

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



OXIDACION BIOLOGICA (Thiobacillus) DE  
GASES AZUFRADOS Y USO DEL EFLUENTE  
COMO FERTILIZANTE AGRICOLA

POR

HUMBERTO RODRIGUEZ FUENTES

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS  
CON ESPECIALIDAD EN AGUA-SUELO

MARIN, N. L., MEXICO. SEPTIEMBRE DE 1997

TD  
S639  
R6  
c.1



1080071704

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE AGRONOMIA

SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

FACULTAD DE AGRONOMIA



DT 2  
252

## OXIDACION BIOLOGICA (Thiobacillus) DE GASES AZUFRADOS Y USO DEL EFLENTE COMO FERTILIZANTE AGRICOLA

Oxidación Biológica (*Thiobacillus*) de Gases Azufrados y Uso del Efluente

Efluente como Fertilizante Agrícola

POR

(POFIF)

HUMBERTO RODRIGUEZ FUENTES

Por

COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS  
CON ESPECIALIDAD EN AGUA-SUELO

Como requisito para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS

con Especialidad en Agua-Suelo

Marín, N.L., México. Septiembre de 1997

MARIN, N. L., MEXICO. SEPTIEMBRE DE 1997

TD  
5639  
R6

C n  
1957  
BIBLIOTECA  
UAN  
FONDO  
TESIS  
(71704)

BURTON RANGEL FINE  
UANL  
FONDO  
TESIS DOCTORAL

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE AGRONOMIA**

**SUBDIRECCION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



**Oxidación Biológica (*Thiobacillus*) de Gases Azufrados y Uso del  
Efluente como Fertilizante Agrícola**

**Por**

**Humberto Rodríguez Fuentes**

**Como requisito para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS AGRICOLAS  
con Especialidad en Agua-Suelo**

**Marín, N.L., México. Septiembre de 1997**

Oxidación Biológica de Gases Azufrados (*Thiobacillus*) y Uso del Efluente como Fertilizante Agrícola

Aprobación de la Tesis

Dr. Rigoberto González González  
Asesor Principal

Dr. Rigoberto E. Vázquez Alvarado  
Co-asesor

Dr. Juan F. Pissani Zúñiga  
Co-asesor

Dr. Emilio Olivares Sáens  
Co-asesor

Dr. Antonio Hinojosa Martínez  
Co-asesor

Dr. Francisco Závila García

Subdirector de Estudios de Postgrado de la Facultad de Agronomía

**Este Trabajo de Investigación fue realizado en el Laboratorio de  
Biotecnología Microbiana y el Campo Experimental de la Facultad de  
Agronomía de la U. A. N. L.**

**y**

**El Centro Experimental de Biotecnología Ambiental Aplicada, del Grupo  
Cydsa S. A. de C. V.**



**Nada real puede ser amenazado.**

**Nada irreal existe.**

**En esto radica la paz de Dios.**

## **DEDICATORIA**

A mi esposa Kattya, que con el propósito de seguir Aprendiendo nos acompañamos con Amor en esta Fascinante Aventura que es la Vida.

A mis Hijos, Amiel Helena y Aldo por desear nacer y aprender a nuestro lado.

A mis Padres, Humberto y Gloria Elena, por su Ejemplo y Amor que siempre me han regalado.

A mis hermanas, Mayella, Gabriela y Sandra Judith por brindarme siempre su valioso apoyo y Amor.

A mi sobrina Ana Nayelly por estar con nosotros

A mi cuñado Cesar Germán y sobrinos Mauricio y Andrea.

A mis familiares “Ticos”, mis Suegros, Don Rubén, Doña Elena, mi cuñado Rubén y su esposa Rosa y mis cuñadas Dora Emilia y Gina y a mis sobrinos Vivian, Eduardo, Macho, Ginarely, Felix, Rubén y Leonardo con mucho cariño.

A mis dos contrastantes Concuños Ticos, Felix y Enrique.

A mis Amigos muy Estimados, Alejandro Del Bosque, Ernesto Sánchez, José Manuel Sépulveda, Raúl Salazar y Elias Treviño a través de los cuales sigo aprendiendo lecciones.

A la Estadística que permitió que “Los Estadísticos” consolidaran una amistad.

Muy Especialmente a Javier Topete, Sandra González e Hijos por enseñarme a ser mejor persona y por regalarme la oportunidad de disfrutar su amistad junto con mi Esposa e Hijos en este Tiempo y Espacio en el que escogí Vivir.

A Samuel Domínguez con sincero afecto por su fraterna disposición y apoyo para conmigo.

Y a Todas aquellas Personas que de alguna manera han contribuido a que mi proceso de aprendizaje sea permanente.

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Rigoberto González González por apoyarme profesionalmente en el desarrollo de este proyecto y por brindarme su sincera Amistad

Al Dr. Rigoberto Vázquez Alvarado por su apoyo permanente en mi superación académica y por su colaboración en la asesoría y revisión de este trabajo de tesis

Al Dr. Juan F. Pissani Zuñiga, por su entusiasmo y constante apoyo hacia mi persona, así como por sus comentarios oportunos durante el proyecto de tesis y en la revisión del escrito.

Al Dr. Emilio Olivares Sáens por la asesoría brindada durante el transcurso de este proyecto, así como por su trato honesto y sincero que me ha permitido crecer como persona.

Al Dr. Antonio Hinojosa Martínez por apoyar incondicionalmente la realización de este proyecto y por sus valiosos comentarios

A la M. C. Lourdes Ugarte por brindarme su amistad y entusiasmo constante que me permitió desarrollar este proyecto y a través del cual sigo descubriendo el fascinante mundo en el que la Biotecnología puede contribuir al bienestar del hombre

Al IIA. Craso Mauricio Acosta Rentaría por enseñarme de Biotecnología, por sus valiosas aportaciones en el escrito de esta Tesis y por permitirme compartir su apreciable y sincera amistad.

Al M. Sc. Walter Hugler Quintanilla por su colaboración y apoyo que me brindó para el desarrollo de este proyecto

Al Grupo Cydsa (Celulosa y Derivados, S. A.) por apoyar económicamente y logísticamente el desarrollo de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por apoyarme con la Beca para obtener el grado de Doctor en Ciencias.

Al Dr. Juan F. Villarreal Arredondo por apoyarme en esta iniciativa de prepararme académicamente

A todo el personal que labora en Centro Experimental de Biotecnología Ambiental Aplicada por el gran apoyo que recibí de su parte, en especial a el Ing. José Luis Benavente, Ing. Gilberto Sánchez, Ing. Jesús Alvarez, Ing. Sonia Marmolejo e Ing. David Garza

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

### **Humberto Rodríguez Fuentes**

Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias Agrícolas con Especialidad en Agua - Suelo.

#### **Tesis:**

Oxidación Biológica de Gases Azufrados (*Thiobacillus*) y Uso del Efluente como Fertilizante Agrícola.

#### **Areas de Estudio:**

Agronomía (Fertilidad de suelos, Microbiología). Biotecnología Ambiental.

#### **Datos Personales :**

Nacido el 12 de junio de 1957 en Durango, Dgo. Hijo de Gloria Elena Fuentes Molano y Humberto Rodríguez Ramírez.

#### **Educación:**

- i). Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León como Ingeniero Agrónomo Fitotecnista, en julio de 1979.
- ii). Egresado del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza / Universidad de Costa Rica (CATIE/UCR) como *Magister Scientiae* en Ciencias Agrícolas y Especialista en Suelos y Cultivos Tropicales; en abril de 1985.

#### **Experiencia Profesional:**

- i). Investigador y Encargado del Programa de Suelos. Campo Agrícola Experimental Mixteca Oaxaqueña. Yanhuitlan, Oaxaca, México. Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas. 1979 - 1980.
- ii). Maestro de Tiempo Completo. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. 1980 a la fecha.
- iii). Jefe del Laboratorio de Suelos, Plantas y Aguas Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. 1982 - 1983.
- iv). Secretario Académico. Sub-Dirección de Estudios de Postgrado. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. 1991 - 1994.

#### **Otros:**

- i). Miembro del Sistema Nacional de Investigadores como Candidato a Investigador Nacional. 1990 - 1993 y 1993 - 1994.
- ii). Reconocimiento por los Altos Méritos en el Desarrollo de Actividades en el Area de Investigación. Universidad Autónoma de Nuevo León. 1993.

## INDICE

	Página
LISTA DE CUADROS.....	xi
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMEN.....	xiv
SUMMARY.....	xv
I. INTRODUCCION.....	1
1.1. Hipótesis.....	3
1.2. Objetivos.....	3
2. REVISION DE LITERATURA.....	4
2.1. Características de los microorganismos litótrofos.....	4
2.2. El género <i>Thiobacillus</i> .....	5
2.3. El uso de <i>Thiobacillus</i> como oxidante de gases azufrados.....	7
2.4. Antecedentes sobre el uso de especies puras de <i>Thiobacillus</i> en procesos de oxidación de H <sub>2</sub> S y CS <sub>2</sub> .....	9
2.5. El pH como factor de la oxidación biológica de gases azufrados.....	9
2.6. El azufre en el suelo.....	10
2.7. Importancia del azufre como fertilizante.....	11
2.8. Antecedentes sobre el uso de fertilizantes agrícolas resultante de biolicores provenientes de la oxidación biológica de H <sub>2</sub> S y CS <sub>2</sub> .....	12
3. MATERIALES Y METODOS.....	14
3.1. Primera Etapa.....	14
3.1.1. Multiplicación de <i>Thiobacillus</i> .....	14
3.1.2. Experimentos de bio-oxidación en laboratorio.....	16
3.1.3. Variables evaluadas en el experimento de laboratorio.....	19
3.2. Experimento de bio-oxidación en el sistema flujo cruzado nivel planta piloto industrial.....	19
3.2.1. Descripción de los componentes del reactor flujo cruzado y del proceso de bio-oxidación de gases azufrados.....	20

3.2.2. Variables evaluadas en el reactor flujo cruzado.....	21
3.2.3. Métodos analíticos empleados.....	23
3.3. Segunda Etapa.....	23
3.3.1. Experimento de bio-oxidación en el reactor Biocyd I nivel planta piloto industrial.....	23
3.3.2. Descripción de los componentes del reactor Biocyd I y del proceso de bio-oxidación de gases azufrados.....	24
3.3.3. Variables evaluadas en el reactor Biocyd I.....	24
3.3.4. Métodos analíticos empleados.....	26
3.4. Experimento de campo (aplicación de los biolicores como fertilizantes agrícolas).....	26
4. RESULTADOS Y DISCUSION.....	30
4.1. Tiempo de duración de los experimentos en el laboratorio para determinar la capacidad de bio-oxidación de especies de <i>Thiobacillus</i> .....	30
4.2. Experimentos de combinaciones de cuatro especies de <i>Thiobacillus</i> sobre la capacidad de oxidación de un compuesto azufrado, nivel laboratorio .....	30
4.2.1. Variable pH.....	30
4.2.2. Variable sulfatos.....	36
4.2.3. Proteína y tiempo de generación.....	38
4.3. Experimento de bio-oxidación en el reactor flujo cruzado, nivel planta piloto industrial.....	39
4.4. Experimento de bio-oxidación en el reactor Biocyd I .....	43
4.5. Experimento de campo. Producción de materia seca de sorgo forrajero (Primero y segundo corte).....	45
4.5.1. Absorción de nitrógeno, potasio y azufre por el sorgo forrajero (Segundo corte).....	47
5. CONCLUSIONES.....	50
6. RECOMENDACIONES.....	52
7. LITERATURA CITADA.....	53
8. APENDICE.....	58

## LISTA DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Características generales de cuatro especies de <i>Thiobacillus</i> (Kelly y Harrison, 1989).....	7
2	Medios de cultivo empleados y condiciones de manejo para la multiplicación de cuatro especies de <i>Thiobacillus</i> .....	15
3	Medio de cultivo que se empleó en los experimentos de bio-oxidación en el laboratorio.....	17
4	Combinaciones de especies de <i>Thiobacillus</i> que se evaluaron en el laboratorio .....	18
5	Características físico-químicas del suelo del Campo Experimental de la FAUANL.....	27
6	Composición química de los biolicores empleados en el experimento de campo.....	27
7	Tratamientos evaluados en el experimento de campo en la FAUANL.....	28
8	Curva de crecimiento para determinar el tiempo de generación de las especies de <i>Thiobacillus</i> .....	30
9	Concentración promedio de azufre oxidado como sulfato y eficiencia de oxidación del sulfuro a sulfato cuando el pH inicial fue 4.0 y 7.0.....	38
10	Crecimiento en base a proteína total y tiempo de generación en las combinaciones de <i>Thiobacillus</i> .....	40
11	Carga total de gases (H <sub>2</sub> S + CS <sub>2</sub> ) como azufre y velocidad de remoción total en el reactor flujo cruzado.....	41
12	Comparación de medias de las variables evaluadas en el experimento de bases en el reactor Biocyd I.....	44
13	Producción de materia seca de sorgo forrajero en el primer corte, segundo corte y total.....	46
14	Absorción total de nitrógeno, potasio y azufre por el cultivo de sorgo forrajero (Segundo corte).....	48

## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1 Reactor Flujo Cruzado.....	22
2 Reactor Biocyd I.....	25
3 Interacciones significativas entre las especies AB ( <i>Thiobacillus denitrificans</i> y <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> ), incisos (a) y (b) cuando el pH inicial fue de 4 ó 7.....	31
3a Interacciones significativas entre las especies AC ( <i>Thiobacillus denitrificans</i> y <i>Thiobacillus thiooxidans</i> ) incisos (c) y (d), cuando el pH inicial fue de 4 ó 7.....	32
4 Interacciones significativas entre una especie y las demás combinaciones en función del pH inicial (4 o 7) del medio de cultivo en que se inocularon. Inciso (a) la especie A ( <i>Thiobacillus denitrificans</i> ), inciso (b) la especie B ( <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> ).....	34
4a Interacciones significativas entre una especie y las demás combinaciones en función del pH inicial (4 o 7) del medio de cultivo en que se inocularon. Inciso (c) la especie D ( <i>Thiobacillus thioparus</i> ).....	35
5 Relación entre la carga de gases ( $H_2S + CS_2$ ) y la velocidad de remoción. reactor flujo cruzado. Los valores de carga fueron agrupados de menor a mayor.....	42
6 Resultados obtenidos entre la carga total de gases ( $H_2S + CS_2$ ) la velocidad de remoción total en el reactor flujo cruzado a través del tiempo.....	42



## APENDICE

Cuadro		Página
A1	Concentrado de los análisis de varianza para las variables incremento de pH, incremento de proteína e incremento de sulfatos. Evaluación de la capacidad oxidativa de Na <sub>2</sub> S por cuatro especies de <i>Thiobacillus</i> en matraz.....	58
A2	Efecto de la oxidación biológica de Na <sub>2</sub> S sobre el pH del medio de cultivo considerando las 4 especies de <i>Thiobacillus</i> con una concentracion inicial de proteina de 400 µg/ml. pH inicial fue = 4.0.....	59
A3	Efecto de la oxidación biológica de Na <sub>2</sub> S sobre el pH del medio de cultivo considerando las 4 especies de <i>Thiobacillus</i> con una concentracion inicial de proteina de 400 µg/ml. pH inicial fue = 7.0.....	60
A4	Concentrado de los análisis de varianza para las variables producción de materia seca (primer corte), producción de materia seca (segundo corte) y producción de materia seca total (primer corte + segundo corte). Experimento de biolicores como fertilizantes agrícolas.....	61
A5	Concentrado de los análisis de varianza para las variables nitrógeno total, potasio total y azufre total absorbidos en el segundo corte. Experimento de biolicores como fertilizantes agrícolas.....	62

## RESUMEN

Humberto Rodríguez Fuentes

Fecha de Graduación: Octubre de 1997

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Agronomía

**Título del Estudio: Oxidación Biológica de Gases Azufrados (*Thiobacillus*) y Uso del Efluente como Fertilizante Agrícola**

**Número de Páginas: 62**

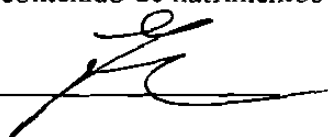
**Candidato para el Grado de Doctor en Ciencias  
Agrícolas con Especialidad en Agua-Suelo**

**Áreas de Estudio:** Biotecnología Ambiental (Microbiología). Agronomía (Fertilidad del Suelo).

**Propósitos y Métodos de Estudio:** Las hipótesis de este trabajo fueron: 1. Las diferentes especies de *Thiobacillus* oxidan compuestos azufrados por lo tanto la inoculación con mezclas de especies puras puede lograr remociones altas y estables de ácido sulfhídrico y disulfuro de carbono. 2. El hidróxido de sodio usado para amortiguar el pH del biollicor no afecta la operación del proceso Biocyd<sup>®</sup> por lo tanto, el uso de álcalis diferentes pudieran no afectar dicho proceso y 3. Los biollicores del proceso Biocyd<sup>®</sup> contienen diferentes niveles de nutrientes esenciales por lo tanto, estos podrían ser empleados como fertilizantes agrícolas. Los propósitos de la investigación fueron: Evaluar la capacidad de oxidación de ( $H_2S + CS_2$ ) por cuatro especies puras de *Thiobacillus*, así como evaluar en la operación del proceso Biocyd<sup>®</sup> el uso de tres álcalis; para amortiguar el pH del biollicor y establecer la posibilidad de utilizar los biollicores como fertilizantes agrícolas. Para lograrlo, en el laboratorio se cultivaron y mezclaron las 4 especies puras de *Thiobacillus*, y posteriormente se inocularon en un reactor y se evaluó la capacidad de oxidación de  $H_2S$  y  $CS_2$ . En otro reactor se evaluó el comportamiento del proceso Biocyd<sup>®</sup> usando los tres álcalis para amortiguar el pH que se genera en el proceso. Los biollicores obtenidos se usaron como fertilizante y se determinó su efecto en la producción de materia seca de sorgo forrajero.

**Contribuciones y Conclusiones:** La inoculación con la mezcla de las 4 especies puras de *Thiobacillus* no logró generar un estado estable. Sin embargo, la velocidad de remoción total de  $H_2S + CS_2$  presentó valores promedio apropiados. Los resultados indican que es factible la sustitución de hidróxido de sodio por el hidróxido de potasio como álcali para regular el pH del biollicor en el proceso Biocyd<sup>®</sup>. Se establece la posibilidad de usar el biollicor de hidróxido de potasio como fertilizante. Se puede disponer de este biollicor aplicándolo a suelos agrícolas sin disminuir el rendimiento de sorgo y pudiera incrementarse la producción de materia seca debido al contenido de nutrientes del biollicor.

FIRMA DEL ASESOR PRINCIPAL:



## SUMMARY

Humberto Rodríguez Fuentes

Graduation: October, 1997

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Agronomía

Title of the Research Work: **Biotechnological Sulphide (*Thiobacillus*) Remove And Use Byproducts As Agricultural Fertilizers**

Number of pages: 62

**Candidate to obtain the Doctor in Agricultural Sciences Degree. Water and Soil Sciences**

**Subjects of the Research Work:** Environmental Biotechnology. (Microbiology). Agronomy (Soil Fertility).

**Aims and Methods of the Research Work:** The hypothesis of this work were: 1. Several species of *Thiobacillus* oxidize sulfur compounds; therefore the inoculation with mixtures of pure species may achieve high and stable removals of sour sulphide acid ( $H_2S$ ) and carbon disulphide ( $CS_2$ ); 2. Sodium hidroxide used in order to buffer the pH of the subproduct (liquid) does not affect the operation of the process Biocyd<sup>®</sup>; therefore, the use of different alkalies may not affect the process and 3. The subproducts of the process Biocyd<sup>®</sup> contain several levels of essential nutriments; therefore, these subproducts may as be used like agricultural fertilizers. The purposes of the investigation were: Evaluating the capacity of oxidation of  $H_2S$  and  $CS_2$  for four pure strains of *Thiobacillus*, as well as evaluate the use of three alkalies in the operation of the process Biocyd<sup>®</sup>, in order to buffer the pH of the subproducts and establish the possibility of using the subproducts as agricultural fertilizers. In order to achive it, *Thiobacillus* were cultivated in the laboratory. The four pure species of *Thiobacillus* were mixed and were inoculated in a reactor (trickling filter). It was evaluated the capacity of oxidation of  $H_2S$  and  $CS_2$ . In another reactor the behavior of the process Biocyd<sup>®</sup> was evaluated using the three alkalies in order to buffer the pH that is generated in the process. The obtained subproducts were used as fertilizer and their effect in the production of dry matter from forage sorghum was determinated.

**Contributions and Conclusions:** The inoculation of the mixture of four species of *Thiobacillus* was not able to generate a steady state. However, the speed of total removal of  $H_2S$  and  $CS_2$  presented appropriate values. Results indicated that it was feasible the substitution of sodium hidroxide for the potassium hidroxide as alkali in order to regulate the pH of the subproduct in the process Biocyd<sup>®</sup>. It was established the possibility of using the subproduct of potassium hidroxide as fertilizer. Results showed that it possible to apply subproduct to agricultural soils without affecting yield of sorghum and this dry matter production could be increased due to the nutrient content of the subproduct.

MAIN ADVISOR SIGNATURE:



## I INTRODUCCION

En zonas con alto desarrollo industrial y casi siempre como parte final de los diversos procesos de producción, se generan una gran cantidad de residuos (en forma de gases, sólidos o líquidos) que en la gran mayoría de los casos son considerados tóxicos para el hombre y que no tienen ninguna utilidad posterior. Las descargas industriales de desechos gaseosos contienen compuestos orgánicos volátiles y algunos inorgánicos oxidables; muchos de estos compuestos descargados a la atmósfera y que son de mal olor pueden ser percibidos por el ser humano a muy bajas concentraciones, tal es el caso del ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) que su olor es perceptible en aire fresco a una dilución de 0.002 mg/L de aire y en el caso del bisulfuro de carbono ( $CS_2$ ) puede percibirse por su olor en concentraciones de 3.17 mg/L (Buisman, *et al.*, 1991).

En el Estado de Nuevo León, no existe la norma técnica de emisión a la atmósfera para el  $H_2S$  ni para el  $CS_2$ ; solo existen normas de trabajo laboral para ambos gases, las cuales son establecidas por instituciones nacionales e internacionales; aunque esto no significa que en el futuro no se vayan a implementar. En países como Estados Unidos de América, Japón y los Europeos estas normas ya existen; por ejemplo en Alemania, las normas de emisiones gaseosas han sido restringidas a  $0.1 \text{ g/m}^3$  para empresas que emitan más de 2 Kg/h de  $CS_2$  (Plas, *et al.*, 1993).

Diversos investigadores (Gadre, 1989; Buisman *et al* 1990a; Windsperger, 1990) han reportado trabajos sobre la oxidación biológica de gases azufrados (principalmente de ácido sulfhídrico) realizadas en reactores a nivel planta industrial en los que no se menciona la identificación de los microorganismos que utilizaron (ya que la inoculación se hace con lodos activados), esto impide a otros investigadores el poder validar y establecer con detalle, entre otros; el manejo que se deberá tener en la operación del reactor en actividades tan importantes como el inóculo a utilizar y tiempo requerido para llegar a un estado estable de eficiencia en la remoción de los gases contaminantes.

Srivastava (1993); Plas, *et al.* (1992) señalan que las mezclas de especies de *Thiobacillus* en este tipo de investigaciones presentan mayores tasas de oxidación de gases azufrados comparadas con especies únicas.

En los últimos cuatro años la empresa Grupo Cydsa S.A. de C.V. en Monterrey, Nuevo León, México, ha patentado y desarrollado un sistema biotecnológico para el control de gases registrado como Biocyd<sup>®</sup>, actualmente el biolico generado en el proceso Biocyd<sup>®</sup> se descarga a una planta de tratamiento de agua que es propiedad de Cydsa; ya que en investigaciones previas realizadas por esta empresa, este biolico no presentó ninguna utilidad agronómica debido a que la composición química de este, es muy alta en sodio; ya que para neutralizar el pH ácido del biolico se emplea el hidróxido de sodio. El cual es altamente dañino para los cultivos agrícolas.

Es importante desarrollar alternativas que contribuyan a aprovechar estos biolicos. Es factible establecer que en el proceso Biocyd<sup>®</sup> se pueda usar el biolico como un fertilizante agrícola si se reemplaza el álcali que actualmente se emplea para neutralizar el pH del biolico. Lo anterior esta fundamentado en que en su composición están presentes además de masa celular de *Thiobacillus*, formas químicas asimilables de nutrimentos ( $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$  y algunos micronutrimentos metálicos), que son considerados como esenciales para los cultivos agrícolas.

## **1.1 Hipótesis:**

1. Las diferentes especies de *Thiobacillus* oxidan compuestos azufrado por lo tanto la inoculación con mezclas de especies puras puede lograr remociones altas y estables de ácido sulfhídrico y disulfuro de carbono.
2. El hidróxido de sodio usado para amortiguar el pH del biollicor no afecta la operación del proceso Biocyd<sup>®</sup> por lo tanto, el uso de álcalis diferentes pudieran afectar dicho proceso.
3. Los biollicores del proceso Biocyd<sup>®</sup> contienen diferentes niveles de nutrimentos esenciales por lo tanto estos podrían ser empleados como fertilizantes agrícolas.

## **1.2 Objetivos**

1. Evaluar en el proceso Biocyd<sup>®</sup> la capacidad de oxidación de gases azufrados ( $H_2S + CS_2$ ) por la mezcla de cuatro especies puras de *Thiobacillus* en un reactor a escala piloto industrial.
2. Evaluar en la operación del proceso Biocyd<sup>®</sup> el uso de hidróxido de potasio e hidróxido de amonio para amortiguar el pH del biollicor en un reactor a escala industrial.
3. Evaluación y análisis nutromental de la producción de forraje en el cultivo de sorgo a través de la adición al suelo de biollicores provenientes de la oxidación biológica de gases azufrados.

## 2. REVISION DE LITERATURA

### 2.1. Características de los microorganismos litótrofos

Los organismos que pueden obtener su energía de la oxidación de los compuestos inorgánicos se llaman litótrofos. La mayor parte de las bacterias litótrofas son capaces de obtener para la biosíntesis todo su carbón a partir del  $\text{CO}_2$  y por consiguiente también son autótrofos, por lo que son llamadas quimiolitótrofos.

Ciertos litótrofos del azufre son incapaces de crecimiento autotrófico, por ejemplo, *Beggiatoa*, ciertas pseudomónadas y una especie de *Thiobacillus*, *Thiobacillus perometabolis*, caen dentro de esta categoría. La mayor parte de los litótrofos restantes son verdaderos autótrofos (Brock y Madigan, 1993).

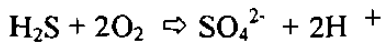
Se necesitan dos componentes cuando un organismo se desarrolla con  $\text{CO}_2$  como fuente única de carbón: energía en forma de ATP (trifosfato de adenosina) y energía reductora. En los quimiolitótrofos, la generación de ATP es similar a la de los organotrofos (organismo que obtiene energía y carbón a partir de compuestos orgánicos), excepto que la fuente de energía (donador de electrones) es una sustancia inorgánica (por ejemplo,  $\text{H}_2\text{S}$ ,  $\text{CS}_2$ ,  $\text{H}_2$  y  $\text{NH}_3$ ) en lugar de una orgánica. Así el ATP se acopla a la oxidación del donador de electrones.

Los organotrofos pueden utilizar compuestos como la glucosa como fuente de carbón y de energía. La mayor parte de los litótrofos utilizan el  $\text{CO}_2$  como fuente de carbón por lo cual son autótrofos.

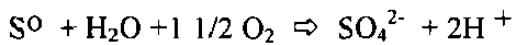
Muchos compuestos de azufre reducido se pueden utilizar como donadores de electrones por bacterias del género *Thiobacillus* (llamadas incoloras), los compuestos de azufre más comúnmente utilizados como fuente de energía son el ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ), azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) y el tiosulfato ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ). El producto final de la oxidación del azufre es en la mayor parte de los casos sulfato y el número total de electrones que intervienen entre el  $\text{H}_2\text{S}$  (estado de oxidación -2) y el  $\text{SO}_4^{2-}$  (estado de oxidación +6) es 8. Se dispone de menos energía cuando se usa uno de los estados intermedios de oxidación del azufre. Kelly (1985) menciona que el proceso de oxidación del sulfuro por parte de *Thiobacillus* es el siguiente:

Limite de la membrana -- Sulfuro  $\Rightarrow$  Polisulfuro  $\Leftrightarrow$  Azufre elemental Polisulfuro  $\Leftrightarrow$   
Sulfito  $\Leftrightarrow$  Sulfato

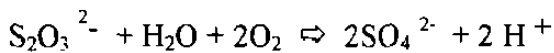
Las siguientes reacciones biológicas pueden ocurrir en un sistema de remoción aeróbico de sulfuros bajo condiciones de pH ácido.



sulfuro -170.6 kJ / reacción



azufre -589.1 kJ / reacción



tiosulfato -409.4 kJ / reacción

La oxidación del compuesto de azufre más reducido ( $\text{H}_2\text{S}$ ) se efectúa en etapas, y el primer paso en la oxidación da como resultado la formación de azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) un material altamente insoluble. Algunas de las bacterias oxidantes del  $\text{H}_2\text{S}$  depositan el azufre elemental formado dentro de sus células. El azufre depositado como resultado de la oxidación inicial es una reserva de energía y cuando el suministro de  $\text{H}_2\text{S}$  se agota, se puede obtener energía adicional de la oxidación del azufre elemental depositado; en muchas ocasiones, este azufre formado, se encuentra asociado a polisulfuros, los cuales le dan un carácter hidrofílico (Pronk *et al.*, 1990).

## 2.2. El género *Thiobacillus*

Los miembros del género *Thiobacillus* son Gram negativos, no esporulantes miden de 0.5 a 1 -3  $\mu$ , son polarmente flageladas excepto *T. novellus*. Todos los miembros de este género usan compuestos reducidos de azufre como donadores de electrones y  $\text{CO}_2$  como fuente de carbón. Unos pocos *Thiobacillus* pueden crecer también de manera heterotrófica con donadores de electrones orgánicos y, en tales condiciones, se parecen a las pseudomonas.



***Thiobacillus thioparus***. Es una bacteria estrictamente aeróbica, la cual crece rápidamente en un medio mineral conteniendo tiosulfato y frecuentemente deposita grandes cantidades de azufre molecular. Estos depósitos de azufre molecular son especialmente comunes sobre placas de agar y dan a las colonias una apariencia como de leche blanca a amarillo canario. Algunas razas, particularmente aquéllas aisladas de aguas producen una mucosa pegajosa sucia, en la cual la bacteria esta embebida y por esto, tiene la apariencia de inmóvil. Masas concentradas de *T. thioparus* aparecen con un color naranja brillante a un rojo, como resultado de su alto contenido de citocromo C. La diferencia del espectro de este citocromo muestra la máxima absorción a 420, 522 y 552 nm. El organismo crece más rápidamente a pH cercano a 7, y a temperaturas de 30 °C.

***Thiobacillus denitrificans***. Esta muy relacionada a *T. thioparus*; difiere de esta última, solo en su habilidad para usar nitratos como un aceptor de electrones en la respiración terminal bajo condiciones anaeróbicas. *T. denitrificans* es un autótrofo obligado; como otras bacterias denitrificantes puede crecer bajo aire en la ausencia del nitrato, pero pierde rápidamente su habilidad denitrificadora en cultivo aeróbico. Cultivada aerobicamente no se puede distinguir de *T. Thioparus*.

***Thiobacillus thiooxidans***. Crece mejor a pH menor de 5; aparte de su hábitat ácido, esta bacteria es principalmente distinguida por su habilidad para oxidar azufre elemental en una tasa igual a la de tiosulfato, en contraste a *T. thioparus* y *T. denitrificans*, los cuales oxidan azufre elemental más lentamente.

***Thiobacillus ferrooxidans***. Es una bacteria que oxida azufre y fue asignada a este género debido a que, es un autótrofo obligado; puede usar tiosulfato como donador de electrones y es morfológicamente idéntico a *T. thiooxidans* y a *T. thioparus*. Aunque *T. ferrooxidans* es favorecido en el mismo rango de pH que *T. thiooxidans*, puede ser diferenciado de éste, por su habilidad para oxidar a azufre elemental rápidamente. *T. ferrooxidans* difiere de todos los demás *Thiobacillus* conocidos por su habilidad, (de la cual deriva su nombre) para usar  $Fe^{2+}$  en lugar de tiosulfato como donador de electrones. Cultivos repetidos de esta especie sobre medios que contienen fierro, ocasionan pérdida de su habilidad para oxidar tiosulfato, aunque las células que crecieron

en tiosulfato, son aún capaces de oxidar sales ferrosas. (Vishniac y Santer, 1952, Kelly y Harrison, 1989).

En el Cuadro 1 se muestran algunas características de las cuatro especies de *Thiobacillus*.

Cuadro 1. Características generales de cuatro especies de *Thiobacillus* (Kelly y Harrison, 1989).

Característica	<i>Thiobacillus denitrificans</i>	<i>Thiobacillus thioparus</i>	<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>
Temperatura Optima °C	28 a 32	25 a 30	28 a 30	30 a 35
pH Optimo	6 a 8	6 a 8	2 a 5	1.5 a 4
Aerobiosis	Promedio =7 Anaeróbico Facultativo	Promedio =7 Aeróbico	Promedio = 3.5 Aeróbico	Promedio =2.75 Aeróbico
Valores de pH*	5.0 a 5.5	3.5 a 4.0	0.6	1.0
Donador de Electrones	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup> y S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	H <sub>2</sub> S, S <sup>0</sup> y S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	S <sup>0</sup>	S <sup>0</sup> y Fe <sup>2+</sup>

\*Estos valores se generan cuando se cultivan con azufre o tiosulfato

### 2.3. El uso de *Thiobacillus* como oxidante de gases azufrados

Aunque la biofiltración (remoción u oxidación por microorganismos de compuestos con mal olor) es poco conocida en Estados Unidos de América, esta tecnología que se emplea para el control del mal olor, ha sido usada por más de 20 años en Europa y Japón se ha estimado que el 40% de los tratamientos de aguas de desecho en Alemania emplean los biofiltros para el control del mal olor.

La principal ventaja de emplear esta tecnología es su bajo costo. Un estudio previo indicó, que entre las tecnologías más comunes y disponibles para el control de la contaminación del aire, la biofiltración es la que tiene el menor costo para flujos de gases

de baja concentración. Esto también ha sido mostrado a gran escala en sistemas de biofiltros que remueven H<sub>2</sub>S (Yang, 1993).

Una gran variedad de bacterias son capaces de oxidar H<sub>2</sub>S y de aquí, que sirvan como alternativas para generar tecnología de desulfurización de gases.

Las bacterias fotosintéticas pertenecientes a las familias *Chromatiaceae* y *Chlorobiaceae* es conocido que metabolizan H<sub>2</sub>S con alta eficiencia. Un proceso que emplea a *Chlorobium thiosulfatophilum* para remover H<sub>2</sub>S de una corriente gaseosa fue desarrollado por Cork *et al.* (1985); en un reactor con agitación, el cual alcanzó eficiencias de remoción del 99.5 %. El azufre elemental fue el principal producto final del H<sub>2</sub>S oxidado (67.1 %) mientras que el 32.8 % fue convertido a compuestos de azufre muy solubles en agua.

La principal desventaja en el uso de bacterias fotosintéticas a gran escala, está ligado con su naturaleza anaeróbica, su requerimiento de energía radiante y su extremadamente gran superficie de exposición que se requiere. (Gadre, 1989; Buisman *et al.*, 1990).

Buisman *et al.* (1989) comparando la remoción de H<sub>2</sub>S entre *Chlorobium thiosulfatophilum* y un consorcio de bacterias azufrosas incoloras (*Thiobacillus*, *Sulfolobus* y *Thermothrix*) reportó tasas de oxidación más bajas con el primer microorganismo (67mg/Lh) que con las segundas (415 mg/Lh); esto coincide con lo reportado por Eckenfelder *et al.* (1989).

Diversos autores (Buisman, *et al.*, 1989; Gadre, 1989; Cadenhead y Sublette, 1990; Ottengraf y Van Den Oever, 1983; Srivastava, 1993; y Yang, 1993) concuerdan en que el uso de la Biotecnología empleando bacterias del género *Thiobacillus* conllevan a eficiencias en la remoción en la mayoría de los casos, de más de un 95 %. Sin embargo, muchos de estos trabajos se han desarrollado a partir de sulfuros (Na<sub>2</sub>S·8H<sub>2</sub>O) o sólo con H<sub>2</sub>S además que los trabajos se han realizado con reactores a escala pequeña (desde 50 ml hasta 5 l). Pocos trabajos se han desarrollado sobre corrientes continuas de H<sub>2</sub>S y CS<sub>2</sub> como el reportado por Yang (1993).

Por otra parte, Plas *et al.* (1993) mencionan que pocos investigadores han trabajado con la oxidación de CS<sub>2</sub> por *Thiobacillus*, por lo que la información es escasa; ellos reportan que especies del género *Thiobacillus* son capaces de usar el CS<sub>2</sub> como

fueron capaces de realizarlo. *Thiobacillus thioeparus* y *Thiobacillus thiooxidans* también concluyen que cuando las concentraciones de este gas excedan de 60 g CS<sub>2</sub>/m<sup>3</sup>, se deberán emplear para la remoción métodos físico químicos y no biológicos ya que se termina la actividad degradativa de las bacterias. Aunado a esto, en la investigación bibliográfica realizada se localizaron pocos reportes de investigadores que se hallan trabajado con la oxidación biológica de H<sub>2</sub>S y CS<sub>2</sub> mezclados.

#### **2.4. Antecedentes sobre el uso de especies puras de *Thiobacillus* en procesos de oxidación de H<sub>2</sub>S y CS<sub>2</sub>**

Srivastava (1993) y Plas *et al.* (1992) señalan que a nivel laboratorio la oxidación biológica de H<sub>2</sub>S y CS<sub>2</sub> en especies mezcladas de *Thiobacillus* presentan mayores tasas de oxidación comparadas con especies únicas. Por el contrario diversos investigadores (Candenhead y Sublette, 1990; Ongcharit *et al.* 1991; Sublette, 1987) consideran el uso de una sola especie de *Thiobacillus* en este tipo de trabajos de investigación.

Sin embargo, otros investigadores (Gadre, 1989; Buisman *et al.*, 1990a; Windsperger, 1990) han reportado trabajos sobre la oxidación biológica de gases azufrados (principalmente de ácido sulfhídrico) realizadas en reactores a nivel planta industrial en los que no se menciona la identificación de los microorganismos que utilizaron (ya que la inoculación se hace con lodos activados), esto impide a otros investigadores el poder validar y establecer con detalle, entre otros; el manejo que se deberá tener en la operación del reactor en actividades tan importantes como el inóculo a utilizar y tiempo requerido para llegar a un estado estable de eficiencia en la remoción de los gases contaminantes.

#### **2.5. El pH como factor de la oxidación biológica de gases azufrados**

Jespersen *et al.* (1993) mencionan que la degradación de contaminantes por microorganismos requiere además de fuente de carbón, un aceptor de electrones, nutrimentos, humedad, temperatura, y un pH apropiado del medio de cultivo. La fuente

de carbón puede ser el contaminante; para bacterias aeróbicas el aceptor de electrones es el oxígeno; la temperatura afecta tanto la cinética de las reacciones bioquímicas además de que destruye el contaminante y de que afecta el crecimiento de los microorganismos que están degradando. En procesos aeróbicos, la mayoría de los desechos se degradan en temperaturas que oscilan entre 15 a 40 °C. En cuanto al pH óptimo para la degradación, mencionan que dependerá del microorganismo.

Buisman *et al.* (1989) trabajando con *Thiobacillus* en un proceso de remoción de H<sub>2</sub>S, concluyen, que el pH óptimo para la mayor tasa de remoción de H<sub>2</sub>S varió en un rango de 8.0 a 8.5 y que a un pH de 9.5, la capacidad oxidativa del sulfuro en el sistema se deterioró; mencionan que la remoción fue significativamente más baja que en el pH óptimo, en el rango de 6.5 a 7.5. Cabe puntualizar que no reportan las especies de *Thiobacillus* con las cuales trabajaron. El consorcio fue colectado del drenaje.

Lo anterior se contrapone a lo que reporta Yang (1993); donde en un rango de pH de 2.9 a 5.3; las eficiencias de remoción de H<sub>2</sub>S fuerondel orden de 99 %. Sin embargo, solo menciona que se emplearon bacterias incoloras oxidantes del azufre. La concentración de H<sub>2</sub>S fue < 2000 ppm.

## 2.6. El azufre en el suelo

El azufre (S) es uno de los elementos más abundantes en la tierra, es un nutrimento esencial para las plantas (son 16 los elementos esenciales para ellas) en su forma inorgánica existe en diversos estados de oxidación : -2, 0, +2, y +6. Las plantas generalmente utilizan el estado de oxidación +6 que es SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> y esto es el resultado de la oxidación de las formas reducidas que deberán ocurrir antes de ser absorbido por los cultivos. Aunque, la oxidación abiotica del azufre puede ocurrir en el suelo, los microorganismos son los principales responsables de la oxidación del azufre. (Burns, 1967).

En muchos suelos en el mundo, se ha detectado que presentan deficiencias en este elemento, aún en lugares donde antes eran desconocidas éstas, las cuáles resultan por: haber empleado por mucho tiempo fertilizantes que contienen bajos niveles de S, por disminución en el uso de fungicidas a base de azufre, resultados positivos en los

programas de abatimiento de la contaminación por  $\text{SO}_2$  y por efecto de las propiedades fisico-químicas de los suelos (Tandon, 1985).

Diversas formas reducidas de azufre son frecuentemente agregadas al suelo; sin embargo, con todo y esto, se presentan deficiencias de este en las plantas. Cabe señalar, que no se puede asumir que los microorganismos oxidarán totalmente el azufre que se agregue a un suelo, ya que, como todos los procesos en los que intervienen los microorganismos, las tasas de oxidación estarán en función a factores relacionados con el ambiente (temperatura, humedad, pH, entre otros) y podrían encontrarse en una condición por abajo de la óptima en algunos suelos (Swift, 1985).

En los suelos de zonas templadas, la concentración de S presente puede variar en un rango de 100 a 15,000  $\mu\text{g/g}$ , de los cuales de 5 a 500  $\mu\text{g/g}$  es típicamente soluble en ácidos diluidos o en agua. En zonas húmedas de pastos, la mayor parte del azufre está en forma orgánica; mientras que, en suelos más secos existe principalmente como yeso ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) y sal de Epson ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ).

El azufre inorgánico es menos abundante que el orgánico, el sulfato es la forma inorgánica más común de S, aunque se ha establecido que en la mayoría de los suelos menos del 25% del azufre total esta presente en la forma de sulfato (Starkey, 1950).

## **2.7. Importancia del azufre como fertilizante**

El azufre como el nitrógeno, fósforo, potasio y calcio es considerado como un macronutriente, el cual es necesario en relativas grandes cantidades para el óptimo crecimiento de las plantas. El azufre es requerido por las plantas para lo siguiente:

1. Síntesis de los aminoácidos que contienen S como cistina, cisteína y metionina.
2. Formación de clorofila.
3. Activación de enzimas proteolíticas y papainas.
4. Síntesis de biotina, tiamina, glutatone y coenzima A
5. Formación de glucósidos presentes en cebolla y crucíferas y
6. Formación de nitrogenasa

Los requerimientos de azufre de los cultivos son variables, sin embargo, se ha establecido que:

1. Incrementa el contenido de proteína cruda de los forrajes
2. Decrementa la relación nitrógeno:azufre y la concentración de nitrato en forrajes
3. Mejora la calidad de los cereales en el horneado del pan
4. Incrementa el contenido de aceite en oleaginosas
5. Mejora el color y la densidad de los pastos que se usan en canchas de juego
6. Incrementa la tolerancia a la sequía en algunos cultivos
7. Incrementa la tasa de descomposición de los residuos agrícolas

(Platou e Irish, 1982; Mortvedt, 1981).

### **2.8. Antecedentes sobre el uso de fertilizantes agrícolas resultante de biolicores provenientes de la oxidación biológica de $H_2S$ y $CS_2$**

No existen antecedentes documentados que indiquen la posibilidad de emplear los biolicores generados de procesos de remoción de gases azufrados como fertilizantes agrícolas considerando el nitrógeno y el potasio como nutrimentos esenciales para cultivos agrícolas. Plas *et al.* (1992) indican que en procesos biológicos de oxidación de sulfuros a sulfatos, se puede adicionar calcio para que este se precipite como yeso y pueda ser empleado en la producción de cemento. No se menciona que álcali se usa para amortiguar el pH del biolicores.

Berzaczy *et al.* (1988) trabajando en un reactor a nivel planta industrial mencionan que el pH ácido de la suspensión que se generó de la bio-oxidación de  $H_2S$  y  $CS_2$  es neutralizada con la adición de una solución de hidróxido de sodio; no se menciona la utilidad que pueda tener esta suspensión ni que se hace con ella.

Windsperger (1990) señala que en un sistema que oxida biológicamente  $H_2S$  y  $CS_2$  a  $SO_4^{2-}$ , el pH del biolicores se neutraliza con una solución de hidróxido de sodio e indica que el costo de esto es alto, y para disminuirlo, plantea la alternativa de usar suspensiones de cal para amortiguar el pH del biolicores y precipitar el  $SO_4^{2-}$ , no se señala que se hace con esa suspensión ni su posible utilidad.

La anterior información se refiere a sistemas aeróbicos, ya que esta bien documentado en la literatura (Buisman, *et al.*, 1989; Buisman, *et al.*, 1991; Cork y Ma, 1982; Cork *et al.*, 1985) que en condiciones anaeróbicas o con un bajo contenido de oxígeno, en la bio-oxidación del H<sub>2</sub>S y CS<sub>2</sub> tienden a formarse mas fácilmente como productos finales el azufre y polisulfuros. Cabe mencionar que el azufre ya precipitado puede tener una utilidad industrial o agrícola. En contraparte, bajo condiciones aerobicas en la bio-oxidación del H<sub>2</sub>S y CS<sub>2</sub> se tiende a formar como producto final el SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>



### 3. MATERIALES Y METODOS

La presente investigación constó de dos etapas y en cada etapa se realizaron diversos experimentos:

**Primer Etapa:** Incrementar las cuatro especies de *Thiobacillus*, determinar a nivel laboratorio la combinación de especie (s) de *Thiobacillus* que presente el mejor desempeño en cuanto a oxidación de un compuesto inorgánico azufrado ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) y posteriormente inocular un reactor a nivel planta piloto industrial con una mezcla de las cuatro especies de *Thiobacillus* y evaluar el comportamiento de oxidación biológica de  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{CS}_2$ .

**Segunda Etapa:** Evaluar el comportamiento del proceso Biocyd<sup>®</sup> a nivel planta piloto industrial usando hidróxido de potasio (KOH), hidróxido de amonio ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ) e hidróxido de sodio (NaOH) como álcalis para amortiguar el pH que se genera en el proceso y posteriormente con los biolicores obtenidos agregarlos en parcelas experimentales en el campo y determinar los efectos de ellos en la producción de materia seca de sorgo forrajero (*Sorghum bicolor*).

#### 3.1. Primera Etapa

##### 3.1.1. Multiplicación de *Thiobacillus*

Las bacterias que se emplearon en esta etapa fueron las siguientes: *Thiobacillus denitrificans* (23642), *Thiobacillus ferrooxidans* (13598), *Thiobacillus thiooxidans* (19377) y *Thiobacillus thioparus* (8158); las cuales se obtuvieron de American Type Culture Collection (12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776 USA).

El medio de cultivo que se usó para la multiplicación de cada especie, así como las condiciones de manejo como temperatura, velocidad de agitación y pH se presenta en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Medios de cultivo empleados y condiciones de manejo para la multiplicación de cuatro especies de *Thiobacillus*.

Especie	Reactivo	Cantidad (g/L)	Temperatura °C	Velocidad Agitación rpm	pH
<i>Thiobacillus denitrificans</i>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2	30 - 35	150	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8			
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1			
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1			
	CaCl <sub>2</sub>	0.03			
	FeCl <sub>3</sub>	0.02			
	MnSO <sub>4</sub>	0.02			
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10.0			
	NaHCO <sub>3</sub>	0.5			
	KNO <sub>3</sub>	5.0			
	Agar-Agar	15.0			
<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	<b>Solución A</b>		30 -35	150	2.8
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4			
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2			
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.08			
	H <sub>2</sub> O	400 ml			
	<b>Solución B</b>				
	FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10.0			
	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 1 N	1.0			
H <sub>2</sub> O	100 ml				
<i>Thiobacillus thiooxidans</i>	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.2	30 - 35	150	
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.5			
	CaCl <sub>2</sub>	0.25			
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0			
	FeSO <sub>4</sub>	0.005			
S	1.0				
<i>Thiobacillus thioparus</i>	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.2	30 - 35	150	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8			
	MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0.1			
	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.1			
	CaCl <sub>2</sub>	0.03			
	FeCl <sub>3</sub>	0.02			
	MnSO <sub>4</sub>	0.02			
	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	10.0			
Agar-Agar	15.0				

### 3.1.2. Experimentos de bio-oxidación en matraz

Antes de iniciar las evaluaciones de la capacidad de bio-oxidación de las combinaciones de especies de *Thiobacillus*, se efectuaron pruebas preliminares para determinar la duración de estas, ya que la información bibliográfica que se obtuvo con respecto a esto era contradictoria; por lo que se procedió a efectuar pruebas para determinar el tiempo de generación (Brock y Madigan, 1993), considerando como factor de crecimiento la densidad óptica de las cuatro especies; en esta prueba, la fase log es la etapa que se utiliza, debido a que es el período de mas rápida reproducción de un microorganismo. En el Cuadro 3, se presenta el medio de cultivo empleado; las condiciones que se mantuvieron de temperatura fueron 30 - 35 °C (se utilizó una incubadora - agitadora con control automático de temperatura) y velocidad de agitación de 150 rpm. Se inocularon matraces (por duplicado) conteniendo 500 mL de medio de cultivo, a los cuales se les adicionó una mezcla de las cuatro especies iniciando con un equivalente de 100 µg /ml de proteína (25 µg /mlde cada especie); la prueba duró 12 días y se efectuaron cuatro lecturas de absorbancia en el espectofotometro óptico (660 nm); a los días cero, cinco, diez y doce. Las fórmulas empleadas para determinar el tiempo de generación fueron:

$$K = \frac{\log_{10} \text{ densidad óptica final} - \log_{10} \text{ densidad óptica inicial}}{0.301 (T_1 - T_0)}$$

Donde:

K = duplicaciones por día

$\log_{10}$  = logaritmo base 10

0.301 = constante de la velocidad de crecimiento

$T_1$  = tiempo 1 (días)

$T_0$  = tiempo 0 (días)

$$Z = \frac{1}{K}$$

Donde:

Z = tiempo de generación (días)

l = constante

K = duplicaciones por día

Una vez que se contó con suficiente inóculo de cada especie, se procedió a iniciar los experimentos de bio-oxidación en el laboratorio. El medio de cultivo empleado fue el mismo que se empleó para realizar las pruebas para determinar el tiempo de generación. El sustrato a oxidar fue el sulfuro de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) en una concentración de 100  $\mu\text{g/ml}$  (1282  $\mu\text{M}$ ), los matraces que se emplearon fueron de 250 ml de capacidad; la inoculación con la (s) bacteria se hizo en base a tener aproximadamente una concentración de proteína total de 100  $\mu\text{g/ml}$  (se utilizaron 150 ml de medio de cultivo).

Cuadro 3. Medio de cultivo que se empleó en los experimentos de bio-oxidación en el laboratorio.

Producto	Cantidad (g/l de agua)
$\text{NH}_4\text{Cl}$	0.27
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.026
$\text{MgCl}_2$	0.01
$\text{Na}_2\text{S}$ (Fuente de energía)	100 $\mu\text{g/ml}$

Se utilizó un diseño completamente al azar con un arreglo de tratamientos de un factorial (4 especies de *Thiobacillus* en dos niveles de pH). Las combinaciones (tratamientos) consideradas fueron 16 (Cuadro 4); cada combinación se evaluó en dos niveles de pH; 4 y 7. Se emplearon dos repeticiones (matraces) por tratamiento.

Debido a que no se contaba con suficiente material de cristalería e incubadoras-agitadoras para realizar todo al mismo tiempo, se procedió a efectuar las evaluaciones con cuatro combinaciones, siete días después, otras cuatro y así sucesivamente hasta completar 16 combinaciones.

Cuadro 4. Combinaciones de especies de *Thiobacillus* que se evaluaron en el laboratorio.

Especie Combinación	No. de Tratamiento
A ( <i>Thiobacillus denitrificans</i> )	1
B ( <i>Thiobacillus ferrooxidans</i> )	2
C ( <i>Thiobacillus thiooxidans</i> )	3
D ( <i>Thiobacillus thioparus</i> )	4
AB	5
AC	6
AD	7
BC	8
BD	9
CD	10
ABC	11
BCD	12
ACD	13
ABD	14
ABCD 100	15
ABCD 400	16

El procedimiento de laboratorio fue el siguiente: De cada especie que previamente se había multiplicado, se procedió a determinar la concentración de proteína total por triplicado, se calculó el promedio (se presentó una desviación máxima de 5 µg/ml) y posteriormente se efectuaron cálculos para determinar la cantidad de ml que se debía inocular a los matraces según la combinación por evaluar; por ejemplo, si la combinación a evaluar era AB (*Thiobacillus denitrificans* + *Thiobacillus ferrooxidans*) entonces se calculaba cuántos ml de inóculo del matraz con la especie A y la especie B se debía agregar a 150 ml de medio de cultivo, tomando en cuenta que como la combinación era de dos especies se colocaron el 50 % de proteína de cada una para obtener un total de

100 µg/ml; en el caso de una combinación que fuera de tres especies, la cantidad de proteína a agregar de cada una de las especies será de 33.3 % dando un total siempre de 100 µg/ml. La combinación ABCD 400 se incluyó considerando una adición de 400 µg/ml de proteína (100 µg/ml. de cada especie). La temperatura fue controlada en un rango de 30 a 35 °C y la velocidad de agitación fue de 150 rpm.

### **3.1.3. Variables evaluadas en el experimento en laboratorio**

Las variables evaluadas fueron: Proteína total, pH y sulfatos; las determinaciones se efectuaron inmediatamente después de la inoculación y a los siete días posteriores; para proteína, Smith y Kelly (1988) sugieren que se emplee el método reportado por Lowry *et al.* (1951), (se empleó albúmina de suero de bovino como estándar); para la determinación de sulfatos se empleó el método turbidimétrico reportado por Greeberg, *et al.* (1992) y para pH se siguió el método reportado por Chapman y Pratt (1979).

### **3.2. Experimento de bio-oxidación en el reactor flujo cruzado nivel planta piloto industrial.**

Una vez que se concluyó con el ensayo de laboratorio, se procedió a realizar la inoculación al sistema Biocyd - Flujo cruzado; para ello se emplearon 5 litros de medio de cultivo conteniendo una mezcla de las cuatro especies de *Thiobacillus*; previo a esto, se procedió a instalar un empaque nuevo en la parte interna del reactor.

Las condiciones de operación del reactor fueron:

1. El pH del biolico se mantuvo entre 4 y 6. Este se controló adicionando al biolico NaOH con una concentración de 4 % (p/v).
2. Carga de azufre que se alimenta al reactor. Debido a que ésta, está en función al flujo de gas alimentado (280 scfm) y de la concentración de los gases que salen de las cámaras donde se produce el celofán, la concentración de H<sub>2</sub>S osciló entre 100 - 150 ppm-mol y de CS<sub>2</sub> entre 200 - 300 ppm-mol.
3. La cantidad de sulfatos se mantuvo entre 30 y 60 g/l.

4. Nutrientes. Fueron los mismos que se presentan en el Cuadro 3.
5. Temperatura. El sistema trabajó a temperatura ambiente
6. El flujo de recirculación del biolícor al domo fue de 71.6 l/min.

Se dejó correr durante dos meses (con las condiciones de operación anteriormente señaladas) el reactor con la finalidad de que se incrementara la población de bacterias así como se adheriera la bio-película al empaque del reactor. El ensayo tuvo una duración de 22 días.

### **3.2.1. Descripción de los componentes del reactor flujo cruzado y del proceso de bio-oxidación de gases azufrados.**

El reactor consiste en una cámara dividida en tres secciones:

a) sección de aspersión del biolícor, b) cámara empacada y c) sección colectora del biolícor recirculado (ver Figura 1).

El flujo de gas contaminado (línea 01) se hace pasar a través del empaque del reactor empleando un ventilador FC-BL-01 en sentido del plano horizontal en donde entra en contacto con el biolícor descendente en un plano perpendicular. El componente contaminante en la emisión gaseosa es absorbido en el biolícor, el cual al ir descendiendo por el empaque poblado por una película bacteriana, los microorganismos toman del biolícor el contaminante, el cual lo emplea como fuente de energía para llevar a cabo sus actividades metabólicas vitales.

El material de empaque es del tipo estructurado de elevada área superficial ( $223.097 \text{ m}^2/\text{m}^3$ ) de contacto entre fases construido de PVC. Es en este lugar donde se lleva a cabo la mayor parte de la degradación biológica del contaminante, el resto de la oxidación se complementa en el sistema colector de la unidad.

Del fondo del colector el biolícor es descargado a través de una válvula, para ser bombeada por medio de la bomba FC-PV-02 a la sección de aspersión del reactor, localizada en la parte superior de la unidad (línea 03).

Para que los microorganismos lleven a cabo adecuadamente su metabolismo se requiere la adición de nutrientes en solución, preparados en el tanque FC-TKN-01, la

solución nutritiva entra al reactor por gravedad a través de la línea 05, cuyo flujo es regulado manualmente por medio de una válvula.

Debido a que es el ácido sulfúrico el principal producto de la degradación de ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) y disulfuro de carbono ( $CS_2$ ), es necesario mantener un pH que no modifique la actividad metabólica del microorganismo, para ello es necesario neutralizar continuamente el ácido formado con sosa cáustica diluida (4 % p/p), preparada en el recipiente FC-TKN-02. Para lograr lo anterior, se hace uso de un dispositivo de control de pH, el cual incluye, el elemento sensor de pH (FC-pH), el amplificador y transmisor de la señal de pH, el equipo controlador y la bomba dosificadora (FC-PV-01) conectada al controlador, para dosificar sosa cáustica (línea 12) de acuerdo al error detectado con respecto al tiempo de control definido para el proceso.

Por problemas de transferencia del contaminante de la fase gas a la líquida, así como también de problemas de inhibición hacia el microorganismo, asociadas a elevadas concentraciones de sulfatos es práctica común el mantener una adecuada concentración de sulfatos en el biolícor para prevenir estos inconvenientes. Para lograr esto, es necesario purgar continuamente una fracción del biolícor a través de la línea 04 reponiéndose con adición continua de agua potable marcado por la línea 06 esta última incluye también las pérdidas por arrastre de biolícor en el gas y evaporación.

El gas tratado sale del proceso a través de la línea marcada con el número 02. (Torres *et al.*, 1993).

### **3.2.2. Variables evaluadas en el reactor flujo cruzado.**

Se evaluó la concentración de  $H_2S + CS_2$  en ppm-mol a la entrada y salida del reactor, con estos datos se calculó la velocidad de remoción total, la cual es considerada como el principal parámetro representativo de la eficiencia del reactor flujo cruzado, ya que indica los gramos totales de azufre (azufre contenido en el  $H_2S + CS_2$ ) removidos en una hora por metro cúbico de empaque.



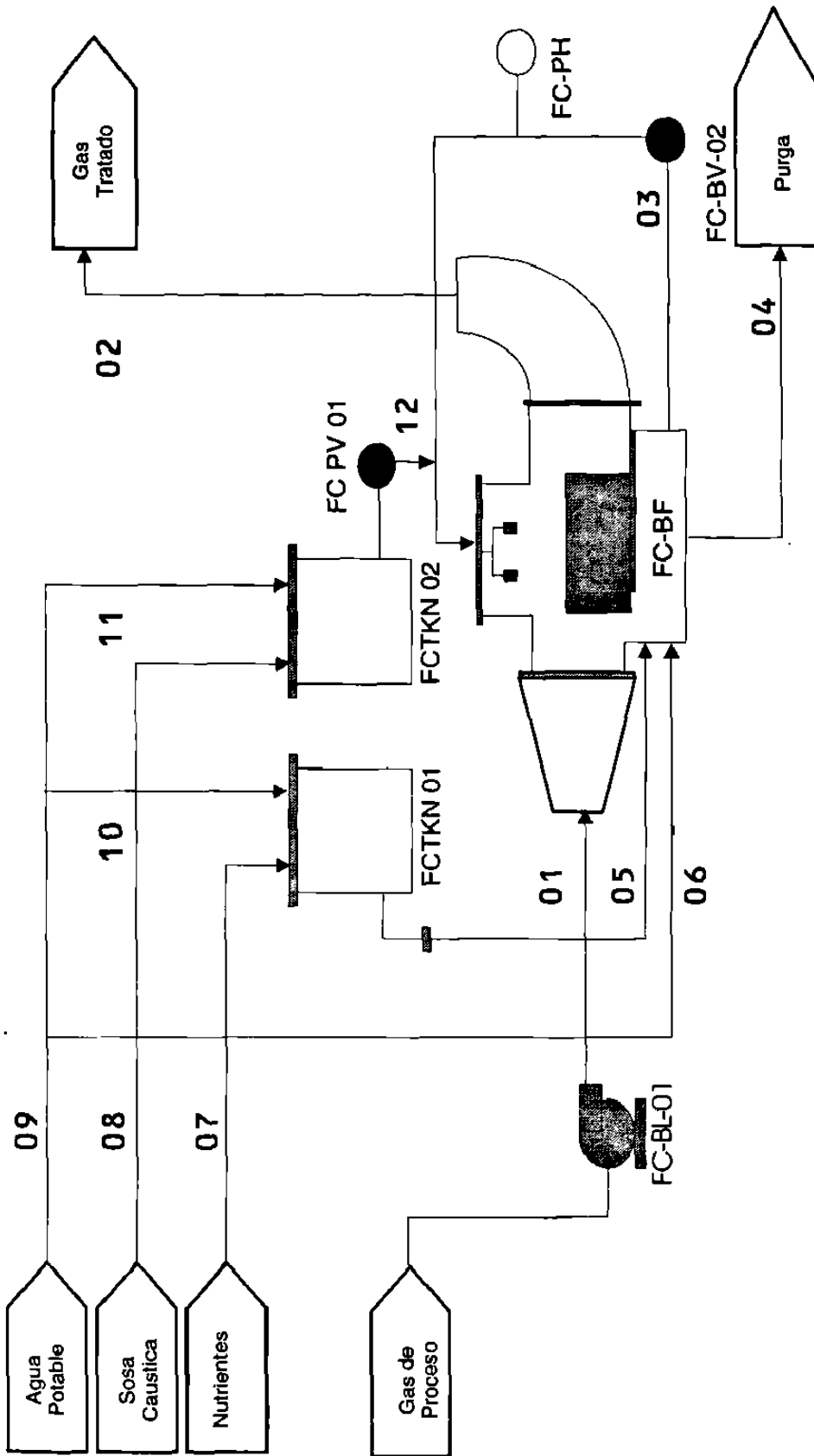


Figura 1. Reactor Flujo cruzado

### 3.2.3. Métodos analíticos empleados

Para determinar la concentración de  $H_2S$  y  $CS_2$  se incorporaron volúmenes de ellos a un bulbo muestreador de gases, posteriormente se analizó por cromatografía de gases; para ello, se empleó un cromatógrafo de gases marca Varian modelo 3400; con una columna empacada de cromosil 310 (marca Supelco) de 8' (6' empacados) x 1/8" o.d. de teflon. Las condiciones de operación fueron:

i) Temperatura de la columna, 50 °C; ii) Flujo de gas acarreador (nitrógeno), 20 ml/min; iii) Volumen de la muestra, 1.0 ml. (Anónimo, 1977). Se efectuaron cuatro análisis diarios de los gases.

### 3.3. Segunda Etapa

#### 3.3.1. Experimento de bio-oxidación en el reactor biocyd I nivel planta piloto industrial.

En este experimento se utilizó un reactor (ver Figura 2) empacado en su interior, el cual tiene adherido un consorcio de bacterias de la familia *Thiobacillaceae*, las cuales oxidan gases azufrados ( $H_2S$  y  $CS_2$ ) y que emplea para su operación 5000 litros de biolicores. Lo anterior se realizó en el Centro Experimental de Biotecnología Ambiental Aplicada (CEBAA) del Grupo Cydsa, S.A. de C.V. en Monterrey, N.L. México. El experimento tubo una duración de alrededor de 20 semanas.

El diseño experimental empleado fue un completamente al azar con diferente número de repeticiones. Los tratamientos que se evaluaron consistieron en regular el pH del biolicores (en un rango de 4 - 5) agregando KOH (tratamiento 1),  $NH_4OH$  (tratamiento 2) y NaOH (tratamiento 3). El número de repeticiones para los tratamientos de KOH,  $NH_4OH$  y NaOH fueron de 25, 15, y 15, respectivamente. El pH se controló por medio de un sistema automático que funciona las 24 horas del día. La duración de cada tratamiento fue de 25, 15, y 15 días, respectivamente. Al término de cada tratamiento se tomaron muestras de los biolicores con la finalidad de determinar su

composición química y se colectó suficiente muestra para el experimento de campo. Esto se efectuó cada vez que se finalizaba cada tratamiento.

### **3.3.2. Descripción de los componentes del reactor Biocyd I y del proceso de bio-oxidación de gases azufrados.**

El proceso Biocyd<sup>®</sup> para la purificación de gases residuales, consiste en alimentar el gas que contiene los contaminantes a través de una columna de absorción. La columna esta equipada con una cama de empaque inerte, la cual es usada para sostener las colonias de microorganismos.

Las bacterias están inmovilizadas y forman una película en la cama de empaque. El flujo de aire y gases azufrados son incorporados al reactor por la parte inferior de la columna y fluye por el empaque hasta la parte superior en donde sale libre de contaminantes.

Durante el recorrido del gas por la columna, este se pone en contacto directo a contracorriente con una solución de nutrientes, la cual entra al reactor en forma de rocío por la parte superior de la columna.

Al darse este contacto se produce el fenómeno de absorción, en donde los contaminantes pasan de la corriente gaseosa a la líquida, para su posterior degradación biológica.

Debido a que es el ácido sulfúrico el principal producto de la degradación de  $H_2S$  y  $CS_2$ , es necesario mantener un pH que no modifique la actividad metabólica del microorganismo, para ello fue necesario neutralizar continuamente el ácido formado con los diferentes álcalis evaluados. Para lograr lo anterior, se hizo uso de un dispositivo de control de pH automático y una bomba dosificadora.

### **3.3.3. Variables evaluadas en el reactor Biocyd I**

Se evaluó la concentración de  $H_2S$  y  $CS_2$  en ppm-mol a la entrada y salida del reactor, con estos datos se calculó la eficiencia de remoción parcial y total de azufre en

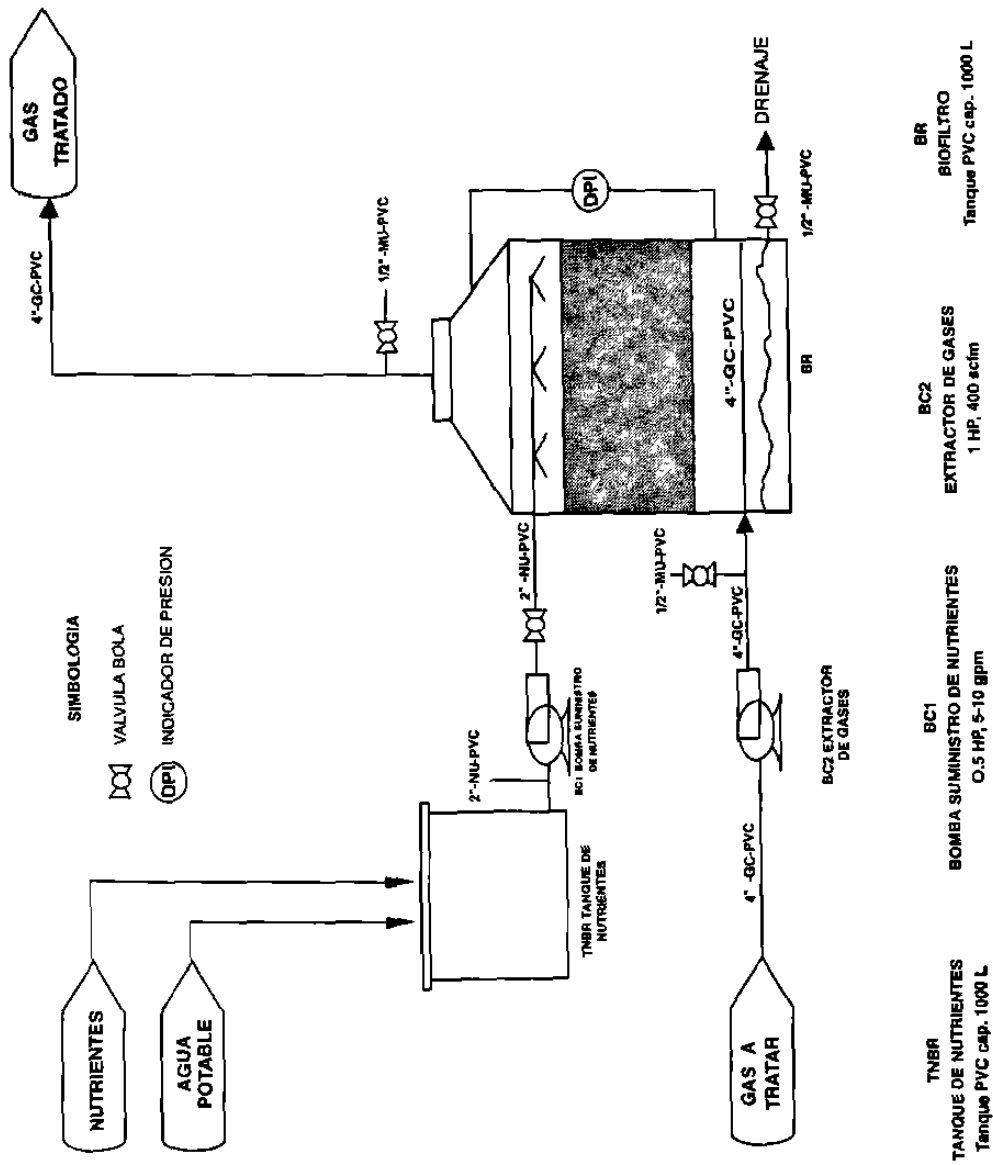


Figura 2. Reactor Biocyd I

cada gas y la velocidad de remoción, la cual es considerada como el principal parámetro representativo de la eficiencia del Biocyd I, ya que indica los gramos totales de azufre (azufre contenido en  $H_2S + CS_2$ ) removidos en una hora por metro cúbico de empaque.

### **3.3.4. Métodos analíticos empleados**

Para determinar la concentración de  $H_2S$  y  $CS_2$  se incorporaron volúmenes de estos gases a un bulbo muestreador, esto se efectuó a la entrada y a salida del reactor, posteriormente se analizó por cromatografía de gases bajo las condiciones descritas en el punto 3.2.3. Se efectuaron cuatro análisis diarios de los gases y se determinó el contenido de proteína en el biolico una vez por semana.

### **3.4. Experimento de campo (aplicación de los biolicores como fertilizantes agrícolas)**

Una vez que se obtuvieron los biolicores, se estableció un experimento en un lote del Campo Experimental de la Facultad de Agronomía de la Universidad Autónoma de Nuevo León (FAUANL), en Marín, N.L. México. La siembra se realizó a tierra venida, se usó sorgo forrajero (el híbrido Silo 600 D); la densidad de siembra fue de 20 kg/ha, la unidad experimental fue de 5 surcos de 7.0 m de largo, a una distancia entre surcos de 0.80 m. Una vez que se delimitaron las parcelas se procedió a tomar una muestra compuesta del sitio con la finalidad de efectuar un análisis físico-químico del suelo; se consideró una profundidad de 0 - 0.3 m, los resultados, se presentan en el Cuadro 5; las metodologías de análisis del suelo son las reportadas por Rodríguez F. y Sánchez A. (1989).

El diseño experimental empleado fue un bloques al azar con siete tratamientos y seis repeticiones. Los tratamientos evaluados fueron los biolicores (biolico A y biolico B) obtenidos del reactor Biocyd I a partir del proceso de oxidación de gases azufrados, mas cinco tratamientos (dos mezclas de estos con un fertilizante comercial nitrogenado, mas cinco fertilizantes nitrogenado, azufre elemental agrícola y un testigo).

En el Cuadro 6, se presenta la composición química de los biolicores. En el Cuadro 7, se presentan las características de los tratamientos.

Cuadro 5. Características fisico-químicas del suelo del Campo Experimental de la FAUANL.

Característica	Valor	Método
pH (1:2)	7.8	Potenciómetro
Textura	Arena: 8.3 % ; Limo: 25.7 % Arcilla: 65.7 %	Hidrómetro
Materia Orgánica	0.20 %	Walkley y Black
Nitrógeno Total	0.032 %	Kjeldahl
Fósforo Extractable	5.1 ppm	Olsen Modificado
Fe	2.5 ppm	Olsen Modificado
Mn	7.2 ppm	Olsen Modificado
Zn	1.7 ppm	Olsen Modificado
Cu	2.0 ppm	Olsen Modificado

Cuadro 6. Composición química de los biolicores empleados en el experimento de campo.

Parámetro	Resultado		Unidad de Medición
	Biolicor B KOH	Biolicor A NH <sub>4</sub> OH	
Sulfato	38,346.000	18,757	mg/l
Nitrógeno amoniacal	166.000	5,070	mg/l como N
Fosfato total	14.000	0.999	mg/l como P
Potasio	23,940.00	23.560	mg/l
Calcio	77.000	61.200	mg/l
Cadmio	< 0.004	0.014	mg/l
Cobalto	< 0.007	< 0.003	mg/l
Cobre	< 0.006	0.040	mg/l
Fierro	1.080	0.853	mg/l
Aluminio	0.490	0.117	mg/l
Magnesio	12.400	12.450	mg/l
Manganeso	0.012	0.017	mg/l
Níquel	< 0.015	0.160	mg/l
Plomo	< 0.040	< 0.025	mg/l
Zinc	0.810	0.158	mg/l
Proteína	118.000	28.000	µg/l

Cuadro 7. Tratamientos evaluados en el experimento de campo en la FAUANL.

Tratamiento	Nitrógeno (N) (kg/ha)	Potasio (K <sub>2</sub> O) (kg/ha)	Azufre (kg/ha)
1. Biolicor A*	40	0	113.5
2. Biolicor A + Nitrógeno <sup>1</sup>	100	0	113.5
3. Biolicor B**	0	50	113.5
4. Biolicor B + Nitrógeno	60	50	113.5
5. Nitrógeno + Azufre comercial	60	0	113.5
6. Azufre Comercial	0	0	113.5
7. Testigo (Sin aplicación)	0	0	0

\*Biolicor A - con NH<sub>4</sub>OH, \*\* Biolicor B = con KOH <sup>1</sup>

Fuente de Nitrógeno usada = (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Se realizó una aplicación preventiva y manual al cogollo de la planta de un insecticida piretroide granulado (Pounce 4G) para el control de plagas como gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*); en total, se aplicó un riego de presembrado y cuatro de auxilio; no hubo necesidad de controlar las malezas. Inmediatamente antes del aporque, se aplicaron las dosis de biolicor a las parcelas, así como las dosis correspondientes de fertilizantes sólidos.

La cosecha (primer corte) se efectuó a los 75 días después de la siembra, se cosecharon los tres surcos centrales de la parcela y se eliminaron dos metros lineales de la cabecera, dejando un total 7.2 m<sup>2</sup> como parcela útil. Se evaluó el peso fresco de la planta total (hojas + tallo + panoja) y se tomó una muestra de 3 plantas completas, a las cuales, también se les evaluó el peso fresco, posteriormente se guardaron en bolsas de papel para colocarlas en la estufa de secado a 50-60 °C y llevarlas a peso constante con la finalidad de obtener el porcentaje de humedad, y con esto, calcular el peso seco del forraje por parcela. El segundo corte del sorgo forrajero se realizó a los 110 días después del primer corte, se evaluaron las mismas variables que en el primer corte; además, se procesaron (secado y molido) muestras de plantas completas de 4 repeticiones con la finalidad de obtener la concentración de nitrógeno, potasio y azufre total absorbido por las plantas. Para la determinación de nitrógeno se empleó el método

de Kjeldhal (Santelises *et al.*, 1987); para potasio y azufre se usó el método de digestión húmeda (Días R. y Hunter, 1978).



## 4. RESULTADOS Y DISCUSION

### 4.1. Tiempo de duración de los experimentos en el laboratorio para determinar la capacidad de bio-oxidación de especies de *Thiobacillus*.

En el Cuadro 8 se presentan los resultados que se utilizaron para calcular el tiempo de generación de los microorganismos considerando la densidad óptica como parámetro de medición.

Cuadro 8. Curva de crecimiento para determinar el tiempo de generación de las cuatro especies de *Thiobacillus*

Tiempo días	Densidad óptica absorbancia 660 nm
0	0.079
5	0.144
10	0.240
12	0.270

Utilizando la fórmula de tiempo de generación señalada en el punto 3.1.2., se calculó que 6.7 días (considerando como fase log del día 5 al día 10) sería tiempo suficiente para determinar la capacidad oxidativa de las diferentes combinaciones de especies de *Thiobacillus*. Finalmente se determinó emplear un período de duración de 7 días para efectuar las pruebas de bio-oxidación.

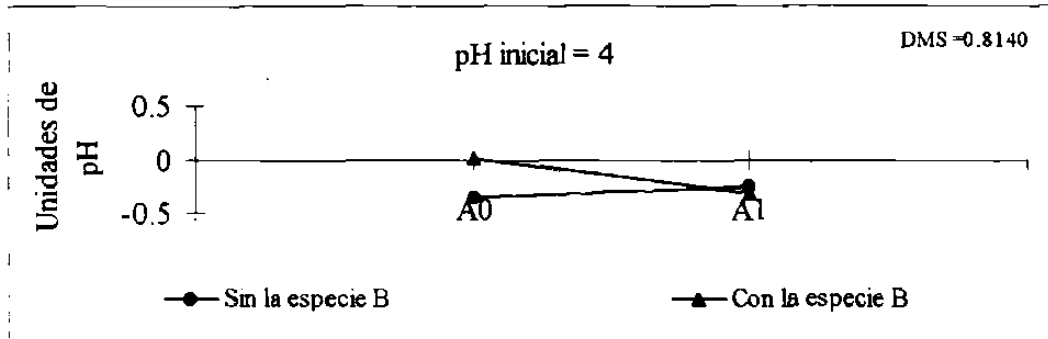
### 4.2. Experimentos de combinaciones de cuatro especies de *Thiobacillus* sobre la capacidad de oxidación de un compuesto azufrado, nivel laboratorio

#### 4.2.1. Variable pH.

Se corrió un análisis factorial a través de las diferencias entre el pH inicial y final para evaluar los efectos de interacción entre las combinaciones de especies de *Thiobacillus*.

En la Figura 3 y el Apendice A1, se presentan solo las interacciones significativas que se consideró mas importantes entre dos especies, las cuales ocurrieron entre las especies AB (*Thiobacillus denitrificans* y *Thiobacillus ferrooxidans*) y las especies AC (*Thiobacillus denitrificans* y *Thiobacillus thiooxidans*) cuando el pH inicial fue de 4 ó 7.

(a)



(b)

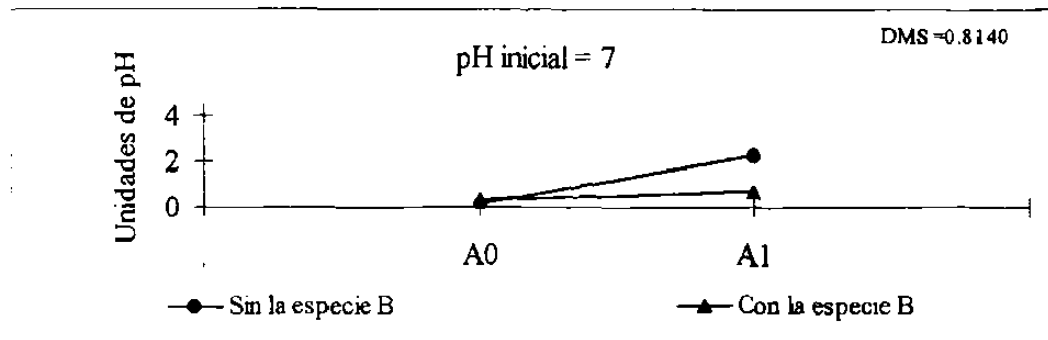
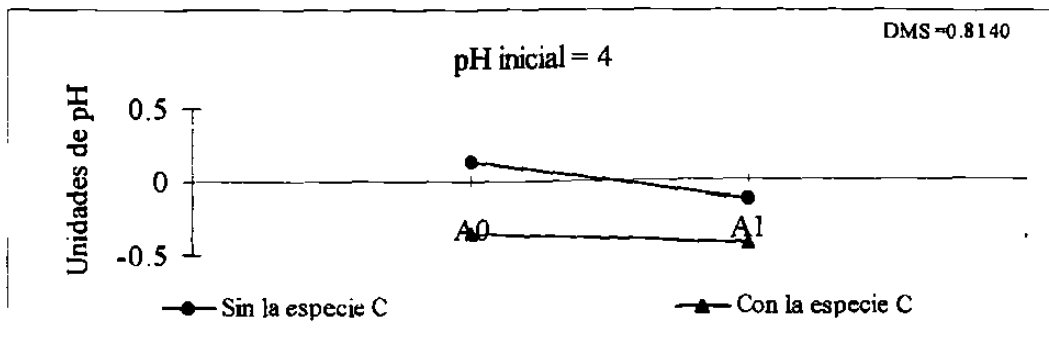


Figura 3. Interacciones significativas entre las especies AB (*Thiobacillus denitrificans* y *Thiobacillus ferrooxidans*), incisos (a) y (b) cuando el pH inicial fue de 4 ó 7.

(c)



(d)

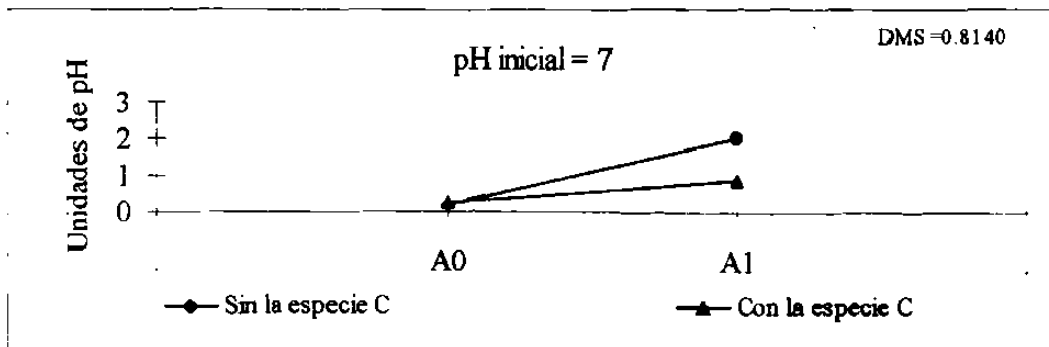
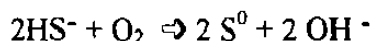


Figura 3a. Interacciones significativas entre las especies AC (*Thiobacillus denitrificans* y *Thiobacillus thiooxidans*) incisos (c) y (d), cuando el pH inicial fue de 4 ó 7.

En la Figura 3 y 3a en los incisos (a) y (c) respectivamente se observa que cuando el pH inicial fue 4, la especie A sola y en presencia de la especie B y la especie C, presentaron un aumento en el pH del medio de cultivo. Por lo que se puede deducir que bajo condiciones iniciales de pH 4 (ácidas) probablemente hay como producto final de la bio-oxidación del  $\text{Na}_2\text{S}$  una mayor producción de azufre que de sulfatos. Gadre (1989) reporta valores de recuperación del 20 % de azufre y 21 % de sulfato y menciona que *Thiobacillus* bajo condiciones de extrema acidez en el medio (pH entre 2 - 3) pueden depositar azufre elemental debido a la incompleta oxidación del sulfuro y establece que

aún sin la condición de acidez tan extrema, se pueden presentar deposiciones de azufre en el medio de cultivo.

Por otra parte Buisman *et al.* (1989) mencionan que en una reacción biológica que puede ocurrir en un sistema de oxidación aeróbico de sulfuro en condiciones de pH neutro es:



Por lo que, al generarse iones  $\text{OH}^-$ , después de oxidar el compuesto azufrado, el pH del medio aumenta y se detiene la oxidación en  $\text{S}^0$ , cabe mencionar que en los matraces, se observó un precipitado de color blanco (lo que indicó la probable presencia de azufre elemental) junto con un color amarillento (lo que sugiere la formación de polisulfuros). Cabe mencionar que la forma  $\text{HS}^-$  es la forma que predomina en condiciones de pH neutro, aunque están presentes también las formas  $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{S}^{2-}$  (Brock y Madigan, 1993).

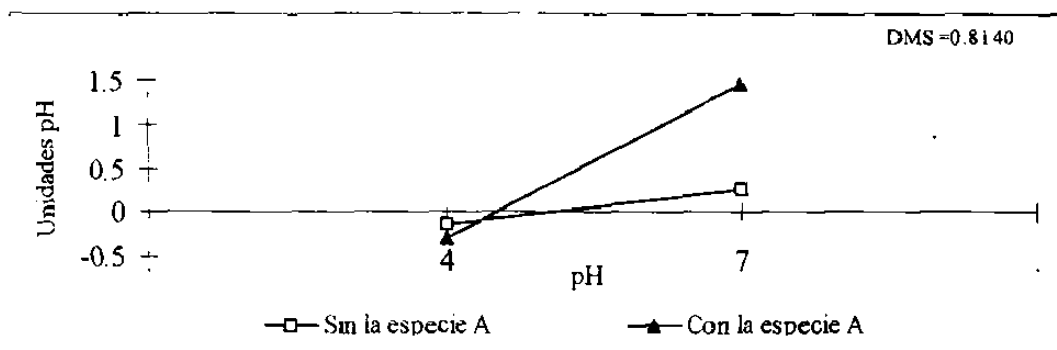
En la Figura 3 y 3a en los incisos (b) y (d) respectivamente cuando las condiciones iniciales fueron de pH neutro (7.0), la especie A en presencia de la especie B y de la especie C, disminuyeron el pH del medio de cultivo; probablemente se presentó la formación de polisulfuros y azufre (presencia de una coloración amarilla y un precipitado blanco respectivamente) como producto final de la bio-oxidación. En este ensayo, solo se efectuó la determinación de sulfatos y esta fue muy baja, por lo que no se puede establecer cuantitativamente la cantidad de polisulfuros ni de azufre. Cabe mencionar que la concentración inicial de sulfuro fue de 41 mg/l.

Buisman *et al.* (1989) establecen que la presencia de un color amarillo en este tipo de sistemas sugiere la formación de polisulfuros, esto se presenta cuando la concentración del sulfuro (fuente de energía) es mayor de 20 mg/l y esta formación será mayor a medida que aumente la cantidad del sulfuro y de azufre en el medio; también mencionan que no cuantificaron el contenido de polisulfuros, sino que lo estimaron (debido a que los polisulfuros son solubles y no pueden ser medidos en una técnica analítica para azufre); para lograrlo, se determinó la concentración de azufre, sulfato y sulfuro. Concluyen que no detectaron en el medio de cultivo la presencia de tiosulfato ni de sulfito.

En la Figura 4 se presentan las interacciones significativas que se consideró mas importantes entre una especie y las demás combinaciones en función del pH inicial (4 o 7) del medio de cultivo en que se inocularon.

Estas interacciones ocurrieron entre las especies A (*Thiobacillus denitrificans*), B (*Thiobacillus ferrooxidans*) y la especie D (*Thiobacillus thioparus*).

(a)



(b)

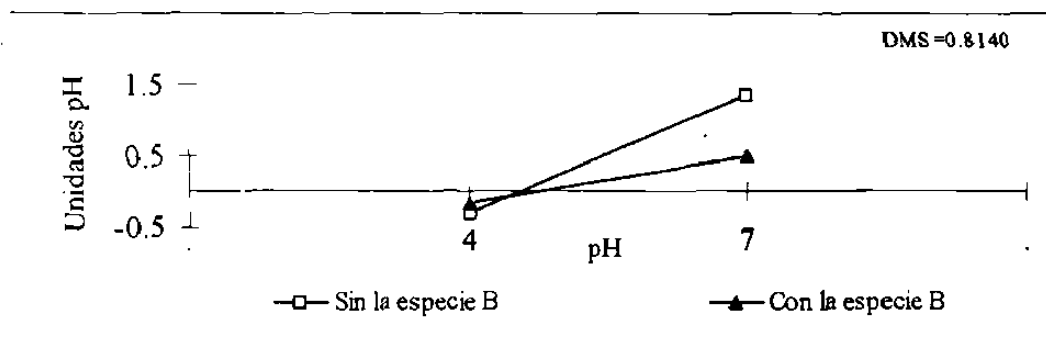


Figura 4. Interacciones significativas entre una especie y las demás combinaciones en función del pH inicial (4 o 7) del medio de cultivo en que se inocularon. Inciso (a) la especie A (*Thiobacillus denitrificans*), inciso (b) la especie B (*Thiobacillus ferrooxidans*).

(c)

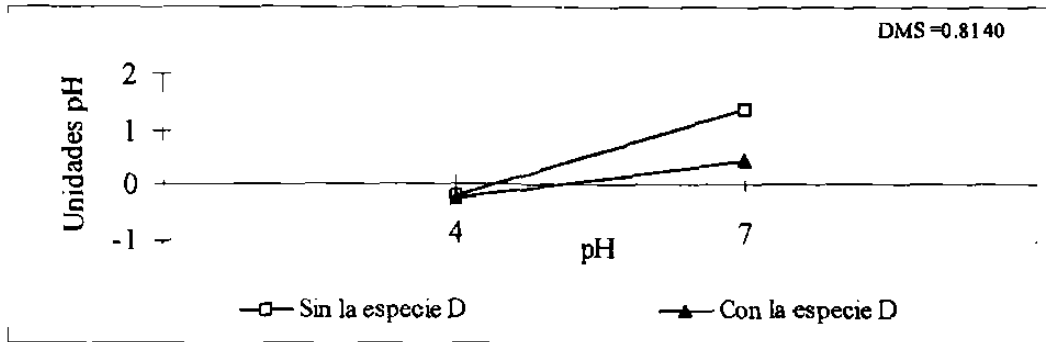


Figura 4a. Interacciones significativas entre una especie y las demás combinaciones en función del pH inicial (4 o 7) del medio de cultivo en que se inocularon. Inciso (c) la especie D (*Thiobacillus thioparus*).

Como se puede observar en la Figura 4 incisos (a) y (b) y Figura 4a del inciso (c) cuando estuvieron presentes la especie A, B y C al ser comparadas contra las demás combinaciones (en ausencia de A, B y C) las unidades de pH disminuidas fueron mayores cuando el pH inicial fue 7 que cuando fue 4.

Brock y Madigan (1991) señalan que uno de los productos principales en las reacciones de oxidación de los compuestos azufrados ( $H_2S$ ,  $CS_2$ ,  $S^0$  y  $S_2O_3$  entre otros) son los iones hidronio ( $H^+$ ), dando como resultado la acidificación del medio por la formación de ácido sulfúrico ( $H_2SO_4$ ); de tal manera que estas bacterias suelen ser capaces de bajar el pH del medio de cultivo.

Kelly y Harrison (1989) mencionan que el pH óptimo para el crecimiento de la especie A y D es de entre 6 y 8, por lo que esta condición favoreció que la oxidación de la fuente de energía empleada ( $Na_2S$ ) fuera transformada principalmente a sulfato y esto provocara una disminución en el pH del medio de cultivo.

Plas *et al.* (1992) en un experimento en que se evaluó la tasa de oxidación biológica del sulfuro utilizando una mezcla de *Thiobacillus* y el efecto del pH sobre esta,

mencionan que entre otros, el pH inicial de 7.0, fue la condición óptima para la oxidación biológica del sulfuro. Así mismo, se determinó que una relación sulfuro/oxígeno de 0.3 en el medio de cultivo redujo el pH en pocas horas, indicando una formación de sulfatos como consecuencia de una completa oxidación del sulfuro; las mayores relaciones sulfuro/oxígeno incrementaron el pH, debido a la limitación de oxígeno, provocándose con ello la producción de azufre elemental como producto final de la oxidación. En relaciones mucho mayores, (de 6 a 7 mol/mol) de sulfuro/oxígeno, se pudo observar que la suspensión presentó turbidez y un color amarillo, indicando un incremento en la formación de azufre como producto de la reacción.

En la experimentación que se llevó a cabo, no se determinó la relación sulfuro/oxígeno ya que no se cuantificó la concentración de oxígeno, debido a que la aireación que se le dió a los medios fue permanente (en la agitadora incubadora); sin embargo, la formación de un color amarillo y un precipitado blanco indicó la presencia de polisulfuros y azufre elemental respectivamente

#### **4.2.2. Variable Sulfatos.**

En el Cuadro 9 se presentan los valores promedio de la cantidad de sulfatos que produjo la bio-oxidación de las 16 combinaciones con las cuatro especies de *Thiobacillus*. Como se puede observar, cuando el pH inicial del medio de cultivo fue de 4, la concentración de sulfato fue igual en términos estadísticos en todas las combinaciones.

Cuando el pH inicial fue de 7, las combinaciones A, ACD, ABC, ABCD 400, ABCD 100, BC, AB, y B presentaron la mayor cantidad de sulfatos, esto significa que en estas combinaciones se oxidó significativamente una mayor cantidad de azufre a sulfatos que las restantes 8 combinaciones.

Buisman *et al.* (1990a) en una experimentación que se llevó a cabo en un reactor a escala laboratorio con capacidad de 1.5 l establecen que cuando la concentración de sulfuro excede los 10 mg/l menos del 10 % se oxida biológicamente a sulfato (en concentraciones de oxígeno por debajo a 6 mg/l); esta relativa baja formación a sulfato podría deberse a que el azufre o los polisulfuros inhiben o son tóxicos a los

microorganismos que pueden oxidar los compuestos azufrados a sulfatos provocando con esto una acumulación de azufre y polisulfuros; o también que el sulfuro como donador de electrones es mas preferido por los microorganismos que el azufre. También reportan que la oxidación de sulfuro a sulfato se incrementa fuertemente después del cuarto día de la inoculación.

En la evaluación de las 16 combinaciones con especies de *Thiobacillus*, la concentración de sulfuro inicial que se agregó a los medios de cultivo fue de 41 mg/l (100 mg/l de  $\text{Na}_2\text{S}$ ) y la concentración de oxígeno en los medios de cultivo debió oscilar entre 5 a 6 mg/l, por lo que es probable que debido a la alta concentración del sulfuro como fuente de energía para las bacterias, se inhibiera la oxidación a sulfato, sin embargo, se observó en los matraces la presencia de compuestos como azufre y/o polisulfuros (precipitado blanco y un color amarilla) dando indicios de que efectivamente hubo oxidación biológica del sulfuro, cabe mencionar que solo se determinó el contenido de sulfato inicial y final, y no se consideraron para su análisis otros compuestos azufrados.

Como se puede observar en el Cuadro 9, las especies de *Thiobacillus* oxidaron mas sulfuro a sulfato cuando el pH inicial fue de 7 que cuando el pH inicial fue de 4. Aún y cuando las combinaciones presentaron diferencias estadísticas en cuanto a la oxidación de sulfuro a sulfato, esta representó un porcentaje de eficiencia bajo con respecto al sulfuro adicionado, tal como se puede observar en el citado Cuadro; en el pH inicial de 4, los valores de eficiencia oscilaron de 0.02 a 3.55 % y en el pH inicial de 7, oscilaron de 0.47 a 7.03 %; presentándose la mayor eficiencia en la especie A en el pH de 7 y ABCD 100 en el pH 4.

La eficiencia de oxidación total no se evaluó debido a que solo se determinó como producto final de la oxidación el sulfato, sin embargo, se observó azufre elemental (es insoluble) precipitado en los matraces, además que la literatura documenta que en este tipo de ensayos es común se presenten polisulfuros, sulfito o tiosulfato entre otros, los cuales son muy solubles.



Cuadro 9. Concentración promedio de azufre oxidado como sulfato y eficiencia de oxidación del sulfuro a sulfato cuando el pH inicial fue 4.0 y 7.0.

pH inicial 4.0			pH inicial 7.0		
Especie Combinación	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (µg/ml)	Eficiencia de Oxidación a Sulfato (%)	Especie Combinación	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (µg/ml)	Eficiencia de Oxidación a Sulfato (%)
ABCD 100	4.38	3.55	A	8.64	7.03
AB	3.06	2.49	ACD	7.58	6.14
CD	3.01	2.46	ABC	7.35	6.00
ABC	2.86	2.33	ABCD 400	6.79	5.6
ACD	2.84	2.31	ABCD 100	5.32	4.33
BCD	2.35	1.92	BC	4.39	3.57
BD	1.81	1.48	AB	4.24	3.45
C	1.19	0.97	B	3.32	2.70
ABCD 400	1.11	0.89	CD	2.51	2.04
ABD	0.84	0.68	AC	2.12	1.73
B	0.73	0.62	C	1.98	1.62
D	0.52	0.39	BCD	1.80	1.47
BC	0.41	0.33	D	1.70	1.38
AC	0.30	0.24	BD	0.88	0.72
AD	0.11	0.10	ABD	0.69	0.56
A	0.03	0.02	AD	0.58	0.47

#### 4.2.3. Proteína y tiempo de generación.

En el Cuadro 10 se presentan los promedios de crecimiento como proteína total y tiempo de generación de las combinaciones con las cuatro especies de *Thiobacillus*. Como se puede observar, el contenido de proteína no fue significativo en las

combinaciones cuando el pH inicial fue 4 (los valores oscilaron entre 1 a 104  $\mu\text{g/ml}$ ); sin embargo, cuando el pH inicial fue 7, la combinación BC fue la que presentó el mayor crecimiento en función a proteína total siendo este de 257  $\mu\text{g/ml}$ ; cabe señalar que este crecimiento en la combinación BC no coincide con la mayor disminución en el pH, ni con la mayor eficiencia de oxidación del sulfuro a sulfato (Cuadro 9). Esto no significa que necesariamente el mayor crecimiento este relacionado con una mayor capacidad de oxidación del sulfuro a sulfato. Sublette (1990) menciona que la contaminación con microorganismos heterotrofos en este tipo de experimentos es factible, aún y cuando los medios de cultivo que se usen no tengan fuente orgánica de carbón; sin embargo, concluye que la presencia de heterotrofos, no disminuyó la capacidad de oxidación del sulfuro de los *Thiobacillus*.

Por otra parte, en el Cuadro 10 se presentan los tiempos de generación en base a proteína, los resultados indican que tanto a pH 4 como pH 7, hubo diferencia significativa, cabe señalar que todas las combinaciones a excepción de A y B en pH 4 y AD, AC Y AB en pH 7, presentaron el mayor tiempo de generación, esto significa que el factor pH inicial limitó el crecimiento en estas combinaciones.

#### **4.3. Experimento de bio-oxidación en el reactor flujo cruzado nivel planta piloto industrial**

La remoción de los gases ( $\text{H}_2\text{S}$  y  $\text{CS}_2$ ), se empezó a generar 4 semanas despues de la inoculación aunque con una baja eficiencia.

Los resultados que a continuación se presentan ocurrieron después de las ocho semanas de la inoculación; cabe mencionar que en el transcurso de ese periodo, debido a problemas operacionales ocurrieron 4 alcalinizaciones en el reactor (el pH del biolicoor llegó hasta 10) ya que el control de éste, se efectuó en forma manual, debido a que el sistema automático de inyección de NaOH se averió. Es importante señalar que las bacterias toleraron las alcalinizaciones ya que 3 días después de esto; se reinició la bio-oxidación de los gases.

Cuadro 10. Crecimiento en base a proteína total y tiempo de generacion en las combinaciones de *Thiobacillus*.

pH Inicial 4			pH Inicial 7		
Combinación Especie	Proteína ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tiempo de generación (días)	Combinación Especie	Proteína ( $\mu\text{g/ml}$ )	Tiempo de generacion (días)
AB	104	5	BC	257	4
BC	82	8	A	127	7
BCD	68	9	B	87	6
AD	42	12	BD	75	6
ABD	37	20	ABD	66	12
C	30	8	ACD	50	13
ACD	27	24	BCD	48	12
ABC	25	32	ABC	44	18
D	22	27	D	35	19
CD	20	34	CD	32	46
AC	20	31	C	30	14
ABCD 100	19	39	ABCD 100	26	27
ABCD 400	16	89	ABCD 400	17	87
BD	4	116	AD	4	244
A	2	272	AC	1	315
B	1	407	AB	1	334

En el Cuadro 11 se presentan los promedios diarios con respecto a la carga total y velocidad de remoción total de gases ( $\text{H}_2\text{S} + \text{CS}_2$ ) que se obtuvieron durante la evaluación del comportamiento de las cuatro especies de *Thiobacillus* inoculadas en el reactor flujo cruzado. Como se puede observar la carga total osciló entre 199 a 1182  $\text{g/m}^3\cdot\text{h}$  de azufre y la velocidad de remoción osciló entre 118 hasta 691  $\text{g/m}^3\cdot\text{h}$  de azufre. Estos resultados indican que en promedio la velocidad de remoción de azufre fue de 276.4  $\text{g/m}^3\cdot\text{h}$ ; esto es importante ya que Revah *et al.* (1995) mencionan que cuando un reactor de estas características alcanza velocidades de remoción de 200  $\text{g/m}^3\cdot\text{h}$  o mas presenta estándares de eficiencias de bio-oxidación que son competitivas en el mercado de la biotecnología de desulfuración.

Cuadro 11 Carga total de gases (H<sub>2</sub>S + CS<sub>2</sub>) como azufre y velocidad de remoción total en el reactor flujo cruzado.

Día	Carga (g de azufre /m <sup>3</sup> *h)	Velocidad de remoción (g de azufre /m <sup>3</sup> *h)
1	900	489
2	708	171
3	870	247
4	1000	413
5	800	173
6	628	118
7	199	133
8	1182	691
9	698	413
10	809	149
11	961	405
12	881	249
13	858	277
14	648	402
15	681	176
16	785	118
17	650	162
18	497	190
		Promedio = 276.4

Las elevadas variaciones en la velocidad de remoción son producto de las variaciones que se tuvieron en la carga al reactor durante la experimentación. Bajo estas condiciones, es difícil alcanzar un estado estacionario en la remoción.

Es importante señalar que la carga de entrada al reactor es producto del flujo de los gases (el cual es controlable) y de la concentración de los gases (que no es completamente controlable) y esta última dependerá considerablemente de la actividad que se tenga en el área de producción donde se obtiene el celofán; por lo que a mayor número de máquinas trabajando en el área, habrá mayor concentración de gases azufrados que entran al reactor y viceversa. En reactores a escala industrial este problema se reduce operando adecuadamente el flujo de gas, ya que con esto se amortiguan las fluctuaciones de la carga (gases contaminantes) que entran al reactor.

Por otra parte en la Figura 5, se puede observar que a bajas cargas de gases (H<sub>2</sub>S + CS<sub>2</sub>) a la entrada del reactor, las velocidades de remoción son bajas y existe una

tendencia en la cual a altas cargas se ve incrementada la velocidad de remoción; esto concuerda con lo reportado por Acosta R. *et al.* (1997). En la Figura 5 se puede observar que debido a las variaciones diarias de la carga, provocaron que no se lograra generar un estado estable de remoción total de ambos gases ( $H_2S + CS_2$ ) en el reactor.

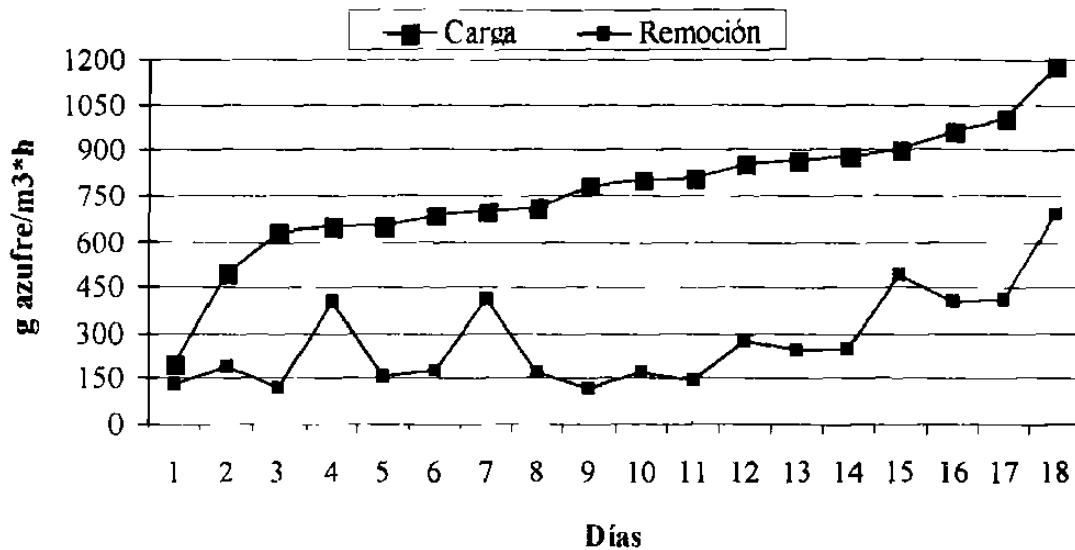


Figura 5 Relación entre la carga de gases ( $H_2S + CS_2$ ) y la velocidad de remoción. Reactor flujo cruzado. Los valores de carga fueron agrupados de menor a mayor.

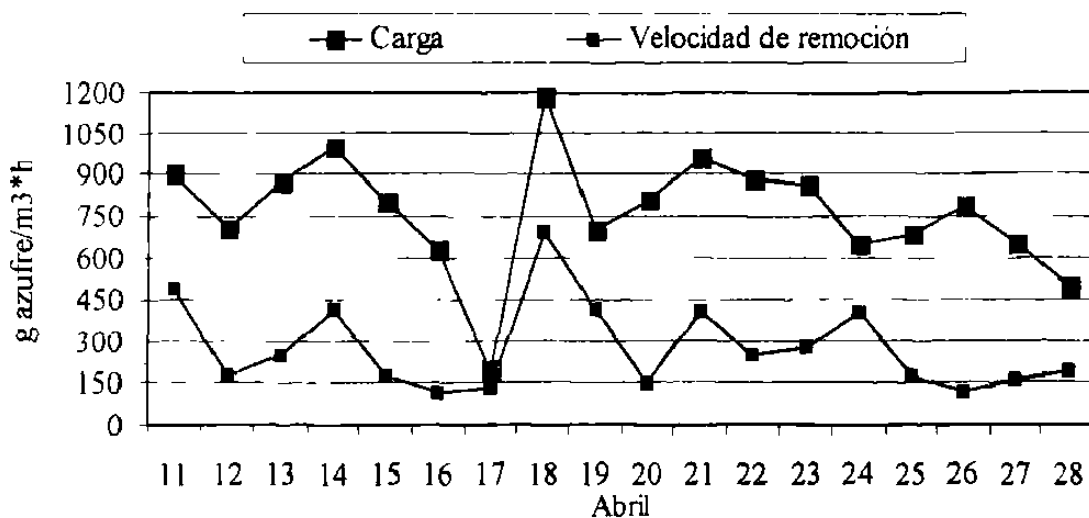


Figura 6. Resultados obtenidos entre la carga total de gases ( $H_2S + CS_2$ ) la velocidad de remoción total en el reactor flujo cruzado a través del tiempo.

#### 4.4. Experimento de bio-oxidación en el reactor Biocyd I

Las variables mas importantes que se emplearon para interpretar los resultados en el sistema fueron la carga total, la velocidad de remoción total y el azufre removido, en el Cuadro 12 se presenta la comparación de medias de las variables evaluadas en el experimento de bases en el reactor Biocyd I.

Cuando se empleó el  $\text{NH}_4\text{OH}$  como base reguladora del pH del biolcor, se presentaron dificultades con el manejo de esta base, ya que la solución desprende un olor fuerte, por lo que las precauciones de manejo (uso de mascarilla, etc.) son más estrictas que con el  $\text{KOH}$  y  $\text{NaOH}$ .

Posteriormente al terminar el periodo de aplicación del tratamiento con  $\text{NH}_4\text{OH}$  y al cambiar al  $\text{NaOH}$ , se generó inestabilidad en el sistema (disminuyó la remoción total de gases), esto tuvo una duración aproximada de cinco semanas, hasta que se resolvió bajar la carga con la finalidad de estabilizarlo; es probable que la inestabilidad se haya debido no al uso de la sosa, sino a un efecto de inhibición de la actividad de las bacterias por la alta concentración de amonio (5.07 g/l) presente en el biolcor (Cuadro 6). Existen antecedentes (Acosta R. 1997) de que las velocidades de remoción total empleando  $\text{NaOH}$ , son similares o mayores a las obtenidas en esta investigación con  $\text{KOH}$  y  $\text{NH}_4\text{OH}$ , pero sin las dificultades encontradas con este último álcali.

Cabe mencionar que aunque el costo del  $\text{KOH}$  es de \$ 12.51 / Kg (3.03 veces mas alto, en comparación al costo del  $\text{NaOH}$ ) y que el costo del  $\text{NH}_4\text{OH}$  es de \$ 3.10 / Kg (0.15 veces más alto en relación al costo del  $\text{NaOH}$ ), pudiera no ser esto un aspecto muy importante si se considera:

1. Que el reactor Biocyd<sup>®</sup> consumiría mensualmente alrededor de 112, 70 y 80 kg/mes de  $\text{KOH}$ ,  $\text{NH}_4\text{OH}$  Y  $\text{NaOH}$  respectivamente.
2. La posibilidad de emplear el biolcor como fertilizante agrícola y evitando la descarga de éste ya tratado al drenaje de la ciudad
3. Que con la alternativa de usar el  $\text{KOH}$  en lugar del  $\text{NaOH}$ , sea mas competitiva esta tecnología en países donde las normas de descargas de efluentes liquidos sean mas estrictas.

Cuadro 12. Comparación de medias de las variables evaluadas en el experimento de bases en el reactor Biocyd I.

Variable	Tratamiento		
	KOH	NH <sub>4</sub> OH	NaOH
Carga total (g azufre/m <sup>3</sup> *h)	298.6 a	312.6 a	125.4 b
Azufre a la entrada (Kg)	52.1 a	53.8 a	21.9 b
Azufre removido por día (Kg)	10.7 a	9.0 a	6.3 b
Vel. de remoción total (g azufre/m <sup>3</sup> *h)	61.7 a	50.6 b	36.2 c
Vel. de remoción de H <sub>2</sub> S (g de azufre/m <sup>3</sup> *h)	23.7 a	14.6 b	22.4 a
Velocidad de remoción de CS <sub>2</sub> (g de azufre/m <sup>3</sup> *h)	38.0 a	36.0 a	13.8 b
Azufre removido/azufre a la entrada (Kg/Kg)	0.2059 b	0.1671 b	0.2855 a

Medias con letras diferentes en las hileras denotan diferencias estadísticas al 5 % de probabilidad.

Por otra parte, actualmente no se dispone de información bibliográfica que indique cual es el efecto en el sistema biotecnológico de remoción de gases al usar una base diferente a la sosa, probablemente la potasa de alguna forma estimuló mayor actividad de las bacterias ya que los resultados muestran que se removieron mas kilogramos de azufre por día cuando se usó potasa e hidróxido de amonio que cuando se empleó sosa (10.7, 9.0 y 6.3 Kg de azufre respectivamente) como base reguladora del pH Cuadro 12).

#### **4.5. Experimento de campo, producción de materia seca de sorgo forrajero (Primero y segundo corte)**

Los resultados de la producción de materia seca en el primer corte, segundo corte y total, se presentan en el Cuadro 13. En el primer corte (75 días después de la siembra) no hubo diferencia estadística significativa entre los tratamientos; sin embargo, se puede observar que el mayor rendimiento se obtuvo en el tratamiento donde se aplicó azufre comercial. En el segundo corte (110 días después del primer corte), se presentaron diferencias estadísticas significativas entre los tratamientos, la mayor producción de materia seca se presentó en el tratamiento 6, esto es, donde se aplicó el azufre comercial, probablemente la mayor disponibilidad de sulfato en el suelo después del primer corte fue la razón de la mayor producción de materia seca. Keller (1969); Tisdale y Nelson (1966) y Swift (1985); señalan que la oxidación de azufre a sulfato en el suelo se presenta lentamente y que esto contribuye a que la disponibilidad de sulfato sea más eficiente en cuanto a la absorción por parte de las plantas

Otra causa que pudo contribuir a la mayor producción de materia seca en el tratamiento donde se aplicó al suelo el azufre comercial (tratamiento 6), pudo ser el efecto acidificante de la degradación del azufre por los microorganismos; lo que a su vez permitió que la disponibilidad de los nutrientes fósforo, hierro, manganeso y zinc fuera mayor para el cultivo del sorgo.

Stromberg y Tisdale (1979) señalan que en suelos calcáreos o con pH alcalino, son frecuentes las deficiencias de estos nutrientes, debido a la baja solubilidad que presentan en esas condiciones en el suelo y no tanto por la ausencia de ellos. Mencionan



que la adición de azufre al suelo permite que los microorganismos nativos (principalmente del género *Thiobacillus*) lo transformen en ácido sulfúrico, lo cual provoca una disminución del pH y consecuentemente se presenta una mayor disponibilidad de los nutrientes fósforo, hierro, manganeso y zinc. También citan que en suelos de zonas áridas para disminuir el pH de la capa superficial se requieren de grandes cantidades de azufre (entre otros productos) y que esto es económicamente prohibitivo; sin embargo, cuando el azufre es aplicado en banda, a un lado y debajo de la semilla de siembra (tal como se efectuó en este experimento) las cantidades por hectárea de azufre requeridas para disminuir el pH del suelo son mucho menores; esto debido a que solo se afecta el volumen de suelo más cercano a las raíces de las plantas en donde se induce la disminución del pH lo cual a su vez provoca la solubilidad y mayor disponibilidad del fósforo y de los micronutrientes ya mencionados.

En el segundo corte, el tratamiento 6 (azufre comercial) fue el que presentó una significativa y mayor producción que los tratamientos 1,2,3,4,5 y 7 (testigo) los cuales presentaron la menor producción de materia seca y estadísticamente la misma entre ellos (Cuadro 13).

Cuadro 13. Producción de materia seca de sorgo forrajero en el primer corte, segundo corte y total.

No. de Tratamiento	Primer Corte	Segundo Corte	Total
6 Azufre	12.98 a*	23.04 a*	36.02 a*
2. Biolicor A + Nitrógeno	11.86 a	18.70 ab	30.57 b
5. Nitrógeno + azufre comercial	11.08 a	18.02 ab	29.11 bc
1. Biolicor A	11.05 a	16.97 ab	27.93 bc
3 Biolicor B	11.03 a	18.57 ab	29.60 bc
4. Biolicor B + Nitrógeno	10.06 a	16.72 ab	26.14 bc
7. Testigo (Sin aplicación)	9.42 a	15.21 b	25.27c

\* Medias con letras diferentes entre la columna denotan diferencias estadísticas al 5 % de probabilidad.

Biolicor A = con  $\text{NH}_4\text{OH}$ ; Biolicor B = con  $\text{KOH}$  ;

Fuente de Nitrógeno usada =  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Es importante señalar que la producción de materia seca en el primer corte, segundo corte y total que se obtuvo en los tratamientos donde se fertilizó el suelo con los biolicores, la mezcla de biolicores-fertilizante nitrogenado y el fertilizante nitrogenado, no disminuyeron la producción de materia seca en relación al tratamiento testigo.

Por otro lado tampoco superaron estadísticamente la producción de materia seca en relación al tratamiento 6. Esto no significa que, los biolicores, las mezclas y el fertilizante nitrogenado no puedan ser usados como fertilizantes agrícolas. Sino que el suelo en el que se efectuó el ensayo, suministró el nitrógeno y potasio que requería el cultivo de sorgo, esto explica por que la adición de ellos no contribuyó a aumentar significativamente la producción de materia seca en ambos cortes.

Si se considera la producción total de materia seca en ambos cortes; se puede observar que hubo diferencia estadística entre los tratamientos y se puede inferir que la mayor producción la presentó el tratamiento 6, sin embargo, el tratamiento 2 (Biolicor A + Nitrógeno) presentó una significativa y mayor producción que el tratamiento testigo. Cabe señalar que el testigo fue el que presentó significativamente la menor producción total de materia seca.

#### **4.5.1. Absorción de nitrógeno, potasio y azufre en el sorgo forrajero (Segundo corte)**

En el Cuadro 14 se presenta el análisis estadístico con respecto a la absorción total de nitrógeno, potasio y azufre en el sorgo; las primeras dos variables fueron estadísticamente iguales.

La absorción de azufre por las plantas fue mayor y estadísticamente significativa en el tratamiento 6 (aplicación de azufre comercial), esto se debió probablemente a que en los tratamientos 1,2,3,4, y 5, la mayor parte del azufre que se encontraba en los biolicores estaba en forma de sulfato y al darse los riegos o al presentarse la lluvia se indujo la lixiviación del  $S-SO_4^{2-}$  a estratos del suelo más profundos (donde las raíces de las plantas no lo pudieron absorber); lo anterior concuerda con lo reportado por Burns (1967); Fox y Hue (1986); Wolt y Adams (1979) y Wolt *et al.* (1992).

Cuadro 14. Absorción total de nitrógeno, potasio y azufre por el cultivo de sorgo forrajero (Segundo corte).

Tratamiento	Nitrógeno (N) kg/ha	Potasio (K) kg/ha	Azufre (S) kg/ha
1. Biolicor A*	178.8 a**	171.6 a**	21.2 ab**
2. Biolicor A + Nitrógeno <sup>1</sup>	211.2 a	119.5 a	17.7 ab
3. Biolicor B	198.1 a	169.2 a	21.1 ab
4. Biolicor B + Nitrógeno <sup>1</sup>	178.9 a	127.4 a	15.3 b
5. Nitrógeno <sup>1</sup> + Azufre comercial	184.0 a	141.9 a	16.9 ab
6. A z u f r e Comercial	228.5 a	184.9 a	28.8 a
7. Testigo (Sin aplicación)	155.4 a	128.6 a	18.7 ab
	cv = 20 %	cv = 25.3 %	cv = 26 %

\* Biolicor A = con NH<sub>4</sub>OH; Biolicor B = con KOH;

<sup>1</sup>Fuente de Nitrógeno usada = (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

\*\*Medias con letras diferentes en la columna denota diferencia estadística al 5 % de probabilidad.

Por otra parte la mayor absorción del S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> por parte de las plantas, en el tratamiento 6, se debió a que la disponibilidad en el suelo del azufre en forma de sulfato fue mayor después del primer corte del sorgo. Wainwright (1984) menciona que los microorganismos nativos del suelo realizan una lenta degradación de azufre a sulfato; Swift (1985) reporta que el período de oxidación de azufre a sulfatos puede variar entre 1 a 12 semanas o más, y que esto dependerá entre otros factores de las condiciones de temperatura y humedad del suelo, así como la presencia de *Thiobacillus*.

Lo anterior no se puede confirmar ya que no se realizó durante el experimento ninguna determinación de S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> en el suelo. Sin embargo, la mayor producción de materia seca en el segundo corte y la mayor absorción por las plantas de azufre total en el tratamiento 6, podría confirmar el hecho que hubo mayor disponibilidad de azufre en forma de sulfato para el cultivo. Cabe mencionar que el tratamiento 6, también presentó la mayor absorción de nitrógeno y de potasio aunque no fue significativa.

Finalmente se puede deducir que en el tratamiento 6, los microorganismos oxidaron el azufre a sulfatos y este fue aprovechado por las plantas después del primer

corte; también se puede establecer que el suelo no suplió a las plantas el S-SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> que requerían, por lo que este nutrimento estuvo en una condición deficiente en el suelo.

## 5. CONCLUSIONES

La inoculación al reactor con la mezcla de las cuatro especies puras de *Thiobacillus* bajo las condiciones de operación que se tuvieron no logró generar un estado estable, con lo que se dificulta el comparar adecuadamente el comportamiento de esta mezcla de microorganismos en la remoción de gases azufrados. Sin embargo, la evaluación de la capacidad de oxidación a través de la velocidad de remoción total de  $H_2S + CS_2$  presentó valores puntuales de hasta 691 g de azufre/ $m^3 \cdot h$  (muy altos) y en promedio de 276.4 g de azufre/ $m^3 \cdot h$ . Por lo que la primera hipótesis planteada se rechaza parcialmente. Lo anterior permite establecer que se cumplió parcialmente con el objetivo planteado.

Los resultados encontrados indican que es operativamente factible la sustitución de hidróxido de sodio por el hidróxido de potasio como álcali para regular el pH del biolcor en el proceso Biocyd<sup>®</sup>; además de que no se disminuye la eficiencia de oxidación biológica de los gases azufrados en el reactor; cabe mencionar que el hidróxido de amonio también se puede utilizar; sin embargo, presenta problemas de manejo que dificultan su uso. Lo anterior permite establecer que la hipótesis planteada se rechaza y se cumple con el segundo objetivo.

La mayor producción de materia seca del sorgo forrajero en el segundo corte se presentó en el tratamiento con aplicación de azufre comercial y fue significativa con respecto a los demás tratamientos.

La mayor producción total (primer corte + segundo corte) de materia seca de sorgo forrajero se presentó en el tratamiento con aplicación de azufre comercial y fue significativa.

La menor producción total de materia seca se presentó en el tratamiento testigo en el primer corte, segundo corte y total.

Los tratamientos donde se fertilizó el suelo con los biolcores A y B generados en el proceso Biocyd<sup>®</sup> no disminuyeron la producción de materia seca del sorgo forrajero en relación al tratamiento testigo.

El tratamiento con aplicación de azufre comercial presentó la mayor producción de materia seca en el segundo corte y coincidió con la mayor absorción de las plantas de azufre (significativa), nitrógeno y potasio (no significativa). Por lo que se acepta la hipótesis de que los biolicores tienen nutrientes esenciales para el sorgo forrajero y pueden ser empleados como fertilizantes agrícolas. Con lo anterior se cumplió el tercer objetivo.

## 6. RECOMENDACIONES

En caso de sustituir el NaOH por KOH en la operación del proceso Biocyd<sup>®</sup>, una alternativa de mejora es la de colocar en forma paralela al clarificador un tanque diseñado con la finalidad de trasladar el biolico que se va a purgar del clarificador (una vez que este tenga una concentración de sulfatos de 35 a 40 g/l, cierta conductividad eléctrica, entre otras), y eficientar la sedimentación agregando productos que actúen como coagulantes, como el óxido de calcio, hidróxido de calcio, carbonato de calcio o hidróxido de magnesio (todos de bajo costo en relación al hidróxido de sodio), y con esto poder reutilizar el agua al incorporarla nuevamente al proceso. Esto abatirá el costo que se paga por el agua (el cual puede ser considerable en un reactor a escala industrial y al año), y permitiría contar con un lodo que más fácilmente podría ser manejado y transportado para ser utilizado como fertilizante o mejorador de suelos y de esta forma el proceso Biocyd<sup>®</sup> será sustentable ya que se tendrán considerados y se controlaran las tres áreas de contaminación como son, el aire, el agua y el suelo.

Realizar estudios de impacto al suelo sobre el uso continuo de la adición de estos lodos o subproductos del proceso Biocyd<sup>®</sup>. Ya que en la prueba que se efectuó para utilizar los biolicores como fertilizantes no consideraron los efectos de estos sobre el suelo; solo se consideró el efecto sobre la producción de materia seca del sorgo forrajero.

Efectuar inoculaciones a los reactores con especies puras de *Thiobacillus* o con especies cultivadas y que provengan de los mismos reactores; ya que una de las actividades de operación que se dan con frecuencia, es la de efectuar inoculaciones con biolico de un reactor a otro o con lodos activados. Lo anterior tiene el inconveniente que la cantidad de bacterias sulfo-oxidantes no es muy alta; sin embargo, si se tienen cultivadas, la concentración de estas será mayor y más pronto se iniciará el proceso de degradación en un reactor que arranca por primera vez o en uno al que se le realizaron lavados de bio-película por aumento de la caída de presión.

## 7. LITERATURA CITADA

- Acosta R., C. M. ; W. Hugler Q.; J. L. Benavente L. 1997. Biocyd® Technology demonstration project for carbon disulfide bioremediation in waste gas. Symposium Emerging Technologies in Hazardous Waste Management IX. september 15 - 17. Pittsburgh, Pennsylvania, U.S.A. 10 p. (in press).
- Acosta R., C. M. 1997 Comunicación personal. Grupo Cydsa, Planta Monterrey, N.L. México.
- Anónimo. 1977 Niosh manual of analitical methods. 2nd edition. vol 3. method 5248 U.S.A.
- Berzaczy, E.; E. Niedermayer; L. Kloimstein and A. Windsperger. 1988. Biological exhaust gas purification in the rayon fiber manufacture. (The Waagner-Biro/ Glanzstoff Austria Process). Chem. Biochem. Eng. 4: 201 - 204.
- Bornemisza, E. 1990 Sulphur in soils of Central America. Sulphur Agriculture. 14: 13 - 15.
- Brock, T D y M. T Madigan. 1993. Microbiología. Prentice Hall Hispanoamericana, S A México 956p
- Buisman, C. J. N., B W Witt and G Lettinga. 1990. Biotechnological sulphide removal in three polyurethane carrier reactors: Stirred reactor, biorotor and upflow reactor. Water Research. 24: 245 - 251.
- Buisman, C. J. N. ; P. Geraats, S. Ijspeert and G. Lettinga. 1990a. Optimization of sulphur production in a biotechnological sulfide-removing reactor. Biotechnol. Bioeng. 35. 50 - 56.
- Buisman, C J. N; N. Post; P. Ijspeert; P. Geraats and G. Lettinga. 1989. Biotechnological process for sulphide removal with sulphur reclamation. Acta Biotechnol. 3: 255 - 267.
- Buisman, C J. N, G Lettinga; C. W M. Paasschens and L. H. A. Habets 1991 Biotechnological sulphide removal from effluents. Water. Sci. Tech. 24 (3/4): 347 - 356.



- Burns, G. R. 1967. Oxidation of sulphur in soils. The Sulphur Institute. *Technical Bulletin Number 13*. 41p.
- Cadenhead, P. and K. L. Sublette. 1990. Oxidation of hydrogen sulfide by Thiobacilli. *Biotechnology and Bioengineering*. 35: 1151 - 1154
- Cork, D. J. ; A. Maka; and A. Srnak. 1985. Control of oxidative sulfur metabolism of *Chlorobium limicola* form thiosulfatophilum. *Appl. Environ. Microbiol.* 49 (2): 269 - 272.
- Cork, D. J. and M. Szuchan. 1982. Acid-gas bioconversion favors sulfur production. *Biotechnology and Bioengineering. Symp.* 12: 285 - 290.
- Chapman, H. P. y P. F. Pratt. 1979. Métodos de análisis para suelos, plantas y aguas. Ed. Trillas. México. 195p.
- Días R., R. y A. Hunter. 1978. Metodología de muestreo de suelos y tejido vegetal, e investigación en invernadero. Turrialba, Costa Rica. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza. CATIE. 68p.
- Eckenfelder, W. W., Y. Argamaand y E. Miller. 1989. Process selection criteria for the biological treatment of industrial wastewaters. *Environmental Progress*. 8: 40 - 45.
- Fox, R.L. and N.V. Hue. 1986. Sulfur cycling in the tropics and sulfur requirements for agriculture. In. International symposium on sulphur in agricultural soils. S. Portch and S. Ghulam Hussain. eds. The Bangladesh Agricultural Research Council and The Sulphur Institute. Dhaka, Bangladesh. pp. 139 - 162.
- Gadre, R. V. 1989. Removal of hydrogen sulfide from biogas by chemoautotrophic fixed-film bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering*. 34: 410 - 414.
- Greeberg, A. E., L. S. Clesceri y A. D. Eaton. 1992. Standard methods for the examination of water and wastewater. Sulfate. Turbidimetric method. section 4. pp 134
- Jespersen, Ch.; D. Jerger and J. Exner. 1993. Bioremediation tackles hazwaste. *Chemical Engineering*. june. pp. 116 - 122.
- Kamprath, E. J. and U. S. Jones. 1986. Plant response to sulfur in the southeastern United States. in. M.A. Tabatabai. ed *Sulfur in Agriculture*. *Agronomy*. 27 323 - 345

- Keller, P. 1969. Effect of sodium chloride and sulphate on sulphur oxidation in soil. *Plant and Soil*. 30(1): 15 - 22.
- Kelly, D. P. 1985. Physiology of the thiobacilli: elucidating the sulphur oxidation pathway. *Microbiol. Sci.* 2: 105 - 109.
- Kelly, D. P. and A. P. Harrison. 1989. Thiobacillus. *In*. *Bergey's Manual of systematic bacteriology*. J. G. Holt. ed. Aerobic chemolithotrophic bacteria and associated organisms. Section 20. vol. 3. pp. 1842 - 1858.
- Lowry, O. H. ; N. J. Rosenbrough; A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193: 265 - 275.
- Mortvedt, J. J. 1981. *Identifying and correcting sulfur deficiencies in crop plants*. *Crops and Soils Magazine*. june-july. pp. 11 - 14.
- Ongcharit, C.; K. Sublette; and Y. Shah. 1991. Oxidation of hydrogen sulphide by flocculated *Thiobacillus denitrificans* in a continuous culture. *Biotechnology Bioengineering*. 37 497 - 504.
- Ottengraf, S. P. P. and A. H. C. Van Den Oever. 1983. Kinetics of organic compound removal from waste gases with a biological filter. *Biotechnology and Bioengineering*. 25: 3089 - 3102.
- Pasricha, N. S. and R. L. Fox. 1993. Plant nutrient sulfur in the tropics and subtropics. *Advances in Agronomy*. 50: 209 - 269.
- Plas, Ch., K. Wimmer; P. Holubar; D. Mattanovich; H. Danner; E. Jelinek; H. Harant and R. Braun 1993. *Degradation of carbondisulphide by Thiobacillus isolate*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38: 820 - 823.
- Plas, Ch., H. Harant; H. Danner; E. Jelinek; K. Wimmer; P. Holubar and R. Braun. 1992. Ratio of biological and chemical oxidation during the aerobic elimination of sulphide by colorless sulphur bacteria. *Appl. Microbiology Biotechnol.* 36: 817 - 822
- Platou, J. S. and R. Irish 1982. *The fourth major nutrient*. The Sulphur Institute, Washington. D C USA. 32 p.

- Pronk, J. T. ; R. Meulemberg; W. Hazeu, P. Bos and J. G. Kuenen. 1990. Oxidation of reduced inorganic sulphur compounds by acidophilic thiobacilli. *Microbiology Reviews* 75: 293 - 306.
- Revah M., S. ; C. M. Acosta R.; W. Hugler Q.; R. Trinidad; C. Avila; I. Estrada and A. Hinojosa M. 1995. Air biodesulfuritation from viscose plants. In. D. S. Hodge and E. Reynolds Jr. eds. 1995. Conference on Biofiltration. on Air Pollution Control Technology. Los Angeles, U.S.A. TRG - USC. 7p.
- Rodriguez F., H. y E. Sánchez A. Métodos de análisis físico químicos para suelos agrícolas. Facultad de Agronomía, Universidad Autónoma de Nuevo León. 219 p.
- Santelises A., A., J D. Etchevers y J. Z. Castellanos. 1987. Análisis químico para evaluar la fertilidad del suelo. Sociedad mexicana de la Ciencia del Suelo. Publicación Especial No 1 México. 217 p.
- Smith, N A. y D P Kelly 1988. Oxidation of carbon disulphide as the sole source of energy for the autotrophic growth of *Thiobacillus thioparus* strain TK-m. *Journal of General Microbiology*. 134: 3041 - 3048.
- Srivastava, K C 1993 Biological removal of H<sub>2</sub>S from sour natural gas. Proceedings of the 1992 GRI Liquid Redox Sulfur Recovery Conference. Austin, Texas, USA. pp. 131 - 139
- Starkey, R. L 1950. Relations of microorganism to transformations of sulfur in soils. *Soil Sci*. 70:55 - 65
- Stromberg, L. K and S. L. Tisdale. 1979. Treating irrigated arid-land soils with acid-forming sulphur compounds. Technical Bulletin Number 24. The Sulphur Institute. Washington, D. C. USA. 26 p.
- Sublette, K. L. 1987. Aerobic oxidation of hydrogen sulphide by *Thiobacillus denitrificans*. Desulphurization of Natural Gas.Purification. *Biotechnology and Bioengineering*. 29: 690 - 695.
- Sublette, K. L. 1990. Microbial treatment of sour gases for the removal and oxidation of hydrogen sulfide *Gas Separation & Purification*. 4: 91 - 96.
- Swift, R. S. 1985 Mineralization and immobilization of sulphur in soil. *Sulphur in Agriculture* 9 20 - 24

- Tandon, H. L. S. 1985. Importance of sulphur in Indian agriculture. *Sulphur in Agriculture*. 9: 8 - 12.
- Tisdale, S. L. and W. L. Nelson. 1966. *Fertilidad de los suelos y fertilizantes De Hispanoamericana*. México. 760 p.
- Torres C., M. D.; S. Revah M.; A. Hinojosa M., F. J. Paez M. and V. M. Morales B. 1993. Biological process for the elimination of sulphur compounds present in gas mixtures. United States Patent Patent number 5,236,677. Date of patent, august 17, 1993.
- Vishniac, W. and H. Santer. 1952. The Thiobacillus. *Bact. Reviews*. 21: 195-213.
- Windsperger, A. 1990. Anwendung eines biologischen tropfkoperreaktors zur abluftreinigung eines viskosebetriebes *Chemie Ingenieur Technik*. 12: 1033 - 1034.
- Wainwright, M 1984 Sulfur oxidation in soils. *Advances in Agronomy*. 37. 349 - 396.
- Wolt, J. D. and Adams, F 1979 The release of sulfate from soil applied basluminite and alunite. *Soil Science Society of American Journal*. 43: 118 - 121.
- Wolt, J. D. . N V Hue and R L Fox. 1992. Solution sulfate chemistry in three sulfur retentive Hydrandepts *Soil Science Society of American Journal*. 56: 89 - 95.
- Yang, Y 1993 Use of biofiltration to control hydrogen sulfide emissions. IGT's 16th International Symposium on GAS, Oil, and Environmental Biotechnology. november 29-december 1. 22p.

## 8. APENDICE

Cuadro A1. Concentrado de los análisis de varianza para las variables incremento de pH, incremento de proteína e incremento de sulfatos. Evaluación de la capacidad oxidativa de Na<sub>2</sub>S por cuatro especies de *Thiobacillus* en matraz

FV Especie (s)	GL	Cuadrados Medios		
		Incremento de pH	Incremento de proteína	Incremento de sulfatos
A	1	2.594*	5263.047	28.467*
B	1	2.513*	9162.500	4.945
C	1	4.596*	296.250	25.776*
D	1	4.088*	6665.485	1.90
pH	1	18.765*	9856.017*	54.683*
AB	1	4.174*	7560.469	3.756
AC	1	1.415	12658.802	8.285
AD	1	4.043	1300.208	0.225
ApH	1	5.078*	7447.517	8.869
BC	1	0.021	3100.833	5.305
BD	1	0.143	3440.052	1.949
BpH	1	3.961*	428.220	4.315
CD	1	0.039	1035.469	43.326*
CpH	1	0.518	118.845	0.007
DpH	1	3.177*	3770.684	26.208*
ABC	1	3.641*	2145.125	0.011
ABD	1	5.049*	2397.781	3.802
ABpH	1	1.587*	5420.352	2.733
ACD	1	2.372*	4728.781	2.582
ACpH	1	1.585*	819.019	2.239
ADpH	1	0.543*	4514.133	0.667
BCD	1	5.485*	3280.500	14.351
BCpH	1	0.009	4392.300	11.901
BDpH	1	0.042	646.352	0.215
CDpH	1	0.106	14.352	6.218
Error	34	0.16082352	229.031617	2.992117647

\*Diferencia significativa  $p < 0.05$

Cuadro A2. Efecto de la oxidación biológica de Na<sub>2</sub>S sobre el pH del medio de cultivo considerando las 4 especies de *Thiobacillus* con una concentración inicial de proteína de 400 µg/ml. pH inicial fue = 4.0.

Especie Combinación	pH Inicial	pH Final	Diferencia Unidades de pH
A ( <i>T. denitrificans</i> )	4.363	4.273	0.090 ab*
B ( <i>T. ferrooxidans</i> )	3.993	3.832	0.161 a
C ( <i>T. thiooxidans</i> )	4.038	5.123	-1.085 c
D ( <i>T. thioparus</i> )	4.131	4.243	-0.111 ab
AB	4.03	4.075	-0.045 ab
AC	4.037	4.180	-0.143 ab
AD	4.100	4.300	-0.205 abc
CD	4.025	3.865	0.160 a
BD	3.970	3.635	0.335 a
BC	4.015	4.060	-0.045 ab
ABD	4.020	4.420	-0.405 abc
ACD	3.930	4.720	-0.795 bc
BCD	3.995	4.405	-0.410 abc
ABC	4.030	4.380	-0.350 abc
ABCD 100	3.990	4.430	-0.440 abc
ABCD 400	4.048	4.055	-0.007 ab

\* Medias con letras diferentes en la columna denota diferencia estadística al 5 % de probabilidad

Cuadro A3. Efecto de la oxidación biológica de Na<sub>2</sub>S sobre el pH del medio de cultivo considerando las 4 especies de *Thiobacillus* con una concentración inicial de proteína de 400 µg/ml. pH inicial fue = 7.0.

Especie (Combinación)	pH Inicial	pH Final	Diferencia Unidades de pH
A ( <i>T. denitrificans</i> )	6.908	4.050	2.858 a*
B ( <i>T. ferrooxidans</i> )	6.983	6.765	0.218 b
C ( <i>T. thiooxidans</i> )	7.022	6.915	0.107 b
D ( <i>T. thioparus</i> )	6.992	6.977	0.014 b
AB	6.97	4.350	2.620 a
AC	7.025	3.730	3.295 a
AD	6.920	4.060	2.860 a
CD	6.980	6.560	0.420 b
BD	7.030	6.625	0.405 b
BC	6.960	6.310	0.640 b
ABD	6.920	7.06	-0.135 b
ACD	6.940	6.910	0.030 b
BCD	6.920	6.910	0.100 b
ABC	6.970	6.885	0.085 b
ABCD 100	6.960	6.900	0.060 b
ABCD 400	6.927	6.882	0.045 b

\* Medias con letras diferentes entre la columna denota diferencia estadística al 5 % de probabilidad.

**Cuadro A4. Concentrado de los análisis de varianza para las variables producción de materia seca (primer corte), producción de materia seca (segundo corte) y producción de materia seca total (primer corte + segundo corte). Experimento de biolicores como fertilizantes agrícolas.**

		Cuadrados Medios		
FV	GL	Produccion Materia seca Primer corte	Produccion Materia seca Primer corte	Produccion Materia seca (P. corte + S. corte)
Tratamientos	6	8.032552	36.529949*	75.069008*
Bloques	5	18.6252294	9.053125	5.757031
Error	30	8.485970	12.493125	17.930079

\*Diferencia significativa  $p < 0.05$



Cuadro A5. Concentrado de los análisis de varianza para las variables nitrógeno total, potasio total y azufre total absorbidos en el segundo corte. Experimento de biolicores como fertilizantes agrícolas.

FV	GL	Cuadrados Medios		
		Nitrogeno	Potasio	Azufre
Tratamientos	6	2317.1875 NS	2675.2187 NS	79.154297*
Bloques	3	4518.916504	837.770813	20.142904
Error	18	1457.034668	1424.055542	26.869411

\*Diferencia significativa  $p < 0.05$

NS No significativo

