



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISION DE CIENCIAS BIOLOGICAS Y DE LA SALUD

ASPECTOS MICROKINETICO EN LA ELIMINACION DE COMPUESTOS
SULFURADOS USANDO COMO MODELO AL BISULFURO DE CARBONO
(CS₂)

TESIS

Que para obtener el titulo de Maestra en Biotecnología presenta

María Isabel Estrada Alvarado

Matrícula 95357130

Director

Dr. Sergio Revah Moiseev

Asesor

Dr. Oscar Monroy Hermosillo

H. Jurado:

M. en C. Walter Hugler Quintanilla

Dr. Elías Razo Flores

Dr. Sergio Revah Moiseev

Dr. Gregorio Jorge Gómez Hernández

Agradecimientos

A mi Padres:

Alberto y Sofia

Por su amor, dedicación, apoyo y confianza.

A mis hermanos

Magdalena, Jesús, Sofia, Francisco y Alejandra

Por el apoyo incondicional y el cariño que me han brindado

A mis sobrinas

Adahi, Selene, Rebeca y Gabriela

A Manuel y a Liliana

Agradecimientos

Al

Dr. Sergio Revah

Dr. Óscar Monroy Hermosillo

Por todo el apoyo recibido durante la realización de este trabajo

Al Grupo CYDSA S.A. de C.V. y

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología

Por el apoyo económico otorgado para la realización de este trabajo

Al H. Jurado:

M. en C. Walter Hugler Quintanilla, Dr. Elías Razo Flores, Dr. Gregorio Jorge Gómez Hernández

Por sus comentarios

A la Universidad Autónoma Metropolitana

A Sergio Alcántara por su apoyo y dedicación a mi formación, así como a mis amigos Marisol V., Patrice G. y Pedro T. y a todos mis compañeros Rufino T., Sergio H., Joel P., Cecilia G., Cecilia G. J., Marielena A., Claudia A., Juan Carlos M., Leonora S., Carolina P., Marcja M., Irmene O., Gabriela V., Isabel S., Margarita V.

res ambientales que están relacionadas con las emisiones de compuestos orgánicos e inorgánicos, tales como dióxido de azufre (SO_2), monóxido de carbono (CO) y dióxido de carbono (CO_2). Cuando estos tipos de compuestos atmosféricos provocan lluvia ácida con el consecuente deterioro de los

RESUMEN

los ecosistemas se ven de manera natural de océanos, tierras de la costa, suelo y agua dulce. Sin embargo, la mayor proporción de emisión de estos gases se genera en la industria. Se ha reportado que se eliminan hasta 3 millones de toneladas en la industria de producción de celofán, rayón y esponjas. Sus efectos ambientales han sido ampliamente documentados.

Las cepas puras de *thiobacilli* y de consorcios sulfoxidantes en la eliminación de los gases reducidos de azufre de corrientes gaseosas en sistemas como biofiltros y bioavivadores de lecho escurrido (BLE) constituyen una alternativa a los métodos físico-químicos, para la eliminación de estos compuestos. En este sentido el presente trabajo es estudio aspectos microcinéticos de la oxidación biológica de CS_2 en función de las características bioquímicas de los microorganismos así como de la influencia del medio ambiente de cultivo.

Se empleó un consorcio proveniente de BLE de la planta piloto de la industria de BLE se encuentra operando desde diciembre de 1993 bajo condiciones de pH 7, la fuente de energía utilizada es CS_2 . El medio mineral utilizado es reportado por Sublette (1987).

Las condiciones de crecimiento quimiolitótrofos fueron determinantes para la actividad sulfoxidante del consorcio. Se observó que ésta se ve afectada por la adición de extracto de levadura en concentraciones de 1g/l. Por otra parte, se encontró que la sulfoxidación no se afectó por concentraciones de cinco en concentraciones de 100 mg/l, por una posible capacidad de adaptación de los microorganismos. El crecimiento en condiciones anaeróbicas mostró que el consorcio parece tener actividad en ausencia de oxígeno, utilizando posiblemente al CS_2 como último aceptor de electrones. Esto se presenta probablemente como consecuencia de la existencia de bacterias sulfoxidantes facultativas como *T. thioautotrophicus* y *P. denitrificans*. El estudio de las poblaciones que conforman el consorcio reveló que coexisten hongos, levaduras y bacterias. Al evaluar medios con inhibidores de crecimiento para hongos (nistatina 125 U/l) o para bacterias (6 ppm) se encontró que la actividad sulfoxidante se lleva a cabo principalmente por las levaduras.

Además se encontró que los intermediarios de la oxidación son: H_2S , COS , S^0 y el producto final SO_4^{2-} .

Existen problemas ambientales que están relacionadas con las emisiones de compuestos azufrados orgánicos e inorgánicos, tales como dióxido de azufre (SO_2), ácido sulfhídrico (H_2S) y bisulfuro de carbono (CS_2). Cuando este tipo de compuestos es liberado a la atmósfera provocan lluvia ácida con el consecuente deterioro de los ecosistemas.

El CS_2 y H_2S se emiten de manera natural de océanos, tierras de la costa, suelo, planta volcanes. Sin embargo, la mayor proporción de emisión de estos contaminantes se genera en la industria. Se ha reportado que se eliminan hasta 3 g/m^3 de sulfuros en la industria de producción de celofán, rayón y esponjas. Sus propiedades tóxicas han sido ampliamente documentadas.

El empleo de cepas puras de thiobacilli y de consorcios sulfoxidantes en la eliminación de compuestos reducidos de azufre de corrientes gaseosas en sistemas como biofiltros y biolavadores de lecho escurrido (BLE) constituyen una alternativa a los procesos fisicoquímicos, para la eliminación de estos compuestos. En este sentido el interés de este trabajo es estudiar aspectos microcinéticos de la oxidación biológica de bisulfuro de carbono que permitan un mayor entendimiento del proceso de oxidación en función de las características bioquímicas de los microorganismos así como de la influencia del medio ambiente de cultivo.

El inóculo empleado fue un consorcio proveniente de BLE de la planta piloto de la UAM-I. Este BLE se encuentra operando desde diciembre de 1993 bajo condiciones controladas de pH 7, la fuente de energía utilizada es CS_2 . El medio mineral utilizado ha sido reportado por Sublette (1987).

Las condiciones de crecimiento quimiolitótrofas fueron determinantes para la capacidad sulfoxidante del consorcio. Se observó que ésta se ve afectada por la presencia de extracto de levadura en concentraciones de 1g/l. Por otra parte, se encontró que la sulfoxidación no se afectó por concentraciones de cinc en concentraciones de 100 mg/l, por una posible capacidad de adaptación de los microorganismos. El crecimiento en condiciones anaerobias mostró que el consorcio fue capaz de tener actividad en ausencia de oxígeno, utilizando posiblemente al nitrato como último aceptor de electrones. Esto se presenta probablemente como consecuencia de la existencia de bacterias sulfoxidantes facultativas como *T. denitrificans* y *P. denitrificans*. El estudio de las poblaciones que conforman el consorcio reveló que coexisten hongos, levaduras y bacterias. Al evaluar medios con inhibidores de crecimiento para hongos (nistatina 1.25 U/l) o para bacterias (8 $\mu\text{g/ml}$) se encontró que la actividad sulfoxidante se lleva a cabo principalmente por las bacterias.

Finalmente se encontró que los intermediarios de la oxidación son: H_2S , COS , S^0 y el producto final $\text{SO}_4^{=}$.

| | Página |
|--|--------|
| Capítulo I. Introducción | 1 |
| Emisiones de bisulfuro de carbono (CS ₂) | 2 |
| Efectos en la salud del CS ₂ | 4 |
| Métodos de eliminación | 4 |
| Eliminación biológica de compuestos reducidos de azufre | 11 |
| Rutas metabólicas de compuestos azufrados | 12 |
| | |
| Capítulo II. Antecedentes | 19 |
| | |
| Capítulo III. Objetivos | 25 |
| | |
| Capítulo IV. Materiales y Métodos | 27 |
| | |
| Capítulo V. Resultados y discusión | |
| Efecto de nutrientes sobre la oxidación de CS ₂ | 37 |
| Microorganismos sulfoxidantes del consorcio | 42 |
| Energía de mantenimiento y energía de crecimiento | 44 |
| Intermediarios en la oxidación biológica de CS ₂ | 48 |
| Oxidación de compuestos azufrados diferentes a CS ₂ | 51 |
| | |
| Capítulo VI. Conclusiones | 54 |
| | |
| Capítulo VII. Bibliografía | 58 |

INTRODUCCIÓN

compuestos sulfurados orgánicos e inorgánicos, tales como mercaptanos (R-SH), dióxido de azufre (SO₂), el ácido sulfhídrico (H₂S) y bisulfuro de carbono (CS₂). En 1990 la global de las emisiones de azufre en la atmósfera fue de 120 millones de toneladas por año (Janassen, 1995). Las emisiones naturales en la atmósfera de H₂S y CS₂ son el resultado de actividades volcánicas y de evaporación de aguas oceánicas; de las emisiones por fuentes industriales, el ácido sulfhídrico y el bisulfuro de carbono son generados por un número de industrias tales como las plantas petroquímicas, tennerías, manufactura de viscosa, algodón y como un resultado de un tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato (SO₄) en la industria de pulpa de papel. En la atmósfera el H₂S causa lluvia ácida debido a una reacción con el ozono hasta ácido sulfúrico.

Tabla 1.1. Efectos ambientales de sectores industriales seleccionados

| Industria | Uso de materia prima | Aire | Acuíferos | Riesgos |
|----------------|--|--|--|---------------------------------|
| Textil | Lana; fibras sintéticas; químicos | Partículas, H ₂ S, SO ₂ , HC | DBO, sólidos suspendidos, sulfatos | Inhalación de polvo |
| Hierro y acero | Mineral de hierro, piedra caliza, desecho reciclados | SO ₂ , partículas, NOx, HC, CO, H ₂ S, sulfite, lluvia ácida | DBO, ácidos, fenol, sulfuros, sulfatos, amoníaco, cianuros | De explosión |
| Refinerías | Químicos inorgánicos | SO ₂ , HC, CO, partículas | DBO, DCO, petróleo, fenoles | Explosión, impacto visual |
| Químicos | Químico orgánico e inorgánico | Químicos orgánicos, benceno, tolueno | Químicos orgánicos, sólidos suspendidos | Exposición a sustancias tóxicas |
| Metalurgia | Bauxita | Fluoruro, CO, partículas | Efluentes de depuradores de gas (fluoruro, hidrocarburos) | |
| Metalurgia | Químicos | Gases tóxicos | Solventes clorados | Exposición a sustancias tóxicas |

Fuente: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, The State of the Environment, OECD Paris 1991.

El incremento en la contaminación global está inevitablemente asociado con una continua industrialización, urbanización y motorización. Algunos de estos problemas ambientales (Tabla 1.1) están relacionados con las emisiones de compuestos azufrados orgánicos e inorgánicos, tales como mercaptanos (R-SH), dióxido de azufre (SO₂), el ácido sulfhídrico (H₂S) y bisulfuro de carbono (CS₂). En 1989 el global de las emisiones de azufre en la atmósfera fue estimada de 93 a 200 millones de toneladas por año (Janssen, 1996). Las emisiones naturales en la atmósfera de H₂S y CS₂ son el resultado de actividades volcánicas y de evaporación de aguas oceánicas; de las emisiones por fuentes industriales, el ácido sulfhídrico y el bisulfuro de carbono son generados por un número de industrias tales como las plantas petroquímicas, tenerías, manufactura de viscosa, rayón y como un resultado de un tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato (SO₄) en la industria de pulpa de papel. En la atmósfera el H₂S causa lluvia ácida debido a una reacción con el ozono hasta ácido sulfúrico.

Tabla 1.1. Efectos ambientales de sectores industriales seleccionados

| Industria | Uso de materia prima | Aire | Acuíferos | Riesgos |
|---------------------|--|---|---|---------------------------------|
| Textil | Lana, fibras sintéticas, químicos | Partículas, H ₂ S, SO ₂ , HC | DBO, sólidos suspendidos, sulfatos | Inhalación de polvo |
| Hierro y acero | Mineral de hierro, piedra caliza, desecho reciclados | SO ₂ , NOx, H ₂ S, sulfite, ácido | partículas HC, CO, lluvia amoniaco, cianuros | De explosión |
| Refinerías | Químicos inorgánicos | SO ₂ , HC, CD | NO ₂ DBO, DCO, petróleo, fenoles | Explosión impacto visual |
| Químicos | Químico orgánico e inorgánico | Químicos orgánicos benceno, tolueno | Químicos orgánicos sólidos suspendidos | Exposición a sustancias tóxicas |
| Metales no ferrosos | Bauxita | Fluoruro, CO, partículas | SO ₂ , Efluentes de depuradores de gas (fluoruro, hidrocarburos) | |
| Microelec trónica | Químicos | Gases tóxicos | Solventes clorados | Exposición a sustancias tóxicas |

fFuente: Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico, The State of the Environment, OCD París 1991

Los compuestos azufrados que se emiten a la atmósfera son eliminados por la comunidad microbiana ecológica presente en el ambiente, que es capaz de oxidar ó reducir dichos compuestos por medio del ciclo biológico del azufre (Figura 1.1). Este ciclo esta compuesto por dos partes, una parte oxidativa y otra reductiva. En la parte reductiva, el sulfato y el azufre funcionan como aceptores de electrones en las rutas metabólicas, usadas por un grupo conocido de bacterias. En la parte oxidativa del ciclo, los compuestos reducidos de azufre sirven como donadores de electrones para bacterias fotótroficas anaeróbicas y también proveen energía para el crecimiento de las bacterias aerobias quimiolitótróficas (Janssen, 1996).

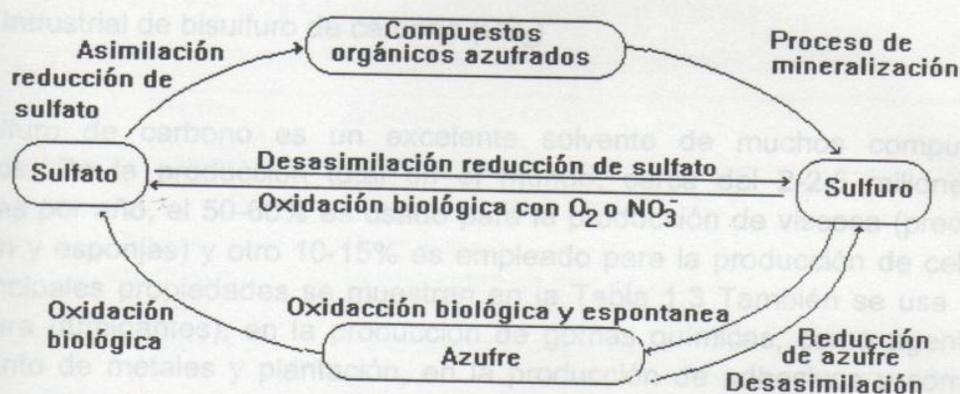


Figura 1.1 Ciclo biológico del azufre (Janssen, 1996).

Emisión de CS₂

| | |
|--------------------|------------------|
| CS ₂ | CS ₂ |
| Estructura química | S-C-S |
| Estado físico | Líquido incoloro |
| Peso molecular | 76.1 |

Fuente Natural:

El CS₂ se genera de forma natural en océanos, suelos, pantanos y volcanes; Puede producirse a partir de los tiocyanatos e isocyanatos generados durante la ruptura de los glucosinolatos, sintetizados por miembros de la familia Cruciferae. El CS₂ 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 CS₂, producido probablemente por las actividades de bacterias anaeróbicas (Taylor 1993). En la Tabla 1.2 se presentan las cantidades estimadas de producción anual de CS₂ por estas fuentes (Kelly y col., 1994).

Tabla 1.2. Producción anual de CS₂ por fuentes naturales (Kelly y col., 1994).

Fuente: Budavari (1989), Moses, (1978); Plantan, (1974); Wassi, (1967)

Tabla 1.2. Producción anual de CS₂ por fuentes naturales

| Fuentes | Producción anual de CS ₂ Ton de azufre x 10 ⁻⁶ |
|-----------------------|---|
| Océanos | 0.3 - 0.6 |
| Zonas costeras | 0.06 |
| Suelos y plantas | 0.6 - 0.8 |
| Combustión de biomasa | - |
| Volcanes | < 0.1 |

Fuente: Kelly y col., 1994

Fuente Industrial de bisulfuro de carbono (CS₂)

El bisulfuro de carbono 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, el 50-60% es usado para la producción de viscosa (precursor de rayón y esponjas) y otro 10-15% es empleado para la producción de celofán. Sus principales propiedades se muestran en la Tabla 1.3 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 y como un extractor para aceite de oliva. Asimismo es útil como precursor del tetracloruro de carbono (Mannville 1993).

Tabla 1.3. Propiedades fisicoquímicas de CS₂

| | |
|---|---|
| Formula molecular | CS ₂ |
| Estructura química | S=C=S |
| Estado físico | Líquido incoloro |
| Peso molecular | 76.1 |
| Densidad | 1.293 g/cm ³ , 80.7 lb/pie ³ (a 0 ° C) |
| Punto de fusión | -110.8 -111.6 °C |
| Punto de ebullición | 46.3 °C |
| Índice de refracción | 1.629 |
| tc | 279 °C |
| pc | 78 atm |
| Tensión superficial (20°C, en contacto con vapor) | 32.33 dinas/cm |
| Solubilidad en g/cm ³ | 0.18 a 20°C 0.22 a 22°C 0.14 a 5°C Soluble en alcohol y éter |
| Limites de inflamabilidad | Inferior : 1.25 Superior : 50.0 |

Fuente: Budavari (1989); Moses, (1978); Plunkett, (1974); Weast, (1987)

Efectos en la salud del CS₂

Los efectos dañinos de CS₂ en la salud humana dependen de su concentración y de la frecuencia y tiempo de exposición. En la Tabla 1.4 se presentan algunos de los efectos nocivos para la salud humana.

Se ha reportado por Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR) (1992) que el CS₂ se absorbe vía pulmonar con un 80 % de retención en los primeros 15 minutos. Al contacto con la piel produce dolor y eritema, mientras que el contacto prolongado produce vesiculación y quemaduras. También se señala que un contacto con los ojos causa quemaduras en las córneas.

Tabla 1.4. Efecto del CS₂ en la salud en función del tiempo de exposición

| Concentración (ppm) | Tiempo de exposición | Efectos en la salud |
|---------------------|----------------------|---|
| 1.0 - 7.6 | 12 años | Reducción en la velocidad de conducción de fibras nerviosas |
| 5 | 12 años | Polineuritis |
| 12 - 18 | exposición continua | Irregularidad en menstruación |
| 6 - 32 | 5 meses a 5 años | Efectos cardiovasculares |
| 13 - 77 | exposición continua | Cambios en la morfología del esperma, disminuye los niveles hormonales en hombres |
| 144 - 321 | 5 años | Insuficiencia inmune, polineuritis, vértigos |
| 320 - 390 | algunas horas | Irritación local, fatiga, cansancio, afecta al sistema nervioso central |
| 420 - 510 | 30 minutos | Fatiga, irritación local, afecta al sistema nervioso central |
| 1150 | 30 minutos | Disminución de la visión |
| 3210 - 3850 | 30 minutos | Convulsiones, estado de coma |
| 4815 | 30 minutos | Es fatal |

Fuente: ATSDR. (1994); U. S. EPA (1986); Verschueren, K. (1983)

Métodos de eliminación de CS₂

Naturales

Las principales rutas de degradación del CS₂ en la atmósfera son la oxidación y la hidroxilación. Las reacciones con radicales hidróxilo ocurren primeramente en la troposfera.

Los intermediarios de la oxidación natural son el H_2S y sulfuro de carbonilo (COS) (Smith y Kelly, 1988), los cuales debido a sus propiedades tóxicas y corrosivas hacen necesaria su eliminación de los efluentes que los contienen. El bisulfuro de carbono (CS_2) tiene un tiempo de vida en la atmósfera de 12 días. Existe un intermediario en la oxidación de CS_2 que es COS, el cual tiene un tiempo de vida media en la atmósfera de dos años. Estos dos gases se encuentran en la atmósfera en concentraciones de 0.07-0.56 ppm (Kelly y col., 1994).

Métodos Físicoquímicos

a) Enmascaramiento de componentes con olor

El enmascaramiento no es un proceso de eliminación, consiste en neutralizar el olor indeseado, con un componente con olor soportable, por ejemplo, con aire o con fragancias en aerosol para usos en interiores. Este método provoca controversias debido a que involucra la adición de más sustancias a la atmósfera, y por lo tanto está en oposición a una limpieza total; por lo tanto, esta técnica es inadecuada para la purificación de gases residuales (Alloway y Ayres, 1993).

b) Reacción química con ozono

Este método ha sido aplicado durante algunos años y consiste en eliminar el olor de los gases residuales al oxidarlos con ozono. No se usa ampliamente debido a los efectos peligrosos que puede tener sobre los bronquios y al costo del proceso (Ottengraf, 1986).

c) 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 este proceso como columnas empacadas, columnas de spray, recipientes agitados, etc.. 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 (Perry y Chilton, 1984).

Para componentes con baja solubilidad, se aplica si la absorción puede ser acompañada por una reacción química rápida en el líquido, por ejemplo, una reacción de oxidación, pues la tasa de eliminación puede incrementarse considerablemente. (Grant y col., 1962).

El CS_2 puede eliminarse de las corrientes gaseosas por absorción con aceites de petróleo. La operación es muy simple: la corriente de gas se pone en contacto con aceite pobre en una torre de absorción a contracorriente. Sin embargo, no es el método más empleado para eliminar CS_2 de corrientes gaseosas (Kohl y Riesenfeld, 1979).

d) Adsorción

En este proceso el gas residual se pone en contacto con un sólido. Las moléculas del adsorbato se condensan en la superficie del adsorbente, donde se enlazan por adsorción física (la adsorción es análoga a una condensación de moléculas gaseosas o a la cristalización partiendo de un líquido. Su acción selectiva es más pronunciada en una capa monomolecular adyacente a la superficie sólida, pero en ocasiones la selectividad persiste a espesores y alturas de 3 ó 4 moléculas) o quimiosorción (a temperaturas altas, generalmente superiores a $400^{\circ}F$, la adsorción ocurre por medio de una reacción verdadera o un enlace químico) 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.

Un adsorbente apropiado que se usa con frecuencia es el carbón activado, principalmente para trazas de compuestos olorosos, por lo cual se usa especialmente en la industria de alimentos. Otros adsorbentes que se utilizan a gran escala incluyen gel de sílice, alúmina activada, tierra de fuller y otras arcillas. Una desventaja de este procedimiento es la saturación del adsorbente después de algún tiempo de operación, lo que hace necesario la regeneración del carbón activado (Perry y Chilton, 1984).

Para la adsorción de CS_2 (entre otros compuestos de azufre orgánicos) se ha usado un carbón activado a base de hulla (Grant y col., 1962; Kohl y Riesenfeld, 1979). El proceso se lleva a cabo a una temperatura de 80 a $100^{\circ}F$, y se dice que el carbón activado es capaz de adsorber una cantidad de compuestos de azufre orgánicos, correspondiente al 10 - 12 % de su peso total.

Los equipos de adsorción que contienen el adsorbente sólido a través del cual el gas debe pasarse, pueden diseñarse con lechos fijos, móviles o fluidizados. El contenedor para un lecho fijo puede ser un cilindro vertical y horizontal, y el

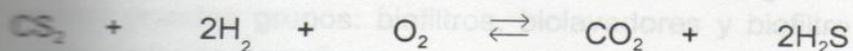
adsorbente puede colocarse en una o varias capas; para un lecho movable se usa un tambor rotatorio que contiene el adsorbente y en un adsorbedor fluidizado se tiene un lecho flotante de adsorbente, el cual se mantiene con el mismo aire contaminado (Peavy y col., 1985).

e) Combustión

Aunque es una fuente de contaminación del aire, la combustión también es la base para un importante proceso de control de contaminación del aire, en el cual el objetivo es convertir los contaminantes del aire a CO_2 y H_2O , a 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. Para que ocurra una combustión eficiente, es necesario tener la combinación apropiada de cuatro elementos básicos : oxígeno, temperatura, turbulencia y tiempo (Peavy y col., 1985).

Dependiendo del contaminante que se quiera oxidar, pueden usarse los siguientes métodos: combustión directa a la flama, combustión térmica o combustión catalítica. Los dos últimos se usan cuando la concentración de los contaminantes en el gas es muy baja. La temperatura de combustión puede disminuirse considerablemente cuando se usa un catalizador apropiado, esto reduce el consumo de combustible.

Para el caso de eliminación de CS_2 de corrientes gaseosas, se han empleado diferentes procesos catalíticos (Tong y col., 1992), dentro de los cuales puede mencionarse el proceso *Carpenter - Evans*, el cual emplea un catalizador de subsulfuro de níquel (Ni_3S_2) a temperaturas de 790 - 840° F. En este proceso el CS_2 sufre una hidrogenación a H_2S según la siguiente reacción:



Se han alcanzado eficiencias de eliminación del 80%. Sin embargo, debido a la deposición de carbón sobre el catalizador, este tiene que regenerarse cada 30 ó 35 días. Otro proceso que puede mencionarse es el que utiliza un catalizador de cromo-alúmina, en el cual se alcanzan conversiones completas, sin embargo, opera a temperaturas de 600 a 800° F y presiones elevadas.

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 en la regeneración de los catalizadores.

Métodos Biológicos

Según la biodegradabilidad de los compuestos orgánicos, estos pueden clasificarse como: *biogénicos* o de origen natural y *antropogénicos* o generados por el hombre. De éstos últimos, los compuestos xenobióticos incluyen a los que se degradan fácilmente, (xenobióticos débiles, similares a los biogénicos) otros de difícil degradación (compuestos recalcitrantes), y a los que no es posible degradar, (compuestos persistentes) (Ottengraf, 1987). Sin embargo, las investigaciones realizadas con sistemas biológicos han permitido aislar y seleccionar especies microbianas, capaces de degradar diferentes contaminantes del ambiente, tanto de fácil degradación, por el exceso en el ambiente como, CS_2 (Revah y col., 1995) así como compuestos recalcitrantes como el DDT.

Los procesos biológicos para la eliminación de desechos contaminantes, aparte de que se aplican en condiciones de temperatura y presión bajas, tienen la ventaja de que generalmente no transfieren los contaminantes a una nueva fase (gas en sólido, sólido en agua, etc.), que es una característica frecuente en otros métodos de purificación. Por otra parte estos procesos son simples, confiables y baratos y son especialmente efectivos en concentración bajas.

La biofiltración es un proceso biotecnológico que se utiliza en el tratamiento de efluentes gaseosos contaminado con diferentes compuestos volátiles como por ejemplo el H_2S , CS_2 biogas generado en las plantas de tratamiento de aguas, compuestos como VOCs. Estos sistemas biológicos se aplican desde los años 20 para eliminar compuestos con malos olores. Este proceso ha mostrado ser efectivo en el tratamiento de una variedad de compuestos tales como VOCs olores y muchos compuestos reducidos de azufre. En los años 80 su aplicación se extendió para eliminar otro tipo de compuestos

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 grandes grupos: biofiltros, biolavadores y biofiltro de lecho escurrido. A continuación se describen:

a) Biofiltros

Consisten de un compartimiento empacado con algún material como composta, turba, etc., a través del cual se hace subir la corriente gaseosa; el material de empaque sirve como soporte de los microorganismos, además de que contiene ciertos nutrientes para los mismos. Los equipos más sencillos de operar y más empleados para la purificación biológica de gases de desecho son los biofiltros.

Actualmente se usan empaques mixtos, esto es, composta, turba, etc. mezcladas con partículas de madera, algún plástico, o algún otro material para alcanzar áreas de contacto mayores y caídas de presión más bajas. Se ha encontrado que el material de empaque debe contener al menos entre 40-60 % de humedad, por lo que en éstos sistemas es conveniente humidificar el gas de entrada o rociar el empaque por la parte superior, o realizar ambas operaciones al mismo tiempo. Debido a que las condiciones climáticas pueden afectar severamente el empaque, se usan también filtros cerrados, con la desventaja de resultar más costosos. ver Tabla 1.5 Otro factor importante es la desactivación que puede sufrir el empaque después de algún tiempo de trabajo (años), por lo que es necesario la adición de nutrientes con cierta frecuencia, o alguna otra forma de reactivarlo, incluso puede llegar a ser necesario sustituirlo por material nuevo. En la literatura se encuentran muy buenas revisiones sobre los aspectos importantes de la biofiltración, en donde pueden encontrarse mayores detalles (Bohn, 1992; Devinny, 1995; Leson y Winer, 1991; Williams y Miller, 1992).

Tabla 1.5 Descripción general de un biofiltro

| Características: | Ventajas: |
|--|--|
| Biomasa inmovilizada | Área gas/líquido alta |
| Fase líquida inmóvil | Fácil arranque |
| Un reactor | Bajo costo de operación |
| Área de aplicación: | Desventajas: |
| Concentración de compuestos < 1 g/m ³ | Poco control de condiciones de reacción |
| Coefficiente de Henry < 10 | Lento el proceso de adaptación al flocular la concentración de gas |
| | Área grande requerida |

b) Biolavadores

Un biolavador es un sistema que trabaja con la biomasa suspendida (es un equipo muy poco usado). Los biolavadores constan de dos compartimientos: un lavador donde se realiza la transferencia de masa de contaminante y oxígeno de la fase gas pasa a la fase líquida, y un regenerador en donde se encuentra la biomasa cuya función es oxidar al contaminante y así regenerar al líquido, en ésta sección puede ser necesario suministrar oxígeno para llevar a cabo una buena oxidación del sustrato.

En éstos sistemas también se hace necesario ajustar las condiciones físicas y químicas tales como la temperatura, el pH, la relación carbono/nitrógeno, etc., para obtener una mayor eficiencia de remoción de contaminantes. Ver Tabla 1.6.

Existen diferentes diseños de biolavadores dependiendo de las sustancias a manejar y los grados de remoción que necesitan alcanzarse (Kohler, 1982; Lebeault, 1990).

Tabla 1.6 Descripción general de un biolavador

| Características | Ventajas |
|--|---|
| Mayoría de la biomasa suspendida | Mejor control de reacción |
| Fase líquida móvil | Posible evitar acumulación de productos |
| Dos reactores | Equipo compacto |
| | Bajas caídas de presión |
| Área de aplicación | Desventajas |
| Concentración de compuestos < 5 g/m ³ | Baja área superficial para transferencia de masa |
| Coefficiente de Henry < 0.01 | Lavado de microorganismos a lenta su crecimiento |
| | Alta generación de lodos |
| | Sistema de arranque complejo |
| | Requerimientos extra de aire para concentraciones mayores de contaminante |
| | Alto costo de mantenimiento |

c) Biofiltros de lecho escurrido (BLE)

Los BLE se presentan como una alternativa a los biofiltros cuando pueden aparecer 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 ésta 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. Ver Tabla 1.7

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 ésta biopelícula baja una película de líquido que contiene los nutrientes necesarios para los microorganismos.

Dentro de los parámetros importantes a manejar en estos equipos, se encuentran pH, 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. (Bishop y Kinner, 198; Diks y Ottengraf, 1991).

Tabla 1.7 Descripción general de las características de un biolavador de lecho escurrido

| Características | Ventajas |
|--|--|
| Biomasa inmóvil | Comparables a biolavador |
| Fase líquida móvil | Mejor retención de microorganismos |
| Dos reactores | Un reactor |
| Área de aplicación | Desventajas |
| Concentración de compuestos < 0.5 g/m ³ | Área superficial baja para transferencia de masa |
| Coefficiente de Henry < 1 | Generación alta de lodos |
| | Complicado sistema de arranque |
| | Costos de operación más altos. |

Eliminación biológica de compuestos reducidos de azufre.

En la eliminación de compuestos reducidos de azufre como el CS₂ y H₂S se han identificado microorganismos que son capaces de oxidarlos (a compuestos menos tóxicos) en corrientes gaseosas. Se pueden mencionar a *Thiobacillus thioparus* (Kanagawa y Mikami, 1989; Cho y col., 1991) *Hyphomicrobium sp* (Suylen y Kuenen, 1986), *Pseudomonas acidovorans* (Zhang y col. 1991) y diferentes cepas de hongos (Ishikawa y col., 1980).

Algunos de los microorganismos capaces de oxidar este tipo de compuestos presentan la característica de producir azufre de manera intracelular por ejemplo *Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Thiospira* y el azufre tiene que ser separado de la biomasa. Por otra parte las bacterias del género *Thiobacillus* son también capaces de oxidar este tipo de compuestos y a diferencia de los ya mencionados éstos producen azufre extracelularmente, los *Thiobacillus* son los mas estudiados, tanto en cultivos puros como con consorcios en procesos de eliminación (oxidación) de compuestos reducidos de azufre.

Características de las bacterias sulfoxidantes

Son bacterias generalmente quimiolitautótrofas, que tienen las siguientes características: generalmente son células pequeñas gram negativas con forma de bacilos pequeños que miden 0.5µm de ancho por 1-3 µm de largo, móvil por un flagelo polar sencillo. La energía necesaria para llevar a cabo sus funciones se deriva de la oxidación de uno o más compuestos reducidos de azufre incluyendo sulfuros, tiosulfato, azufre elemental, sulfito y politionatos (Tabla 1.8).

Tabla 1.8. Donador de electrones para algunas especies de microorganismos litotróficos

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

Fuente: Janssen, 1996.

Rutas metabólicas oxidativas de compuestos azufrados

La energía metabólica para el mantenimiento y el crecimiento de los microorganismos sulfoxidantes es derivada de la oxidación de uno o más compuestos reducidos de azufre. Todas las especies pueden fijar bióxido de carbono por medio del ciclo de Benson-Calvin y son capaces de crecer autotróficamente; algunas especies son quimiolitotróficos obligados mientras que otros pueden crecer heterotróficamente.

La química de compuestos de sulfuro inorgánico es compleja y la transformación biológica de estos compuestos es difícil de estudiar, debido a la reactividad química del sustrato y los intermediarios metabólicos. Uno de los más presumibles es el azufre elemental, sin embargo, existen algunas propuestas sobre las rutas metabólicas en la que *Thiobacillus* oxidan compuestos azufrados como es el tiosulfato (ya que este es un precursor biogénico del CS₂ tanto en el ácido sulfhídrico y el azufre).

Una de las rutas bioquímicas se presenta en la Figura 1.2. Esta ruta conserva el concepto de las interacciones químicas extracelulares de politionatos, pero de manera intracelular involucran al tetracionato y al tritionato como intermediarios de la oxidación del tiosulfato. En primer lugar, el tiosulfato es oxidado a tetracionato

en el periplasma del microorganismo, donando sus electrones directamente al citocromo c. Después el tetratiónato es oxidado a sulfato en el citoplasma, que a su vez es oxidado a sulfato liberándose 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.

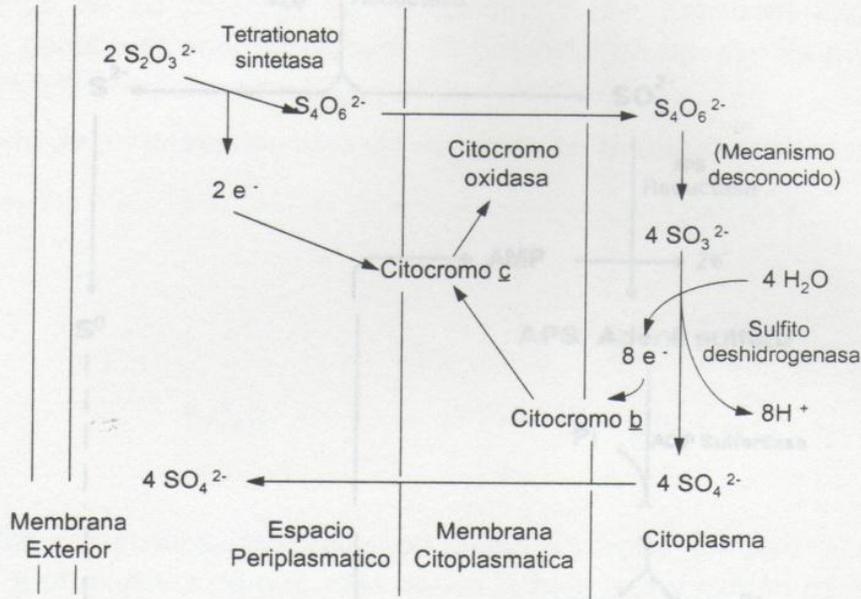


Figura 1.2 Oxidación de tiosulfato. Oxidación periplasmática de tiosulfato y oxidación citoplasmática de tetratiónato por *Thiobacillus tepidarius* (Kelly 1989)

Se han realizado otros estudios para poder explicar la conversión de tiosulfato hasta sulfato y sulfuro por medio de la ruta adenosin-fosfosulfato(APS), por medio de la enzima APSreductasa y ADP-sulforilasa. Esto se muestra en la Figura 1.3

La oxidación del sulfuro y del azufre implican primero la reacción de esas sustancias con el grupo sulfhídrico de la célula, con la formación de un complejo sulfuro-sulfhídrico. El azufre elemental producido 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 se acumula mas sino probablemente oxidado, tan pronto como se forma, aunque este mecanismo no está bien establecido.

El sulfuro 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. Además, hay una fosforilación a nivel de sustrato en la que el APS reacciona con Pi y se convierte en ADP y sulfato.

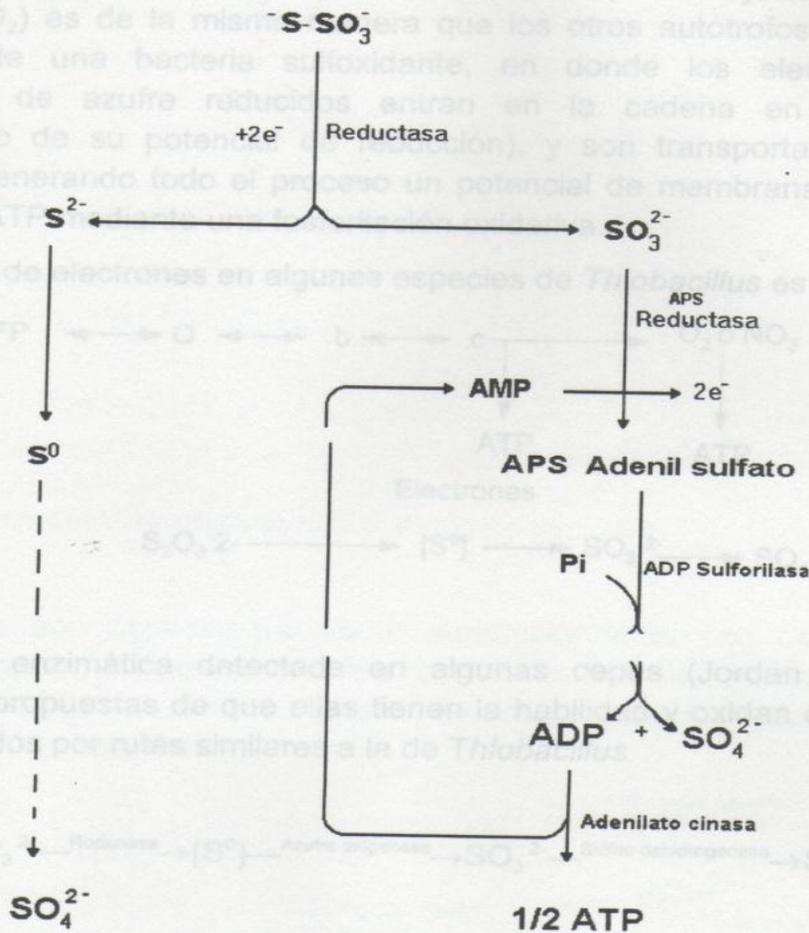


Figura 1.3 Oxidación del tiosulfato hasta sulfato y producción de energía.

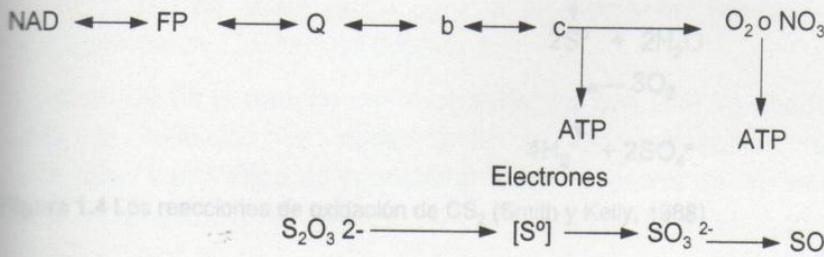
El sistema de oxidación de tiosulfato es una enzima tiosulfato oxidasa llamada tiosulfato-citocromo c reductasa, la cual no está involucrada en el proceso de fosforilación oxidativa, sin embargo la transferencia de moléculas de oxígeno es por medio de los citocromos b ó c.

Este proceso es acoplado para la formación de ATP. La energía generada puede ser utilizada para llevar el flujo de electrones invertido por la reducción de NAD(P). La reducción directa de nucleótidos de piridina por compuestos inorgánicos de

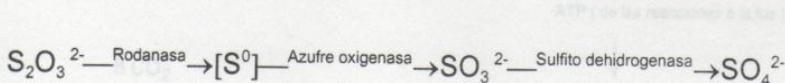
azufre no es termodinámicamente factible e involucra altas reacciones endergónicas.

El modo de formación del poder reductor necesario para la fijación de bióxido de carbono (CO₂) es de la misma manera que los otros autótrofos. El sistema de transporte de una bacteria sulfoxidante, en donde los electrones de los compuestos de azufre reducidos entran en la cadena en varios puntos (dependiendo de su potencial de reducción), y 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 transporte de electrones en algunas especies de *Thiobacillus* es el siguiente:



Generalmente son capaces de crecer autótroficamente con CO₂ como única fuente de carbono. La actividad enzimática detectada en algunas cepas (Jordan y col., 1994) confirman la propuestas de que ellas tienen la habilidad y oxidan compuestos de azufre reducidos por rutas similares a la de *Thiobacillus*



No se conoce bien la ruta de degradación de CS₂ sin embargo se han propuesto las reacciones de oxidación de este, en donde se encuentran como intermediarios a H₂S, COS y S⁰. Durante el metabolismo aeróbico el CS₂ sufre una hidrólisis, después el COS se hidroliza y finalmente el H₂S se oxida a sulfato como se muestra en la Figura 1.4

La habilidad de algunas cepas para crecer anaeróbicamente con nitrato en CS₂ sugiere que una oxigenasa no es un componente obligatorio de la ruta y esto es probablemente consecutivo a la hidrólisis para sulfuro de carbonilo(COS) y el H₂S puede formarse durante el catabolismo del CS₂ (Smith y col., 1988).

Figura 1.3 Ciclo de Calvin a partir del carbono de CO₂ + 12 NADPH + 18 ATP se genera C₆H₁₂O₆ + 12 NADP + 18 ADP + Pi

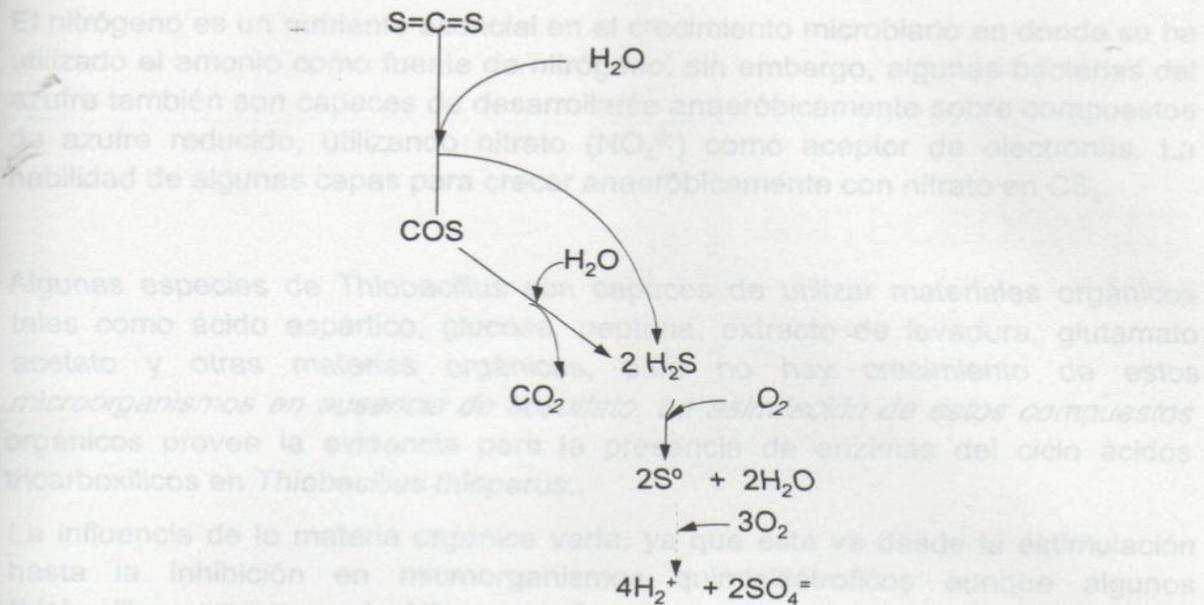


Figura 1.4 Las reacciones de oxidación de CS_2 (Smith y Kelly, 1988)

Generalmente son capaces de crecer autotróficamente con CO_2 como única fuente de carbono, los estudios sobre fijación de CO_2 han demostrado que las reacciones del Ciclo de Calvin (Figura 1.5) parecen ser las responsables de la fijación de CO_2 en este litotrófo.

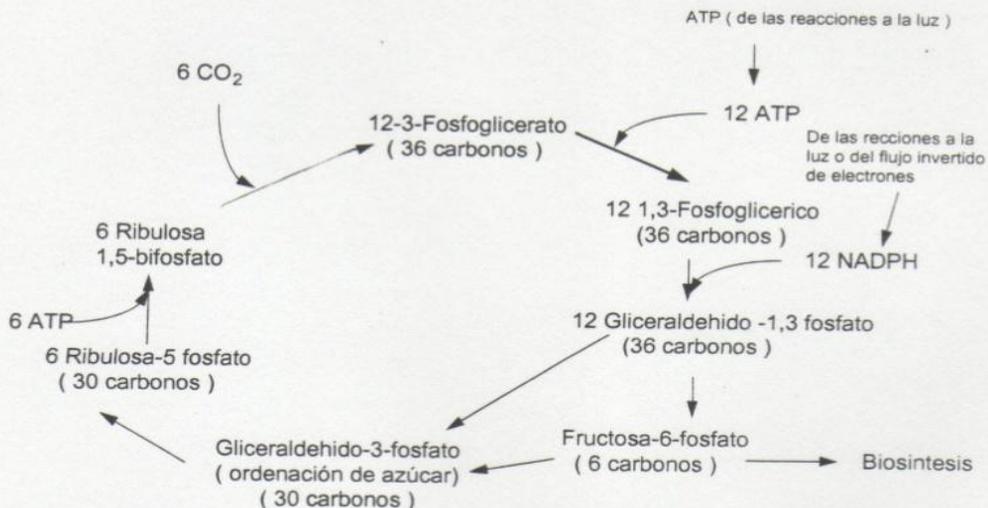


Figura 1.5 Ciclo de Calvin a partir del carbono de CO_2 + 12 NADPH + 18 ATP se genera $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ + 12 NADP⁺ + 18 ADP + Pi

El nitrógeno es un nutriente esencial en el crecimiento microbiano en donde se ha utilizado el amonio como fuente de nitrógeno, sin embargo, algunas bacterias del azufre también son capaces de desarrollarse anaeróbicamente sobre compuestos de azufre reducido, utilizando nitrato (NO_3^{2+}) como aceptor de electrones. La habilidad de algunas cepas para crecer anaeróbicamente con nitrato en CS_2 .

ANTECEDENTES

Algunas especies de *Thiobacillus* son capaces de utilizar materiales orgánicos tales como ácido aspártico, glucosa, peptona, extracto de levadura, glutamato acetato y otras materias orgánicas, pero no hay crecimiento de estos microorganismos en ausencia de tiosulfato. La asimilación de estos compuestos orgánicos provee la evidencia para la presencia de enzimas del ciclo ácidos tricarboxílicos en *Thiobacillus thioparus*..

La influencia de la materia orgánica varía, ya que esta va desde la estimulación hasta la inhibición en microorganismos quimiolitótrofos aunque algunos *thiobacillus* y una cepa de *Nitrobacter* fueron capaces de crecer en presencia de estos compuestos (Bock, 1976).

Tal parece que varias bacterias oxidantes del azufre se desarrollan sólo mixotróficamente, utilizando H_2S como fuente de energía y un compuesto orgánico como fuente de carbono. En esta categoría esta *Beggiatoa*, un organismo muy difundido en los sedimentos marinos y de agua dulce.

Actualmente un problema ambiental es la emisión de compuestos azufrados producidos en la elaboración de celofán y rayón. Uno de estos es el **CAPITULO II**
 Sulfuro de carbono (CS_2), que por sus propiedades químicas es utilizado como solvente en dicho proceso. Así mismo se encuentra al ácido sulfhídrico que es un intermediario de la oxidación de CS_2 .

En algunos casos el CS_2 liberado durante el proceso es recuperado. Aproximadamente el 70 %, el restante es arrastrado junto con una corriente gaseosa. Esta corriente se emite a la atmósfera en grandes cantidades, pero las concentraciones de CS_2 y H_2S son muy bajas, de tal manera que la recuperación de CS_2 no es posible. Como estos contaminantes son tóxicos, corrosivos y malolientes, deben ser eliminados antes de ser desechados a la atmósfera. Los métodos convencionales son ineficientes cuando la concentración de CS_2 en la corriente gaseosa es baja (< 1000 ppm), por lo que se han propuesto métodos biológicos para su eliminación.

ANTECEDENTES

Actualmente existen algunos trabajos sobre la oxidación y el metabolismo de CS_2 por microorganismos (un reporte muy breve sobre su oxidación por *Thiobacillus thiooxidans*, de Butler y col., 1968; Rajagopal y Daniels, 1966; Smith y Kelly, 1968; Pies y col., 1993; Jordan y col., 1995); así como estudios a nivel reactor. De hecho los reportes encontrados en la literatura se refieren a sistemas para la eliminación de CS_2 y H_2S simultáneamente.

Sublette y col. (1987) realizaron un estudio sobre la eliminación biológica de H_2S empleando un cultivo de *Thiobacillus denitrificans* en reactores en lote y condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Los autores reportaron que el rendimiento de biomasa en condiciones aeróbicas es menor que en condiciones anaeróbicas, pero la carga máxima soportada por los microorganismos es mayor en la segunda. Determinaron también la estequiometría de la reacción y reportaron que las bacterias empleadas son muy sensibles a CH_3SH , pero toleran al CS_2 , COS y CH_3SCH_3 . Demostraron también que otros *Thiobacillus* crecen con H_2S como fuente de energía, pero ninguno presentó ventajas claras sobre *Thiobacillus denitrificans* (Cadenhead y Sublette, 1990).

Kanagawa y Mikami (1989) trabajaron con *Thiobacillus thioparus* TK-m para remover metanotico, sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo y sulfuro de hidrogeno, y reportaron bajas eficiencias.

Actualmente un problema ambiental es la emisión de compuestos azufrados producidos en la elaboración de celofán y rayón. Uno de estos compuestos es el bisulfuro de carbono (CS_2), que por sus propiedades químicas es utilizado como solvente en dicho proceso. Así mismo se encuentra al ácido sulfhídrico que es un intermediario de la oxidación de CS_2 .

En algunos casos el CS_2 liberado durante el proceso se puede recuperar. Aproximadamente el 70 %, el restante es arrastrado junto con una corriente gaseosa. Esta corriente se emite a la atmósfera en grandes cantidades, pero las concentraciones de CS_2 y H_2S son muy bajas, de tal manera que la recuperación de CS_2 no es posible. Como estos contaminantes son tóxicos, corrosivos y malolientes, deben ser eliminados antes de ser desechados a la atmósfera. Los métodos convencionales son ineficientes cuando la concentración de CS_2 en la corriente gaseosa es baja (< 1000 ppm), por lo que se han propuesto métodos biológicos para su eliminación.

Actualmente existen algunos trabajos sobre la oxidación y el metabolismo de CS_2 por microorganismos (un reporte muy breve sobre su oxidación por *Thiobacillus thiooxidans*, de Butler y col., 1969; Rajagopal y Daniels, 1986; Smith y Kelly, 1988; Plas y col., 1993, Jordan y col., 1995); así como estudios a nivel reactor. De hecho los reportes encontrados en la literatura se refieren a sistemas para la eliminación de CS_2 y H_2S simultáneamente.

Sublette y col. (1987) realizaron un estudio sobre la eliminación biológica de H_2S empleando un cultivo de *Thiobacillus denitrificans* en reactores en lote y condiciones tanto aeróbicas como anaeróbicas. Los autores reportaron que el rendimiento de biomasa en condiciones aeróbicas es menor que en condiciones anaeróbicas, pero la carga máxima soportada por los microorganismos es mayor en la segunda. Determinaron también la estequiometría de la reacción y reportaron que las bacterias empleadas son muy sensibles a CH_3SH , pero toleran al CS_2 , COS y CH_3SCH_3 . Demostraron también que otros *Tiobacilos* crecen con H_2S como fuente de energía, pero ninguno presentó ventajas claras sobre *Thiobacillus denitrificans* (Cadenhead y Sublette, 1990).

Kanagawa y Mikami (1989) trabajaron con *Thiobacillus thioparus* TK-m para remover metanotiol, sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo y sulfuro de hidrógeno, y reportaron bajas eficiencias.

Rajagopal y Daniels (1986) realizaron un estudio con diferentes compuestos azufrados, tanto orgánicos como inorgánicos, dentro de los que se encuentra el CS_2 ; para determinar su efecto se utilizó también como fuente de azufre para diferentes bacterias metanogénicas. Encontraron que el CS_2 puede servir como fuente de azufre para el crecimiento de *Thermolithotrophicus*, *jannaschii*, *deltae* cepas DRC y DLH, y *Thermoautotrophicum* cepas Marburg y DH; con crecimientos máximos (cerca de los alcanzados con sulfuro) para estos últimos y *thermolithotrophicus*; mientras que para *jannaschii* y *deltae* cepas DRC y DLH los crecimientos alcanzados fueron comparativamente más bajos.

Smith y Kelly (1988) se probaron nueve especies de tiobacilos para evaluar su crecimiento sobre CS_2 . Únicamente se obtuvieron resultados positivos con *T. thioparus* cepa TK-m, la cual también es capaz de crecer sobre sulfuro de dimetilo y tiocianato. La estequiometría de la oxidación de CS_2 resultó abajo de la relación molar esperada de cuatro O_2 por CS_2 oxidado. La mejor relación fue de 1.5 : 1.0 a 25 mM de CS_2 , con un promedio de $1.32 \pm 0.13 O_2$ por CS_2 para 5 - 50 mM, lo cual indica una oxidación incompleta del bisulfuro con posible acumulación de azufre.

Por su parte Plas y col. (1993), aislaron un *Thiobacillus* que no está bien identificado, ya que la composición de la pared celular corresponde a *T. thiooxidans*, pero los parámetros fisiológicos corresponden a *T. thioparus*, sin embargo, es capaz de usar el CS_2 como única fuente de energía. Las muestras de cultivo para el enriquecimiento se obtuvieron de un BLE construido para el tratamiento biológico de gases de desecho conteniendo H_2S y CS_2 donde los parámetros cinéticos se presentan en el Tabla 2.1

Jordan y col. (1995), reportaron las características metabólicas de bacterias aisladas de suelos y hojas del árbol del roble (productor de CS_2), capaces de usar CS_2 como único sustrato. Su estudio comprende características morfológicas y fisiológicas de las bacterias, así como aspectos cinéticos y bioquímicos. Las cepas aisladas difieren de las conocidas anteriormente, que degradan CS_2 en que son heterótrofas facultativas, algo que no se había reportado. Además, son capaces de crecer en un amplio intervalo de compuestos de azufre.

Se reportaron los parámetros cinéticos de cada una de las bacterias estudiadas los que son comparables a los encontrados en la literatura, que se muestran en la Tabla 2.1 Por otro lado, los resultados sugieren que la trayectoria metabólica de

degradación de CS_2 , probablemente sea la reportada para *T. thioparus*, cepa TK-m, esto es, una hidrólisis inicial a COS y H_2S y una segunda a CO_2 y H_2S . Sin embargo, quedan por realizar varios estudios más para poder clasificar con mayor precisión estos microorganismos.

Buisman y col. (1989), proponen implementar un proceso biotecnológico para la eliminación de sulfuros, basándose en el principio de que el sulfuro puede ser oxidado a azufre elemental el que puede separarse por sedimentación. Han encontrado que los principales productos de oxidación biológica del sulfuro son el azufre y el sulfato. Ellos observaron que concentraciones altas de sulfuro pueden inhibir la actividad de los microorganismos debido a la formación de polisulfuros; encontraron un intervalo de pH óptimo de 8.0-8.5 y un intervalo de temperatura óptimo de 25-35 °C

Buisman y col. (1990) sobre la optimización de la producción de azufre en este proceso, reporta que la producción de sulfatos es muy baja a concentraciones de oxígeno altas y de sulfuro en el reactor de alrededor de 10 mg/L y baja aún más a concentraciones de sulfuro mayores de 20 mg/L aún a concentraciones altas de oxígeno. También observaron que se produce más sulfato al trabajar con biomasa inmovilizada que al hacerlo con biomasa suspendida a la misma concentración tanto de oxígeno como de sulfuro.

Revah y col. (1994), han utilizado un cultivo mixto en la oxidación de bisulfuro de carbono (CS_2), ácido sulfhídrico (H_2S) y se han determinado algunas condiciones de operación en donde observaron que este cultivo crece y oxida dichos compuestos a un pH de 7 y una temperatura de 30°C. En la oxidación biológica de CS_2 y H_2S el producto final es SO_4^{2-} (H_2SO_4) por lo que es necesario neutralizar el medio de cultivo, además se observa que la oxidación se ve afectada negativamente a concentraciones mayores de 20 g/L de SO_4^{2-} en el sistema se han determinado algunos parámetros cinéticos que se muestran en la Tabla 2.1

Estos sistemas biológicos se encuentran operando industrialmente en las empresas que elaboran celofán y rayón (ver Tabla 2.2)

Tabla 2.1. Parámetros cinéticos utilizando a CS₂ como fuente de energía por *Thiobacillus*

| Fuente | Ks (mgCS ₂ /L) | Vmax (mg CS ₂ /gprot.*min) |
|-------------------|------------------------------|--|
| Smith y Kelly | 1.2 | 4.3 |
| Plas y col. | No reportado | 2.5 |
| Revah y col. | 9.03 | 3.4 |
| Jordan y col. KS1 | 3.17 | 5.43 |
| KL1 | 2.61 | 6.66 |
| KS2 | 2.38 | 3.17 |
| KL2 | 5.84 | 3.80 |

Las condiciones bajo las cuales fueron obtenidas dichas constantes son:

Jordan y col. KS1 a una temperatura (T) de 37°C a pH de 7.0 KS2 a T de 30°C a pH de 7.5 KL1 a T de 37°C a pH de 7.5 KL2 a T de 25°C a pH de 7.3

Plas y col.: T de 30°C y pH de 7,2

Smith y Kelly: T de 30°C y pH de 7,0

Revah y col. con un consorcio a T de 30°C y pH de 7.0

Para la oxidación de CS₂ se utiliza un biorreactor de lecho escurrido (BLE) a nivel planta piloto. Este consiste en hacer pasar el gas contaminante por la parte inferior del BLE a través de un empaque que se encuentra cubierto por una biopelícula. Esta contiene microorganismos que pueden oxidar dicho compuesto contaminante, y la corriente gaseosa es desechada por la parte superior. En contracorriente se alimenta medio fresco que contiene los nutrientes necesarios para que los microorganismos puedan crecer y llevar a cabo la oxidación. En este sistema se tratan flujos de 150 L/min de CS₂ teniéndose un 93% de eficiencia de eliminación de contaminantes. La tasa de degradación de CS₂ alcanzadas fueron de 300 g CS₂/m³-h (Trinidad, 1996).

Dentro de estos estudios se observó que el cultivo mixto crece y oxida dichos compuestos a un pH de 7 y que a pH mayores el cultivo presenta graves problemas eliminándose la oxidación biológica; y a pH menores, aunque disminuye la oxidación de los compuestos existe eliminación por que este tipo de microorganismos es capaz de crecer a pH muy bajos de 1.0 y una temperatura de 30°C. En la oxidación biológica el producto final es sulfato (SO₄) el cual tiene un efecto negativo sobre la oxidación de CS₂ a concentraciones mayores de 20 g/L de SO₄⁼ en el sistema (Revah, 1995)

Estos sistemas biológicos se encuentran operando industrialmente en las empresas que elaboran celofán y rayón (ver Tabla 2.2).

Tabla 2.2. Concentraciones de H₂S y CS₂ de las diferentes plantas en donde es generado.

| Planta de producción | Concentración del contaminante (ppmv) | |
|----------------------|---------------------------------------|-----------------|
| | H ₂ S | CS ₂ |
| Planta de celofán | 250-500 | 200-900 |
| Planta de Rayón | 20-150 | 20-150 |
| Planta de esponja | 40-150 | 50-800 |

Fuente: Revah 1995

El interés de estudiar los aspectos microcinéticos de la oxidación de bisulfuro de carbono CS₂ se debe a la importancia de explicar los fenómenos de la oxidación eliminando todos los factores involucrados en el BLE (aspectos macrocinéticos).

La microcinética del proceso se refiere a los fenómenos que tienen relación directa con los microorganismos, por ejemplo: la tasa de oxidación del compuesto contaminante (sustrato) y el efecto que tienen sobre ésta variables tales como la temperatura y el pH; la inhibición que pueden experimentar los microorganismos debido a la concentración de sustrato, fenómenos de heterotrofia, etc. Por otro lado, la macrocinética se refiere a los fenómenos físicos que ocurren en el proceso, como por ejemplo la transferencia de masa del gas al líquido y de aquí a los microorganismos, el efecto de los flujos de gas y líquido empleados en el proceso.

Por lo que considerando los factores que pueden afectar la oxidación en el aspecto macrocinético como las zonas anoxicas en el reactor, las altas concentraciones de zinc presentes en la eliminación de CS₂ en la producción de fibra de rayón y celofán, y las características de crecimiento que presentan los microorganismos reducidos de azufre. Se planteo el objetivo principal del trabajo que consistió en evaluar el efecto de algunos factores que interfieren en el proceso de eliminación de compuestos azufrados utilizando como modelo al CS₂ por medio de un consorcio.

CAPITULO III

OBJETIVO

OBJETIVOS

General :

Estudiar el efecto de algunos factores que intervienen en el proceso biológico en la eliminación de compuestos azufrados utilizando como modelo al CS_2 , a nivel microcinético

Particulares :

Evaluar el efecto de algunos nutrientes sobre la oxidación de CS_2

Identificar a los diferentes microorganismos que componen el consorcio microbiano y evaluar según el género su capacidad sulfoxidante

Evaluar los requerimientos energéticos del consorcio

Identificar los intermediarios en la oxidación biológica de CS_2 por el consorcio

Evaluar la capacidad de oxidación otros compuestos organosulfurados (tiofeno) por el consorcio

CAPITULO IV

OBJETIVO

General :

Estudiar el efecto de algunos factores que intervienen en el proceso biológico en la eliminación de compuestos azufrados utilizando como modelo al CS_2 a nivel microcinético

Particulares :

Evaluar el efecto de algunos nutrientes sobre la oxidación de CS_2

Identificar a los diferentes microorganismos que componen el consorcio microbiano y evaluar según el género su capacidad sulfoxidante

Evaluar los requerimientos energéticos del consorcio

Identificar los intermediarios en la oxidación biológica de CS_2 por el consorcio

Evaluar la capacidad de oxidación otros compuestos organosulfurados (tiofeno) por el consorcio

MATERIALES Y MÉTODOS

CAPÍTULO IV

MATERIALES Y MÉTODOS

Tabla 4.1 Medio de cultivo Sublett (1967)

| Compuesto | Concentración (g/L) | Solución de elementos traza | |
|---|---------------------|---|-------|
| Na_2HPO_4 | 1.2 | Compuesto | g/L |
| K_2HPO_4 | 1.6 | $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.51 |
| $\text{CaCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.4 | KI | 0.14 |
| H_2Cl | 0.5 | KBr | 0.14 |
| FeCl_3 | 0.02 | H_3BO_3 | 3.06 |
| MgCl_2 | 0.03 | ZnCl_2 | 0.28 |
| KCl | 0.02 | $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.33 |
| NaHCO_3 | 1.0 | $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.51 |
| Solución de metales pesados | 15 ml | $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ | 0.51 |
| Agua mineral | 50 ml | $\text{SnCl}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.14 |
| | | $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.16 |
| | | $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.16 |
| Solución de metales pesados | | $\text{CuSeO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ | 0.14 |
| DTA | 1.5 g/L | NaVO_3 | 0.024 |
| $\text{NaCO}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.1 g/L | | |
| Solución de elementos traza | 6.0 ml/L | | |

Sistema experimental

En los experimentos de respirometría se utilizaron botellas serológicas wheaton de 300 ml con 270 ml de medio mineral y 30 ml de inóculo. El consumo de oxígeno como medida indirecta de la oxidación de los sustratos se midió por un oxímetro YSI modelo 9B.

Para los experimentos en microcosmos se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 ml con válvulas mininert con rosca con 25 ml de medio mineral y 2.5 ml de inóculo. Se determinó proteína, sulfatos y concentración de CS_2 y H_2S en el aire con respecto al tiempo.

Condiciones de cultivo

Los microorganismos se crecieron en medio mineral con matraces Erlenmeyer de 125 ml con válvulas mininert con rosca utilizando un volumen de llenado de 20%, 10% de

Inoculó

El inóculo utilizado para este estudio fue un consorcio tomado del Biorreactor de Lecho Ecurrido (BLE) de la planta piloto de la UAM-I Este BLE se encuentra operando desde diciembre del 1993, El medio mineral empleado es el reportado por Sublette(1987) (Tabla 4.1) a un pH de 7, a temperatura ambiente y como fuente de energía a CS_2 .

Medio de cultivo

El medio de cultivo empleado es el de la Tabla 4.1 este medio es el utilizado por los microorganismos autótrofos que utilizan como fuente de energía a CS_2 y como fuente de carbono a $NaHCO_3$ (CO_2).El pH del medio es de 7.

Tabla 4.1 Medio de cultivo Sublette(1987)

| Compuesto | Concentración (g/L) | Solución de elementos traza | |
|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|-------|
| Na_2HPO_4 | 1.2 | Compuesto | g/L |
| KH_2PO_4 | 1.8 | $AlCl_3 \cdot 6H_2O$ | 0.51 |
| $MgCl_2 \cdot 7H_2O$ | 0.4 | KI | 0.14 |
| NH_4Cl | 0.5 | KBr | 0.14 |
| $MnCl_2$ | 0.02 | H_3BO_3 | 3.06 |
| $CaCl_2$ | 0.03 | $ZnCl_2$ | 0.28 |
| $FeCl_3$ | 0.02 | $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.33 |
| $NaHCO_3$ | 1.0 | $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.51 |
| Solución de metales pesados | 15 ml | $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ | 0.51 |
| Agua mineral | 50 ml | $SnCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.14 |
| | | $BaCl_2 \cdot 2H_2O$ | 0.16 |
| Solución de metales pesados | | $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.16 |
| EDTA | 1.5 g/L | $CuSeO_4 \cdot 2H_2O$ | 0.14 |
| $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ | 0.1 g/L | $NaVO_3$ | 0.024 |
| Solución de elementos traza | 6.0 ml/L. | | |

Sistema experimental

En los experimentos de respirometría se utilizaron botellas serologicas wheaton de 300 ml con 270 ml de medio mineral y 30 ml de inóculo. El consumo de oxígeno como medida indirecta de la oxidación de los sustratos se midió por un oxímetro YSI modelo 50 B.

Para los experimentos en microcosmos se utilizaron matraces Erlenmeyer de 125 ml. con válvulas mininert con rosca con 25 ml de medio mineral y 2.5 ml de inóculo. Se determinó proteína, sulfatos y concentración de CS_2 y H_2S en el aire con respecto al tiempo.

Condiciones de cultivo

Los microorganismos se crecieron en medio mineral con matraces Erlenmeyer de 125 ml. con válvulas mininert con rosca utilizando un volumen de llenado de 20%, 10% de

inóculo (consorcio) del BLE, a una temperatura de 30 °C, pH de 7 y 150 r.p.m. de agitación.

Efecto de algunos nutrimentos en la oxidación de CS₂

Efecto del extracto de levadura

Para evaluar el efecto del extracto de levadura en el crecimiento del consorcio. Se adaptaron a los microorganismos adicionando extracto de levadura (1 g/L durante 48 horas) y 25 mg CS₂ /L. Los resultados se compararon con un control sin extracto de levadura. A partir de ese cultivo se preparó el inóculo y se realizó una cinética de crecimiento y producción de sulfatos en el medio de cultivo con 0 y 1 g/L de extracto de levadura y 25 mg CS₂ /L. Se calcularon las tasas de oxidación por medio de respirometría.

Efecto del cinc

Para observar el efecto del Zn²⁺ se adicionaron diferentes concentraciones de cinc (1.12, 25, 50 mg/L) con 25 mg/L de CS₂. Se determinaron proteína, sulfato y tasas de oxidación por respirometría.

Efecto del nitrato

Para observar el efecto del nitrato como aceptor de electrones o fuente de nitrógeno se realizaron cinéticas para ver como estas condiciones afectaban la oxidación de CS₂ por lo que se adapta el inóculo en las siguientes condiciones por microcosmos.

Condición:

Medio (fuente de nitrógeno NH₄), inóculo, en presencia de O₂ (control)

Medio (fuente de nitrógeno NH₄ y fuente de nitrógeno NO₃), inóculo, en presencia de O₂

Medio (fuente de nitrógeno NO₃) inóculo en ausencia de O₂

Para lograr condiciones anaeróbicas el oxígeno fue desplazado con helio aireando con este gas durante 20 minutos.

La concentración que se utilizó fue de NH₄Cl 0.5 g/L y de KNO₃ 0.94 g/L y se pusieron en las condiciones de operación ya establecidas.

Se determinó proteína, sulfatos y concentración de CS₂ y H₂S en el aire con respecto al tiempo.

| Compuesto | Concentración (g/L) |
|----------------------------------|---------------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 7.85 |
| KH ₂ PO ₄ | 4.71 |

Microorganismos sulfoxidantes presentes en el consorcio

Se utilizaron medios con inhibidores de crecimiento. Se aislaron las bacterias y los hongos del consorcio. Para ello en medio sólido se utilizó para el crecimiento de hongos el medio Sabouraud con 125,000 U/100 ml de cloranfenicol y para bacterias se utilizó medio mineral con 0.1 g/L de extracto de levadura adicionando 8 μ g/ml de nistatina.

Las placas se inocularon con el consorcio y se colocaron en atmósfera de CS₂ utilizando un desecador la incubación se realizó a una temperatura de 30°C durante 72 horas.

Se crecieron en medio líquido y se realizaron pruebas de respirometría para determinar las velocidades de oxidación de CS₂ por los diferentes microorganismos.

Terminado el periodo de incubación, se realizaron tinciones de Gram

Se determinaron proteína, sulfatos, CS₂, H₂S y oxígeno disuelto en líquido

Intermediarios en la oxidación de CS₂

Para observar los intermediarios se realizaron cinéticas para ver la oxidación de CS₂ y la aparición de los productos de oxidación.

Se determinaron proteína, sulfatos y concentración de CS₂ y H₂S en el aire con respecto al tiempo.

Energía de mantenimiento y energía de crecimiento

Se utilizó un sistema de células en reposo (resting cell) de acuerdo a Demain y Lin (1991) Para este se realizó una curva de crecimiento con medio mineral con 25 mg S₂/L y en la fase exponencial se toma el inóculo. Posteriormente fue centrifugado a 10000 rpm durante 20 minutos; las células fueron lavadas y después suspendidas en una solución salina. El amortiguador de fosfatos a pH de 7.0 y el medio mineral a pH de 7.0 fueron inoculados con la solución de células y en los sistemas se determinó la oxidación del bisulfuro de carbono, con respecto al tiempo.

Amortiguador de fosfatos a pH de 7

| Compuesto | Concentración (g/L) |
|----------------------------------|---------------------|
| Na ₂ HPO ₄ | 7.85 |
| KH ₂ PO ₄ | 4.71 |

Oxidación de compuestos azufrados diferente a CS_2

Para calcular la tasa de oxidación relativa de otros compuestos se utilizó una concentración de 1 mM de tiosulfato, bisulfuro de carbono, sulfito, azufre, sulfhídrico. La concentración de tiofeno utilizada fue de 60 mg/L con los microorganismos adaptados a se evaluó la tasa relativa de oxidación utilizando una curva patron con albúmina de 0 a 500 $\mu\text{g/ml}$

Sulfatos

Se determinaron sulfatos por espectrofotometría (Sheen, Kahler y Rosa, 1955; Thomas y Cotton, 1954).

El ion sulfato precipita en un medio con ácido clorhídrico y cloruro de bario, formando cristales uniformes como sulfato de bario. La absorbancia de la solución es medida por nefelometría o espectrofotometría y la concentración del ion sulfato es determinada por comparación de la lectura con una curva estándar.

El color o materia suspendida en grandes cantidades pueda interferir con este método. Alguna materia puede ser removida por filtración. Si ambos son pequeños en comparación con la concentración del ion sulfato, la interferencia puede ser corregida. La salica en exceso 500 mg/L, pueden interferir y en aguas que contienen grandes cantidades de materia orgánica no es posible la precipitación del sulfato de bario.

Hay otros iones en el agua que pueden formar compuestos insolubles con bario bajo condiciones fuertemente ácidas, la determinación puede ser hecha a temperatura ambiente, la cual puede variar en un intervalo de 10°C sin causar un error apreciable. La sensibilidad aproximada es de 1 mg de sulfato/L.

Reactivos

Mezcla de reacción: Mezcla 30 ml de HCl concentrado, con 300 ml de agua destilada, 300 ml de alcohol isopropílico o etílico al 95% y 75 g de cloruro de sodio. Posteriormente mézclalos con 50 ml de glicerol.

Cloruro de bario: cristales de tamaño de malla 20 o 30

Solución estándar de sulfato: Disuelve 147.9 mg de Na_2SO_4 anhidro en 1000 ml de agua destilada. Se hace una curva con incrementos en concentración de 5 mg/L en un intervalo de 0-40 mg/L. Alrededor de 40 mg/L la exactitud del método decrece y la suspensión de sulfato de bario pierde la estabilidad.

Procedimiento

- 1) Se coloca un volumen de 100 ml de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml
- 2) Se agregarán 5 ml de la mezcla de reacción
- 3) Se agita
- 4) Se adiciona una cucharada de cristales de cloruro de bario

5) Se agita durante 1 minuto exactamente y a una velocidad constante
 a 420 nm.

Técnicas de Análisis

Biomasa

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

Se basa en la reacción de cloruro de sodio con azufre elemental para formar tiocianato de sodio.

Sulfatos

Se determinaron sulfatos por espectrofotometría (Sheen, Kahler y Ross, 1955; Thomas y Cotton, 1954).

El ion sulfato precipita en un medio con ácido clorhídrico y cloruro de bario, formando cristales uniformes como sulfato de bario. La absorbancia de la solución es medida por nefelometría o espectrofotometría y la concentración del ion sulfato es determinada por comparación de la lectura con una curva estándar.

El color o materia suspendida en grandes cantidades puede inferir con este método. Alguna materia puede ser removida por filtración. Si ambos son pequeños en comparación con la concentración del ion sulfato, la interferencia puede ser corregida. La silica en exceso 500 mg/L pueden inferir y en aguas que contienen grandes cantidades de materia orgánica no es posible la precipitación del sulfato de bario.

Hay otros iones en el agua que pueden formar compuestos insolubles con bario bajo condiciones fuertemente ácidas, la determinación puede ser hecha a temperatura ambiente, la cual puede variar en un intervalo de 10°C sin causar un error apreciable. La sensibilidad aproximada es de 1 mg de sulfato/L.

Reactivos

Mezcla de reacción: Mezcla 30 ml de HCl concentrado, con 300 ml de agua destilada, 100 ml de alcohol isopropílico o etílico al 95% y 75 g de cloruro de sodio. Posteriormente mézclalos con 50 ml de glicerol.

Cloruro de bario: cristales de tamaño de malla 20 o 30

Solución estándar de sulfato: Disuelve 147.9 mg de Na_2SO_4 anhidro en 1000 ml de agua destilada. Se hace una curva con incrementos en concentración de 5 mg/L en un intervalo de 0-40 mg/L. Alrededor de 40 mg/L la exactitud del método decrece y la suspensión de sulfato de bario pierde la estabilidad.

Procedimiento.

- 1) Se coloca un volumen de 100 ml de la muestra en un matraz Erlenmeyer de 250 ml
- 2) Se agregarón 5 ml de la mezcla de reacción
- 3) Se agita
- 4) Se adiciona una cucharada de cristales de cloruro de bario

5) Se agita durante 1 minuto exactamente y a una velocidad constante

6) Se mide la absorbancia a 420 nm.

Determinación de azufre elemental

(Bartlett y Skoog, 1954; Karchmer, 1972; Schedel y Trüper, 1980)

Este método se basa en la reacción de cianuro de sodio con azufre elemental para formar tiocianato de sodio.

Reactivos.

Cianuro de sodio 0.1 M

Azufre cristalino puro.

$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0.75 M en 20 % de HNO_3

Procedimiento.

Se filtro una alícuota que contenía de 0 - 60 mg de azufre elemental, usando filtros de membrana con tamaño de poro de 0.1 mm. El filtro que retiene el azufre elemental, se incubó en 3 ml de NaCN 0.1 M a 90 ° C por 10 minutos. Después de enfriarse, se adicionó 6.5 ml de agua destilada y 0.5 ml de $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ 0.75 M en 20 % de HNO_3 . Finalmente, se midió la densidad óptica a 460 nm. Se preparó una curva de calibración de la misma manera con concentraciones conocidas.

Concentración de CS_2 y H_2S

Las concentraciones de CS_2 y H_2S se determinarán por cromatografía de gases utilizándose un cromatógrafo de gases HP 5890 II, que cuenta con detector fotométrico de flama y una columna de teflón de 1 m de longitud y 3 mm de diámetro, empacada con super Q; las condiciones de operación en el cromatógrafo son las siguientes:

Condiciones de operación

| | |
|-------------------------------|-------------------|
| Volumen de la muestra gaseosa | 400 μl |
| Temperatura de inyección | 150 °C |
| Temperatura de columna | 130 °C |
| Temperatura de detector : | 220 °C |
| Flujo de gas acarreador (He) | 20 mL/min. |
| Flujo de hidrógeno | 75 mL/min. |
| Flujo de aire | 100 mL/min. |

Tiofeno

La concentración de tiofeno se determinó por cromatografía de gases utilizándose un cromatógrafo de gases HP 5890. II, que cuenta con detector de ionización a la flama y una columna de megaboro HP-I con 5 metros de longitud.

| | |
|---|--|
| Volumen de la muestra | 400 μ l |
| Temperatura de inyección | 260 ° C |
| Temperatura de columna | 180 ° C a 260 °C durante 10 min. a una tasa de 20 °C/ min. |
| Temperatura de detector : | 280 ° C |
| Flujo de gas acarreador (N ₂) | 1.8 ml/min. |
| Flujo de hidrógeno | 75 ml/min. |
| Flujo de aire | 100 ml/min. |

Respirometría

El consumo de oxígeno como medida indirecta de la oxidación de los sustratos se midió por un oxímetro YSI modelo 50 B.

Determinación de consumo de O₂

En botellas para DBO se colocó el medio de cultivo aireado durante el tiempo necesario para saturar el medio de oxígeno (aproximadamente 30 minutos)

Las botellas se inocularon con el consorcio al 10 %

Se llevo el medio a las condiciones requeridas para la prueba

Se midió la concentración inicial de oxígeno disuelto en el medio

Se dejaron las botellas en agitación a temperatura(30°C), pH (7)

Se monitoreo el consumo de oxígeno disuelto en el líquido con respecto al tiempo con un oxímetro.

Se calculó la tasa de consumo de oxígeno (mg O₂/min) por medio de la pendiente de dicho consumo, con respecto al tiempo.

Se calculó el consumo de CS₂ (mg CS₂/gP*min) de acuerdo a la estequiometría global de la reacción de oxidación de CS₂ considerando la biomasa presente y la respiración endógena.

Respiración Endógena.

Para conocer el consumo real del sustrato azufrado se determinó la respiración endógena, la cual consiste en determinar el consumo de oxígeno requerido para el microorganismo tomando del inóculo con el 10% del volumen total.

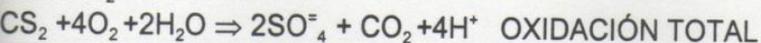
Se aireo durante 30 minutos para eliminar el bisulfuro contenido en el medio

Se dejaron las botellas en agitación, a temperatura y pH de operación

Se monitoreó el consumo de oxígeno a través del tiempo

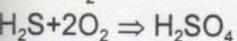
Para los cálculos de las tasas relativas de oxidación a partir del oxígeno consumido se hicieron de acuerdo con las siguientes ecuaciones:

Para CS_2 de oxidación:



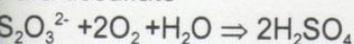
Factor $CS_2 = 0.59 \text{ mg } CS_2 / \text{mg } O_2$

Para H_2S :



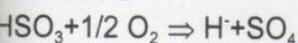
Factor $H_2S = 0.53 \text{ mg } H_2S / \text{mg } O_2$

Para tiosulfato



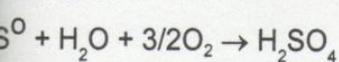
Factor $S_2O_3^{2-} = 1.75 \text{ mg } S_2O_3^{2-} / \text{mg } O_2$

Para sulfito



Factor $HSO_3^- = 5.06 \text{ mg } HSO_3^- / \text{mg } O_2$

Para azufre



Factor $S^0 = 0.67 \text{ mg } S^0 / \text{mg } O_2$

Microcosmos

Microcosmos es una muestra alterada mínimamente de un ecosistema conducida al laboratorio para ser estudiada, que se comporta de manera ecológicamente similar en donde se seleccionan ciertas propiedades naturales. Los estudios de microcosmos han sido propuestos como un método directo, efectivo para predecir el efecto ecológico en experimentos en campo. Las variables pueden ser controladas más efectivamente que en el ecosistema actual. (Krimsky y col., 1995).

En matraces Erlenmeyer de 125 ml con válvulas mininert con rosca utilizando un volumen de llenado de 20% de medio de cultivo.

Las botellas se inocularon con el consorcio del BLE al 10%

Se llevo el medio a las condiciones requeridas para la prueba

Se midió la concentración inicial de CS_2

Se dejaron las botellas en agitación a temperatura (30°C), pH (7)

Se monitoreó el consumo de CS_2 con respecto al tiempo por medio de cromatografía de gases.

Se calculó la tasa de consumo de CS_2 (mg CS_2 /min.) por medio de la pendiente de dicho consumo, con respecto al tiempo. Considerando la biomasa presente se calculó las tasas de oxidación.

CAPITULO V

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para evaluar el efecto del extracto de levadura sobre el crecimiento del consorcio del BLE en presencia de CS_2 , se adaptó el consorcio a concentraciones de extracto de levadura de 0 y 1 g/l, y se examinó el crecimiento a diferentes tiempos de la fermentación. Los resultados se presentan en la Figura 5.1. Se observa que existe un mayor crecimiento del consorcio cuando se adicionó al medio 1 g/l de extracto de levadura. En tanto que en el medio mineral los microorganismos alcanzan valores de crecimiento casi de la mitad a lo observado en extracto de levadura siendo ésta de cerca de 50 $\mu\text{g/ml}$ mientras que la biomasa producida con medio mineral fue de 30 $\mu\text{g/ml}$.

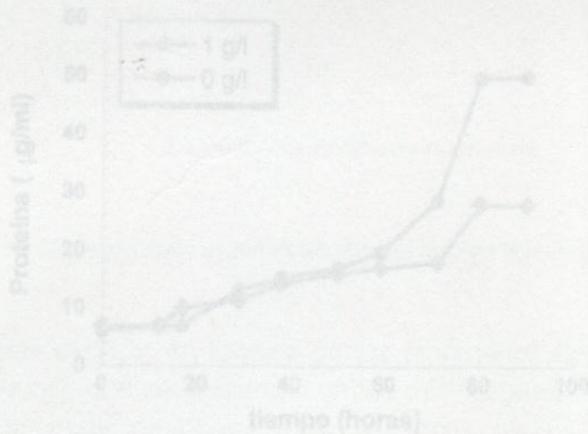


Figura 5.1 Cinética de crecimiento del consorcio del BLE en presencia de extracto de levadura utilizando CS_2 como fuente de energía y de carbono

Por otro lado la producción de sulfatos ligado al consumo de CS_2 al final del cultivo fue mayor en el medio mineral que cuando se utiliza el extracto de levadura. Esto se ve reflejado en la disminución del pH (Tabla 5.1).

Tabla 5.1 Producción de sulfatos y pH a las 80 horas.

| Medio de Cultivo | Sulfatos (mg/L) | pH Inicial | pH final |
|--------------------------|-----------------|------------|----------|
| Medio Mineral (MM) | 5.5 | 7.0 | 5.00 |
| MM con 1 g/l de extracto | 3.5 | 7.0 | 5.28 |

Efecto de nutrientes sobre la oxidación de CS_2

Efecto del extracto de levadura

Para evaluar el efecto del extracto de levadura sobre el crecimiento y la oxidación de CS_2 se adaptó el consorcio a concentraciones de extracto de levadura de 0 y 1 g/L y se determinó el crecimiento a diferentes tiempos de la fermentación. Los resultados se presentan en la Figura 5.1. Se observa que existe un mayor crecimiento del consorcio cuando se adicionó al medio 1g/L de extracto de levadura. En tanto que en el medio mineral los microorganismos alcanzan valores de crecimiento casi de la mitad a lo observado en extracto de levadura siendo ésta de cerca de 50 $\mu\text{g/ml}$ mientras que la biomasa producida con medio mineral fue de 30 $\mu\text{g/ml}$.

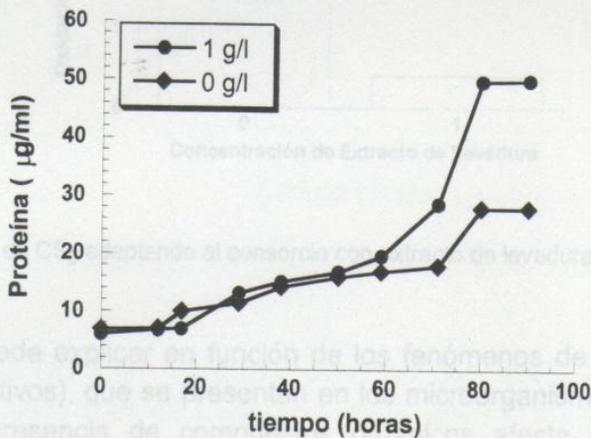


Figura 5.1 Cinética de crecimiento del consorcio del BLE en presencia de extracto de levadura utilizando CS_2 como fuente de energía y de carbono

Por otro lado la producción de sulfatos ligado al consumo de CS_2 al final del cultivo fue mayor en el medio mineral que cuando se utiliza el extracto de levadura. Esto se ve reflejado en la disminución del pH (Tabla 5.1)

Tabla 5.1 Producción de sulfatos y pH a las 80 horas.

| Medio de Cultivo | Sulfatos (mg/L) | pH inicial | pH final |
|--------------------------|-----------------|------------|----------|
| Medio Mineral (MM) | 5.6 | 7.0 | 3.80 |
| MM con 1 g/L de extracto | 3.5 | 7.0 | 6.26 |

Para evaluar por respirometría las tasas de oxidación de CS_2 en presencia y ausencia de extracto de levadura, se utilizó una concentración de 100 mg CS_2 /L. El inóculo utilizado fue previamente adaptado durante 48 horas, utilizando una concentración de extracto de levadura de 1 g/L. En los resultados que se muestran en la Figura 5.2 se observa que en presencia de extracto de levadura el consumo de CS_2 es aproximadamente 8 veces menor que el control (0.5 mg CS_2 / g P* min. contra 3.8 mg CS_2 / g P* min respectivamente).

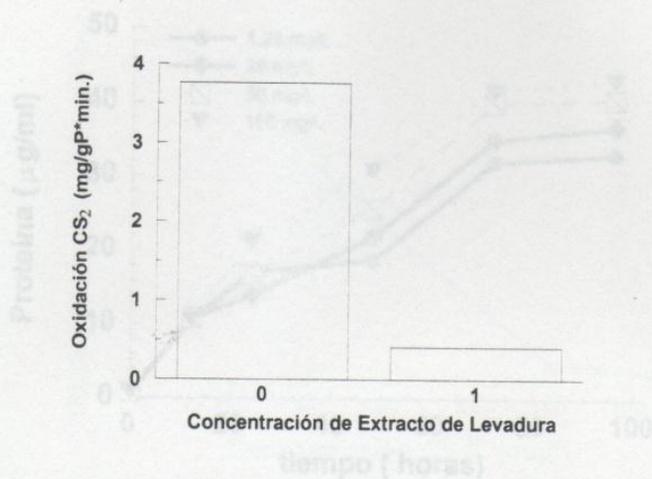


Figura 5.2. Consumo de CS_2 adaptando al consorcio con extracto de levadura de(0 y 1g/L) durante 48h.

Lo anterior se puede explicar en función de los fenómenos de autotrofia y mixotrofia (autótrofos facultativos), que se presentan en los microorganismos sulfoxidantes. En el primer caso la presencia de compuestos orgánicos afecta el crecimiento de los microorganismos (autótrofos estrictos) y por lo tanto su capacidad sulfoxidante, En el segundo caso los microorganismos que son autótrofos facultativos no se ven afectados en su crecimiento más sí en su actividad sulfoxidante.

De acuerdo a los trabajos de Bock (1976), se ha reportado que pueden existir microorganismos quimioautótrofos facultativos es decir que pueden mejorar su crecimiento cuando se les adiciona en baja concentración alguna fuente orgánica (hidrolizado de peptona). Sin embargo, en presencia de estas fuentes los microorganismos pierden la capacidad de oxidar compuestos inorgánicos. Por otro lado señalan que cuando estos microorganismos vuelven a crecer en el medio de cultivo sin fuente orgánica recuperan la capacidad oxidativa.

Efecto de la concentración del Zn^{2+} sobre la oxidación de CS_2

Para observar el efecto del Zn^{2+} sobre la oxidación de CS_2 se evaluó el efecto de concentraciones crecientes de cinc (1.25, 25, 50 y 100 mg/l), sobre el crecimiento y producción de sulfatos (Figura 5.3 y Tabla 5.2). Por otro lado se calcularon las tasas de oxidación del consorcio en función de las concentraciones crecientes de este elemento utilizando respirometría (Figura 5.4).

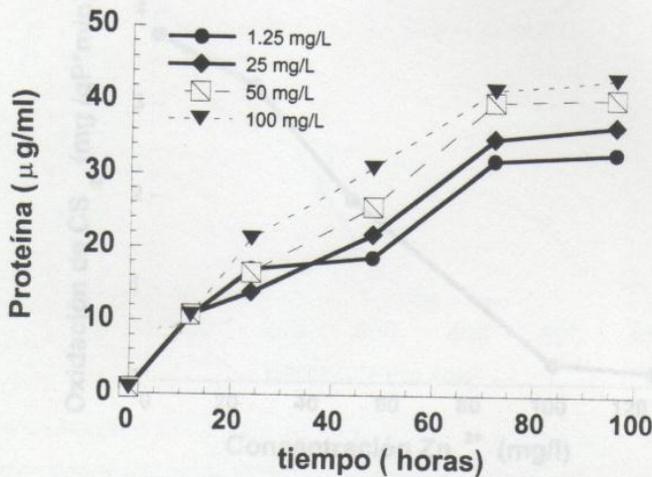


Figura 5.3 Efecto de concentraciones de Zn^{2+} sobre el crecimiento de un consorcio

En la Figura 5.3 y Tabla 5.2 se puede observar que tanto el crecimiento como la producción de sulfatos no se ve afectada al incrementar la concentración de zinc (25, 50, 100 mg/l).

Tabla 5.2 Producción de sulfatos a diferentes concentraciones de zinc.

| Medio de Cultivo | Sulfatos (mg/l) |
|---------------------------|-----------------|
| Mineral (MM) | 5.6 |
| MM con 25 mg/L Zn^{2+} | 4.3 |
| MM con 50 mg/L Zn^{2+} | 4.1 |
| MM con 100 mg/L Zn^{2+} | 4.1 |

Por otro lado, al analizar por respirometría el efecto de concentraciones crecientes del cinc sobre las tasas de oxidación de CS_2 se observó en la figura 5.4 que la oxidación se vio afectada negativamente al incrementarse la concentración de cinc. A concentraciones mayores de 20 mg/L del ion, la oxidación se vio afectada considerablemente. De este modo, en una concentración de 20 mg/L la oxidación fue de aproximadamente 15 %, mientras que después de 50 mg /L del ion, disminuye aproximadamente en un 50 % respecto al control.

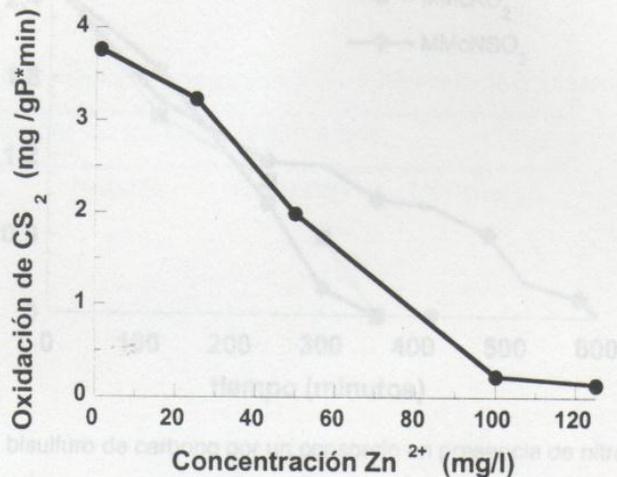


Figura 5.4 Efecto de concentraciones crecientes de zinc, (1.25, 25, 50, 100 y 125 mg/l), en la oxidación de CS_2 de un consorcio por respirometría.

Podemos suponer que este efecto negativo observado por respirometría se debió a que las células no lograron adaptarse a concentraciones altas de cinc ya que los tiempos empleados en la técnica son cortos (aproximadamente 1 hora). Este efecto que no se observó al evaluar el crecimiento, fue posiblemente debido a que en este caso los microorganismos pudieron adaptarse durante el tiempo de fermentación (96 horas). Es posible suponer que el efecto se presente debido al choque por altas concentraciones de cinc.

Efecto del nitrato sobre la oxidación de CS_2

Para observar el efecto que tiene el nitrato en la oxidación de CS_2 se adicionó nitrato en condiciones aerobias y anaerobias. Los microorganismos del consorcio empleado, en el caso de condiciones anaerobias se adaptaron durante 7 días ya que cuando se

realizaron pruebas bajo estas condiciones con el inóculo, sin adaptación, no había oxidación total de CS_2 . Siendo la misma concentración de biomasa en ambos casos. Los resultados se presentan en la Figura 5.5.

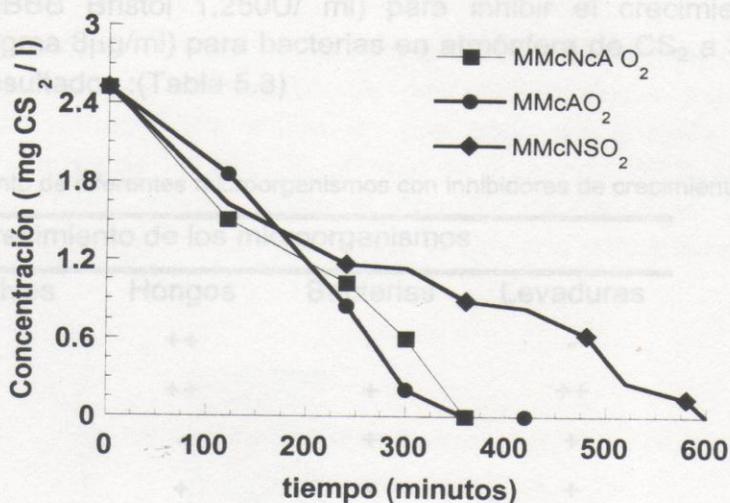


Figura 5.5 Oxidación de bisulfuro de carbono por un consorcio en presencia de nitrato

MMcA O₂. Es el medio mineral utilizando al cloruro de amonio como fuente de nitrógeno en presencia de oxígeno. MMcNsO₂ Es el medio mineral con nitrato como fuente de nitrógeno y en ausencia de oxígeno. MMcNcA O₂ Es el medio mineral utilizando al nitrato y al cloruro de amonio como fuente de nitrógeno en presencia de oxígeno

Se observó que el consorcio puede crecer independientemente de la fuente de nitrógeno empleada y también que existe oxidación con las dos fuentes de nitrógeno. Al mismo tiempo se observa que no se presenta una mayor oxidación por tener las dos fuentes de nitrógeno en el mismo sistema; lo que indica que no es el nitrógeno limitante del crecimiento de los microorganismos.

Así también se puede observar en la Figura 5 que los microorganismos en ausencia de oxígeno presenta la capacidad de oxidar CS_2 . Sin embargo, para oxidar 2.5 mg/l de CS_2 necesitan 600 minutos, mientras que en condiciones aerobias necesitan 300 minutos. Esto se debe posiblemente a que en condiciones anaerobias crecen microorganismos anaerobios o bien aerobios facultativos (*Thiobacillus denitrificans*) de acuerdo a Sublette (1989), y que en conjunto estos microorganismos representan una población de menor número que en el consorcio.

Microorganismos sulfoxidantes del consorcio

Para determinar las diferentes poblaciones del consorcio y su capacidad sulfoxidante se prepararon medios de cultivo en presencia de inhibidores del crecimiento nistatina (micostatin SQIBBB Bristol 1,250U/ ml) para inhibir el crecimiento de hongos y cloranfenicol (Sigma 8 μ g/ml) para bacterias en atmósfera de CS₂ a 30°C obteniéndose los siguientes resultados :(Tabla 5.3)

Tabla 5.3 Crecimiento de diferentes microorganismos con inhibidores de crecimiento del consorcio.

Crecimiento de los microorganismos

| Medios Selectivos | Hongos | Bacterias | Levaduras |
|-------------------|--------|-----------|-----------|
| HA | ++ | - | - |
| HB | ++ | + | ++ |
| HC | - | + | + |
| BA | + | + | + |
| BB | - | + | ++ |
| BC | + | - | - |

NOTA: (-) No hay crecimiento, (+) Hay crecimiento, (++) Más crecimiento

HA Medio Sabouraud con cloranfenicol (8 μ g/ml) HB: Medio Sabouraud HC: Medio Sabouraud con nistatina (1,250 U/ ml)

BA: Medio Mineral con extracto de levadura(el) BB: Medio Mineral con nistatina (1,250U/ ml) BC: Medio Mineral con cloranfenicol (8 μ g/ml)

Se puede observar en la Tabla 5.3 que en los medios que tuvieron cloranfenicol no hay crecimiento de bacterias porque este compuesto interfiere con la síntesis de proteínas, al combinarse con la subunidad 50-S del ribosoma bacteriano de tal forma que no permite el ensamble de los aminoácidos en la cadena proteína. En los medios que contenían nistatina no hubo crecimiento de hongos porque la nistatina es un compuesto que actúa sobre los esteroides de la membrana citoplasmática de hongos. Como la membrana de las bacterias no contiene esteroides, el crecimiento de bacterias no se ve afectado (Koneman y col. 1987).

En microscopio se observó que las hifas de los hongos no son septadas; por lo que posiblemente pertenecen a la clase de los ficomicetos. En tanto las bacterias son Gram negativas, lo que indica la presencia de tiobacilos.

Al observar que estos microorganismos pueden crecer en atmósfera de CS_2 entonces se evaluó la capacidad de oxidación de dicho compuesto. Se crecieron durante 48 horas en medio líquido en medio mineral, medio mineral con cloranfenicol ($8\mu\text{g/ml}$) y medio mineral con nistatina ($1,250\text{U/ml}$) inyectando CS_2 en el líquido. Posteriormente se evaluaron las tasas de oxidación de CS_2 por los microorganismos.

Los resultados se muestran en la Figura 5.6 donde se observa que la oxidación de bisulfuro cuando no hay inhibidores de crecimiento en el medio es de $3.8\text{ mg CS}_2/\text{gP}^*\text{min}$. La oxidación disminuye en presencia de inhibidores de crecimiento, encontrándose valores de $1.8\text{ mg CS}_2/\text{gP}^*\text{min}$ en presencia del inhibidor para hongos y de $0.3\text{ mg CS}_2/\text{gP}^*\text{min}$ cuando existe el inhibidor de bacterias. Lo que nos lleva a suponer que los microorganismos que oxidan el CS_2 son principalmente las bacterias.

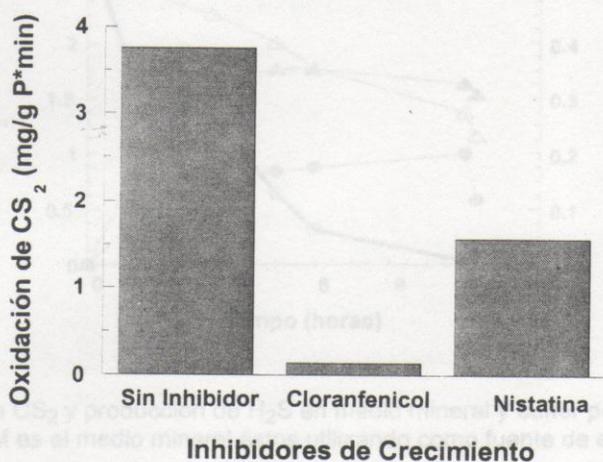


Figura 5.6 Efecto de la población presente en el BLE en el consumo de CS_2

Los resultados coinciden con diferentes trabajos reportados acerca de que tipos de microorganismos realizan la oxidación de compuestos reducidos de azufre (CS_2 y H_2S) en corrientes gaseosas, se pueden mencionar a *Thiobacillus thioparus* (Kanagawa y Mikami, 1989; Cho y col. 1991) *Hyphomicrobium sp* (Suylen y Kuenen, 1986), *Pseudomonas acidovorans* (Zhang y col. 1991) y algunas especies de hongos (Ishikawa y col.1980).

Por otra parte Hugler y col., 1996 En reactores a nivel industrial utilizados en la eliminación de olores de compuestos azufrados encontraron bacterias y levaduras ($4.3 \cdot 10^{10}$ número de microorganismos /g muestra), amibas ($5.25 \cdot 10^5$ numero de microorganismos /ml muestra) y hongos ($2.7 \cdot 10^5$ CHU/g. muestra).

Energía de mantenimiento y energía de crecimiento

Con el fin de establecer los requerimientos energéticos para el metabolismo basal y el metabolismo en fase de crecimiento de los microorganismos, se determinó cuánto de CS_2 se destina a cada uno de estos estados. Para ello se utilizó un sistema de células en reposo "resting cell" de acuerdo a Demain (1991). (El inóculo se centrifugó y se suspendió en solución salina. Se inocularon los matraces utilizando para el metabolismo basal se empleó un amortiguador de fosfatos, y para el metabolismo en fase de crecimiento el medio mineral) Los resultados se presentan en la Figura 5.7.

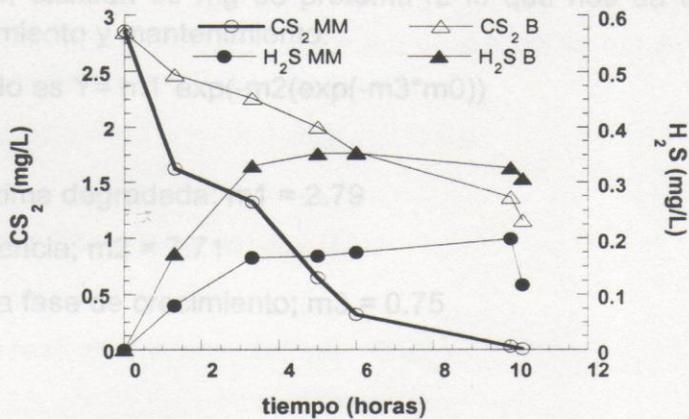


Figura 5.7 Oxidación de CS_2 y producción de H_2S en medio mineral y buffer por un consorcio, en donde B es el amortiguador y MM es el medio mineral éstos utilizando como fuente de energía al CS_2

En donde se observa que en el medio mineral la oxidación de CS_2 es total a las 10 horas mientras que el sistema con amortiguador no se oxida totalmente. Esto hace que exista una acumulación de H_2S mientras que en el medio mineral continúa la oxidación de H_2S . Como era de esperarse en el amortiguador no hay crecimiento, ya que aquí no existe fuente de nitrógeno, y la energía utilizada es únicamente para el mantenimiento celular. En cambio en el medio mineral si se observó crecimiento alcanzando valores de $20 \mu\text{g/L}$ en 10 horas del proceso respiratorio (Tabla 5.4).

Tabla 5.4 Biomasa producida en medio mineral y en buffer.

| | Biomasa inicial | Biomasa final | Crecimiento |
|---------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| Medio mineral | $20 \mu\text{g/l}$ | $40 \mu\text{g/l}$ | $20 \mu\text{g/l}$ |
| Buffer | $20 \mu\text{g/l}$ | $20 \mu\text{g/l}$ | $0 \mu\text{g/l}$ |

Del total de la fuente de energía proveniente del sustrato (ΔS_E) una parte contribuye a la tasa de energía para crecimiento (ΔS_G) y otra a la tasa de energía para mantenimiento (ΔS_M)

$$(\Delta S_E) = (\Delta S_G) + (\Delta S_M)$$

La energía de la oxidación de CS_2 se destina tanto a crecimiento como a mantenimiento. Para determinar la energía destinada a crecimiento se ajusto un modelo como se muestra en la Figura 5.8, donde se observa que a las 3 horas, aproximadamente, existían 30 mg de proteína /L lo que nos da un consumo de CS_2 destinado a crecimiento y mantenimiento.

El modelo ajustado es $Y = m_1 * \exp(-m_2(\exp(-m_3 * m_0)))$

En donde:

m_1 : cantidad máxima degradada; $m_1 = 2.79$

m_2 : tiempo de latencia; $m_2 = 7.71$

m_3 : una idea de la fase de crecimiento; $m_3 = 0.75$

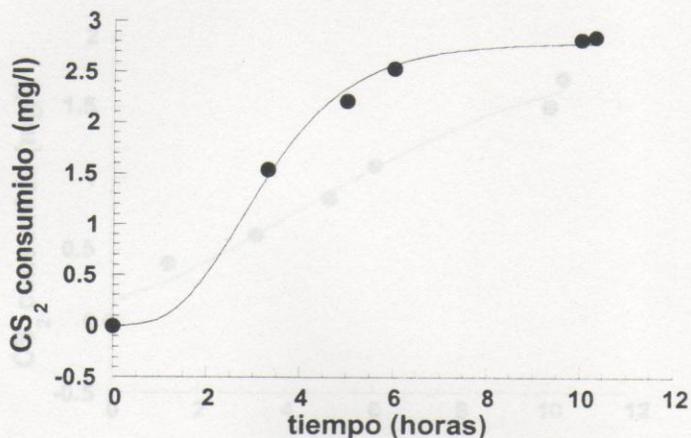


Figura 5.8 Oxidación de CS_2 por un consorcio en crecimiento

CS₂ para crecimiento y mantenimiento

$$= 0.368 * m_1 * m_3 \text{ en donde } m_1 = 2.79, m_3 = 0.75$$

$$= 0.775 \text{ mg consumido / h*L considerando la biomasa } 30 \text{ mg de proteína /L}$$

$$= 0.775 \text{ mg/h*L / } 0.03 \text{ mg de proteína /L}$$

$$= 26 \text{ mg CS}_2 \text{ consumido/g proteína*h.}$$

En amortiguador no hay fuente de nitrógeno por lo que no observamos crecimiento. El CS₂ oxidado es la fuente de energía proveniente del sustrato dedicado a mantenimiento, se ajusto un modelo Figura 5.9 en donde se obtuvo cuanto del CS₂ es destinado a mantenimiento.

El modelo ajustado es $Y = m_1 * \exp(-m_2(\exp(-m_3 * m_0)))$

En donde:

m1: cantidad máxima degradada; $m_1 = 2.00$

m2: tiempo de latencia; $m_2 = 2.71$

m3: una idea de la fase de crecimiento; $m_3 = 0.224$

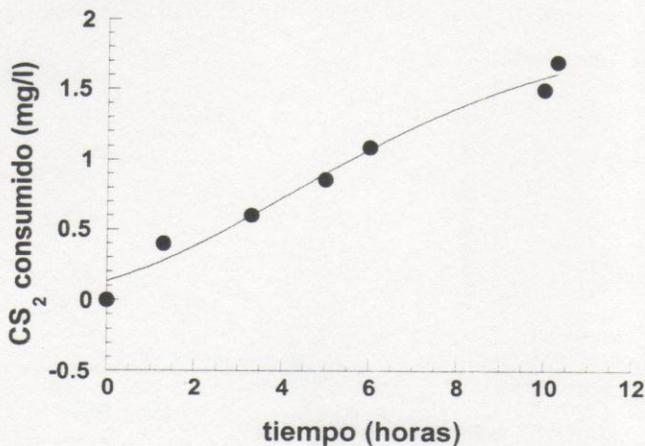


Figura 5.9 Oxidación de CS₂ por un consorcio en amortiguador (mantenimiento).

intermediarios en la oxidación biológica de CS₂

CS₂ a mantenimiento =

= 0.368*m1*m3 en donde m1= 2.00, m3= 0.224

= 0.164 mg consumido / h*L considerando la biomasa 20 mg de proteína /L

= 0.164 mg/h*L /0.02 mg de proteína /L

= 8.2 mg CS₂ consumido/g proteína*h.

En la Tabla 5.5 se observa cuanto del CS₂ adicionado al medio de cultivo lo que es destinado a mantenimiento y cuanto es destinado a crecimiento.

Tabla 5.5 Oxidación de CS₂ destinada a mantenimiento y a crecimiento

| Sistema | mg de CS ₂ consumido /g proteína*h | |
|---------------|---|-------------|
| | Mantenimiento | Crecimiento |
| Medio mineral | | 26 |
| Amortiguador | 8.2 | |

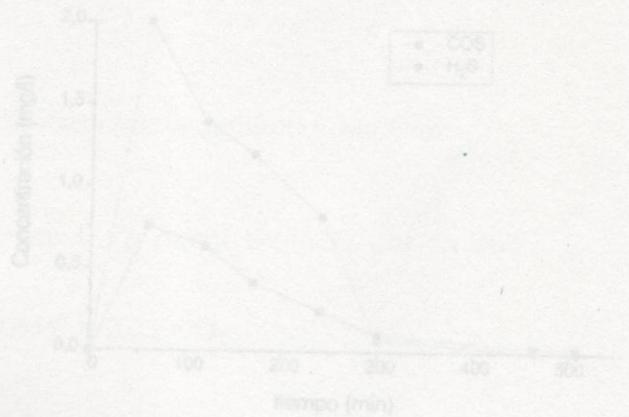
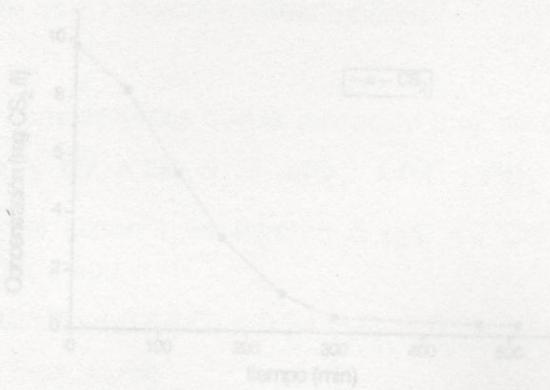
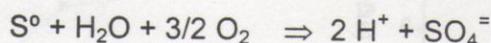
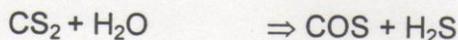


Figura 5.10 a) Oxidación de CS₂ a una concentración de 8.2 mg/l por un consorcio b) la presencia y oxidación de COS y H₂S, Intermediarios de la oxidación de CS₂

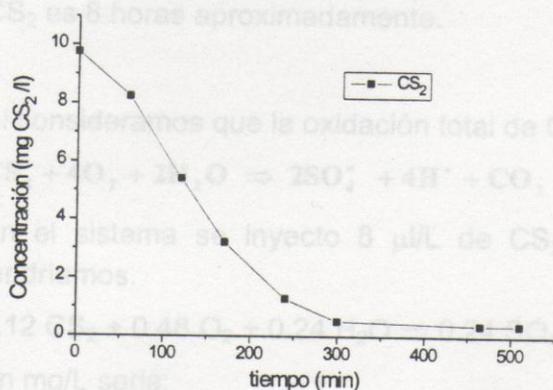
Intermediarios en la oxidación biológica de CS₂.

En las reacciones de oxidación de CS₂ se encuentran el azufre como producto de la oxidación sulfato, los cuales se pueden observar en la Figura 5.11, en donde se obtuvo Se ha reportado (Smith y Kelly, 1988) que durante la oxidación de bisulfuro de carbono ocurren las siguientes reacciones:

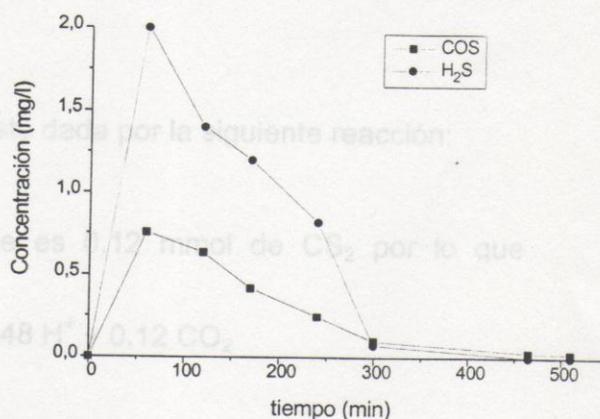


Mediante el análisis cromatográfico realizado se detectó la presencia de tres picos a los siguientes tiempos de retención tr 0.33, 0.56 y 3.02 h los cuales corresponden a H₂S, COS y CS₂, respectivamente.

En la Figura 5.10 Se puede observar que la concentración de CS₂ va disminuyendo durante los primeros 200 minutos, se puede observar también la presencia de COS y H₂S que van siendo oxidados. La presencia de estos compuestos se debe únicamente a la oxidación biológica, ya que se realizó un control químico, es decir, contenía el medio mineral con CS₂ en ausencia de microorganismos y la concentración de CS₂ se mantuvo constante.



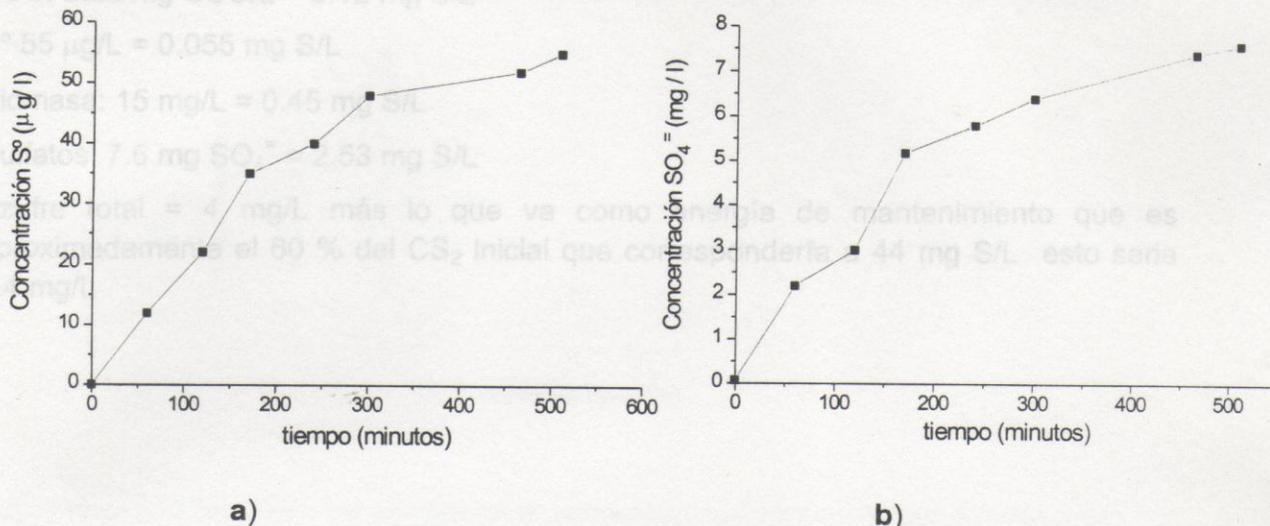
a)



b)

Figura 5.10 a) Oxidación de CS₂ a una concentración de 9.6 mg/l por un consorcio b) la presencia y oxidación de COS y H₂S, Intermediarios de la oxidación de CS₂

En las reacciones de oxidación de CS_2 se encuentran el azufre como producto de la oxidación sulfato, los cuales se pueden observar en la Figura 5.11, en donde se obtuvo 55 $\mu\text{g/L}$ de azufre y 7.6 mg/L de sulfato.



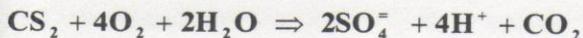
a)

b)

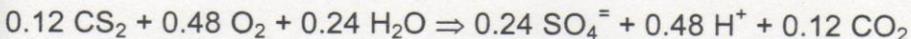
Figura 5.11 a) Producción de azufre, un intermediario en la oxidación de CS_2 b) Producción de sulfato, producto final en la oxidación de CS_2 por un consorcio.

La producción de biomasa fue de 15 $\mu\text{g/ml}$ ya que el tiempo en el que es oxidado el CS_2 es 8 horas aproximadamente.

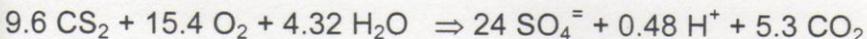
Si consideramos que la oxidación total de CS_2 esta dada por la siguiente reacción:



En el sistema se inyectó 8 $\mu\text{l/L}$ de CS_2 que es 0.12 mmol de CS_2 por lo que tendríamos.



En mg/L sería:



Esto sería en el caso teórico, sin embargo, aquí no tenemos producción de biomasa, azufre sulfato COS , H_2S CS_2 y lo que va a como energía de mantenimiento. Si

hacemos un balance de azufre con base en todos los compuestos azufrados tenemos una concentración inicial de azufre = 8.8 mg S / L

El azufre en:

CS₂ al final: 0.38 mg CS₂ / L = 0.33 mg S/L

COS: 0.22 mg COS/L = 0.12 mg S/L

S° 55 µg/L = 0.055 mg S/L

Biomasa: 15 mg/L = 0.45 mg S/L

Sulfatos: 7.6 mg SO₄⁼ = 2.53 mg S/L

Azufre total = 4 mg/L más lo que va como energía de mantenimiento que es aproximadamente el 60 % del CS₂ inicial que correspondería a 44 mg S/L esto sería 8.4 mg/L

Substrato (mmol/L)

Figura 5.13 Tasa relativa de oxidación de compuestos azufrados a una concentración 1mM

Cuando se comparan las velocidades de oxidación de diferentes compuestos azufrados se observa que el sulfhídrico y bisulfuro de carbono son oxidados rápidamente con respecto a los otros. Esto se explica por la naturaleza química de estos compuestos además de que este cultivo se encuentra adaptado a CS₂, aunque si bien son oxidadas rápidamente altas concentraciones son tóxicas para los microorganismos. Así se ha reportado que 100 ppm de H₂S en *Thiobacillus denitrificans* es tóxico para el microorganismo (Sublette 1989), así como concentraciones mayores de 250 mg/l. de CS₂ tienen un efecto negativo sobre los microorganismos sulfoxidantes (Rovah y col., 1994)

Por otro lado se observa que con compuestos como el tiosulfato y sulfuro las velocidades de oxidación son lentas sin embargo las concentraciones que los microorganismos soportan sin que haya un efecto negativo en el crecimiento son hasta de 40 g/L para tiosulfato. La baja velocidad de oxidación de azufre se explica también por su naturaleza físico-química. Mientras que tiosulfato y sulfuro son solubles, el azufre es insoluble, de modo que los microorganismos tienen que adherirse al elemento como se ha reportado (Konishi y col., 1994)

Oxidación de compuestos azufrados diferentes a CS_2 .

Para observar el efecto que tiene el consorcio sobre la oxidación de compuestos azufrados distintos a CS_2 , mediante respirometría se evaluaron las tasas relativas de oxidación de sulfhídrico, bisulfuro de carbono, sulfito, tiosulfato y azufre elemental, utilizando una concentración de 1 mM. Los resultados se presentan en la Figura 5.13

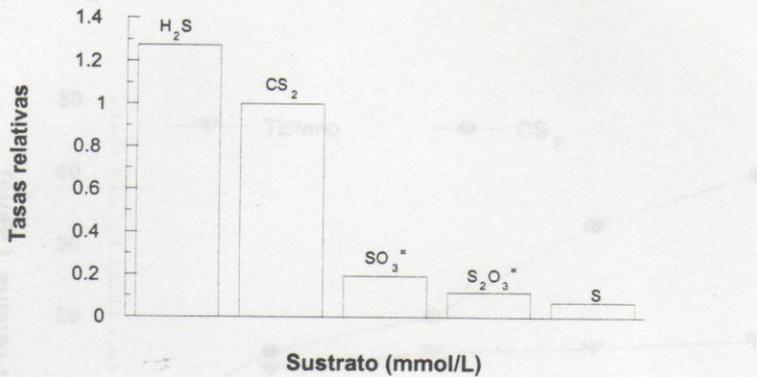


Figura 5.13 Tasas relativas de oxidación de compuestos azufrados a una concentración 1mM

Cuando se comparan las velocidades de oxidación de diferentes compuestos azufrados se observa que el sulfhídrico y bisulfuro de carbono son oxidados rápidamente con respecto a los otros. Esto se explica por la naturaleza química de estos compuestos además de que este cultivo se encuentra adaptado a CS_2 , aunque si bien son oxidadas rápidamente altas concentraciones son tóxicas para los microorganismos. Así se ha reportado que 100 ppm de H_2S en *Thiobacillus denitrificans* es tóxico para el microorganismo (Sublette 1989), así como concentraciones mayores de 250 mg/L de CS_2 tienen un efecto negativo sobre los microorganismos sulfoxidantes (Revah y col, 1994)

Por otro lado se observa que con compuestos como el tiosulfato y sulfito las velocidades de oxidación son lentas sin embargo las concentraciones que los microorganismos soportan sin que haya un efecto negativo en el crecimiento son hasta de 40 g/L para tiosulfato. La baja velocidad de oxidación de azufre se explica también por su naturaleza fisico-química. Mientras que tiosulfato y sulfito son solubles, el azufre es insoluble, de modo que los microorganismos tienen que adherirse al elemento como se ha reportado (Konishi y col., 1994)

Otro compuesto evaluado fue el tiofeno un compuesto organoazufrado que se utiliza industrialmente y que por su naturaleza es difícil de oxidarse ya que es un compuesto cíclico. La concentración empleada fue de 60 mg/L y los resultados obtenidos se presentan en la Figura 5.14. Como se puede observar si hubo crecimiento de los microorganismos empleando como fuente de energía al tiofeno aunque el crecimiento en presencia de esta fuente es 2.5 veces menor que la biomasa generada cuando el consorcio utiliza al CS₂

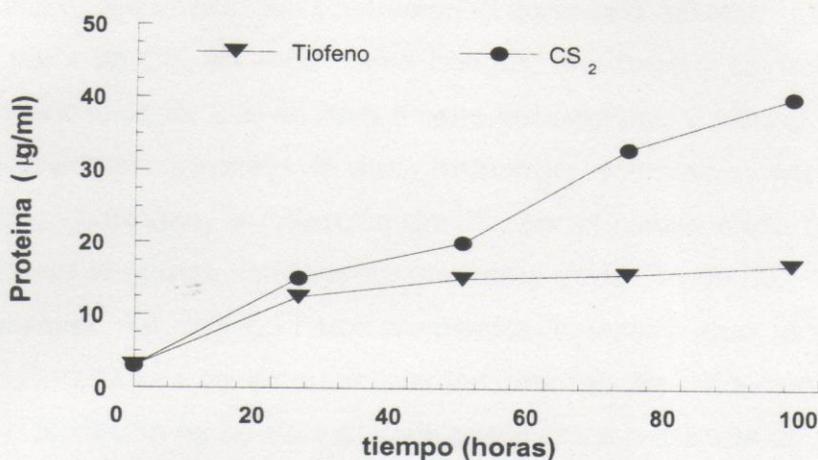


Figura 5.14 Cinética de crecimiento de un consorcio utilizando tiofeno y CS₂ a una concentración de 60 mg/L

Se calcularon las velocidades de oxidación (Tabla 5.6) utilizando como fuente de energía al CS₂ y al tiofeno. La velocidad de oxidación de CS₂ es aproximadamente 5 veces mayor que en el caso del tiofeno por el consorcio, lo que se corroboró al compararlo con el control químico es decir en ausencia de inoculo, en donde la concentración de tiofeno permaneció constante. Por otro lado, se observó producción de sulfatos, datos que se presentan en la Tabla 5.6

Tabla 5.6 Crecimiento, producción de sulfatos, pH y velocidad de oxidación utilizando como fuente de energía a CS₂ y tiofeno.

| Fuente de energía | Velocidad de oxidación | Producción de sulfato (mg/L) | pH inicial | pH final |
|------------------------------|------------------------|------------------------------|------------|----------|
| CS ₂ (21 mg S/L) | 21 mg S / g Proteína*h | 5.6 | 7.0 | 3.8 |
| Tiofeno (25 mg S/L) | 4 mg S / g Proteína*h | 2 | 7.0 | 5.1 |

Los intermediarios de la oxidación biológica de CS_2 realizada por el cultivo mixto son: En la fase gaseosa sulfuro de carbono (CS_2), ácido sulfídrico (H_2S), sulfato de hidrógeno (H_2SO_4) y ácido sulfúrico (H_2SO_3). En la bibliografía se han reportado los mismos intermediarios en la oxidación, por lo que podemos suponer que la oxidación biológica por el cultivo mixto es un proceso similar al reportado.

CAPITULO VI

CONCLUSIONES

Entre los microorganismos que conforman el consorcio del BLE que obtienen su energía a partir de CS_2 se encontraron hongos, levaduras y bacterias. La mayor parte de la oxidación de CS_2 se lleva a cabo por bacterias ($1.5 \text{ mg } CS_2/gP \cdot \text{min}$), siendo mínima la participación de otros microorganismos como hongos ($0.3 \text{ mg } CS_2/gP \cdot \text{min}$). Asimismo, la oxidación de CS_2 por el cultivo mixto fue de $3.8 \text{ mg } CS_2/gP \cdot \text{min}$ por lo que es conveniente realizar la oxidación de CS_2 con el total de microorganismos del cultivo. Estos resultados muestran que la población de bacterias sulfoxidantes es determinante del proceso de oxidación de CS_2 . Sin embargo, la oxidación no se vio mejorada por la única presencia de bacterias, por lo que suponemos otro tipo de factores pueden influir en el metabolismo del cultivo.

Al evaluarse el efecto de algunos nutrientes como el extracto de levadura ($1g/l$), zinc ($25, 50, 100 \text{ mg/l}$) y nitrato, se pudo observar lo siguiente, en el caso del extracto de levadura se observó una mayor producción de biomasa debido a que se favoreció el crecimiento de heterotrófos, por lo que la oxidación de CS_2 disminuyó. En el caso del zinc se observó por una parte que en presencia de concentraciones crecientes de zinc el cultivo creció y oxidó de forma similar al control con 1.2 mg/L de zinc. Por otro lado al utilizar la técnica de respirometría para evaluar las tasas de oxidación se observó que las concentraciones de zinc mayores de 20 g/L sí afectan la tasa de oxidación. Este hecho fue probablemente debido a un efecto de choque osmótico sobre las células los cuales debido a los tiempos cortos (de 1 h) de la técnica de respirometría, no podría adaptarse a la

Los intermediarios de la oxidación biológica de CS_2 realizada por el cultivo mixto son: En la fase gaseosa sulfuro de carbonilo (COS), ácido sulfhídrico (H_2S); en la fase líquida, azufre (S^0) y como producto final sulfato (SO_4^-). En la bibliografía se han reportado los mismos intermediarios en la oxidación, por lo que podemos suponer que la oxidación biológica por el cultivo mixto se lleva a cabo por un proceso similar al reportado.

Entre los microorganismos que conforman el consorcio del BLE que obtienen su energía a partir de CS_2 se encontraron hongos, levaduras y bacterias. La mayor parte de la oxidación de CS_2 se lleva a cabo por bacterias ($1.8 \text{ mg } CS_2/gP*\text{min}$), siendo mínima la participación de otros microorganismos como hongos ($0.3 \text{ mg } CS_2/gP*\text{min}$). Asimismo, la oxidación de CS_2 por el cultivo mixto fue de $3.8 \text{ mg } CS_2/gP*\text{min}$ por lo que es conveniente realizar la oxidación de CS_2 con el total de microorganismos del cultivo. Estos resultados muestran que la población de bacterias sulfoxidantes es determinante del proceso de oxidación de CS_2 . Sin embargo, la oxidación no se vio mejorada por la única presencia de bacterias, por lo que suponemos otro tipo de factores pueden influir en el metabolismo del cultivo.

Al evaluarse el efecto de algunos nutrientes como el extracto de levadura ($1g/l$), cinc (25, 50, 100 mg/l) y nitrato, se pudo observar lo siguiente, en el caso del extracto de levadura se observó una mayor producción de biomasa debido a que se favoreció el crecimiento de heterotrófos, por lo que la oxidación de CS_2 disminuyó. En el caso del cinc se observó por una parte que en presencia de concentraciones crecientes de cinc el cultivo creció y oxidó de forma similar al control con 1.2 mg/L de cinc. Por otro lado al utilizar la técnica de respirometría para evaluar las tasas de oxidación se observó que las concentraciones de cinc mayores de 20 g/L si afectan la tasa de oxidación. Este hecho fue probablemente debido a un efecto de choque osmótico sobre las células los cuales debido a los tiempos cortos (de 1 h) de la técnica de respirometría, no podría adaptarse a la

presencia de cinc en el medio. Suponemos además que en la cinética de crecimiento si pueden adaptarse a las concentraciones de cinc evaluados y por lo tanto su crecimiento no se ve afectado. Finalmente en el caso del nitrato se puede afirmar que este puede ser utilizado como fuente de nitrógeno en condiciones aeróbicas y como aceptor de electrones en condiciones anaeróbicas. El hecho de que bajo estas condiciones se presentara actividad oxidativa por los microorganismos significa en el BLE crecen microorganismos sulfoxidantes facultativos (posiblemente *Thiobacillus denitrificans*).

Al evaluar los requerimientos energéticos del consorcio, se observó que la energía obtenida a partir de CS_2 que se destina tanto para el metabolismo basal y el metabolismo en fase de crecimiento de los microorganismos fue 26 mg CS_2 consumido/g proteína*h. Para el metabolismo basal fue de 7.5 mg CS_2 consumido/g proteína*h y para el metabolismo en fase de crecimiento fue de 18.5 mg CS_2 consumido/g proteína*h. Por lo que de esta fuente de energía el 30 % es destinado a mantenimiento y el 70 % es destinado a crecimiento.

La población microbiana presente en el BLE presentó una tasa de oxidación mayor para H_2S y CS_2 que para otros compuestos azufrados evaluados: sulfito, tiosulfato y azufre elemental. Los dos compuestos gaseosos CS_2 y H_2S , presentaron las mayores tasas de oxidación sin embargo debido a su toxicidad, los microorganismos sólo pueden soportar hasta 100 mg/L sin que se afecte su crecimiento, un comportamiento similar presentó el tiofeno. Los compuestos azufrados sólidos y solubles, sulfito y tiosulfato presentan tasas de oxidación intermedias entre H_2S y CS_2 y azufre elemental, sin embargo estos compuestos en concentraciones muy arriba de 100 mg/L (20 g/L) no fueron tóxicos para los microorganismos.

Finalmente el azufre presentó la menor tasa de oxidación respecto a los demás compuestos. Esto debido a la característica de insolubilidad del azufre en agua. Lo que supone que los microorganismos para oxidarlo se deben primero adherir a él para iniciar su oxidación.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFÍA

CAPITULO VII

- Alloway, B. & Ayrst, D. C. (1993). *Chemical Principles of Environmental Pollution*, Chapman & Hall, London.

- ATSDR (1992). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicology Profile for Carbon Disulfide. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA.

BIBLIOGRAFÍA

- Bartlett, J. K. & Skoog, D. A., (1954). Colorimetric Determination of Elemental Sulfur in Hydrocarbons, *Anal. Chem.* 26, 6, 1008.

- Bishop, P. L. & Kumar, N. E., (1996). "Aerobic Fixed-Film Processes", en *Biotechnology*, V. 8, Cap. 3, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.

- Bock, E. & Steinmüller, W., (1978). Growth of *Nitrobacter* in the Presence of Organic Matter. *Arch. Microbiol.* 108, 299-304, 305-312.

- Boff, H., (1992). Consider Biofiltration for Decontaminating Gases, *Chem. Eng. Prog.*, April, 54.

- Buisman, C., Post, R., Ijspeert, P., Garastis, G. & Lettinga, G., (1989). Biotechnological Process for Sulfide Removal with Sulfur Reclamation, *Acta Biotechnol.* 9, 3, 255 - 267.

- Buisman, C., Garastis, G., Ijspeert, P. & Lettinga, G., (1990). Optimization of Sulfur Production in a Biotechnological Sulfide Removing Reactor, *Biotechnology Bioengineering* 35, 50-55.

- Butler, J. M., Rothschild, B. & Keller, J. R., (1969). Metabolism of Carbon Disulfide by *Thiobacillus thiooxidans*, *Bacteriological Proceedings* 64. Citado por Smith y Kelly, 1988.

- Cadenhead, P. & Sublette, K.L., (1990). Oxidation of Hydrogen Sulfide by *Thiobacillus*, *Biotechnology Bioengineering* 35, 1150.

- Devlinny, J. S., (1995). Topics for Research in Biofiltration, Conference on Biofiltration (an Air Pollution Control Technology), Los Angeles, California, Oct. 5-6.

- Diks, R.M.M. & Ottengraf, S.P.P., (1991). "Process Engineering Aspects of Biological Waste Gas Purification", *Internat. Symp. Environ. Biotechnology* (April).

- Grant, R. J., Mans, M. & Smith, S. G., (1982). Adsorption of Normal Paraffins and Sulfur Compounds on Activated Carbon, *AIChE J.* 8, 3, 403.

- Mader, W.C., Davis, S.J., & Galloway, J.N., (1988). Sulfide Oxidation by *Thiobacillus* in a Dioxin-Removing Trickling Filter, 80th Annual Meeting & Exhibition, Air & Waste Management, Nashville, Tennessee.

BIBLIOGRAFÍA

- Alloway, B. & Ayres, D. C., (1993), Chemical Principles of Environmental Pollution, Blackie Academic & Professional, Glasgow
- ATSDR (1992). Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Carbon disulfide. U.S. Department of Health and Human Services, Public Health Service. Atlanta, GA.
- Bartlett, J. K. & Skoog, D. A., (1954), Colorimetric Determination of Elemental Sulfur in Hydrocarbons, *Anal. Chem.* 26, 6, 1008.
- Bishop, P. L. & Kinner, N. E., (1986), "Aerobic Fixed-Film Processes", en *Biotechnology*, V. 8, Cap. 3, VCH Verlagsgesellschaft Weinheim.
- Bock E. & Steinmuller W., (1976). Growth of Nitrobacter in the Presence of Organic Matter. *Arch Microbiol.* 108, 299-304, 305-312.
- Bohn, H., (1992), Consider Biofiltration for Decontaminating Gases, *Chem. Eng. Prog.*, April, 34.
- Buisman, C., Post, R., Ijspeert, P., Geraats, G. & Lettinga, G., (1989), Biotechnological Process for Sulfide Removal with Sulfur Reclamation, *Acta Biotechnol.* 9, 3, 255.- 267
- Buisman, C., Geraats, G., Ijspeert, P. & Lettinga, G., (1990), Optimization of Sulfur Production in a Biotechnological Sulfide Removing Reactor, *Biotechnology Bioengineering.* 35, 50.-56.
- Butler, J. M., Rothschild, B. & Keller, J. R., (1969), Metabolism of Carbon Disulfide by *Thiobacillus thiooxidans*, *Bacteriological Proceedings* 64. Citado por Smith y Kelly, 1988.
- Cadenhead, P. & Sublette, K.L., (1990), Oxidation of Hydrogen Sulfide by *Thiobacilli*, *Biotechnology Bioengineering.* 35, 1150 .
- Devinny, J. S., (1995), Topics for Research in Biofiltration, Conference on Biofiltration (an Air Pollution Control Technology), Los Angeles, California, Oct. 5-6.
- Diks, R.M.M. & Ottengraf, S.P.P., (1991), "Process Engineering Aspects of Biological Waste Gas Purification", *Internat. Symp. Environ. Biotechnology* (April).
- Grant, R. J., Manes, M. & Smith, S. B., (1962), Adsorption of Normal Paraffins and Sulfur Compounds on Activated Carbon, *AIChE J.* 8, 3, 403.
- Hugler, W.C., Cantú-De la garza J.G. & Villa-Garcia M. (1996) Biofilm Analysis from an Odor-Removing Trickle Filter, 89th Annual Meeting & Exhibition, Air & Waste Management, Nashville, Tennessee.

- Janssen, A. J. H., (1996), Formation and colloidal behavior of elemental sulphur produced from the biological oxidation of hydrogensulphide. PhD thesis,
- Jordan, S. L., Kraczkiewicz-Dowjat, A. J., Kelly, D. P. & Wood, A. P., (1995), Novel Eubacteria Able to Grow on Carbon Disulfide, *Arch. Microbiol.* 163, 131.
- Kanagawa, T. & Mikami, E., (1989), Removal of Methanetioli, Dimethyl Sulfide, Dimethyl Disulfide and Hydrogen Sulfide from Contaminated Air by *Thiobacillus thioparus* TK-m, *App. Enviromen. Microbiol.* 55, 3, 555.
- Kelly Don P. (1989) "Energetics of Chemolithotrophs" Department of Biological Sciences, University of Warwinc Englan.
- Kelly D.P. (1982) Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur *Phil. Trans R. Soc. Lond* 238 499-528
- Kelly, D. P., Wood, A. P., Jordan, S. L., Padden, A. N., Gorlenko, V. M., & Dubinina, G. A., (1994), Biological Production and Consumption of Gaseous Organic Sulphur Compounds, *Atmospheric Gas Production and Consumption* 22, 1011.
- Kohl, A. L. & Riesenfeld, F. C., (1979), *Gas Purification*, Gulf Publishing Company, Houston.
- Karchmer, J. H., (1972), *The Analytical Chemistry of Sulfur and Its Compounds*, Wiley - Interscience, New York
- Kohler, H., (1982), *Fortschritt-Berichte VDI-Zeitschr. Reihe 15*, 22 (Citado por Ottengraf, 1991).
- Koneman Allen Dowell (1987) *Sommers Diagnostico microbiologico*, Ed.. Panamericana
- Konishi Y., Takanasaka Y & Asai S. (1994), Kineticas of Growth and Elemental Sulfur Oxidation in Batch Culture of *thiobacillus ferrooxidans*, *Biotechnology. Bioengineering.* 44, 667-673.
- Krimsky S., Wrubel R.P., Naess I.G. Levy S.B. Wetzler R.E. & Marshall B. (1995) Standardized Microcosms in Microbial Risk Assessment. *BioScience* 45:590-599
- Kyeoung-Suk Cho, Mitsuyo Hirai, & Makoto Shoda (1992). Enhanced Removal Efficiency of Malodorous Gases in a Pilot-Scale peat Biofilter Inoculated with *Thiobacillus tioparus* DW44. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 73 46-50
- Leson, G. & Winer, A.M., (1991), Biofiltration: An Innovative Air Pollution Control Technology for VOC Emissions, *J. Air Waste Management Association* 41, 8, 1045 (Ago.).

- Lebeault, J.M., (1990), Abstr. Forum Appl. Biotechnol. Gent, 20 (Sep.). Citado por Ottengraf (1991).
- Mannsville. (1993), chemical products Synopsis, Carbon Disulfide. Mannsville Chemical Products Corporation. January 1993.
- Ottengraf, S.P.P, (1986), Exhaust Gas Purification, en Biotechnology, V. 8, Cap. 12, VCH Verlagsgesellsch Weinheim.
- Ottengraf, S. (1987) Biological systems for waste gas elimination. Reviews 5:132-136
- Peavy, H. S., Rowe, D. R.& Tchobanoglous, G., (1985), Environmental Engineering, McGraw - Hill, Singapore.
- Plas, C., Wimmer, K., Holubar, P., Mattanovich, D., Danner, H., Jelinek, E., Harant, H.& Braun, R., (1993), Degradation of Carbondisulfide by a Thiobacillus isolate, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 820-823.
- Rajagopal, B. S.& Daniels, L., (1986), Investigation of Mercaptans, Organic Sulfides, and Inorganic Sulfur Compounds as Sulfur Sources for the Growth of Methanogenic Bacteria, *Current Microbiology* 14, 137.
- 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 0on Biofiltration (an Air Pollution Control Technology), Los Angeles, California, Oct. 5-6.
- Schedel, M.& Trüper, H. G., (1980), Anaerobic Oxidation of Thiosulfate and Elemental Sulfur in *Thiobacillus denitrificans*, *Arch. Microbiol.* 124, 205.
- Sheen, R. T., Kahler, H. L.& Ross, E. M., (1955), Turbidimetric Determination of Sulfate in Water, *Ind. Eng. Chem. Anal. Ed.* 7, 4, 262.
- Smith, N.A.& Kelly, D.P., (1988), Mechanism of Oxidation of Dimethyl Disulfide by *Thiobacillus thioparus* Strain E6, *Journal of General Microbiology.* 134, 3031.
- Smith N.S. & Kelly D. P. (1988) . Oxidation of carbon disulphide as the sole source of energy for the autotrophic growth of *Thiobacillus thioparus* strain TK-m. *Journal of General Microbiology.* 134: 3041-3048.
- Sublette, K.L.& Sylvester, N.D., (1987), Oxidation of Hydrogen Sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: Desulfurization of Natural Gas, *Biotechnology. Bioengineering.* 29, 249-257.

-
- Sublette, K.L., 1987, Aerobic Oxidation of Hydrogen Sulfide by *Thiobacillus denitrificans*, *Ibid.* 29, 690.
 - Sublette, K.L., (1989), Microbial treatment of sulfur gases for the removal and oxidation of hydrogen sulphide, *Biotechnology. Bioengineering.*
 - Taylor, B. F., (1993), in *Biogeochemistry of Global Change* (Oremland, R. S., ed.), pp. 745 - 781, Chapman and Hall, New York (citado por Kelly *et al.*, 1994).
 - Thomas, J. F. & Cotton, J. E., (1954), A Turbidimetric Sulfate Determination, *Water & Sewage Works* 101, 426.
 - Tong, S., Dalla Lana, I. G. & Chuang, K. T., (1992), Appraisal of Catalysts for the Hydrolysis of Carbon Disulfide, *Can. J. Chem. Eng.* 70, Junio, 516.
 - Trinidad, V. R. (1996) Estudios sobre la remoción de CS₂ de corrientes gaseosas en un bioreactor de lecho escurrido, *PhM. tesis*, Ingeniería Química, Universidad Autónoma Metropolitana - Iztapalapa.
 - Williams, T.O. & Miller, F.C., (1992), Odor Control Using Biofilters, *Biocycle Magazine* Oct., 33, 10, 72..