamaño de poro.

RESULTADOS

5.1 Oxidación de tiosulfato

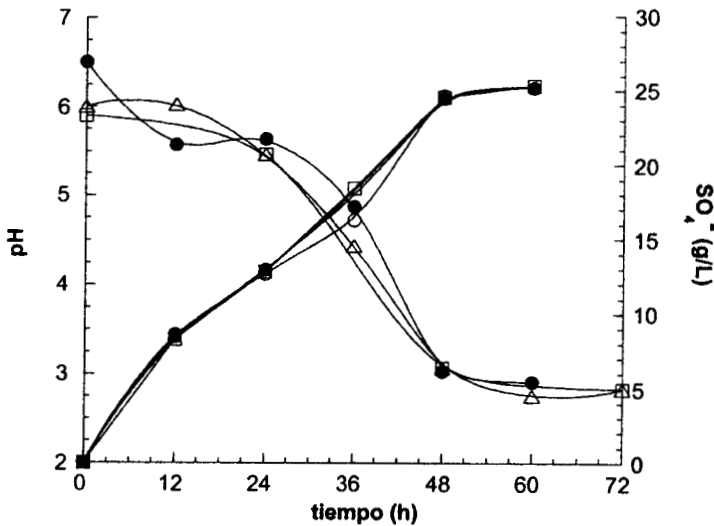
De acuerdo a estudios realizados por varios autores, se conocen al menos dos rutas principales de oxidación de tiosulfato (azufre y sulfuro), éstas son identificadas como la ruta de oxidación de azufre de *Paracoccus* (PSO) y la ruta del intermediario S₄ (S4I). En la primera no se forman politionatos y en la segunda ruta, característica de los quimiolitótrofos obligados (por ejemplo, *T. tepidarius*, *T. neapolitanus*, *T. ferrooxidans* y *T. thiooxidans*), incluye la formación de politionatos (Kelly *et al.* 1997). Por su parte Suzuki (1999) proponen dos mecanismos de oxidación de tiosulfato. El primero envuelve la división inicial del enlace S-S por la rodanasa con la formación de sulfito y azufre elemental. El azufre puede ser oxidado posteriormente cuando se ha agotado el tiosulfato disponible, si es baja la concentración del tiosulfato, el azufre no es acumulado, sino probablemente es oxidado tan pronto como se forma, aunque este mecanismo no está bien establecido. Una característica de la oxidación de compuestos reducidos de azufre es la acidificación del medio, resultado de la producción de protones. El ácido formado por la oxidación de compuestos reducidos de azufre es el ácido sulfúrico (H₂SO₄).

Para evaluar el comportamiento de las cepas al utilizar tiosulfato de sodio como única fuente de energía, se realizó una cinética de crecimiento de ambos cultivos con 20 g/L, los resultados se presentan a continuación.

5.1.1 Consorcio sulfooxidante

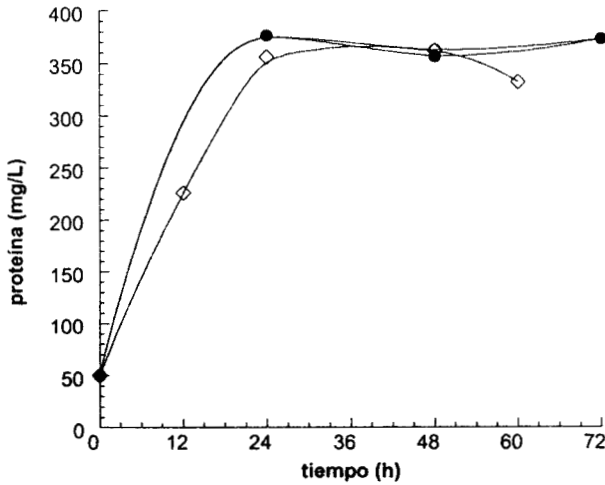
Los resultados de la acumulación de sulfato y el comportamiento del pH durante la oxidación de tiosulfato de sodio por el consorcio sulfooxidante, se presentan en la gráfica 5.1. El pH del medio disminuye lentamente

durante las primeras 24 horas, hasta alcanzar un valor cercano a 5, la concentración de sulfatos es de 12 g/L. Después de las 24 horas observamos una disminución en el valor del pH hasta 3, debido un rápido descenso del pH, dado que el punto de equivalencia del sistema amortiguador es 4. La acumulación de sulfatos alcanza su valor máximo (25 g/L) aproximadamente a las 48 horas. Posteriormente el valor del pH se mantiene constante, por el agotamiento del sustrato (tiosulfato). Durante la oxidación biológica de tiosulfato por el consorcio se observa únicamente sulfato, sin la formación de intermediarios como SO_3^- o S^0 .



Gráfica 5.1 pH y acumulación de sulfato por el consorcio sulfooxidante

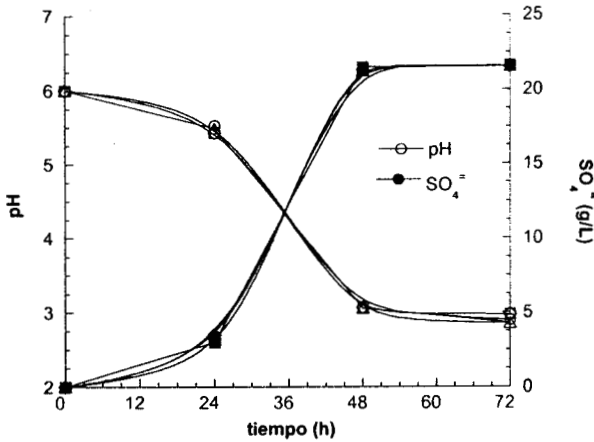
En la gráfica 5.2 se presenta el crecimiento del consorcio sulfooxidante. El inóculo que se utilizó en los experimentos se encuentra adaptado a tiosulfato, por lo que no se observa una fase de adaptación y alcanza la fase estacionaria en las primeras 24 horas. La concentración máxima de proteína que se tiene es de 400 mg/L. Posiblemente la ruta de oxidación de tiosulfato por el consorcio sea la de *Paracoccus*, propuesta por Kelly *et al.* (1997), ya que no se detectan intermediarios.



Gráfica 5.2 Crecimiento del consorcio sulfoxidante

5.1.2 *Thiobacillus thioparus*

La acumulación de sulfatos y el comportamiento del pH durante la oxidación de tiosulfato de sodio por *T. thioparus* se presenta en la gráfica 5.3. El pH disminuye lentamente durante las primeras 24 horas, alcanzando un valor de 5.5 aproximadamente. A partir de las 24 horas se observa una rápida disminución del pH hasta un valor cercano a 3, debido a que el punto de equivalencia del sistema amortiguador es 4. La producción de sulfatos en las primeras 24 horas fue de 5 g/L y alcanza el máximo a las 48 horas (23 g/L). Durante la oxidación de tiosulfato por *T. thioparus* se observó la presencia de bajas concentraciones de sulfito y azufre elemental. Estos resultados coinciden con la ruta de oxidación via enzima rodanasa propuesta por Suzuki (1999).



Gráfica 5.3 pH y acumulación de sulfato por *T. thioparus*.

En la gráfica 5.4 se presenta el crecimiento de *T. thioparus* durante la oxidación de tiosulfato de sodio. En las primeras 24 horas el cultivo alcanza la fase estacionaria con una concentración máxima de proteína de 800 mg/L). Al igual que en el consorcio, no se observa la fase de adaptación debido a que el inóculo se encuentra adaptado a la fuente de energía.

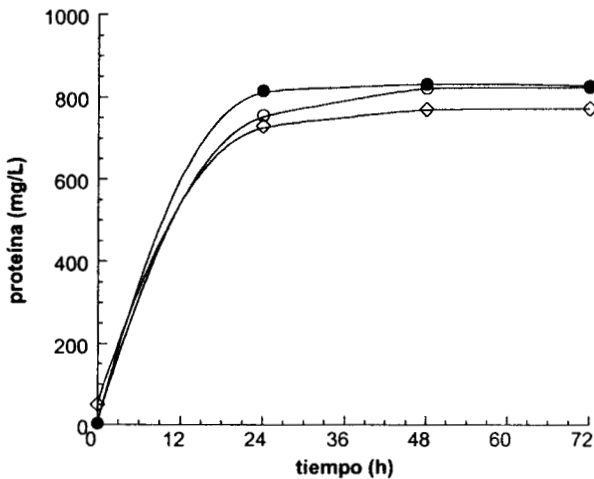


Figura 5.4 Crecimiento de *T. Thioparus*

5.2 Adición de surfactante

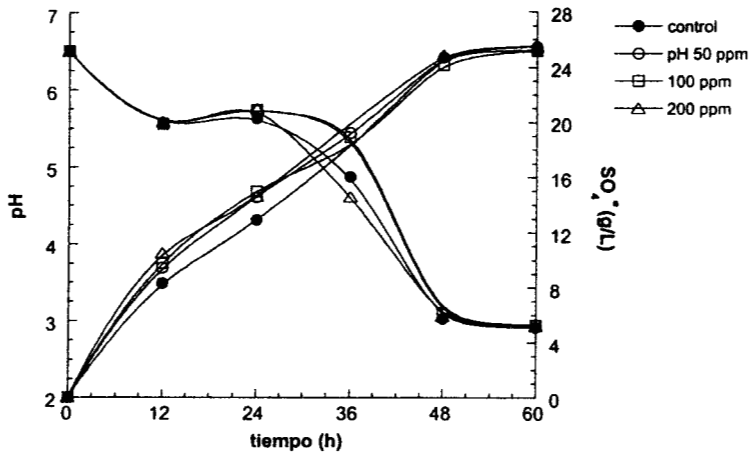
Se ha reportado que el uso de surfactantes permite una mayor adhesión de *Thiobacillus thiooxidans* al azufre elemental (Otero *et al.*, 1995), lo cual permite un incremento en la velocidad de oxidación del mismo. Existe una diferencia entre el azufre comercial y el azufre producido por la oxidación parcial del H_2S o $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ por los microorganismos, Steudel (1987) ha reportado que el azufre biológico es oxidado más rápidamente debido a su estructura hidrofílica. De acuerdo a Swisher (1987) los surfactantes aumentan la permeabilidad de la membrana permitiendo una mayor secreción del azufre al medio de cultivo, lo cual es favorable debido a que éste puede separarse del medio, evitando así la contaminación por sulfatos, que es una de las finalidades del trabajo. La posibilidad de que los microorganismos oxiden al azufre secretado, por una mejor adhesión o transporte del mismo hacia la célula, sólo podría ocurrir en el caso de una limitación de la fuente principal de energía (tiosulfato en este estudio); que no se presenta en las condiciones evaluadas.

Con el fin de evaluar el efecto de la presencia de surfactante sobre la acumulación de azufre en el medio, se observó su efecto utilizando concentraciones crecientes sobre el crecimiento, producción de sulfatos y pH en el consorcio sulfooxidante y *T. thioparus* ATCC 23645. Las concentraciones evaluadas fueron 50, 100 y 200 ppm. La fuente de energía de éste y los demás experimentos fue tiosulfato de sodio ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) en 20 g/L.

Se utilizó un surfactante no iónico H-10, usado como antiespumante en diferentes procesos industriales, como la preparación de compuestos limpiadores, soluciones refrigerantes, adhesivos, abrasivos, detergentes y en tratamiento de suelo contaminado con hidrocarburos. Se han recomendado concentraciones entre 10-150 ppm (Dow Corning, 1997).

5.2.1 Consorcio sulfooxidante

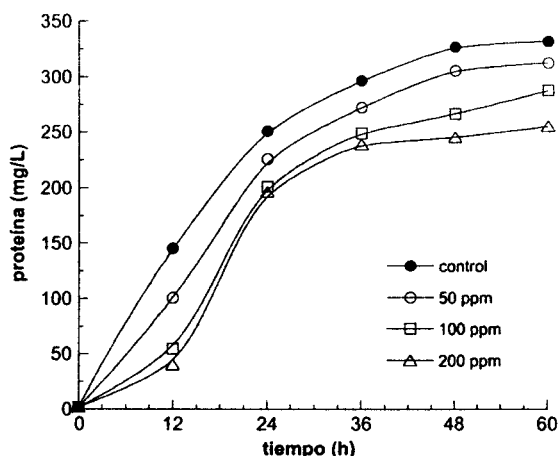
En la gráfica 5.5 se presenta el efecto de la utilización del surfactante sobre el pH y la acumulación de sulfatos. Se observa que no existe un efecto del surfactante sobre el comportamiento del pH y la velocidad de producción de sulfatos (tabla 5.1). Por otro lado, se puede decir que la oxidación del tiosulfato por el consorcio sigue un comportamiento característico: durante las primeras 24 horas el pH disminuye lentamente hasta un valor cercano a 5, en tanto que la producción de sulfatos es aproximadamente de 12 g/L. Después de las 24 horas el pH disminuye notablemente hasta un valor cercano a 3, ello corresponde a un incremento en la producción de sulfatos que alcanza su máxima conversión (25 g/L).



Gráfica 5.5 Efecto del surfactante sobre el pH y la producción de sulfatos en el consorcio sulfooxidante

En la gráfica 5.6 se presenta el efecto del surfactante sobre el crecimiento, durante las primeras 24 horas se observa una ligera disminución de la velocidad de crecimiento en función de la concentración de surfactante (tabla 5.1) a mayor concentración de surfactante es menor la velocidad de crecimiento. Se observa que aproximadamente a las 24 horas el cultivo

entra en fase estacionaria y al final del experimento (60 horas) se alcanza la concentración máxima de proteína de 300 mg/L. Se puede concluir que en presencia de surfactante no se observa acumulación de azufre elemental.



Gráfica 5.6 Efecto del surfactante sobre el crecimiento en el consorcio sulfooxidante

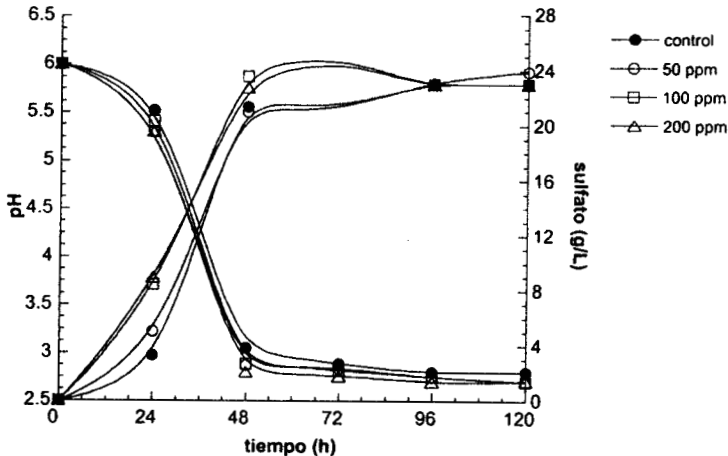
Tabla 5.1 Velocidades del consorcio sulfooxidante con surfactante

Surfactante H-10	SO ⁻⁴ (g/L*h)	Proteína (mg/L*h)
control	0.49	10.35
50 ppm	0.49	9.31
100 ppm	0.47	8.29
200 ppm	0.47	8.08

Torres (1998), reportó resultados similares utilizando el mismo consorcio sulfooxidante y CS₂ como fuente de energía. Observó por técnicas de respirometría, que la velocidad de oxidación presentó un ligero incremento; lo cual fue atribuido a un posible aumento en la disponibilidad del O₂ para los microorganismos en el biolavador.

5.2.2 *Thiobacillus thioparus*

En la gráfica 5.7 se presenta el efecto de la presencia del surfactante sobre el pH y la acumulación de sulfatos en *Thiobacillus thioparus*. Se observa que no existe un efecto del surfactante sobre el comportamiento del pH y la velocidad de producción de sulfatos (tabla 5.2). Durante las primeras 24 horas el pH disminuye lentamente hasta un valor cercano a 5.5, en tanto que la producción de sulfatos es aproximadamente de 8-5 g/L. Después de las 24 horas el pH disminuye notablemente hasta un valor cercano a 3, relacionado con un incremento en la producción de sulfatos, alcanzando la máxima conversión de sulfatos (25 g/L). El valor del pH después de las 48 horas y hasta el final de la cinética permanece constante, al igual que la producción de sulfatos.



Gráfica 5.7 Efecto del surfactante sobre el pH y la producción de sulfatos en *T. thioparus*

En la gráfica 5.8 se presenta el efecto del surfactante sobre el crecimiento de *T. thioparus*, a diferencia del consorcio sulfooxidante en la cepa de *T. thioparus* la velocidad de crecimiento aumentó ligeramente con la adición de 50 y 100 ppm. Sin embargo, con la adición de 200 ppm de surfactante el crecimiento disminuye (Tabla 5.2). Se puede observar que los valores de

proteína alcanzados por *T. thioparus* son mayores a los alcanzados por el consorcio existiendo una relación aproximada de 2.5. De la misma manera que en el caso del consorcio, no se observó acumulación de azufre elemental en *T. thioparus* por el uso de surfactantes.

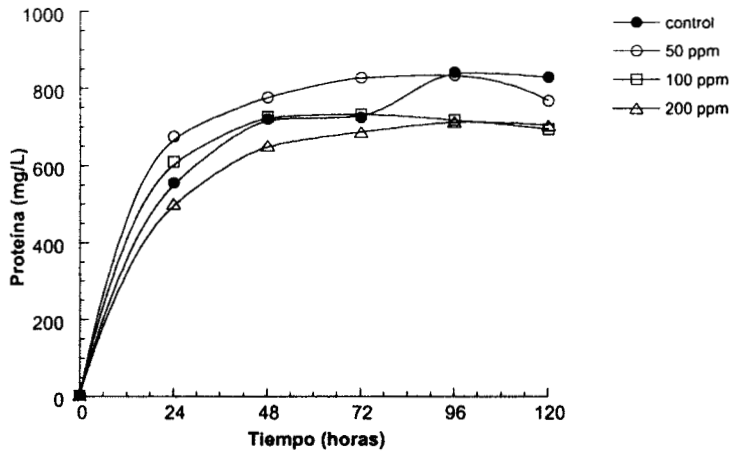


Figura 5.8 Efecto del surfactante sobre el crecimiento de *T. thioparus*.

Tabla 5.2 Velocidades de *T. thioparus* con surfactante

Surfactante (H-10)	SO ₄ ²⁻ (g/L·h) ¹	Proteína (mg/L·h)
control	0.44	23.00
50 ppm	0.45	28.00
100 ppm	0.49	25.27
200 ppm	0.47	20.74

Otero *et al.* (1995) estudiaron el efecto de un surfactante en una cepa pura de *T. thiooxidans*. Observaron que los efectos tóxicos de Tween 80 en concentraciones mayores a 1000 ppm podrían interferir con el crecimiento normal de *T. thiooxidans*. Reportan que el surfactante actúa a nivel fisiológico, donde la parte hidrofóbica reacciona y forma complejos con la doble capa lipídica de la membrana celular haciéndola más permeable; si ocurre esto, el azufre producido por la oxidación parcial de tiosulfato, que se encuentra dentro del microorganismo, es fácilmente excretado. Esto no se observó en los experimentos aquí realizados, aunque las

concentraciones evaluadas fueron cinco veces menores. Al parecer, el surfactante *per se* no favorece la acumulación de azufre en las concentraciones evaluadas. Por lo cual es posible señalar que existen otros factores ambientales, que es necesarios estudiar, para detener la oxidación de tiosulfato en azufre elemental.

5.3 Aireación

Se ha reportado que la oxidación de sulfuro se encuentra regulada por la concentración de oxígeno en el medio de cultivo (Buisman *et al.*, 1989; Stefess *et al.*, 1996; Janssen *et al.*, 1997; Kelly *et al.*, 1997; Visser *et al.*, 1997). Esta regulación ocurre a nivel de la enzima azufre oxidasa, lo que permite la oxidación parcial del sulfuro, obteniendo azufre elemental como intermediario de la oxidación.

Con el fin de evaluar el efecto de la aireación sobre el crecimiento y la formación de azufre elemental se realizó el siguiente experimento, en matraces de 250 ml con diferentes niveles de llenado (Johnson, 1979) y bajo las mismas condiciones de pH, agitación, temperatura y concentración de inóculo.

En la tabla 5.3 se presentan los resultados de crecimiento y formación de azufre. Se observa un efecto negativo de la aireación sobre el crecimiento y positivo sobre la acumulación de azufre, es decir, a una menor aireación, un menor crecimiento y una mayor formación de azufre elemental. Con un volumen de llenado de 50 y 100 ml la concentración de proteína es independiente del nivel de aireación. Sin embargo, con 200 ml de medio el crecimiento se ve significativamente reducido. La concentración de proteína en el consorcio sulfooxidante decrece de un valor usual de cerca de 300 mg/L a 144 mg/L y en *T. thioparus* de 800 mg/L a 384 mg/L, la diferencia es aproximadamente 50%. El crecimiento microbiano se ve disminuido cuando se forma azufre elemental, porque la energía disponible se reduce considerablemente. Cuando se produce azufre, la energía que se genera durante el proceso es de -129.50 kJ/mol HS⁻, mientras que con la formación de sulfato es de -772.43 kJ/mol HS⁻.

El efecto es diferente sobre la acumulación de azufre, donde observamos que a un mayor volumen de llenado (menor aireación) existe una mayor concentración de azufre elemental en el medio. La estequiometría de la reacción de oxidación del sulfuro indica que se requiere cuatro veces más oxígeno para la formación de sulfatos que para la formación de azufre elemental.

Tabla 5.3 Velocidades con diferentes niveles de aireación

Nivel de medio	Consortio sulfooxidante		<i>T. thioparus</i>	
	mgProt/L	mgS/L	mgProt/L	mgS/L
50 ml	300	0	700	37
100 ml	276	0	630	35
200 ml	144	48	364	72

5.4 Adición de Inhibidores

Los electrones producidos por la oxidación de los compuestos reducidos de azufre, entran a la cadena respiratoria en varios puntos (en función del potencial de reducción de los mismos compuestos reducidos de azufre). Estos electrones son transportados al oxígeno molecular, generando todo el proceso un potencial de membrana que lleva a la síntesis del ATP mediante una fosforilación oxidativa. El poder reductor (NADPH) para la fijación de CO₂ se genera por el transporte inverso de electrones de acuerdo a (Madigan *et al.*, 1999).

En los sistemas respiratorios se ha podido deducir la existencia de vías alternas en el transporte de electrones de los sistemas respiratorios, referidas a la síntesis de citocromos del mismo potencial redox, a partir de la acción diferencial de inhibidores. La inhibición casi total y monofásica indica que a ese nivel sólo hay un camino para el flujo de electrones; una inhibición parcial o bifásica indicará que a ese punto existe una ruta alternativa poco sensible al inhibidor respiratorio (Barquera *et al.*, 1991). Existen diferentes inhibidores para cada uno de los complejos del transporte de electrones, así por ejemplo, la rotenona, el amital y la piercidina bloquean el flujo de electrones entre la NADH y CoQ reductasa; la antimicina A actúa a nivel de citocromo b y citocromo c; el cianuro y la azida bloquean el flujo entre el citocromo a y el citocromo a₃, finalmente el monóxido de carbono bloquea el transporte del citocromo a₃ al oxígeno (Dipa y Datta, 1987).

Ciertos inhibidores se han utilizado para establecer las rutas metabólicas de los thiobacilli. Los intermediarios de la oxidación de compuestos azufrados son acumulados cuando su oxidación es inhibida; N-etilmaleimida inhibe la oxidación de azufre elemental, la N-óxido 2N-heptil 4-hidroxiquinolina y la antimicina A son inhibidores de la oxidación del

sulfito (Suzuki *et al.*, 1992; Chan y Suzuki, 1993 Chan y Suzuki, 1994; Hallberg *et al.* 1996).

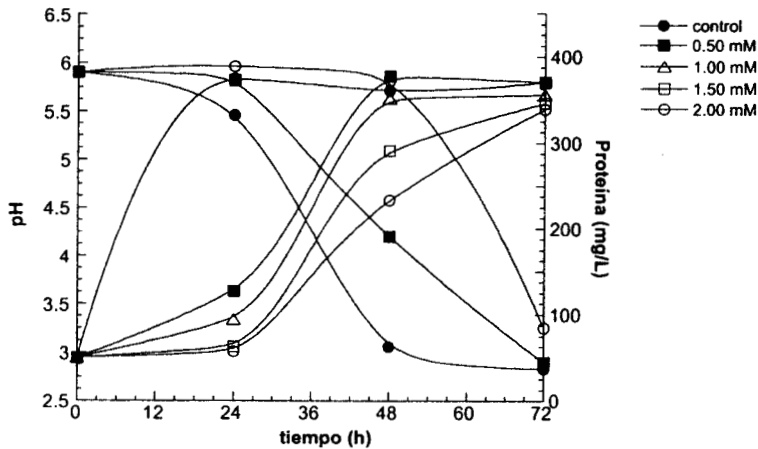
Para el estudio del efecto de los inhibidores sobre la acumulación de azufre en el medio, se evaluaron diferentes concentraciones de cianuro de sodio (0.5-2 ppm), N-etilmaleimida (NEM 0.01-1.5 ppm) y tiocianato de amonio (10-50 ppm) sobre el pH y el crecimiento del consorcio sulfooxidante y de *Thiobacillus thioparus*. El cianuro es un inhibidor en la etapa final de la cadena respiratoria; la NEM inhibe la actividad de la azufre oxidasa y el tiocianato (SCN⁻), que puede ser usado como fuente de energía, azufre, nitrógeno y carbono por bacterias autotróficas, posiblemente regule el flujo de electrones por el radical CN⁻ que contiene.

5.4.1 Cianuro de sodio

5.4.1.1 Consorcio sulfooxidante

En la gráfica 5.9 se presenta el efecto de la presencia de cianuro de sodio sobre el pH y el crecimiento del consorcio. Se observa un efecto negativo del cianuro sobre la fase exponencial del crecimiento; a una mayor concentración del inhibidor existe un mayor retardo de la fase exponencial. El valor del pH en el control durante las primeras 24 horas disminuye lentamente hasta un valor cercano a 5.5, después de las 24 horas el pH disminuye notablemente hasta un valor cercano a tres; mientras en el medio con 0.5 y 1.0 mM de cianuro, el pH disminuye ligeramente y es hasta las 72 horas que alcanza un pH de tres. Las concentraciones de 1.5 y 2 mM mantienen constante el valor del pH por 48 horas después la disminución es muy rápida alcanzando el valor de tres en las próximas 24 horas.

La velocidad de crecimiento se ve notablemente disminuida (Tabla 5.4); mientras el control alcanza valores de 13 mg/L*h, concentraciones de cianuro de 0.5 y 1.0 mM disminuyen 50% su valor (6 mg/L*h) y las concentraciones de 1.5 y 2.0 mM tienen una velocidad de crecimiento de 5 y 4 mg/L*h respectivamente, lo que equivale a una disminución del 70%. Esto se observa claramente al momento de alcanzar la fase estacionaria, el control alcanza la concentración máxima de proteína (375 mg/L) durante las primeras 24 horas y entra a la fase estacionaria, los medios con cianuro alcanzan esta fase con 24 horas de retraso. El hecho de que el crecimiento se recupere, pudiera explicarse por una degradación del cianuro con respecto al tiempo, permitiendo el crecimiento de los microorganismos, los cuales ya no son alterados por la concentración utilizada del inhibidor; mientras que, concentraciones más altas provocan la muerte de todos los microorganismos. Asimismo, se observó que una vez alcanzada la fase estacionaria la adición del inhibidor no tiene efecto alguno sobre el cultivo.



Gráfica 5.9 Efecto del NaCN sobre el pH y el crecimiento del consorcio sulfooxidante

Como se muestra en la Tabla 5.4, el uso de cianuro promovió la acumulación de azufre elemental. Sin embargo, no se observa una relación

lineal entre la concentración de cianuro y la acumulación de azufre. La acumulación de S° se puede atribuir al escaso crecimiento del consorcio y a una posible saturación por sustrato, más que al inhibidor mismo. Es decir, al parecer no es el inhibidor el que induce este efecto, aunque los experimentos hasta aquí realizados no permiten una conclusión al respecto.

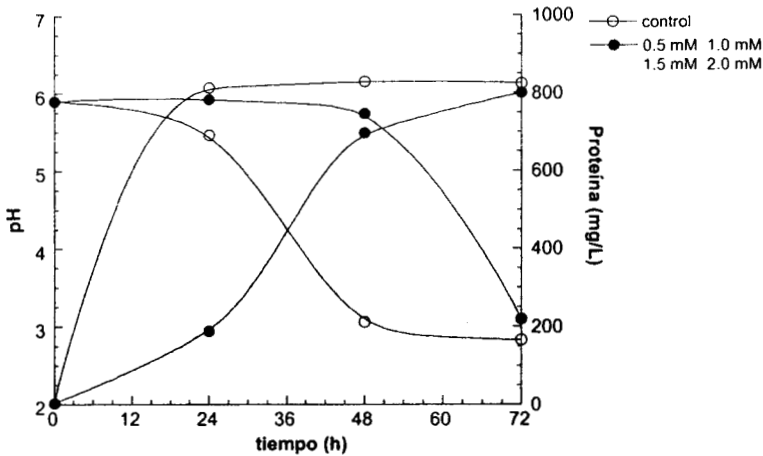
Tabla 5.4 Velocidad de crecimiento del consorcio y acumulación de azufre con NaCN

cianuro de sodio (mM)	Proteína (mg/L*h)	S° (mg/L)
control	13.56	0
0.5	6.82	26
1.0	6.28	41
1.5	5.03	40
2.0	3.82	40

5.4.1.2 *Thiobacillus thioparus*

En la gráfica 5.10 se presenta el efecto de la presencia de cianuro de sodio sobre el pH y el crecimiento. Se observa un efecto negativo del cianuro sobre la velocidad de crecimiento de *T. thioparus*. En el control durante las primeras 24 horas el pH disminuye lentamente hasta un valor cercano a 5.5, después de las 24 horas el pH disminuye hasta un valor cercano a tres; mientras en el medio con cianuro, el pH se mantiene constante por 48 horas, después la disminución es muy rápida alcanzando el valor de tres. La velocidad de crecimiento es menor con respecto al control (Tabla 5.5); mientras el control alcanza 34 mg/L*h, en los medios con cianuro la velocidad disminuye 50% su valor, alcanzando únicamente entre 14 y 18 mg/L*h. Observamos también que el control alcanza la concentración máxima de proteína (800 mg/L) durante las primeras 24 horas y entra a la fase estacionaria, los medios con cianuro alcanzan esta fase con 24 horas de retraso. Sin embargo, al final de la cinética (72 horas) se observan los mismos valores, tanto de pH como de concentración de proteína. Al igual que lo señalado para el consorcio es posible que las concentraciones de

cianuro utilizadas permitan el crecimiento de microorganismos, los cuales ya no son alterados por el inhibidor una vez que se ha degradado.



Gráfica 5.10 Efecto del NaCN sobre el pH y el crecimiento de *Thibacillus thioparus*.

Se observa también la acumulación de azufre en el medio con cianuro (Tabla 5.5), alcanzando concentraciones de azufre similares al consorcio. Nuevamente, al parecer, el efecto del inhibidor sobre la acumulación de azufre elemental es debido al efecto negativo de éste sobre el crecimiento microbiano. Sin embargo, los experimentos hasta aquí realizados no permiten aclarar el por qué de la acumulación de azufre.

Tabla 5.5 Velocidad de crecimiento y acumulación de azufre elemental con NaCN en *T. thioparus*

cianuro de sodio (mM)	Proteína (mg/L*h)	S ⁰ (mg/L)
control	33.84	0
0.5	18.48	31
1.0	16.60	36
1.5	14.82	40
2.0	14.45	45

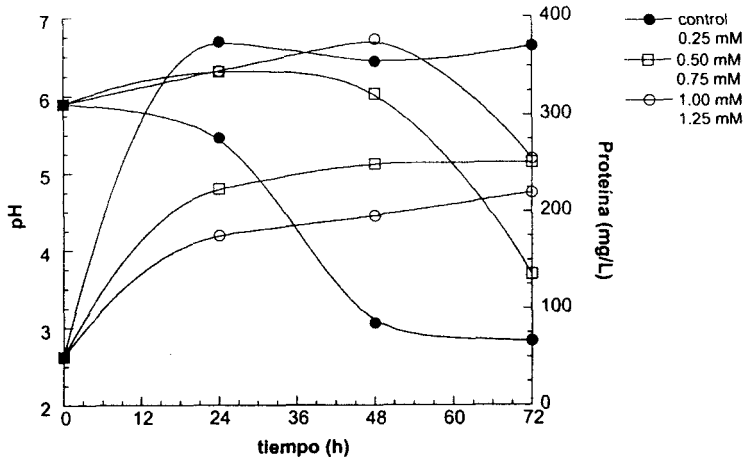
El retardo de la fase exponencial, en ambos cultivos, puede explicarse por la acción del cianuro sobre la cadena respiratoria. Como se sabe el cianuro inhibe el transporte de electrones a nivel de citocromo c, la inhibición es

parcial porque permite la oxidación del tiosulfato y el crecimiento; lo que no sucede cuando se utilizan concentraciones más altas (10 ó 50 mM) donde no se observa crecimiento ni oxidación de tiosulfato, por lo que representa una inhibición completa. Sin embargo, la energía que se genera en presencia de cianuro, no es suficiente para soportar el crecimiento de los microorganismos.

5.4.2 N-etilmaleimida

5.4.2.1 Consorcio sulfooxidante

En la gráfica 5.11 se presentan los resultados de pH y de crecimiento del consorcio sulfooxidante utilizando concentraciones crecientes de NEM (0.25-1.25). Se observa que no existe diferencia en el crecimiento y en la disminución de pH entre el control y la concentración de 0.25 mM, en tanto las concentraciones de 0.5 y 0.75 mM el valor de pH se mantiene constante hasta las 48 horas, después comienza a disminuir y al término de la cinética alcanza un valor de 4; en el caso de concentraciones de 1.0 y 1.25 mM durante las primeras 48 horas el valor del pH aumenta ligeramente (6.5), después disminuye pero sólo alcanza el valor de 5.5 aproximadamente. Con respecto al crecimiento, el control y la concentración de 0.25 mM entran a la fase de mantenimiento a las 24 horas, alcanzando la concentración máxima de proteína (375 mg/L). Para las demás concentraciones de NEM el comportamiento es el mismo, entran a la fase estacionaria a las 24 horas, con la diferencia de que no alcanzan la concentración máxima de proteína, obteniendo valores de 250 mg/L aproximadamente. El hecho de que la concentración de 0.25 mM tenga el mismo comportamiento que el control, posiblemente sea porque la concentración es muy baja para inhibir a la enzima involucrada en la oxidación del tiosulfato.



Gráfica 5.11 Efecto del NEM sobre el pH y el crecimiento del consorcio sulfooxidante

La acumulación de azufre elemental en el consorcio sulfooxidante, se ve favorecida por la adición de NEM (Tabla 5.6). Aunque no exista una relación definida entre la concentración de inhibidor y la acumulación de azufre elemental. Sin embargo, el efecto sobre la velocidad de crecimiento es significativo, ya que con NEM la velocidad disminuye dos veces su valor con respecto al control.

Tabla 5.6 Velocidad de crecimiento del consorcio y acumulación de azufre elemental con NEM

NEM (mM)	Proteína (mg/L·h)	Azufre (mgS/L)
control	13.57	0
0.25 mM	12.55	0
0.50 mM	7.45	52
0.75 mM	7.23	55
1.00 mM	5.40	72
1.25 mM	5.23	70

5.4.2.2 *Thiobacillus thioparus*

Los resultados de crecimiento y pH de *T. thioparus* se presentan en la gráfica 5.12. El NEM tiene un efecto negativo sobre el crecimiento de *T.*

thioparus, a medida que aumenta la concentración de inhibidor se observa una disminución en el crecimiento. Así, encontramos que la concentración máxima de proteína en el control y en las dos primeras concentraciones es de 800 mg/L, mientras que con 0.25 y 0.5-1.00 mM sólo alcanzan 400 y 200 mg/L respectivamente. Es importante notar que la fase exponencial se retarda y lo que observamos como fase estacionaria, sea la fase de adaptación, debido a la presencia del NEM. Las velocidades de crecimiento disminuyen significativamente (Tabla 5.7).

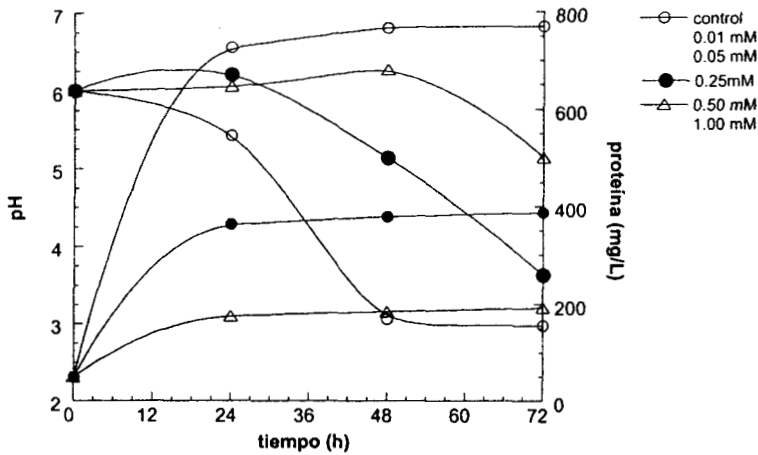


Figura 5.12 Efecto del NEM sobre el pH y el crecimiento de *T. thioparus*

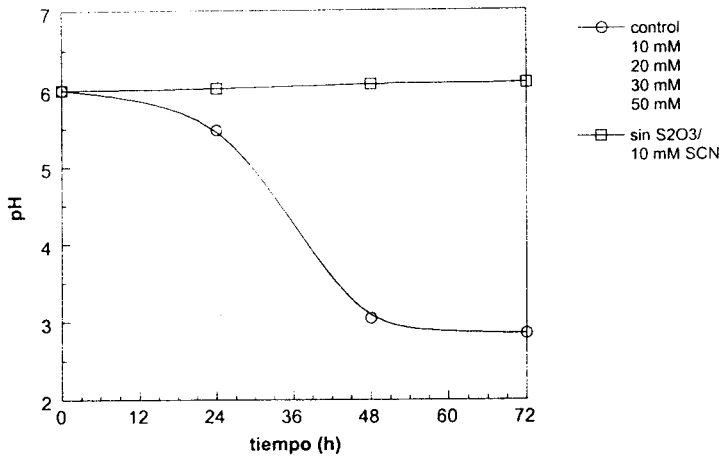
En el caso de *T. thioparus*, la acumulación de azufre se vio favorecida por la adición de NEM y la velocidad de crecimiento se ve disminuida dos o cuatro veces su valor (Tabla 5.7). Es importante notar que el efecto del NEM sobre la cepa pura de *T. thioparus* es mayor que sobre el consorcio, por ejemplo, con una concentración de 1 mM la velocidad de crecimiento en *T. thioparus* es casi cinco veces menor que el control, mientras que en el consorcio la velocidad de crecimiento solamente disminuye a la mitad. El efecto que observamos con NEM es debido a su poder inhibitorio sobre la enzima envuelta en la oxidación de compuestos azufrados.

Tabla 5.7 Velocidad de crecimiento de *T. thioparus* y acumulación de azufre elemental con NEM

NEM (mM)	Proteína (mg/L*h)	Azufre (mg/L)
control	28.27	0
0.01	25.36	0
0.05	24.54	0
0.25	13.09	36
0.5	7.12	44
1.0	5.24	45

5.4.3 Tiocianato de amonio

En la gráfica 5.13 observamos el comportamiento del pH con tiocianato de amonio. Las concentraciones crecientes de SCN^- (10-50 mM) no tienen un efecto notorio sobre la disminución del pH. Se observa la disminución gradual que alcanza un valor de 3 a las 48 horas, como se observó en todos los experimentos realizados. Aún cuando se ha reportado que el género *Thiobacillus* puede utilizar el tiocianato como fuente de energía, carbono, nitrógeno y azufre (Hung y Pavlostathis, 1999), observamos que el SCN^- no fue utilizado por el consorcio en lugar del tiosulfato, posiblemente porque el cultivo no se encontraba bajo condiciones limitantes de sustrato. El comportamiento con *T. thioparus* fue el mismo. No se observó un incremento sobre la acumulación de azufre en presencia de tiocianato de amonio.

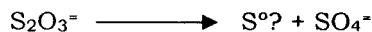


Gráfica 5.13 Efecto del NH₄SCN sobre el pH en el consorcio sulfooxidante.

En la oxidación de S₂O₃²⁻ por el consorcio bajo condiciones normales de crecimiento no se detectaron intermediarios; en *T. thioparus* se detectó sulfito y azufre en bajas concentraciones. El uso de los inhibidores favoreció la acumulación de azufre, no así, el tiocianato de amonio. Sin embargo, no se observó una conversión estequiométrica de S₂O₃²⁻ a S⁰, ya que de acuerdo a las cinéticas de crecimiento, el sulfato siguió acumulándose en el medio. Esto sugiere, que la incorporación de electrones a nivel de cadena respiratoria resultó sólo parcialmente inhibida.

Lo anterior permite proponer las siguientes rutas de oxidación para los microorganismos estudiados:

Consorcio sulfooxidante



Thiobacillus thioparus

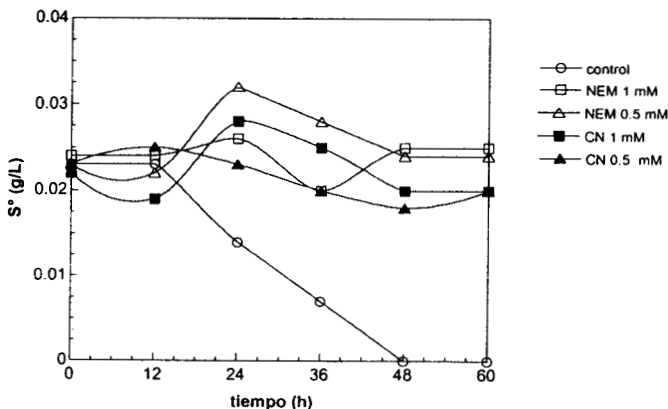


En el caso del consorcio es desconocido el mecanismo por el cual, bajo ciertas condiciones de crecimiento, como el control de O_2 disuelto y el uso de inhibidores, permite la acumulación de azufre. En el caso de la vía de la rodanasa (Suzuki, 1999), se sugiere que al inhibir la oxidación del azufre a sulfato, el sulfito acumulado se oxida rápidamente, vía fosforilación de sustrato a sulfato como única fuente de electrones para la obtención de energía.

5.5 Oxidación de azufre elemental biológico

Con la finalidad de evaluar el efecto del CN^- y del NEM sobre la oxidación del azufre elemental, se realizó el siguiente experimento. Una vez formado el azufre elemental en el cultivo continuo del consorcio sulfooxidante (adaptado a $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$), se determinaron concentraciones iniciales y se adicionó CN^- y NEM en dos concentraciones 0.5 y 1 mM, cuantificando azufre, proteína y sulfato a través del tiempo.

En la gráfica 5.14 se presentan los resultados de la oxidación de S^0 . La concentración inicial de azufre elemental fue 0.023 g/L, durante las primeras 12 horas, la concentración de azufre permanece constante, debido a la presencia aún de tiosulfato (0.5 g/L), al cambio de sustrato y posiblemente a la adhesión de los microorganismos a las partículas del azufre que ocurre en las primeras horas. El azufre biológico tiene la particularidad de estar hidratado y por lo tanto facilita su transporte al interior de la célula (Steudel, 1987). Después de esta fase de adaptación se observa un consumo lineal, con una velocidad de consumo de 0.00063 $\text{mgS}^0/\text{L}\cdot\text{h}$, hasta el agotamiento del azufre, lo que ocurre a las 48 horas de la cinética. En el medio con NEM y con CN^- la concentración de azufre permanece constante hasta el final de la cinética.



Gáfica 5.14 Efecto del NaCN y del NEM sobre la oxidación de azufre elemental biológico

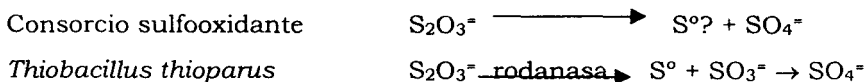
CONCLUSIONES

1. La adición de surfactante al medio no tuvo efecto sobre la acumulación de azufre elemental. Posiblemente debido a las concentraciones evaluadas, ya que como se reporta en la bibliografía los surfactantes aumentan la permeabilidad de la membrana permitiendo así una mayor secreción del azufre al medio de cultivo (Swisher, 1987). Resultados similares se obtuvieron para un BLE de acuerdo a Torres (1998).
2. Al evaluar el efecto de algunos inhibidores como el cianuro de sodio (0.5-2 ppm), N-etilmaleimida (NEM 0.01-1.5 ppm) y tiocianato de amonio (10-50 ppm), se pudo observar lo siguiente. En el caso del cianuro de sodio se observó un efecto negativo sobre la fase exponencial del crecimiento; a una mayor concentración del inhibidor existe un mayor retardo de la fase exponencial. El hecho de que el crecimiento se recupere, pudiera explicarse por una degradación del cianuro con respecto al tiempo, permitiendo el crecimiento de los microorganismos, los cuales ya no son alterados por la concentración utilizada del inhibidor, o bien por la acción del cianuro sobre la cadena respiratoria, como se sabe, el cianuro inhibe el transporte de electrones a nivel de citocromo c, la inhibición es parcial porque permite la oxidación del tiosulfato y el crecimiento; lo que no sucede cuando se utilizan concentraciones más altas (10 ó 50 mM) donde no se observa crecimiento ni oxidación de tiosulfato, por lo que representa una inhibición completa. Sin embargo, la energía que se genera en presencia de cianuro, no es suficiente para soportar el crecimiento de los microorganismos. El uso de cianuro promovió la acumulación de azufre elemental. Sin embargo, no se observa una relación lineal entre la concentración de cianuro y la acumulación de azufre. La acumulación de S⁰ se puede atribuir al escaso crecimiento del consorcio y a una posible saturación por sustrato, más que al inhibidor mismo. Es decir, al parecer

no es el inhibidor el que induce este efecto, aunque los experimentos hasta aquí realizados no permiten una conclusión al respecto.

3. La acumulación de azufre elemental en el consorcio sulfooxidante, se ve favorecida por la adición de NEM. Aunque no existe una relación definida entre la concentración de inhibidor y la acumulación de azufre elemental. Sin embargo, el efecto sobre la velocidad de crecimiento es significativo. Es importante notar que el efecto del NEM sobre la cepa pura de *T. thioparus* es mayor que sobre el consorcio, por ejemplo, con una concentración de 1 mM la velocidad de crecimiento en *T. thioparus* es casi cinco veces menor que el control, mientras que en el consorcio la velocidad de crecimiento solamente disminuye a la mitad. El efecto que observamos con NEM es debido a su poder inhibitorio sobre la enzima envuelta en la oxidación de compuestos azufrados.
4. Con respecto a la adición de tiocianato de amonio Aún cuando se ha reportado que el género *Thiobacillus* puede utilizar el tiocianato como fuente de energía, carbono, nitrógeno y azufre observamos que el SCN⁻ no fue utilizado por el consorcio sulfooxidante, ni por *T. thioparus* en lugar del tiosulfato, posiblemente porque el cultivo no se encontraba bajo condiciones limitantes de sustrato. No se observó un efecto sobre la acumulación de azufre en presencia de tiocianato de amonio.
5. El azufre presentó una tasa de oxidación menor respecto al tiosulfato, esto debido a la característica de insolubilidad del azufre en agua. Sin embargo, la velocidad de oxidación del azufre biológico es mayor a la velocidad de oxidación del azufre elemental comercial, debido a que el azufre biológico tiene la particularidad de estar hidratado y por lo tanto facilita su transporte al interior de la célula (Steudel, 1987).

6. Al evaluar el efecto de la aireación sobre la acumulación de azufre se observó un efecto sobre el crecimiento, sin embargo sobre la acumulación de azufre el efecto es positivo, es decir, a una menor aireación, un menor crecimiento y una mayor formación de azufre elemental. En la bibliografía se ha reportado que la oxidación de sulfuro se encuentra regulada por la concentración de oxígeno en el medio de cultivo. Esta regulación ocurre a nivel de la enzima azufre oxidasa, lo que permite la oxidación parcial del sulfuro, obteniendo azufre elemental como intermediario de la oxidación.
7. Finalmente, en la oxidación de $S_2O_3^{2-}$ por el consorcio bajo condiciones normales de crecimiento no se detectaron intermediarios. En *T. thioparus* se detectó sulfito y azufre en bajas concentraciones. El uso de los inhibidores favoreció la acumulación de azufre, no así, con el tiocianato de amonio. Sin embargo, no se observó una conversión estequiométrica de $S_2O_3^{2-}$ a S^0 , ya que de acuerdo a las cinéticas de crecimiento, el sulfato siguió acumulándose en el medio. Esto sugiere, que la incorporación de electrones a nivel de cadena respiratoria resultó sólo parcialmente inhibida. Lo anterior permitió proponer las siguientes rutas de oxidación para los microorganismos estudiados:



8. En el caso del consorcio que posiblemente utiliza la ruta de *Paracoccus* (Kelly, 1997), es desconocido el mecanismo por el cual, bajo ciertas condiciones de crecimiento, como el control de O_2 disuelto y el uso de inhibidores, permite la acumulación de azufre. En el caso de la vía de la rodanasa (Suzuki, 1999), se sugiere que al inhibir la oxidación del azufre a sulfato, el sulfito acumulado se oxida rápidamente, vía fosforilación de sustrato, a sulfato como única fuente de electrones para la obtención de energía.

- Alcántara S, Estrada I, Vásquez M y Revah S., (1999), Carbón disulfide oxidation by a microbial consortium from a trickling filter, *Biotechnol. Lett.* **21**:815-819.
- Aleem M., (1977), Microbial Energetics, Ed. Haddock, B.A. y Hamilton, W.A., 27 Symposium the Society for General Microbiology held at Imperial College London, U.K.
- Barquera B, García a y Escamilla E. (1991), Cytochrome d expression and regulation pattern in free-living *Rhizobium phaseoli*, *Arch. Microbiol.* **155**:124-1129
- Bartlett J y Skoog D., (1954), Colorimetric determination of elemental sulfur in hydrocarbons, *Anal. Chem.* **26**(6)-1008.
- Bishop P y Kinner N., (1986), "Aerobic fixed-film processes", in Biotechnology, V. 8, Cap. 3, VCH Verlagsgesellsch Weinheim.
- Bohn H., (1992), Consider biofiltration for decontaminating gases, *Chem. Eng. Prog.*, April, 34.
- Buisman C., (1998), Industrial applications of new sulphur biotechnology, The biological sulphur cycle: environmental science and technology, Wageningen, The Netherlands, April 19-24.
- Buisman C, Geraats B, Ijspeert P y Lettinga G., (1990), Optimization of sulphur production in a biotechnological sulfide removing reactor, *Biotechnol. Bioeng.*, **35**:50-56.
- Buisman C, Post R, Ijspeert P, Geraats G y Lettinga G., (1989), Biotechnological process for sulfide removal with sulphur reclamation, *Acta Biotechnol.*, **9**(3):255-267.
- Buisman C, Wit B y Lettinga G., (1990), Biotechnological sulphide removal in three polyurethane carrier reactors: stirred reactor, biorotor reactor and upflow reactor, *Wat. Res.*, **24**(2):245-251.
- Chan C y Suzuki I., (1993), Quantitative extraction and determination of elemental sulfur and stoichiometric oxidation of sulfide to elemental sulfur by *Thiobacillus thiooxidans*, *Can. J. Microbiol.*, **39**:1166-1168.
- Chan C y Suzuki I., (1994), Thiosulfate oxidation by sulfur-grown *Thiobacillus thiooxidans* cells, cell free extracts and thiosulfate-oxidizing enzyme, *Can. J. Microbiol.* **40**:816-822.

- Cho K, Hirai M y Shoda M., (1992), Enhanced removal efficiency of malodorous gases in a pilot-scale peat biofilter inoculated with *Thiobacillus thiooparus* DW44, *J. Ferment. Bioeng.*, **73**(1):46-50.
- Deviny, J.S., (1995), Topics for research in biofiltration, conference on biofiltration (an Air Pollution Control Technology), Los Angeles, California, Oct. 5-6.
- Diks R y Ottengraf S., (1991), "Process engineering aspects of biological waste gas purification", in the International Symposium of Environmental Biotechnology, Ostende Bélgica, 22-25 April.
- Dipa K y Datta A., (1987), a comprehensive introduction to membrane biochemistry, Floral Publishing, Madison, USA. pp. 267-332.
- Estrada I., (1998), Aspectos microcinéticos de la oxidación de compuestos azufrados, Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Godish T., (1997), Air Quality, Lewis Publishers, 3ª ed., New York, p. 448.
- Groenestijn J y Hesselink, P., (1993), Biotechniques for air pollution control, *Biodegradation*, **4**:283-301.
- Hallberg K, Dopson M y Lindström E., (1996), Reduced sulfur compound oxidation by *Thiobacillus caldus*, *J. Bacteriol.* **178**(1):6-11.
- Hazeu W, Batenburg-van der Vegte W, Bos P, van der Pas R y Kuenen J, (1988), The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans*, *Arch. Microbiol.*, **150**:574-579.
- Hooper A y DiSpirito A., (1985), In bacteria which grow on simple reductants, generation of a proton gradient involves extracutoplasmic oxidation of substrate, *Microbiol. Rev.* **49**(2):140-157.
- Hung C y Pavlostathis S., (1999), Kinetics and modeling of autotrophic thiocyanate biodegradation, *Biotech. Bioeng.* **62**(1):1-11.
- Hurst C., (1997), Manual of Environmental Microbiology, ASM Press, USA, pp. 324-332.
- Janssen A., (1996), Formation and colloidal behavior of elemental sulphur produced from the biological oxidation of hydrogensulphide. PhD thesis, Wageningen, The Netherlands.

- Janssen A, Ma S, Lens P y Lettinga G., (1997), Performance of a sulfide-oxidizing expanded-bed reactor supplied with dissolved oxygen, *Biotechnol. Bioeng.*, **53**:32-40
- Johnson E y Lewis M., (1979), Astaxanthin formation by the yeast *Phaffia rhodozyma*, *J. Gen. Microbiol.*, **115**:173-183
- Kanagawa T y Mikami E., (1989), Removal of methanetiol, dimethyl sulfide, dimethyl disulfide and hydrogen sulfide from contaminated air by *Thiobacillus thioparus* TK-m, *App. Enviromen. Microbiol.* **55**(3): 555.
- Kelly D., (1982) Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur, *Phil.Trans. R. Soc. Lond* **238** 499-528
- Kelly D., (1990), Energetics of chemolithotrophs, Ed. T.A. Krulwich, Chapter 16, *The bacteria*, vol. XII, Academic Press, Inc. USA.
- Kelly D, Wood A, Jordan S, Padden A, Gorlenko V y Dubinina G., (1994), Biological production and consumption of gaseous organic sulphur compounds, *Atmospheric Gas Production and Consumption* **22**:1011.
- Kelly D, Shergill J, Lu W y Wood A., (1997), Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria, *Antoine van Leeuwenhoek*, **71**:195-107.
- Kohler H, (1982), Fortschritt-Berichte VDI-Zeitschr. Reihe 15, 22 (Citado por Ottengraf, 1991).
- Kong S y Allen E., (1997), Control of organo-sulfur emissions using biofiltration: dimethyl sulfide, air & waste Management Association's 90th Annual Meeting & Exhibition, Toronto, Ontario, Canadá.
- Konishi Y, Takasaka Y y Asai S., (1994), Kinetics of growth and elemental sulfur oxidation in batch culture of *Thiobacillus ferrooxidans*, *Biotech. Bioeng.*, **44**:667-673.
- Kuenen J, Robertson L, Scheuderman-Suylen G y Gommers P., (1986), Microbial desulphurization of industrial wastes, III:9-15.
- Lebeault J, (1990), Abstr. Forum Appl. Biotechnol. Gent, 20 (Sep.). Citado por Ottengraf (1991).
- Leson G, Winer A, (1991), Biofiltration: an innovative air pollution control technology for VOC emissions, *J. AWMA.*, **41**:1045-1054.

- Lizama H y Sankey B., (1993), Conversion of hydrogen sulphide by acidophilic bacteria, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **40**:438-441.
- Lowry H., (1951), Protein measurement with the Folin reagent, *J. Bio. Chem.*, **193**:265-275
- Lyric R y Suzuki I., (1970), Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*, II Properties of adenosin-5'-phosphosulfate reductase, *Can. J. Biochem.* **48**:344-354.
- Lyric R y Suzuki I., (1970), Enzymes involved in the metabolism of thiosulfate by *Thiobacillus thioparus*, III Properties of thiosulfate-oxidizing multi-enzyme and proposed pathway of thiosulfate oxidation, *Can. J. Biochem.* **48**:355-363
- Madigan M, Martinko J y Parker J., (1999), Diversidad metabólica de los microorganismos. En *Biología de microorganismos*, Prentice Hall Iberia, pp. 473-531
- Moat A y Foster J., (1995), *Microbial Physiology*, Third Edition, Ed. Wiley-Liss, New York, USA, pp. 580
- Ongcharit C, Dauben P y Sublette K., (1989), Immobilization of an Autotrophic Bacterium by Coculture with Floc-Forming Heterotrophs, *Biotech. Bioengin.*, **33**:1077-1080.
- Otero A, Curutchet G, Donati E y Tedesco P., (1995), Action of *Thiobacillus thiooxidans* on sulphur in the presence of a surfactant agent and its application in the indirect dissolution of phosphorus, *Process Biochem.*, **30** (8) 747-750.
- Peavy H, Rowe D y Tchobanoglous G., (1985), *Environmental Engineering*, McGraw - Hill, Singapore.
- Perry R, Green D and Maloney J, (1984), *Perry Manual del Ingeniero Químico*, Tomo IV Sección 14-16, 6ª edición, Ed. Mc Graw Hill.
- Revah S, Acosta M, Hugler W, Trinidad R, Avila C, Estrada I e Hinojosa A., (1995) a Air Biodesulfuration from viscose plants: carbon disulfide elimination, Conference On Biofiltration (an Air Pollution Control Technology), Los Angeles, California, Oct. 5-6.
- Riordan J y Vallee B., (1967), Reactions with N-ethylmaleimide and p-mercuribenzoate, In: C H W. Hirs (ed) *Methods in Enzimology*, vol. XI, Academic Press, USA, pp. 541-548.

- Riveros H, (1996), Contaminación atmosférica en la Ciudad de México, Primer Coloquio Binacional México-Japón sobre Gestión Ambiental: Contaminación Atmosférica, México, enero 25-26.
- Robertson L y Kuenen J, (1992), The colorless sulfur bacteria, In: Balows A, Trüper H, Dworkin M, Harder H, Schleifer K (eds) *The prokaryotes*, vol. 1, Springer, Berlín Heidelberg New York, pp. 385-413.
- Sam L, Rema V, Davasia P y Natarajan K., (1993), Surface properties of *Thiobacillus ferrooxidans* and its adhesion to mineral surfaces, *Current Science*, **65**(12):974-978
- Sublette K., (1987), Aerobic oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*, *Biotech. Bioeng.*, **29**:690-695.
- Sublette K y Silvester N., (1987), Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: desulfurization of natural gas, *Biotech. Bioeng.*, **29**:249-257.
- Smet E y van Langenhove, (1998) , Abatement of volatile organic sulfur compounds in odorous emissions from the bio-industry, *Biodegradation*, 9:273-284.
- Steffes G, Torremans A, Schrijver R, Robertson L y Kuenen J., (1996), Quantitative measurement of sulphur formation by steady-state and transient-state continuous cultures of autotrophic *Thiobacillus* species, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**:169-175.
- Steudel R., (1998), the yellow element and its astounding complexity, *The Biological Sulphur Cycle: Environmental Science and Technology*, Wageningen, The Netherlands, April 19-24.
- Suzuki I, Chan C y Takeuchi T., (1992), Oxidation of elemental sulfur to sulfite by *Thiobacillus thiooxidans* cells, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(11):3767-3769.
- Suzuki I, (1999), Oxidation of inorganic sulfur compounds: chemical and enzymatic reactions, *Can. J. Microbiol.* **45**:97-105.
- Swisher R., (1987), Surfactant biodegradation, Marcel Dekker, USA, pp. 1085.
- Takeuchi T y Suzuki I., (1997), Cell hydrophobicity and sulfur adhesion of *Thiobacillus thiooxidans*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**(5):2058-2061

- Tano T, Kitaguchi H, Harada M, Nagasawa T y Sugio T., (1996), Purification and some properties of a tetrathionate decomposing enzyme from *Thiobacillus thiooxidans*, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **60**(2): 224-227.
- Taylor B., (1993), in Biogeochemistry of global Change (Oremland, R. S., ed.), pp. 745-781, Chapman and Hall, New York (citado por Kelly *et al.*, 1994).
- Tichý R, Lens P, Grotenhuis J y Bos P., (1998), Solid state reduced sulfur compounds: environmental aspects and bio-remediation, The Biological Sulphur Cycle: Environmental Science and Technology, Wageningen, The Netherlands, April 19-24.
- Torres P., (1998), Estudio del efecto de algunos factores de operación en la oxidación biológica de CS₂ en un biolavador de lecho escurrido (BLE), Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Trinidad R., (1996), Estudios de remoción de CS₂ de corrientes gaseosas en un biolavador de lecho escurrido (BLE), Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Visser J, Jong G, Robertson L y Kuenen J., (1997), Purification and characterization of a periplasmic thiosulfate dehydrogenase from the obligately autotrophic *Thiobacillus* sp. W5, *Arch. Microbiol.*, **166**:372-378.
- Visser J, Jong G, Robertson L y Kuenen J., (1997), A novel membrane-bound flavocytochrome c sulfide dehydrogenase from the colourless sulfur bacterium *Thiobacillus* sp. W5, *Arch. Microbiol.*, **167**:295-301.
- Visser J, Robertson L, Verseveld H y Kuenen J., (1997), Sulfur production by obligately chemolithoautotrophic *Thiobacillus* species, *Appl. Environmental Microbiol.*, **63**(6):2300-2305.
- Williams T y Miller F., (1992), Odor control using biofilters, *Biocycle Magazine* Oct., **33**:10, 72.
- Zhang L, Hirai M y Shoda M, (1991), Removal characteristics of dimethyl sulfide, methanethiol and hydrogen sulfide by *Hyphomicrobium* sp 155 isolated from peat biofilter, *J. Ferment. Bioeng.* **75**(5):392-396.