

85  
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

DETERMINACION DE LAS CONDICIONES PARA  
LA BIODESULFURACION DEL COMBUSTOLEO.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
INGENIERO QUIMICO  
P R E S E N T A :  
RUBEN JUAREZ GOMEZ



MEXICO, D. E.

1997.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

**JURADO ASIGNADO**

PRESIDENTE	M. en I. JOSÉ FRANCISCO GUERRA RECASENS
VOCAL	I.Q. ARTURO LÓPEZ TORRES
SECRETARIO	M. en B. LUIS GILBERTO TORRES BUSTILLOS
1ER. SUPLENTE	I.Q. RODOLFO TORRES BARRERA
2DO. SUPLENTE	DR. VÍCTOR MANUEL LUNA PABELLO

LA PRESENTE TESIS SE DESARROLLÓ EN:

**INSTITUTO DE INGENIERÍA, U.N.A.M**  
**COORDINACIÓN DE INGENIERÍA AMBIENTAL**



M. en B. Luis Gilberto Torres Bustillos  
ASESOR



Rubén Juárez Gómez  
SUSTENTANTE

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN LA  
COORDINACIÓN DE INGENIERÍA AMBIENTAL DEL  
INSTITUTO DE INGENIERIA DE LA UNAM.  
BAJO LA DIRECCIÓN DE:  
M. EN B. LUIS GILBERTO TORRES BUSTILLOS  
Y LA DRA. BLANCA JIMÉNEZ CISNEROS.**

**SE CONTÓ CON EL APOYO DE BECA POR PARTE  
DE LA DGAPA EN EL PROYECTO IN503895.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO,  
LA FACULTAD DE QUÍMICA Y EL INSTITUTO DE INGENIERÍA**  
Por la formación que me han brindado

**Al M. en B. Luis G. Torres B. y a la Dra. Blanca Jiménez C. por la oportunidad de participar en este proyecto.**

**Al Ing. Rodolfo Torres Barrera por su apoyo durante la carrera.**

**Al Dr. Vázquez-Duhait del Instituto de Biotecnología de la UNAM y al Dr. Jorge Romero del Instituto de Limnología y Ciencias de Mar (UNAM) por su apoyo en la realización de esta tesis.**

**A todas y cada una de las personas que de alguna forma me ayudaron en la realización de este trabajo y que por falta de memoria más no de ganas en este momento se me escaparon.**

**Muchas Gracias.**



# DEDICATORIA

a  
**Maggie**  
por su cariño  
y estoicismo

A mis patrocinadores oficiales:  
**Rubén y Liduvina**  
*(mis padres)*  
por su confianza y apoyo

A  
**Fausto y Marily**  
*(mis hermanos)*  
por su amistad y su paciencia

Al E.Q.P:  
**Rafael, German,  
Mauricio y Jorge**

A toda la gente del II: Dionicio, Ulises, Edmundo, Carlos,  
Luis, Homero, Abelardo, Judit, Vero, Alejandro, Norma,  
y demás compañeros y amigos del la FQ y del IMIQ

# CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	<b>I</b>
<b>LISTA DE TABLAS</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>IV</b>
<b>CAPÍTULO 1</b>	
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
<b>CAPÍTULO 2</b>	
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 COMBUSTIBLEO</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Importancia del combustibleo como energético.....	4
2.1.2 Contenido de Azufre.....	7
<b>2.2 QUÍMICA DEL AZUFRE</b> .....	<b>10</b>
2.2.1 Ciclo del Azufre.....	10
2.2.2 Contaminación por SO <sub>2</sub> y lluvia ácida.....	15
2.2.3 Efectos de los óxidos de azufre a la salud.....	17
<b>2.3 DESULFURACIÓN</b> .....	<b>19</b>
2.3.1 Reacciones de desulfuración.....	19
2.3.2 Proceso de Desulfuración Catalítica.....	20
2.3.3 Proceso de Biotdesulfuración.....	22
<b>2.4 CONDICIONES DE PROCESO EN SISTEMAS BIOTECNOLÓGICOS</b> .....	<b>31</b>
2.4.1 Temperatura.....	31
2.4.2 pH.....	32
2.4.3 Medio de Cultivo.....	32
<b>CAPÍTULO 3</b>	
<b>3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL</b> .....	<b>34</b>
<b>3.1 SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE TRABAJO</b> .....	<b>34</b>
<b>3.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PROCESO</b> .....	<b>36</b>
3.2.1 Efecto de la Temperatura.....	36
3.2.2 Efecto del pH.....	36
3.2.3 Efecto de la concentración del sustrato.....	37
3.2.4 Efecto de la solución reductora.....	37
<b>3.3 SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO</b> .....	<b>38</b>
3.3.1 Formulación de un medio para el proceso de desulfuración.....	38
<b>3.4 PRUEBAS CON COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS</b> .....	<b>40</b>
3.4.1 Efecto del solvente.....	41
3.4.2 Desulfuración de los compuestos organosulfurados.....	41
<b>3.5 ENSCALAMIENTO A FERMENTADOR DE 5 LITROS</b> .....	<b>43</b>
3.5.1 Biotdesulfuración en combustibleo.....	44

<b>CAPÍTULO 4</b>	
4. RESULTADOS	46
4.1 SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE TRABAJO	46
4.2 DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PROCESO	49
4.2.1 Efecto de la Temperatura	49
4.2.2 Efecto del pH	51
4.2.3 Efecto de la concentración de sustrato	53
4.2.4 Efecto de la solución reductora	58
4.3 FORMULACIÓN Y SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO	60
4.4 PRUEBAS CON COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS	64
4.4.1 Efecto del solvente	64
4.4.2 Compuestos organosulfurados	66
4.5 ESCALAMIENTO A FERMENTADOR DE 5 LITROS	70
4.5.1 Caracterización del combustible	70
4.5.2 Biorreducción de combustibles	71
<b>CAPÍTULO 5</b>	
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	71
5.1 CONCLUSIONES	71
5.2 RECOMENDACIONES	71
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>78</b>
<b>APÉNDICE A</b>	
MEDIOS Y TÉCNICAS DE CULTIVO	82
A.1 CULTIVO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS	82
A.2 MEDIOS DE CULTIVO	83
A.3 TÉCNICAS DE CULTIVO	85
<b>APÉNDICE B</b>	
MÉTODO GRAVIMÉTRICO PARA DETERMINAR SULFATOS	88
DETERMINACIÓN DE ÁCIDO SULFÚDRICO	90
B.1 MÉTODO IODOMÉTRICO	90
B.2 MÉTODO POTENCIOMÉTRICO	91
<b>APÉNDICE C</b>	
TABLAS DE RESULTADOS	95



## **RESUMEN**

El presente trabajo de tesis busca sentar las bases para establecer las condiciones de operación de un proceso de biodesulfuración de combustóleo por la vía reductiva.

En el primer capítulo se hace una breve introducción, donde se pretende justificar el proyecto de biodesulfuración.

El segundo capítulo comprende una revisión bibliográfica donde se plantea más a fondo la problemática derivada del uso de combustibles con alto contenido de azufre. De esta manera se pretende ilustrar la importancia energética del combustóleo y el impacto ambiental que acarrea su uso. En este mismo capítulo se hace una revisión de las tecnologías existentes para la desulfuración de combustibles fósiles, así como los estudios realizados en el área de biodesulfuración.

La metodología experimental empleada se describe en el capítulo tres y en el apéndice A, donde se describen las técnicas empleadas.

En el capítulo cuatro, se hace una discusión de los resultados obtenidos comparándolos con los reportados en la literatura.

En el capítulo cinco se concluye sobre los resultados obtenidos en éste trabajo y se plantean las recomendaciones para trabajos posteriores.

## LISTA DE TABLAS

Tabla 2.1.1	Requerimientos detallados para combustóleos	3
Tabla 2.1.2	Consumo de combustóleo durante 1994. (SEMIP 1994)	5
Tabla 2.1.3	Generación de energía eléctrica a nivel nacional durante 1994	5
Tabla 2.1.4	Comparación de los diferentes sistemas termoelectricos y sus combustibles durante 1994	6
Tabla 2.1.5	Valores comparativos de poder calorífico y costo para algunos combustibles industriales.	6
Tabla 2.1.6	Contenido de azufre en algunos petróleos crudos.	8
Tabla 2.1.7	Compuestos organosulfurados presentes en el petróleo.	8
Tabla 2.1.8	Compuestos azufrados que se han encontrado en el petróleo.	9
Tabla 2.2.1	Algunos microorganismos que metabolizan compuestos con azufre	14
Tabla 2.2.2	Algunos estudios de laboratorio acerca de los efectos de exposiciones breves al dióxido de azufre sobre la función respiratoria. (OMS 1982)	18
Tabla 2.2.3	Concentraciones límite de dióxido de azufre y ácido sulfúrico requeridas para producir efectos sobre las funciones sensoriales o reflejos en humanos durante exposiciones breves (OMS 1982)	18
Tabla 2.3.1	Reacciones de hidrogenación.	19
Tabla 2.3.2	Desulfuración de diferentes crudos usando <i>D. desulfuricans</i> M6	27
Tabla 2.3.3	Desulfuración de diferentes fracciones de tres crudos usando <i>D. desulfuricans</i> M6.	28
Tabla 2.3.4	Comparación de los diferentes sistemas biodesulfuradores reportados	28
Tabla 2.4.1	Principales elementos constituyentes las células microbianas	33
Tabla 3.1.1	Clasificación de las cepa de trabajo	34
Tabla 3.3.1	Composición del suero de leche AMPI.	38
Tabla 3.3.2	Composición de cada uno de los medios evaluados.	39
Tabla 3.4.1	Compuestos organosulfurados, fórmula, peso molecular, cantidad de azufre y solubilidad.	40
Tabla 3.4.2	Concentración de los compuestos organosulfurados en las pruebas de desulfuración	42
Tabla 4.1.1	Clasificación de las cepa de trabajo	47
Tabla 4.2.1	Reacciones de formación para CH <sub>4</sub> y H <sub>2</sub> S.	54
Tabla 4.3.1	Comparación de la capacidad sulfato-reductora de las cinco cepas en los medios diseñados contra medio Postgate B y C	60
Tabla 4.3.2	Comparación de la actividad volumétrica de las cinco cepas en los medios diseñados contra medio Postgate B y C.	61
Tabla 4.3.3	Comparación de la actividad específica de las cinco cepas en los medios diseñados contra medio Postgate B y C.	61
Tabla 4.3.4	Costo de los medios de cultivos analizados.	63
Tabla 4.4.1	Degradación de compuestos organosulfurados.	67
Tabla 4.5.1	Análisis de combustóleo proveniente de la refinería de Tula	70
Tabla 4.5.2	Resultados de una biodesulfuración de combustóleo	72
Tabla A.1	Composición del medio Postgate B,C y API	81
Tabla C.1	Datos de las cepas a pH de 5	92
Tabla C.2	Datos de las cepas a pH de 7	93
Tabla C.3	Remoción de sulfatos a 28, 35 y 45°C	94
Tabla C.4	Actividades volumétricas a 28, 35 y 45°C	94
Tabla C.5	Actividades específicas a 28, 53 y 45°C	94
Tabla C.6	Remoción de sulfatos a pH de 5, 7 y 8	95
Tabla C.7	Actividad volumétrica a pH de 5, 7 y 8	95
Tabla C.8	Actividad Especifica a pH de 5, 7 y 8	95
Tabla C.9	Remoción de sulfatos a diferentes concentraciones de sulfato a 168 y 336 horas	96
Tabla C.10	Actividad volumétrica a diferentes concentraciones de sulfato a 168 y 336 horas	96
Tabla C.11	Actividad específica a diferentes concentraciones de sulfato a 168 y 336 horas	96
Tabla C.12	Remoción de sulfatos, actividad volumétrica y específica a diferentes concentraciones de solución reductora	97
Tabla C.13	Efecto del solvente en la actividad de las cepas 5 y 22	97

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.2.1	Ciclo biogeoquímico del azufre.	10
Figura 2.2.2	Reacciones que participan en el ciclo de azufre.	11
Figura 2.2.3	Ciclo biológico del azufre.	13
Figura 2.3.1	Proceso de hidrosulfuración típico	22
Figura 2.3.2	Clasificación de los sistemas de biodesulfuración.	23
Figura 2.3.3	Diseño de reactor propuesto para la desulfuración de petróleo.	24
Figura 2.3.4	Diagrama de un sistema de desulfuración biocatalítica.	26
Figura 2.3.5	Proceso de biodesulfuración vía reductiva, sistema anaerobio.	30
Figura 2.4.1	Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano.	32
Figura 3.5.1	Bioreactor Applikon	43
Figura 3.5.2	Diagrama de la metodología usada para la biodesulfuración de combustóleo.	45
Figura 4.1.1	Crecimiento de las veinticuatro cepas a pH 5 y 7 en medio B. Porcentaje de remoción de sulfatos, actividad volumétrica y específica.	48
Figura 4.2.1	Efecto de la temperatura en la actividad volumétrica, específica y la remoción de sulfatos.	50
Figura 4.2.2	Efecto del pH en la actividad volumétrica, específica y la remoción de sulfatos.	52
Figura 4.2.3	Efecto de la concentración de sulfato sobre la remoción del mismo. (336 hrs)	53
Figura 4.2.4	Efecto de la concentración en la remoción de sulfatos, la actividad volumétrica y específica.	56
Figura 4.2.5	Porcentaje de remoción de sulfatos, actividad volumétrica y específica en función de la relación DQO/sulfato	57
Figura 4.2.6	Remoción de sulfatos a distintas concentraciones de solución reductora.	58
Figura 4.2.7	Actividad Específica y Volumétrica a distintas concentraciones de solución reductora	59
Figura 4.4.1	Efecto de tres solventes en la remoción de sulfatos y en el crecimiento.	63
Figura 4.4.2	Efecto de tres solventes en la actividad volumétrica y específica	65
Figura 4.4.3	Efecto de varios solventes orgánicos solubles en agua sobre la actividad específica en sistemas enzimáticos	66
Figura 4.4.4	Crecimiento y producción de H <sub>2</sub> S con los cinco compuestos seleccionados.	68
Figura 4.4.5	Reacciones de desulfuración propuestas.	69
Figura 4.5.1	Producción de ácido sulfhídrico en el proceso de biodesulfuración.	71
Figura 5.1.1	Diagrama de flujo de proceso, Sistema de biodesulfuración metabólico anaerobio	77
Figura A.1	Curva de crecimiento batch con seis fases.	80
Figura A.2	Pruebas en viales	83
Figura A.3	Sistema empleado para las pruebas a nivel matraz	84
Figura B.1	Curva de calibración de concentración de ion sulfuro en solución buffer antioxidante	90
Figura B.2	Curva de calibración de concentración de ion sulfuro en medio Postgate B	91

## LISTA ABREVIACIONES

ABS	Absorbancia.
AE	Actividad Específica
ASR	Actividad sulfato reductora
AV	Actividad Volumétrica
BMG	Bacterias metanogénicas
BSR	Bacterias sulfato-reductoras.
DQO	Demanda química de oxígeno.
SSV	Sólidos suspendidos volátiles.
STR	Reactor de tanque agitado.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO**

**Seleccionar las condiciones favorables para la desulfuración, por la vía biológica, de combustóleo mexicano.**

### **METAS PARTICULARES**

- i. **Evaluar la actividad sulfato-reductora y el crecimiento de veinticuatro cepas anaerobias, con el fin de seleccionar las más aptas para el proceso.**
- ii. **Comparar el crecimiento de los microorganismos en varios medios de cultivo y a partir de esto formular un medio propicio y económico para el proceso.**
- iii. **Identificar los parámetros a controlar en el proceso y seleccionar las condiciones favorables de los mismos para la biodesulfuración.**
- iv. **Demostrar que las cepas seleccionadas son capaces de degradar compuestos organosulfurados presentes en el combustóleo.**
- v. **Realizar una prueba de biodesulfuración en combustóleo.**

## **CAPITULO 1**

### **1. INTRODUCCIÓN**

El creciente problema de la contaminación producida por el uso de combustibles fósiles ha suscitado la necesidad de implementar legislaciones en materia ambiental cada vez más estrictas y por consiguiente de procesos y combustibles más limpios.

En el caso de la contaminación por óxidos de azufre (SOx), esta genera graves problemas al equilibrio ecológico, así como también de corrosión, ya que al combinarse con la humedad del ambiente produce ácido sulfúrico que ocasiona el deterioro de materiales de construcción, bosques y ecosistemas completos

Las emisiones de SOx se deben en gran medida al uso de combustibles fósiles (carbón y combustóleo principalmente) para calefacción y producción de energía eléctrica. Por ello se prefieren combustibles con alto poder calorífico, y bajo contenido de azufre. Por su parte, los crudos y sus derivados que México produce y exporta se caracterizan por su alto contenido de azufre (entre 1.5 y 4.5%) que sobrepasa los requerimientos internacionales para cumplir con las emisiones al aire permitidas para los óxidos de azufre (menor al 1%). Esto hace que el petróleo mexicano y sus derivados se coticen a un costo entre 35 y 40% menor que el de otros países cuyo contenido de azufre es inferior.

Existen varias soluciones al problema de la contaminación por óxidos de azufre tales como la implementación de equipos de control, desarrollo de sistemas de combustión que reduzcan las emisiones o emplear combustibles alternos libres de azufre, pero dada la importancia económica del petróleo en México, surge la necesidad de tratar las fracciones para reducir su nivel de azufre

La biodesulfuración de combustibles fósiles consiste en el uso de microorganismos o enzimas derivadas de microorganismos para degradar los compuestos con azufre presentes en el carbón, petróleo o sus fracciones.

La biodesulfuración presenta muchas ventajas, comparadas con los procesos tradicionales de desulfuración, como son: menores costos de inversión y operación por el uso de temperaturas y presiones de operación bajas, además no existe el requerimiento de costos catalizadores metálicos ni de suministro de hidrógeno.

El grupo de trabajo *Tratamiento y Reúso* del Instituto de Ingeniería, ha iniciado un proyecto de investigación sobre la remoción biológica de azufre en el petróleo y sus derivados, tales como el combustóleo. El objetivo es determinar la aplicabilidad y grado de remoción de los compuestos de azufre en las fracciones medias y pesadas del petróleo mexicano para desarrollar una biotecnología que pueda competir ventajosamente frente a otros métodos de remoción empleados comúnmente. Como primer etapa, se estudia el caso del combustóleo

El desarrollo de un proceso biotecnológico como el propuesto involucra varias etapas tales como (Winkler 1990):

- **Diseño del ambiente favorable para el proceso.** lo que representa definir una serie de parámetros que serán las condiciones de proceso .
- **Ingeniería de Fermentación,** incluye el diseño, desarrollo y construcción del reactor así como los requerimientos de la planta para mantener el ambiente diseñado.
- **Desarrollo de los organismos.** Esto consiste en la selección de cepas que tenga un alto rendimiento. Es decir se deben buscar organismos que tengan una alta velocidad de crecimiento y de producción (o degradación) del producto deseado así como el menor consumo de sustrato.

La presente tesis se enfoca principalmente en el primer punto (diseño del ambiente), es decir, seleccionar las condiciones físicas y químicas más favorables para el proceso y parte en el tercero (desarrollo de los organismos) no siendo un desarrollo propiamente sino más bien una selección de los microorganismos más apropiados.

Por lo que respecta a la ingeniería de fermentación se pretende que el presente trabajo pueda sentar algunas bases para el escalamiento del proceso.

## CAPÍTULO 2

### 2. ANTECEDENTES

#### 2.1. COMBUSTÓLEO.

El combustóleo es un combustible de tipo residual, es decir, un producto de los fondos de la destilación en la refinación del petróleo. Una definición aceptada de combustóleos es proporcionada por la especificación de la American Society of Testing and Materials (ASTM) D 396 para combustóleos\*. La ASTM define seis grados los cuales se describen en la Tabla 2.1.1.

PROPIEDAD	GRADO No. 1	GRADO No.2	GRADO No.4 (ligero)	GRADO No.4	GRADO No.5 (ligero)	GRADO No.5 (pesado)	GRADO No.6
Características	Adepto destilado para quemar en los hornos	Adepto destilado para usos generales de quemar (destilado). Para quemadoras que no requieren combustóleo No. 1	Usualmente no se requiere procesamiento para su utilización o quemado	Usualmente no se requiere procesamiento para su transporte o quemado	El tipo de procesamiento de hornos y del equipo	A veces requiere procesamiento en hornos y en hornos que se requiere para su transporte	Se requiere procesamiento en hornos y quemadores para su transporte
Gravedad Específica 60/50°F (grados API)	0.8499 (35 min)	0.8762 (30 min)	0.8762 (30 max.)	...	...	...	...
Temperatura de inflamación °C(°F), min	38 (100)	38 (100)	38 (100)	55 (130)	55 (130)	55 (130)	60 (140)
Viscosidad cinemática mm <sup>2</sup> /s							
a 38°C (104°F) min	1.4	2.0	2.0	5.8	>26.4	>55	...
máx	2.2	3.6	5.8	26.4	55	134	...
a 40°C (104°F) min	1.3	1.9	...	5.5	>24.0	>58	...
máx	2.1	3.4	...	24.0	(58 cSt)	(168 cSt)	...
a 100°C (212°F) min	...	...	...	...	5.0	9.0	15.0
máx	...	...	...	...	8.9	14.9	50.0
Temp. de destilación °C(°F)							
10% vol recuperado, máx	215 (420)	...	...	...	...	...	...
90% vol recuperado, min	...	262 (540)	...	...	...	...	...
máx	288 (550)	383 (640)	...	...	...	...	...
Azufre % en peso, máx	0.5	0.5	...	...	...	...	...
Ceniza (% en masa), máx	...	...	0.05	0.10	0.15	0.15	...
Residuo de Carbon 10% b, % m, máx	0.15	0.35	...	...	...	...	...
Agua y sedimento (% en volumen), máx	0.05	0.05	0.50	0.50	1.00	1.00	2.00

Tabla 2.1.1 Requerimientos detallados para combustóleos

\* Standard Specification of Fuel Oils, 1986, American Society of Testings and Materials. (D-396-86)

En México, el principal tipo de combustóleo que se produce es el pesado de acuerdo a información de Pemex-Refinación, este tipo de producto en nuestro país tiene las siguientes características (Franco 1996):

- Temperatura de inflamación: °C 66 Min.
- Temperatura de escurrimiento: °C 15 Min.
- Agua y sedimento % Vol.: 1.0 Máx
- Viscosidad S.F. a 50°C Seg.: 475/550
- Azufre % en peso: 4<sup>\*</sup>, 4.4<sup>\*\*</sup>

### **2.1.1. Importancia del combustóleo como energético.**

El combustóleo se utiliza ampliamente como combustible en diversos procesos industriales y esto se debe en gran medida a su alto poder calorífico y a su bajo costo por ser un residuo de la refinación del petróleo.

En la Tabla 2.1.2 se enlistan diferentes sectores y su consumo de combustóleo durante 1994. Como se puede observar su principal aplicación es la generación de energía eléctrica, esto debido a que dado su bajo costo, alto poder calorífico y disponibilidad, resulta un combustible atractivo para este propósito, contribuyendo durante 1994 en más de las dos terceras partes de la generación de energía eléctrica a nivel nacional.

En la Tabla 2.1.3 se muestra una relación de la generación de energía eléctrica acorde a cada uno de los sistemas existentes en México. En esta tabla podemos observar que los sistemas Termoeléctricos, que emplean primordialmente combustóleo, constituyen el 85.42% de la producción nacional.

En la Tabla 2.1.4 se detalla cada sistema y su consumo de combustible durante 1994. Se puede ver la importancia del combustóleo, ya que representa más de la mitad del consumo total de los sistemas termoeléctricos (68.23%) empleándose principalmente en sistemas de vapor y duales.

---

\* Refinerías: Cadereita, Minatitlán, Salamanca, Salina Cruz y Tula

\*\* Refinería de Ciudad Madero



CONSUMIDOR	PETACALORIAS	% DE CONSUMO
GENERACIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA	189.7	73.06
SECTOR INDUSTRIAL		
Industria Cementera	20.6	7.93
Industria Química	11.2	4.31
Industria Azucarera	7.7	2.97
Industria Siderúrgica	4.8	1.85
Industria de Celulosa y Papel	3.8	1.46
Industria Cervecera y Malta	1.1	0.42
Otras	11.9	4.58
SECTOR TRANSPORTE		
Marítimo	0.5	0.17
SECTOR COMERCIAL		
Comercio	8.4	3.24
TOTAL	259.7	100

Tabla 2.1.2 Consumo de combustóleo durante 1994. (SEMIP 1994)

GENERACIÓN DE ENERGÍA ELÉCTRICA		
PLANTAS DE GENERACIÓN	GENERACIÓN BRUTA 1994	
	Gwh	%
HIDROELECTRICAS	20,048	14.58%
TERMOELECTRICAS	117,470	85.42%
Vapor	77,023	56.01%
Ciclo combinado	9,099	6.62%
Turbogas	456	0.33%
Combustión interna	249	0.18%
Geotermoelectrica	5,598	4.07%
Dual	7,770	5.56%
Carboeléctrica	13,036	9.48%
Nucleoeléctrica	4,239	3.08%
EOELECTRICAS	no representativa	
TOTAL	137,518	100.00%

Tabla 2.1.3 Generación de energía eléctrica a nivel nacional durante 1994

Tipo de Termoeléctrica	Generación Bruta GWh	COMBUSTIBLES										Total Teracal
		Combustible		Gas		Diesel		Carbon		UO <sub>2</sub>		
		M <sup>3</sup> X10 <sup>6</sup>	Teracal	M <sup>3</sup> X10 <sup>6</sup>	Teracal	M <sup>3</sup> X10 <sup>3</sup>	Teracal	TonX10 <sup>6</sup>	Teracal	MVD/ST	Teracal	
VAPOR	77.023	17.083	170.112	2.609	23.764	18	165	-	-	-	-	194.041
CICLO COMBINADO	9.099	105	1.044	2.204	16.648	123	1.137	-	-	-	-	20.829
TURBOGAS	456	-	-	67	565	148	1.368	-	-	-	-	1.933
COMBUSTIÓN INTERNA	249	33	331	-	-	33	322	-	-	-	-	633
DUAL	5.559	1.826	16.184	-	-	11	103	-	-	-	-	18.284
CARBO-ELECTRICA	13.036	-	-	-	-	11	105	6.650	30.635	-	-	30.740
NUCLEO-ELECTRICA	4.235	-	-	-	-	-	-	-	-	6.077	11.530	11.530
TOTAL	109.703	169.703	19.047	5.060	42.977	344	3.177	6.695	30.635	6.077	11.530	277.990
PORCENTAJE			68.23%		15.46%		1.14%		11.02%		4.15%	100.00%

Tabla 2.1.4 Comparación de los diferentes sistemas termoeléctricos y sus combustibles durante 1994 (sector eléctrico nacional)

Las ventajas y desventajas del uso de combustóleo se derivan de sus características, composición y precio con relación a otros productos. Podemos decir que es más fácil de manejar y transportar que el carbón y mucho más difícil que el gas y otros hidrocarburos menos viscosos.

El combustóleo tiene el inconveniente de la presencia de sustancias que dan lugar a emisiones indeseables de contaminantes y problemas de corrosión. Por otro lado, la relación costo-poder calorífico lo hace un energético muy atractivo comparado con otros (ver Tabla 2.1.5).

COMBUSTIBLE	PODER CALORÍFICO	COSTO*	COSTO/ENERGÍA \$/Kcal
Combustóleo	39,759.0 BTU/l	170.0 \$/l	4.27
Gas Natural	33,563.0 BTU/m <sup>3</sup>	243.0 \$/m <sup>3</sup>	7.24
Diesel	36,679.0 BTU/l	516.0 \$/l	14.06
Carbón Micare	18,135.0 BTU/Kg	103.0 \$/Kg	5.68

\* incluye 15% de IVA. (anuario de C.F.E., 1990)

Tabla 2.1.5 Valores comparativos de poder calorífico y costo para algunos combustibles industriales.

### 2.1.2. Contenido de Azufre.

El combustóleo y en general el petróleo mexicano tienen un alto contenido de azufre (de 1.5 a 4%) en comparación con los combustibles fósiles de otras partes del mundo. En la Tabla 2.1.6 se enlistan petróleos crudos de varias regiones, donde se observa que el petróleo tipo Maya presenta la mayor cantidad de azufre.

PEMEX clasifica a los combustóleos de acuerdo al contenido de azufre en pesados, intermedios y ligeros. El porcentaje de azufre en peso para el combustóleo pesado va de 3.0% en adelante, para el combustóleo intermedio de 1.5 a 3.0% y para el ligero menos del 1.5%.

El contenido de azufre en el combustóleo varía de acuerdo a la refinería y al tipo de crudo del cual proviene. Así tenemos que un combustóleo de la refinería de crudo tipo Istmo tendrá de 1.9 a 3.9%, uno de crudo Maya de 4.3 a 5.3% y uno de Olmeca tendrá de 1.42 a 1.6 % en peso de azufre. (Manríquez *et al.* 1991).

Debido a la complejidad del combustóleo no se cuenta con datos sobre la proporción y el tipo de compuestos organosulfurados presentes en él. En la Tabla 2.1.7 se enlistan algunos compuestos representativos existentes en los petróleos crudos, esta lista se puede tomar como una buena aproximación para el combustóleo por ser éste un residuo, ya que la mayoría de estos compuestos se concentran en el combustóleo al refinarse el petróleo.

Crudo	% de azufre
Istmo	1.5
Maya	3.3
Olmeca	0.8
Kuwait	2.6
Medio Oriente	1.5 - 3.0
Venezuela	1.7
Mississippi	1.6
California	1.0
Canadá	0.44
África del Norte	0.18
Lejano Oriente	0.10

Tabla 2.1.6 Contenido de azufre en algunos petróleos crudos.



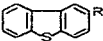
NOMBRE	ESTRUCTURA
Tioles (mercaptanos)	R-SH
Disulfuros	R-S-S-R'
Sulfuros	R-S-R'
Tiofenos	
Benzotiofenos	
Dibenzotiofenos	

Tabla 2.1.7 Compuestos organosulfurados presentes en el petróleo.

Nombre	Punto de ebullición °C	% en peso
1-Butanol	98.4	Traza
1-Propanol	67.5	0.00041
2,2-Dimetil -3- tiopentano	120.41	0.00058
2,4-Dimetil -3- tiopentano	120.02	0.00053
2-Butanol	85.15	0.00386
2-Hexanol	138.9	0.0028
2-Metil - propanol	64.22	0.00055
2-Metil -1- propanol	88.72	0.00003
2-Metil -2- butanol	99.0	0.00064
2-Metil -3- tiopentano	107.4	
2-Metil 3- tiohexano	132.05	0.00078
2-Metilciclopentano	133.23	0.0023
2-Metilciclohexano	153.04	0.0029
2-Pentanol	112.9	0.0014
2-Propanol	52.56	0.00199
2-Tiobutano	66.65	0.00222
2-Tiohexano	123.2	0.00077
2-Tiopentano	95.52	0.00030
2-Tiopropano	37.31	0.00088
3,3-Dimetil -2- tiobutano	99.0	
3-Metil -2- butanol	109.8	
3-Metil -2- tiobutano	84.81	0.00064
3-Metilciclohexano	158.04	0.00024
3-Metilciclopentano	138.67	0.00046
3-Pentanol	113.9	0.00057
3-Tioheptano	144.24	0.00078
3-Tiohexano	118.50	0.00012
3-Tiopentano	92.10	0.00075
4-Metil -3- tiohexano	133.65	0.00050
4-Metilciclohexano	158.64	0.00048
Ciclohexanol	158.8	0.0012
Ciclopentanol	132.2	
cis-2,5-Dimetilciclopentano	142.28	0.0024
Dibenzotiofeno	332	
Disulfuro de benceno		
Etanol	35.00	0.00530
Metanol	5.96	0.00240
Sulfuro de difenilo		
Tiociclohexano	141.75	0.00032
Tiocielopentano	121.12	0.00077
Tionafteno	84.2	
trans-2,5-Dimetilciclopentano	142.0	0.0025

Tabla 2.1.8 Compuestos azufrados que se han encontrado en el petróleo.

## 2.2. QUÍMICA DEL AZUFRE.

### 2.2.1. Ciclo del Azufre.

El ciclo de azufre es un proceso natural mediante el cual se producen, degradan y asimilan una serie de compuestos azufrados para permitir un equilibrio. En la Figura 2.2.1 se muestra una representación esquemática de los flujos de azufre que se presentan en la litosfera, el agua y la atmósfera. En este esquema se expresan con números romanos los flujos y con números arábigos la magnitud de los mismos, expresada en toneladas por año. Se denota con círculos las emisiones antropogénicas.

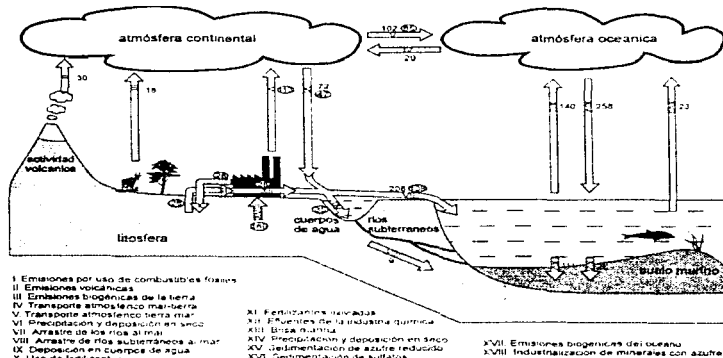


Figura 2.2.1 Ciclo biogeoquímico del azufre. Modificado de Ivanov (1993)

Se puede observar que los flujos antropogénicos tienen un peso considerable en el balance global. Entre los más importantes podemos destacar: La industrialización de minerales con azufre (169 Ton/año), el uso de fertilizantes (28 Ton/año) y las emisiones por combustión (113 Ton/año) que representa un grave problema ambiental.

por combustión (113 Ton/año) que representa un grave problema ambiental.

Las emisiones a la atmósfera se encuentran conformadas por  $\text{H}_2\text{S}$  de la descomposición de materia orgánica y óxidos de azufre resultado de la combustión. De estos compuestos se desprenden una serie de procesos donde intervienen el oxígeno y la radiación solar. En la Figura 2.2.2 se muestran las reacciones atmosféricas que ocurren en el ciclo del azufre y algunas que se dan en el suelo. En sí, la reacción por sí sola es lenta, pero el proceso se acelera en presencia de hidrocarburos y otros contaminantes asociados con las emisiones de vehículos (OMS 1982).

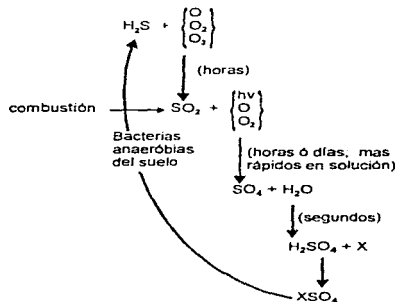


Figura 2.2.2 Reacciones que participan en el ciclo de azufre.

### 2.2.1.1. Ciclo biológico del azufre.

Como se puede observar, tanto en la Figura 2.2.1 como la 2.2.2, los organismos vivos constituyen una un eslabón indispensable en el ciclo del azufre. En la Figura 2.2.3 se muestran los principales mecanismos en donde participan los seres vivos en el ciclo de azufre.

Los principales depósitos naturales de azufre y compuestos azufrados los constituyen los sulfatos y sulfuros minerales, así como los depósitos de azufre elemental.

Las transformaciones microbianas del azufre pueden ser agrupadas en cinco categorías: (Alvarez, 1983)

- *Reducción asimilatoria de sulfatos.* En este proceso el sulfato es usado como fuente de azufre para la biosíntesis de compuestos organosulfurados en plantas, hongos y microorganismos.
- *Mineralización.* Los productos formados en el rompimiento de los compuestos orgánicos azufrados varían en relación con el tipo de compuesto y microorganismo, así como de las condiciones ambientales. La degradación de materia orgánica muerta de plantas y microorganismos, da como resultado la formación de ácido sulfhídrico, este puede ser oxidado ó precipitar como sulfuro por la presencia de metales pesados (mineralización).
- *Oxidación de sulfuro.* El grupo más numeroso de microorganismos que utilizan el azufre inorgánico es el de las bacterias, aunque se ha encontrado que algunos hongos y actinomicetos pueden también oxidar formas reducidas del azufre *in vitro*. La oxidación puede ocurrir de forma espontánea cuando se encuentra suficiente oxígeno o nitratos, por otra parte la oxidación biológica se da bajo condiciones aerobicas, anóxicas y anaerobias. En presencia de oxígeno y nitratos, las bacterias oxidan el sulfuro a azufre ó incluso sulfatos. Los electrones del sulfuro son usados para convertir el oxígeno ó nitrato en  $H_2O$  y  $N_2$ . Los electrones también pueden ser usados para la reducción de  $CO_2$ . La oxidación anaerobia de sulfuro es llevada a cabo por las bacterias fototróficas de azufre. Estas bacterias usan los electrones del sulfuro para la reducción y asimilación del  $CO_2$ .
- *Reducción de azufre (desasimilación).* La reducción biológica del azufre elemental a sulfuro usualmente se lleva a cabo por bacterias sulfato-reductoras, donde el donador de electrones usualmente es acetato.



- *Reducción de sulfato (desasimilación)*. La reducción biológica de sulfatos a sulfuro se lleva a cabo por bacterias sulfato-reductoras. Estas bacterias usan  $H_2$  y compuestos orgánicos como donadores de electrones.

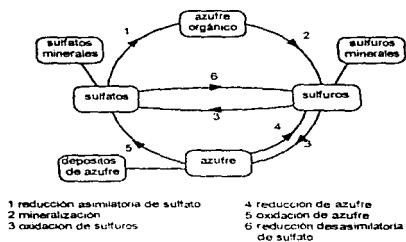


Figura 2.2.3 Ciclo biológico del azufre.

En la Tabla 2.2.1 se enlistan varios microorganismos que emplean compuestos con azufre en su metabolismo.

MICROORGANISMO	SUSTRATOS	REFERENCIA
<i>Thiobacillus thioparus</i> <i>T. neapolitanus</i> <i>T. ferroxidans</i> <i>T. concretivorus</i> <i>T. thiooxidans</i>	Azufre elemental Tiosulfatos Sulfuros Sulfitos Politionatos	Starr <i>et al.</i> (1981)
<i>Desulfotribium desulfuricans</i> <i>D. vulgaris</i> <i>D. gigas</i>	Sulfatos	Widdel y Bak (1991) Starr <i>et al.</i> (1981)
<i>Desulfobacter postgatei</i>	Sulfatos	Widdel y Bak (1991) Starr <i>et al.</i> (1981)
<i>Desulfotribium propionicus</i>	Sulfatos	Widdel y Bak (1991) Starr <i>et al.</i> (1981)
<i>Desulfococcus multivorans</i>	Sulfatos	Widdel y Bak (1991) Starr <i>et al.</i> (1981)
<i>Desulfomonile hedyni</i>	Sulfatos	Widdel y Bak (1991)
<i>Desulfomicrothium sp</i>	Sulfatos	Widdel y Bak (1991)
<i>Desulfonema limicola</i> <i>D. maerum</i>	Sulfatos	Widdel y Bak (1991) Starr <i>et al.</i> (1981)
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	Sulfatos	Widdel y Bak (1991) Starr <i>et al.</i> (1981)
<i>Desulfatomaacium nigrificans</i> <i>D. antarcticum</i>	Sulfatos	Starr <i>et al.</i> (1981)
<i>Desulfosarcinula baarsii</i>	Sulfatos	Widdel y Bak (1991)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Azufre orgánico derivado del carbon	Kilbane y Jackowski (1992)
bacterias aerobias Gram(-) que crecen en carbazol	Dibenzotiofeno, benzotiofeno, tiantreno, teovanteno	Finnein <i>et al.</i> (1992)
<i>Pseudomonas sp</i>	Dibenzotiofeno	Kodama <i>et al.</i> (1973), Yamada (1968)
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Azufre orgánico de carbón bituminoso	Kargi y Robinson (1986)
<i>Rhodococcus rhodochrous</i> + <i>Enterobacter sp</i>	Azufre orgánico	Bielage y Kilbane (1989)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dibenzotiofeno	Hou y Laskin (1976)
<i>Bacillus sphaericus</i> + <i>Enterobacter sp</i>	Azufre orgánico	Bielage y Kilbane (1989)
<i>Acinetobacter</i> y <i>Rhizobium sp</i>	Dibenzotiofeno	Malik (1978)
<i>Thiobacillus sp</i>	Azufre orgánico	Cockay y Yurten (1983)
<i>Arthrobacter</i> y <i>Pseudomonas sp</i>	Dibenzotiofeno	Knecht (1961)
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	Sulfocacetato, sulfosuccinato, tetrametil sulfano, benceno sulfonato, toluen sulfonato, 3-piridina sulfonato, 2-sulfo benzato, 1-naftalen sulfonato, 2-naftalen sulfonato, sulfopropil piridina	Lee y Clark (1993)
<i>Rhodococcus sp</i>	Acido sulfhidrico	Ohta <i>et al.</i> (1990)
<i>Pseudomonas sp</i>	Tiofeno	Kunta <i>et al.</i> (1971)
<i>Rhodopsudomonas sp</i>	Mercaptomalato, H <sub>2</sub> S, malato	Visscher y Taylor (1993)
<i>Thiocapsa roseopersicina sp</i>	3 Mercaptopropionato, H <sub>2</sub> S, mercaptomalato	Visscher y Taylor (1993)

Tabla 2.2.1 Algunos microorganismos que metabolizan compuestos con azufre.

### **2.2.2. Contaminación por SO<sub>x</sub> y lluvia ácida.**

Si bien el azufre se encuentra en forma natural en grandes cantidades formando diversos compuestos tanto en el aire como en la tierra y agua, las contribuciones que provienen de las actividades humanas por lo general tienen una importancia primordial en las zonas urbanas. En particular, se considera que el empleo de combustibles para la calefacción y la producción de energía causa la mayor parte de la contaminación por óxidos de azufre y partículas a que está expuesta la población en general.

Existen dos tipos de fuentes: las fijas que constituyen principalmente a las industrias y las móviles que comprende a los vehículos automotores. Las fuentes fijas contribuyen en mayor proporción que las móviles por su alto requerimiento de combustible pero estas últimas tienen un efecto especialmente intenso sobre las concentraciones de las zonas habitacionales, ya que las emisiones se producen cerca del nivel del suelo.

En la zona metropolitana de la ciudad de México se calcula que durante 1989 se emitieron a la atmósfera 205,726 Toneladas de dióxido de azufre. De los cuales el 28.3% provino de plantas Termoeléctricas y el 32.0% de la Industria (Cuadri y Sanchez 1994).

En los Estados Unidos de América las emisiones durante 1994 fueron aproximadamente de 20 millones de toneladas. Las plantas generadoras de energía eléctrica (sistemas de vapor y ciclo combinado principalmente) contribuyeron con cerca del 70% de las emisiones anuales de SO<sub>2</sub> y el 30% de NO<sub>x</sub>.

En los últimos años se ha incrementado el interés por el destino final de los óxidos de azufre provenientes de la combustión de energéticos. Parte de ese interés se concentra en la naturaleza de los productos de las reacciones y sus posibles efectos sobre la salud, además de los efectos ecológicos de estos productos cuando se depositan y su probable papel como aerosoles en la modificación global del clima.

Parte del dióxido de azufre que se emite al aire es eliminado como tal por diversas superficies, que incluyen el suelo, el agua y la vegetación. Se ha calculado que en el Reino Unido aproximadamente el 25% del dióxido de azufre se elimina mediante estos procesos directos (depósito "seco"), el resto se transforma en ácido sulfúrico o sulfatos mediante una serie de procesos, en presencia de humedad, que en su mayoría son arrastrados por la lluvia ("lluvia ácida") (OMS 1982).

La deposición ácida o "lluvia ácida", como se le conoce comúnmente, tiene lugar cuando las emisiones de óxidos de azufre (SO<sub>2</sub>) y nitrógeno (NO<sub>x</sub>) reaccionan en la atmósfera con agua, oxígeno y otros oxidantes para producir ácido sulfúrico y nítrico, respectivamente, que se deposita en la tierra; ya sea en forma seca (como gas o partículas) o en forma húmeda (como lluvia, niebla o nieve).

Las reacciones son las siguientes:



Si bien este proceso de autodepuración limita la acumulación de compuestos de azufre en el aire, y por lo tanto disminuye los efectos sobre la salud, la "lluvia ácida" que se produce constituye un grave problema al ambiente.

Los problemas que acarrea las deposiciones ácidas son los siguientes:

- *Acidificación de cuerpos de agua*, principalmente lagos y arroyos, afectando con esto tanto a la flora como la fauna presente y por lo tanto el equilibrio del ecosistema.
- *Daño a bosques*. La "lluvia ácida" no mata a los árboles directamente, más bien se trata de un proceso de debilitación que puede ser: daño a las hojas, acidificación del suelo y disminución de la concentración de nutrientes.
- *Corrosión en materiales de construcción y pintura*. Este es el problema más conocido, ya que resulta evidente el deterioro de muchas construcciones clásicas y esculturas.

Dada la importancia del problema de la contaminación por SO<sub>2</sub> y "lluvia ácida" se cuenta con varias soluciones:

- Uso de combustibles alternos o con bajo contenido de azufre.
- Desulfuración de los combustibles fósiles.
- Implementación de sistemas de combustión de lecho fluidificado que emplean carbonatos de calcio y magnesio para precipitar los óxidos de azufre. (Díaz 1996)
- Uso de equipos de control.

La implementación de nuevos sistemas de combustión ó el uso de equipos de control implican costos de instalación y operación, además de una nueva problemática que es la eliminación de los residuos producidos por estos sistemas. Por otra parte el uso de combustibles alternos depende de la disponibilidad de estos y la relación costo poder calorífico, mientras que la desulfuración depende de tecnologías eficientes y también le añade un valor agregado al costo de la energía. Como podemos ver todas estas posibles soluciones presentan un inconveniente económico y/o tecnológico.

### ***2.2.3. Efectos de los óxidos de azufre a la salud.***

El dióxido de azufre es un irritante respiratorio muy soluble en las superficies húmedas de las vías respiratorias. Como consecuencia de su gran solubilidad, la mayor parte del dióxido de azufre se absorbe en la nariz y en las vías respiratorias superiores, siendo muy escasa la cantidad que llega directamente a los pulmones. Las concentraciones en extremo elevadas pueden exceder la capacidad de absorción de las vías respiratorias superiores y provocar la muerte o alteraciones patológicas en el aparato respiratorio de los animales de experimentación, tales como edema laríngeo y pulmonar. (OMS 1982)

En estudios realizados con voluntarios, en condiciones controladas y exposiciones breves (de hasta 24 horas), se observaron las modificaciones de la función respiratoria y efectos sobre los órganos sensoriales y reflejos.

En la Tabla 2.2.2 se muestran algunos efectos del dióxido de azufre sobre las funciones respiratorias y en la Tabla 2.2.3 la concentración límite de ácido sulfúrico y dióxido de azufre para producir efectos en humanos.

Concentración (ppm)	Tiempo de exposición (min)	Efectos	Referencia
1-8	10	Aumento de la frecuencia del pulso, disminución del volumen ventilatorio, aumento de la frecuencia respiratoria	Amurd <i>et al.</i> , (1953)
1	10-30	Aumento de la resistencia pulmonar	Frank <i>et al.</i> , (1962)
1	15	Aumento de la resistencia pulmonar	Snell y Luchsinger, (1969)
1	60-180	Disminución de la secreción nasal de moco y de la anchura de las fosas nasales	Andersen <i>et al.</i> , (1962)
0.75	120	A los 30 min, leve efecto sobre la capacidad vital forzada, volumen de respiración forzada durante un segundo así como el flujo máximo en el punto medio y el flujo respiratorio máximo al 50%	Bates y Hazucha, (1973)
0.37	120	Ningun efecto en las pruebas anteriores de la función pulmonar	Bates y Hazucha, (1973)

Tabla 2.2.2 Algunos estudios de laboratorio acerca de los efectos de exposiciones breves al dióxido de azufre sobre la función respiratoria. (OMS 1982)

Efectos	Concentraciones limite ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ )		
	Ácido Sulfúrico	Dióxido de Azufre	Ácido Sulfúrico + Dióxido de Azufre
Percepción de olor e irritación de la mucosa	0.6 a 0.85	1.6 a 2 P	0.3 + 0.5
Supresión de la adaptación a la obscuridad	0.63 a 0.73	0.92	0.3 + 0.5
Elevación de la cronaxia óptica	0.73	1.5	0.6 + 1.2
Alteración del ritmo alfa	0.63	0.9	0.3 + 0.5
Condicionamiento del reflejo electrocortical	0.4	0.6	0.15 + 0.5 o 0.3 + 0.25

Tabla 2.2.3 Concentraciones limite de dióxido de azufre y ácido sulfúrico requeridas para producir efectos sobre las funciones sensoriales o reflejos en humanos durante exposiciones breves (OMS 1982)

### 2.3. DESULFURACIÓN.

#### 2.3.1. Reacciones de desulfuración.

La reacción de hidrógeno molecular con un hidrocarburo, como los que constituyen el petróleo, se denomina hidrogenación (Hastings y Van Driesen 1988). Como se muestra en la Tabla 2.3.1, el campo de la hidrogenación se subdivide en tres tipos de reacciones más específicas. La saturación es la adición de hidrógeno a compuestos aromáticos o a compuestos con dobles o triples ligaduras sin que haya rompimiento de enlaces. Cuando en una reacción con hidrógeno hay rompimiento de uno o más enlaces, esa reacción se denomina hidrogenólisis. La reacción de hidrogenólisis en la que hay ruptura de enlaces carbono-azufre se llama hidrodesulfuración. Por otra parte, las reacciones de hidrogenólisis en las que hay ruptura de enlaces carbono-carbono se conocen con el nombre de hidrólisis. En las refinerías se efectúa también la ruptura de enlaces carbono-carbono-azufre y azufre-azufre a altas temperaturas y en ausencia de hidrógeno. Este tipo de ruptura se denomina desintegración (o pirólisis, según sea el caso). Dos ejemplos desintegración son la desintegración catalítica y la desintegración suave (no catalítica).

Las reacciones de hidrogenólisis se aplican en el procesamiento de petróleo con fines de desulfuración, hidrólisis o una combinación de ambas. La diferencia entre estos procesos se encuentra en la elección del catalizador y de las condiciones para lograr el resultado deseado.



<b>Saturación</b>	
	
Benceno	+ 3H <sub>2</sub> → Ciclohexano
<b>Hidrodesulfuración</b>	
R-SH + H <sub>2</sub> → RH + H <sub>2</sub> S	
R-S-S-R' + 3H <sub>2</sub> → RH + R'H + 2H <sub>2</sub> S	
<b>Hidrólisis</b>	
R-R' + H <sub>2</sub> → RH + R'H	

Tabla 2.3.1 Reacciones de hidrogenación.

### **2.3.2. Proceso de Desulfuración Catalítica.**

Por definición, la hidrodesulfuración consiste en remover azufre con una reacción catalítica empleando hidrógeno y teniendo como subproducto ácido sulfhídrico. Los compuestos de azufre presentes tienen diferentes estructuras y pesos moleculares, reaccionan a distintas velocidades para formar  $H_2S$  y diversos compuestos con los hidrocarburos. Durante el proceso de hidrodesulfuración también reaccionan moléculas que no contienen azufre. Los hidrocarburos oxigenados reaccionan con hidrógeno a mayor velocidad que los compuestos organosulfurados y los nitrogenados reaccionan a menor velocidad.

El proceso de hidrodesulfuración no es una reacción específica ya que en el combustible se encuentran presentes varios compuestos que contienen azufre en su molécula con estructuras y pesos moleculares distintos (mercaptanos, tiofenos, sulfuros, etc.), por lo que éstos compuestos reaccionan a diferentes velocidades.

El proceso de hidrodesulfuración es relativamente simple, una carga de alimentación de hidrocarburo e hidrógeno pasa por el lecho de un catalizador a temperaturas y presiones elevadas. Algunos de los átomos de azufre unidos a las moléculas de hidrocarburo reaccionan con el hidrógeno en la superficie del catalizador para formar sulfuro de hidrógeno. Los cálculos del equilibrio termodinámico muestran que estas reacciones podrían verificarse casi al 100%, pero por razones económicas normalmente se limita la aplicación comercial de la hidrodesulfuración (Hastings y Van Driesen 1988).

#### **2.3.2.1. Configuración típica de los procesos de hidrodesulfuración.**

En la Figura 2.3.1 se muestra el diagrama básico para un proceso típico de hidrodesulfuración. En primer lugar se bombea una carga de alimentación de hidrocarburos líquidos a una presión ligeramente mayor de la que sale de la sección del reactor. La carga presurizada se mezcla entonces con gas de reciclaje caliente y se precalienta a las condiciones de entrada del reactor. Esta mezcla caliente se hace pasar por un catalizador en la sección de reactor a temperaturas de 288 a 454 °C y presiones de 150 a 3000 psig. El efluente del reactor se enfría por intercambio de calor. Los hidrocarburos líquidos desulfurados producidos y el gas de reciclaje se separan a una presión ligeramente menor que



la de la sección del reactor. Para separar el  $H_2S$  y los hidrocarburos gaseosos ligeros, el gas de reciclaje se depura o purga o ambas cosas, se mezcla con hidrógeno de repuesto, se comprime a una presión superior a la de la sección de reactor y se mezcla con una carga de alimentación de hidrocarburos líquidos.

El sistema de gas de reciclaje se emplea en el proceso de hidrodesulfuración para minimizar pérdidas físicas de hidrógeno, que es costoso. Para las reacciones de hidrodesulfuración se requiere una alta presión parcial de hidrógeno en la fase gaseosa para mantener altas velocidades de reacción de desulfuración y para evitar la depositación de carbono. La alta presión parcial de hidrógeno se mantiene introduciendo dicho gas en los reactores a una velocidad varias veces mayor que la de su consumo químico. La mayor parte del hidrógeno que no ha reaccionado se enfría para extraer hidrocarburos, se recupera en el separador y se vuelve a utilizar. En el proceso se pierde hidrógeno por solubilidad en los hidrocarburos líquidos desulfurados que se producen, así como durante el depurado o purga de  $H_2S$  e hidrocarburos gaseosos ligeros del gas de reciclaje.

A fin de mantener una alta presión parcial de hidrógeno en el reactor, el  $H_2S$  y los hidrocarburos gaseosos ligeros que se producen en la sección de reacción deben ser depurados o purgados del gas de reciclaje. Una posible elección para lograr este objetivo es un sistema de absorción, se puede emplear un sistema depurador con monoetanolamina (MEA) o una sustancia equivalente para eliminar  $H_2S$  del gas de reciclaje. Si no se emplea ninguno de estos sistemas, puede recurrirse al purgado de parte del gas de reciclaje.

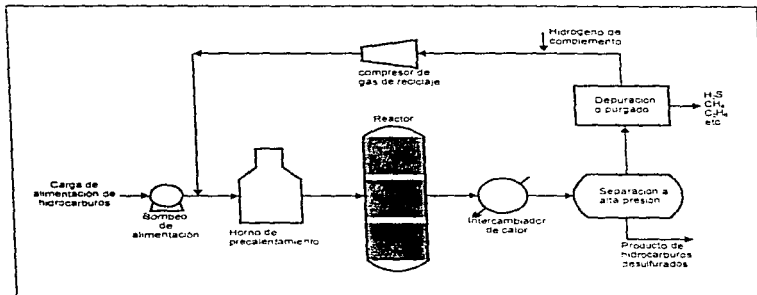


Figura 2.3.1 Proceso de hidrosulfuración típico (Kenneth et al. 1988)

### 2.3.3. Proceso de Biorreducción.

El concepto de biorreducción no es nuevo, las primeras patentes de sistemas biológicos para la remoción de azufre en hidrocarburos de petróleo datan de los años cincuenta (Strawinski 1950, ZoBell 1953, Kirshenbaum 1961). Desde entonces y durante los últimos años se han hecho varios intentos por desarrollar sistemas biológicos, tanto enzimáticos como bacterianos para la desulfuración de combustibles fósiles. Estas y otras tecnologías no se han comercializado aún, debido a que éstos sistemas presentan cinéticas de reacción lentas.

La biotecnología se ha utilizado ampliamente en la industria petrolera, ya sea en tratamiento de agua o en problemas de biorremediación ocasionados por derrames de hidrocarburos. Por lo tanto, no es de extrañarse que las tecnologías propuestas para la biorreducción surjan de estudios en biorremediación.

Haciendo una revisión de los estudios realizados y las tecnologías existentes en materia de biorreducción podemos clasificar éstas en dos grandes ramas: la vía reductiva y la oxidativa. Estas dos las podemos subdividir en dos rutas la metabólica y la enzimática.

ca, esto dependiendo si se emplean microorganismos ó únicamente enzimas. En la Figura 2.3.2 se muestra una clasificación de los sistemas de biodesulfuración.

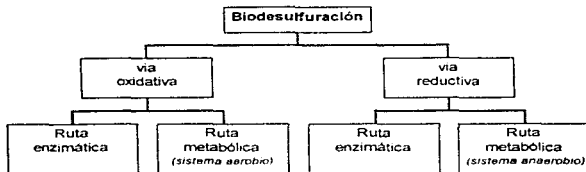


Figura 2.3.2 Clasificación de los sistemas de biodesulfuración.

### 2.3.3.1. Vía Oxidativa.

Esta se refiere a los sistemas que emplean microorganismos (ruta metabólica) o enzimas (ruta enzimática) capaces de oxidar el azufre presente en las moléculas organosulfuradas.

**Ruta Metabólica:** Esta se basa en microorganismos que requieren oxígeno como donador de electrones y como resultado de su metabolismo oxidan el azufre de las moléculas. A esta clase de organismos se les conoce como aerobios, por su necesidad de oxígeno.

A continuación se muestran algunos sistemas oxidativos metabólicos reportados:

Hartdegen en 1984 propuso un sistema para la desulfuración del petróleo empleando una derivación genéticamente alterada de *Pseudomonas alcaligenes*, capaz de oxidar dibenzotiofeno y otras moléculas a productos solubles en agua. Otra aportación es el diseño de un reactor a base de membranas permeables para separar la fase líquida de la oleosa. (ver Figura 2.3.3)

A mediados de los 80's, la Atlantic Research Corp. desarrolló una cepa de *Pseudomonas* capaz de transformar Dibenzotiofeno a 2,2'-dihidroxibifenilo y sulfito (Campbell 1993).

Debido a que tanto el carbón como el petróleo contienen grandes cantidades de azufre, se han realizado estudios interesantes en lo que respecta a la biodesulfuración que valen la pena mencionar. (EISaw y Gray 1991)

- Chandra *et al.* (1979) reportaron que bacterias heterótrofas fueron capaces de remover más del 20% del azufre orgánico presente en carbón de la India.
- Gokcay y Yurteri en 1983 reportaron una remoción del 50-57% de azufre orgánico y 90-95% de pirita en lignita Turca.
- Kargi y Robinson (1986) reportaron una remoción del 19% en carbón bituminoso empleando *Sulfolobus acidocaldarius*.

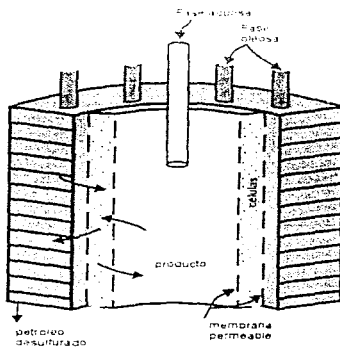


Figura 2.3.3. Diseño de reactor propuesto para la desulfuración de petróleo. (Hartegan *et al.* 1984)

**Ruta Enzimática:** Esos sistemas emplean enzimas provenientes de organismos que a manera de biocatalizador favorecen la oxidación del azufre de las moléculas.

Entre los trabajos reportados se encuentran los estudios realizados por Vázquez-Duhatl et al. (1993), donde propone el uso de Citocromo C como biocatalizador para oxidar tiofenos y otros compuestos organosulfurados en presencia de peróxido de hidrógeno.

Entre los estudios más conocidos en el área de desulfuración biocatalítica se encuentran los realizados por Monticello, que propone un sistema para la desulfuración catalítica de petróleo y destilados medios. El diagrama de flujo del proceso se presenta en la Figura 2.3.4. El proceso consiste básicamente en la mezcla del biocatalizador (material biológico) con el hidrocarburo en un tanque agitado para formar una emulsión. Después de cierto tiempo de residencia, la emulsión se rompe y el aceite desulfurado es separado. El biocatalizador es recuperado y el azufre separado es precipitado con óxido de calcio y removido de la corriente acuosa. Este proceso logra una disminución de azufre del 5 al 25 %. Monticello enfatizó que los principales factores para la aplicación práctica de este sistema son los siguientes :

- Mejoramiento de la cepa bacteriana y del proceso fermentativo.
- Selección de una configuración adecuada del bioreactor.
- Selección de una metodología de ruptura de la emulsión eficiente.
- Determinación de un método de disposición de desechos ( azufre, agua, catalizador agotado, etc. ).

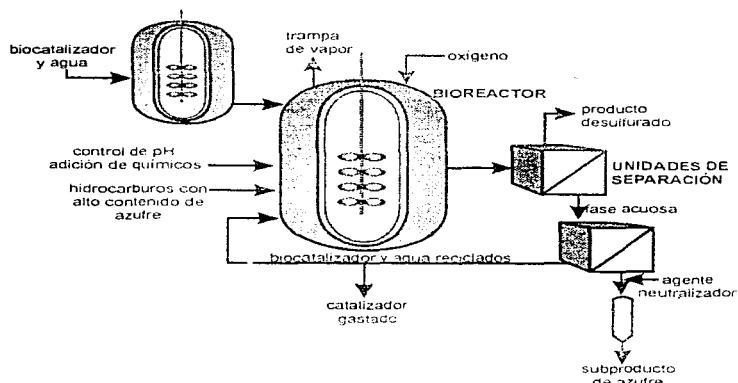


Figura 2.3.4 Diagrama de un sistema de desulfuración biocatalítica. (Monticello 1993)

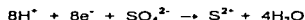
Una de las grandes ventajas que que nos propone el sistema biocatalítico es la posibilidad de reciclar el biocatalizador, lo cual no es posible en sistemas enzimáticos.

### 2.3.3.2. Via Reductiva.

Por lo que respecta a la vía reductiva esta presenta la opción contraria a la oxidativa es decir la reducción del azufre de las moléculas para producir ácido sulfhídrico.

**Ruta enzimática:** No se tiene conocimiento de sistemas reductivos enzimáticos reportados.

**Ruta metabólica:** A estos sistemas se les conoce como procesos anaerobios y son sistemas que, se desarrollan en condiciones anóxicas, es decir ausencia de oxígeno molecular. Esta clase de sistemas se basa en las capacidades sulfato-reductoras de algunos microorganismos, los cuales emplean los sulfatos como aceptores de electrones en su metabolismo, reduciendo estos y generando sulfuro de hidrógeno. La reacción es la siguiente:



En base a esta capacidad se ha propuesto sustituir los sulfatos con compuestos organosulfurados presentes en los hidrocarburos. Por su parte, Lizama *et al.* (1995) demostró que tres tipos de bacterias sulfato-reductoras (*Desulfotomaculum orientis*, *Desulfovibrio desulfuricans* y *Thermodesulfobacterium commune*) son capaces de emplear el dibenzotiofeno como su único aceptor de electrones lo cual se puede extrapolar a otras bacterias de la familia de sulfato-reductoras, y por lo tanto pueden ser consideradas para la biodesulfuración de hidrocarburos.

Entre los sistemas anaerobios se puede mencionar el propuesto por Zobell (1953) y los estudios realizados por Kim *et al.* (1990 y 1995).

Kim *et al.* (1990 y 1995), han realizado varios estudios de desulfuración con *Desulfovibrio desulfuricans* en varios petróleos crudos, fracciones y en compuestos modelos, así como sistemas de celdas electroquímicas para favorecer la transferencia de electrones (Kim *et al.* 1994). En la Tabla 2.3.2 se muestran los resultados del tratamiento de distintos petróleos crudos y en la Tabla 2.3.3 de varias fracciones

Petróleo crudo	Contenido de azufre (%)	Desulfuración (%)
Irani ligero	1.53	10
Ras-Budran	2.37	5
Basrah	2.42	6
Oman	1.15	10
Kuwait	3.15	17
Dubai	2.08	15

Tabla 2.3.2 Desulfuración de diferentes crudos usando *D. desulfuricans* M6.

Muestra Origen	Fracción	Contenido de azufre (%)		porcentaje de desulfuración
		Antes	Después	
Irani	Crudo	1.53	1.38	9.8
	LVGO <sup>a</sup>	1.91	1.95	0
	LDO <sup>b</sup>	1.76	1.86	0
	A-BTM <sup>c</sup>	2.71	2.23	17.7
Basrah	Crudo	2.42	2.27	6.2
	365°C + <sup>d</sup>	3.72	3.00	19.4
Kuwait	Crudo	2.96	2.22	25.0
	250-350°C	1.47	1.49	-
	365°C +	2.07	0.85	58.9

<sup>a</sup> Fracción de la destilación al vacío a temperaturas entre 266 y 301°C

<sup>b</sup> Fracción de la destilación al vacío a temperaturas entre 305 y 412°C

<sup>c</sup> Fondos de la destilación atmosférica

<sup>d</sup> Fondos de la destilación atmosférica a 365°C

Tabla 2.3.3 Desulfuración de diferentes fracciones de tres crudos usando *D. desulfurans* M6

Referencia	% de remoción	tipo de azufre	microorganismo	tipo de proceso
Handegren <i>et al.</i> (1994)	NR	Dibenzotiofeno	derivación de <i>Pseudomonas alcaligenans</i>	Oxidativo Metabólico
Atlantic Research Corp.	NR	Dibenzotiofeno	<i>Pseudomonas</i>	-
Chandra <i>et al.</i> (1979)	20%	Azufre orgánico en carbón de la India	NR	-
Gocay y Yurten (1983)	50-57% 90-95%	Azufre orgánico Pinta Lignita turca	NR	-
Kargi y Robinson (1999)	19%	Azufre orgánico en carbón bituminoso	<i>Sulfobobus acidocaldarius</i>	-
Monticello	5 al 25%	Azufre en hidrocarburos	-	Oxidativo Enzimático
Vázquez-Duhall <i>et al.</i> (1993)	-	Tiofenos y compuestos organosulfurados heterocíclicos	<i>Citrocromo C</i>	-
Zobell (1953)	-	Azufre en petróleo	NR	Anaerobio
Kim <i>et al.</i> (1995)	5 al 16%	Azufre en petróleo	<i>D. Desulfurans M6</i>	-
Lizama <i>et al.</i> (1995)	2-21%	Dibenzotiofeno	<i>Desulfotomaculum obovis</i> <i>D. Desulfurans</i> <i>Thermodesulfobacterium commune</i>	-
Vázquez-Duhall <i>et al.</i> (1993)	NR	Compuestos organosulfurados	<i>Citrocromo C</i>	Enzimático

NR - No reportado

Tabla 2.3.4 Comparación de los diferentes sistemas biodesulfuradores reportados



El Instituto de Ingeniería de la UNAM se encuentra desarrollando un sistema capaz de reducir los niveles de azufre en combustóleo. En la Figura 2.3.5. se muestra el diagrama de flujo del proceso. El proceso comprende cinco etapas que son:

- a) Preparación de la emulsión.
- b) Desarrollo de inóculos.
- c) Desulfuración.
- d) Esterilización y recuperación de combustóleo.
- e) Recuperación de azufre.

El proceso planteado comienza con la emulsificación del combustóleo en agua, esto con el fin de permitir un mayor contacto de los microorganismos que se desarrollan en un medio acuoso. Se precalienta el combustóleo hasta una temperatura de 50 a 60°C y se mezcla con el medio salino, empleando un emulsificante. (ver Zamora *et al* 1996)

Paralela a la fase de la emulsificación, se encuentra la preparación del inóculo. Esta etapa consiste en desarrollar a los microorganismos en un medio salino con sulfatos y una fuente de carbono, permitiendo de esta forma alcanzar un nivel máximo de crecimiento.

Una vez lograda la emulsión y el inóculo ambos se pasan al biorreactor de tipo reactor de tanque agitado (STR) el cual deberá mantenerse con agitación, temperatura y pH controlados, además de conservar condiciones anóxicas en esta parte del proceso.

Una vez completado el tiempo de residencia la carga desulfurada se debe esterilizar para destruir la biomasa, permitiendo con esto la ruptura de la emulsión y la separación de la fase acuosa del combustóleo.

Por otra parte, durante la etapa de desulfuración se genera ácido sulfhídrico, el cual debe de ser removido. El H<sub>2</sub>S puede absorberse en una columna con solución de sulfato férrico. Esto, con la finalidad de oxidar el sulfhídrico, como lo muestra la ecuación 1, y recuperar azufre elemental. Para recuperar el sulfato férrico se emplean bacterias ferro-oxidantes que oxidan el hierro de ferroso a férrico (ecuación 2).



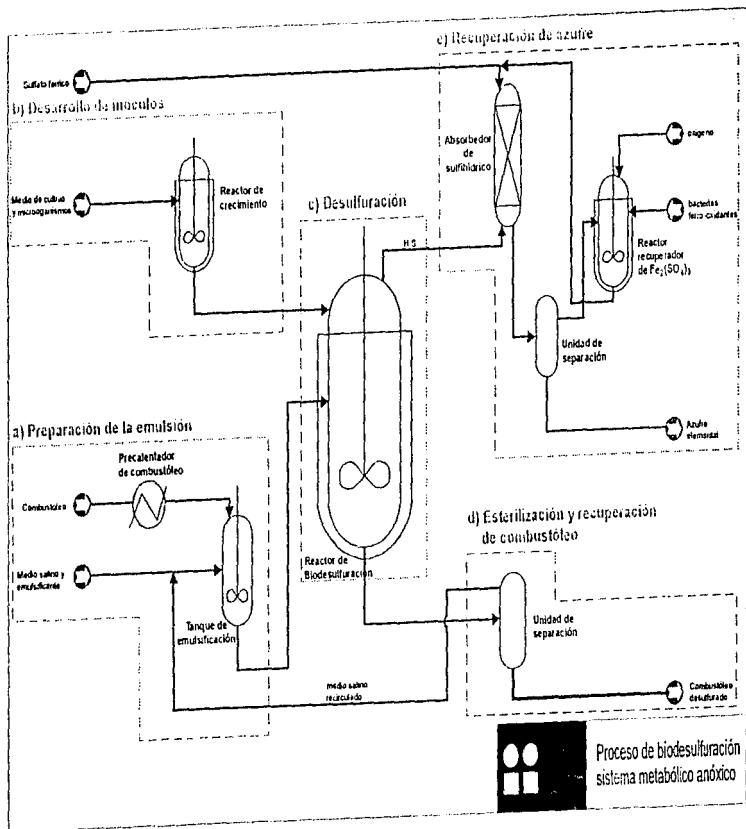


Figura 2.3.5 Proceso de biodesulfuración vía reductiva, sistema anaerobio

## 2.4. CONDICIONES DE PROCESO EN SISTEMAS BIOTECNOLÓGICOS.

Los procesos biológicos al igual que los procesos químicos requieren de un ambiente propicio para poderse llevar a cabo. Winkler (1990) define tres componentes del ambiente para sistemas biotecnológicos:

- *Ambiente Biológico.* Un ambiente biológico deseado será aquel en el cual solo los organismos requeridos se encuentren presentes o el sistema este libre de organismos que compitan o inhiban a lo propios del proceso.
- *Ambiente Químico.* Un ambiente químico favorable significa que todos los nutrientes y sustratos requeridos se encuentren presentes a los niveles correctos y el valor de pH sea el adecuado, además de que el sistema se encuentre libre de sustancias inhibitorias.
- *Ambiente Físico.* Este involucra la temperatura del sistema y la agitación; ya que el sistema se debe conservar homogéneo para mantener los demás parámetros.

Como se puede observar, el ambiente favorable para un sistema biotecnológico se encuentra en función de muchas variables y si no se cuenta con datos ni relaciones matemáticas para poder predecir su comportamiento es necesario realizar estudios experimentales para poder establecer los parámetros de mayor importancia en el proceso. A continuación se plantean algunos parámetros importantes a considerar:

### 2.4.1. Temperatura

La temperatura es un parámetro fundamental en cualquier proceso. Esta afecta el crecimiento de manera notable, debido a que los microorganismos de una especie dada, sólo pueden crecer en un rango restringido de temperaturas. La Figura 2.4.1 muestra cómo se pueden clasificar los organismos de acuerdo con la temperatura. Los psicófilos presentan un rango de 5° a 15°, los mesófilos de 24° a 40°C y los termófilos de 45° a 60°C pero se han reportado casos hasta 94°C.

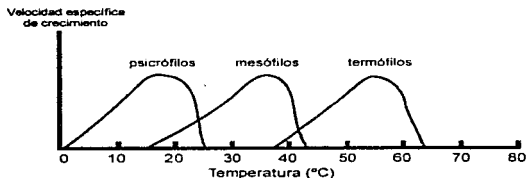


Figura 2.4.1 Efecto de la temperatura en el crecimiento microbiano. (Quintero 1981)

#### 2.4.2. pH

El pH, medida de concentración de iones hidrógeno, tiene también un marcado efecto en la velocidad de crecimiento y en el rendimiento. El valor de pH para una especie presenta generalmente un máximo denominado pH óptimo. En bacterias el valor de pH óptimo varía entre 6.0 y 8.0; en levaduras entre 4.0 y 6.0 y en mohos entre 3.0 y 7.0. De lo anterior se desprende la necesidad de buscar el pH más favorable para el proceso.

#### 2.4.3. Medio de cultivo

Todos microorganismos necesitan para su crecimiento de fuentes de energía y de materia. En la mayoría de los procesos biológicos industriales la fuente de energía y la de materia son la misma, pero es necesario que la fuente de materia contenga todos los elementos constitutivos de la masa celular en las proporciones requeridas por la composición interna del organismo. En la Tabla 2.4.1 se presentan los compuestos orgánicos de los principales elementos de la masa celular y su porcentaje en peso seco; las cifras son de carácter general, pero se considera que son representativas de la composición microbiana. La selección o formulación de un medio de cultivo debe considerar todos los elementos descritos en dicha tabla.

Elemento	Compuestos orgánicos	% del peso seco
H	Compuestos orgánicos y agua	8
O	Compuestos orgánicos y agua	20
C	Compuestos orgánicos	50
N	Proteínas, ácidos nucleicos y coenzimas	14
S	Proteínas y algunas coenzimas	1
P	Ácidos nucleicos, fosfolípidos y coenzimas	3
Mg	Cofactor de reacciones enzimáticas	0.5
Mn	Cofactor de algunas enzimas	0.1
Ca	Cofactor de enzimas (proteasas)	0.5
Fe	Citocromos, proteínas y cofactor de enzimas	0.2
Co	Constituyente de la vitamina B <sub>12</sub>	} 0.03
Zn	}	
Cu		
Mo	Constituyente de ciertas enzimas	

Tabla 2.4.1 Principales elementos constituyentes las células microbianas. (Quintero 1981)

## CAPÍTULO 3

### 3. METODOLOGÍA EXPERIMENTAL

#### 3.1. SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE TRABAJO.

Se estudiaron veinticuatro aislados de sedimento marino proporcionadas por el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, identificadas como bacterias anaerobias. Diecisiete de las veinticuatro cepas fueron obtenidas durante muestreos de sedimentos marinos en el Golfo de Tehuantepec y Golfo de Campeche, en lugares con actividad petrolera. Las siete cepas restantes provienen de un reactor anaerobio que trata aguas residuales de la Ciudad de Toluca, Estado de México.

Todos los aislados presentan formación de sulfuro de hidrógeno indicando con esto su actividad sulfato-reductora. En trabajos anteriores se ha probado su crecimiento en presencia de combustóleo, resultando únicamente veinte de ellos viables para el proceso (Tabla 3.1.1) (Aragón *et al.* 1996).

Código asignado	Código de Ciencias del Mar	Origen	Crecimiento en presencia de combustóleo
1	EP E1	Campeche	+
2	O N-1	Oaxaca	+
3	O N-4	Oaxaca	+
4	RN-1	Campeche	+
5	O N-2	Oaxaca	-
6	O N-3	Oaxaca	+
7	EP E5	Campeche	+
8	EP E6	Campeche	+
9	EP E3	Campeche	+
10	SR1 DIG	Toluca	+
11	DG1	Toluca	-
12	SR DG2	Toluca	+
13	EP E2	Campeche	+
14	EP E4	Campeche	+
15	1B DIG	Toluca	+
16	DGT DIG	Toluca	-
17	2A DIG	Toluca	-
18	SO DIG	Toluca	-
19	RN 2	Campeche	-
20	2 DIG	Toluca	-
21	O N-4	Oaxaca	-
22	O N-3	Oaxaca	+
23	O N-2	Oaxaca	+
24	O N-1	Oaxaca	+
25	RN-4	Campeche	-

Tabla 3.1.1 Clasificación de las cepa de trabajo (+ crecimiento, - inhibición)

La clasificación de los microorganismos se desconoce actualmente, pero muy probablemente se trata de cultivos mixtos debido a su origen.

Dada la complejidad de realizar estudios con 24 cepas se propuso seleccionar cinco que fueran propicias para el proceso. Para poder identificar las cepas se tomó como parámetro su capacidad para la reducción de sulfatos como potencial para la degradación de compuesto orgánicos, así como la actividad volumétrica y específica de los aislados.

Para la prueba de selección se hicieron crecer todas las cepas en botellas viales de 150 mL con un 5% de inóculo en 95 mL de medio Postgate B, desplazando el oxígeno presente en el espacio libre del vial con nitrógeno, siguiendo la metodología descrita por Widdel y Bak (1991)<sup>†</sup>.

Se realizaron las pruebas a valores de pH de 5 y 7. La mediciones para pH 5 se realizaron a los 5 y 15 días, para las de pH 7 a los 7 y 15 días.

Se filtraron las muestras con papel Whatmann No.4 para eliminar el sulfuro de hierro formado y se midió la degradación de los sulfatos presentes en el medio por el método gravimétrico<sup>†</sup>, así como la densidad óptica del mismo a una longitud de onda de 610 nm y una dilución 1/10.

En base a la acción sulfato-reductora y el crecimiento (medido como densidad óptica) se evaluaron los siguientes parámetros:

- *Porcentaje de remoción de sulfatos:*

$$\% \text{ de Remoción} = \frac{\text{g SO}_4^{2-} / \text{L iniciales} - \text{g SO}_4^{2-} / \text{L finales}}{\text{g SO}_4^{2-} / \text{L iniciales}} \times 100$$

- *Actividad Volumétrica:* Relaciona la cantidad de sulfatos reducidos un por volumen y tiempo. Representa la actividad sulfato-reductora.

$$\text{Actividad Volumétrica} = \frac{\text{g SO}_4^{2-} / \text{L iniciales} - \text{g SO}_4^{2-} / \text{L finales}}{\text{tiempo (hr)}}$$

<sup>†</sup> Apéndice B

- *Actividad Específica*: Relaciona la cantidad de sulfatos reducidos por tiempo y cantidad de biomasa, medida como densidad óptica.

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{g SO}_4^{2-} \text{ iniciales} - \text{g SO}_4^{2-} \text{ finales}}{\text{tiempo (hr)} \times \text{unidades de densidad óptica(ABS)}}$$

### 3.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PROCESO.

Tomando como referencia los parámetros reportados para sistemas semejantes así como procesos microbiológicos industriales ya existentes, se propone que las variables a estudiar sean: la temperatura, el pH, la concentración de sustrato y el potencial redox (solución reductora).

#### 3.2.1. Efecto de la Temperatura.

Las pruebas se hicieron a nivel vial en condiciones anóxicas para las cinco cepas seleccionadas a 28, 35 y 45°C con el fin de cubrir la región mesófila. Se empleó medio Postgate B libre de hierro para evitar la precipitación de sulfuro de hierro. Se usó un 5% de inóculo. Se determinó el crecimiento de biomasa<sup>2</sup> y la remoción de sulfatos a las 168 y 336 horas. Con estos datos se calculó la actividad volumétrica y específica.

#### 3.2.2. Efecto del pH.

Se evaluó la reducción de sulfatos así como la actividad específica y volumétrica para las cinco cepas seleccionadas a pH de 5, 7 y 8. Las pruebas se hicieron a nivel vial usando medio Postgate B libre de hierro. Se tomaron muestras a las 168 y 336 horas de proceso.

---

<sup>2</sup> Medido como densidad óptica, ver apéndice A.



El valor del pH se modificó en el medio usando ácido clorhídrico ó hidróxido de sodio según fuera el caso. Se midió el crecimiento como densidad óptica y se calculó la remoción de sulfatos por el método gravimétrico.

### **3.2.3. Efecto de la concentración del sustrato.**

Debido a que el combustóleo contiene altas cantidades de azufre, es necesario establecer el efecto de la concentración de este en la capacidad de los microorganismos para su degradación. Por tal motivo se realizaron pruebas a diferentes concentraciones empleando sulfatos de calcio y magnesio como modelo.

Se trabajaron concentraciones de 2.17, 4.56, 8.28 y 15.84 g SO<sub>4</sub>/l. La pruebas se efectuaron en botellas viales con un 5% de inóculo en 95 mL de medio Postgate B (sin fierro) modificando la concentración de sulfatos de calcio y magnesio en la misma proporción en todos los casos. El valor pH fue de 7 y la temperatura 35°C.

Se determinó la degradación de sulfatos a las 168, 336, 506 y 696 horas de proceso, así como la actividad específica y volumétrica.

### **3.2.4. Efecto de la solución reductora.**

Las bacterias sulfato-reductoras comúnmente trabajan en medios reducidos, razón por la cual se le añade al medio alguna substancia que aumente o disminuya el potencial redox. En el caso de el medio Postgate B y C se emplea tioglicolato de sodio y ácido ascórbico (Postgate, 1984).

Se determinó el efecto de la solución reductora en la remoción de sulfatos, haciendo pruebas a diferentes concentraciones, midiendo la remoción de sulfatos y las actividades específicas y volumétricas. Las pruebas se hicieron a nivel matraz empleando medio Postgate B sin fierro, adicionando diferentes cantidades de solución reductora (ácido ascórbico y tioglicolato de sodio): 25, 50 y 100 por ciento.

Se mantuvieron las mismas condiciones (pH de 7, 5% de inóculo, temperatura de 35°C y agitación de 150 rpm) y las mediciones se realizaron a las 168 horas.

### 3.3. SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

#### 3.3.1. Formulación de un medio para el proceso de desulfuración.

La literatura reporta que las bacterias con acción sulfato reductora presentan buena actividad cuando crecen en medio Postgate B y C, pero debido a su alto costo (aproximadamente 0.87 y 1.41 dólares por litro respectivamente) no es factible su aplicación industrial. Por tal motivo surge la necesidad de diseñar un medio más rentable. Tomando como base el medio Postgate B, se propone la formulación de un nuevo medio empleando suero de leche como fuente de carbón y nitrógeno.

Se usó suero de leche AMPI de Century Foods debido a su alto contenido de proteínas (fuente de nitrógeno), de carbohidratos (fuente de carbón) y de sales. Ver Tabla 3.3.1.

Parámetro		%
Calcio como Ca	*	0.374
Magnesio como Mg	*	0.091
Sodio como Na	*	0.970
Potasio como K	*	1.534
Cloruros como Cl	*	2.398
Fosfatos como $PO_4^{2-}$	*	0.034
Sulfatos como $SO_4^{2-}$	*	1.534
Proteína	**	34.5
Grasa	**	3.5
Carbohidratos, como Lactosa	**	52.0
Lactato	***	3.0

Tabla 3.3.1 Composición del suero de leche AMPI

Se diseñaron tres medios y se realizó un estudio comparativo de la funcionalidad de cada uno de estos. La formulación de los medios se realizó modificando el medio Postgate B, buscando sustituir el lactato de sodio (fuentes de carbón) por lactosa y ácido láctico,

\* Análisis de suero de leche AMPI hecho por el Laboratorio de Análisis Industriales de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

\*\* Boletín Técnico proporcionado por Century Foods Internacional.

\*\*\* Determinación por titulación acidimétrica.

así como el extracto de levadura (fuente de nitrógeno) por las proteínas presentes en el suero de leche. Se empleó la misma cantidad de sales que el medio Postgate B.

Las formulaciones desarrolladas se identificaron con las siguientes claves (ver Tabla 3.3.2):

- Medio ii-1 *sin lactato de sodio ni extracto de levadura*.
- Medio ii-2 *sin lactato de sodio, sin extracto de levadura, ni cloruro de sodio*.
- Medio ii-3 *sin lactato de sodio*.

Estas pruebas se hicieron a nivel matraz, empleando 5% de inóculo y 95 mL de medio. Se evaluó la remoción de sulfatos y la actividades específica y volumétrica a las 168 horas.

En ninguno de los casos se usó solución de hierro para evitar su precipitación como sulfuro de hierro

medio	Postgate		ii		
	B	C	1	2	3
Lactato de sodio (50%)	7.5g	12. g	-	-	-
Suero de leche	-	-	6.37 g	6.37 g	6.37 g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	4.5 g	-	-	-
CaSO <sub>4</sub>	1.0 g	-	1.0 g	1.0 g	1.0 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	-	0.05 g	-	-	-
Citrato de Sodio	-	0.3 g	-	-	-
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	2.0 g	2.0 g	2.0 g	2.0 g	2.0 g
NaCl	25 g	25 g	25 g	-	25 g
Extracto de levadura	1.0 g	1.0 g	-	-	1.0 g
Solución reductora	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Sulfatos totales	1.484 g	3.818 g	1.484 g	1.484 g	1.484 g

Tabla 3 3 2 Composición de cada uno de los medios evaluados.

## 3.4. PRUEBAS CON COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS.

Se evaluó la acción de las cinco cepas seleccionadas en presencia de cinco compuestos modelo presentes en el combustible (ver 3.4.1).


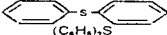

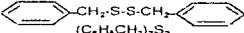
COMPUESTO	P.M.	FORMULA	% S	SOLUBILIDAD > 10%
Tionafteno	134	 $C_8H_6S$	23.88	Etanol Benceno Cloroformo Diétiler
Sulfuro de difenilo	186.27	 $(C_6H_5)_2S$	17.18	Etíleter Benceno Disulfuro de carbono
Dibenzotiofeno	184.2	 $C_{12}H_8S$	17.36	Benceno Etanol
Disulfuro de dibencilo	246.39	 $(C_6H_5CH_2)_2S_2$	25.97	Etíleter Etanol caliente Benceno
Etanolol (etilmercaptano)	62.13	$CH_3CH_2SH$	51.50	Acetona Etíleter Etanol

Tabla 3.4.1 Compuestos organosulfurados, formula, peso molecular, cantidad de azufre y solubilidad (Aldrich Chemical Company Inc. Milwaukee Wi.)

#### **3.4.1. Efecto del solvente.**

Debido a que los compuesto de organosulfurados que son objeto de estudio no son solubles en el medio de crecimiento por ser este un medio acuoso, es necesario seleccionar un solvente para poder hacer una solución (o suspensión) donde los microorganismos puedan estar en contacto con los compuestos.

Se estudió el efecto de tres solventes en el crecimiento y la capacidad sulfato-reductora de los microorganismos. Los compuestos evaluados fueron: etanol, dimetilformamida y benceno.

Se hicieron pruebas a nivel matraz con 91.5 mL de medio Postgate B sin hierro, 5% de inoculo y 3.5 mL de solvente. La temperatura fue de 35°C, el valor de pH de 7 manteniéndose a agitación constante de 150 rpm. Estas pruebas únicamente se hicieron con las cepas 5 y 22.

Se midió la cantidad de sulfatos degradados así como la densidad óptica, con estos parámetros se evaluó la capacidad de degradación de sulfatos, así como las actividades específica y volumétrica.

#### **3.4.2. Desulfuración de los compuestos organosulfurados.**

Para estas pruebas se consideró la relación DQO/S existente en el medio Postgate B y se substituyó el azufre inorgánico (sulfatos) por azufre orgánico (compuestos organosulfurados). La relación elegida fue de 3.845 g DQO/g S. En la Tabla 3.4.2 se muestra la concentración empleada para cada uno de los compuestos

Se tomaron 3 mL de la solución 0.02 M de los compuestos disueltos en etanol. Las pruebas se hicieron a nivel matraz para las 5 cepas empleando medio Postgate B sin hierro, substituyendo los sulfatos por cloruros. Las condiciones fueron: pH de 7, temperatura de 35°C, 5 % de inoculo y agitación a 150 rpm.

Se evaluó la acción de las cinco cepas seleccionadas en presencia de los cinco compuestos modelo. Se midió el sulfuro de hidrógeno producido a las 168 horas, em-

pleando el método potenciométrico; la cantidad de biomasa se determinó por medio de la densidad óptica.

Compuesto	% de azufre en la molécula	moles de azufre en el medio	concentración del compuesto en el medio
Tionafteno	23.88	0.02 mol S/L	2.68 g/L
Sulfuro de difenilo	17.18	0.02 mol S/L	3.725 g/L
Dibenzotiofeno	17.36	0.02 mol S/L	3.684 g/L
Disulfuro de dibenzilo	25.97	0.02 mol S/L	2.463 g/L
Etilmercaptano	51.50	0.02 mol S/L	1.242 g/L

Tabla 3.4.2 Concentración de los compuestos organosulfurados en las pruebas de desulfuración

### 3.5. ESCALAMIENTO A FERMENTADOR DE 5 LITROS.

El bioreactor o fermentador, como se le conoce en el área de biotecnología, es el corazón de todo sistema biológico y se puede definir como un contenedor capaz de mantener un ambiente favorable para la operación de un proceso biológico deseado.

En el presente estudio se empleó un reactor de tanque agitado (STR) de 5 litros marca Applikon. El reactor (ver Figura 3.5.1) presenta las siguientes características:

Bioreactor enchaquetado Applikon Z61104CT05

- Material: Vidrio de borosilicato y acero inoxidable
- Agitador con motor de velocidad variable y propela tipo marino
- Volumen máximo de trabajo: 4.81 L (H/D = 1.6)
- Volumen mínimo de trabajo: 3.41 L
- Volumen de trabajo: 3.41 L (H/D = 1.1)
- Volumen Chaqueta: 2.01 L

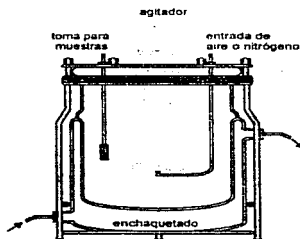


Figura 3.5.1 Bioreactor Applikon

### 3.5.1. BIODESULFURACIÓN EN COMBUSTÓLEO.

Se empleó combustóleo proveniente de la refinería de Tula, Hidaigo. Dicho combustóleo se caracterizó previamente y de acuerdo a las normas descritas por la ASTM. Se determinó la cantidad de azufre, su poder calorífico y contenido de metales entre otros.

El procedimiento usado para la biodesulfuración se muestra de forma esquemática en la Figura 3.5.2. En este esquema se aprecian cuatro etapas que se describen a continuación:

- a) **Desarrollo de los inoculos.** Se prepararon 350 mL de inoculo de la cepa 22, cultivada durante 7 días en medio Postgate B sin fierro y un valor de pH de 7.
- b) **Preparación de la emulsión.** Se prepararon 3150 mL de una emulsión de combustóleo en medio Postgate B (esterilizado) sin fierro ni sulfatos. La preparación de dicha emulsión se llevo a cabo empleando un 10 % de combustóleo y un 1% de Tween 20 como agente emulsificante. Se usó un agitador de tipo Lightnin Labmaster a 1350 rpm. El combustóleo se precalentó a 60°C y se añadió al medio con Tween de acuerdo al procedimiento descrito por Zamora *et. al* (1996).
- c) **Biodesulfuración.** Se llenó el fermentador con la emulsión y se agregó el inoculo. Se selló el reactor y se desplazó el oxígeno presente con nitrógeno. Se mantuvo una temperatura de 35°C y una agitación de 750 rpm. El valor de pH inicial fue de 7. Se midió diariamente la producción de ácido sulfhídrico durante 168 horas usando el método potenciométrico (Apéndice C) y desplazando el H<sub>2</sub>S con nitrógeno.
- d) **Esterilización y recuperación del combustóleo.** Después del tiempo de desulfuración, la emulsión se esterilizó a 120°C durante 15 minutos en matraces sellados con tapones de algodón o cartón dentro de una autoclave, con el fin de romper la emulsión. Se decantó el combustóleo de la fase acuosa y se mandó analizar su contenido total de azufre y su capacidad calorífica (Instituto de Investigaciones Eléctricas). Se tomaron como testigos muestras iniciales de la emulsión sin inoculo y del combustóleo sin emulsionar.



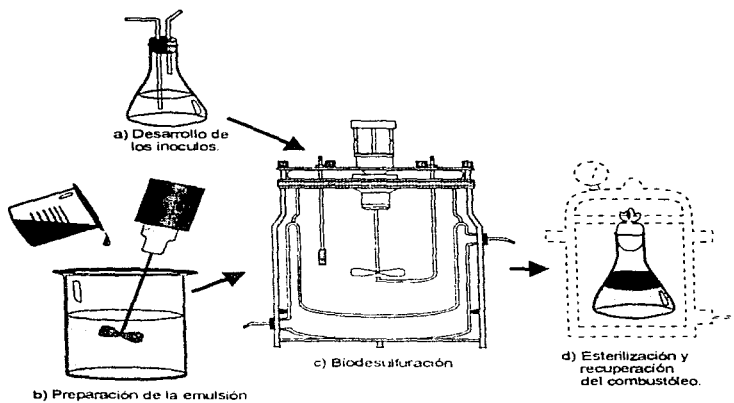


Figura 3.5.2 Diagrama de la metodología usada para la biodesulfuración de combustóleo.

## CAPÍTULO 4

### 4. RESULTADOS

#### 4.1. SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE TRABAJO.

Los datos obtenidos de la caracterización de las veinticuatro cepas a pH 5 y 7 se muestran en la Figura 4.1.1 y el Apéndice C.

Los niveles de biomasa más altos fueron alcanzados indistintamente a 14 días para el pH 7 y 5 días para el pH 5. Los valores máximos de densidad óptica alcanzados (mostrados entre paréntesis) fueron de las cepas 12(0.208), 22(0.238), 17(0.195) y 8(0.185) siempre al quinto día. Al contrario, las cepas con mejor crecimiento celular a pH 7 fueron la 3(0.868), 4(0.635), 14(0.377), 6(0.372) y 23(0.346), siempre al día 14. Algunas cepas mostraron un marcado desarrollo, tales como la 5, 23, 22, 8 y 7, con valores de remoción de 92.8, 87.3, 79.6, 65.0 y 61.0% (al 14 día; pH 7). Las mismas cepas disminuyeron el sulfato inicial en 8.63, 5.03, 6.36, 11.67 y 10.9% (al 7º día) y 9.6, 20, 13.56, 12.5 y 14.2 (al 14º día) cuando el pH fue de 5. Las mejores cepas a un valor de pH 5 resultaron ser 9(60.4%), 6(54.4%), 12(23.23%) y 15 (21.43%).

La remoción de sulfatos por las 24 cepas a pH 5 (para el 5º y 14º día) y a pH 7 (para el 7º y 14º día), así como la actividad específica y volumétrica, se muestran en la Figura 4.1.1. Como puede observarse, el porcentaje de remoción para la totalidad del grupo de cepas resultó consistentemente más alto cuando el valor del pH del proceso fue de 7. Los valores de remoción más altos se encontraron al 7º día para la mayoría de los experimentos a pH 7, pero un comportamiento contrario fue observado cuando se trabajó a pH 5; es decir, que se presentó una mejor remoción de sulfatos al día 14, siendo menor la remoción al 5º día.

En cuanto a la actividad volumétrica, el desarrollo de las diferentes cepas anóxicas fue como sigue: a pH 5 (día 5) las actividades volumétricas logradas por las cepas variaron en el intervalo de  $8.43 \times 10^{-4}$  a  $2.30 \times 10^{-3}$  gSO<sub>4</sub>/l\*hr, que corresponden a las cepas 19 y 21, respectivamente. A pH 7 (día 7) las actividades volumétricas fueron tan grandes como  $1.47 \times 10^{-3}$  a  $1.2 \times 10^{-2}$  gSO<sub>4</sub>/l\*hr para las cepas 17 y 15, respectivamente. Otras cepas in-

teresantes son la 8, 14 y 24 (a pH 5) así como 8, 22 y 23 (a pH 7) por encontrarse dentro de los mejores resultados obtenidos de actividad volumétrica.

Por lo que respecta a la actividad específica, la tendencia fue como sigue: Cuando el valor de pH fue de 5 (5° día), la actividad específica fue  $9.67 \times 10^{-6}$  y  $6.34 \times 10^{-4}$   $\text{gSO}_4/\text{DO} \cdot \text{hr}$ , para las cepas 22 y 14, respectivamente. Para un valor de pH de 7 (14° día), la actividad específica fue  $8.84 \times 10^{-6}$  y  $9.20 \times 10^{-4}$   $\text{gSO}_4/\text{DO} \cdot \text{hr}$ , para las cepas 1 y 18, respectivamente. Otras cepas con potencial de aplicación son la 4, 16 y 21 (a pH 5), así como la 5, 9, 16 y 24 (a pH 7), pues sus actividades específicas se presentan como las más altas, en comparación con las de las demás cepas.

Con todos los datos recabados se tomó la decisión de cuales serían las cepas más propicias para el proceso. Las mejores cepas de acuerdo a su crecimiento, su actividad volumétrica y a su capacidad para degradar sulfatos fueron las siguientes: 5, 7, 8, 15, 17, 22 y 23. Se descartó la cepa 23 (clave ON-2) por provenir de un sitio de muestreo semejante al de la cepa 5 (clave O'N-2'), ambas procedentes de sedimentos marinos de la misma zona (costas de Oaxaca). Por otra parte la cepa 17 se descartó por no presentar crecimiento en presencia de combustóleo (Aragón et al. 1996). En la Tabla 4.1.1 se muestran la cepas seleccionadas.

Código asignado	Código de Ciencias del Mar	Origen	porcentaje de remoción de sulfatos (pH 7)	densidad óptica máxima (crecimiento)	Crecimiento en presencia de combustóleo
5	O'N-2	Oaxaca	86.06 a 92.79	0.386	positivo
7	EP E5	Campeche	47.96 a 61.04	0.298	positivo
8	EP E6	Campeche	64.20 a 65.02	0.246	positivo
15	1B DIG	Toluca	57.44 a 61.52	0.295	positivo
22	O'N-3'	Oaxaca	79.82	0.467	positivo

Tabla 4.1.1 Clasificación de la cepa de trabajo

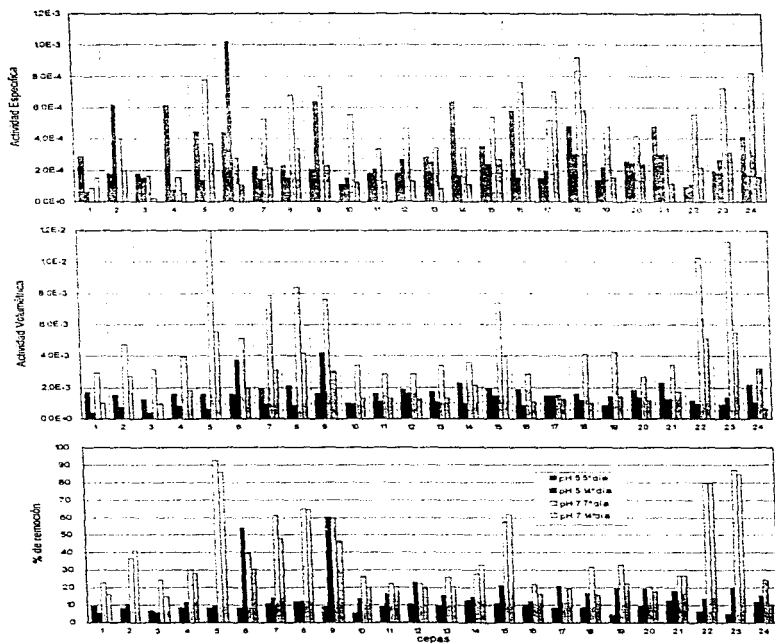


Figura 4.1.1 Crecimiento de las veinticuatro cepas a pH 5 y 7 en medio B, Porcentaje de remoción de sulfatos, actividad volumétrica y específica.

## 4.2. DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PROCESO.

### 4.2.1. Efecto de la Temperatura.

En la Figura 4.2.1 se muestran los porcentos de remoción de sulfatos, y las actividades volumétrica y específica para las 5 cepas seleccionadas a 28, 35 y 45°C. (Ver Apéndice C).

Se puede observar en los resultados obtenidos que en general todas la cepas presentan mejor actividad a 35°C. También podemos remarcar que la temperatura tiene un efecto drástico sobre la remoción ya que esta disminuye en el mejor de los casos de 61.07 a 6.13% (para la cepa 7) y en el peor de 79.62 a 0%.

Para todas las cepas, las mejores actividades volumétricas se alcanzaron a las 168 hrs y 35°C. Con valores del orden de  $7.4 \times 10^{-3}$  a  $1.2 \times 10^{-2}$  g  $\text{SO}_4/\text{l hr}$ . Siendo las mejores las cepas 5 y 22,  $1.20 \times 10^{-2}$  y  $1.03 \times 10^{-2}$  g  $\text{SO}_4/\text{l hr}$  respectivamente.

Por lo que respecta a la actividad específica, el comportamiento fue semejante al presentado por la actividad volumétrica con la salvedad de que a 28°C se presentaron buenas actividades, en algunos casos mayores que las obtenidas a 35° como son las cepas 7 (168 hrs) y 22 (336 hrs). Esto es útil para el desarrollo de los inoculos, donde se requiere una mayor cantidad de biomasa. De acuerdo a estas pruebas, es factible desarrollar los binóculos a temperatura ambiente, evitando con esto el gasto de precalentamiento. De cualquier forma las mejores actividades específicas en el menor tiempo se presentaron a 35°C, siendo el tiempo otro parámetro a tomar en cuenta en cualquier proceso.

De los resultados anteriores podemos afirmar que los microorganismos son del tipo mesófilos y se propone que la temperatura de operación sea de 35°C.

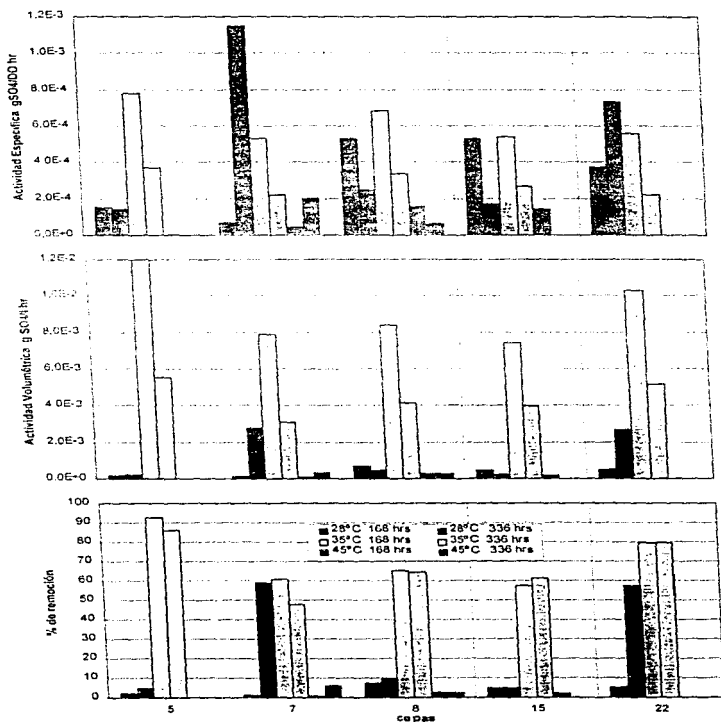


Figura 4.2.1 Efecto de la temperatura en la actividad volumétrica, específica y la remoción de sulfatos.

#### **4.2.2. Efecto del pH.**

En la Figura 4.2.2 se muestran los porcentajes de remoción de sulfatos y las actividades volumétrica y específica para las 5 cepas seleccionadas a valores de pH de 5,7 y 8 (Ver Apéndice C).

Corroborando los estudios preliminares de selección de las cepas (inciso 4.1), podemos decir que las mejores remociones se obtuvieron, para todas la cepas, a pH 7. Por otra parte se observan buenas remociones a pH 8, pero estas se logran hasta las 336 horas.

Por lo que respecta a las actividades específica y volumétrica, todas las cepas alcanzan los mejores valores de pH de 8 a las 168 horas, tanto en la actividad volumétrica como en la específica. Esto es interesante, ya que se puede lograr una mayor cantidad de biomasa en una semana a pH de 8; lo cual es útil en el desarrollo de los inoculos.

A partir de los resultados obtenidos se propone que el valor de pH para el proceso sea de 7 y de 8 para el desarrollo de los inoculos.

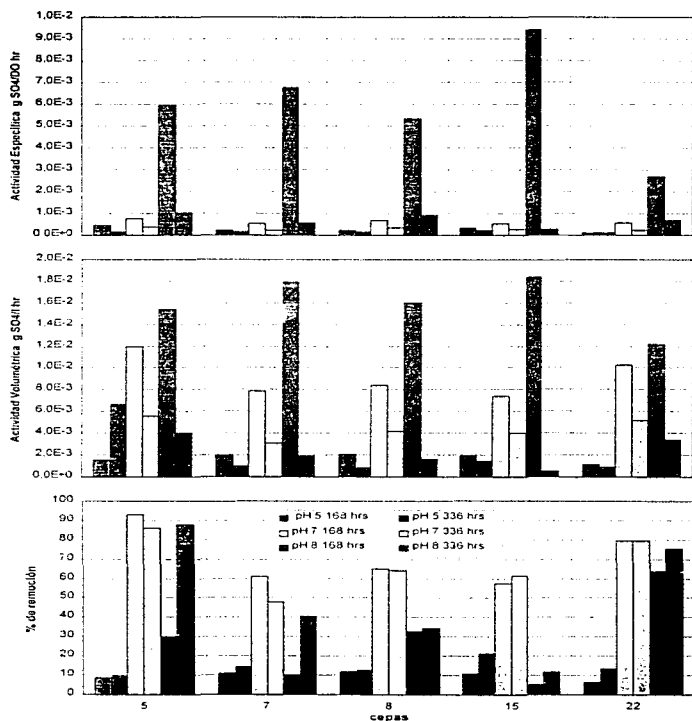


Figura 4.2.2 Efecto del pH en la actividad volumétrica, específica y la remoción de sulfatos.



#### 4.2.3. Efecto de la concentración del sustrato.

En la Figura 4.2.3 se muestran los resultados obtenidos para la remoción de sulfatos a diferentes concentraciones del sustrato. Como se puede observar la concentración inicial de sulfatos tiene un efecto marcado en la remoción. La tendencia presentada es muy similar para todas las cepas, y este comportamiento bien puede ser representado por una ecuación de tipo cuadrático. La máxima remoción fue en todos los casos para la concentración menor, 2.17 g/l (entre un 48 y un 86% para las diferentes cepas). La reducción mínima ocurrió a la concentración de 4,56 g/l, con excepción de la cepa 22 donde esta tuvo lugar a 8.34 g/l. Es interesante remarcar que a la concentración inicial de 16.06 g/l la remoción fue muy similar para todas las cepas ( $30.93 \pm 2.58$ ).

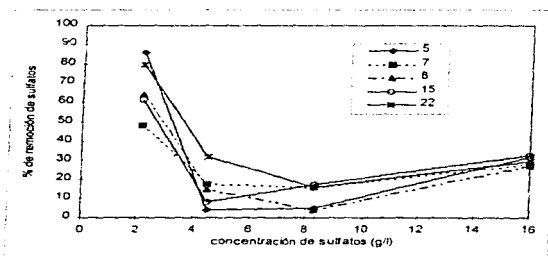


Figura 4.2.3 Efecto de la concentración de sulfato sobre la remoción del mismo. (336 hrs)

Por lo que respecta a las actividades volumétrica y específica los datos obtenidos se presentan en la Figura 4.2.4. En esta se puede observar que tanto para la actividad volumétrica como para la específica, las tendencias son muy semejantes. Los mejores valores se lograron, para casi todos los casos, a las 168 horas y 16.06 g/l de concentración inicial.

Es importante resaltar que la actividad específica tiene una tendencia de tipo exponencial con relación a la concentración inicial de sulfatos. Mientras que la actividad volu-

métrica se comporta de manera semejante a la remoción, presentando para todos los casos una tendencia que bien podría representarse con una ecuación cuadrática.

Se ha encontrado que en los reactores anaerobios se presenta una competencia entre las bacterias sulfato-reductoras (BSR) y las metanogénicas (BMG) por el donador de electrones y por consiguiente en la producción de  $\text{H}_2\text{S}$  ó  $\text{CH}_4$ , según sea el caso. En el caso de la presente investigación se desconoce la existencia de BMG pero muy probablemente se presenten debido a la fuente de las cepas.

Dicha competencia se da por una traslape en las condiciones ambientales favorables para ambos organismos y por la naturaleza misma de las reacciones. Tanto la reacción de formación de metano como la de sulfuro tienen una  $\Delta G$  de formación muy cercana, con la diferencia que para el caso de sulfuro esta tiene una ligera ventaja termodinámica en ambos casos, esto se deduce de su como se ve en su valor de  $\Delta G^\circ$  (Tabla 4.2.1).

Reacciones para bacterias sulfato-reductoras.	
$4 \text{H}_2 + \text{SO}_4^{2-} + \text{H}^+ \rightarrow \text{HS}^- + 4 \text{H}_2\text{O}$	$\Delta G^\circ = -153 \text{ kJ/mol}$
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{SO}_4^{2-} \rightarrow \text{HS}^- + 2 \text{HCO}_3^-$	$\Delta G^\circ = -72 \text{ kJ/mol}$
Reacciones para bacterias metanogénicas.	
$4 \text{H}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{CH}_4 + 3 \text{H}_2\text{O}$	$\Delta G^\circ = -136 \text{ kJ/mol}$
$\text{CH}_3\text{COO}^- + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{HCO}_3^-$	$\Delta G^\circ = -31 \text{ kJ/mol}$

Tabla 4.2.1 Reacciones de formación para  $\text{CH}_4$  y  $\text{H}_2\text{S}$

Nos se conoce a ciencia cierta cuales son los parámetros que gobiernan la competencia entre BSR y BMG, pero se sabe que la concentración inicial de sulfatos y de sustrato tiene una gran influencia. Visser (1995) establece que la relación DQO/ $\text{SO}_4$  determina la ASR en todos anaerobios suspendidos o granulares, donde la DQO es una medida indirecta de la cantidad de sustrato. Las relaciones mayores de 20 no promueven el crecimiento de BSR, pero si de BMG. A relaciones entre 1.7 y 2.7 se presenta una competencia entre BSR y BMG. Visser encontró que con el valor experimental de 0.61 la ASR se incrementa.

Se calcularon las relaciones  $DQO/SO_4$  y en la Figura 4.2.5 se muestra el efecto que tiene sobre la remoción de sulfatos, la actividad volumétrica y específica. Se observa que tanto la actividad volumétrica como la remoción de sulfatos presentan un comportamiento de una función cuadrática con un mínimo en el rango de 0.35 a 0.65  $DQO/SO_4$ . Este comportamiento es muy similar para las cinco cepas, pero por lo que respecta a la actividad volumétrica se puede observar que a las 168 horas existe una gran diferencia entre las cepas cuando disminuye la relación  $DQO/SO_4$  y esta diferencia se vuelve casi nula a las 336 horas.

Para la remoción de sulfatos, como ya se mencionó, el comportamiento es de tipo cuadrático, pero a diferencia de las actividades existe una marcada diferencia entre las cepas para los diferentes valores de  $DQO/SO_4$ .

La actividad específica presenta un comportamiento de tipo exponencial con tendencia asintótica a mayores valores de  $DQO/SO_4$ , alcanzando los mayores valores a relaciones menores a 0.2.

Todos los datos anteriores revelan que, independientemente de la competencia entre BSR y BMG, la cual no se pretende demostrar en este trabajo, es interesante el hecho de que a relaciones menores de 0.2  $gDQO/gSO_4$  se alcanzan las mejores actividades tanto volumétrica como específica, lo que nos indica que para el medio de cultivo se puede trabajar con mayores concentraciones de sulfatos, o lo que es mejor con bajo contenido de sustrato, que en el caso del medio Postgate B se emplea lactato que es muy costoso.

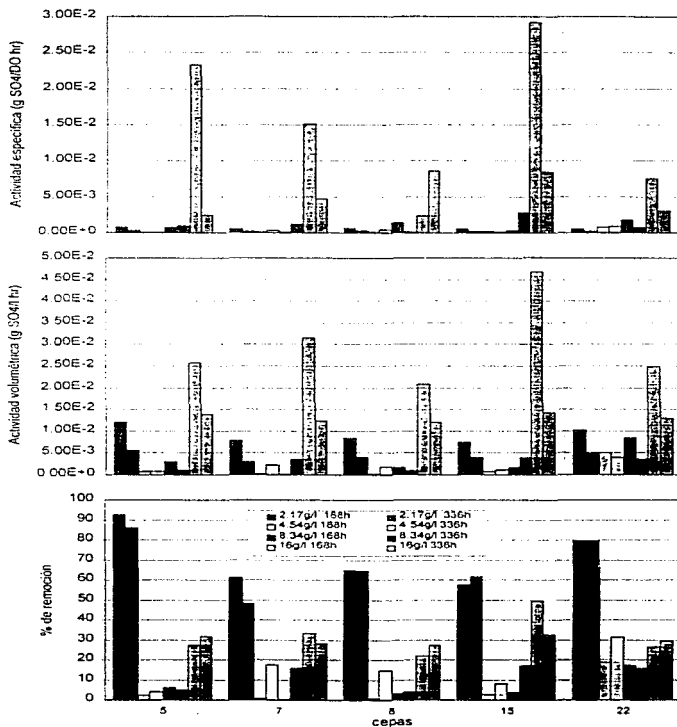


Figura 4.2.4 Efecto de la concentración en la remoción de sulfatos, la actividad volumétrica y específica.

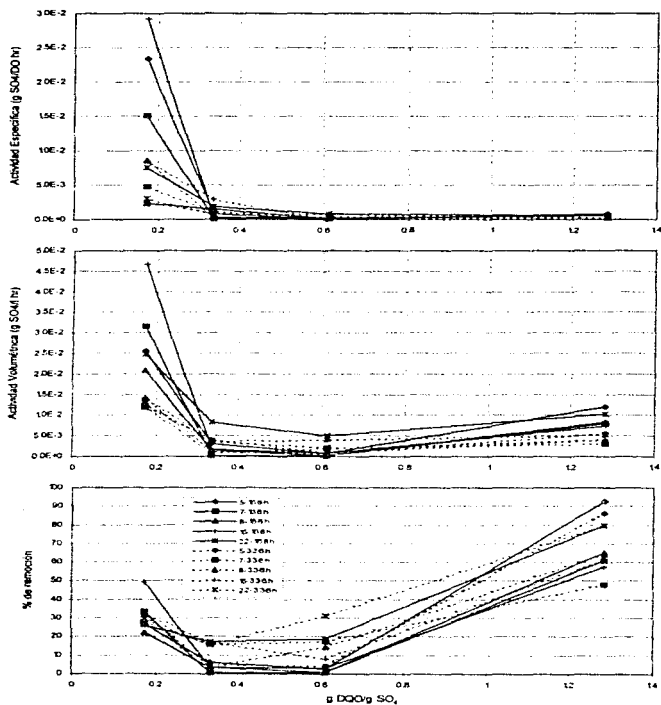


Figura 4.2.5 Porcentaje de remoción de sulfatos, actividad volumétrica y específica en función de la relación DQO/sulfato

#### 4.2.4. Efecto de la solución reductora.

El efecto de la concentración de la solución reductora fue muy diferente para cada una de las cepas. En la Figura 4.2.6 se presentan las remoción porcentual de sulfatos, y en la Figura 4.2.7 las actividades específica y volumétrica para las cinco cepas seleccionadas a tres niveles distintos de solución reductora (ver Apéndice C).

Como se puede observar en las gráficas, las cepas 5 y 22 lograron la mayor cantidad de azufre removido, donde la cepa cinco alcanzó valores de 85,3, 70,7 y 59,1% (para 100, 50 y 25% se solución reductora), mientras que los valores para la cepa 22 fueron de 79,8, 92,6 y 89,7% respectivamente. Las cepas 7 y 15 no obtuvieron buenos resultados, con un 7 y 6% de remoción respectivamente. Por otra parte, la cepa 8 removió un 41% con un 50% de solución reductora.

En general para casi todas las cepas se puede decir que la concentración de solución reductora no tiene un impacto importante en la actividad volumétrica y específica, con excepción de la cepa 8 donde aumenta y la 5 que disminuye considerablemente.

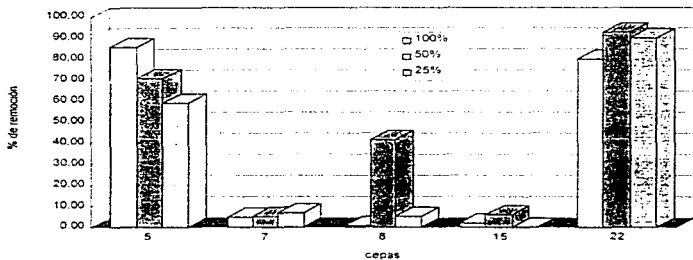


Figura 4.2.6 Remoción de sulfatos a distintas concentraciones de solución reductora.

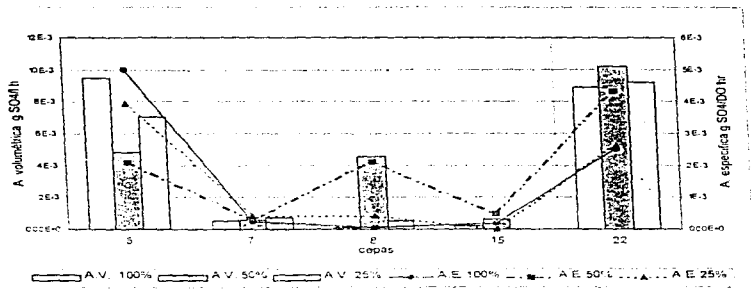


Figura 4.2.7 Actividad Especifica y Volumétrica a distintas concentraciones de solución reductora.

### 4.3. FORMULACIÓN Y SELECCIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO.

En la Tabla 4.3.1 se compara las remoción de sulfatos para las cinco cepas seleccionadas en cada uno de los medios. Las mejores remociones fueron para el medio Postgate B, y en general todas las cepas tuvieron un pobre desempeño para los medios propuestos pero también para el Postgate C; sin embargo para el medio ii-3 que contiene suero de leche y extracto de levadura las cepas tuvieron desde un 7 hasta un 33% de remoción, lo cual es bajo pero resalta la importancia de la presencia de extracto de levadura, que es una fuente importante de nitrógeno.

cepa	Porcentaje de remoción				
	Medio Postgate		Medio II		
	B	C	1	2	3
5	85.31	4.38	3.48	3.00	7.37
7	4.99	3.49	20.67	1.65	7.10
8	0.88	2.83	0.00	3.06	11.43
15	2.08	4.20	6.18	0.59	5.34
22	79.82	19.60	6.97	0.65	33.67

Tabla 4.3.1 Comparación de la capacidad sulfato-reductora de las cinco cepas en los medios diseñados contra medio Postgate B y C

Por lo que respecta a las actividades volumétrica y específica los valores obtenidos se muestran en las Tablas 4.3.2 y 3 respectivamente.

La actividad volumétrica es pobre y similar para las cepas 7,8 y 15 con valores de  $6.4 \times 10^{-4}$  gSO<sub>4</sub>/l\*hr en promedio. La cepa 22 tiene una mejor aceptación al medio Postgate C y para el medio propuesto ii-3 ( $5.32 \times 10^{-3}$  y  $3.05 \times 10^{-3}$  gSO<sub>4</sub>/l\*hr respectivamente) pero en ninguno de los casos mejor que el medio Postgate B.

La actividad específica tiene un comportamiento curioso, las cepas con bajo desempeño (7,8,15) alcanzan los mayores valores para el medio Postgate C y para las cepas 5 y 22 también se logran buenas actividades. Desafortunadamente, para los medios propuestos las actividades son muy bajas y casi nulas, lo que representa un gran problema en lo que se refiere al desarrollo de biomasa.



cepas	Actividad Volumétrica gSO <sub>4</sub> /l hr				
	Medio Postgate		Medio II		
	B	C	1	2	3
5	9.53E-3	1.18E-3	3.80E-4	3.12E-4	6.68E-4
7	5.57E-4	9.37E-4	2.25E-3	1.72E-4	6.43E-4
8	9.80E-5	7.59E-4	0.00E+0	3.19E-4	0.00E+0
15	2.33E-4	1.13E-3	6.74E-4	6.13E-5	4.84E-4
22	8.92E-3	5.32E-3	7.59E-4	6.74E-5	3.05E-3

Tabla 4.3.2 Comparación de la actividad volumétrica de las cinco cepas en los medios diseñados contra medio Postgate B y C.

cepas	Actividad Específica gSO <sub>4</sub> /DO hr				
	Medio Postgate		Medio II		
	B	C	1	2	3
5	5.01E-3	2.15E-3	5.17E-5	2.60E-5	1.18E-4
7	2.42E-4	6.37E-4	2.79E-4	1.48E-5	1.43E-4
8	6.30E-5	9.84E-4	0.00E+0	2.65E-5	0.00E+0
15	1.77E-4	3.86E-3	5.83E-5	5.63E-6	8.51E-5
22	2.51E-3	1.84E-3	8.17E-5	5.81E-6	4.60E-4

Tabla 4.3.3 Comparación de la actividad específica de las cinco cepas en los medios diseñados contra medio Postgate B y C.

Aunque los resultados obtenidos no sean satisfactorios como para emplear los medios a nivel industrial, estos son útiles ya que nos indican la línea a seguir en la formulación del medio de cultivo. El bajo desempeño obtenido se pudo deber:

- a) Inicialmente se propuso que las bacterias serían capaces de usar además del lactato de la leche, que se encuentra en bajas concentraciones (3%), los azúcares de la misma (lactosa) como fuente de carbono. Al parecer las bacterias no son capaces de usar estos azúcares. La solución a esto puede ser usar más suero de leche para aumentar la cantidad de lactato, pero esto tendría una repercusión

sión en los costos. Otra opción es investigar fuentes de carbono alternas semejantes al lactato, pero más comerciales, tales como el acetato.

- b) Como ya se mencionó anteriormente, la ausencia de extracto de levadura (fuente de nitrógeno) tiene una fuerte repercusión en el desempeño de las bacterias, pero principalmente en la actividad específica que es el parámetro que nos relaciona la cantidad de biomasa producida. Esto se debe a que el nitrógeno es de los principales constituyentes de las proteínas y estas del material celular. Se postuló la hipótesis de que las bacterias serían capaces de usar las proteínas presentes en el suero de leche. Con los datos obtenidos no se puede afirmar lo contrario, pero al parecer esta fuente de nitrógeno no es útil para este tipo de bacterias o tal vez no sea suficiente. Por lo anterior se propone el uso de otro tipo de fuentes de nitrógeno como podrían ser: harina de pescado, harina de soya ó hidrolizado de maíz, los cuales son ampliamente usados en biotecnología.

En la Tabla 4.3.4 se muestran los requerimientos de cada uno de los compuestos que constituyen los medios estudiados, así como su costo por litro. Cabe resaltar el hecho de que los compuestos que encarecen al medio son aquellos que no se pueden conseguir como reactivos industriales de ahí la importancia de buscar sustitutos. Como se puede ver el uso de cloruro de sodio encarece relativamente el medio, una posible solución es uso de agua de mar para sustituir algunas sales. Se debe de considerar la presencia de sulfatos los cuales son útiles en el desarrollo de los inoculos, no así en la etapa de biodesulfuración.

	Contenido por litro					Costo					Costo por kilo
	B	C	ii-1	ii-2	ii-3	B	C	ii-1	ii-2	ii-3	
Lactato de sodio (Solución 50%)	7 g	12 g	-	-	-	\$ 5.92	\$ 10.15	-	-	-	\$ 845.5 <sup>1</sup>
Suero de leche	-	-	6.37 g	6.37 g	6.37 g	-	-	\$ 0.02	\$ 0.02	\$ 0.02	\$ 3.0
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	4.5 g	-	-	-	-	\$ 0.01	-	-	-	\$ 1.9
CaSO <sub>4</sub>	1.0 g	-	1.0 g	1.0 g	1.0 g	\$ 0.01	-	\$ 0.01	\$ 0.01	\$ 0.01	\$ 10.9
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	-	0.06 g	-	-	-	-	\$ 0.00	-	-	-	\$ 3.4
Citrato de sodio	-	0.30 g	-	-	-	-	\$ 0.05	-	-	-	\$ 152.0 <sup>1</sup>
NH <sub>4</sub> Cl	1.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g	1.0 g	\$ 0.01	\$ 0.01	\$ 0.01	\$ 0.01	\$ 0.01	\$ 10.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	0.5 g	\$ 0.01	\$ 0.01	\$ 0.01	\$ 0.01	\$ 0.01	\$ 24.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5 g	0.5 g	2.0 g	2.0 g	2.0 g	\$ 0.00	\$ 0.00	\$ 0.02	\$ 0.02	\$ 0.02	\$ 8.6
NaCl	25 g	25 g	25 g	-	25 g	\$ 0.17	\$ 0.17	\$ 0.17	-	\$ 0.17	\$ 6.6
Extracto de levadura	1.00 g	1.00 g	-	-	1.00 g	\$ 0.40	\$ 0.40	-	-	\$ 0.40	\$ 398.0 <sup>1</sup>
Solución reductora	10.0 ml	10.0 ml	10.0 ml	10.0 ml	10.0 ml	\$ 0.27	\$ 0.27	\$ 0.27	\$ 0.27	\$ 0.27	
<b>TOTAL</b>						<b>\$ 6.79</b>	<b>\$ 11.06</b>	<b>\$ 0.50</b>	<b>\$ 0.34</b>	<b>\$ 0.90</b>	

Tabla 4.3.4 Costo de los medios de cultivos anaerobios (precios, Noviembre 1976)

<sup>1</sup> Disponible únicamente como reactivo analítico.

#### **4.4. PRUEBAS CON COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS.**

##### **4.4.1. Efecto del solvente.**

En las Figuras 4.4.1 y 4.4.2 se muestran los resultados de las pruebas efectuadas para seleccionar el tipo de solvente a ocupar.

El benceno resultó ser un excelente solvente para todos los compuestos pero no es soluble en agua lo que produce una emulsión que pudiera ser considerada para el estudio, pero tiene una gran efecto tóxico tanto en la cepa 5 como la 22, inhibiendo el crecimiento de un 82.35 para la cepa 5 y eliminando casi por completo la acción sulfato reductora para ambas cepas.

Todos los compuestos en dimetilformamida (DMF) presenta gran solubilidad

Se tiene conocimiento de estudios sobre el efecto de los solventes orgánicos en sistemas enzimáticos, en la Figura 4.4.3 se muestran varios solventes miscibles en agua así como su efecto sobre la actividad específica en sistemas enzimáticos, se puede observar que las mejores actividades se logran con solventes más polares, como se puede ver en la figura a, donde el se muestran los solventes de acuerdo a su polaridad, medida por el índice Dimoth-Richard  $E_T(30)$ .

Aunque nuestro sistema difiere al presentado nos sirve como una buena aproximación y nos da las bases para proponer al etanol como solvente a emplear. Se debe tener en cuenta que no es lo mismo el efecto que pudiera tener el solvente en un sistema meramente bioquímico como es el caso de los sistemas enzimáticos y el efecto tóxico en sistemas vivos como es nuestro caso.

Tomando en cuenta lo anterior y basados en los estudios realizados se propone usar etanol por su polaridad y su efecto relativamente poco tóxico en los microorganismos.

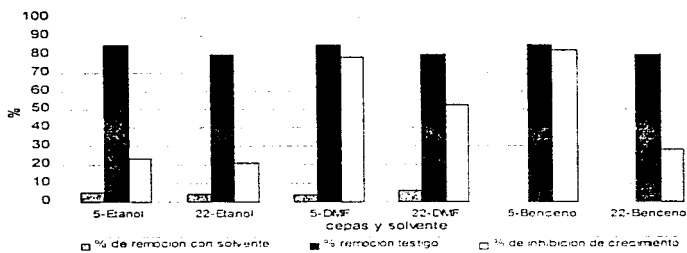


Figura 4.4.1. Efecto de tres solventes en la remoción de sulfatos y en el crecimiento

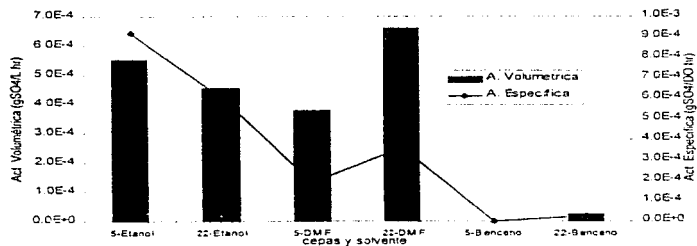


Figura 4.4.2. Efecto de tres solventes en la actividad volumetrica y especifica.

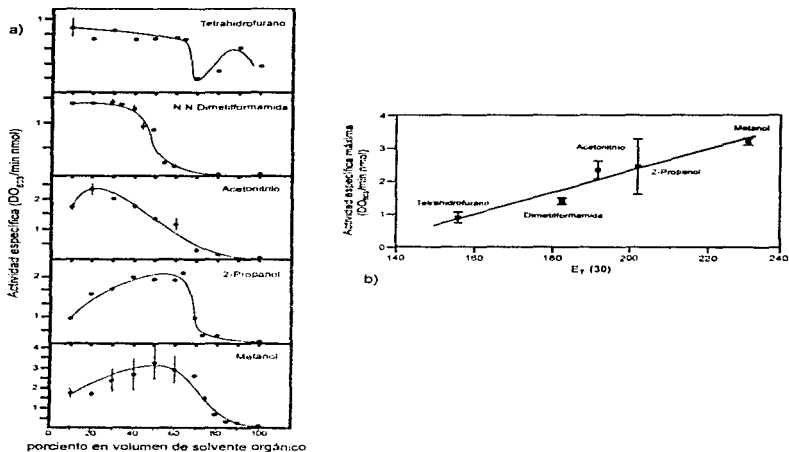


Figura 4.4.3 Efecto de varios solventes orgánicos solubles en agua sobre la actividad específica en sistemas enzimáticos. (Vázquez-Duhait *et al.* 1993)

#### 4.4.2. Compuestos organosulfurados.

Tal vez sea aventurado extrapolar la actividad sulfato-reductora de las bacterias a compuestos organosulfurados, tomando en cuenta que en el caso de compuestos cíclicos no podemos hablar de estados de oxidación, sin embargo existen reportes de bacterias sulfato-reductoras que pueden usar compuestos organosulfurados como único aceptor de

electrones (Lizama et al. 1995), y la prueba de la reducción del azufre orgánico es la producción de  $H_2S$ , donde el azufre se encuentra en su máximo estado de reducción.

En la Tabla 4.4.1 y la Figura 4.4.4 se muestran los resultados obtenidos de la degradación de los compuestos organosulfurados propuestos. Se muestra la densidad óptica que nos da un indicio de la cantidad de biomasa desarrollada, y la producción de ácido sulfídrico que nos da una medida indirecta de la actividad sulfato reductora. Se muestra también, de manera cualitativa la degradación de los compuestos organosulfurados.

	5			7			8			15			22		
	DO	H <sub>2</sub> S mmol	DEG	DO	H <sub>2</sub> S mmol	DEG	DO	H <sub>2</sub> S mmol	DEG	DO	H <sub>2</sub> S mmol	DEG	DO	H <sub>2</sub> S mmol	DEG
Dibenzotiofeno	0.073	0.0818	+	0.108	0.0742	+	0.215	0.0024	-	0.114	0.061	+	0.112	0.0553	+
Sulfuro de difenilo	0.007	0.01	+	0.009	0.0102	+	0.01	0.0104	+	0.005	0.0166	-	0.005	0.0104	+
Tiofeno	0.022	0.175	+	0.041	0.1819	+	0.038	0.1897	+	0.028	0.1025	-	0.031	0.1506	+
Disulfuro de dibenzilo	0.040	0.0674	+	0.33	0.0599	+	0.056	0.0587	+	0.056	0.0578	+	0.032	0.0101	+
Etimercaptano	0.022	0.0275	+	0.041	0.0264	+	0.038	0.2239	+	0.028	0.0254	-	0.01	0.0375	+
Testigo	0.092	0.0134	-	0.033	0.1015	-	0.028	0.1104	+	0.031	0.0616	+	0.081	0.0781	+

Tabla 4.4.1 Degradación de compuestos organosulfurados (DEG Degradación + positivo, - negativo)

Como se puede observar en la Figura 4.4.4 los mejores crecimientos se lograron en todos los casos en presencia de dibenzotiofeno, seguido este por disulfuro de dibenzilo, y por su parte la mayor cantidad de  $H_2S$  producido fue para el tiofeno seguido de dibenzotiofeno y disulfuro de dibenzilo.

De lo anterior podemos proponer que los microorganismos tiene mayor afinidad al azufre presente dentro de anillos aromaticos, como es el caso del tiofeno y dibenzotiofeno.

En la Figura 4.4.5 se muestran los compuestos desulfurados y las reacciones propuestas, degradadamente en este momento no se cuenta con análisis cualitativos para poder corroborar esto, pero partiendo de los resultados reportados en la literatura se puede decir que es una buena aproximación.

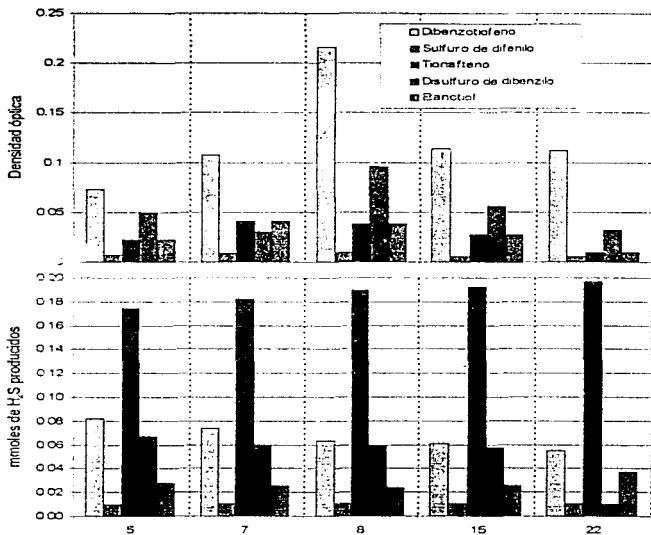


Figura 4.4.4 Crecimiento y producción de H<sub>2</sub>S con los cinco compuestos seleccionados. (NOTA: Se omiten los datos de el testigo debido a la magnitud de los mismos)



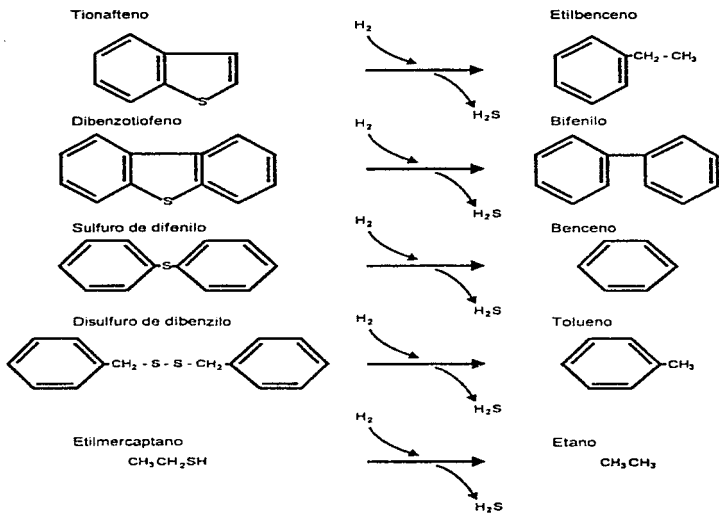


Figura 4.4.5 Reacciones de desulfuración propuestas.

#### 4.5. ESCALAMIENTO A FERMENTADOR DE 5 LITROS.

##### 4.5.1. Caracterización del combustóleo.

En la Tabla 4.5.1 se muestran las características del combustóleo usado en las pruebas. Se puede observar que contiene un alto contenido de níquel y vanadio (5.54 y 311 ppm respectivamente) siendo estos elementos inhibitorios para muchos microorganismos, lo que resulta una variable a superar. Por otra parte el contenido de azufre fue de 4.33 %, dicho contenido varía de acuerdo a las condiciones y al tiempo por lo que se caracterizó el combustóleo cada vez que se hicieron pruebas.

determinación	resultado	norma usada
cenizas % en peso	0.274	ASTM D 482-91
visc. s.s.f @ 37.8 °c	2110	ASTM D 87-88
visc. s.s.f @ 50 °c	700.4	ASTM D 87-88
visc. s.s.f @ 60 °c	306.1	ASTM D 87-88
visc. s.s.f @ 82.2 °c	78.36	ASTM D 87-88
visc. s.s.f @ 98.9 °c	40.59	ASTM D 87-88
azufre % en peso	4.33	ASTM D 1552-90
v. calorífico kcal/g	10.151	ASTM D 3286-91a
v. calorífico neto kcal/g	9.832	ASTM D 3286-91a
p. específico @ 20/4 °c	0.999	ASTM D 70-86
temp. de ignición °c	197	ASTM D 92-85
carbón % en peso	84.91	ASTM D 5373-93
hidrógeno % en peso	10.25	ASTM D 5373-93
nitrógeno % en peso	0.37	ASTM D 5373-93
oxígeno % en peso	0.14	ASTM D 5373-93
níquel ppm	5.54	
potasio ppm	4.17	
sodio ppm	15.45	
vanadio ppm	311	
hierro ppm	4.99	
cobre ppm	menos 1.0	
calcio ppm	6.82	
magnesio ppm	0.55	
cloruros ppm	0.12	

Tabla 4.5.1 Análisis de combustóleo proveniente de la refinería de Tula (Instituto de Investigaciones Eléctricas)

#### 4.5.2 Biorreducción de combustóleo.

En la Figura 4.5.1 se muestra el comportamiento de la producción de sulfhídrico durante la biorreducción. Se puede observar que se tiene una cantidad inicial debido al inoculo, y esta baja drásticamente y se recupera hasta alcanzar un máximo entre las 72 horas decayendo nuevamente. Estos datos serán útiles para calcular una cinética y posteriormente hacer el diseño del reactor.

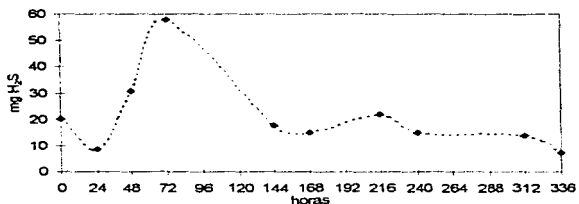


Figura 4.5.1 Producción de ácido sulfhídrico en el proceso de biorreducción.

En la Tabla 4.5.2 se muestran los resultados de una prueba de biorreducción de combustóleo. Se observa que se alcanza una remoción del 11.3 % a las 168 hrs y de 25.12% a las 336 hrs dichos valores aún no satisfactorio para cumplir con los requerimientos internacionales (1% de azufre) pero nos dan la pauta para saber por donde continuar el proyecto

Por lo que respecta al poder calorífico se presenta una disminución (9 al 12.8 %). Esto se puede deber :

- Al romperse la emulsión quede cierta cantidad de agua emulsionada en el combustóleo.
- Por usarse un sistema de calentamiento (autoclave) para romper la emulsión exista una degradación térmica de algunas moléculas.
- Los microorganismos empleen a los hidrocarburos como fuente de carbono.

Esta última explicación es poco probable ya que las moléculas de hidrocarburos presentes en el combustóleo son muy complejas y difíciles de romper. De cualquier forma, basándose en las dos primeras explicaciones, pareciera ser que la solución se encuentra en la ruptura de la emulsión, por lo que se recomienda hacer estudios sobre esto. Una posible alternativa sería el uso de ácido ó alcali.

Parámetro	Combustóleo sin emulsionar	Testigo (combustóleo sin inóculo)	Combustóleo sometido al proceso
Contenido de azufre (%)	3.94% 3.94%	3.85%	3.53% 168 hrs 2.98% 336 hrs
Capacidad calorífica	10.13 Kcal/g	9.94 Kcal/g	8.276 Kcal/g 160 hrs 9.2 Kcal/g 336 hrs
Remoción de azufre (%)	-	3.26%	11.3% 168 hrs 25.12% 336 hrs
Disminución de la capacidad calorífica (%)	-	1.97%	12.83% 168 hrs 9.18 336 hrs

Tabla 4.5.2 Resultados de una biodesulfuración de combustóleo

## CAPÍTULO 5

### 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

La biodesulfuración del combustible por la vía reductiva resulta una alternativa interesante ante la deshidrodésulfuración catalítica ya que reduce significativamente el consumo energético del proceso, pero representa un gran reto tecnológico tanto en el área de ingeniería química como biotecnológica. Los costos del proceso tendrán un impacto sobre el costo del combustible pero éste, una vez tratado, podrá ser vendido a un mejor precio. Este incremento no debe ser mayor que el sufragado al aplicar el proceso químico (hidrodésulfuración) o el de equipos de control (lavadores de gases) a la salida de los equipos de combustión. A continuación se presentan las conclusiones del presente estudio, así como las recomendaciones para trabajos posteriores.

#### 5.1 CONCLUSIONES

Las cepas seleccionadas para el proceso fueron : 5, 7, 8, 15, y 22 debido a que presentaron la mejor actividad sulfato-reductora.

Con respecto al efecto de la temperatura se observó que las cepas seleccionadas son de tipo mesófilo, por lo que se propone una temperatura de operación de 35°C. Algunas cepas (7 y 22) presentaron potencial para desarrollarse a 28°C, lo que puede reflejarse como una disminución en los costos de calentamiento.

El mejor valor de pH fue de 7 para todos los casos. Las mejores actividades específicas se obtuvieron para un valor de pH de 8. Por lo que se recomienda usar un pH de 7 para el proceso y un valor de pH de 8 para el desarrollo de los inoculos, donde se busca tener la mayor cantidad de biomasa posible.

Para relaciones menores de 0.2 gDQO/gSO<sub>4</sub> las cepas seleccionadas alcanzan las mejores actividades tanto volumétrica como específica, lo que nos indica que para el medio de cultivo se puede trabajar con mayores concentraciones de sulfatos, o lo que es mejor con bajo contenido de sustrato, que en el caso del medio Postgate B se emplea lactato que es muy costoso.

En general para casi todas las cepas se puede decir que la concentración de solución reductora no tiene un impacto importante en la actividad volumétrica y específica, con excepción de la cepa 8 donde aumenta y la 5 que disminuye considerablemente.

Por lo que concierne al medio de cultivo el que tuvo el mejor desempeño fue el Postgate B, aunque los resultados obtenidos no sean satisfactorios como para emplear los medios a nivel industrial, estos son útiles ya que nos indican la línea a seguir en la formulación del medio de cultivo.

Se observó que todas las cepas seleccionadas tienen mayor afinidad por el azufre presente dentro que los ciclos de las moléculas que el azufre lineal.

El proceso es capaz de realizar la desulfuración de combustóleo reduciendo el contenido de azufre hasta un 25.12%, pero esto lleva consigo un tiempo de 336 hrs y una disminución en la capacidad calorífica del 9.2%.

La máxima producción de ácido sulfhídrico se logra a las 72 horas de proceso.

## 5.2 RECOMENDACIONES

Actualmente se desconoce qué géneros y especies de bacterias están involucradas en las muestras recolectadas. Debido a la naturaleza de las cepas muy posiblemente se trata de consorcios de microorganismos, si bien es evidente que los principales

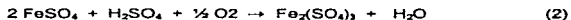
microorganismos involucrados en los cultivos estudiados son bacterias sulfato-reductoras; es posible la presencia de bacterias metanogénicas, las cuales, en las condiciones propicias pueden competir con las BSR por los sustratos. Por estos motivos es útil realizar estudios sobre producción de H<sub>2</sub>S contra producción de metano, para establecer las condiciones a evitar.

Se propone realizar estudios para posibles mejoras genéticas de las copas.

En el presente trabajo se buscó sustituir los componentes caros del medio de cultivo (Postgate B), para lo cual se empleó suero de leche como sustituto de la fuente de carbono y nitrógeno. Esta sustitución no fue exitosa, ya que no se cumplió la cantidad de nitrógeno requerido, por ésta razón se proponen otras fuentes de nitrógeno tales como: harina de pescado, harina de soya, e hidrolizado de maíz.

Es conveniente hacer análisis cuantitativos y cualitativos de los compuestos azufrados presentes en el combustible, ya que dada la complejidad del mismo, no se cuenta con datos precisos sobre que tipo de compuestos se presentan ni en que proporción. Así como análisis cualitativos de los compuestos azufrados estudiados y sus moléculas desulfuradas, para poder establecer de esta manera los mecanismos de reacción.

Es importante considerar los residuos del proceso, por eso se deben hacer estudios para la tratar las emisiones de ácido sulfhídrico producido. Siendo una posible solución, siguiendo la línea biológica, su adsorción y oxidación a azufre elemental con sulfato ferroso y la recuperación de este último por microorganismos (*thiobacillus ferroxidans*, por ejemplo) capaces de transformar el sulfato ferroso a férrico. (Asai *et al.* 1990)



Al romperse la emulsión de combustible-agua, la fase acuosa resultante se encuentra con un alto contenido de carga orgánica por lo que esta deberá ser tratada antes de poder volver a usarla ó en su caso desecharla

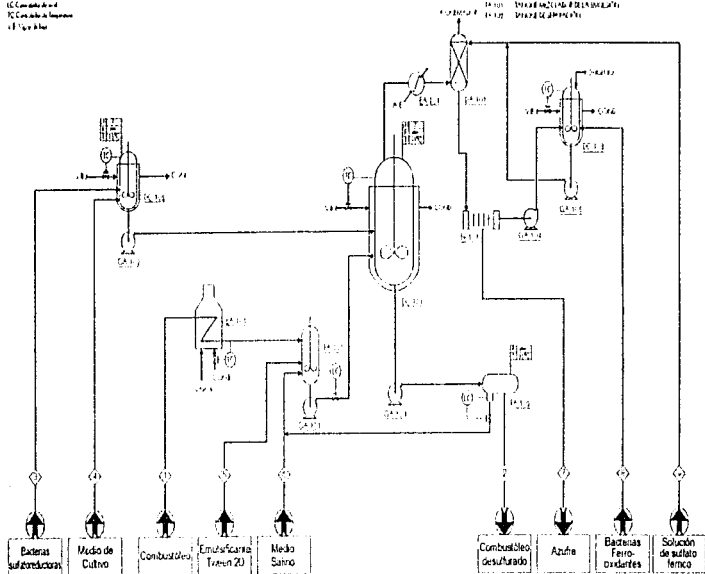
Como se pudo observar el sistema propuesto presenta el grave problema de la disminución de la capacidad calorífica, por lo que se recomienda hacer pruebas para buscar la mejor forma de romper la emulsión con un mínimo deterioro de la capacidad calorífica . Para ello, habrá que optimizar el sistema de separación agua-aceite, además de considerar la posibilidad de reciclar el agua de emulsión previo análisis de las consecuencias que esto acarrearía.

Las conclusiones y recomendaciones que se plantean en el presente trabajo se resumen en el diagrama de flujo de proceso ( Figura 5.1.1). Aunque con los datos actuales todavía no nos es posible definir el flujo de las corrientes y tampoco los balances de materia y energía correspondientes, se considera que el diagrama de flujo propuesto será de gran utilidad en el desarrollo de este proyecto.



Componente	Cantidad	Unidad	Material	Altura	Diámetro	Temperatura	Presión	Estado	Observaciones
1	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
2	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
3	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
4	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
5	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
6	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
7	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
8	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
9	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
10	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
11	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
12	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
13	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
14	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
15	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
16	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
17	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
18	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
19	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	
20	1	m	304	1.5	0.5	100	1	1	

A1: Tipo de válvula  
 C: Control manual  
 CC: Control automático  
 TC: Control de temperatura  
 S: Tipo de sensor



### LISTA DE EQUIPO

ITEM	DESCRIPCIÓN
01-01	REACTOR
01-02	REACTOR DE OXIDACIÓN
01-03	REACTOR DE OXIDACIÓN
01-04	REACTOR DE OXIDACIÓN
01-05	REACTOR DE OXIDACIÓN
01-06	REACTOR DE OXIDACIÓN
01-07	REACTOR DE OXIDACIÓN
01-08	REACTOR DE OXIDACIÓN
01-09	REACTOR DE OXIDACIÓN
01-10	REACTOR DE OXIDACIÓN
01-11	REACTOR DE OXIDACIÓN
01-12	REACTOR DE OXIDACIÓN

BOLETA DE CALIFICACIÓN DE COMBUSTIBLES		INSTITUTO DE INGENIERIA, UNAM	
PROCESO DE CALIFICACIÓN DE COMBUSTIBLES		ESTADÍSTICA DE CALIFICACIÓN DE COMBUSTIBLES	
PROCESO DE CALIFICACIÓN DE COMBUSTIBLES		ESTADÍSTICA DE CALIFICACIÓN DE COMBUSTIBLES	
1	2	3	4
5	6	7	8
9	10	11	12
13	14	15	16
17	18	19	20
21	22	23	24
25	26	27	28
29	30	31	32
33	34	35	36
37	38	39	40
41	42	43	44
45	46	47	48
49	50	51	52
53	54	55	56
57	58	59	60
61	62	63	64
65	66	67	68
69	70	71	72
73	74	75	76
77	78	79	80
81	82	83	84
85	86	87	88
89	90	91	92
93	94	95	96
97	98	99	100

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Alvarez T., (1983) "Recopilación de métodos y medios de cultivo para el aislamiento, cuantificación y determinación de la actividad bioquímica de los microorganismos del Ciclo de Azufre", Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, p. 6-14.
2. American Society of Testings and Materials, Standar Specification of Fuel Oils. 1986.. (D-396-86)
3. APHA,AWWA y WPCF (1989) Standar Methods for the examination of Water and wastewater", 17ª edición . Washinton D.C.
4. Aragón P., Romero J. y Jiménez B. (1996), "Desulfuración del combustible mexicano por vía biológica", *X Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental*, disco 4, archivo XCNIS148, Toluca, Mexico, Febrero 1996
5. Asai S., Konishi Y., Yabu T.,(1990), "Kinetics of Absorption of Hydrogen Sulfide into Aqueous Ferric Sulfate Solutions", *AIChE Journal*, **36**(9), p. 1331-1338
6. Bos P. y Robertson L.A., (1996) "Microbiology of sulphur removal", En: *Advanced course of process design in eniromental Biotechnology.*, Institute for Biotechnology Studies, Delft p. 2-35
7. Campbell I.M., (1993) "Catching the fossil fuel biodesulfurization wave", *Chemtech*, p. 43-46
8. Franco S.A., (1996) Comunicado personal. "Respuesta a la información solicitada sobre características y de Precios combustibles mexicanos " *Pemex Refinación, Subdirección Comercial, Cuernavaca, Mor. México*. Comunicado personal pemex
9. Cuadri G. y Sanchez L.R.,(1994), *La Ciudad de México y la Contaminación Atmosferica*, LIMUSA, México D.F.
10. Díaz R., (1996), " Equipos de combustión de lecho fluidizado ", Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 1996
11. ElSawy A. y Gray D., (1991), "A critical review of biodesulphurization systems for removal of organic sulphur from coal.", *Fuel*, **70**: 591-594

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

12. Finnerty W.R., K. Shockley y H. Attaway (1992) "Microbial desulfurization and denitrogenation of hydrocarbons" *Microbial enhanced oil recovery.*, p 83-91.
13. Hartdegan F.J., Coburn J.M. y Roberts R.L. (1984) "Microbial Desulfuration of Petroleum", *Chem. Eng. Progress*, **80**, p. 63-67
14. Hastings K.H. y van Driesen R.P., (1988), "Hidrodesulfuración de fracciones de aceite crudo de petróleo y productos de petróleo." *Tecnología del Petróleo. D.M. Considine (Edit) Publicaciones Marcombo*. México., p. 2-289 - 2-303.
15. Ivanov M.V.,(1983) "Mayor fluxes of the global biogeochemical cycle of sulfur". En: The global biochemical sulfur cycle, J Wiley & Sons, p. 449-463
16. Juárez R., Rodríguez A., Torres L.G., y Jiménez B., (1996), "Characterization of mexican native strains with sulphate-reducing activity and their application to the removal of sulphur from fuel oils", sometido para su publicación a *Letters in Applied Microbiology*.
17. Kim B.H., Kim H.Y., Kim T.S. y Park D.H., (1995), "Selectivity of desulfurization activity of *Desulfovibrio desulfuricans* M5 on different petroleum products", *Fuel Processing Technology*, **43**, p. 87-94.
18. Kim H.Y., Kim T.S. y Kim B.H., (1990) "Degradation on organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl an hydrogen sulfide" *Biotechnol. Lett.*, **12**, p. 761-764,
19. Kim H.Y., Kim T.S. y Kim B.H., (1990), "Petroleum desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M5 using electrochemically supplied reducing equivalent", *Biotechnol. Lett.*, **12**, p. 757-760.
20. Lizama H.M., Wilkins L.A. y Scott T.C., (1995), "Dibenzothiophene sulfur can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria", *Biotechnol. Lett.*, **17**, p. 113-116.
21. Longoria R., (1995) Comunicación personal. "Reporte del análisis de una muestra de combustible proveniente de la refinería de Tula, Hidalgo." *Instituto de Investigaciones Eléctricas. Cuernavaca, Mor. México*.
22. Manriquez L., Moreno A. y Anaya C.G., (1991) "Assays for important Mexican crudes updated." *Oil and gas Journal*, marzo 4 de 1991, p 45-48.

23. Midgley D. y Torrance K., (1991), Potenciometric Water Analysis., 2ª edición, *John Wiley & sons*.
24. Monticello J.J., y Fennerty W.B. (1985) , "Microbial desulfurization of fossil fuels", *Ann. Rev. Microbiol.*, **39**, p. 371-389
25. Monticello D.J. (1994) "Biocatalytic desulfurization ". *Hydrocarbon Processing*, **12(1)** ,p. 39-45.
26. Monticello D.J., (1993) "Biocatalytic desulfurization of petroleum and middle distillates". *Environmental Progress*, **12(1)** ,p. 1-4.
27. ONU, OMS, OPS (1982) "Criterios de Salud Ambiental No 8; Óxidos de Azufre y Partículas en Suspensión". Publicación científica No. 424,
28. Pfafflin J.R. y Ziegler E.N., (1992) "Fossil Fuel Cleaning Process", *Encyclopedia of Environmental Science and Engineering* , Gordon and Breach Science Publishers, 3a de., p. 412-425
29. Postgate J. R. (1984). "The sulphate-reducing bacteria". *Cambridge University Press, Cambridge*,
30. R.E. Johnstone y Thring M.W.,(1957), Pilot Plant Models and Scale Up Methods, McGraw-Hill, Nueva York
31. Rodríguez A., Torres L.G., Juárez R. y Jiménez B., (1996). "The effect of COD/sulfate ratio over the activity of five sea sediment-Isolates with high sulfate-reducing capabilities", sometido para su publicación a *Letters in Biotechnology*.
32. Schwartz R.D. y W.W. Leathen (1991) Petroleum microbiology. En : Industrial Microbiology. Miller B.M. y W. Litzky (Edit). *Mc Graw Hill*, Nueva York, EUA, Capitulo 13, pag 384-411
33. Secretaría. de Energía, Minas e Industria Paraestatal (1994) Balance Nacional Energía 1994.
34. Skoog D.A., West D.M. (1989), Análisis Instrumental, *Mc.Graw Hill*, 2a. Ed.
35. Speece R.E. (1996) "Anaerobic Biotechnology for Industrial Wastewaters" *Vanderbilt University, Archae Press*, p. 297-317

36. Vázquez-Duhalt R., Westlake D.W.S. y Fedorak P.M., (1993), "Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides", *Enzyme Microbiol. Technol.*, **15**, p. 494-499
37. Visser A.,(1995), "The anaerobic treatment of sulfate containing wastewater" Tesis de doctorado, Wageningen Agricultural University, Wageningen, The Netherlands
38. Widdel F. y F. Bak (1991) "Gram-negative mesophilic sulfate -reducing", en: *The Prokariotes, a Handbook on the Biology of Bacteria.*, Springer-Verlag, p. 3352-3377
39. Winkler M.A.,(1990) , Chemical Engineering Problems in Biotechnology, *Elsevier*
40. Zamora E. (1997), "Preparación de una emulsión de combustóleo en agua para su desulfuración por vía biológica", Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México,

**Apéndice A****MEDIOS Y TÉCNICAS DE CULTIVO**

La metodología empleada para el cultivo de los microorganismos se basó, retomando los estudios de Kim *et al.* (1990) y Lizama *et al.* (1995), en las técnicas de cultivo para bacterias sulfato-reductoras, mesofílicas y gram-negativas descritas por Widdel y Bak (1991). En este apéndice se describen las técnicas usadas.

**CULTIVO DE BACTERIAS SULFATO REDUCTORAS**

Las bacterias sulfato reductoras crecen bajo condiciones reductoras y anóxicas. Si se inocula en un medio que contenga oxígeno, únicamente los cultivos frescos de algunas especies robustas podrán desarrollarse. Si la cantidad de inoculo no es muy pequeña, se producirá suficiente sulfhídrico para desplazar al oxígeno, aunque el sulfuro aumenta la toxicidad del O<sub>2</sub>, especialmente si se presenta al final en exceso (Cypionka *et al.*, 1985).

Se recomienda remover el O<sub>2</sub> desplazándolo con N<sub>2</sub> antes de la inoculación, con esto se elimina el peligro de daño celular y facilita la iniciación de crecimiento.

La remoción de oxígeno por medios físicos no siempre es suficiente, especialmente para especies con crecimiento lento, o con pequeñas cantidades de inoculo. Para estos casos es necesario añadir una solución reductora.

Las soluciones reductoras<sup>1</sup> mas empleadas para el cultivo de bacterias sulfato-reductoras son:

- Ascorbato (dehidroascorbato/ascorbato) E'' = 0.058 V
- Tioglicolato (disulfuro de tioglicolato/tioglicolato) E'' = -0.14 V
- Sulfuro (S<sup>2-</sup>/H<sub>2</sub>S) E'' = -0.243 V

---

<sup>1</sup> Los potenciales redox estan calculados a un pH de 7.0

- Disulfuro ( $2\text{SO}_3^{2-}/\text{S}_2\text{O}_4^{2-}$ )  $E'' = -0.29 \text{ V}$  es relativamente tóxico y solo se usa en bajas concentraciones (0.1 a 0.2 mM)
- Cisteína (cistina/cisteína)  $E'' = -0.325$  frecuentemente se usa en el cultivo de metanogénicos.

En este trabajo se empleó una solución de tioglicolato y ácido cítrico.

En los procesos fermentativos por lote (*batch*) el crecimiento celular tiene el comportamiento descrito en la Figura A.1. La duración de cada una de las etapas dependerá principalmente de la cantidad inicial de biomasa (inoculo).

Por criterio eurístico, en biotecnología, usualmente se ocupa entre un 5 y un 10% de inoculo.

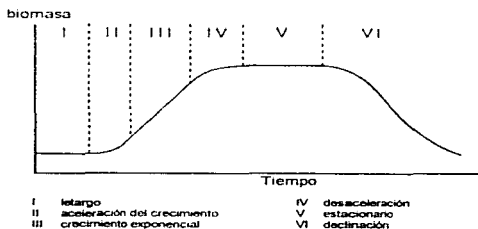


Figura A.1 Curva de crecimiento *batch* con seis fases. (Quintero 1981)

## MEDIOS DE CULTIVO

Postgate (1984) ha desarrollado un gran número de medios de cultivo para diversas especies de bacterias sulfato reductoras. Por su parte Kim (1990) emplea medio Postgate C y Lizama (1995) una variante de Postgate B. Widdel y Bak (1991) mencionan que los medios de lactato han sido usados exitosamente en el cultivo de las bacterias sulfato-

reductoras "clásicas" *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*. El lactato sirve como donador de electrones y fuente de carbono. Los fosfatos presentes funcionan como buffer.

El medio API se usó para mantener un stock de las cepas, el cual debe de ser renovado cada 3 meses (Aragón *et al.* 1996).

En la Tabla A.1. se enlistan los componentes de los medios Postgate B, C y API. Las sales no se deben mezclar antes de su disolución para evitar la formación de precipitados. Se deben añadir sucesivamente al agua con agitación. El pH se ajusta a 7.2 aproximadamente y se esteriliza a 120°C durante 15 minutos en una autoclave.

Tanto la solución de  $\text{FeSO}_4$  como la reductora se esterilizan aparte y bajo una atmósfera de  $\text{N}_2$ , añadiéndolas posteriormente al medio y regulado el pH en condiciones asépticas.

MEDIO	POSTGATE		API
	B	C	
Agua destilada	1 L	1 L	1 L
Lactato de sodio (Solución 50%)	5.5 mL	9.5 mL	-
Acetato de sodio	-	-	4 g
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-	4.5 g	-
$\text{CaSO}_4$	1.0 g	-	-
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	-	0.06 g	-
Citrato de sodio	-	0.3 g	-
Ácido ascórbico	-	-	0.1 g
$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	0.1 g
$\text{NH}_4\text{Cl}$	1.0 g	1.0 g	-
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5 g	0.5 g	-
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	-	-	0.01 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g	0.5 g	0.2 g
$\text{NaCl}$	25 g	25 g	10 g
Extracto de Levadura	1.0 g	1.0 g	1 g
Solución de $\text{FeSO}_4$	10 mL	0.08 mL	-
Solución reductora	10 mL	10 mL	-

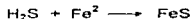
Tabla A.1. Composición del medio Postgate B,C y API

Solución Reductora:  
 Agua destilada 10 mL  
 Tioglicolato de sodio 0.1 g  
 Ácido ascórbico 0.1 g

Solución de  $\text{FeSO}_4$  :  
 Agua destilada 10 mL  
 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.5 g



Las bacterias sulfato-reductoras desprenden ácido sulfhídrico como parte de su metabolismo en cual forma un precipitado negro debido a la presencia de Hierro en el medio (A). Esta propiedad es útil como un indicador de la actividad celular, pero en algunos casos se evita el uso de la solución de Hierro ya que enturbia el medio e impide realizar mediciones acertadas del crecimiento celular via turbidímetro o espectro.



### TÉCNICAS DE CULTIVO

El cultivo de microorganismos anaerobios presentan la problemática de tener que mantener condiciones anóxicas todo el tiempo. Existen varias técnicas de cultivo, ya sea en medio sólido (agar), empleando jarraras anaerobias ó tubos sellados con parafina y en medio líquido en matraz o botellas vial. En cualquiera de los casos se debe de mantener una atmósfera reducida, libre de oxígeno y es indispensable que los recipientes se encuentren sellados.

Se trabajó en medio líquido usando las técnicas de crecimiento en viales y matraces las cuales se describen a continuación.

#### *Crecimiento en viales*

La técnica de cultivo en viales es ampliamente usada para sistemas anóxicos, debido a que es mas seguro mantener una atmósfera libre de oxígeno por el sello de hule que a su vez es reforzado por un anillo metálico. Este sistema se empleó para mantener un stock de microorganismos y para algunas pruebas.

Se usaron botellas viales de 150 mL de capacidad, de los cuales se ocupan únicamente 100 mL de medio.

Las botellas se llenan con el medio, sin solución reductora ni de  $\text{FeSO}_4$  (para el caso de Postgate) y se sellan. Con una aguja hipodérmica se le inyecta nitrógeno mientras que con otra se extrae el aire presente en el espacio libre del frasco. (ver Figura A, 1)

Las botellas se esterilizan en una autoclave (120°C , 15 minutos). Una vez estériles se añade las soluciones reductora y de fierro (para los medios Postgate) con una jeringa. De la misma forma de inocula. Todo bajo condiciones asépticas.

Como ya se menciona, esta técnica es muy útil cuando se quiere garantizar condiciones anóxicas y es muy práctica para tomar muestras, pero tiene el inconveniente del volumen manejado y del control de las condiciones una vez sellado el vial.

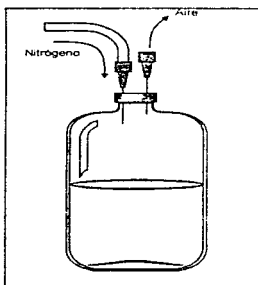


Figura A.2. Pruebas en viales

#### ***Crecimiento a nivel matraz***

Se trabajó con matraces Erlenmayer de 250 mL con tapón hermético de hule con tubos de vidrio que funcionan como entrada y salida de gas (ver figura A.1). El volumen de trabajo en los matraces fue de 100 mL.

Los matraces se llenan con el medio sin fierro ni solución reductora y se cierran con tapones de algodón para su esterilización. Se esteriliza en una autoclave por 15 minutos a 120°C. Una vez fríos se añade la soluciones de fierro y reductora. Posteriormente el inoculo.

Los matraces se sellan con los tapones y estos a su vez con cinta de parafina. Se inyecta nitrógeno por el tubo que esta en contacto con el medio líquido y una vez desplazado el oxígeno presente se cierran ambos tubos con pinzas.

Se midió el sulfuro de hidrógeno formado desplazándolo con nitrógeno y burbujearlo en una solución buffer antioxidante y midiéndolo con un electrodo de ion selectivo.\*

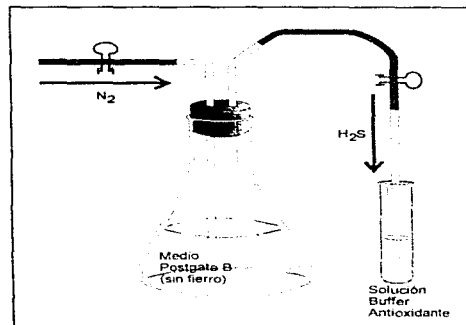


Figura A.3 Sistema empleado para las pruebas a nivel matraz.

La técnica de cultivo en matraz tiene la ventaja, a diferencia de las pruebas en vial, de ser más práctica para la toma de muestras del sulfídrico producido.

\* ver apéndice C

## Apéndice B

### TÉCNICAS ANALÍTICAS

#### MÉTODO GRAVIMÉTRICO PARA DETERMINAR SULFATOS, CON SECADO DE RESIDUO

La presente técnica fue tomada del método 4500-SO<sub>4</sub> Standard Methods y modificado de acuerdo a las muestras analizadas. La metodología se describe a continuación:

- 1 Procedimiento
  - a. *Principio*: El ión sulfato es precipitado como sulfato de bario (BaSO<sub>4</sub>) en una solución de ácido clorhídrico al añadir cloruro de bario (BaCl<sub>2</sub>).
  - b. *Interferencias*: La determinación de ión sulfato esta sujeta a varios errores tanto positivos como negativos. Las principales causa de interferencias que producen resultados altos es la presencia de material suspendido, sílica, BaCl<sub>2</sub>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>. Las interferencias negativas son producto de la presencia de sulfatos de metales alcalinos, que frecuentemente producen bajos rendimientos.
  
- 2 Material
  - a. *Horno de secado*.
  - b. *Desecador*.
  - c. *Balanza analítica*.
  - d. *Filtro*: Filtro de membrana Milipore de 0.45µm o filtro de microfibra de vidrio tipo GF/A.
  - e. *Papel Filtro Whatmann No. 4*.
  - f. *Sistema de filtrado*: adecuado para el tipo de filtro seleccionado.
  
- 3 Reactivos
  - a. *Ácido Clorhídrico*: Solución 1:1 de HCl

b. *Solución de cloruro de bario*: Disolver 100 g  $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en un litro de agua destilada, filtrar con papel filtro fino. Cada mililitro es capaz de precipitar aproximadamente 40 mg de  $\text{SO}_4^{2-}$ .

#### 4 Procedimiento

- a. *Preparación del los filtros*: Secar los filtros a peso constante en el horno a  $105^\circ\text{C}$ , dejar enfriar en el desecador y pesar.
- b. *Preparación de la muestra*: Tomar 5 mL de la muestra y completar a 150 mL con agua destilada en un matraz Erlenmayer de 250 mL.  
Ajustar el pH a 4.5 - 5.0 con la solución de HCl y calentar hasta  $98^\circ\text{C}$ . Agregar perlas de vidrio.  
Precalentar la solución de  $\text{BaCl}_2$  y agregar 25 mL a la muestra una vez que esta este caliente.
- c. *Digestión de la muestra*: Caliente la muestra de  $80$  a  $90^\circ\text{C}$  no menos de 2 horas.
- d. *Filtrado y pesado*: Filtre el  $\text{BaSO}_4$  a temperatura ambiente y lave el destilado con pequeñas cantidades de agua destilada caliente. Seque el precipitado de la misma forma como se preparo el filtro. Deje enfriar en el desecado y pese.

#### 5 Cálculos

$$\text{mg SO}_4^{2-} / \text{L} = \frac{\text{mg BaSO}_4 \times 411.6}{\text{mL muestra}}$$

## DETERMINACIÓN ÁCIDO SULFÚRICO

### Método Iodométrico<sup>2</sup>.

#### 1. Reactivos.

- a) *Ácido clorhídrico*, HCl 6N
- b) *Solución patrón de yodo*, 0.0250 N.
- c) *Solución patrón de tiosulfato de sodio*, 0.0250 N.
- d) *Solución de almidón*: disolver 2 g de almidón y 0.2 g de ácido salicílico como conservador en 100 mL de agua destilada caliente.

#### 2. Procedimiento

Añádase con bureta a un matraz de 500 mL, una cantidad de solución del yodo estimada como un exceso sobre la cantidad de sulfuro presente. Añádase agua destilada, si fuera necesario, para llevar el volumen a unos 20 mL. Añádase 2 mL de HCl 6N. Liévense con una pipeta 200 mL de muestra en el matraz, descargando la muestra en la superficie de la solución. si desaparece el color del yodo, añádase más yodo para mantener el color. Titúlese por retroceso con solución de Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, añadiendo unas gotas de solución de almidón al acercarse al punto final, y continuando hasta desaparición del color azul.

#### 3. Cálculo.

Un mililitro de solución de yodo 0 025 N reacciona con 0.4 mg S<sup>2-</sup>:

$$\text{mg S}^{2-} / l = \frac{[(A \times B) - (C \times D)] \times 16000}{\text{ml de muestra}}$$

donde: A = mL solución de yodo

B = normalidad de la solución de Yodo

C = mL solución Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

D = normalidad de la solución Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

<sup>2</sup> Métodos Normalizados para el análisis de aguas potables y residuales. 4500-S<sup>2</sup>

**Método Potenciométrico.****1. Material y reactivos.**

- a) *Electrodo de Ion selectivo*: Se empleó un electrodo con las siguientes características:

Construcción en cuerpo de Epoxy

Rango de medición: 1.0 a  $1 \times 10^{-7}$  molar

32,100 a 0.003 ppm

Pendiente  $27 \pm 2$  mV/década

Temperatura de trabajo: 0 a 80 °C

Interferencias:  $Hg^2$ , Hg

Además de el electrodo se empleó un potenciómetro digital marca Instrulab y un electrodo doble unión de referencia, así como un agitador magnético.

- b) *Solución buffer antioxidante (solución ajustadora iónica)*: La solución buffer contiene: hidróxido de sodio para mantener en una proporción constante al sulfuro como ión  $S^{2-}$ , ácido ascórbico para prevenir la oxidación del sulfuro y EDTA como agente quelante para enmascarar a los metales pesados.

La formulación de la solución es la siguiente: Disolver sucesivamente en 500 mL de agua desionizada (eliminar de preferencia el oxígeno disuelto con nitrógeno) 80 g de hidróxido de sodio, 75 g de EDTA y 70 g de ácido ascórbico. Enfríe la solución rápidamente y añore a un litro con mas agua desionizada. Guarde la solución en un envase de plástico con tapón hermético. Esta solución tiene un periodo de utilidad de 2 a 4 semanas, dependiendo su exposición al aire. Se recomienda purgar la solución con nitrógeno cada vez que se abre la botella. Si la solución se torna de un color café obscuro es que se ha oxidado y por lo tanto debe desecharse.

- c) *Solución estándar*: El método potenciométrico requiere de una solución patrón para lo cual se emplea sulfuro de sodio. Disolver 1.5 g de sulfuro de sodio nonahidratado ( $Na_2S \cdot 9H_2O$ ) y aforar a 100 mL. Titular la solución con el método iodométrico. Una vez conocida la concentración exacta de sulfuro, tomar 50 mL con una pipeta volumétrica y aforar a 100 mL con solución buffer antioxidante. Guardar la solución

en una botella de plástico cerrada herméticamente. La solución será estable por lo menos por una semana.

La concentración de la solución estándar tendrá la mitad de la concentración calculada por iodometría y será aproximadamente:

1 mL de solución estándar  $\approx$  1 mg de sulfuro.

Apartir de esta solución se deberán realizar las necesarias empleando buffer antioxidante al 25% para aforar.

## 2. Procedimiento.

a) *Toma de muestras:* Las medición de  $H_2S$  se hace considerando el gas presente en el espacio libre del matraz y la proporción disuelta en el medio

- Medición de  $H_2S$  gas: Se desplaza el gas presente en el matraz, con nitrógeno y se burbujea el  $H_2S$  producido durante 30 segundos en 20 mL en una solución buffer antioxidante al 50%.
- Medición de  $H_2S$  disuelto: Tomar 20 mL de muestra evitando lo mas posible el contacto con el aire y diluir inmediatamente la muestra 1:1 con solución buffer antioxidante

b) *Procedimiento analítico:*

- 1) Lavar los electrodos con agua desionizada y secarlos con un pañuelo de papel desechable. Sumergir los electrodos en 50 mL de solución estándar en un recipiente con un magneto para agitación . La concentración,  $s_1$ , de la solución estándar se deberá escoger mayor que la que se espera tenga la muestra.
- 2) Comenzar la agitación evitando la formación de un vortex, y mantener la misma velocidad de agitación para todas las mediciones.
- 3) Medir el potencial ( $E_1$ ), y tomar la lectura cuando se estabilice.
- 4) Repetir el paso 1 con una segunda concentración de solución estándar,  $s_2$ , la cual deberá ser menor de la que se espere tenga la muestra y no mayor a  $0,5s_1$ .
- 5) Medir el potencial ( $E_2$ ), y tomar la lectura cuando se estabilice.
- 6) Repetir el paso 1 con la muestra previamente diluida con la solución buffer.
- 7) Medir el potencial ( $E_x$ ), y tomar la lectura cuando se estabilice.



## B. Cálculos:

## a) Cálculo de la pendiente de calibración:

$$k = \frac{E_1 - E_2}{\log s_1 - \log s_2} \approx -29 \text{ mV}$$

b) Concentración de  $S^{2-}$ :

Calcular la diferencia de potencial:  $\Delta = E_1 - E_x$

Concentración:  $c = 2 \cdot s_1 \times \text{antilog}(-\Delta / k)$

c) Cantidad de  $H_2S$  producida:

$$\text{mg } H_2S = \left[ (7 \times 10^{-9} \cdot e^{-0.0311A}) \times B + (2 \times 10^{-5} \cdot e^{-0.0195C}) \times D \right]$$

donde: A = mV en la solución buffer.

B = mL de solución buffer (20 mL).

C = mV en el medio Postgate B.

D = mL de medio Postgate B (100 mL).

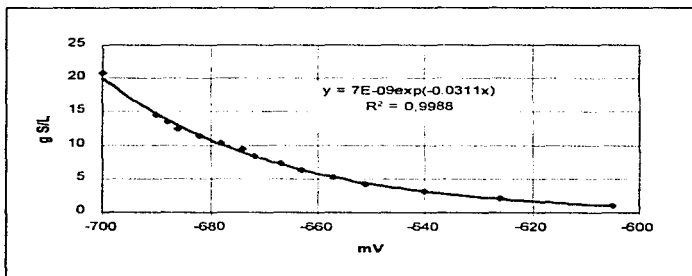


Figura C.2.1. Curva de calibración de concentración de ión sulfuro en solución buffer antioxidante.

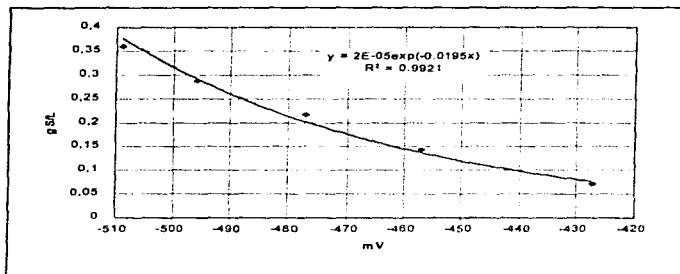


Figura C.2.2 Curva de calibración de concentración de ión sulfuro en medio Postgate B

Apéndice C

TABLAS DE RESULTADOS

SELECCIÓN DE LAS CEPAS DE TRABAJO

Cepa	DENSIDAD ÓPTICA					SULFATOS			% DE REMOCIÓN		ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA		ACTIVIDAD ESPECÍFICA	
	0 días	2 días	5 días	7 días	14 días	total	5° día	14° día	5° día	14° día	5° día	14° día	5° día	14° día
						g SO <sub>4</sub> L	g SO <sub>4</sub> L	g SO <sub>4</sub> L	%	%	g SO <sub>4</sub> /L hr	g SO <sub>4</sub> /L hr	g SO <sub>4</sub> /OO hr	g SO <sub>4</sub> /OO hr
1	0.234	0.02	0.118	0.015	0.117	2.171	1.965	2.052	9.490	5.599	1.72E-03	3.83E-04	2.91E-04	6.55E-05
2	0	0.012	0.172	0.023	0.024	2.171	1.965	1.939	8.447	10.722	1.53E-03	7.46E-04	1.78E-04	6.22E-04
3	0.028	0.011	0.142	0.013	0.055	2.171	2.021	2.042	6.531	5.993	1.25E-03	4.16E-04	1.77E-04	1.51E-04
4	0.131	0.02	0.051	0.004	0.22	2.171	1.954	1.616	6.637	11.764	1.56E-03	8.19E-04	6.13E-04	7.44E-05
5	0.182	0.013	0.07	0.006	0.097	2.171	1.954	1.963	6.637	9.584	1.56E-03	6.67E-04	4.47E-04	1.38E-04
6	0.288	0.019	0.072	0.319	0.074	2.171	1.980	0.990	8.805	54.413	1.80E-03	3.79E-03	4.44E-04	1.02E-03
7	0.03	0.019	0.177	0.004	0.135	2.171	1.935	1.862	10.911	14.228	1.97E-03	9.99E-04	2.23E-04	1.47E-04
8	0.258	0.019	0.165	0.018	0.116	2.171	1.916	1.909	11.623	12.522	2.11E-03	8.72E-04	2.28E-04	1.50E-04
9	0.118	0.028	0.155	0.042	0.151	2.171	1.976	0.950	9.016	60.384	1.63E-03	4.20E-03	2.11E-04	6.42E-04
10	0.038	0.022	0.16	0.016	0.125	2.171	2.052	1.871	5.600	13.845	9.97E-04	9.64E-04	1.11E-04	1.53E-04
11	0.05	0.02	0.181	0.006	0.11	2.171	1.974	1.615	9.110	16.428	1.65E-03	1.14E-03	1.82E-04	2.08E-04
12	0.063	0.019	0.208	0.014	0.12	2.171	1.945	1.667	10.437	23.232	1.89E-03	1.62E-03	1.82E-04	2.69E-04
13	0.06	0.029	0.124	0.026	0.084	2.171	1.951	1.836	3.879	15.460	1.75E-03	1.06E-03	2.82E-04	2.56E-04
14	0.018	0.01	0.072	0.082	0.122	2.171	1.897	1.956	12.617	14.513	2.28E-03	1.01E-03	6.34E-04	1.66E-04
15	0.103	0.032	0.112	0.029	0.125	2.171	1.925	1.705	13.911	21.431	1.97E-03	1.43E-03	3.53E-04	2.39E-04
16	0.015	0.008	0.066	0.03	0.113	2.171	1.543	1.902	10.532	12.428	1.91E-03	8.65E-04	5.78E-04	1.53E-04
17	0.064	0.024	0.195	0.006	0.147	2.171	1.594	1.712	6.163	21.147	1.48E-03	1.47E-03	1.51E-04	2.00E-04
18	0.096	0.024	0.065	0.003	0.077	2.171	1.584	1.803	8.537	16.977	1.56E-03	1.18E-03	4.91E-04	3.07E-04
19	0.137	0.021	0.125	0.015	0.123	2.171	2.070	1.733	4.656	20.199	6.43E-04	1.41E-03	1.35E-04	2.29E-04
20	0.072	0.014	0.143	0.04	0.112	2.171	1.951	1.741	10.153	19.820	1.84E-03	1.38E-03	2.57E-04	2.46E-04
21	0.012	0.017	0.065	0.123	0.085	2.171	1.895	1.776	12.712	18.209	2.30E-03	1.27E-03	4.84E-04	2.86E-04
22	0.09	0.05	0.238	0.075	0.172	2.171	2.033	1.877	6.362	13.565	1.15E-03	9.44E-04	9.67E-05	1.10E-04
23	0.127	0.041	0.092	0.07	0.103	2.171	2.052	1.737	5.035	20.010	9.11E-04	1.39E-03	1.88E-04	2.79E-04
24	0.057	0.021	0.104	0.104	0.124	2.171	1.912	1.614	11.954	15.555	2.16E-03	1.08E-03	4.16E-04	1.75E-04

Tabla C.1 Datos de las cepas a pH de 5

	DENSIDAD ÓPTICA				SULFATOS			%, DE REMOCIÓN		ACTIVIDAD VOLUMÉTRICA		ACTIVIDAD ESPECÍFICA	
	mo	3 <sup>o</sup> día	7 <sup>o</sup> día	14 <sup>o</sup> día	mo	7 <sup>o</sup> día	14 <sup>o</sup> día	7 <sup>o</sup> día	14 <sup>o</sup> día	7 <sup>o</sup> día	14 <sup>o</sup> día	7 <sup>o</sup> día	14 <sup>o</sup> día
	mo	g/50 mL	g/50 mL	g/50 mL	g/50 mL	g/50 mL	g/50 mL	%	%	g SO <sub>4</sub> /L hr	g SO <sub>4</sub> /L hr	g SO <sub>4</sub> /DO hr	g SO <sub>4</sub> /DO hr
1	0.228	0.147	0.653	0.126	2.171	1.679	1.828	22.063	19.839	2.91E-03	1.02E-03	8.84E-05	1.51E-04
2	0.372	0.164	0.237	0.275	2.171	1.387	1.274	35.856	41.334	4.73E-03	2.61E-03	3.99E-04	1.94E-04
3	0.244	0.178	0.389	0.858	2.171	1.640	1.845	24.434	14.892	3.16E-03	9.62E-04	1.63E-04	2.22E-05
4	0.152	0.15	0.515	0.6353	2.171	1.536	1.560	33.624	26.160	3.9E-03	1.82E-03	1.54E-04	5.73E-05
5	0.213	0.399	0.308	0.3	2.171	0.156	0.333	92.737	65.968	1.23E-02	5.56E-03	7.79E-04	3.71E-04
6	0.227	0.377	0.365	0.372	2.171	1.311	1.522	39.628	39.814	5.12E-03	1.99E-03	2.81E-04	1.07E-04
7	0.193	0.104	0.298	0.782	2.171	0.646	1.130	61.047	47.969	7.82E-03	3.19E-03	5.97E-04	2.20E-04
8	0.116	0.171	0.246	0.245	2.171	0.252	0.774	66.028	64.364	8.41E-03	4.16E-03	6.83E-04	3.38E-04
9	0.144	0.217	0.208	0.254	2.171	0.887	1.165	59.152	46.357	7.65E-03	3.06E-03	7.95E-04	2.27E-04
10	0.153	0.135	0.124	0.215	2.171	1.555	1.731	26.543	23.264	3.43E-03	1.31E-03	5.53E-04	1.22E-04
11	0.12	0.129	0.17	0.268	2.171	1.650	1.727	22.185	20.483	2.87E-03	1.32E-03	3.37E-04	1.27E-04
12	0.097	0.145	0.124	0.154	2.171	1.655	1.747	22.374	19.535	2.89E-03	1.26E-03	4.67E-04	1.33E-04
13	0.215	0.133	0.195	0.3	2.171	1.601	1.725	25.170	20.978	3.39E-03	1.33E-03	3.47E-04	8.87E-05
14	0.176	0.076	0.207	0.377	2.171	1.563	1.453	27.761	33.095	3.85E-03	2.14E-03	3.47E-04	1.13E-04
16	0.134	0.068	0.276	0.295	2.171	0.624	0.856	57.445	61.521	7.43E-03	3.65E-03	5.35E-04	2.70E-04
18	0.103	0.065	0.074	0.102	2.171	1.625	1.815	21.905	16.433	2.83E-03	1.06E-03	7.65E-04	2.08E-04
17	0.115	0.057	0.057	0.035	2.171	1.624	1.747	11.335	19.536	1.47E-03	1.26E-03	5.16E-04	7.01E-04
18	0.113	0.051	0.09	0.036	2.171	1.476	1.521	32.645	16.124	4.14E-03	1.04E-03	9.22E-04	5.79E-04
19	0.125	0.085	0.176	0.181	2.171	1.451	1.650	33.183	22.169	4.29E-03	1.43E-03	4.79E-04	1.58E-04
20	0.113	0.148	0.129	0.097	2.171	1.723	1.782	20.613	17.925	2.67E-03	1.16E-03	4.18E-04	2.35E-04
21	0.12	0.312	0.227	0.3	2.171	1.567	1.557	26.833	26.928	3.47E-03	1.74E-03	3.09E-04	1.16E-04
22	0.116	0.307	0.369	0.467	2.171	0.442	0.442	79.623	79.623	1.03E-02	6.15E-03	5.59E-04	2.20E-04
23	0.117	0.095	0.311	0.345	2.171	0.276	0.329	67.352	64.836	1.13E-02	6.48E-03	7.28E-04	3.17E-04
24	0.137	0.086	0.078	0.067	2.171	1.632	1.943	24.843	10.532	3.21E-03	6.81E-04	8.23E-04	1.56E-04

Tabla C.2 Datos de las cepas a pH de 7

## DETERMINACIÓN DE LAS CONDICIONES DE PROCESO

*Efecto de la temperatura*

cepa	Remoción porcentual de sulfatos					
	28°C		35°C		45°C	
	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs
5	2,123	29,188	92,797	86,068	0,065	0,024
7	2,477	58,423	61,047	47,968	0,772	6,134
8	9,846	2,358	65,028	64,364	2,804	2,624
15	5,557	0,162	57,446	61,521	2,076	0,000
22	0,937	54,978	79,623	79,623	0,000	0,896

Tabla C 3 Remoción de sulfatos a 28, 35 y 45°C

cepa	Actividad Volumétrica (g SO <sub>4</sub> /l hr)					
	28°C		35°C		45°C	
	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs
5	1,93E-04	1,89E-03	1,20E-02	5,56E-03	5,95E-06	1,11E-06
7	2,34E-04	2,81E-03	7,89E-03	3,10E-03	7,30E-05	3,24E-04
8	9,47E-04	5,76E-04	8,41E-03	4,16E-03	2,70E-04	2,57E-04
15	5,24E-04	2,69E-04	7,43E-03	3,98E-03	1,96E-04	0,00E+00
22	8,39E-05	2,48E-03	1,03E-02	5,15E-03	0,00E+00	0,00E+00

Tabla C 4 Actividades volumétricas a 28, 35 y 45°C

cepa	Actividad Específica (g SO <sub>4</sub> /DO hr)					
	28°C		35°C		45°C	
	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs
5	1,43E-04	1,22E-03	7,79E-04	3,71E-04	4,58E-06	9,22E-07
7	1,17E-04	1,17E-03	5,30E-04	2,20E-04	4,56E-05	2,03E-04
8	7,28E-04	3,20E-04	6,83E-04	3,38E-04	1,59E-04	6,52E-05
15	6,17E-04	1,99E-04	5,38E-04	2,70E-04	1,45E-04	0,00E+00
22	6,45E-05	6,80E-04	5,59E-04	2,20E-04	0,00E+00	0,00E+00

Tabla C 5 Actividades específicas a 28, 35 y 45°C

**Efecto de la temperatura**

cepa	Remoción porcentual de sulfatos %					
	pH 5		pH 7		pH 8	
	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs
5	8.637	9.584	92.797	86.068	30.144	87.619
7	10.911	14.228	61.047	47.968	10.233	40.416
8	11.669	12.522	65.028	64.364	32.615	34.398
15	10.911	21.431	57.446	61.521	5.326	11.820
22	6.362	13.565	79.623	79.623	63.751	75.517

Tabla C.6 Remoción de sulfatos a pH de 5, 7 y 8.

cepa	Actividad Volumétrica (gSO <sub>4</sub> /l hr)					
	pH 5		pH 7		pH 8	
	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs
5	1.56E-03	6.67E-03	1.20E-02	5.56E-03	1.55E-02	3.99E-03
7	1.97E-03	9.90E-04	7.89E-03	3.10E-03	1.79E-02	1.91E-03
8	2.11E-03	8.72E-04	8.41E-03	4.16E-03	1.61E-02	1.65E-03
15	1.97E-03	1.49E-03	7.43E-03	3.98E-03	1.84E-02	5.57E-04
22	1.15E-03	9.44E-04	1.03E-02	5.15E-03	1.22E-02	3.38E-03

Tabla C.7 Actividad volumétrica a pH de 5, 7 y 8.

cepa	Actividad Específica (gSO <sub>4</sub> /DO hr)					
	pH 5		pH 7		pH 8	
	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs	168 hrs	336 hrs
5	4.47E-04	1.38E-04	7.79E-04	3.71E-04	5.95E-03	1.04E-03
7	2.23E-04	1.47E-04	5.30E-04	2.20E-04	6.77E-03	5.62E-04
8	2.28E-04	1.50E-04	6.83E-04	3.38E-04	5.37E-03	9.19E-04
15	3.53E-04	2.39E-04	5.38E-04	2.70E-04	9.42E-03	2.53E-04
22	9.67E-05	1.10E-04	5.59E-04	2.20E-04	2.71E-03	7.04E-04

Tabla C.8 Actividad específica a pH de 5, 7 y 8.

**Efecto de la concentración de sustrato**

cepa	% de Remoción							
	2.17g/l	2.17g/l	4.54g/l	4.54g/l	8.34g/l	8.34g/l	16g/l	16g/l
	168h	336h	168h	336h	168h	336h	168h	336h
5	92.80	86.07	2.61	4.28	6.16	4.82	27.23	31.75
7	61.05	47.97	0.80	17.45	0.40	15.85	33.57	28.09
8	65.03	64.36	0.98	14.75	3.28	4.03	22.11	27.36
15	57.45	61.52	2.97	8.34	3.48	17.35	49.55	32.61
22	79.62	79.62	18.76	31.54	17.10	15.66	26.34	29.41

Tabla C 9 Remoción de sulfatos a diferentes concentraciones de sulfato a 168 y 336 horas.

cepas	Actividad Volumétrica (g SO <sub>4</sub> /l hr)							
	2.17g/l	2.17g/l	4.54g/l	4.54g/l	8.34g/l	8.34g/l	16g/l	16g/l
	168h	336h	168h	336h	168h	336h	168h	336h
5	1.20E-2	5.56E-3	7.07E-4	7.65E-4	3.04E-3	1.11E-3	2.57E-2	1.40E-2
7	7.89E-3	3.10E-3	2.17E-4	2.21E-3	1.96E-4	3.65E-3	3.17E-2	1.24E-2
8	8.41E-3	4.16E-3	2.66E-4	1.87E-3	1.62E-3	9.26E-4	2.08E-2	1.20E-2
15	7.43E-3	3.98E-3	8.05E-4	1.06E-3	1.71E-3	3.99E-3	4.67E-2	1.43E-2
22	1.03E-2	5.15E-3	5.09E-3	3.99E-3	8.43E-3	3.60E-3	2.48E-2	1.29E-2

Tabla C 10 Actividad volumétrica a diferentes concentraciones de sulfato a 168 y 336 horas.

cepas	Actividad Específica (g SO <sub>4</sub> /DO hr)							
	2.17g/l	2.17g/l	4.54g/l	4.54g/l	8.34g/l	8.34g/l	16g/l	16g/l
	168h	336h	168h	336h	168h	336h	168h	336h
5	7.79E-4	3.71E-4	1.31E-4	1.05E-4	8.21E-4	1.01E-3	2.33E-2	2.49E-3
7	5.30E-4	2.20E-4	6.04E-5	3.60E-4	9.80E-5	1.22E-3	1.51E-2	4.75E-3
8	6.83E-4	3.38E-4	9.87E-5	5.01E-4	1.47E-3	1.29E-4	2.37E-3	8.60E-3
15	5.38E-4	2.70E-4	2.12E-4	1.34E-4	3.18E-4	2.85E-3	2.92E-2	8.44E-3
22	5.59E-4	2.20E-4	8.19E-4	8.68E-4	1.83E-3	8.19E-4	7.53E-3	3.01E-3

Tabla C 11 Actividad específica a diferentes concentraciones de sulfato a 168 y 336 horas.

Efecto de la solución reductora.

cepas	% de remoción			A. Volumétrica			A. Especifica		
	100%	50%	25%	100%	50%	25%	100%	50%	25%
5	85.31	70.79	59.17	9.5E-3	4.9E-3	7.1E-3	5.0E-3	2.1E-3	4.0E-3
7	4.99	5.41	7.00	557.4E-6	594.1E-6	722.8E-6	242.0E-6	298.5E-6	428.3E-6
8	0.88	41.36	5.24	98.0E-6	4.5E-3	539.0E-6	63.0E-6	2.1E-3	425.1E-6
15	2.08	6.02	0.00	232.7E-6	661.5E-6	0	176.7E-6	473.3E-6	0
22	70.82	92.64	89.70	8.9E-3	10.2E-3	9.2E-3	2.5E-3	4.3E-3	2.6E-3

Tabla C. 12 Remoción de sulfatos, actividad volumétrica y específica a diferentes concentraciones de solución reductora.

PRUEBAS CON COMPUESTOS ORGANOSULFURADOS

Solvente	Cepa	Porcentaje de remoción	Porcentaje de inhibición de crecimiento	Actividad Volumétrica (gSO <sub>4</sub> /l hr)	Actividad Especifica (gSO <sub>4</sub> /D.O hr)
Etolanol	5	5.27	23.52	5.51E-4	9.19E-4
Etolanol	22	4.29	21.27	4.53E-4	6.04E-4
DMF	5	3.59	78.43	3.80E-4	1.90E-4
DMF	22	6.26	52.48	6.62E-4	3.58E-4
Benceno	5	0.00	82.35	0.00	0.00
Benceno	22	0.23	78.36	2.45E-5	2.45E-5
Testigo	5	85.30	-	9.53E-3	8.92E-3
Testigo	22	79.82	-	5.01E-3	2.51E-3

Tabla C. 13 Efecto del solvente en la actividad de las cepas 5 y 22.