

UNAM  
POSGRADO

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO

01177

10

**"EFECTO DEL NITRÓGENO AMONIAICAL  
Y COMPUESTOS AROMÁTICOS SOBRE EL  
PROCESO DE SULFOXIDACIÓN EN UN  
REACTOR DE RECIRCULACIÓN"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA (AMBIENTAL)

P R E S E N T A:

DAVID HERNÁNDEZ MARTÍNEZ

CIUDAD UNIVERSITARIA ABRIL DEL 2002

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

01177

**UNAM**  
POSGRADO

**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MÉXICO**

**PROGRAMA DE POSGRADO EN INGENIERÍA  
CAMPO DE CONOCIMIENTO: INGENIERÍA AMBIENTAL**

**"EFECTO DEL NITRÓGENO AMONICAL Y COMPUESTOS  
AROMÁTICOS SOBRE EL PROCESO DE SULFOXIDACIÓN EN UN  
REACTOR DE RECIRCULACIÓN"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN INGENIERÍA (AMBIENTAL)**

**PRESENTA:**

**I. Q. DAVID HERNÁNDEZ MARTÍNEZ**

**JURADO: DR. PEDRO MARTÍNEZ PEREDA  
M. EN I. JUAN CID NÚÑEZ  
DR. GERMÁN BUITRÓN MÉNDEZ  
DRA. GEORGINA FERNÁNDEZ VILLAGÓMEZ  
DR. ALFONSO DURÁN MORENO**

**CIUDAD UNIVERSITARIA ABRIL DEL 2002**

El presente trabajo de maestría se realizó en los laboratorios del área de Biotecnología del Petróleo, en el Instituto Mexicano del Petróleo bajo la dirección del M. I. Juan Cid Nuñez, la supervisión del Dr. Sergio Julián Alcántara Pérez y con el apoyo del Dr. Pedro Martínez Pereda.

La Maestría en Ingeniería con la orientación Ambiental de la Universidad Nacional Autónoma de México está incluida en el Padrón de Excelencia del CONACyT y cuenta con el apoyo del mismo Consejo. La realización de los estudios de maestría fueron económicamente sostenidos por la Beca-Crédito otorgada por el CONACyT. El trabajo de tesis fue sostenido económicamente bajo el proyecto PBP/PIMAS D.0021 y con la ayuda de beca complemento, ambos por parte del Instituto Mexicano del Petróleo.

## ÍNDICE GENERAL

	Página
<b>RESUMEN.</b>	5
<b>1 GENERALIDADES.</b>	
1.1 Química del azufre.	6
1.1.1 El ciclo del azufre	6
1.1.2 Sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico (H <sub>2</sub> S)	8
1.1.2.1 Reacciones químicas del sulfuro.	9
1.1.2.2 Reacciones biológicas del sulfuro.	9
1.1.2.3 Reacciones enzimáticas de los compuestos reducidos de azufre.	10
1.1.3 Problemática ambiental generada por H <sub>2</sub> S.	11
1.1.3.1 Riesgos a la salud.	11
1.1.3.2 Efectos a la salud	11
1.4 Procesos de oxidación de sulfuro de hidrógeno (H <sub>2</sub> S).	13
1.4.1 Procesos fisico-químicos de separación y tratamiento	13
1.4.2 Métodos biológicos	14
1.4.2.1 Oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas.	15
1.4.2.2 Oxidación por organismos nitrificantes.	16
1.4.2.3 Oxidación por un proceso químico-biológico.	17
1.4.2.4 Oxidación por bacterias sulfoxidantes.	18
1.5 Las aguas amargas y su caracterización.	25
1.6 Procesos biológicos con <i>Thiobacillus</i> en presencia de compuestos orgánicos o aromáticos.	28
<b>2 OBJETIVOS Y ALCANCES.</b>	
2.1 Objetivo general.	29
2.2 Objetivos particulares.	29
2.3 Hipótesis.	30
2.4 Alcances	30
<b>3 MATERIALES Y MÉTODOS.</b>	
3.1 Metodología general.	31
3.2 Material biológico.	32
3.3 Medio de cultivo.	32
3.4 Cultivo discontinuo de microorganismos.	32
3.5 Cultivo continuo de microorganismos.	33
3.6 Métodos analíticos.	34
3.6.1 Determinación del oxígeno disuelto (OD) en la fase líquida.	34
3.6.2 Determinación de compuestos azufrados (S <sup>2-</sup> , SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> y S <sup>0</sup> )	34
3.6.2.1 Determinación colorimétrica de sulfuro.	34
3.6.2.2 Determinación colorimétrica de sulfato.	35
3.6.2.3 Determinación colorimétrica de azufre elemental.	36
3.6.2.4 Determinación de sulfato y tiosulfato por cromatografía de líquidos.	37

3.6.3	Determinación colorimétrica de biomasa.	37
3.6.4	Determinación de nitrógeno amoniacal.	38
3.6.5	Determinación de fenol y p-cresol por cromatografía de gases.	39
3.7	Estudio del efecto de los compuestos aromáticos y la concentración de sulfuro sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos mediante pruebas de respirometría.	39
3.8	Estudio del efecto de los compuestos aromáticos sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos, en cinética en matraz.	40
3.9	Estudio del efecto de fenol sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos en cinética realizada en reactor en lote con control de pH.	40
3.10	Estudio del efecto del fenol sobre el proceso de sulfoxidación en un reactor de recirculación con operación continua.	41
3.11	Sistemas de reacción.	41
3.11.1	Reactor discontinuo.	42
3.11.2	Reactor de recirculación.	43
3.11.3	Reactor de recirculación en el estudio del efecto del fenol sobre el proceso de sulfoxidación.	45
<b>4</b>	<b>ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.</b>	
4.1	Desarrollo de microorganismos en un reactor discontinuo del tipo tanque agitado.	47
4.2	Oxidación de sulfuros en un reactor de recirculación.	50
4.2.1	Evaluación del efecto de la tasa de dilución y la carga de alimentación de sulfuro.	51
4.3	Efecto del nitrógeno amoniacal sobre el proceso de sulfoxidación.	54
4.4	Parámetros cinéticos de la oxidación biológica de sulfuro mediante pruebas de respirometría.	57
4.5	Efecto de la concentración de fenol y p-cresol sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos, mediante pruebas de respirometría.	58
4.6	Efecto de la concentración de fenol y p-cresol sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos, en cinética en matraz.	65
4.7	Efecto de la concentración de fenol sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos, en reactor en lote con control de pH.	71
4.8	Efecto de la concentración de fenol sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos, en un reactor de recirculación con operación continua	72
<b>5</b>	<b>CONCLUSIONES.</b>	76
<b>6</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	79
<b>7</b>	<b>NOMENCLATURA</b>	87

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Número de tabla</b>	<b>Nombre de tabla</b>	<b>Página</b>
1.1	Estados de oxidación de compuestos inorgánicos de azufre.	8
1.2	Efectos a la salud causados por el sulfuro de hidrógeno.	12
1.3	Bacterias sulfoxidantes.	19
1.4	Características de las aguas amargas de la refinería de Tula, Hidalgo, para las unidades catalíticas I y II	26
4.1	Fases de operación del tipo tanque agitado.	47
4.2	Resultados obtenidos durante el cultivo de microorganismos sulfoxidantes.	48
4.3	Evaluación de la tasa de evaluación en el reactor de recirculación.	52
4.4	Comportamiento de la proteína.	54
4.5	Nitrógeno amoniacal determinado y no determinado analíticamente como talen el balance	55
4.6	Comportamiento de la proteína con el incremento en la carga de nitrógeno amoniacal.	56
4.7	Fases de operación del quimiostato con recirculación con adición de fenol.	75

## ÍNDICE DE FIGURAS

Número de figura	Nombre de la figura	Página
1.1	Ciclo del azufre.	7
1.2	Reacciones enzimáticas de compuestos reducidos de azufre.	10
3.1	Reactor completamente agitado para desarrollo de biomasa.	42
3.2	Reactor de recirculación utilizado en el estudio del proceso de <i>oxidación biológica de sulfuro</i> .	44
3.3	Reactor de recirculación utilizado en la evaluación del efecto de los compuestos aromáticos sobre el proceso de sulfoxidación.	45
4.1	Remoción de sulfuro en el sistema.	49
4.2	Reactor de recirculación con sistema de aireación separada.	51
4.3	Porcentaje de producción de azufre elemental y sulfato en el reactor de recirculación.	53
4.4	Velocidad específica de consumo de oxígeno a diferentes concentraciones de sulfuro.	58
4.5	Velocidad de consumo de oxígeno a diferentes concentraciones de fenol.	63
4.6	Velocidad de consumo de oxígeno a diferentes concentraciones de p-cresol.	64
4.7	Comportamiento de la proteína a diferentes concentraciones de fenol y p-cresol.	66
4.8	Comportamiento del pH para las diferentes concentraciones de fenol y p-cresol.	67
4.9	Producción de sulfato debido a la oxidación de tiosulfato a diferentes concentraciones de fenol y p-cresol.	68
4.10	Comportamiento del fenol durante la cinética en matraz.	69
4.11	Comportamiento del p-cresol durante la cinética en matraz.	70
4.12	Comportamiento de la cinética en reactor.	71
4.13	Reactor de recirculación en operación continua, utilizado en el estudio del efecto de fenol.	72
4.14	Efecto del incremento en la carga de fenol en un reactor de recirculación con operación continua.	74

## RESUMEN

En México, la industria petrolera es de gran importancia. El crudo mexicano se caracteriza sus altas concentraciones de compuestos de azufre, nitrógeno y metales. El  $H_2S$ , uno de ellos, representa riesgos a la salud por su propiedades tóxicas, clasificado por Naciones Unidas como un residuo peligroso, puede causar daños al medio ambiente por su corrosividad, mal olor, alta demanda de oxígeno y por ser precursor de la lluvia ácida. Las aguas residuales llamadas aguas amargas provenientes de esta industria son complejas debido a la presencia de compuestos aromáticos, sulfuros, sulfatos,  $CO_2$ , nitrógeno amoniacal y sales por lo que es necesario realizar un estudio que permita conocer posibilidades de tratarlas antes de la descarga y minimizar efectos a salud y medio ambiente.

En el presente trabajo se estudiaron las condiciones que favorecen la oxidación biológica de sulfuros en un reactor de recirculación, y su transformación parcial en azufre elemental limitando la cantidad de oxígeno presente, también se estudió el efecto del incremento en la tasa de dilución. En una relación de oxígeno a sulfuro cercana a 0.8 se presentó la mayor producción de azufre elemental, la cual fue del 92%, la tasa de dilución máxima con la que se trabajó, fue de  $1 d^{-1}$ , la carga manejada en esta tasa de dilución correspondió a 2 g/Ld de sulfuro. La velocidad máxima de oxidación de  $22.4 mgHS^-/g_{prot} \cdot min$  con una  $K_s$  de 0.3 mM de sulfuro. Al evaluar la presencia de nitrógeno amoniacal, se observó que a cargas de hasta 1750 mg/l sin que se observara efecto negativo alguno sobre los microorganismos o sobre la eficiencia de oxidación de sulfuro, la proteína se incrementó desde 55 mg/l hasta 197 a medida que se incrementó la carga de nitrógeno la cual inició con un valor de 84 mg/l. La presencia de compuestos aromáticos (fenol y p-cresol) aparentaron no presentar efecto alguno sobre el proceso de sulfoxidación ya que hasta cargas de 200 mg/l de fenol la eficiencia del proceso no fue inhibida, la presencia de p-cresol en pruebas en lote mostró inhibición en el crecimiento de los microorganismos en concentraciones de 50 a 200 mg/l.

## 1. GENERALIDADES

### 1.1 Química del azufre

**Azufre elemental.** El azufre es el segundo elemento del grupo VI de la tabla periódica. Se encuentra en la naturaleza como una mezcla de cuatro isótopos (32,33,34 y 36). La abundancia natural de éstos es 95.1%, 0.74%, 4.2% y 0.016% respectivamente. El azufre es un sólido amarillo que forma cristales ortorrómbicos (azufre rómbico), es poco soluble en agua (5 µg/l de S a 25 °C) y muy soluble en disolventes no polares como tetracloruro de carbono y bisulfuro de carbono. Su punto de fusión es de 112.8 °C (Pauling, 1964; Alcántara, 2000).

#### 1.1.1 El ciclo del azufre

El azufre se encuentra en la naturaleza en diferentes estados de oxidación y forma diferentes compuestos generados por procesos químicos o biológicos, todo dentro de un ciclo (figura 1,1) denominado ciclo biogeoquímico del azufre. En este ciclo, aunque son posibles varios estados de oxidación, tres de ellos tienen, por su estabilidad, una mayor importancia en la naturaleza (Alcántara, 2000): **-2** (sulfhidrilo R-SH y sulfuro HS<sup>-</sup>), **0** (azufre elemental, S<sup>0</sup>) y **+6** (sulfato, SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>).

El ciclo del azufre, junto con los ciclos del carbono y nitrógeno es de los más importantes en la naturaleza. El ciclo del azufre tiene una parte oxidativa y otra reductiva, las cuales, en un ecosistema natural, deben estar balanceadas. Del lado reductivo, el sulfato (SO<sub>4</sub><sup>-2</sup>) y azufre (S<sup>0</sup>) actúan como aceptores de electrones en el metabolismo de un amplio rango de bacterias anaerobias (Widdel, 1988). En el lado oxidativo del ciclo, los compuestos reducidos del azufre y el azufre son oxidados biológicamente por tres vías: a) oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas, b) oxidación química espontánea con oxígeno y c) oxidación con oxígeno o nitrato por bacterias incoloras (Buisman, 1989).



En 1989 se estimó que la emisión global de azufre a la atmósfera fue de 200 millones de toneladas (Janssen, 1996) Entre los compuestos que se emiten con mayor frecuencia están el  $\text{SO}_2$ , el  $\text{H}_2\text{S}$  y el  $\text{CS}_2$ , entre otros, siendo la mayor parte de las emisiones de origen industrial debido al uso de combustibles fósiles, la refinación del petróleo y la producción de ácido sulfúrico.

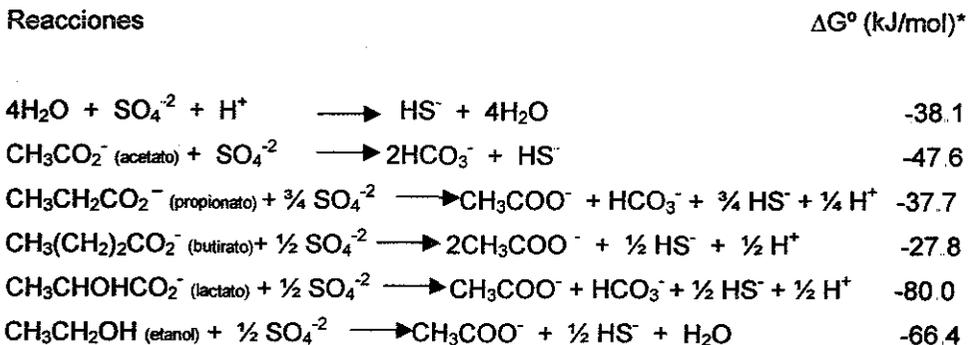
### 1.1.2 Sulfuro de hidrógeno o ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ )

El azufre inorgánico se encuentra en la naturaleza en varios estados de oxidación siendo los sulfuros el más reducido y sulfatos el más oxidado (tabla 1.1). Muchos microorganismos (particularmente Thiobacilli) consiguen energía para su crecimiento de la oxidación de compuestos parcialmente reducidos de azufre (Alcántara, 2000).

**Tabla 1.1 Estados de oxidación de compuestos inorgánicos de azufre.**

ESTADO DE OXIDACIÓN				
-2	0	+2	+4	+6
$\text{H}_2\text{S}$	S	SO	$\text{SO}_2$	$\text{SO}_3$
$\text{HS}^-$	$\text{S}_8$	$\text{H}_2\text{SO}_2$	$\text{HSO}_3^-$	$\text{H}_2\text{SO}_4$
	$\text{S}^0$		$\text{SO}_3^{2-}$	$\text{SO}_4^{2-}$

Los sulfuros solubles ( $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{HS}^-$ ,  $\text{S}^{2-}$ ) son frecuentemente encontrados en aguas residuales relacionadas con la industria del petróleo. La fuente de estos sulfuros es generalmente la reducción de sulfatos por bacterias sulfato reductoras (BSR) mediante las siguientes reacciones.



\* $\Delta G^\circ$ : Valores tomados de Tahuer y col. (1977)

El sulfuro de hidrógeno,  $\text{H}_2\text{S}$ , es muy volátil (punto de fusión de  $-85.6\text{ }^\circ\text{C}$  y punto de ebullición de  $-60.7\text{ }^\circ\text{C}$ ) También es altamente soluble en agua,  $0.1\text{ M}$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$  aproximadamente, (Alcántara, 2000).

### 1.1.2.1 Reacciones químicas del sulfuro

La forma más reducida de los compuestos de azufre, es el  $\text{H}_2\text{S}$ , un gas venenoso, inflamable, altamente soluble en agua (aproximadamente  $0.1\text{ M}$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ ) con un  $\text{p}K_1$  cercano a 7 y un  $\text{p}K_2$  de 13. Las bajas concentraciones de sulfuro de hidrógeno en la naturaleza se mantienen gracias a la baja solubilidad de sulfuros metálicos que se producen en reacciones de condensación con iones como  $\text{Hg}^{2+}$  o  $\text{Ag}^+$  los cuales tiene solubilidades muy bajas. La reacción siguiente muestra la combustión oxidativa del  $\text{H}_2\text{S}$  como una reacción de oxidación química (Susuki, 1999).



En presencia de yodo ( $\text{I}_2$ ) se oxida hacia azufre elemental produciendo condiciones ácidas (Susuki, 1999).

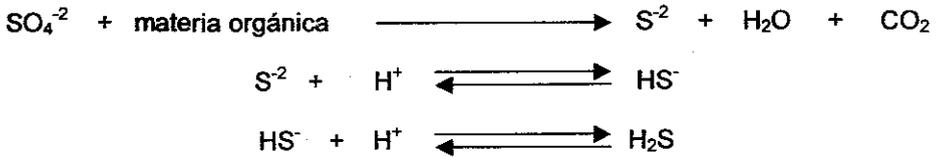


El  $\text{H}_2\text{S}$  sufre reacciones de condensación como las mencionadas con los metales y también para producir ácido tiosulfúrico (Susuki, 1999).



### 1.1.2.2 Reacciones biológicas del sulfuro

El sulfuro de hidrógeno es generado por la reducción de sulfatos en condiciones anaerobias por bacterias sulfato reductoras como se muestra (Susuki, 1999):



### 1.1.2.3 Reacciones enzimáticas de compuestos reducidos de azufre

La oxidación microbiana de compuestos de azufre inorgánicos es gobernada por reacciones químicas y enzimáticas (Suzuki, 1999). Las reacciones químicas pueden ser aceleradas por enzimas como catalizadores biológicos.

La figura 1.2 muestra las reacciones de oxidación microbiana para compuestos reducidos de azufre (Suzuki, 1999), basándose en el conocimiento de las reacciones enzimáticas.

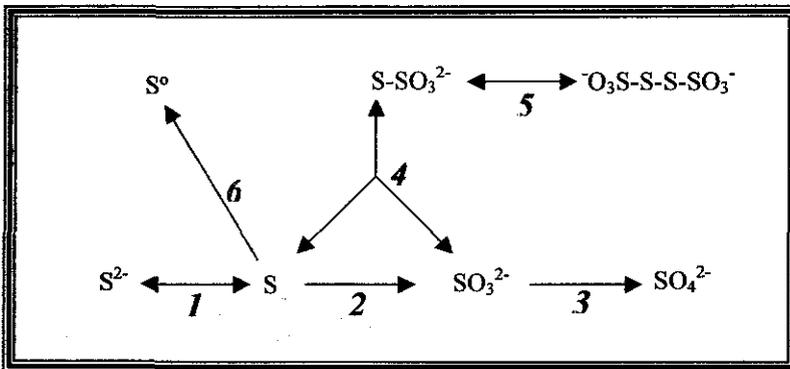


Figura 1.2 Reacciones enzimáticas de compuestos reducidos de azufre (Suzuki, 1999)

La reacción 1 catalizada por sulfuro-oxidasa produce azufre elemental el cual es oxidado hacia sulfito en la reacción 2, catalizada por una enzima sulfuro-oxidante. La reacción 2 es inhibida por N-etilmaleimida (NEM), un agente tioenlazante y cuando el sulfuro es oxidado en presencia de NEM, el azufre formado se acumula como azufre elemental sólido, S<sup>0</sup>, con un octeto estable S<sub>8</sub> (reacción 6).

### **1.1.3 Problemática ambiental generada por H<sub>2</sub>S.**

El H<sub>2</sub>S se emite al ambiente también por diferentes industrias y procesos como la tenería o curtiduría, producción de etanol a partir del bagazo de la caña, producción de viscosa, celofán y la petroquímica, como resultado del tratamiento anaerobio de aguas residuales que contienen sulfato, de la extracción de gas natural y de la eliminación biológica de CS<sub>2</sub> (Sublette y Sylvester, 1987, Buisman y col., 1989, Torres y col., 1993 y Revah y col., 1995).

La toxicidad, propiedades corrosivas, olor desagradable, las altas demandas de oxígeno y capacidad como precursor de la formación de lluvia ácida (debido a la alta volatilidad del sulfuro) (Buisman y col, 1990), dictan estrictos controles para la descarga de sulfuros al medio ambiente. Las propiedades corrosivas se reflejan en el daño que hacen a las paredes en reactores, pipas de acero y otros sistemas. El problema del mal olor por presencia de sulfuros es debido a que en diluciones de éste de 0.002 mg/l de aire el compuesto es perceptible (Buisman y col., 1990).

El H<sub>2</sub>S recuperado en operaciones metanogénicas generalmente se incinera, así, el proceso se transforma de un problema de contaminación de aguas a un problema de contaminación de aire (Rajganesh y col, 1995), en el cual la combustión de H<sub>2</sub>S produce dióxido de azufre, un contaminante regulado.

#### **1.1.3.1 Riesgos a la salud**

El sulfuro de hidrógeno está clasificado como un residuo peligroso cuyo Número de Identificación de Naciones Unidas es 1053, pertenece al grupo de los Gases Tóxicos Inflamables (grupo 2) y sus peligros potenciales se mencionan a continuación (Guía Norteamericana de Respuesta en Caso de Emergencia, 1996).

#### **1.1.3.2 Efectos a la salud**

A bajas concentraciones, el sulfuro de hidrógeno presenta propiedades de toxicidad y se hace perceptible su característico olor a huevo podrido. La tabla 1.2

habla de la toxicidad del H<sub>2</sub>S y cuáles son los efectos que causa en un nivel de concentración dado.

**Tabla 1.2 Efectos a la salud causados por el H<sub>2</sub>S**

CONCENTRACIÓN (ppm)	EFFECTO A LA SALUD
1	Percepción de mal olor (huevo podrido)
10	Máxima exposición permitida en áreas de trabajo por jornada de 8hrs.
100	Dolor de cabeza y náusea, pérdida del sentido del olfato (2-15min)
200	Rápida pérdida del sentido del olfato, ardor de ojos y traquea.
500	Pérdida del equilibrio y razonamiento, insuficiencia respiratoria en 200min.
700	Inconsciencia inmediata, sin un tratamiento adecuado paro respiratorio y muerte.

Adaptado de Alcántara, (2000)

La Guía Norteamericana de Respuesta en Caso de Emergencia (1996), elaborada por El Departamento de Transporte de los Estados Unidos, Transporte de Canadá y la Secretaría de Comunicaciones y Transportes de México, en el marco del Tratado de Libre Comercio agrupan a este compuesto como uno que puede presentar las siguientes características:

1. Tóxico; extremadamente peligroso.
2. Puede ser fatal si se inhala o se absorbe por la piel.
3. El olor inicial puede ser irritante o pestilente y puede disminuir su sentido del olfato.
4. El contacto con gas o gas licuado puede causar quemaduras, lesiones severas y/o quemaduras por congelación.
5. El fuego producirá gases irritantes, corrosivos y/o tóxicos.
6. Las fugas resultantes del control del incendio pueden causar contaminación.
7. Material extremadamente inflamables.
8. Puede formar mezclas explosivas con el aire.
9. Puede incendiarse por calor, chispas o flamas.
10. Los vapores de gas licuado son inicialmente más pesados que el aire y se esparcen a través del piso.
11. Los vapores pueden viajar a una fuente de incendio y regresar en flamas.
12. La fuga resultante del control puede crear incendio o peligro de explosión.

13. Los contenedores pueden explotar cuando se calientan, los cilindros con rupturas pueden proyectarse.

El  $H_2S$  es uno de los contaminantes más tóxicos y también tiene un gran efecto inhibitorio sobre los sistemas anaerobios o metanogénicos. De acuerdo con Anderson y col. (1982), podría ser colocado como uno de los inhibidores más importantes.

#### **1.4 Procesos de oxidación de sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ )**

Existen diferentes métodos de oxidación de  $H_2S$  que se conocen en la actualidad, éstos pueden ser físico-químicos o biológicos. Los métodos biológicos de tratamiento de aire, contaminado con este compuesto, son relativamente económicos en comparación a técnicas convencionales como incineración o absorción en carbón activado. Los procesos biológicos se desarrollan a temperatura ambiente por lo que no requieren energía adicional y no generan productos contaminantes (Janssen, 1997).

##### **1.4.1 Métodos físico-químicos de separación y tratamiento.**

Existen diferentes procesos físico-químicos para separar los compuestos reducidos de azufre dentro de la industria del petróleo. En el caso del  $H_2S$  el proceso comercial más utilizado en gases y corrientes de aire contaminado con el ácido es el proceso con aminas (arrastre con vapor de agua mediante columnas de platos, Sublette, 1987). El proceso consiste en contactar gas con la solución, el solvente de amina se calienta entre 90 y 150 °C para liberar  $H_2S$  y el solvente se regenera. El sulfuro de hidrógeno se incinera o se convierte a azufre elemental por el proceso Claus o Stretford (Nagl, 1997; Velasco, 2001). Sin embargo, los sulfuros recuperados generalmente se incineran convirtiendo un problema de agua en uno de aire por la producción de dióxido de azufre y por favorecer la formación de lluvia ácida (Rajganesh y col., 1995).

Mediante otro mecanismo, los sulfuros pueden oxidarse a tiosulfatos por oxidación con aire. Para ello se requieren de altas presiones y los tiosulfatos producidos tienen DBO y DQO considerables (Rajganesh y col., 1995).

Pequeñas cantidades de sulfuros pueden precipitar con sales de cobre (II) o zinc (II), más, si estos precipitados se exponen a condiciones ácidas, el  $H_2S$  se puede regenerar (Rajganesh y col., 1995).

Algunos otros métodos físico-químicos usados con frecuencia son la aeración, cloración, ozonación y tratamiento con  $KMnO_4$  y  $H_2O_2$ . Sin embargo, todos estos tratamientos producen sulfatos y tiosulfatos como productos finales, son de naturaleza compleja, tienen altos requerimientos de energía y altos costos para la disposición de los desperdicios producidos (Restrepo y col, 1999).

Aunque estos procesos son muy efectivos en la recuperación de azufre, los residuos de azufre liberados al ambiente son aún muy altos. El gasto de energía necesario para producir las condiciones extremas de presión y temperatura hacen que el costo de operación de los procesos mencionados sea alto (Janssen, 1996).

De aquí surge la necesidad de buscar tecnologías alternativas que ofrezcan soluciones sustentables. Tal es el caso de los tratamientos biológicos empleando microorganismos que sean capaces de transformar por reacciones de oxidación-reducción los compuestos reducidos de azufre hacia azufre elemental (Buisman, 1989; Torres y col, 1993; Janssen, 1996).

#### **1.4.2 Métodos biológicos**

Los tratamientos biológicos empleando microorganismos son capaces de transformar por reacciones de oxidación-reducción óxidos de azufre, sulfuros, disulfuros y otros compuestos azufrados a azufre elemental (Buisman y col., 1989; Torres y col. 1993; Janssen, 1996).

Los procesos biológicos utilizados en la eliminación de  $H_2S$  se pueden clasificar de la forma siguiente (Buisman y col., 1989, Jensen y Webb, 1995, Janssen y col., 1997)

1. Oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas.
2. Oxidación anaerobia por microorganismos nitrificantes.
3. Oxidación por un proceso químico-biológico.
4. Oxidación aerobia por bacterias sulfooxidantes.

#### 1.4.2.1 Oxidación anaerobia por bacterias fotosintéticas.

Cork y col. (1986) propusieron el uso del microorganismo anaerobio fotosintético *Chlorobium limicola* var. *Thiosulfaum* que oxida al  $H_2S$  en azufre elemental. Al utilizar cultivos en batch y en continuo, mostraron que las velocidades de entrada del gas ( $H_2S$ ) y la cantidad de luz en el biorreactor fueron determinantes en la optimización de la eliminación del compuesto. Encontraron que el 67.1% del compuesto fue convertido a azufre elemental mientras que el 32.9% permaneció como compuestos azufrados solubles en agua.

Kim y col. (1990) inmovilizaron células de *Chlorobium limicola* var. *Thiosulfaum* en una matriz de estroncio-alginato y reportaron que la acumulación de azufre o sulfato está en función de la energía lumínica y la velocidad de alimentación.

La mayor desventaja en el uso de bacterias fotosintéticas a gran escala se debe a los requerimientos de energía radiante y por lo tanto, a la necesidad de una gran superficie de contacto con ella en los reactores (Alcántara, 2000).

Sánchez y col. (1996) reportaron la operación de un sulfidostato (quimiostato con control de concentración de sulfuro) para la oxidación de  $H_2S$  con la bacteria

fotótrofa *chromatium vinosum*. El control se logró mediante una sonda redox y diferentes niveles de luminosidad.

#### 1.4.2.2 Oxidación por organismos nitrificantes

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

Sublette y Silvester (1987) reportaron el crecimiento anaerobio de *Thiobacillus denitrificans* sobre ácido sulfhídrico en un reactor continuo tipo tanque agitado. Encontraron que la concentración de biomasa y las condiciones ambientales son las variables más importantes en este proceso. Por otro lado reportaron que la presencia de organismos heterótrofos no tiene un efecto importante sobre el crecimiento de *T. denitrificans* por lo que las condiciones de esterilidad no son importantes

Ongcharit y col. (1989) desarrollaron un procedimiento para la inmovilización de células para *Thiobacillus denitrificans* en un cultivo mixto con bacterias heterótrofas cuya característica es la formación de agregados con buenas propiedades de sedimentación. El cultivo fue crecido en presencia de tiosulfato como única fuente de energía y sin una fuente de carbono orgánica en un cultivo en lote. Se supuso que los heterótrofos utilizan los productos de desecho de *Thiobacillus denitrificans* o bien los productos de la lisis celular como fuente de carbono y energía. Los agregados fueron posteriormente utilizados para eliminar  $H_2S$  en un reactor continuo de tanque agitado con recirculación de la biomasa.

Debido a que el  $H_2S$  es un sustrato inhibitorio para *Thiobacillus denitrificans* el reactor fue operado en condiciones limitadas de ácido pero se obtuvo una

eficiencia de eliminación del compuesto de 90.7%. se encontró también que la acumulación de sulfato puede provocar, a altas concentraciones, un efecto inhibitorio en el proceso de oxidación.

Sublette (1990) reportó la aplicación de un proceso en planta piloto para el tratamiento de biogás producido en un digestor anaerobio. Sin embargo, sólo alcanzó eficiencias de eliminación del ácido de 0.15%

Candenhead y sublette (1990) evaluaron otros microorganismos del género *Thiobacillus* (*T. thioparus*, *T. versatus*, *T. neopolitanos*, y *T. thiooxidans*) con el propósito de determinar si alguno de ellos ofrecía ventajas sobre *Thiobacillus denitrificans* en la oxidación aerobia de H<sub>2</sub>S. Ninguno ofreció ventaja clara ya que todos mostraron bajos rendimientos de biomasa comparados en condiciones similares de crecimiento.

Buisman afirma que este sistema no es ampliamente aplicable debido al requerimiento de nitrato (Buisman y col., 1990).

#### 1.4.2.3 Oxidación por un proceso químico-biológico.

Imaizumi (1986) reportó un proceso de eliminación de H<sub>2</sub>S utilizando un proceso químico-biológico con una solución férrica y el microorganismo *Thiobacillus ferrooxidans*. El ácido se hace precipitar como azufre elemental



El azufre elemental se separa y el sulfato férrico se regenera por la oxidación biológica del sulfato ferroso utilizando *T. ferrooxidans*. La solución oxidada se recicla al absorbedor. Se ha reportado una eficiencia del 99% de eliminación de H<sub>2</sub>S en una planta comercial existente.

#### 1.4.2.4 Oxidación por bacterias sulfoxidantes.

##### **Bacterias sulfoxidantes "incoloras" de azufre**

El nombre "incoloras" de azufre, se usa para designar a los procariotes capaces de utilizar compuestos reducidos de azufre (principalmente sulfuro de hidrógeno, azufre elemental y tiosulfato) como fuente de energía para su crecimiento (Velasco, 2001). La falta de fotopigmentos en estas bacterias (color rosa en cultivos con alto crecimiento celular) es la causa de que se les califique como incoloras (Alcántara, 2000).

Bajo condiciones de suficiente oxígeno en el sistema, el producto final de la oxidación es el sulfato. Sin embargo, en el caso del sulfuro y tiosulfato y bajo ciertas condiciones de cultivo (limitación de oxígeno o cargas altas de fuente de energía) es posible observar la formación de azufre elemental como producto de la oxidación parcial de dichos compuestos. La oxidación del  $H_2S$  en medio acuoso, permite la transformación de este gas en una molécula disociada no volátil que puede posteriormente ser recuperada. Varios sistemas biológicos son capaces de acelerar fuertemente este proceso (Plas y col. 1993)

Una gran parte de los conocimientos fisiológicos de estos microorganismos proviene del estudio de un número limitado de géneros. La facilidad de los Thiobacilli para ser cultivados en laboratorio los convierte en los más estudiados y esto ha permitido entender las rutas bioquímicas de la oxidación de los compuestos reducidos de azufre (Alcántara, 2000).

Los Thiobacilli son microorganismos aerobios y facultativos, Gram-negativos con forma de bacilos que miden entre 1 y 3  $\mu m$  de largo y aproximadamente 0.3  $\mu m$  de ancho, Estos microorganismos no necesitan factores ambientales especiales ya que dependiendo de la especie pueden tener actividad a intervalos de pH que van de 0.5 a 10 con temperaturas entre 20 y 75°C, la mayoría son autótrofas, pero también pueden crecer heterotróficamente. Se encuentran en

diferentes habitats: suelo, agua dulce y de mar, desechos ácidos y aguas (Alcántara, 2000).

Los Thiobacilli utilizan formas inorgánicas de compuestos reducidos de azufre (sulfuro, disulfuro, tiosulfato, azufre elemental, sulfito, tiocianato y politionatos) como fuente de energía y CO<sub>2</sub> como su principal fuente de carbono. Normalmente usan O<sub>2</sub> como aceptor de electrones aunque existen especies como *T. denitrificans*, capaces de usar nitrato como aceptor en condiciones anaerobias (Ongcharit y col. 1991; Janssen y Webb, 1995). Algunas especies son capaces de utilizar carbono orgánico como fuente de carbono suplementaria. Debido a los requerimientos nutricionales simples de los quimiolitótrofos, su uso en la remoción de H<sub>2</sub>S es muy ventajoso (Kelly, 1990).

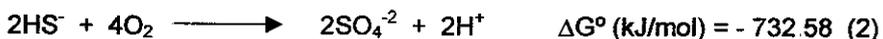
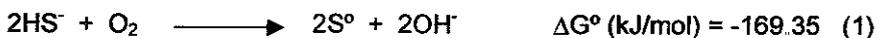
En la tabla 1.3 se dan ejemplos de bacterias sulfoxidantes y sus condiciones de crecimiento (Madigan y col., 1999).

Tabla 1.3 Bacterias sulfo-oxidantes

Bacterias	Donador de electrones	pH de crecimiento	Tipo*
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	S <sup>-2</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , S	2-5	O
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	Fe <sup>+2</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , S	2-6	F
<i>Thiobacillus thioparus</i>	CNS <sup>-</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , S	6-8	O
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	CNS <sup>-</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , S	6-8	O
<i>Thiobacillus intermedius</i>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , S, glutamato	2-6	F
<i>Thiobacillus novellus</i>	S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , S, glutamato	6-8	F
<i>Thiomicrospira pelophila</i>	S <sup>-2</sup> , S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>-2</sup> , S	6-8	O
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	S, glutamato, peptona	2-3	F

- O = Autotrófico obligado; F = Autotrófico facultativo.

En condiciones aerobias este tipo de bacterias puede oxidar H<sub>2</sub>S a azufre elemental (Janssen y col. 1995; Kuenen, 1975). Las reacciones que se llevan a cabo son:



Aquí, la energía libre de Gibbs se da por mol de sulfuro. Sobre condiciones de limitación de oxígeno o altas cargas de sulfuro, el azufre elemental será el producto predominante mientras que la formación de sulfato se produce bajo circunstancias de limitación de sulfuro y exceso de oxígeno (Buisman y col. 1991). Debido a que la formación de sulfato rinde más energía, esta reacción es preferida por los microorganismos. Con un control adecuado se puede favorecer la oxidación parcial reduciendo el consumo de oxígeno, la formación de lodos y optimizando la recuperación de azufre (Janssen y col. 1997; Alcántara 1999).

La eliminación del  $H_2S$  se lleva a cabo mediante un proceso de oxidación aerobia por microorganismos sulfoxidantes, los cuales oxidan a los compuestos reducidos de azufre para obtener energía útil para su metabolismo. A este grupo pertenecen microorganismos de una gran diversidad fisiológica y morfológica. Los géneros que pertenecen a este grupo son: *Thiobacillus*, *Thiomicrospira*, *Sulfobolus*, *Thermothrix*, *Pseudomonas*, *Thiovulum*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thiospira* y *Thioploca*. Un aspecto importante es si estas bacterias almacenan o excretan el azufre producido dentro de la célula. Especies del género *Beggiatoa*, *Thiothrix* y *Thiospira* acumulan en el interior de la célula el azufre producido, esto dificulta el proceso de eliminación de azufre ya que debería producirse una gran cantidad de biomasa y el azufre sería difícil de separar de ésta. Los microorganismos del género *Thiobacillus* poseen la característica de que el azufre producido es excretado al medio lo que facilita la separación del azufre y no requiere de una generación alta de biomasa (Alcántara, 2000).

Buisman y col (1990) proponen y desarrollan un proceso biotecnológico para la eliminación de  $H_2S$  utilizando microorganismos del género *Thiobacillus*. Encontraron que el azufre elemental y el sulfato son los principales productos de la oxidación biológica del  $H_2S$ . Utilizaron dos reactores continuos con agitación completa de igual construcción variando únicamente el volumen y las cantidades de partículas para el soporte de los microorganismos. Se estudiaron factores ambientales con los resultados siguientes: pH óptimo 8.0-8.5, temperatura óptima

25-35 °C. se encontró que al incrementar la concentración de oxígeno las velocidades de oxidación se incrementaron proporcionalmente hasta tener una eficiencia del 95% a pH de 8.5 y 3 mg/l de OD.

Buisman y col. (1990) Estudiaron el efecto de diversos factores de la fermentación con la finalidad de determinar su importancia en la optimización de la producción de azufre elemental. Los factores evaluados fueron: la concentración de oxígeno disuelto, la concentración de H<sub>2</sub>S y el uso de un sistema con partículas para soporte de los microorganismos. Reportó que a concentraciones de H<sub>2</sub>S mayores a 10 mg/ml se genera menos del 10% de sulfatos cuando la concentración de oxígeno permanece por debajo de 6 mg/l. Sin embargo reportó que a concentraciones mayores a 20 mg/ml la influencia de la concentración de oxígeno es insignificante, a concentraciones menores de 20 mg/ml, la producción de sulfatos se incrementa cuando aumenta la concentración de oxígeno de 3 a 9mg/l. Comparó tres sistemas diferentes de reactores empacados con poliuretano (agitado, biorrotor y flujo ascendente) en la eficiencia de conversión de sulfuro a azufre elemental, analizando también los tiempos de retención. Los reactores biorrotor y flujo ascendente mostraron mejores resultados en la eliminación de H<sub>2</sub>S.

Buisman y Prins (1994) reportaron un proceso biológico para la desulfuración de gas de combustión (SO<sub>2</sub>) a nivel planta piloto y con proyecciones a su aplicación industrial en una termoeléctrica con capacidad de producción de 600MW.

El proceso utilizado consta de cuatro secciones, en el orden siguiente:

- Una sección de absorción de SO<sub>2</sub>,
- Un reactor biológico anaerobio.
- Un reactor biológico aerobio.
- Una sección de recuperación de azufre.

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

En una fase inicial se trataron 1500 m<sup>3</sup>/h de gas de combustión, reportándose eficiencias de eliminación de SO<sub>2</sub> del 95% y de H<sub>2</sub>S del 99% con recuperación de azufre del 95%.

Revah y col. (1995) y Torres y col. (1993) reportaron un proceso biológico de eliminación de CS<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>S de un gas proveniente de la fabricación de celofán y rayón con la conversión a azufre y sulfato. Utilizaron una población mixta que contenía microorganismos del género *Thiobacillus*. Las concentraciones de los compuestos azufrados llegaron hasta 1000 ppm de cada uno logrando eficiencias del 98% de eliminación de H<sub>2</sub>S y 80% de CS<sub>2</sub>. Los equipos diseñados han operado varios años con flujos de hasta 800 m<sup>3</sup>/min.

Hinz y col. (1998) investigaron sobre la desorción del sulfuro de hidrógeno utilizando un reactor agitado en lote y encontraron que la resistencia de desorción en las fases líquida y gas son dependientes de la velocidad de agitación. Se evaluó un modelo basado en la teoría de película.

Recientemente se reportan nuevas configuraciones de equipos que permiten tratar altas concentraciones (hasta 2500 ppmv) de H<sub>2</sub>S en aire utilizando biolavadores de lecho escurrido (BLE) en serie con alta conversión a sulfato (Hugler y col. 1999). Otras configuraciones de BLE tratan olores de plantas de tratamiento con concentraciones diluidas de H<sub>2</sub>S, otros sulfuros, COVs y nitrogenados. Este tipo de sistemas ha sido estudiado por Lobo y col. (1999) donde se mencionan factores como importantes a los fenómenos de transferencia gas-líquido y de reacción.

Como ya se mencionó, la oxidación biológica de  $H_2S$  por microorganismos sulfoxidantes se presenta en dos etapas (Janssen y col., 1997). La formación de  $S^0$  se prefiere por varias razones: a) el azufre elemental es insoluble en agua, por lo tanto se puede sedimentar y separar de la corriente acuosa que lo contiene; b) de la misma forma, este azufre se puede purificar y reutilizar, lo que le da un valor agregado al proceso; c) evita la concentración de sulfatos que en concentraciones mayores a 30 g/l tienen un efecto negativo sobre la oxidación, y; d) la formación de sulfatos requiere de 4 veces más oxígeno y en consecuencia una mayor demanda de energía en aireación.

Los trabajos de Buisman (1998,1994,1991,1990,1989) fueron los primeros que se reportaron con este fin. Sin embargo, hasta 1997 (Janssen y col.,) reportaron un sistema que favoreció la acumulación de  $S^0$  a partir de la oxidación parcial de  $H_2S$ .

Janssen y col (1995) estudiaron la formación de sulfatos y azufre elemental como productos de la oxidación de sulfuro y comprobaron que ésta puede ser controlada dependiendo de la cantidad de oxígeno suplementada, concluyéndose que ajustando éste, la reacción puede dirigirse hacia la formación de azufre elemental. Encontraron que bajo condiciones de OD limitadas (abajo de 0.1 mg/l), el azufre elemental es el producto mayoritario en la oxidación del  $H_2S$ , mientras que la formación de sulfato se favoreció por concentraciones limitadas de  $H_2S$  o concentraciones de OD mayores a 0.1 mg/l. Posteriormente (Janssen y col. 1997) reportaron un proceso biotecnológico de máxima recuperación de  $S^0$  a partir de la oxidación de  $H_2S$ . En este trabajo se diseñó y estudió un reactor de lecho expandido para conseguir la oxidación de sulfuro hacia azufre elemental y producir éste con buenas propiedades de sedimentación, separando etapa de reacción de etapa de aireación. Se obtuvo como resultado un buen precipitado con concentración mayor al 92% de azufre elemental y velocidades de sedimentación de las partículas superiores a 25 m/h. En 1998 el mismo grupo de investigación aplicó potencial redox para el control de un biorreactor sulfuro-oxidante y

determinó que un potencial redox en el caso es mayormente determinado por la concentración de sulfuro de hidrógeno debido a que este compuesto posee un alto estándar de cambio de densidad de corriente con una superficie del electrodo de platino. Determinó que los valores óptimos redox para la formación de azufre se encuentran entre -137 y -247 mV a 30°C y pH de 8.

Restrepo y col. (1999) estudió la oxidación biológica de sulfuros encontrado en las aguas residuales de refinería usando un reactor de lecho fijo de flujo continuo. Obtuvo remociones mayores al 90% para concentraciones de sulfuro desde 300 hasta 1600 ppm obteniendo como principales productos finales sulfatos, tiosulfatos y tiosulfitos.

Alcántara (2000) estudió la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes, evaluando los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Estableció las condiciones de cultivo que favorecen la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre siendo éstos, una temperatura de 30 °C, un pH entre 5.5 y 7 y una concentración de OD superior o igual a 0.2 mg/l. Determinó que a concentraciones mayores a 20 g/l de sulfato se afecta negativamente la oxidación biológica de CS<sub>2</sub>, mientras que si se alimenta tiosulfato (30 g/l), el sistema soporta hasta 40 g/l de sulfatos. Estudió los efectos de la presencia de amonio y levaduras en el medio hallando favorable la de amonio y desfavorable la de levadura cuando su concentración es mayor a 500 mg/l. Utilizó inhibidores de cadena respiratoria para observar el efecto sobre el crecimiento tanto en el crecimiento como en la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental, en las pruebas realizadas en lote halló que en concentración 0.5mM de cianuro el efecto fue parcialmente negativo mientras en pruebas en continuo se inhibió completamente el crecimiento microbiano. Sin embargo, a concentraciones de 0.1 mM de cianuro el crecimiento en continuo del consorcio no resultó afectado.

Velasco (2001) realizó estudios sobre los factores que determinan la oxidación biológica de tiosulfato en azufre elemental utilizando un reactor de recirculación con las fases de aireación y reacción separadas con un consorcio sulfoxidante y concluyó (utilizando azul de metileno y agua) que un reactor de este tipo tiene el comportamiento de un reactor de mezcla completa con dos zonas una sin turbulencia en la parte inferior del reactor y otra con turbulencia y mezcla completa para tasas de dilución de recirculación menores de  $4 \text{ h}^{-1}$ , mientras que para diluciones mayores a  $4 \text{ h}^{-1}$  el reactor se comporta como uno completamente mezclado sin zona muerta. Observó que cuando la carga de sustrato aumenta la biomasa incrementa su valor. Cuando evaluó la composición de los aglomerados de azufre elemental determinó que el 90% del aglomerado es azufre elemental y 6% es biomasa (lo cual concuerda con lo reportado por Janssen y col. en 1997)

### **1.5 Las aguas amargas y su caracterización**

En México la normatividad existente referente a agua no menciona límite alguno para la concentración de sulfuro en efluentes de aguas residuales tratadas. El azufre en el crudo se puede encontrar en forma de sulfuros, sulfatos y sulfitos, aunque la mayor parte está incorporado en la matriz orgánica en forma de sulfonas, tiofenos, tioles y sustitutos de benzotiofenos y dibenzotiofenos (Monticello y Kilbane, 1991). Durante el proceso de refinación del crudo se generan diferentes corrientes ricas en compuestos azufrados, principalmente en los siguientes procesos (PEMEX, 1984; Kensell y Quinlan, 1997): tratamiento y fraccionamiento de hidrocarburos ligeros y pesados, desulfuración de fracciones intermedias (hidrodesulfuración), cracking catalítico y endulzamiento del gas amargo.

Las aguas amargas se originan debido al uso de vapor para el agotamiento de las torres de destilación o de la reducción de la presión parcial de hidrocarburos en las plantas de cracking térmico o catalítico. También, en algunas unidades de refinería inyectan agua de lavado para absorber compuestos corrosivos o sales

que puedan causar taponamiento. Este vapor o agua entra en contacto con hidrocarburos que contienen H<sub>2</sub>S, produciéndose así el agua amarga (Kensell y Quinlan, 1997). Tan solo en la refinería "Miguel Hidalgo", ubicada en la ciudad de Tula, estado de Hidalgo en México se generan 1500 m<sup>3</sup>/d de aguas amargas (comunicación personal: Ing. Rosa Maria Vazquez, Refinería "Miguel Hidalgo", Tula, Hidalgo. (2000).

Tabla 1.5 Características de las aguas amargas de la refinería de Tula, Hidalgo (unidades catalíticas I y II)

PARÁMETRO (mg/l) EXCEPTO pH	UNIDAD CATALÍTICA I (MARZO 2000)	UNIDAD CATALÍTICA II (MARZO 2000)
Parámetros globales.		
pH	8.58	10.12
DQO	140	2142
Nitrógeno amoniacal	4.7	1416.2
Nitrógeno orgánico	13.6	119.6
Fósforo total.	0.45	1.87
Iones.		
Sulfatos	337.5	609.1
Sulfito	150	0.
Tiosulfato	0	2180
Cloruros	103	7
Fosfato	0	0
Carbonato	0	0
Nitrato	23	0
Orgánicos.		
Fenoles	25	155
Cresoles	10	130
2,5 DMPH	0	25
Metales		
As	0.007	0.007
Cd	0.143	0.168
Fe	0.416	0.684
Mg	11.71	0.98
Ca	30 29	1.84
K	10.85	0.576
Na	1.869	1.3618
Hg	<0.0025	<0.0025
Al	<1 1	<1.1
Otros.		
Sufuro total	150.0	730.0

Fuente: IMP 2001, Informe Técnico proyecto IMP-D21, Confidencial

Además del  $H_2S$ , las aguas amargas contienen cantidades importantes de amoníaco, fenoles, cianuros,  $CO_2$ , algunas sales, ácidos y otros compuestos como los poliaromáticos y el grupo denominado BTEX. Rajganesh y col en 1995 realizaron una caracterización de aguas amargas, las concentraciones determinadas fueron las siguientes (en mg/l): ácido acético, 400; fenol, 5; benceno, 5; tolueno, 2; sulfuro total, 70.

La tabla 1.5 muestra la caracterización de las aguas amargas de la refinería de Tula, Hidalgo. Donde se demuestra que además de sulfuro, existe la presencia de compuestos orgánicos, nitrógeno amoniacal, metales y otros iones.

Haciendo una revisión de lo estudiado hasta la fecha con respecto a la oxidación biológica de  $H_2S$  y su transformación parcial en azufre elemental se puede mencionar que se han realizado estudios sobre el uso de diferentes géneros de microorganismos sulfoxidantes, se ha trabajado acerca del uso de diferentes sistemas biotecnológicos de reacción o combinaciones de procesos químicos con sistemas biológicos, se ha trabajado en las condiciones ambientales y factores que intervienen para favorecer el crecimiento de los microorganismos sulfoxidantes. También se han estudiado aquellos factores y condiciones que favorecen la optimización de formación de azufre elemental como lo son la carga de sulfuro y la concentración de oxígeno disuelto en el reactor y la recuperación de azufre se ha optimizado mediante el diseño de un reactor que separa las fases de reacción y de aireación para favorecer el control de la concentración de oxígeno disuelto en el reactor y la formación de azufre elemental. Incluso se mencionan aplicaciones industriales exitosas con eficiencias de remoción superiores al 90% en el tratamiento de efluentes líquidos y gaseosos que contienen  $H_2S$  y otros compuestos reducidos de azufre.

A pesar de lo estudiado y de los resultados positivos obtenidos, no se mencionan estudios sobre tratamiento de aguas residuales de la industria petrolera (las cuales ofrecen, por sus características de efluente complejo,

dificultades particulares al momento de ser tratadas como la presencia de compuestos aromáticos y nitrógeno amoniacal, fósforo, sales, algunos iones y por supuesto la presencia de  $H_2S$ ) donde se identifique el efecto que los compuestos aromáticos y el nitrógeno amoniacal puedan causar al proceso de sulfoxidación y la transformación de  $H_2S$  en azufre elemental.

### **1.6 Procesos biológicos de tratamiento con *Thiobacillus* en presencia de compuestos orgánicos ó aromáticos.**

Existe en general, poca información acerca de estudios realizados sobre microorganismos del género *Thiobacillus*.

Alcántara (2000) realizó estudios sobre el efecto de la concentración de levadura en el proceso de sulfoxidación hallando desfavorable la presencia de ésta en concentraciones superiores a 500 mg/l.

En el tratamiento de aguas amargas, Rajganesch y col. 1995, observaron la presencia de compuestos aromáticos como benceno (5 mg/l), tolueno ( 2 mg/l), fenol (5 mg/l) y ácidos carboxílicos (400 mg/l) sin que existiera efecto sobre el proceso de oxidación de sulfuro de hidrógeno por microorganismos del género *Thiobacillus*.

## **2. OBJETIVOS Y ALCANCES**

### **2.1 Objetivo general**

Evaluar el proceso de oxidación biológica de sulfuros en un reactor con recirculación bajo la influencia del nitrógeno amoniacal, fenol y p-cresol, variando la carga de sulfuro, el tiempo de retención, la relación oxígeno sulfuro y la presencia de nitrógeno amoniacal, fenol y p-cresol.

### **2.2 Objetivos particulares**

1. Cuantificar la formación de biomasa en un reactor completamente agitado utilizando como fuente de energía sulfuro y tiosulfato.
2. Estudiar el efecto de la variación en la tasa de dilución sobre la oxidación de sulfuro disminuyendo el tiempo de retención hidráulico y aumentando la carga de sulfuro alimentada.
3. Estudiar el efecto de la relación oxígeno/sulfuro sobre la formación de azufre elemental a partir de la oxidación de sulfuro.
4. Estudiar el efecto de diferentes cargas de nitrógeno amoniacal sobre la sulfoxidación aumentando la carga de nitrógeno amoniacal en la alimentación.
5. Estudiar el efecto del fenol y p-cresol sobre la oxidación de sulfuro adicionando fenol y p-cresol al proceso de sulfoxidación.

### **2.3 Hipótesis**

Es posible llevar a cabo el proceso biológico de sulfoxidación, en presencia de nitrógeno amoniacal, fenol y p-cresol.

### **2.3 Alcances**

A partir del trabajo de investigación se entenderán los mecanismos que determinan la oxidación parcial del sulfuro en azufre elemental. Por otro lado, se obtendrá información sobre el efecto que pueden ocasionar diversos compuestos presentes en aguas residuales de la industria petrolera como nitrógeno amoniacal y compuestos aromáticos sobre el proceso de sulfoxidación.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1 Metodología general**

La metodología seguida para este trabajo, constó básicamente de los siguientes pasos.

- 1 Montaje de las técnicas analíticas. Con base en las necesidades del proyecto se definieron las diferentes técnicas analíticas que se habrían de utilizar.
- 2 Desarrollo de biomasa. Se buscó desarrollar biomasa en cantidad suficiente para realizar la experimentación planteada.
- 3 Montaje y puesta en marcha de la experimentación. Se utilizó un reactor de recirculación en condiciones de pH y temperatura controlados para oxidar biológicamente sulfuro.
- 4 Estudiar efecto de variables sobre el proceso de sulfoxidación. Se estudiaron, las condiciones que favorecieron la oxidación parcial del sulfuro en azufre elemental, el efecto de la tasa de dilución, diferentes cargas de nitrógeno amoniacal y efecto de compuestos aromáticos.

### **3.2 Material biológico**

Con la finalidad de desarrollar biomasa adaptada a la oxidación de sulfuro se utilizó un consorcio adaptado a oxidar tiosulfato durante cuatro años en el Laboratorio de Ingeniería Química de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Atzacapotzalco. Este consorcio se inoculó a un reactor de tipo tanque agitado para su desarrollo.

Con el fin de asegurar el desarrollo de biomasa, observar el proceso de sulfoxidación y estudiar el efecto de diferentes condiciones sobre el proceso en un reactor de recirculación, se utilizó un consorcio sulfoxidante proveniente de un biolavador de lecho escurrido, empacado con un soporte inerte de PVC. Este equipo se utiliza para la eliminación de bisulfuro de carbono y ácido sulfhídrico y ha permanecido en operación durante 5 años. Este consorcio se combinó con el generado en laboratorio.

### **3.3 Medio de cultivo**

El medio de cultivo utilizado fue el descrito por Sublette (1987), utilizando  $\text{Na}_2\text{S}$  como fuente de energía. Este compuesto ha sido utilizado como modelo de estudio en diferentes trabajos (Sublette, 1987; Buisman y col., 1990; Janssen y col., 1997). La composición del medio es la siguiente (g/l):  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  1.2,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1.8,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  0.5,  $\text{MnCl}_2$  0.02,  $\text{CaCl}_2$  0.03,  $\text{FeCl}_3$  0.02,  $\text{NaHCO}_3$  1.0, solución de metales pesados (zinc, cobre, níquel, cobalto, estaño y bario) 15 ml/l y agua destilada.

### **3.4 Cultivo discontinuo de microorganismos**

Utilizando un reactor del tipo tanque agitado marca Applikkon de 2.5 l, se inició el cultivo discontinuo del consorcio utilizando como fuente de energía sulfuro y tiosulfato de sodio en mezcla, con una carga inicial de 1.25 g/l. El cultivo se inició en lote y posteriormente se inició una operación en discontinuo, desplazando

una cantidad de volumen diario de acuerdo al tiempo de retención requerido. Considerando que el inóculo utilizado estuvo adaptado a oxidar tiosulfato, se inició con una mezcla sulfuro-tiosulfato y disminuir gradualmente la carga de tiosulfato. Para evitar la pérdida de biomasa, el material retirado se centrifugó y el pellet resultante se resembró en el reactor.

Se evaluaron diferentes tiempos de retención y diferentes cargas de la mezcla sulfuro-tiosulfato

Tiempos de retención de 11, 5 y 3 días.

Cargas de mezcla sulfuro-tiosulfato en g/l de 1.25 (12 días), 2.0 (9 días), 1.4 (8 días), 1.8 (20 días) y 0.2 (13 días).

### **3.5 Cultivo continuo de microorganismos**

Se utilizó una mezcla del consorcio generado en el reactor discontinuo y un consorcio sulfoxidante, proveniente de un biolavador de lecho escurrido utilizado en la eliminación de bisulfuro de carbono y ácido sulfhídrico para reinocular el reactor de recirculación. Éste se alimentó solamente con sulfuro de sodio y se manejaron diferentes tasas de dilución, se evaluaron las condiciones que favorecen la formación de azufre elemental, se evaluó el efecto de la presencia de nitrógeno amoniacal y el efecto de la presencia de compuestos aromáticos (los periodos de evaluación para cada condición fueron de al menos cinco tiempos de residencia en el estado estacionario).

Las tasas de dilución evaluadas, en  $\text{días}^{-1}$  fueron: 0.2, 0.3, 0.5 y 1.0.

Las cargas de alimentación de sulfuro fueron, (g/l): 0.3, 0.6, 0.8, 1.0 y 2.0

La presencia de nitrógeno amoniacal se evaluó adicionando  $\text{NH}_4\text{Cl}$  al medio mineral en concentraciones diferentes para tener las siguientes cargas: 0.084, 0.55 y 1.75 g/l.

### 3.6 Métodos analíticos

#### 3.6.1 Determinación del oxígeno disuelto (OD) en la fase líquida.

Se utilizó un medidor de OD marca Applikon YSI modelo 50B SENSOR DIS.OX.(ADI) L= 385 mm, 7-15 l,  $\theta = 12$  mm. La calibración se realizó introduciendo el electrodo en agua previamente aireada (30 min) a saturación de OD para asegurar que el valor de lectura es el de saturación. El valor cero de oxígeno disuelto en agua se ajustó gasificando con  $N_2$  una porción de agua hasta que no existiera oxígeno presente (30 min). El valor máximo de OD para las condiciones de 30 °C y 2300 metros sobre el nivel del mar es de 5.74 mgO<sub>2</sub>/l.

#### 3.6.2 Determinación de compuestos azufrados ( $S^{2-}$ , $S_2O_3^{2-}$ , $SO_4^{2-}$ y $S^0$ )

##### 3.6.2.1 Determinación colorimétrica de sulfuros (Cord-Ruwisch, 1985)

El sulfuro precipita en un medio ácido (HCl) con sulfato de cobre formando una solución coloidal de sulfuro de cobre. La absorbancia de la suspensión de sulfuro de cobre se determina en espectrofotómetro y la concentración de sulfuros por lectura en la curva estándar. Para prevenir la pérdida de sulfuro se cuida que no haya gran aireación y se provee un pH mayor a 9 con adición de NaOH. La presencia de color o materia suspendida en grandes cantidades ocasiona interferencia. Tiene un límite máximo de 25 mM de  $S^{2-}$ .

Procedimiento.

1. En un tubo de ensayo se adicionan 4 ml. de reactivo de cobre (4.14 ml HCl concentrado más 1.25 g de  $CuSO_4 \cdot 9H_2O$ , en 1 litro de agua destilada)
2. Bajo agitación, se adiciona 0.1 ml de muestra.
3. La reacción se lleva a cabo en 5 seg y se lee de inmediato a  $\lambda=480$  nm (por duplicado)
4. Se realiza el mismo experimento con los blancos. El blanco consiste en 0.1 ml de muestra y 4 ml de solución de HCl (4.14 ml de HCl conc. en 1 litro de agua)

5. El promedio de los blancos se resta al promedio de los de reactivo de cobre y el valor obtenido se lleva a la curva estándar para conocer la concentración.
6. Se utiliza un blanco general de 4 ml del reactivo de HCl para todos los tubos.

### 3.6.2.2 Determinación colorimétrica de sulfatos (Sheen y col., 1955)

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 se mide por nefelometría o espectrofotometría y la concentración del ion sulfato se determina por comparación de la lectura con una curva estándar, que va de 0 a 40 mg/l. La lectura se realiza a  $\lambda = 420$  nm. La sensibilidad aproximada es de 1 mg/l de sulfatos.

Es conveniente incorporar un cronómetro para asegurar que el tiempo de agitación para cada muestra en cada paso sea el mismo. Por otro lado, también es necesario que los imanes utilizados en cada muestra sean del mismo tamaño y que la velocidad de agitación sea la misma.

#### Reactivos:

- 1) Mezcla de reacción: disolver 75 g de NaCl en 300 ml de agua destilada, agregar 30 ml de HCl concentrado, 100 ml de alcohol isopropílico al 95%. Posteriormente mezclar con 50 ml de glicerol.
- 2) Cloruro de bario.
- 3) Solución estándar de sulfato: Pesar 149.7 mg de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  anhidro y llevar a 1 litro con agua destilada. Hacer diluciones con incrementos de 5 mg/l en un rango de 0 a 40 mg/l para la curva patrón.

#### Procedimiento:

- 1) Colocar 50 ml de muestra diluida 1:50 en un vaso de pp de 100 ml.
- 2) Agregar 5 ml de mezcla de reacción.
- 3) Agitar 1.5 min (todas las muestras a velocidad constante).
- 4) Adicionar una cucharada de cristales de cloruro de bario y dejar agitando a velocidad constante 1 minuto exacto.

- 5) Leer absorbancia a 420 nm.
- 6) El blanco se prepara con agua destilada y se sigue el mismo procedimiento.

### **3.6.2.3 Determinación colorimétrica del azufre elemental (Bartlett y Skoog, 1954).**

El método permite una rápida y precisa determinación de pequeñas cantidades de azufre elemental en hidrocarburos. En una solución de acetona, el azufre elemental reacciona rápida y cuantitativamente con cianuro para dar el complejo tioacianato; el cual, se puede determinar colorimétricamente por la adición de acetona con cloruro férrico. El método es sensible para concentraciones de 2 ppm de azufre elemental. Los peróxidos, sulfuros, bisulfuros y mercaptános no interfieren cuando están presentes en grandes cantidades. La presencia de agua durante la prueba podría disminuir la coloración, la exposición a la luz solar durante tres horas provoca un decaimiento en la absorbancia del 20%, la presencia de algunos compuestos orgánicos de azufre así como sulfuros podrían interferir en el análisis. En general la presencia de compuestos orgánicos presentes en las fracciones del petróleo no interfieren en la determinación. El método alcanza una precisión del 98 al 99%. La absorbancia se lee a  $\lambda = 465$  nm. El límite de detección es de 50 mg/l máximo.

Reactivos:

- 1) Solvente de acetona. Diluir 50 ml de acetona en 950 ml de agua destilada.
- 2) Solución de cianuro de sodio. Disolver 0.1 g de NaCN en 100 ml de solvente de acetona.
- 3) Solución de cloruro férrico. Disolver 0.4 g de  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  en 100 ml de solvente de acetona, dejar reposar 24 hrs

Procedimiento:

- 1) En un matraz volumétrico de 25 ml colocar una dilución de 1 ml de muestra y 4 ml de éter de petróleo.

- 2) Se adicionan 15 ml de solución de cianuro de sodio y se deja reposar por dos minutos.
- 3) Se afora con solvente de acetona
- 4) Se toma una alícuota de 5 ml y se mezcla con 5 ml de solución de cloruro férrico. Se deja reposar 10 min.
- 5) Se determina la absorbancia a 465 nm
- 6) El blanco es una mezcla de solvente de acetona y cloruro férrico, también se deja reposar 10 min.

#### **3.6.2.4 Determinación de sulfato y tiosulfato por cromatografía de líquidos (HPLC)**

Se utilizó un equipo marca Varian modelo 1100, la columna utilizada (Ionospher-A) de intercambio iónico tuvo unas dimensiones de 250 mm de longitud por 4 mm de diámetro interno. Se utilizó ftalato de potasio (40 mM) como fase móvil a un flujo de 1.5 ml/min y una presión de 140 bars.

#### **3.6.3 Determinación colorimétrica de biomasa (Lowry, 1951).**

Este método utiliza el reactivo de Folin fenol para la determinación de proteína. El uso del reactivo es debido a su sensibilidad y facilidad del procedimiento. Esta es una forma indirecta de determinar la biomasa, utilizando una curva patrón de albúmina bovina de 0 a 250 mg/l. La lectura se realiza a  $\lambda = 540$  nm.

Los reactivos utilizados son

- A) Sulfato de cobre pentahidratado al 1% en agua.
- B) Tartrato doble de sodio y potasio al 2% en agua.
- C) Carbonato de sodio al 2% en hidróxido de sodio 1N.
- D) Preparar cuando se va a utilizar 1A + 1B.
- E) Preparar cuando se va a utilizar 1D + 50C.

Reactivo de Folin.- preparar al momento de utilizar en relación 1:1 con agua. para tratar un número determinado de muestras es necesario seguir la siguiente guía:

N° MUESTRAS	VOL E (ml)	VOL A (ml)	VOL B (ml)	VOL C (ml)	REACTIVO FOLÍN (ml)	FOLÍN (ml)	AGUA (ml)
5	35	0.345	0.345	34.31	3.5	1.75	1.75

Procedimiento:

1. Tomar 0.5 ml de muestra y adicionarle 0.5 ml de NaOH 2N. agitar en vortex e hidrolizar en agua a ebullición durante 5 minutos.
2. Tomar 1 ml de agua destilada para blanco y seguir con el proceso.
3. Preparar el reactivo E.
4. Agregar 5 ml del reactivo E y agitar en vortex.
5. Dejar reposar 10 min. cada tubo.
6. Preparar el reactivo de Folin fenol.
7. Agregar 0.5 ml de reactivo de Folin fenol y agitar en vortex.
8. Dejar reposar 30 min.
9. Leer a 590 nm.

Para las anteriores determinaciones (sulfato, proteína, azufre elemental y sulfuro) se utilizó un espectrofotómetro marca HACH modelo DR/2000 de lectura directa.

### 3.6.4 Determinación de nitrógeno amoniacal.

Para la determinación de nitrógeno amoniacal se utilizó un electrodo marca ORION modelo 95-12. El método consiste primero, en asegurar un pH superior a 11.5 para que el nitrógeno se encuentre disuelto en forma de amoniaco. Este valor se consigue agregando una solución que contiene 5M NaOH, 0.5M EDTA, 10% de metanol y azul de metileno como indicador. Se agregan dos mililitros de la

solución alcalina a 100 ml de la muestra, si el pH es correcto la solución se torna azul y el color persiste, si el color no persiste se agrega un mililitro más.

Una vez que la muestra posee el pH necesario, se agita a velocidad constante. El frasco se tapa con un tapón de caucho que tenga un agujero para introducir el electrodo y que éste quede sujeto. En el frasco se forma un equilibrio en fase gaseosa entre vapor de agua y amoníaco. La lectura se da en milivoltaje, es lineal hasta 1000 ppm y se realiza en un equipo ORION modelo 720A.

### **3.6.5 Determinación de fenol y p-cresol por cromatografía de gases**

La determinación se realizó en un equipo de cromatografía de gases marca Hewlett Packard serie 6890, con inyector de 2  $\mu$ l de muestra, con una relación split 50:1, columna capilar Alltech AT1000 de 50 m X 25  $\mu$ m X 0.40  $\mu$ m, el flujo fue de 1 ml por minuto. El horno posee una temperatura de 180-200 °C con una velocidad de incremento de 2 °C/min, el detector es FID y el gas acarreador usado fue helio. El tiempo de la prueba fue de 16 minutos.

### **3.7 Estudio del efecto de los compuestos aromáticos, fenol y p-cresol, y la concentración de sulfuro sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos por pruebas de respirometría**

Se realizaron pruebas por la técnica de respirometría en un equipo medidor de oxígeno marca YSI modelo 52CE, para conocer el efecto que diferentes concentraciones de sulfuro provocaron sobre el consumo de oxígeno. Por otro lado, a una concentración constante de sulfuro (1 mM) se realizaron pruebas con fenol y p-cresol para conocer el efecto de estos aromáticos sobre la velocidad de consumo de oxígeno.

Las concentraciones de sulfuro probadas fueron (mM): 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 3.5, 4.0, 5.0, 6.0 y 8.0.

Las concentraciones de fenol evaluadas fueron (g/l): 0.1, 0.2, 1.0, 1.5, 2.0 y 3.0.

Las concentraciones de p-cresol que se evaluaron fueron (g/l): 0.2, 0.5, 1.0, 1.5 y 1.8.

Las pruebas se realizaron en frascos de 60 ml conteniendo medio de cultivo con un contenido de proteína de 35 mg/l, la temperatura de la prueba fue de 30 °C, los volúmenes de sulfuro, fenol y p-cresol adicionados dependieron de las concentraciones requeridas.

Se realizó además una prueba sin sulfuro para determinar el consumo de oxígeno en fase endógena (sin fuente de energía) y tres evaluaciones de la oxidación química (sin microorganismos), las concentraciones de sulfuro para las oxidaciones químicas fueron (mM) 0.5, 1.5 y 3.5.

### **3.8 Estudio del efecto de los compuestos aromáticos sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos, en cinética en matraz.**

Para conocer más acerca del comportamiento de microorganismos y proceso en presencia de compuestos aromáticos, se realizó una cinética en matraz utilizando matraces de 250 ml a los cuales se adicionó un volumen de 100 ml. de medio con una concentración de tiosulfato de 20 g/l, la agitación se mantuvo en 100 rpm, el pH inicial fue de 6.0 y la prueba se realizó a 30 °C.

Las concentraciones de fenol y p-cresol evaluadas fueron (mg/l): 0.0 (control), 50, 100 (sin tiosulfato, control), 100 y 200.

### **3.9 Estudio del efecto de fenol sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos en cinética realizada en reactor en lote con control de pH.**

Para conocer el comportamiento del sistema en reactor se montó un sistema en lote con un volumen de 500 ml en donde se controló el pH en un valor de 7.0, la operación fue a temperatura ambiente y con agitación magnética, la adición de oxígeno se manejó sin control. El medio de cultivo alimentado contuvo una

concentración de 20 g/l de tiosulfato, la concentración de fenol evaluada fue de 100 mg/l

### **3.10 Estudio del efecto del fenol sobre el proceso de sulfoxidación en un reactor de recirculación con operación continua.**

Debido a la presencia de aromáticos en las aguas amargas, a que en el actual trabajo se pretendió oxidar sulfuro en presencia de aromáticos y a las condiciones en las que se condujo el proceso de oxidación biológica de sulfuro en un reactor de recirculación, se buscó evaluar en un sistema similar los efectos de la presencia de fenol, para ello se montó un sistema que se describe en la sección 3.3.13 (figura 3.3), éste se operó a diferentes cargas de fenol (25, 50, 100 y 200 mg/l/d). La operación se inició con un tiempo de retención de un día y una tasa de dilución de  $1d^{-1}$ , la carga de sulfuro fue de 2.0 g/l/d, se esperó las condiciones de estado estacionario y se inició con la primera carga de sulfuro. La temperatura de operación se controló en 30 °C.

### **3.11 Sistemas de reacción**

Los reactores biológicos que se utilizan en diversos procesos industriales se diseñan y adaptan de acuerdo a las necesidades particulares que el proceso exija y con frecuencia se emplean equipos diferentes para una misma reacción, el uso de este tipo de reactores tiene una aplicación muy variada tanto en procesos productivos como en el tratamiento de residuos.

Las diferencias entre los reactores utilizados en ingeniería química y en ingeniería bioquímica o biotecnología no se encuentran en los principios de operación o en los procesos unitarios, sino en la naturaleza de los sistemas vivos (Perry, 1992) El uso de microorganismos está restringido a las condiciones en que pueden funcionar los sistemas biológicos; por consiguiente, las principales condiciones de operación de estos sistemas son: el pH, la temperatura, el

potencial de óxido-reducción y el medio correcto para que una especie o cepa logre una predominancia. En los sistemas de cultivos mixtos, especialmente en los tratamientos biológicos de residuos, puede existir un cambio constante entre las poblaciones y sus medios que afecta el control y el comportamiento el carácter aerobio o anaerobio del sistema se define de acuerdo a condiciones particulares predeterminadas

### 3.11.1 Reactor discontinuo

El primer paso de la fase experimental consistió en desarrollar suficiente cantidad de microorganismos para inocular el reactor de recirculación. Para ello se utilizó un reactor completamente agitado como el mostrado en la figura 3.1.

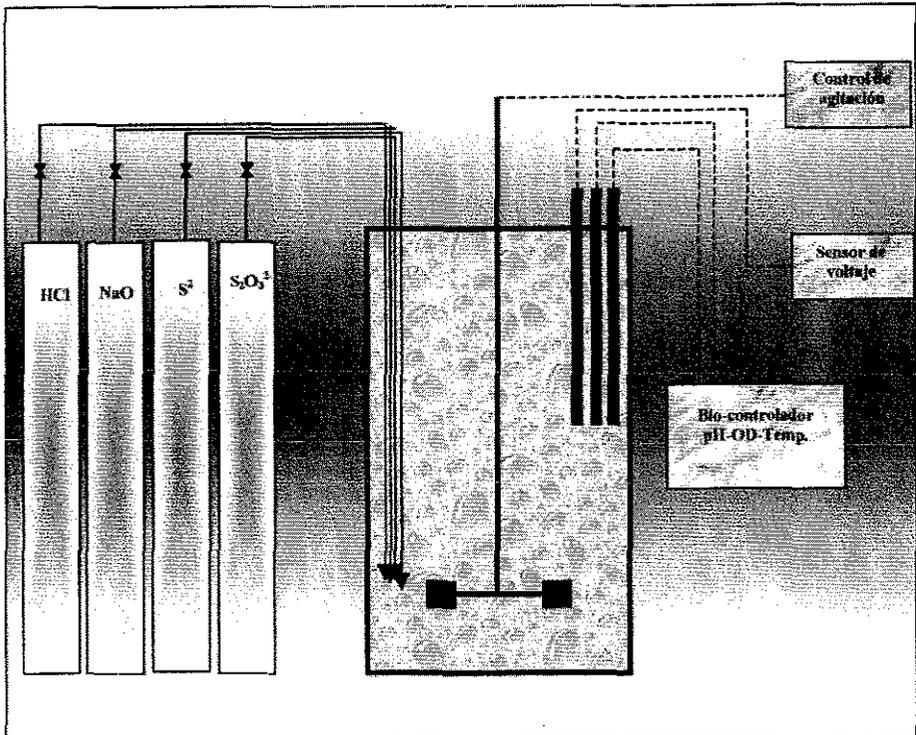


Figura 3.1. Reactor completamente agitado para desarrollo de biomasa.

La agitación se mantuvo a 370 rpm con un controlador de agitación marca Applikon ADI1032 con variación de agitación de 0 a 400 rpm. La alimentación de sulfuro, tiosulfato y medio de cultivo se realizó usando bombas de la marca Cole Parmer con cabezal modelo 7518-00. El control de pH (6.0), se realizó adicionando NaOH y HCl 2N con bombas ColeParmer modelo 7543-20 y cabezal Cole Parmer modelo 7518-00. La temperatura de operación se mantuvo en 30 °C utilizando una chaqueta de calentamiento. La lectura de los parámetros y el control se manejó con un biocontrolador marca Applikon ADI1030 en el cual se leyeron los parámetros OD, pH y temperatura. El potencial de oxido reducción (ORP) se midió con un sensor marca Orion modelo 720A.

### **3.11.2 Reactor de recirculación.**

Este sistema (figura 3.2) se diseño con la finalidad de oxidar sulfuro parcialmente en azufre elemental y obtener una máxima acumulación de éste. La etapa de aireación está separada de la de reacción con el objetivo controlar la concentración de oxígeno disuelto en la etapa de reacción, evitar turbulencias debido a la aireación, pérdidas de sulfuro y favorecer la sedimentación de azufre elemental (Janssen y col., 1997). La fase líquida se airea y posteriormente se recircula a la etapa de reacción. El reactor cuenta con un separador de burbujas en la parte alta para evitar la entrada de aire al sistema y un distribuidor del flujo de recirculación en el centro del reactor para reducir turbulencias y lograr una distribución homogénea. El volumen del reactor es de 9.75 litros y el del aireador es de 1.867 litros las dimensiones del reactor son: diámetro interno de 14 cm y longitud de 93 cm.

La temperatura se controló a 30°C con un baño de recirculación marca Neslab modelo EX410. La bomba de alimentación de S<sup>=</sup> fue marca Cole Parmer con cabezal Cole Parmer modelo 72201. La bomba de alimentación del medio fue marca Cole Parmer con cabezal modelo 77201-60. La bomba utilizada para la recirculación fue marca Cole Parmer digital modelo 7523-20 con cabezal modelo

7518-00. El pH fue controlado en un valor de 7.0 mediante la adición de HCl 6N con una bomba marca Cole Parmer modelo 7543-20 continua de 20 rpm con cabezal modelo 7014-20. Se utilizó un biocontrolador marca B&C electronics para el control de pH. El aire, antes de entrar al aireador pasó por un desecante purificador de aire con policarbonato y sulfato de aluminio anhidro.

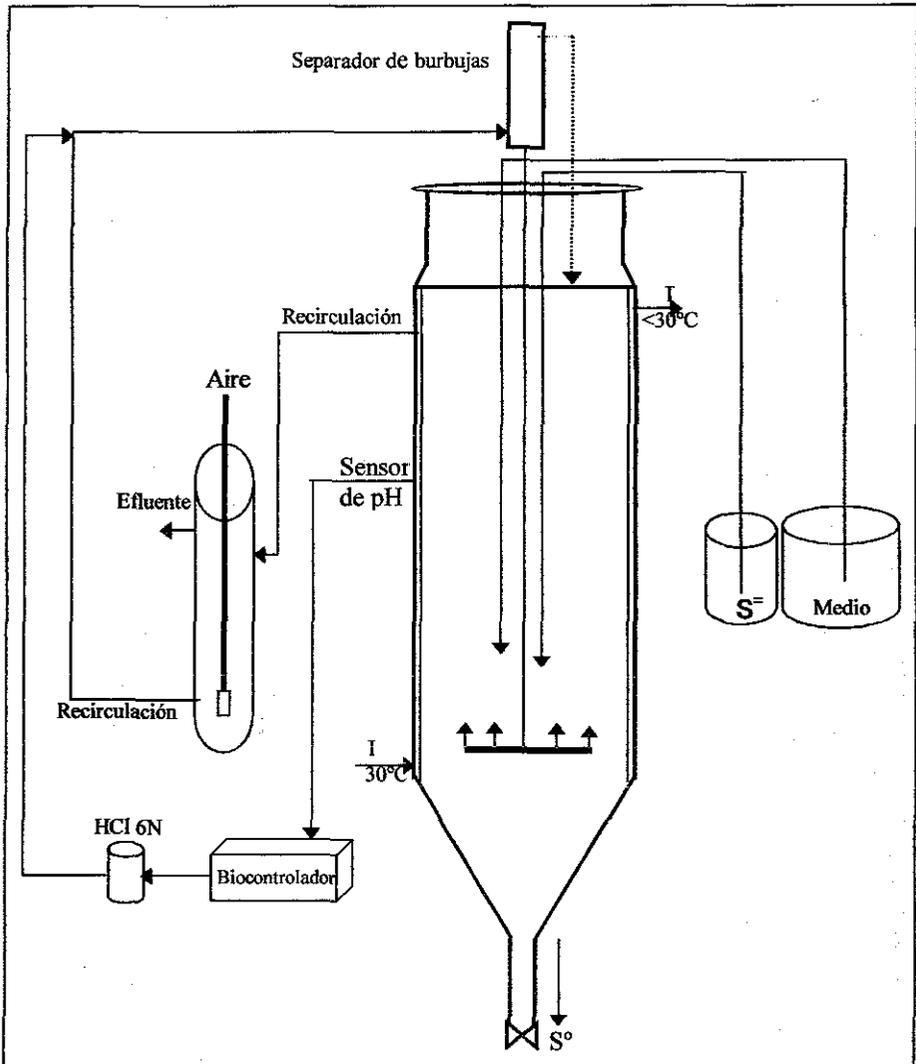


Fig. 3.2 Reactor de recirculación utilizado en el estudio del proceso de oxidación biológica de sulfuro.

En la parte baja del reactor se colocó una válvula de compuerta para recuperar en azufre elemental sedimentado. Todo el sistema se manejó en un soporte metálico y en campana de extracción especial para prevenir la fuga de sulfuro.

### 3.11.3 Reactor de recirculación para el efecto del estudio de fenol sobre el proceso de sulfoxidación.

Para esta etapa se utilizó un reactor agitado marca Applikon de 2.5 l de volumen, se adaptó a un recipiente de vidrio de 0.5 litros de volumen (figura 3.3) en cual se utilizó como aireador, al igual que el reactor anterior las fases de reacción y aireación se mantuvieron separadas. El sistema se operó en continuo.

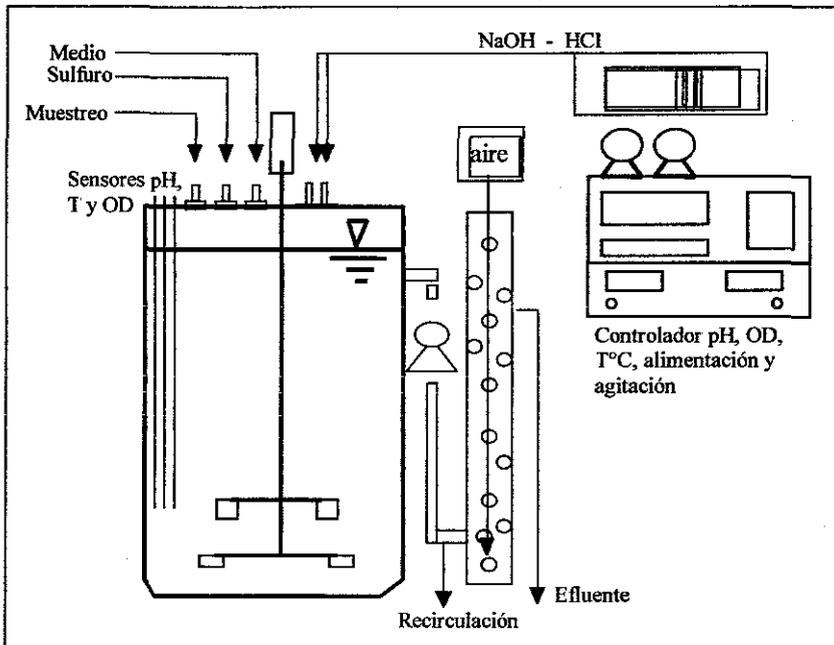


Fig. 3.3 Reactor de recirculación utilizado en la evaluación de aromáticos sobre el proceso de sulfoxidación

La agitación se mantuvo en 300 rpm con un controlador de agitación marca Applikon ADI1032. La alimentación de sulfuro y medio de cultivo se realizó utilizando bombas de la marca Cole Parmer con cabezal modelo 7518-00. El control de pH (7.0) se realizó adicionando HCl 6N. La temperatura de operación se mantuvo en 30 °C, el OD se mantuvo a saturación en el aireador y su concentración en la etapa de reacción se controló mediante el flujo de recirculación buscando una relación 1:1 de oxígeno a sulfuro. La lectura de los parámetros de control se realizó con un controlador marca Applikon ADI1030.

## 4. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

### 4.1 Desarrollo de microorganismos en un reactor discontinuo del tipo tanque agitado.

Con el fin de conocer el comportamiento de un sistema que oxida sulfuro y adaptar la biomasa suficientemente a la oxidación de sulfuro, se desarrolló un sistema de reacción del tipo tanque agitado, se trabajaron diferentes fases de operación en el reactor (tabla 4.1). El sistema arrancó con una concentración de 5g/l de tiosulfato y 350 mg/l de  $S^{2-}$ . La biomasa generada se centrifugó y se regresó al sistema. Las condiciones de operación del reactor fueron las siguientes: pH de 6.0, temperatura de 30 °C, el oxígeno disuelto se mantuvo en valores cercanos al 2% de saturación. El sistema se arrancó en lote y posteriormente se inició una operación discontinua con recambio de medio, adición de tiosulfato y sulfuro. Con el volumen de reemplazo establecido se controló el tiempo de retención

**Tabla 4.1 Fases de operación del reactor tipo tanque agitado.**

Fase	Operación	Tiempo de operación (d)	Tiempo de retención (d)	Carga de sustrato	Volumen de reemplazo (ml/d)
I	Arranque	1.5	-	$S_2O_3^{2-} = 5 \text{ g/l}$ $S^{2-} = 350 \text{ mg/l}$	-
II	Discontinua	1.5	11	1.25 g/d	225
II	Discontinua	10	5	1.25 g/d	500
IV	Discontinua	9	3	2 g/d	833
V	Discontinua	7.5	3	1.4 g/d	833
VI	Continua	33	3	1.84 y 0.2 g/d	833

Considerando que el inóculo estaba adaptado a oxidar tiosulfato se decidió iniciar los experimentos con una mezcla tiosulfato-sulfuro y disminuir gradualmente la carga de tiosulfato hasta cero, la tabla 4.1 muestra los valores de carga total de sustrato (no se cuenta con la información complementaria referente a las concentraciones de sulfuro y tiosulfato durante esta fase). Alcántara, (2000) menciona que la mayoría de los microorganismos sulfoxidantes pueden utilizar como fuente de energía al tiosulfato mientras que una menor diversidad

microbiana es capaz de utilizar compuestos como  $CS_2$  ó  $H_2S$ , debido principalmente a las características de toxicidad de los dos últimos. Los resultados arrojados por el sistema se presentan en la tabla 4.2 para las diferentes etapas de operación.

**Tabla 4.2 Resultados obtenidos durante el cultivo de microorganismos sulfoxidantes.**

Operación	Carga sustrato (g/d)	Carga de sulfuro (mg/d)	Remoción de Sulfuro (mg/d)	Eficiencia de remoción (%)
Discontinuo	1.25	250	246.2	98.4
	1.25	250	245.5	98
	2	410	402	98
	1.4	410	389	95
Continuo	1.84	50	47.8	95
	0.2	200	198.4	99

Durante las diferentes fases de operación la densidad óptica se comportó de forma similar al comportamiento de la proteína, incrementándose simultáneamente. Los valores de la densidad óptica (540 nm) variaron desde 0.7 (valor inicial) hasta 2.7 como máximo. Por su parte la proteína inició con un valor de 60 mg/l y obtuvo un máximo de 1900 mg/l debido principalmente a que como se mencionó, la biomasa generada se centrifugó y regresó al sistema. Hasan y col., (1994) realizó cultivo en lote de biomasa adaptada a la oxidación de sulfuro y observó que la densidad óptica se incrementó mientras se incrementó la cantidad de biomasa y disminuyó la concentración de sustrato. Debido a que los productos de la oxidación de sulfuro por microorganismos del género *Thiobacillus* son sulfato y azufre elemental, la densidad óptica se puede ver incrementada por dos factores diferentes en este sistema: a) Presencia de azufre elemental suspendido en el reactor (el cual se observó físicamente) y b) Aumento en la población de microorganismos (que en cantidades elevadas conservan un color rosa pálido, Alcántara, 2000).

La remoción de sustrato se observa en la figura 4.1 donde se muestra que el sistema tuvo una eficiencia del 95 al 99% durante su operación en cuanto a la eliminación de sulfuro.

Las reacciones involucradas en el proceso de sulfoxidación (Buisman, 1988) y de oxidación de tiosulfato (Velasco, 2001) muestran que los productos generados son sulfato y azufre elemental, en estas reacciones se producen iones  $\text{OH}^-$  cuando el producto final es el azufre elemental, mientras que si el producto final es sulfato se producen iones  $\text{H}^+$ . El consumo de HCl y de NaOH (ambos 2N) se mantuvo en condiciones de igualdad durante la operación del reactor sin definir un consumo específico. El sistema produjo tanto azufre elemental como sulfato, de ahí que se consumiera ácido y base. El azufre elemental observó un incremento desde cero hasta 5.5 g/l mientras que el sulfato inició con un valor de 1 g/l y se incrementó hasta valores de 6.3 g/l. Debido a que el material retirado se centrifugó y el pellet resultante se resembró en el reactor, se provocó una acumulación de material (azufre elemental + biomasa + sales inorgánicas no disueltas) en el reactor.

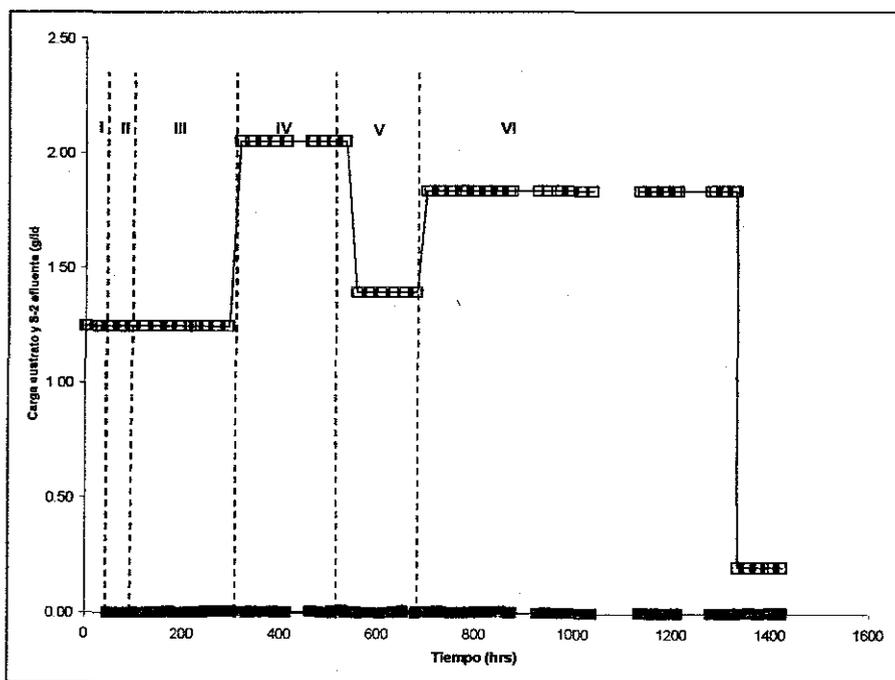


Fig 4 1 Remoción de sulfuro en el sistema. □ carga de alimentación (g/l) y ■ carga de sulfuro en efluente (g/l)

En general el sistema se comportó con inestabilidad, en cuanto a la aireación ya que el nivel de oxígeno varió frecuentemente por problemas en la alimentación, y producción de azufre y sulfato ya que dependiendo de la cantidad de oxígeno se produjo uno u otro, en todos los casos los análisis indicaron que la oxidación de sulfuro se realizó en alto porcentaje (superior al 95%), durante las fases de operación discontinua el sistema se comportó con estabilidad en cuanto al crecimiento de microorganismos y la densidad óptica.

#### **4.2 Oxidación de sulfuros en un reactor de recirculación**

Posterior al desarrollo de microorganismos se procedió a inocular un reactor de recirculación con el fin de oxidar biológicamente sulfuro, aumentar la tasa de dilución disminuyendo a la vez el tiempo de retención hidráulico y aumentando la carga de sulfuro, lo anterior con la posibilidad de que se favoreciera la producción de azufre elemental en el reactor. El reactor de recirculación (figura 4.2) consta básicamente de una etapa de reacción (en la cual se oxida sulfuro y se busca favorecer la oxidación parcial en azufre elemental) y una de aireación (a saturación de OD). El sistema fue diseñado con un aireador especialmente separado para favorecer el control sobre la concentración de OD en el área de reacción, evitar turbulencias en el sistema, poseer una área de sedimentación del azufre elemental formado y evitar la pérdida de sulfuro debido al arrastre por el aire y la agitación. La temperatura se controló en 30°C y el pH en 7.

La operación se inició con la inoculación de 15 l de inóculo con densidad óptica de uno (540 nm) y 8.25 l de medio (descrito en el capítulo 2). La proteína inicial en el reactor tuvo un valor de 70 mg/l. Se intentó manejar una relación estequiométrica de oxígeno a sulfuro de tal forma que se tuviera un mol de oxígeno por mol de sulfuro, para ello el aireador se saturó de oxígeno y se calculó el flujo de recirculación requerido. La concentración de sulfuro en la alimentación

fue inicialmente de 2.2 g/l y se incrementó posteriormente a un valor de 4 g/l, a esta concentración última la solución tuvo un pH de 11.5.

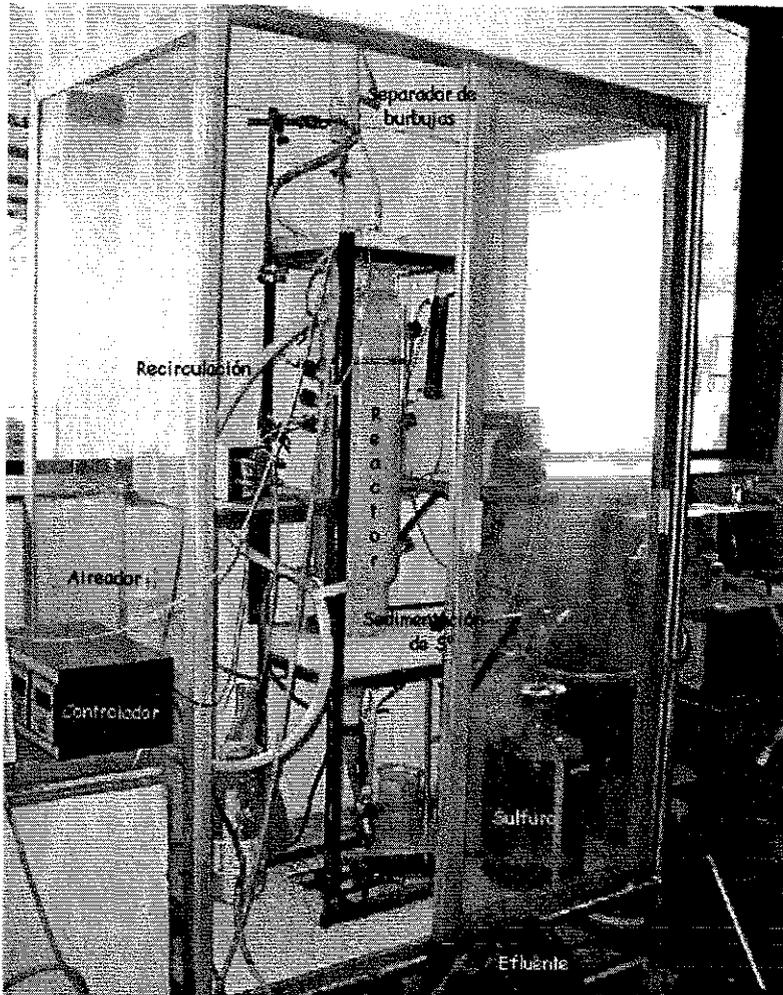


Fig 4.2 Reactor de recirculación con sistema de aireación separada.

#### 4.2.1 Evaluación del efecto de la tasa de dilución y la carga de alimentación de sulfuro

De acuerdo con Pirt (1975), se define a la tasa de dilución como la velocidad de flujo por unidad de volumen. En otras palabras, es el inverso del tiempo de

retención. Los resultados para las primeras fases de operación se muestran en la tabla 4.3 en la cual se observa el incremento de la tasa de dilución con respecto a la producción de sulfatos, producción de azufre elemental y crecimiento de microorganismos.

Como se observa en la tabla 4.3, la oxidación de sulfuro fue del 99% para las cargas de sulfuro evaluadas. En el trabajo reportado por Janssen (1996) se señala que el consorcio fue capaz de oxidar totalmente en cargas de 14 g/lid debido a que la biomasa se retenía en el reactor depositada sobre el azufre elemental, mientras que para un sistema de células suspendidas libres, el consorcio oxidó hasta 6 g/lid. Aunque, para este caso, en esta fase de operación del reactor no se llegó a una carga límite de alimentación, el reactor trabajó en ambas condiciones, con biomasa libre en el área de reacción y adherida en el área de sedimentación del azufre elemental.

**Tabla 4.3 Evaluación de la tasa de dilución en el reactor de recirculación.**

Dilución (d <sup>-1</sup> )	Carga S <sup>2-</sup> alim. (g/lid)	Carga de SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (g/lid)	Carga de S <sup>0</sup> (g/lid)	Carga S <sup>2-</sup> efluente (g/lid)	eficiencia de oxidación (%)
0.2	0.6	0.36	0.48	0.0036	99.4
0.5	1	0.39	0.87	0.0022	99.7
1	2	0.5	1.83	0.0014	99.9

Por otro lado, la producción de azufre elemental se incrementó mientras se incrementó la carga de sulfuro (figura 4.3), debido posiblemente a una deficiencia de oxígeno en el sistema. La máxima producción de azufre elemental fue de 91.5% para una dilución de 1 d<sup>-1</sup>. Por el contrario, la producción de sulfato disminuyó en forma inversamente proporcional al incremento en la carga de azufre elemental. La relación O<sub>2</sub>/S<sup>2-</sup> determinada tuvo un valor aproximado de 0.8 lo que de acuerdo con Janssen (1996) favoreció la producción de azufre elemental.

El incremento en la producción de azufre elemental posiblemente se debió a la insaturación de oxígeno disuelto en el aireador y por lo tanto una disminución en

la relación oxígeno/sulfuro que en valores inferiores a uno favorecen la oxidación parcial del sulfuro en azufre elemental (Buisman, 1989). Este comportamiento (mostrado por el reactor) corresponde también al observado por Janssen, (1996) donde a mayores cargas de alimentación de sulfuro, mayor producción de azufre elemental, ambos factores pudieron contribuir al incremento en la formación de azufre elemental.

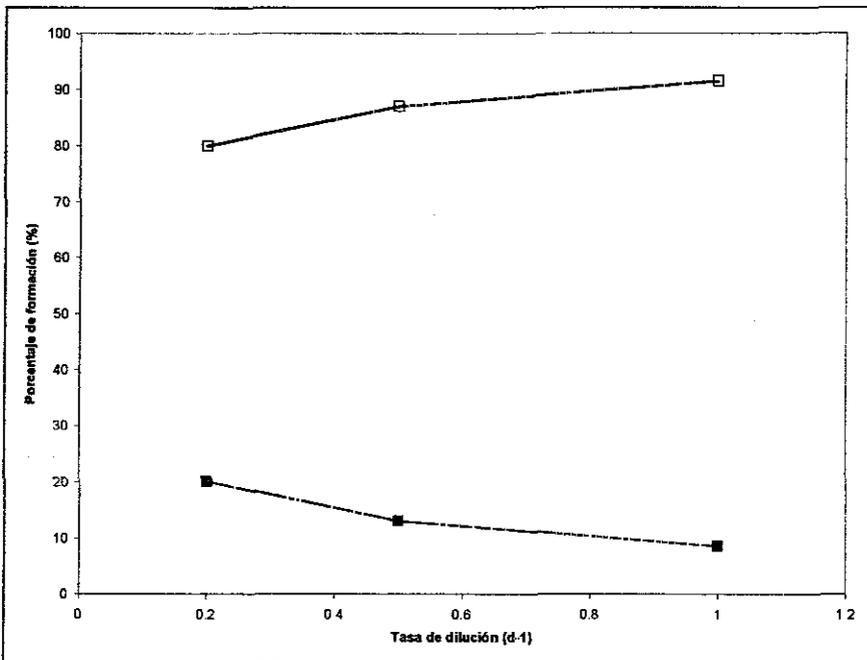


Figura 4.3 Porcentaje de producción de azufre elemental y sulfato en el reactor de recirculación. ■ SO<sub>4</sub> y □ S<sup>0</sup>

Por su parte, la concentración de proteína se incrementó cuando se elevó la carga de sulfuro (tabla 4.4), no se alcanzó un valor máximo de crecimiento en este sistema. Alcántara (2000) realizó pruebas en lote para determinar el crecimiento de proteína a diferentes concentraciones de tiosulfato y encontró que a concentraciones de 30g/l de tiosulfato el valor máximo de proteína fue de 700mg/l.

Por su parte Velasco (2001) utilizando un reactor similar al de este trabajo y trabajando con tiosulfato, logró valores máximos de proteína de 60mg/l.

Como se puede observar, la biomasa tuvo mayor crecimiento mientras la tasa de dilución aumentó, el aumento en la dilución fue acompañado de otro en la carga de sulfuro lo que significó una cantidad mayor de sulfuro por unidad de tiempo para el aprovechamiento por parte de los microorganismos. A su vez, la producción de azufre elemental favoreció la acumulación de biomasa en el reactor ya que parte de los microorganismos se adhieren a las partículas de azufre elemental (Janssen, 1996) y esto influyó en las determinaciones. La proteína podría constituir del 50 al 65% de la biomasa (Quintero, 1993). El rendimiento (Y) máximo en esta parte experimental fue de 0.125 gramos de células formadas por gramo de sustrato consumido.

**Tabla 4.4 Comportamiento de la proteína.**

Tasa de dilución ( $d^{-1}$ )	Carga $S^{\circ}$ alimentación (g/d)	Proteína (mg/l)
0.2	0.6	32.45
0.5	1.0	55
1.0	2.0	242.3

Partiendo de un mol de  $HS^{-}$ , la producción de  $S^{\circ}$  genera una  $\Delta G^{\circ}$  de -129.5 kJ/mol  $HS^{-}$ , en cambio la producción de sulfato genera -772.43 kJ/mol  $HS^{-}$ , como se observa la generación de sulfato rinde una mayor cantidad de energía para los microorganismos. Sin embargo; como se mencionó, la producción de azufre elemental se vio favorecida, en estas condiciones es lógico pensar que a mayor carga de sulfuro mayor generación de azufre elemental lo cual se tradujo en más altos valores globales de energía (por el número total de moles de sulfuro oxidadas) y, por lo tanto, la biomasa también se incrementó debido a este factor. Durante la operación del reactor no se determinaron las condiciones críticas de dilución por lo que en ningún momento se tuvo un lavado de biomasa lo cual también favoreció que se observara el incremento de biomasa.

#### **4.3 Efecto de nitrógeno amoniacal sobre el proceso de sulfoxidación.**

La concentración elevada de nitrógeno amoniacal es otra de las características de las aguas amargas, algunos reportes de análisis de aguas amargas (Informe Técnico, proyecto IMP-D21, 2001) de PEMEX muestran valores de 6,700 mg/l. Por ello se estudió el efecto que pueda ser ocasionado por la presencia de nitrógeno amoniacal en el proceso de sulfoxidación. Se probaron diferentes cargas y se determinó el efecto sobre el desarrollo de la biomasa y la oxidación de sulfuro, posiblemente un cambio fisiológico y de población de microorganismos sulfoxidantes a nitrificantes (Tabla 4.6). En el reactor se estableció un exceso de oxígeno (relación oxígeno/sulfuro mayor de 1). La tasa de dilución fue de  $0.5d^{-1}$  y carga de sulfuro de 1 g/l.

La tabla 4.5 muestra los resultados analíticos obtenidos para las cargas de alimentación de nitrógeno amoniacal, se observa una columna que indica que existió una cantidad del nitrógeno total la cual no se determinó analíticamente como amoniacal. Como se ve, al aumentar la carga de amonio, la concentración de proteína se incrementó pasando de un valor de 55 mg/l hasta un valor de 159 mg/l por otro lado el amonio en baja carga (84 mg/l) no fue detectado a la salida del reactor.

**Tabla 4.5 Nitrógeno amoniacal determinado y no determinado analíticamente como tal en el balance.**

Carga inicial de $N-NH_3^+$ (mg/l)	Carga Determinada (mg/l)	Carga no determinada (mg/l)
84	0	84
556	279	277
1750	1212.5	537.5

Durante el periodo de evaluación de las diferentes cargas de amonio no se observó un cambio en el comportamiento sulfoxidante de los microorganismos. De esta manera se puede decir que no existió efecto alguno sobre el proceso de oxidación biológica de sulfuro ya que al inicio del experimento no se detectó sulfuro a la salida del reactor y durante las cargas de amonio probadas tampoco se observó presencia de sulfuro. Al evaluar la concentración de nitrato en el

sistema no se detectó concentración alguna lo que señala que la población microbiana no lleva a cabo el proceso de nitrificación.

Siempre que se aumentó la carga de nitrógeno amoniacal existió un incremento de la biomasa superior al anterior (tabla 4.6). Existen diferentes aspectos que pudieron influir en el balance de nitrógeno amoniacal:

1. El incremento en el valor de la proteína se observa cuando se incrementa el valor de la carga en la alimentación de nitrógeno amoniacal, lo que puede explicar que el nitrógeno contribuye al crecimiento celular.
2. Alcántara, (2000) realizó pruebas en lote para determinar el efecto de diferentes concentraciones de amonio sobre los microorganismos sulfoxidantes, mencionó que el transporte de amonio hacia el interior de la célula no está limitado, ya que en las diferentes concentraciones probadas (5-60 mM) en pruebas en lote, el amonio se agotó en un tiempo máximo de 36 horas (aunque no se observó incremento en la biomasa).

Lo anterior puede explicar el consumo continuo de nitrógeno amoniacal, el incremento en los valores de biomasa y los valores de las cargas no determinadas. Sin embargo, los experimentos hasta aquí realizados no permiten saber el efecto fisiológico del amonio sobre los microorganismos. Contrario a lo que menciona Lowry (1951) la presencia de amonio no mostró una reducción en la medición de los valores de la biomasa. El rendimiento máximo en esta fase de operación fue de 0.1 gramos de células formadas por gramo de sustrato consumido.

**Tabla 4.6 comportamiento de la proteína con el incremento en la carga de nitrógeno amoniacal**

Carga de nitrógeno amoniacal (mg/l/d)	Proteína (mg/l)
84	55
556	59
1750	197

#### 4.4 Parámetros cinéticos de la oxidación biológica de sulfuro mediante pruebas de respirometría

Con el objeto de conocer de que forma la concentración de sulfuro puede afectar el comportamiento del proceso de sulfoxidación se evaluaron diferentes concentraciones de éste mediante pruebas de respirometría. Se utilizó un equipo marca YSI modelo 52CE.

Las pruebas se realizaron en frascos de 60 ml conteniendo medio de cultivo saturado de oxígeno y a 30 °C, se inyectó el sulfuro y posteriormente la biomasa. Adicionalmente, se realizó una prueba para determinar el consumo de oxígeno en fase endógena y la oxidación química. Se midió el consumo de oxígeno con respecto al tiempo.

El consumo de oxígeno para las diferentes concentraciones de sulfuro se muestra en la figura 4.4 en donde se observa que la concentración de sulfuro igual a 0.75 mM es en la cual el consumo de oxígeno tiene un valor más alto (42.2 mgO<sub>2</sub>/g<sub>prot</sub>min) por lo que se puede afirmar que en estas condiciones se tiene la mayor velocidad de oxidación de sulfuro a una velocidad máxima específica de oxidación de 22.4 mgHS<sup>-</sup>/g<sub>prot</sub>\*min. El valor de K<sub>S</sub> calculado a partir del modelo de Monod ( Han y Levenspiel, 1987) el cual asume que existe una concentración crítica de un inhibidor en la cual ya no puede haber crecimiento de microorganismos, fue de 0.3 Mm de sulfuro. Éste es un valor similar al reportado por Alcántara (2000). El mismo autor, determinó que a concentraciones de hasta aproximadamente 5 mM de sulfuro, este presenta baja inhibición de la actividad sulfoxidante del consorcio mientras que Plas y col. (1993) menciona que en concentraciones superiores a 2 mM de sulfuro se observa una inhibición completa de la actividad microbiana. Como se ve en la gráfica, la inhibición se da a partir de

concentraciones 1mM de sulfuro. El comportamiento del consorcio en cuanto a la velocidad de oxidación de sulfuro mostró mejores resultados comparados con los obtenidos por Alcántara, quien obtuvo una velocidad de 13.8 mgHS/g<sub>prot</sub>\*min.

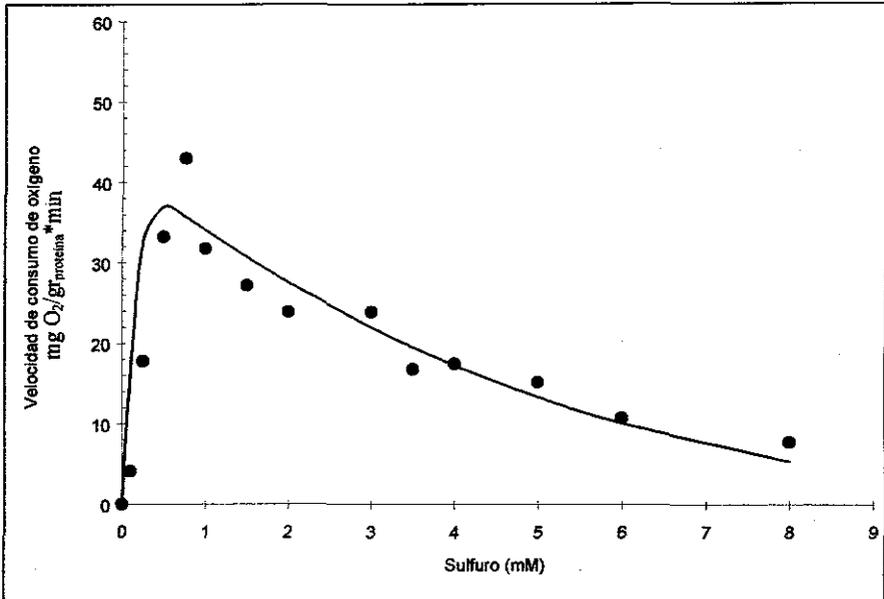


Fig. 4.4 Velocidad específica de consumo de oxígeno (mg O<sub>2</sub>/g<sub>prot</sub>\*min) a diferentes concentraciones de sulfuro

#### 4.5 Efecto de la concentración de fenol y p-cresol sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos, mediante pruebas de respirometría

Para conocer el efecto de los compuestos aromáticos sobre el proceso de oxidación biológica de sulfuros, se realizaron pruebas de respirometría en presencia de compuestos aromáticos, se adicionó al medio el sulfuro (1 mM), después el aromático en turno (a la concentración indicada) y posteriormente la biomasa.

Los compuestos orgánicos son generalmente tóxicos para los microorganismos (Rikizo y col., 1994). Como un resultado del carácter lipofílico de estos compuestos, las interacciones con las partes hidrofóbicas de la célula

juegan un papel importante en el mecanismo de acción de toxicidad. La transferencia de compuestos lipofílicos e hidrofóbicos procede vía disolución en fase acuosa y posteriormente la asimilación en forma activa o pasiva por parte de la célula, por lo que para metabolizar estos compuestos es necesario que primero entren a la célula. Después de la disolución de un compuesto puede sufrir alguno de los siguientes procesos (Sikkema y col., 1995): a) transformación o acumulación (bioconcentración) en los sistemas biológicos, b) adsorción hacia las superficies y c) permanencia en la solución. Como resultado de la acumulación de compuestos lipofílicos en lípidos de membranas, se han observado pérdidas en la integridad de éstas (Hugo, 1978; Seeman y Roth, 1972; Sikkema y col., 1992 y Uribe y col., 1985). También se han observado cambios en la actividad enzimática (Osborne y col., 1990) y se ha que la proteína es el primer sitio de acción de los compuestos lipofílicos (Franks y Lieb, 1978 y 1987).

El mayor cambio se da en la dimensión de la membrana ya que la acumulación causa un ensanchamiento entre la membrana de salida y la membrana citoplásmica (Cornell y Schüürmann, 1983) entrando en contacto primero con la película interna. Esta acumulación puede causar disturbios en las interacciones entre los fosfolípidos, dirigiendo a la fluidez de la membrana y eventualmente resultando en la hinchazón de la bicapa (Sikkema y col., 1995). La acumulación de moléculas de hidrocarburos resulta en un ensanchamiento, separación y fluidicidad de las películas de la membrana (Sikkema y col., 1994). Los efectos principalmente se observan en la membrana citoplásmica (primer sitio destruido por el solvente) y la provocación de una separación de esta con la membrana de salida (expandiendo el periplasma). Otro de los efectos ultraestructurales es la presencia de cuerpos esféricos que inflaman a la célula (aparentemente de membrana citoplásmica) (Riziko, 1994). Los cambios en la integridad de la membrana resultan en un cambio en el funcionamiento de las mismas. Las funciones principales que la membrana realiza son: a) función barrera y energía de transducción, en las cuales la membrana forma gradientes de iones que pueden usarse para dirigir procesos endorgénicos y, b) formación de

una matriz para proteínas. A altas concentraciones de hidrocarburos se ha observado que el citocromo C se inactiva (Sikkema y col., 1994).

Diferentes tipos de microorganismos son capaces de tolerar altas concentraciones de hidrocarburos en el ambiente donde éstas existen. El mecanismo de esta tolerancia no es muy conocido y se pueden mencionar diferentes posibilidades.

a) El plasma de membrana de una célula consiste de una matriz bicapa de fosfolípidos en la cual se encuentran las proteínas (enzimas). Esta bicapa contiene compuestos lipo-solubles como el colesterol o carotenos, quienes sirven como modificadores en la fluidez e integridad de la membrana (Andrews y col., 1980; Bloom y col, 1991 y Krajewski y col., 1992). Una de las respuestas a la presencia de hidrocarburos es la modificación en la producción de ácidos fáticos, Heipieper y col. (1992), observaron la conversión de *cis* ácidos fáticos a la forma *trans*, durante la adaptación de una cepa de *Pseudomonas* a fenol. Los autores sugieren que la conversión de *cis* a *trans* incrementa el ordenamiento de la membrana y consecuentemente disminuye la fluidicidad.

b) La tolerancia a compuestos lipofílicos se relaciona con la resistencia de la membrana de salida a esas moléculas, ésta es altamente porosa y permite el paso de los compuestos, lo que permitiría la salida de hidrocarburos del cuerpo celular.

c) La función de la película superficial para proteger a la célula es ampliamente conocida (Sleytr y Massher, 1988), la función que realiza es la de una maya molecular.

d) El sistema de excreción para hidrocarburos funciona de forma similar a los compuestos excretados de la célula como productos del metabolismo. Sin embargo, no existe mucha información acerca de como el sistema de excreción de compuestos tóxicos en la membrana citoplásmica (Poolman y col., 1993).

e) La presencia de materiales que sirven como matrices de adsorción (carbón activado entre otros) se ha demostrado que reducen los efectos tóxicos en células atrapadas en estas matrices en presencia de fenol (Heipieper y col, 1991 y Bettman y Rehin, 1984).

De acuerdo con Rikizo, 1994, la resistencia de bacterias a solventes orgánicos se ha relacionado con el logaritmo natural del coeficiente de partición ( $\text{Log } P_{ow}$ ) donde este parámetro es un indicador de la polaridad del solvente (entre n-octanol y agua). Un solvente orgánico para el cual el  $\text{Log } P_{ow}$  es bajo (1.5-3), generalmente es más tóxico para los microorganismos, un grupo de estos puede sobrevivir en presencia de una variedad de solventes orgánicos de los cuales  $\text{Log } P_{ow}$  son iguales o mayores que un valor particular (valor índice). De esta forma, los solventes que posean un valor mayor al índice tendrán poco efecto sobre los microorganismos. El solvente que posea el valor igual al índice será llamado solvente índice y será sensible a todos los solventes con un valor de  $\text{Log } P_{ow}$  menor al índice. El valor índice es diferente para cada género, especie o cepa de bacterias.

En general bacterias Gram negativas presentan mayor tolerancia que Gram positivas, debido a que las Gram negativas poseen doble membrana (citoplásmica y de salida) mientras que las positivas sólo poseen la membrana citoplásmica (Sikkema y col., 1995). La presencia de cationes divalentes (alcalinoterreos) favorecen el crecimiento de los microorganismos en solventes orgánicos y la presencia de EDTA (agente quelante de los alcalinoterreos) inhibe esa ayuda (Riziko (1994).

El desarrollo de la tolerancia a compuestos tóxicos en microorganismos (*Pseudomonas*) puede tener respuestas de corto y largo periodo la respuesta de corto periodo esta basada en un aumento en la rigidez de la membrana celular por una transformación rápida de algunos ácidos fáticos. La respuesta de largo

tiempo, además de los cambios en ácidos fáticos envuelve alteraciones en el nivel de los fosfolípidos. Existe la posibilidad de que células creciendo en presencia de compuestos orgánicos puedan usar un mecanismo de exclusión dependiente de la energía que puede disminuir el nivel de compuesto en la membrana lo cual puede incrementar las posibilidades de sobrevivir en presencia de compuestos tóxicos (Ramos y col., 1996).

Debido a la presencia de compuestos aromáticos en las aguas amargas, fue necesario realizar un estudio del efecto que los compuestos aromáticos pueden causar al proceso sulfoxidativo. El fenol y el p-cresol son dos de los compuestos que mayor presencia tienen en estas aguas por lo que se estudiaron diferentes concentraciones de ambos (fenol en concentraciones de 25 a 155 mg/l y p-cresol de 10 a 130 mg/l según la caracterización). Las figuras 4.7 y 4.8 muestran los resultados del efecto que tanto fenol (4.7) como p-cresol (4.8) ejercieron sobre el proceso de sulfoxidación las pruebas se realizaron a una temperatura de 30°C y una concentración 1 mM de sulfuro. El volumen necesario para tener la concentración deseada de fenol o p-cresol se determinó a partir de una solución madre (20 g/l de fenol y 1.8 g/l de p-cresol) y tomando en cuenta el volumen final de la prueba (60 ml). El resto de volumen necesario para el total, fue medio mineral a una temperatura de 30°C y con oxígeno a saturación.

En la figura 4.5 se observa el efecto que el fenol causa sobre el proceso de sulfoxidación. Una disminución del 15.8% (aproximadamente) de la velocidad de consumo de oxígeno se observa en general. Se puede decir que la presencia de fenol disminuye la velocidad de oxidación de sulfuro en un 15.8% en forma instantánea ya que se observa que la velocidad de consumo de oxígeno pasó de 30.9 mgO<sub>2</sub>/g<sub>prot</sub>min a un valor promedio de 26 mgO<sub>2</sub>/g<sub>prot</sub>min.

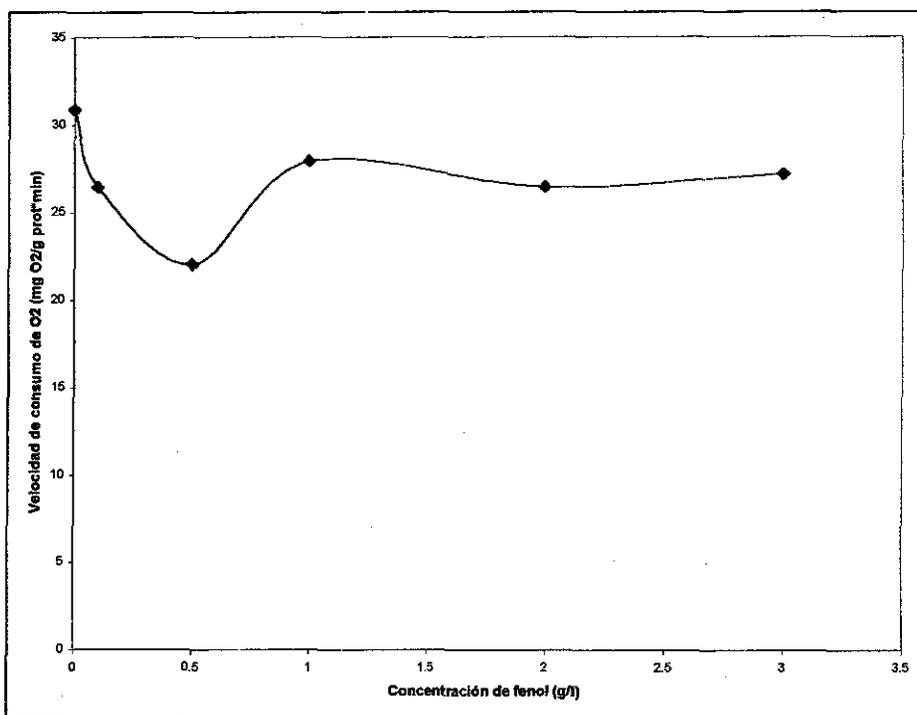


Fig 4.5 Velocidad de consumo de oxígeno a diferentes concentraciones de fenol

Ramos y col. en 1996, durante la adaptación de una cepa de *Pseudomonas* a tolueno, determinaron que existen dos tipos de respuesta cuando los microorganismos se sometieron al contacto con tolueno, una de corto tiempo (minutos) y otra de largo tiempo. Las pruebas de respirometría que se realizaron en el actual trabajo tomaron tiempos de 1 a 5 minutos. Ramos, menciona un cambio en la producción de fosfolípidos antes y después de la adición de tolueno. Las células respondieron al tolueno cambiando la cantidad de ácidos grasos no saturados. Inmediatamente a la adición del hidrocarburo aromático la presencia de ciclopropano se hizo ilegible con un incremento en la producción del ácido C16:1,9 *cis*. De forma similar a los ácidos fáticos, otros compuestos presentaron variación en el aumento o disminución de su producción. Aunque en el presente trabajo no fue posible la determinación de dichos o similares productos, puede ser que de acuerdo con el caso de estudio de Ramos, el fenol tenga un efecto inmediato sobre los microorganismos del género *Thiobacillus* el cual se vió

reflejado en la disminución de la velocidad de consumo de oxígeno. Debido a que el tiempo en el que se realiza la prueba no fue posible determinar si existió efecto alguno sobre el proceso de oxidación de sulfuro.

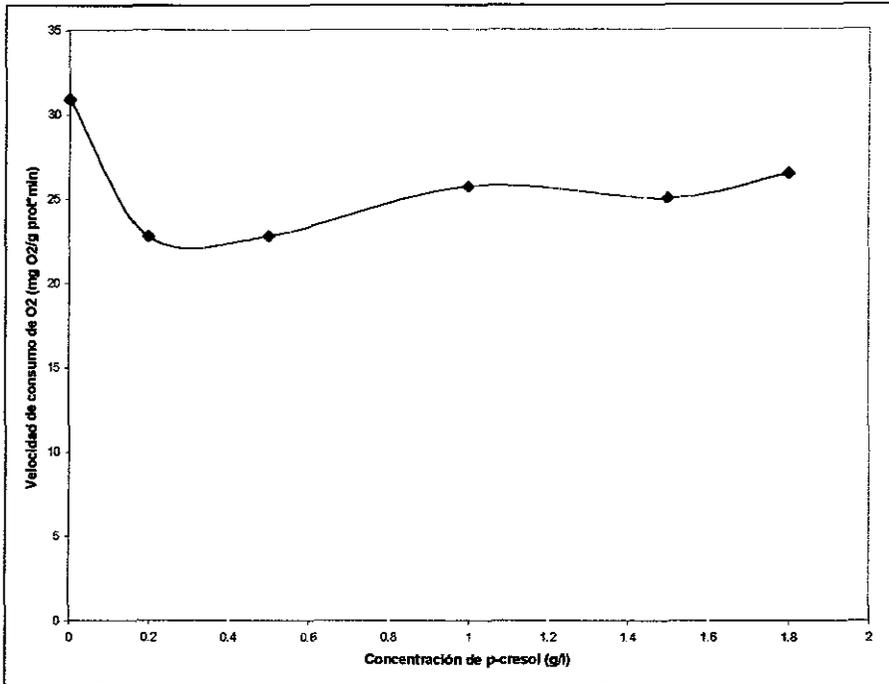


Fig 4.6 Velocidad de consumo de oxígeno a diferentes concentraciones de p-cresol

En la figura 4.6 se muestra el caso de la adición del p-cresol, el comportamiento mostrado es similar al del fenol, la disminución en la velocidad de consumo de oxígeno fue aproximadamente de un 20.5%, lo que hace suponer que el efecto del p-cresol es mayor. De acuerdo a lo establecido por Rikizo (1994), un compuesto orgánico para el cual el logaritmo del coeficiente de partición posea valores bajos (inferiores a 3.0) generalmente será más tóxico para los microorganismos. Los valores para fenol y p-cresol son respectivamente 1.46 y 1.94 (Hansch *et al*, 1995) por lo que se podría esperar que existiera tal efecto negativo. Se puede observar tanto para el fenol como para el p-cresol que a pesar del aumento en la concentración del aromático el efecto no aumenta.

#### **4.6 Efecto de la concentración del fenol y p-cresol sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos, en cinética en matraz**

Para conocer el efecto que a periodos más largos de tiempo pudieran causar los hidrocarburos aromáticos se montó una cinética en matraz, la fuente de energía utilizada fue tiosulfato de sodio debido a que este compuesto se ha utilizado como una buena alternativa en diferentes ocasiones (Sublette y Sylvester, 1987 y Rajganesh y col., 1995) por su facilidad de manejo y operación, también debido a que a bajas concentraciones, entre 5 y 30 mg/l (Buisman y col., 1991) el sulfuro es tóxico para los microorganismos y una prueba de esta naturaleza no se podría realizar en tales condiciones

La prueba se realizó en matraces de 250 ml, la concentración de tiosulfato fue de 20g/l, la temperatura de 30°C y la agitación se controló a 100 rpm con un pH inicial de 6.0

Las concentraciones de fenol y p-cresol evaluadas fueron (mg/l): 0 (control), 50, 100 (sin tiosulfato, control), 100 y 200. En cada matraz se depositaron concentraciones iguales de ambos aromáticos.

La concentración de proteína (figura 4.7), en general aumentó su valor en todas las concentraciones aunque este incremento fue menor mientras aumentó la concentración de fenol y p-cresol. De acuerdo con la gráfica, se observó un crecimiento máximo de 140 mg/l de proteína cuando en la prueba se realizó sin adición de fenol, en una concentración de 50 mg/l de fenol y p-cresol el valor de proteína tuvo un máximo de 110 mg/l, finalmente, a una concentración de fenol y p-cresol de 200 mg/l, la proteína presentó un valor máximo de 60 mg/l. Los resultados obtenidos de las pruebas de respirometría y los resultados obtenidos en esta cinética muestran que existió un efecto negativo sobre el crecimiento de los microorganismos cuando existe la presencia de compuestos aromáticos. La

medición de la proteína pudo verse afectada mostrando valores mas bajos debido a la presencia de fenol y p-cresol como lo menciona García y Vázquez en 1998.

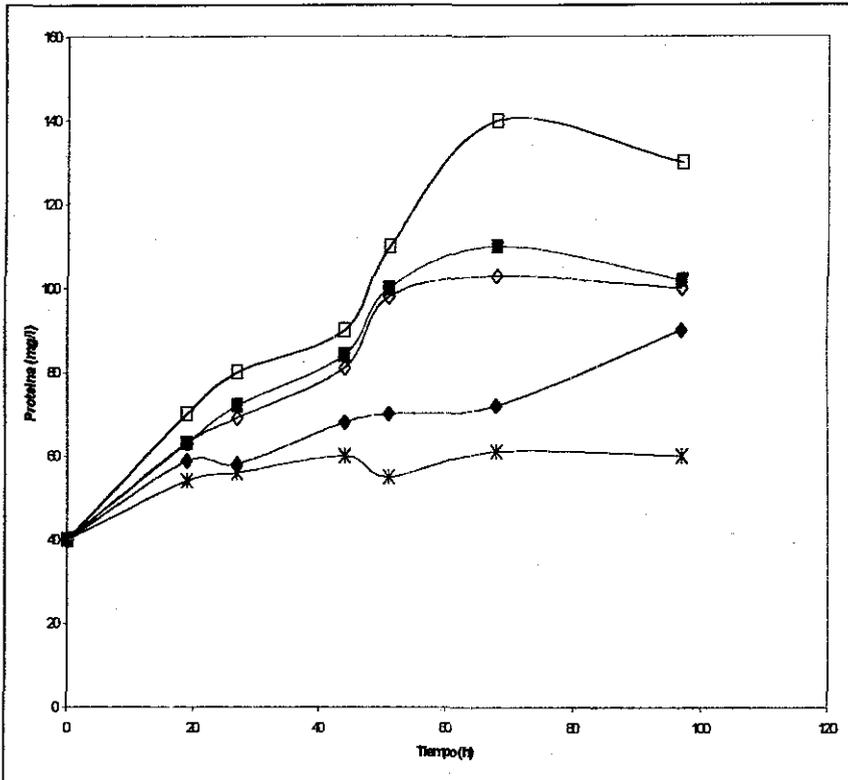


Fig 4.7 Comportamiento de la proteína a diferentes concentraciones de fenol y p-cresol (mg/l)

□ 0, ▲ 50, ▼ 100 sin tiosulfato, ▲ 100 y \* 200.

En cuanto al comportamiento del pH en la cinética de crecimiento (figura 4.8) se puede observar que durante las primeras 20 horas el pH aumentó para todas las concentraciones de fenol y p-cresol en valores similares (7.9) al aumento que se dio en la prueba sin aromáticos, a partir de ese instante se dio una disminución también para todas las concentraciones. El comportamiento mostrado en la gráfica conserva una estrecha relación con la producción de sulfato y azufre elemental

(figura 4.9) como productos de la oxidación biológica del tiosulfato (Velasco, 2001) y, por lo tanto la generación de iones hidrógeno u oxidrilo respectivamente.

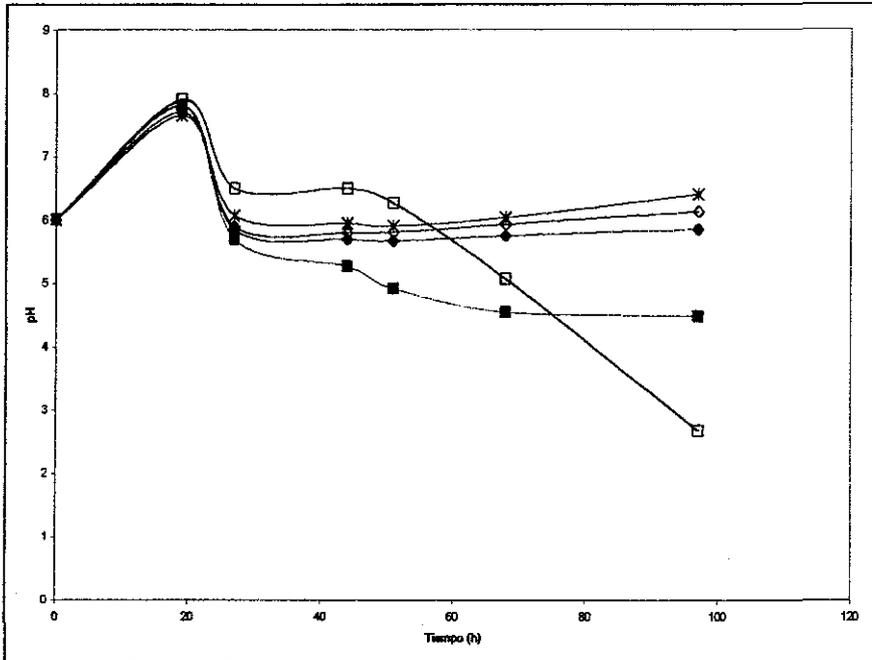


Fig 4.8 Comportamiento del pH para las diferentes concentraciones de fenol y p-cresol (mg/l).

□ 0 ■ 50 ◆ 100 (sin tiosulfato). ◇ 100 y γ 200

Durante la cinética se observó la generación de azufre elemental (no determinado) el cual nunca se retiró del sistema, los microorganismos están suspendidos en el sistema sin embargo tienen la capacidad de adherirse a las partículas (sólidas) de azufre elemental. De acuerdo a las reacciones de oxidación del tiosulfato, la limitación de oxígeno deriva en la producción de azufre elemental. La figura 4.7 muestra que siempre existió crecimiento de microorganismos, por otro lado, la gráfica 4.8 muestra al principio el aumento de pH lo cual indica producción de azufre, posteriormente una disminución del pH lo cual indica que existe la producción de sulfato (figura 4.9), al parecer a partir de ese momento podría suponerse una producción lenta de ambos (sulfato y azufre elemental) ya que el pH aumenta nuevamente de forma lenta. Solo el matraz sin aromáticos

siguió un comportamiento donde el pH disminuyó hasta un valor final de 2.6 y la reacción se dirigió favorablemente hacia sulfato.

Lo anterior se puede comprobar observando la figura 4.9 donde se muestra la producción de sulfato. Lo anterior demuestra que el crecimiento de microorganismos si se llevó a cabo y confirma la posible tolerancia de los microorganismos del consorcio a la presencia de compuestos aromáticos.

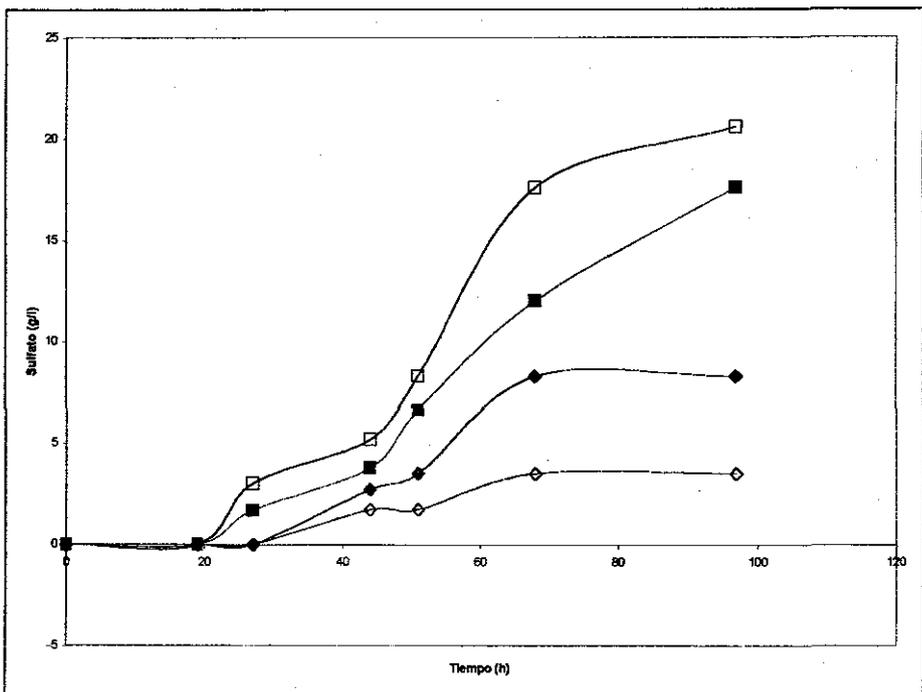


Fig 4.9 Producción de sulfato (g/l) debido a la oxidación del tiosulfato a diferentes concentraciones de fenol y p-cresol (mg/l) □50 ■100 (sin tiosulfato), ◆100 y ◇200)

En las figuras 4.10 y 4.11 se presenta el comportamiento del fenol y el p-cresol. El fenol (figura 4.10) presentó una disminución para cada una de las diferentes concentraciones, durante las primeras 20 horas en general no existió una disminución en la concentración de fenol, sin embargo, a partir de este

momento inició la disminución. Para la concentración de 50 mg/l de fenol el valor final fue de 43 mg/l, las pruebas realizadas a 100 mg/l presentaron un valor final de 58 mg/l y la concentración de fenol de 200 mg/l tuvo un valor de 145 mg/l al término de la prueba. En el caso del p-cresol el comportamiento fue similar, la concentración se mantuvo sin cambio durante las primeras horas pero al final disminuyó. Las primeras 20 horas presentaron un comportamiento similar a la gráfica de fenol ya que no existió una disminución en la concentración presente, los valores finales para las concentraciones de p-cresol probadas (50, 100 y 200) fueron respectivamente 40, 80 y 160 mg/l.

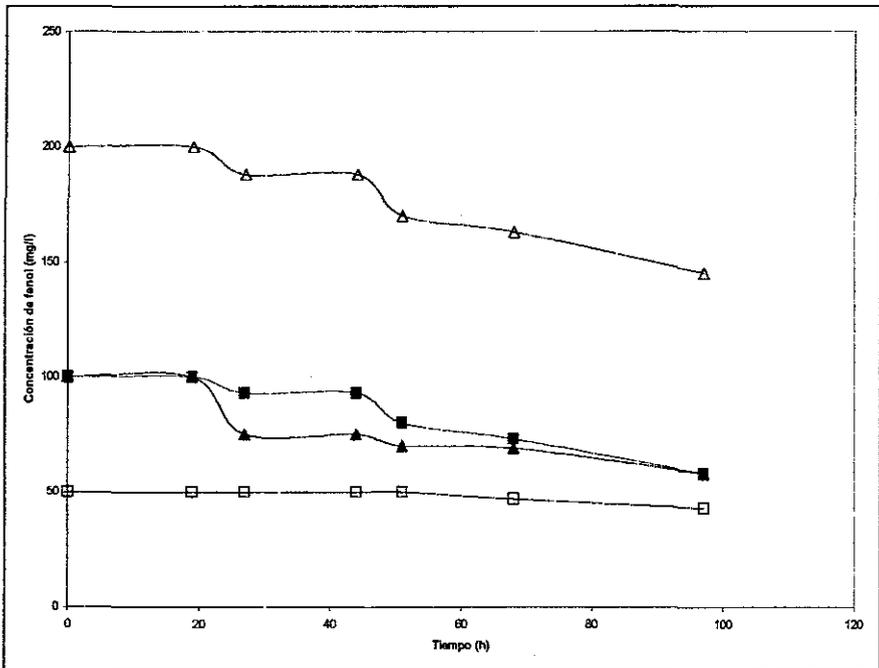


Fig. 4.10 Comportamiento de fenol (mg/l) durante la cinética: □50 ■100 (sin tiosulfato) ▲100 y ▲200

Se ha reportado que algunos thiobacilli como *Thiosphaera pantotropha*, *Paracoccus denitrificans* y ciertas especies *Beggiatoa* son organismos capaces de crecer en mezclas de compuestos reducidos de azufre y sustratos orgánicos,

estas bacterias pueden crecer quimiolitotróficamente, heterotróficamente o mixotróficamente (Robertson y Kuenen, 1991). Es posible suponer que el consorcio se adaptó a la presencia de compuestos aromáticos debido a que como se observa en las gráficas anteriores tanto el fenol como el p-cresol mostraron una disminución en la concentración, por otro lado la producción de sulfato y el aumento en la proteína muestran incremento aún a concentraciones de 200 mg/l. Sin embargo, existen reportes ya mencionados donde se dice que los hidrocarburos se acumulan en la membrana celular lo cual pudo haber ocurrido.

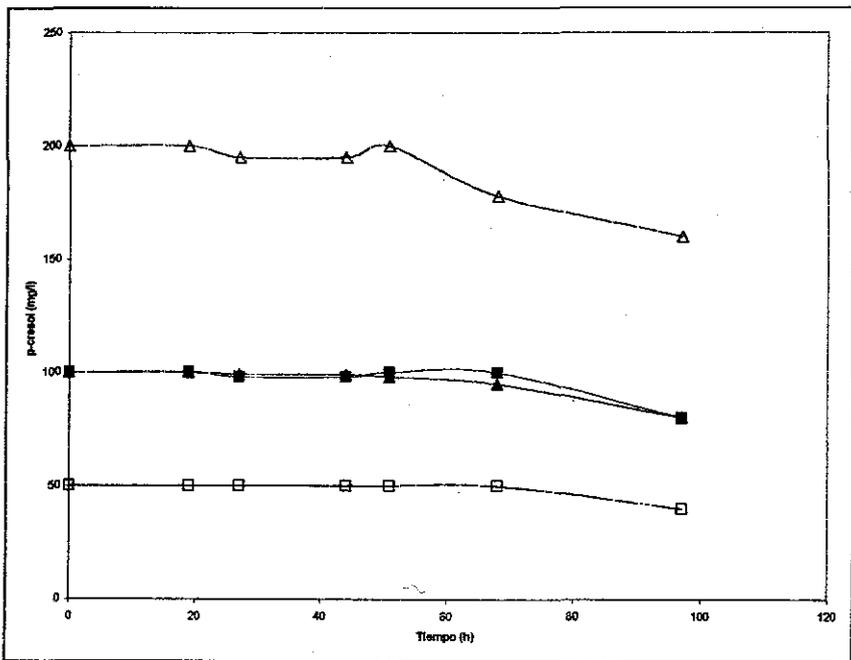


Fig. 4.11 Comportamiento de p-cresol (mg/l) durante la cinética: □50, ■100 (sin tiosulfato), ▲100 y ▲200

El proceso de sulfoxidación puede ser afectado por la presencia de aromáticos como se observó en la gráfica de producción de sulfato. La cinética realizada no arroja resultados suficientes para definir el mecanismo de afección de los aromáticos sobre los microorganismos y el proceso de sulfoxidación por lo que se requeriría de experimentos adicionales para establecer dicho mecanismo.

#### 4.7 Efecto de la concentración del fenol sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos, en cinética en un reactor en lote con control de pH.

Con el fin de evaluar el efecto de los compuestos aromáticos en un reactor con control de pH y descartar esta variable del sistema, se montó un sistema en lote con un volumen de 500 ml y se controló el pH en un valor de 7, la operación fue a temperatura ambiente, con agitación magnética y con aireación. El medio de cultivo tuvo una concentración de 20g/l y la concentración de fenol evaluada fue de 100mg/l

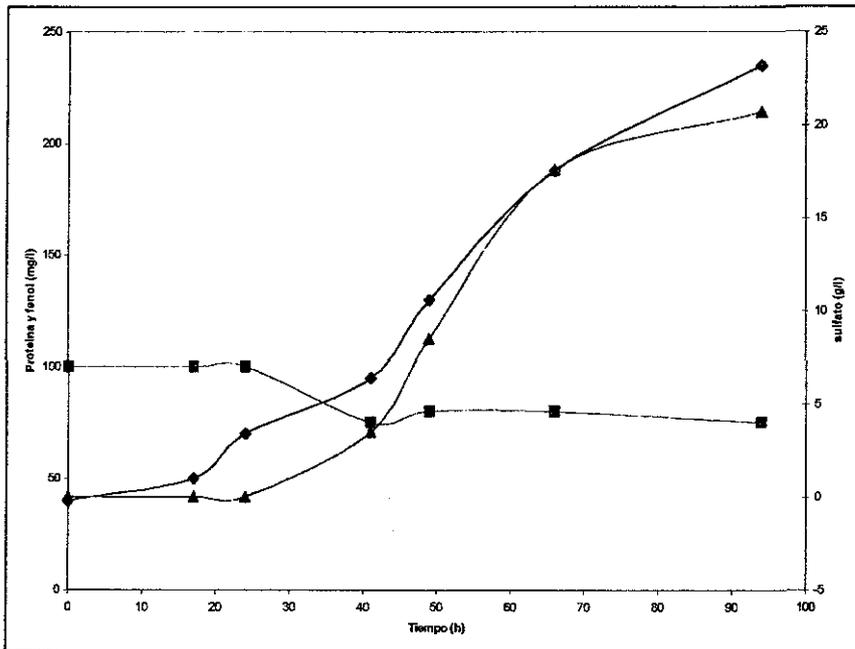


Fig 4.12 Comportamiento de la cinética en reactor. ◊proteína (mg/l), ■fenol (mg/l) y ▲sulfato (g/l)

Los resultados aparecen en la figura 4.12. A la concentración de fenol probada (100 mg/l) la proteína aumentó consistentemente, hasta un máximo de 230 mg/l, la generación de sulfato como producto de la oxidación biológica de tiosulfato aumentó hasta un valor de 20 g/l y la concentración de fenol disminuyó, alcanzando un valor final de 75 mg/l. Se pudo comprobar la tolerancia del

consorcio a la presencia de compuestos aromáticos, sugiere además que el consorcio puede desarrollarse en periodos de tiempo más prolongados sin que se vea afectado el proceso de sulfoxidación

#### 4.8 Efecto de la concentración del fenol sobre el proceso de sulfoxidación y los microorganismos, en un reactor de recirculación con operación continua

Con el fin de avaluar en cultivo continuo el efecto que tienen los compuestos aromáticos sobre la oxidación de sulfuro, se implementó un quimiostato con recirculación (figura 4.13)

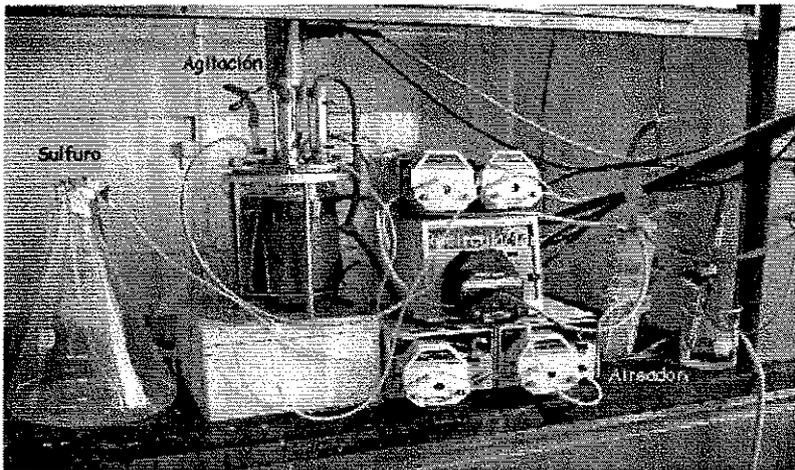


Fig 4.13 Reactor de recirculación (operación continua) utilizado en el estudio del efecto de fenol

El principio de operación es similar al descrito anteriormente donde la fase de aireación estuvo separada de la de reacción para favorecer el control de la concentración de oxígeno en la fase de reacción. En ésta, se tuvo un volumen de 2.5 l y una agitación de 270rpm. Las condiciones de operación fueron: pH de 7, temperatura de 30°C. La tasa de dilución fue de  $1d^{-1}$  y la carga de sulfuro de 2.0

g/l. Una vez obtenido el estado estacionario se procedió a la adición del compuesto aromático en diferentes cargas (25, 50, 100, 150 y 200 mg/l).

La figura 4.14 muestra la evaluación para las fases de operación del reactor. La carga de sulfuro a la salida se mantuvo en un valor de cero en todas las cargas de fenol evaluadas. Por su parte, desde el estado estacionario anterior a la primera carga de fenol (25 mg/l), todo el sulfuro fue oxidado a sulfato y este valor se mantuvo constante a lo largo de las fases de operación. Como se observa, la proteína inició con valores elevados cercanos a 200 mg/l debido a que existió la formación de azufre elemental (por la adhesión de microorganismos a las partículas de azufre y la recirculación). En condiciones de producción de sulfato al 100%, la proteína se mantuvo en valores cercanos a 100 mg/l, cuando se evaluó la carga de fenol de 150 mg/l se observó un incremento en la proteína de 100 mg/l a un valor promedio de 110 mg/l, cuando de nuevo se incrementó la carga de fenol a 200 mg/l, la proteína sufrió nuevamente un incremento hasta un valor promedio de 118 mg/l lo cual sugiere la posibilidad de que el fenol haya sido degradado por el consorcio, como lo mencionó Sikkema en 1995 al hablar de las posibles actividades de un hidrocarburo en contacto con microorganismos. En estas últimas condiciones el rendimiento fue de 0.6 gramos de células formadas por gramo de sustrato consumido. Rajganes, (1995) trabajó con microorganismos del género *Thiobacillus* en el tratamiento de aguas amargas con concentraciones de aromáticos de hasta 5 mg/l y en su trabajo no reportó efecto negativo sobre el proceso por la presencia de estos.

Por lo que respecta a las diferentes cargas de fenol evaluadas la gráfica 4.13 muestra que existe una disminución a la salida. Las primeras tres (25, 50 y 100 mg/l) muestran a partir del día primero de su alimentación una disminución hasta cero en la salida lo cual se observa a partir del día cuatro en cada carga. Por su parte las dos últimas cargas (150 y 200 mg/l) presentan un remanente a la salida 3 mg/l y 10 mg/l respectivamente, a pesar de que existe un incremento en los valores de proteína para estas cargas también existe fenol a la salida lo que puede

deberse a que el carbono proveniente del fenol no sea ya necesario para el crecimiento celular si es que se está consumiendo o bien que exista una saturación en la membrana celular donde el aromático podría acumularse.

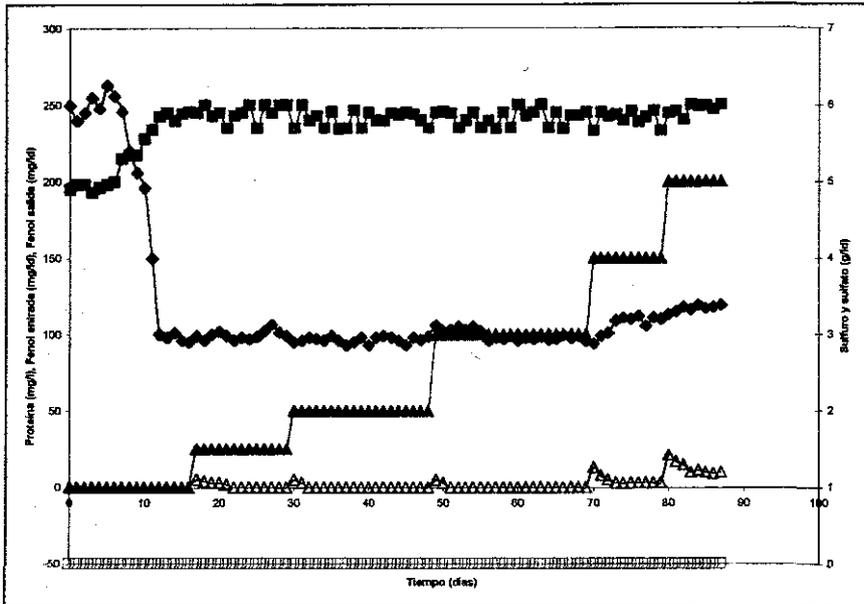


Fig 4 14 Efecto de fenol en incrementos de carga (25, 50, 100 y 150 mg/l) en reactor de recirculación con operación continua: ♦proteína (mg/l). ▲Fenol entrada (mg/l), ΔFenol salida (mg/l), □Sulfuro salida (g/l), y ■ Sulfato (g/l)

En su trabajo, Sikkema (1995) habló respecto a los procesos que sufre un hidrocarburo después de su disolución principalmente hablando de a) una transformación y degradación por el consorcio o b) una acumulación (bioconcentración) intracelular en los sistemas biológicos. Debido a que la concentración de fenol durante los experimentos disminuyó rápidamente se puede pensar en que ocurre uno de los dos eventos posibles e incluso los dos. El fenol desapareció del medio completamente hasta una carga de 100 mg/l, a cargas de 150 y 200 mg/l se observó fenol a la salida del reactor (3 y 10 mg/l respectivamente). Sin embargo, no se puede definir con los resultados obtenidos cuál es el mecanismo fisiológico por el cual el fenol desaparece del medio.

La tabla 4.7 muestra los resultados globales de esta prueba, se observa que la proteína sufrió un incremento ligero en sus valores cuando la carga de fenol rebasó los 150mg/ld. Por lo anterior se puede suponer que no existe un efecto negativo por la presencia de fenol sobre los microorganismos en un cultivo continuo. Por otro lado durante la etapa de operación del reactor no se observa disminución en la eficiencia de oxidación de sulfuro debido a la presencia de fenol en el medio ya que la oxidación fue del 100% durante las diferentes cargas de adición de fenol, por lo que se puede suponer que la presencia de fenol en cargas iguales o inferiores a 200 mg/ld no ejercen algún efecto negativo sobre el proceso de sulfoxidación.

Tabla 4.7 Fases de operación del quimiostato con recirculación con adición de fenol

Carga de fenol entrada (mg/ld)	Carga de fenol salida (mg/ld)	Carga de sulfato salida (g/ld)	Carga de sulfuro salida (g/ld)	Proteína (mg/l)
25	0	6	0	100
50	0	6	0	100
100	0	6	0	100
150	3	6	0	110
200	10	6	0	118

## 5. CONCLUSIONES

1. Se demostró que es posible adaptar un consorcio que oxida tiosulfato a la oxidación de sulfuro. Durante esta etapa de adaptación, la proteína se comportó con valores ascendentes con valor inicial de 60 mg/l y obteniendo valores máximos de 1900 mg/l, debido a que el volumen retirado del reactor se centrifugó y la biomasa se regresó al sistema. La densidad óptica (540 nm) se incrementó desde un valor inicial de 0.7 hasta máximos de 2.7 debido al aumento de población y a la presencia de azufre elemental en el sistema. La eliminación de sulfuro fue del 100 %.

2. Durante la etapa de operación del reactor de recirculación en donde se separaron las fases de reacción y aireación, se manejaron diferentes tasas de dilución de 0.2, 0.5 y 1 d<sup>-1</sup>, a su vez la carga de sulfuro se incrementó en valores de 0.6, 1.0 y 2.0 g/l/d. Durante las tres tasas de dilución la eliminación de sulfuro fue del superior al 99%. Por su parte, la proteína se incrementó a medida que aumentó la carga de sulfuro y observó un valor máximo de 240 mg/l a una tasa de dilución de 1 d<sup>-1</sup> y 2.0 g/l/d de sulfuro.

3. Debido a que la relación O<sub>2</sub>/S<sup>=</sup> fue menor a uno y aproximada a 0.8, se favoreció la producción de azufre elemental, el cual presentó un valor máximo de 91.5 %.

4. El consorcio presentó un comportamiento cinético de la oxidación biológica de sulfuro superior al de origen. La velocidad máxima específica de oxidación de sulfuro determinada por pruebas de respirometría fue de 22.4 mg HS<sup>-</sup>/g<sub>prot</sub>\*min a una concentración máxima de 0.75 mM de sulfuro con una K<sub>S</sub> de 0.3 mM de sulfuro, valor que corresponde con la literatura (Alcántara, 2000). A una concentración 1 mM de sulfuro, se presentó inhibición en la velocidad de oxidación.

5 En el reactor de recirculación se probó la influencia de la presencia de nitrógeno amoniacal, las cargas probadas fueron 84, 556 y 1750 mg/l a una tasa de dilución de  $0.5 \text{ d}^{-1}$  y una carga de 1.0 g/l de sulfuro. La presencia de nitrógeno amoniacal no afectó al desarrollo del consorcio ni al proceso de sulfoxidación, mientras que se incrementó la carga de nitrógeno el valor de la proteína se elevó desde 55 mg/l hasta valores de 197 mg/l. Lowry (1951) menciona una disminución en la coloración de hasta 25% en la determinación de proteína lo cual no ocurrió en el presente trabajo, posiblemente debido a que la prueba se realizó en condiciones suficientemente alcalinas. Los experimentos realizados no permiten identificar efecto fisiológico alguno ni identificar de que forma ayuda la presencia de nitrógeno al desarrollo de microorganismos. La posible existencia de microorganismos nitrificantes se descarta ya que no se encontró presencia de nitrato en el sistema.

6. La presencia de fenol y p-cresol causan un efecto inmediato a la velocidad de consumo de oxígeno, como fue observado en las pruebas de respirometría, el fenol y el p -cresol disminuyen en un 16 y 20.5 % la velocidad de consumo de oxígeno respectivamente desde la primera concentración probada (200 mg/l), a pesar del aumento en la concentración de los aromáticos, el efecto no se incrementó ni la oxidación de sulfuro se vio afectada. Con los resultados obtenidos y las pruebas realizadas no es posible definir el mecanismo fisiológico de afección de los compuestos aromáticos hacia los microorganismos.

7. La presencia de fenol en un reactor de recirculación con operación continua no afecta negativamente el proceso de sulfoxidación, lo anterior se probó al estudiar cargas de fenol en el sistema, las cargas evaluadas (25, 50, 100, 150 y 200 mg/l) no disminuyeron la cantidad de proteína del sistema la cual se mantuvo en valores cercanos a 100 mg/l, durante la operación la carga de alimentación de sulfuro (2 g/l) fue eliminado al 100%. La concentración de fenol a la salida del reactor fue generalmente cero, sólo a cargas de 150 y 200 mg/l se observó fenol a la salida (3 y 10 mg/l). Los resultados no ofrecen información acerca de si el fenol es

degradado o asimilado intracelularmente por el consorcio. Así mismo la presencia de p-cresol en pruebas en lote demostró no afectar negativamente el proceso sulfoxidativo en concentraciones de hasta 200 mg/l.

8. El sistema de reacción con recirculación ofrece la capacidad de tratar aguas que contengan compuestos reducidos de azufre como el sulfuro de hidrógeno oxidándolo parcialmente a azufre elemental, con alta eficiencia de remoción, disminuyendo la cantidad de sulfato en la descarga, recuperando un material con valor en el mercado, sin necesidad de catalizadores u oxidantes químicos, sin un lodo químico por disponer y no se ve afectado negativamente por la presencia de nitrógeno amoniacal ni de compuestos aromáticos por lo que es real la posibilidad de tratar aguas que combinen estos contaminantes como las provenientes de la industria del petróleo.

## 6. BIBLIOGRAFÍA

- Alcántara S, Estrada I, Vásquez M, Revah S (1999) Carbon disulfide oxidation by a microbial consortium from a trickling filter. *Biotechnol. Lett.* **21**, 815-819.
- Alcántara, S. (2000). Estudio de la oxidación biológica de los compuestos reducidos de azufre utilizando un consorcio de microorganismos sulfoxidantes. Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación parcial del tiosulfato en azufre elemental. Tesis de doctorado. Universidad Autónoma Metropolitana, México.
- Anderson G.K., Donnelly T. and McKeown K.J. (1982). Identification and control of inhibition in the anaerobic treatment of industrial wastewater. *Process Biochem.* **17**(4), 28-32/41.
- Bartlett J, Skoog D (1954) Colorimetric Determination of Elemental Sulfur in Hydrocarbons. *Anal. Chem.* **26**(6), 1008.
- Bloom, M., E. Evans, and O. G. Mouritsen (1991) Physical properties of the fluid lipid-bilayer component of cell membranes: a perspective. *Q. Rev. Biophys.* **24**, 293- 397.
- Buisman C (1998) Industrial applications of new sulphur biotechnology. The Biological Sulphur Cycle: Environmental Science and Technology. Wageningen, The Netherlands, April 19-24.
- Buisman C, Prins, W (1994) New process for biological (flue) gas desulfurization. Symposium on Biological Waste Gas Cleaning. Heidelberg, FRG pp. 95-103.
- Buisman C, Ijspeert P, Janssen A, Lettinga G (1990) Kinetics of chemical and biological sulphide Oxidation in aqueous solutions. *Wat. Res.* **24**(5), 667-671.
- Buisman C, Geraats B, Ijspeert P, Lettinga G (1990) Optimization of sulfur production in a biotechnological sulfide removing reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 50-56.
- Buisman C, Wit B, Lettinga G, (1990), Biotechnological sulphide removal in three polyurethane carrier reactors: stirred reactor, biorotor reactor and upflow reactor. *Wat. Res.* **24**(2), 245-251.
- Buisman, C., Ijspeert, P., Hof, A., Janssen, A., Hagen, R., Lettinga, G. (1991) Kinetic parameters of a mixed culture oxidizing sulfide and sulfur with oxygen. *Biotechnol. Bioeng.* **35**: 50-56
- Buisman C, Post R, Ijspeert P, Geraats G, Lettinga G (1989) Biotechnological Process for Sulfide Removal with Sulphur Reclamation. *Acta Biotechnol.* **9**(3),

255-267.

- Cadenhead P, Sublette K (1990) Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacilli*. *Biotechnol. Bioeng.* **35**, 1150-1154.
- Cord R. and Ruwisch (1985). A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate reducing bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, **4**: 33-36.
- Cork DJ, Jerger DE, Maka A (1986) Biocatalytic production of sulfur from process waste streams. *Biotechnol. Bioeng. Symp. Ser.* **16**, 149-162.
- Cork D, Garunas R, Sajjad A (1983) *Chlorobium limicola* forma *thiosulfatophilum*: Biocatalyst in the production of Sulfur and Organic Carbon from a Gas Stream Containing H<sub>2</sub>S and CO<sub>2</sub>. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**(3), 913-918.
- Cornell, B. A., and Schüürmann. (1988) Membrane thickness and acyl chain length. *Biochim. Biophys. Acta* **733**: 324-335.
- García, A.H., Vázquez, D.R. (1998) Cuantificación de proteínas: una revisión, *Bio Tecnología*. **3**: 77-88.
- Guía Norteamericana de Información y Respuesta, Departamento de Transporte de los Estados Unidos, Transporte de Canada y Secretaría de Comunicaciones y Transportes de México, 1996.
- Hansch *et al*, 1995, PhysProp. database. Chemfinder database. <http://www.chemfinder.com>
- Hasan, S., Rajganesh, B., and Sublette, K. (1994) Large- Scale cultivation of *Thiobacillus denitrificans* to support pilot and field tests of a bioaugmentation process for microbial oxidation of sulfides. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **45**: 925-934.
- Hazeu W, Batenburg-van der Vegte W, Bos P, van der Pas R, Kuenen J (1988) The production and utilization of intermediary elemental sulfur during the oxidation of reduced sulfur compounds by *Thiobacillus ferrooxidans*. *Arch Microbiol.* **150**, 574-579.
- Heipieper, H. J., R.Diefenbach, and H. Keweloh (1992) Conversion of *cis* insaturated fatty acids to *trans*, a possible mechanism for the protection of phenol-degrading *Pseudomonas putida* P8 form substrate toxicity. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 1847- 1852.
- Heipieper, H. J., H. Keweloh and H. J. Rehm (1991) Influence of phenols on growth and membrane permeability of free and immobilized *Escherichia coli* *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 1213- 1217.
- Hinz, A.,and Wallin, M., Individual and simutaneous desorption of H<sub>2</sub>S and CO<sub>2</sub>.

*Chem. Eng. J.* **72** pp. 63-77

- Hugler W, Acosta C, Revah S (1999) Biological removal of Carbon Disulfide from waste air streams. *Environm. Progress*. Accepted.
- Hugo, W. B. (1978) Membrane-active antimicrobial drugs, a reappraisal of their mode of action in the light of the chemiosmotic theory. *Int J. Pharm.* **1**, 127-131.
- Informe técnico, proyecto IMP-D21, Confidencial, (2001).
- Imaizumi T., (1986) Some industrial applications of organic microbial oxidation in Japan. *Biotech. Bioeng. Symp.* N° 16, 363.
- Janssen A, Ma S, Lens P, Lettinga G (1997) Performance of a Sulfide-Oxidizing Expanded-Bed Reactor Supplied with Dissolved Oxygen. *Biotechnol. Bioeng* **53**:32-40.
- Janssen A (1996) Formation and colloidal behavior of elemental sulphur produced from the biological oxidation of hydrogen sulphide. PhD thesis, Wageningen, The Netherlands.
- Janssen A, Sleyster R, van der Kaa C, Jochemsen A, Bontsema J, Lettinga G (1995) Biological sulphide oxidation in a fed-batch reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **47**, 327-333.
- Jensen A, Webb C (1995) Treatment of H<sub>2</sub>S-containing gases: A review of microbiological alternatives. *Enzyme Microbiol. Technol.* **17**, 2-10
- Kelly D, Shergill J, Lu W, Wood A (1997) Oxidative metabolism of inorganic sulfur compounds by bacteria. *Antoine van Leeuwenhoek.* **71**, 195-107.
- Kelly P, Wood A (1994) Enzymes involved in the microbiological oxidation of thiosulfate and polithionates. *Methods in Enzymology.* **243**, 510-520.
- Kelly D, Wood A, Jordan S, Padden A, Gorlenko V, Dubinina G (1994) Biological Production and Consumption of Gaseous Organic Sulphur Compounds. *Atmospheric Gas Production and Consumption.* **22**, 1011.
- Kelly D (1990) Energetics of Chemolithotrophs. In *The Bacteria*, vol. XII, Ed. T.A. Krulwich, Academic Press, Inc. USA. pp. 479-501.
- Kelly D, (1982) Biochemistry of the chemolithotrophic oxidation of inorganic sulfur. *Phil. Trans R. Soc. Lond.* **238**, 499-528.
- Kensell, W.W., and Quinlan, M.P. (1997) The M.W. Kellogg company refinery sulfur management. En: Meyers A.R. (Ed), *Handbook of petroleum refining process*. Mc. Graw-Hill, New York, pp 11.1-11.14.
- Kim, B W, Kim I K, Chang H N (1990) Bioconversion of hydrogen sulfide by free and immobilized cells of *Chlorobium thiosulfatophilum*. *Biotechnol Lett.* **12**,

- 381-386.
- Krajewski-Bertnand, M.A., Milon, A., Nakatani, Y., and Ourisson, G. (1992) The interaccion of various cholesterol "ancestors" with lipid membranes: A  $^2\text{H}$ -NMR study on oriented bilayers. *Biochim. Biophys Acta* **1105**: 213-220.
- Kuenen JG, Pronk JT, Hazeu, Meulenberg R, Bos P (1993) A review of bioenergetics and enzymology of sulfur compound oxidation by acidophilic thiobacilli. In *Biohydrometallurgical Technologies*. Torma AE and Lakshman VL. TMS press. pp 487-493.
- Kuenen, J. G. (1975). Colorless sulfur bacteria and their role in the sulfur cycle. *Plant Soil*. **43**:49-76.
- Lehninger A, Nelson D, Cox M (1993) Principles of bioenergetics. In: Principles of biochemistry. Worth Pub. N.Y. pp. 364-369.
- Lehninger A (1983) Enzimas de oxidación-reducción y transporte electrónico. En: *Bioquímica*. Omega Ed. pp. 487-517.
- Lobo R, Revah S, Viveros G (1999) An analysis of a trickle bed bioreactor: Carbon disulfide removal. *Biotechnol. Bioeng.* **63**,1, 98- 109.
- Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, Randal R J (1951) Protein Measurements with the Folin Phenol Reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
- Lu W P, Kelly D P (1988) Kinetic and energetic aspects of inorganic sulphur compounds oxidation. *J. Gen. Microbiol.* **134**, 865-876.
- Mackenzie F (1995) Biogeochemistry. In: *Encyclopedia of Environmental Biology*. Vol. I. Academic Press, USA. pp. 249-276.
- Madigan M, Smith D y Brock T. (1987) *Microbiología*, Cuarta Edición, Editorial Prentice Hall, USA, pp. 466-472.
- Madigan M, Martinko J, Parker J (1999) Diversidad metabólica de los microorganismos. En: *Biología de microorganismos*. Prentice Hall Iberia. pp. 473-531.
- Monticello D, Finnerty R (1985) Microbial desulfurization of fossil fuels. *Ann. Rev. Microbiol.* **39**, 371-389.
- Monticello, D., and Kilbane J., (1991) Practical considerations in biodesulfurization of petroleum. *Environmental Biosciences Corporation, Institute of Gas Technology*.
- Moore W, Frisch N (1974) Sistemas y programas para el control de la contaminación del aire. En: *Manual para el Control de la Contaminación Industrial*. Herbert Lund, compilador. Tr. Aurora Bernáldec y Carlos Blasco. pp. 95-145.

- Nagl G (1997) Controlling H<sub>2</sub>S emissions. *Chemical Engineering*. **3**, 125-127.
- Ongcharit C, Dauben P, Sublette K (1989) Immobilization of an autotrophic bacterium by coculture with floc forming heterotrophs. *Biotechnol. Bioeng.* **33**, 1077-1080.
- Ongcharit C, Sublette K, Shah Y (1991) Oxidation of hydrogen sulfide by flocculated *Thiobacillus denitrificans* in a continuous culture. *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 497-504.
- Osborne, S. J., Leaver, M. K. Turner, and P. Dunnill (1990). Correlation of biocatalytic activity in a organic-aqueous two-liquid phase system with solvent concentration in the cell membrane. *Enzyme Microb. Technol.* **12**; 281-291.
- Pauling L (1964) In: College Chemistry: An introductory text book of general chemistry. S. Fco. Freeman.
- PEMEX (1984) Refinería "Miguel Hidalgo", Tula de Allende, Hidalgo. Editado por la Subdirección de Transformación Industrial de PEMEX.
- Perry R. (1992) Manual del Ingeniero Químico, sexta Edición, Mc. Graw-Hill, Vol. 6, sección 22.
- Pirt, J., (1975) Principles of microbe and cell cultivation. Wiley, USA, pp 29-41.
- Plas C, Harant H, Danner H, Jelinek E., Wimmer K, Holubar P, Braun R (1992) Ratio of biological and chemical oxidation during the aerobic elimination of sulphide by colorless sulphur bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 817-822.
- Plas C, Wimmer K, Holubar P, Mattanovich D, Danner H, Jelinek E, Harant H, Braun R (1993) Degradation of carbon disulphide by a *Thiobacillus* isolate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38**, 820-823.
- Poolman, B., D. Molenaar, and W. N. Konings (1993). Diversity of transport mechanisms in bacteria, p. 1-50. In M Shinitzky (ed), Handbook of biomembranes. Balaban Publishers, Rehovot, Israel.
- Quintero, R.R. (1993) Ingeniería bioquímica, teoría y aplicaciones, Tercera reimpresión, Ed. Alambra Mexicana, México, pp. 31,46,59,62,64,223.
- Rajganes B, Sublette K, Camp C (1995) Pilot-scale biotreatment of refinery spent sulfidic caustics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51/52**, 661-672.
- Rajganes B., Selvaraj, P.T., Manning, F.S., Sublette, K.L., and Camp, C. (1995) Biotreatment of produced water for removal of sulfides, orgánicos and toxicity. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 51/52.
- Ralf Cord-Ruwisch. (1985) A quick method for the determination of dissolved and precipitated sulfides in cultures of sulfate-reducing bacteria. *J. Microbiol.*

*Meth* 4 pp 33-36.

- Ramos, J. L., Dunques E., Rodriguez, J. J., Godoy P., Haidour A., Reyes F., and Fernández A (1996). Mechanisms for solvent tolerance in bacteria. *J. Biol. Chem.* **272**: 3887-3890.
- Restrepo, A.S., Caicedo, N.H., Celis, C., and Rosero, G. (1999). Bio-oxidation of sulfur found in the refinery wastewater using a pool of chemilitotrophic bacteria immobilized on a fixed bed. *IAWQ International Specialised Conference of the Chemical Industrial Group*. México.
- Rikizo Aono, Hideki Kobayashi, Keith N Joblin, Koki Horkoshi, (1994). Effects of organic solvents on growth of *Escherichia coli* k-12. *Biosciences Biotechnology Biochemistry*. **58**, 2009- 2014.
- Robertson L, Kuenen J (1991) The colorless sulfur bacteria, In: Balows A, Trüper H, Dworkin M, Harder H, Schleifer K (eds) *The prokaryotes*, vol. 1, Springer, Berlín Heidelberg New York, pp. 385-413.
- Sánchez O, van Gemerden H, Más J (1996) Description of a redox controlled sulfidostat for the growth of sulfide- oxidizing phototrophs. *Appl Environm. Microbiol.* **62**, 3640- 3645
- Seeman, P., and S. Roth (1972). General anesthetics expanded cell membranes at surgical concentrations. *Biochim. Biophys. Acta* **255**:171-177
- Sheen, R.T., Kalher, H.L. and Ross, E.M. (1955). Turbidimetric determination of sulfate in water, *Ind. Eng. Chem. Anal.* **7**: 4,262
- Sikkema, J., B. Poolman, W. N. Konings, and J. A. M. de Bont (1992). Effects of the membrane action of tetralin on the functional and structural properties of artificial and bacterial membranes. *J. Bacteriol.* **174**: 2986-2992.
- Sikkema J., Bont J.A. de, Poolman B. (1994) Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *Journal Biotechnology Chemistry*. **269**, 8022-8028.
- Sikkema J., Bont J.A. de, Poolman B. (1995) Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. *Microbiological reviews*. **59**, 201-222.
- Sleytr, U. B., and P. Messner (1988) Crystalline surface layers in prokaryotes. *J. Bacteriol.* **170**: 2891-2897.
- Studel R, (1996), The Yellow Element and Its Astounding Complexity. *Anorganische Chemie*. **5**, 226-234.
- Studel R (1998) Sulfur chemistry: Speciation, natural occurrence, redox reactions and colloidal aspects. In: *Cycle: Environmental Science and Technology*, Wageningen, The Netherlands, April 19-24.

- Sublette K, Kolhalkar B, Ratermank, K (1998) Technological aspects of the microbial treatment of sulfide-rich wastewaters: A case study. *Biodegradation*. **9**, 259-271.
- Sublette, K.L. and Sylvester, N.D., (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by *thiobacillus denitrificans*: Desulfurization of natural gas. *Biotech. and Bioeng*. **29**: 249-257.
- Sublette K L (1990) Microbial treatment of sour gases for the removal and oxidation of hydrogen sulphide. *Gas Sep. Purif.* **4**, 91-96.
- Sublette K (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by *Thiobacillus denitrificans*: desulfurization of natural gas. *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 249-257.
- Sublette K, Sylvester N (1987) Oxidation of hydrogen sulfide by mixed cultures of *Thiobacillus denitrificans* and heterotrophs. *Biotechnol. Bioeng.* **29**, 759-761.
- Sublette K, (1987), Aerobic Oxidation of Hydrogen Sulfide by *Thiobacillus denitrificans*, *Biotech. Bioeng.* **29**, 690-695.
- Suzuki I, Chan C, Takeuchi T (1992) Oxidation of elemental sulfur to sulfite by *Thiobacillus thiooxidans* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**(11), 3767-3769.
- Suzuki I (1999) Oxidation of inorganic sulfur compounds: Chemical and enzymatic reactions. *Can. J. Microbiol.* **45**, 97-105.
- Thauer, R.K., Jungerman, K., Decker, K. (1977) Energy conservation in chemotrophic anaerobic bacteria. *Bacteriol. Review*, **41**: 100-180.
- Takakuwa S (1992) Biochemical Aspects of microbial oxidations of inorganic sulfur compounds. In: *Organic sulfur chemistry: Biochemical Aspects*. Eds. Oae S, Okuyama T CRC Press, USA. pp. 1-44
- Takakuwa S, Fujimori S, Iwasaki H (1979) Some properties of cell-sulfur adhesion in *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **25**, 21-30.
- Takeuchi T, Suzuki I (1997) Cell hydrophobicity and Sulfur Adhesion of *Thiobacillus thiooxidans*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 2058- 2061.
- Tichy R, Lens P, Grotenhuis J, Bos P, (1998), Solid state reduced sulfur compounds: Environmental aspects and bio-remediation. *Critical Rev. Environ. Sci. Technol.* **28**(1), 1-40.
- Thomas, J.F. and Cotton, J.E. (1954), A turbidimetric sulfate determination, *Water and sewage works*, 101:426
- Torres P, (1998), Estudio del efecto de algunos factores de operación en la oxidación biológica de CS<sub>2</sub> en un biolavador de lecho escurrido (BLE), Tesis de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México.
- Torres C M, Revah S, Hinojosa M A, Paez M F, Morales V (1993) Biological

Process for the elimination of sulphur compounds present in gas mixture  
U.S. Patent 5,236,677.

Uribe, S., J. Ramirez, and A. Peña (1985). Effects of  $\beta$ -pinene on yeast membrane functions. *J. Bacteriol.* **161**: 1195-1200.

Velasco, J.A. (2001). *Evaluación de los parámetros que determinan la oxidación biológica de tiosulfato en azufre elemental*. Tesis de grado de Maestría, Universidad Autónoma Metropolitana. México.

Widell, F. (1988) Microbiology and ecology of sulphate and sulfur reducing bacteria  
En: Zehnder, A.J.B. (Ed.), *Biology of anaerobic microorganisms*, Wiley, New York, pp. 469-585

## 7 NOMENCLATURA

<b>Símbolo</b>	<b>Significado</b>
°C	Grados centígrados
°C/min	Grados centígrados por minuto
d <sup>-1</sup>	Días a la menos uno (tasa de dilución)
g	Gramos
g/l	Gramos por litro
g/l/d	Gramos por litro por día
kJ/mol	Kilo-Joul por mol
L	Litros
Log P <sub>ow</sub>	Logaritmo natural del coeficiente de partición
M	Concentración molar
m/h	Metros por hora
mM	Concentración milimolar
min	Minutos
ml	Mililitros
mg	Miligramos
mm	Milímetros
mg/l	Miligramos por litro
ml/l	Mililitros por litro
ml/min	Mililitros por minuto
mg/l/d	Miligramos por litro por día
msnm	Metros sobre el nivel del mar
m <sup>3</sup> /h	Metros cúbicos por hora
m <sup>3</sup> /min	Metros cúbicos por minuto
m <sup>3</sup> /d	Metros cúbicos por día
mgHS <sup>-</sup> /g <sub>proteína</sub> *min	Miligramos de sulfuro por gramo de proteína por minuto
mgO <sub>2</sub> /g <sub>proteína</sub> *min	Miligramos de oxígeno por gramo de proteína por minuto
N	Concentración normal
nm	Longitud de onda en nanómetros
ORP	Potencial de óxido-reducción
%	Porcentaje
pH	Potencial Hidrógeno
ppm	Concentración en partes por millón
ppmv	Partes por millón por unidad de volumen
rpm	Revoluciones por minuto
μl	Microlitros
μm	Micrómetros