



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

3
2cf

FACULTAD DE INGENIERIA
DIVISION DE ESTUDIOS DE
POSTGRADO

ESTUDIO DE UN BIOCATALIZADOR PARA
LA ELIMINACION DE AZUFRE ORGANICO
EN DIESEL

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN INGENIERIA
(AMBIENTAL)

P R E S E N T A

GLADYS TERESA CASTORENA CORTES

DIRIGIDA POR: M. EN C. JUAN VILLAFANA ROJAS
M. EN I. FRANCISCA IRENE SOLER ANGUIANO



CIUDAD UNIVERSITARIA 1998

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

260089



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.

Dedicatoria

A mis padres Heberto Jorge Castorena y M^a Teresa Cortés, por su sabiduría al guiarme y por su amor infinito

Al compañero de mi vida, Andrés, por su apoyo, comprensión y sobre todo por su amor

A mi hermana Lisi por su gran cariño

Por que ustedes son lo mejor que Dios me ha dado

Gladys

Agradecimientos

Mi más sincero agradecimiento al M. en C Juan Villafaña Rojas y a la M. en I Francis Soler Anguiano por dirigir la tesis, por su confianza, apoyo y amistad.

A los miembros del jurado, por sus valiosas aportaciones en la revisión del Trabajo: M. en C. Gabriela Moller, M en C. Juan Villafaña, M. en I. Francis Soler, M. en I. Ann Wellens y la M.en I Ana. Elisa Silva.

A los integrantes del Departamento de Bioprocesos del IMP en especial : Pilar Bremauntz, Juan Cid, Muarilio Aguilar, Roman Castañeda y Miriam Pérez ,por su ayuda incondicional y entusiasmo.

Quisiera resaltar la invaluable colaboración del M. en C. Diego Zaragoza para al análisis de los experimentos, así como los útiles comentarios y sugerencias del Dr. Luis Fernández.

A los profesores que intervinieron en mi formación en la Maestría y que compartieron conmigo ese valioso tesoro que es el conocimiento.

Al Instituto Mexicano del Petróleo por las facilidades otorgadas para la realización de la tesis.

Al CONACYT por apoyarme en mis estudios de posgrado.

Por último a todas aquellas personas que de alguna manera ayudaron a la realización de este trabajo

GRACIAS

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioprocesos del Instituto Mexicano del Petróleo, bajo la asesoría del M. en C. Juan Villafañá Rojas y de la M. en I. Francisca Irene Soler Anguiano .

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	1
-------------------	---

<i>Objetivos</i>	3
<i>OBJETIVO GENERAL</i>	3
<i>OBJETIVOS ESPECÍFICOS</i>	3

CAPÍTULO 1.....	4
-----------------	---

Importancia del bióxido de azufre en la contaminación atmosférica

1.1 Fuentes de emisión.....	4
1.2 Precipitación ácida.....	5
1.3 Efectos de la precipitación ácida en flora y fauna.....	6
1.4 Efectos de la precipitación ácida en materiales.....	6
1.5 Efectos del bióxido de azufre en la salud.....	7
1.6 Lluvia ácida en México.....	8
1.7 Acciones realizadas para la reducción y control de óxidos de azufre.....	8
1.8 Legislación.....	9

CAPÍTULO 2.....	11
-----------------	----

Contenido de azufre en las fracciones de petróleo

2.1 Especies organosulfuradas en las fracciones del petróleo.....	12
2.2 Alternativas para disminuir el contenido de azufre.....	13
2.3 Hidrodesulfuración.....	14

CAPÍTULO 3 17

Biodesulfuración

3.1 Consideraciones de la tecnología de biodesulfuración.....	18
3.2 El dibenzotiofeno como molécula patrón	19
3.3 Vías metabólicas de la desulfuración.....	21
3.4 <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	22
3.5 Rutas metabólicas propuestas para la desulfuración del DBT por <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	25
3.6 Proceso.....	26
3.7 Comparación entre la hidrodeshulfuración y la biodesulfuración.....	28

CAPÍTULO 4 29

Desarrollo experimental

4.1 Producción de biomasa	30
4.1.1 <i>Microorganismo y medios de cultivo</i>	30
4.1.2 <i>Condiciones de incubación</i>	30
4.1.3 <i>Preparación del inóculo</i>	30
4.1.4 <i>Determinación del peso seco</i>	31
4.1.5 <i>Efecto combinado de la fuente de carbono, nitrógeno y azufre</i>	31
4.2 Desarrollo del método analítico.....	31
4.2.1 <i>Perfil de estándares en Ultravioleta (UV)</i>	31
4.2.2 <i>Separación y cuantificación de los metabolitos</i>	32
4.2.3 <i>Tratamiento de las muestras para la extracción de metabolitos</i>	32
4.3 Pruebas de actividad.....	33
4.3.1 <i>Cinética</i>	33
4.3.2 <i>Efecto del pH</i>	33
4.3.3 <i>Efecto de la fuente de carbono</i>	33
4.3.4 <i>Efecto de la cantidad inicial de inóculo</i>	33
4.3.5 <i>Reutilización de la biomasa</i>	34
4.4 Pruebas de inhibición	34
4.4.1 <i>Inhibición por sulfato</i>	34
4.4.2 <i>Efecto de la concentración de dibenzotiofeno</i>	34
4.4.3 <i>Efecto del 2,2- bifenol</i>	34
4.4.4 <i>Inhibición por el 2-hidroxibifenilo</i>	35
4.5 Pruebas con diesel.....	35
4.5.1 <i>Pruebas de desulfuración con diesel</i>	35
4.5.2 <i>Pruebas con una fracción organosulfurada del diesel</i>	35

4.6 Diseño de Experimentos.....	36
4.6.1 <i>Diseño factorial</i>	36
4.6.2 <i>Comparación por intervalos múltiples de Duncan</i>	37
CAPÍTULO 5	39
Resultados	
5.1 Producción de biomasa	39
5.1.1 <i>Efecto combinado de la fuente de carbono, nitrógeno y azufre</i>	39
5.1.2 <i>Cinética de crecimiento de Rhodococcus rhodochrous en MBS</i>	43
5.2 Pruebas analíticas	44
5.2.1 <i>Pruebas de solubilidad</i>	44
5.2.2 <i>Perfil de estándares en Ultravioleta (UV)</i>	45
5.2.3 <i>Separación y cuantificación de los metabolitos</i>	47
5.2.4 <i>Determinación de la actividad desulfuradora de Rhodococcus rhodochrous</i>	49
5.3 Pruebas de actividad	49
5.3.1 <i>Velocidad de remoción del DBT</i>	49
5.3.2 <i>Efecto del pH</i>	50
5.3.3 <i>Efecto de la fuente de carbono</i>	51
5.3.4 <i>Efecto de la concentración inicial de inóculo</i>	52
5.3.5 <i>Reutilización de la biomasa</i>	53
5.4 Pruebas de inhibición	54
5.4.1 <i>Inhibición por sulfato</i>	54
5.4.2 <i>Efecto de la concentración del dibenzotiofeno</i>	55
5.4.3 <i>Efecto del 2,2-bifenol</i>	55
5.4.4 <i>Inhibición por 2-hidroxibifenilo</i>	57
5.5 Pruebas con diesel.....	58
5.5.1 <i>Pruebas de desulfuración con diesel</i>	58
5.5.2 <i>Pruebas con una fracción azufrada del diesel</i>	58
CONCLUSIONES	61
RECOMENDACIONES	63
BIBLIOGRAFÍA	65
Anexos	70

Indice de tablas

Tabla	1.1	Promedios de acidez de lluvia, observados en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.....	8
Tabla	1.2	Tendencias de la normatividad ambiental sobre el contenido de azufre en combustibles fósiles.....	9
Tabla	1.3	Normatividad nacional para el contenido de azufre de diferentes combustibles.....	10
Tabla	2.1	Contenido de azufre en el combustible crudo de diferentes países.....	11
Tabla	2.2	Contenido de azufre y aspectos energéticos de algunos combustibles nacionales.....	12
Tabla	2.3	Compuestos organosulfurados en las fracciones de petróleo.....	12
Tabla	3.1	Comparación de los procesos aerobios y anarobios en la biodesulfuración.....	22
Tabla	3.2	Comparación entre la hidrodeshulfuración y la biodesulfuración.....	28
Tabla	4.1	Formulación del medio basal de sales (MBS).....	30
Tabla	4.2	Concentración de los estándares para las pruebas de detección en el HPLC.....	32
Tabla	5.1	Biomasa en peso seco del <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en diferentes formulaciones de medio.....	42
Tabla	5.2	Biomasa en peso seco del <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en diferentes fuentes de carbono.....	43
Tabla	5.3	Intervalo lineal de concentraciones de metabolitos detectables en HPLC.....	48
Tabla	5.4	Cambio de pH en la fermentación	51
Tabla	5.5	Efecto por la concentración del DBT en la remoción por <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	55
Tabla	5.6	Efecto en la actividad desulfuradora de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> por la presencia de BF.....	56
Tabla	5.7	Efecto en la actividad desulfuradora de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> por la presencia de HBF.....	57

Índice de figuras

Figura 2.1	Esquema del proceso de hidrodesulfuración del diesel.....	15
Figura 3.1	Estructura del dibenzotiofeno (DBT).....	19
Figura 3.2	La biodesulfuración en el esquema de refinación.....	20
Figura 3.3	Propuesta de las vías metabólicas aerobia y anaerobia para la biodesulfuración del DBT.....	23
Figura 3.4	Estados morfológicos de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> : bacilo.....	24
Figura 3.5	Estados morfológicos de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> : bacilo.....	24
Figura 3.6	Diagrama que muestra la acción de las diferentes enzimas de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> , que participan en la desulfuración del DBT.....	26
Figura 3.7	Esquema de un posible proceso de biodesulfuración.....	27
Figura 5.1	Crecimiento <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en diferentes fuentes de nitrógeno y azufre, en medios formulados con glicerol al 1 %	40
Figura 5.2	Crecimiento <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en diferentes fuentes de nitrógeno y azufre, en medios formulados con glucosa al 1 %	41
Figura 5.3	Crecimiento <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en diferentes fuentes de nitrógeno y azufre, en medios formulados con sacarosa al 1 %	41
Figura 5.4	Crecimiento <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en diferentes fuentes de nitrógeno y azufre, en medios formulados con etanol al 1 %	42
Figura 5.5	Cinética de crecimiento de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en el MBS, cloruro de amonio, glicerol al 1% y DBT al 0.1 %.....	43
Figura 5.6	Espectro de absorción del 2,2-bifenol (BF) en acetonitrilo	45
Figura 5.7	Espectro de absorción del dibenzotiofiofeno (DBT) en acetonitrilo.....	46
Figura 5.8	Espectro de absorción del 2,-hidroxibifenilo (HBF) en acetonitrilo.....	46
Figura 5.9	Espectro de absorción de la sulfona del DBT (DBTS) en acetonitrilo.....	47
Figura 5.10	Cromatografía de los estándares: (1) DBTS, (2) BF, (3) HBF, (4) Naftaleno, (5) DBT.....	48
Figura 5.11	Cromatograma del HBF y el DBT.....	49
Figura 5.12	Velocidad de remoción del DBT por <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en MBS	50
Figura 5.13	Efecto del pH en la actividad de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en MBS.....	51
Figura 5.14	Efecto de la fuente de carbono en la actividad desulfuradora.....	52

Figura 5.15	Efecto de la concentración inicial del microorganismo	52
Figura 5.16	Efecto en la remoción del DBT por la reutilización de la biomasa de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> en MBS.....	53
Figura 5.17	Inhibición de la actividad desulfuradora de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> por la presencia de sulfato.....	54
Figura 5.18	Inhibición de la actividad desulfuradora de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> por la presencia de 2,2- bifenol.....	56
Figura 5.19	Inhibición de la actividad desulfuradora de <i>Rhodococcus rhodochrous</i> por la presencia de del 2-hidroxibifenilo.....	57
Figura 5.20	Cromatograma de una fracción de compuestos organosulfurados del diesel, disueltos en dodecano y tolueno.....	59
Figura 5.21	Cromatograma de una fracción de compuestos organosulfurados del diesel, disueltos en dodecano y tolueno, después de la interacción con <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	59

Indice de anexos

Anexo I	Validación del método analítico.....	72
Anexo II A	Densidad óptica de los cultivos en diferentes medios	76
Anexo II B	Pruebas de actividad: Cinética.....	77
Anexo II C	Pruebas de actividad: Efecto del pH.....	78
Anexo II D	Pruebas de actividad: Fuentes de Carbono.....	79
Anexo II E	Pruebas de actividad: Efecto de la cantidad inicial de inóculo.....	80
Anexo II F	Pruebas de actividad: Efecto del sulfato.....	81
Anexo II G	Pruebas de actividad: Efecto de la concentración del DBT.....	82
Anexo II H	Pruebas de actividad: Efecto de la concentración del 2-bifenol....	83
Anexo II I	Pruebas de actividad: Efecto de la concentración del 2 hidroxibifenilo	84
Anexo II J	Pruebas de actividad: Reutilización de la biomasa	85
Anexo III A	Diseño Factorial producción de biomasa en diferentes medios de cultivo.....	86
Anexo III B	Comparaciones Múltiples de Duncan: Efecto del pH en la remoción	98
Anexo III C	Comparaciones Múltiples de Duncan: Efecto de la fuente de carbono en la remoción.....	100
Anexo III D	Comparaciones Múltiples de Duncan: Efecto de la concentración inicial de inóculo	103

Introducción

Los combustibles fósiles contienen cantidades importantes de azufre en forma de compuestos orgánicos. Las emisiones por la combustión de estas sustancias son una fuente de contaminación atmosférica en forma de partículas, óxidos de azufre y ácidos.

Debido a la preocupación por las emisiones de azufre, se han elaborado diversas regulaciones en varias partes del mundo, para reducirlas. Lo cual justifica el interés por procesos que permitan disminuir el contenido de azufre en los combustibles.

La tecnología actual para la remoción de azufre en combustibles fósiles, es la hidrodesulfuración, la cual requiere de un gran consumo de energía, por lo que el costo de operación es elevado, además que no es efectiva para todas las especies organosulfuradas. Un proceso biotecnológico basado en la biodesulfuración puede ser atractivo tanto técnica como económicamente para solventar el problema^(Johnson, 1994).

El principio de la biodesulfuración se basa en la capacidad de algunos microorganismos de emplear los compuestos organosulfurados de los hidrocarburos, como fuente de azufre y utilizarlo en sus procesos metabólicos.

Dentro de los diversos microorganismos aislados, capaces de utilizar el azufre del carbón mineral y de combustibles fósiles, se pueden citar: *Desulfovibrio desulfuricans*, *Thiobacillus sp.*, *Sulfolobus sp.*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter sp.* y *Rhodococcus rhodochrous*. Este último tiene la característica de remover selectivamente el azufre sin atacar los enlaces carbono-carbono, evitando así la pérdida de poder calorífico del combustible^(Energy Biosystems, 1992).

Es importante mencionar que no se ha desarrollado un proceso comercial con la tecnología de biodesulfuración. El costo y condiciones de producción de biomasa, así como el tiempo de biocatálisis, son los parámetros clave que limitan la factibilidad económica del sistema. De acuerdo a lo anterior, se observa la necesidad de estudiar los factores involucrados en la fermentación (formulación de medio, temperatura, pH, aireación, tipo de microorganismo) a fin de generar información útil para desarrollar el bioproceso.

En el presente trabajo se estudio la desulfuración de hidrocarburos por métodos biológicos. La bacteria empleada fue *Rhodococcus rhodochrous* cepa IGTS8 y se utilizó como molécula modelo el dibenzotiofeno (DBT), el cual es un compuesto representativo de las especies organosulfuradas del diesel. A continuación se da una breve descripción de las partes que conforman el documento.

En el primer capítulo se presentan los efectos del bióxido de azufre y la precipitación ácida sobre el medio ambiente, la salud y los materiales. Además se marca la normatividad sobre el contenido de azufre en los combustibles.

Las especies organosulfuradas que se encuentran en los diferentes cortes de petróleo, así como la descripción del proceso tradicional para la eliminación de azufre: hidrosulfuración, se presentan en el capítulo dos.

En el tercer capítulo se mencionan a los microorganismos con capacidad desulfuradora. Se presentan de forma general las vías metabólicas aerobia y la anaerobia, para la transformación de los compuestos organosulfurados. De manera más específica, se describen las características microbiológicas de *Rhodococcus rhodochrous* y el esquema de desulfuración del DBT.

En el capítulo cuatro se describen las técnicas empleadas en la experimentación, mientras que en el capítulo 5 se presentan los resultados.

El orden de planeación y ejecución de los diferentes experimentos partió con la formulación de medios para la propagación de la bacteria. A la vez se desarrollaron los métodos analíticos dentro de los cuales destaca la técnica de cuantificación del dibenzotiofeno y otros metabolitos involucrados en la biodesulfuración. Finalmente se ejecutaron las pruebas de biodesulfuración del DBT y el diesel.

De los resultados obtenidos se determinó el tiempo de duplicación del microorganismo, la velocidad de remoción del DBT y se analizó el efecto de factores como pH, fuente de carbono, cantidad de inóculo y presencia de inhibidores (sulfato, hidroxibifenilo y bifenol) en el desarrollo y actividad de *Rhodococcus rhodochrous*. Por último se realizaron pruebas de biodesulfuración con diesel.

Objetivos

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la capacidad biodesulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* para la eliminación de azufre en diesel, utilizando como molécula de referencia al compuesto organosulfurado dibenzotiofeno.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Formular un medio de cultivo adecuado para la propagación del microorganismo.
- Determinar el tiempo de duplicación de *Rhodococcus rhodochrous* en un medio con DBT.
- Determinar el lapso de tiempo para la máxima desulfuración del DBT por *Rhodococcus rhodochrous*.
- Evaluar el efecto del pH, concentración inicial de inóculo y la fuente de carbono en la biodesulfuración.
- Desarrollar e implementar técnicas analíticas para la determinación del dibenzotiofeno y los posibles productos de la biodesulfuración.
- Estudiar el efecto inhibitorio del sulfato, 2 hidroxibifenilo, y 2,2-bifenol sobre la capacidad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* en DBT.
- Determinar el porcentaje de remoción de azufre en diesel a nivel laboratorio.

Capítulo 1

Importancia del bióxido de azufre en la contaminación atmosférica

El bióxido de azufre (SO_2) es un gas incoloro de olor irritante, el cual se disuelve con facilidad en el agua para formar ácido sulfuroso. En solución pura, éste último se oxida con el oxígeno presente en el aire para formar ácido sulfúrico. En presencia de impurezas catalizadoras, tales como sales de manganeso, hierro o con la luz ultravioleta, la velocidad de conversión se incrementa. La importancia del SO_2 como precursor del ácido sulfúrico radica en ser éste, uno de los principales elementos de la lluvia ácida, por lo que tiene importantes efectos en el ambiente^(OMS, 1982).

1.1 Fuentes de emisión

Las emisiones de bióxido de azufre se liberan principalmente durante la quema de los combustibles fósiles (diesel, combustóleo y gasolina) que contienen azufre, así como por la utilización del carbón con fines de generar electricidad o en la calefacción residencial. Otras fuentes son los procesos industriales, como la fabricación de cemento y la fundición de metales^(INE, 1995).

De forma natural, el bióxido de azufre se produce por las emisiones volcánicas y las reacciones anaerobias de ciertos microorganismos^(OMS, 1982). Se estima que la contribución de bióxidos de azufre a la atmósfera por fuentes naturales es de 50 a 70 millones de toneladas por año, mientras que las fuentes antropogénicas son de 100 a 130 millones por año^(Nebel, 1996). La diferencia crucial es que éstas últimas están concentradas en las regiones industrializadas y que sus emisiones se incrementan rápidamente cada año, mientras que las

primeras están distribuidas en todo el planeta y algunas son intermitentes (por ejemplo las erupciones volcánicas).

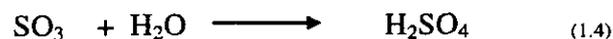
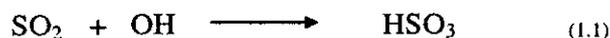
1.2 Precipitación ácida

La precipitación ácida, conocida también como lluvia ácida, es el fenómeno producido por la incorporación de compuestos químicos, especialmente óxidos de azufre y de nitrógeno, que al combinarse con la humedad existente en la atmósfera forman ácidos, siendo los más importantes por sus efectos el ácido sulfúrico y el ácido nítrico.

En la actualidad, las precipitaciones ácidas adquieren gran importancia, debido a que sus efectos pueden ser irreversibles y dañar zonas arqueológicas, monumentos históricos, edificios, estructuras metálicas, lagos, ríos y bosques, así como los ecosistemas asociados a ellos^(INE, 1994).

El agua de lluvia se considera ácida cuando su potencial de hidrógeno (pH) es inferior a 5.5, aunque en estudios recientes los investigadores han considerado que las precipitaciones son ácidas cuando su pH es menor de 5.0, ya que factores naturales como las emisiones de ácidos orgánicos, compuestos de azufre y nitrógeno emitidos por fuentes naturales, traen como consecuencia que el pH de la lluvia no contaminada este más cerca de 5.0 que de 5.5. Se estima que aproximadamente del 60 al 70 % de la acidez se debe al ácido sulfúrico y del 30 al 40 % se debe al ácido nítrico^(Nebel, 1996).

El mecanismo de las transformaciones de los óxidos de azufre no se conoce tan bien como el de los óxidos de nitrógeno. Se propone que una parte del SO₂ se convierte en ácido sulfúrico debido a la intervención de radicales, producidos por mecanismos fotoquímicos^(Casselli, 1992), como se muestra en las siguientes reacciones:



1.3 Efectos de la precipitación ácida en flora y fauna

El problema de la precipitación ácida fue identificado por primera vez en Suiza a mediados de los sesentas, al observar cambios en los ecosistemas de los lagos ^(Gosdish, 1991).

En los ríos y lagos, la acidez del agua origina cambios importantes. El desarrollo de los embriones de algunas especies se inhibe a un pH inferior a 6, mientras que a valores menores de 5 comienzan a desaparecer varias especies de peces, entre las cuales figuran los salmones y las truchas. En estas condiciones de acidez se observa una disminución en el plancton y la fauna del fondo de los lagos, lo que reduce el suministro de alimento de los peces ^(Caselli, 1992).

Por otra parte, estudios realizados con animales de laboratorio indican que la exposición prolongada a la precipitación ácida puede tener efectos negativos, especialmente en el sistema respiratorio y mucosas ^(OMS, 1982).

Los efectos de la lluvia ácida afectan también a la vegetación, el SO₂ provoca daño a las plantas, al interferir con la formación y funcionamiento de la clorofila por lo cual se reduce la fotosíntesis además de lesionar las hojas.

Otra consecuencia de la precipitación ácida es la lixiviación de los nutrientes del suelo. La acidez de las precipitaciones provoca modificaciones en el intercambio de los elementos químicos entre las plantas y el suelo. A consecuencia de ello se tienen pérdidas de calcio, sodio, magnesio y potasio, además de que ocurre una alteración de los procesos microbiológicos que intervienen en la fijación del nitrógeno. Esta desmineralización puede ocasionar pérdidas en productividad de las cosechas y los bosques o un cambio en la vegetación natural. La severidad del daño a las tierras y las extensiones de agua está particularmente determinada por los minerales en el terreno de una región ^(Caselli, 1992).

1.4 Efectos de la precipitación ácida en materiales

El efecto que ejerce la lluvia ácida sobre algunos materiales también es importante debido a que corroe metales, deteriora controles eléctricos, papel, textiles, pinturas, materiales de construcción y monumentos históricos ^(Strauss, 1989).

El ácido sulfúrico provoca daños en algunos materiales al aumentar la velocidad de corrosión. En atmósferas urbanas se han observado tasas de corrosión de una y media a cinco veces la tasa obtenida en ambientes rurales, dependiendo de la clase de material expuesto, así como de la duración de la exposición. Los ácidos sulfuroso y/o sulfúrico son capaces de atacar una amplia variedad de materiales de construcción incluyendo caliza, mármol, pizarra y mortero, los cuales por efecto del ácido se transforman en sales solubles

que luego lava la lluvia. Una suerte similar es la que tienen los metales, al quedar sometidos a un proceso de corrosión, con la formación de carbonatos y sulfatos básicos.

Otro de los efectos es que los aerosoles del ácido sulfúrico y otros sulfatos constituyen del 5 al 20 por ciento de las partículas en suspensión en el aire urbano y contribuyen significativamente a la reducción de la visibilidad (Wark y Warner, 1990).

1.5 Efectos del bióxido de azufre en la salud

Los efectos negativos de la contaminación atmosférica sobre la salud humana, no pueden estudiarse por separado para cada uno de los contaminantes, debido a que al respirarse conjuntamente su acción es siempre combinada. Sin embargo, es posible señalar las alteraciones que provocan cada uno.

Debido a las características fisicoquímicas, el bióxido de azufre que se encuentra en el aire, es potencialmente inhalable y su absorción a través de la mucosa respiratoria hacia el torrente sanguíneo, es proporcional a su concentración en la atmósfera.

Los efectos tóxicos de los óxidos de azufre y el ácido sulfúrico en una población expuesta son: edema, irritación del epitelio nasal y bronquiolar e inflamación de las mucosas. Los grupos más sensibles a los efectos por exposición son: asmáticos, fumadores, niños y ancianos (Spengler, 1989).

Informes de la American Lung Association indican que la contaminación del aire afecta el aparato respiratorio a través de una agregación continua que provoca:

- Constricción de las vías respiratorias.
- Dificultad de la respiración.
- Disminución del flujo de secreción mucosa por posible inflamación del epitelio.
- Acción tóxica de los cilios de la nariz.

Los efectos anteriores facilitan el desarrollo de una infección broncopulmonar, debido a que los microorganismos patógenos no son removidos y destruidos. El efecto constante de los contaminantes conduce al desarrollo de enfermedades crónicas respiratorias obstructivas que afectan al corazón (Sabido, 1992).

El SO₂ puede alcanzar los alvéolos cuando se fija a partículas de la fracción respirable, produciendo irritación en las membranas respiratorias y broncoconstricción severa. En este caso se incrementan los efectos negativos de cada uno de los contaminantes individuales es decir el efecto es sinérgico.

1.6 Lluvia ácida en México

Los efectos de la lluvia ácida son más evidentes en las zonas industrializadas del país, en especial la zona metropolitana de la Ciudad de México (ZMCM), debido a los altos niveles de emisión de SO₂ por la carga vehicular, así como las contribuciones de fuentes fijas. En la tabla 1.1 se señala cual ha sido el comportamiento de la lluvia ácida en esta zona.

Tabla 1.1 Promedios de acidez en lluvia, observados en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México.

Año	Intervalo promedio de pH
1987	3-6-5.9
1988	3.6-6.1
1989	3.4-8.7
1990	4.3-6.8
1991	4.4-6.3
1992	4.4-6.1
1993	4.4-6.0

Fuente: INE, 1994.

Sin embargo, zonas que se consideran poco industrializadas como el sur del país también sufren los estragos de la precipitación ácida. Se ha reportado que los monumentos mayas de Palenque, Edzna y Tulum han sido dañados por efecto de la lluvia ácida que se presenta como consecuencia de los contaminantes atmosféricos, entre los cuales está el SO₂, producidos por las actividades petroleras que se realizan en el Golfo de México^(Bravo, 1991).

1.7 Acciones realizadas para la reducción y control de óxidos de azufre

Debido a la importancia de los efectos del bióxido de azufre y de la lluvia ácida, se han desplegado una serie de acciones con el objetivo de disminuir las emisiones, dentro de las que destacan^(INE, 1994):

- Eliminación del uso del combustóleo en el Valle de México, sustituyéndolo por gasóleo industrial, el cual tiene un contenido máximo de azufre del 2 %.
- Cierre de la refinería 18 de Marzo.
- Empleo de gas natural en las dos termoeléctricas del Valle de México y en 365 industrias.

- Distribución de diesel especial (contenido de azufre menor del 0.5 %) desde 1990.
- Utilización del Diesel Sin (contenido de azufre del 0.05 %) a partir del octubre de 1993, principalmente para el transporte.

Cabe resaltar que las acciones se enfocan al empleo de combustibles con bajo contenido de azufre.

1.8 Legislación

Debido a los importantes efectos, tanto a la salud como al medio ambiente por las emisiones de bióxido de azufre y de la lluvia ácida, los gobiernos de varios países, especialmente los industrializados, han establecido regulaciones estrictas para controlar las emisiones (tabla 1.2).

Tabla 1.2 Tendencias de la normatividad ambiental sobre el contenido de azufre en combustibles fósiles.

Productos azufrados	Niveles de Azufre (ppm)		Año
	Anterior	Objetivo	
U.S. Gasolina CARB.	300	40	1996
Europa Diesel para motores	3000	500	1996
Japón- Gasóleo	2000	500	1996
Taiwan - Gasóleo	5000	500	1997
U.S. Gasolina CAAA	400	300	1998
Europa- Crudo	3500	1,000	1999
Europa- Crudo- Bunker	33000	10,000	1999
U.S. Gasolina CAAA	400	50-100	2000
Tailandia- Gasóleo	5000	2000	2000

Fuente : Monticello, 1994.

Actualmente se tiene la tendencia mundial de reducir el contenido de azufre de los combustibles, con el propósito de cumplir con las normas ecológicas en materia de prevención de la contaminación ambiental. En Estados Unidos el contenido promedio de azufre en el diesel para 1986 era de 0.27 %, sin embargo, la EPA demandó que el nivel se redujera para 1994 a 0.05% con el fin de reducir las emisiones a la atmósfera^(Monticello y Kilbane, 1991)

En México la legislación establece en la norma NOM-086-ECOL 1994, las especificaciones que deben reunir los combustibles fósiles, líquidos y gaseosos. La norma indica las características que deben cumplir éstos compuestos, así como los métodos con los que se deben realizar la medición.

El documento señala que para el 1° de enero de 1998 se tendrá un contenido máximo de azufre del 0.05 % en peso para los combustibles ligeros para la ZMCM. En la tabla 1.3 se indica la concentración máxima permitida para los diferentes combustibles.

Tabla 1.3 Normatividad nacional para el contenido de azufre en diferentes combustibles.

Combustible ^a	Unidad	Método	Límite máximo
Magna Sin	% en peso	ASTM-D-1266-91	0.3 %
Nova Plus	% en peso	ASTM-D-2622-87	0.15 %
Gasóleo	% en peso	ASTM-D-1552-90	2 %
Diesel Sin ^b	% en peso	ASTM-D-2622-87	0.05 %
Diesel desulfurado	% en peso	ASTM-D-2622-87	0.5 %
Diesel industrial ^c	% en peso	ASTM-D-2622-87	0.5%
Gas natural	% en peso (dm ³ /m ³)	ASTM D-4468-98	0.034 % (0.32)
Gas licuado	% en peso (kg/ton)	UDP-791-80	0.014 % (0.14)

Fuente: NOM-086-ECOL, Gaceta Ecológica 1995.

a.- Hasta el 31 de diciembre de 1997 el contenido máximo de azufre del combustóleo procedente de las refinerías de Cadereyta, Minatitlán, Salamanca, Salina Cruz y Tula será del 4 % en peso y el de Madero de 4.6 % en peso. A partir del 1 de Enero de 1998 el contenido máximo de azufre de cualquier combustóleo no excederá del 4 % en peso.

b.- Obligatorio para la Zona Metropolitana de la Ciudad de México a partir de 1994 y las Zonas Metropolitanas de Nuevo León y Guadalajara a partir de 1995.

c.- El diesel industrial es para uso exclusivo de quemadores de flama abierta, por lo que no debe utilizarse en motores de combustión interna al no satisfacer los requerimientos para dicho uso.

Capítulo 2

Contenido de azufre en las fracciones de petróleo

Se estima que el 88 % de las emisiones antropogénicas de bióxidos de azufre provienen de la quema de combustibles fósiles como el diesel y el combustóleo ^(Nebel, 1996). Por esta razón, los esfuerzos por disminuir la emisiones se concentran en disminuir el contenido de azufre de estos compuestos.

El azufre es el heteroátomo más abundante en el petróleo y su porcentaje depende del yacimiento (tabla 2.1). El contenido de azufre en el combustible crudo varía del 0.2 al 3 %, sin embargo puede alcanzar valores hasta del 5 %. El azufre se puede encontrar en el crudo en forma de sulfuros, sulfatos, sulfitos, pero la mayor parte está incorporado dentro de la matriz orgánica en forma de sulfonas, tiofenos, tioles, sustitutos de benzotiofenos y dibenzotiofenos ^(Monticello y Kilbane, 1991).

Tabla 2.1 Contenido de azufre en el combustible crudo de diferentes países.

Fuente	% de azufre
Arabia Saudita	1.7-2.9
Irán	1.4-2.6
Sur de Texas	1.9
México	1.5- 3
Venezuela	2.0-5.0

Fuente: Monticello y Kilbane, 1991.

En la tabla 2.2 se muestran algunas características de los principales combustibles utilizados en México.

Tabla 2.2 Contenido de azufre y aspectos energéticos de algunos combustibles nacionales.

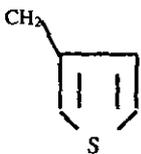
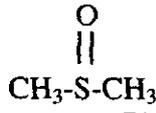
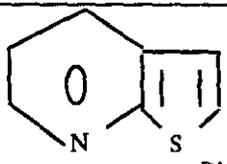
Propiedad	Diesel	Combustóleo	Gasóleo	Gasolina
% en peso de azufre	1-4	4-3	2	0.15 a trazas
Poder calorífico (Kcal/kg)	10,680	10,400	10,843	
Peso específico	0.852	0.981	0.87	0.726

Fuente: INE, 1995.

2.1 Especies organosulfuradas en las fracciones del petróleo

La forma en que el azufre se enlaza a los hidrocarburos da origen a diversos compuestos organosulfurados, los cuales se pueden agrupar en seis grandes familias. En la tabla 2.3 se ejemplifican especies de cada una de las ellas.

Tabla 2.3 Compuestos organosulfurados en las fracciones de petróleo.

Familia	Especie modelo
Mercaptanos	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-SH}$ Propanotiol
Sulfuros	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-S-CH}_2\text{-CH}_3$ Dietyl sulfuro
Disulfuros	$\text{CH}_3\text{-S-S-CH}_2\text{-CH}_3$ Metil,etyl disulfuro
Tiofenos	 Metil tiofeno
Sulfoxidos y ácidos sulfónicos	 Dimetil sulfoxido
Mixto: más de 2 heteroátomos	 Piridintiofeno

Fuente: Bremauntz. 1996.

Las fracciones de crudo se separan en función de su intervalo de ebullición, así se tienen las naftas en las fracciones menores a 200 ° C, los destilados medios de 200 a 550 °C (dentro de esta fracción se obtiene el diesel) y por último, los asfaltos son las fracciones con un rango de ebullición mayor a 500 ° C^(Bremauntz, 1996).

Durante el fraccionamiento del crudo, el azufre se concentra en las fracciones que hierven a mayor temperatura, como el combustóleo, que contienen hidrocarburos con mayor número de átomos de carbono. Por el contrario, el azufre está prácticamente ausente en la gasolina y solo presente en cantidades modestas en el gasóleo^(Caselli, 1992).

En las fracciones ligeras menores a 200° C se detectan especies como mercaptanos, ciclo alquil-sulfuros y alquil-tiofenos. En la fracción obtenida en el rango de 200 a 540° C se detectan especies como los disulfuros, tiofenos con dos o más anillos aromáticos condensados, aunque predominan en abundancia los alquilbenzenos y naftiofenos. La mayoría de las especies azufradas presentes en la fracción que corresponde al diesel (200-450° C) son compuestos de tipo aromático entre los que predominan: benzotiofenos, dibenzotiofenos y benzonaftotiofenos^(Laredo, 1995).

En residuos de destilación al vacío el contenido de azufre es mayor que en cualquiera de las fracciones anteriores y su distribución en diversas especies organosulfuradas es amplia, aunque dominan los tiofenos, sulfuros aromáticos y sulfóxidos.

2.2 Alternativas para disminuir el contenido de azufre

Debido a que los óxidos de azufre que se emiten al aire provienen del azufre que contienen los combustibles, las posibles soluciones para evitar su descarga a la atmósfera son:

- Explotación de yacimientos con bajo contenido de azufre.
- Eliminación física de los compuestos sulfurados.
- Eliminación del azufre por métodos químicos y/o biológicos.

En el primer caso, el número de yacimientos con bajo contenido de azufre cada vez es menor, además, de que la mayoría de los combustibles fósiles en México tienen un alto contenido de azufre. En la segunda opción se utilizan filtros o lavadores, sin embargo, la reducción por estos métodos no es suficiente para llegar a los estándares requeridos por la normatividad, por lo que se hace necesaria la remoción de azufre de los combustibles por métodos químicos.

El proceso tradicional para la eliminación de azufre en la industria de refinación es la hidrosulfuración (HDS), que involucra una reacción catalítica de hidrógeno en presencia de un catalizador (cobalto-molibdeno/alúmina) a presiones que varían de 15 a 50

atmósferas. y temperaturas de 290 a 455 °C, dependiendo del tipo de alimentación y el nivel de desulfuración requerida.

2.3 Hidrodesulfuración (HDS)

En el proceso de hidrodesulfuración la hidrogenación de los componentes organosulfurados es la reacción principal, siendo la primera etapa la ruptura de los enlaces C-S y la adición de hidrógeno a los fragmentos formados, dando como resultado hidrocarburos libres de azufre y ácido sulfhídrico (H₂S).

Las reacciones típicas de hidrodesulfuración son:



La velocidad de hidrogenación de los compuestos organosulfurados depende de su estructura, a continuación se muestra el orden de hidrogenación.



Las unidades de hidrotratamiento están conformadas por un sistema de precalentamiento, reactores y un sistema de separación de gas-líquido (figura 2.1). En la sección de precalentamiento, la carga (fracción de destilado) se combina con una corriente de hidrógeno; una vez caliente la mezcla se realizan las reacciones de hidrotratamiento a las presiones y temperaturas antes señaladas.

El efluente del reactor sigue hacia el separador de alta presión en donde se obtienen dos corrientes, una gaseosa con alto contenido de hidrógeno y otra con el hidrocarburo. El hidrógeno se recircula nuevamente hacia la carga del compresor y el líquido se envía a una sección de agotamiento donde se inyecta agua y se separan la fracción desulfurada del H₂S. Se repone el hidrógeno que haya sido consumido en la reacción para amantener el proceso en continuo^(Cancheyta, 1995).

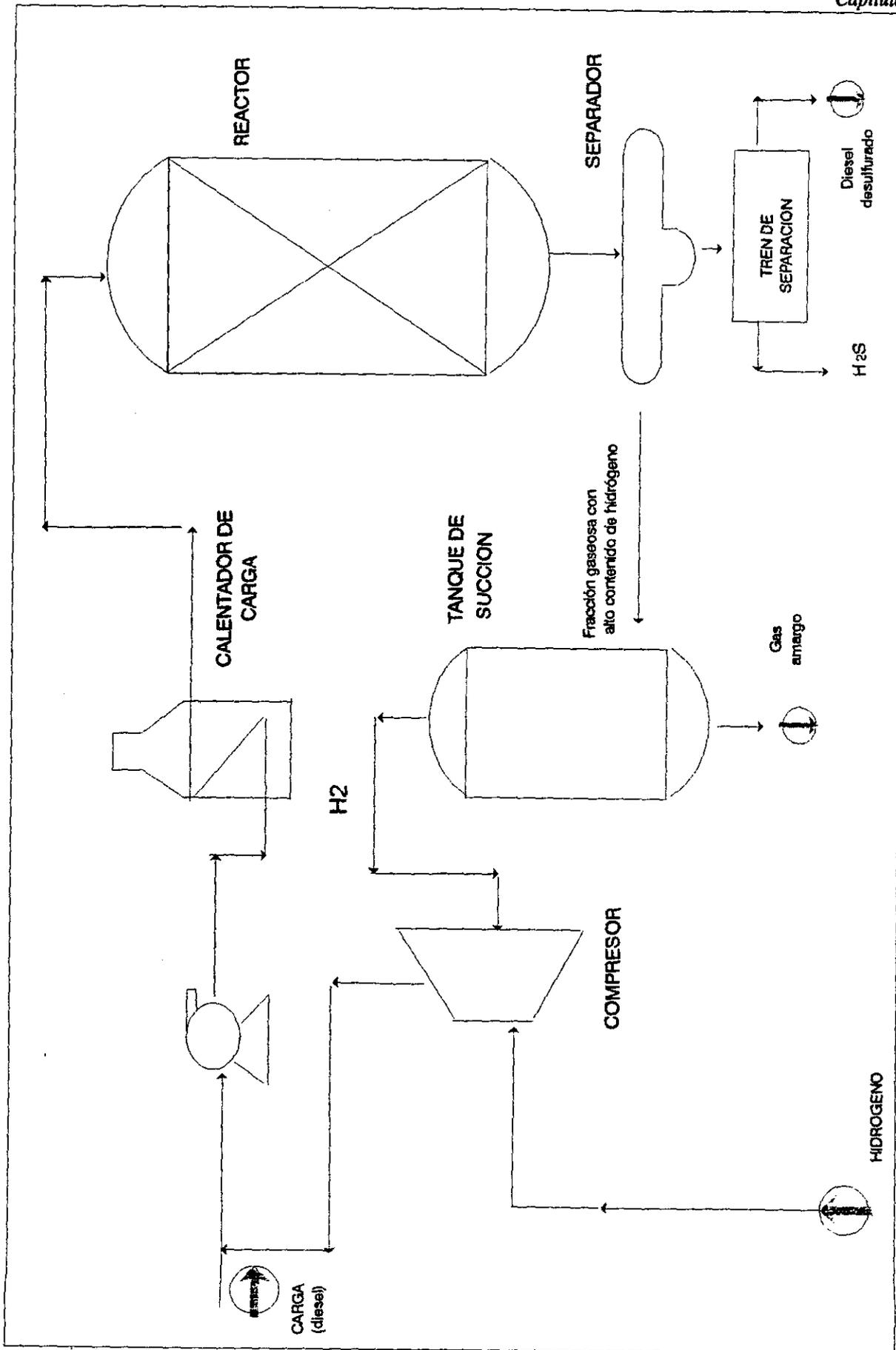


Figura 2.1 Esquema del proceso de hidrodesulfuración del diesel.

Los tiofenoles y tioles son removidos eficientemente por el proceso HDS, sin embargo los benzotiofenoles y dibenzotiofenoles alquilsustituidos son más resistentes al hidrotreatmento (Kabe, 1992 y Laredo, 1995)

El gasto de energía necesario para producir las condiciones extremas de temperatura y presión hacen que el costo de operación sea alto.

Debido al alto costo del proceso de hidrodesulfuración y a la dificultad para desulfurar algunos compuestos, tecnologías alternativas son de gran interés para la industria del petróleo. Una de estas tecnologías involucra el empleo de microorganismos que tengan la capacidad de utilizar el azufre orgánico del combustible e incorporarlo en sus vías metabólicas y obtener moléculas solubles en agua, las cuales son fáciles de remover (Monticello, 1993)

Capítulo 3

Biodesulfuración

El azufre es esencial para todos los organismos vivos. En el caso de las bacterias constituye hasta el 3 % de su peso seco ^(Lizama, 1995), es componente de los aminoácidos: metionina y cisteína. Por tanto es un elemento presente en las proteínas y enzimas, cabe resaltar que los puentes disulfuro entre los aminoácidos mencionados, determinan la estructura y función de las proteínas. Por otra parte, tiene un papel importante en el metabolismo de algunos organismos que utilizan compuestos azufrados como donadores o aceptores de electrones en las reacciones de generación de energía ^(Grossman, 1995). Para que un microorganismo utilice el azufre de un compuesto organosulfurado es necesario que primero lo remueva de la matriz, siendo éste el principio básico de la biodesulfuración.

Durante los últimos cincuenta años se han realizado investigaciones para desarrollar procesos microbiológicos para la desulfuración de combustibles fósiles. Las primeras patentes datan de mediados de los años 50 para la desulfuración del carbón ^(Zobell, 1953, Stoner, 1990). Los estudios posteriores se enfocaron a la búsqueda de bacterias que degradaban compuestos organosulfurados, ejemplos de estos microorganismos son: *Thiobacillus ferrooxidans* ^(Beyer, 1990), *Pseudomonas* ^(Finnerty, 1990, Setti, 1995), *Desulfovibrio desulfurans* y *Sulfolobus sp.* ^(Wang, 1994), los cuales son capaces de oxidar compuestos sulfurados de hidrocarburos. Sin embargo, los métodos encontrados no fueron aplicados debido a que el proceso involucraba pérdida del combustible al ocurrir la remoción de azufre. El proceso biológico implicaba generalmente un ataque a las estructura carbonada, provocando una importante pérdida del poder calorífico. A principios de los noventas se aisló al microorganismo *Rhodococcus rhodochrous*, el cual es capaz de desulfurar el azufre sin afectar la matriz hidrocarbonada.

3.1 Consideraciones de la tecnología de biodesulfuración

El objetivo de las tecnologías de biodesulfuración es desarrollar sistemas con bacterias o enzimas que realicen reacciones específicas para liberar el azufre, dejando intacta la estructura hidrocarbonada^(Monticello, 1993 b, Kilbane 1990).

El desarrollo de un proceso comercial para la desulfuración microbiológica debe cumplir con los siguientes puntos^(Monticello y Kilbane, 1991).

Microorganismo

- La reacción debe atacar específicamente la unión C-S.
- Debe ser resistente a los compuestos potencialmente tóxicos que se encuentran en el petróleo.
- Ser lo suficientemente fuerte para resistir las condiciones del proceso.
- Debe ser estable genéticamente durante largos periodos de tiempo.

Proceso

- No debe ocasionar cambios importantes en la calidad y valor del combustible.
- Los residuos que se generen deben ser de fácil tratamiento.
- Debe ser de fácil integración para las plantas de refinación existentes.

El proceso de biodesulfuración tiene ciertas ventajas y desventajas^(Kulpa, 1995, Energy Biosystems, 1992), las cuales se enlistan a continuación:

Ventajas

- Menor consumo de energía que el proceso de hidrosulfuración.
- Menor costo de operación y de capital.
- Remueve compuestos azufrados que no se alcanzan a remover en el proceso de hidrosulfuración.
- Temperaturas y presiones de operación bajas.
- Puede aplicarse a diferentes fracciones de petróleo.
- Se puede adaptar fácilmente a los procesos de refinación.
- No hay desintegración de moléculas por no haber condiciones severas.
- No hay pérdidas de octanaje.

Desventajas

- Poco conocimiento del proceso a nivel bioquímico.
- No se ha probado su factibilidad a gran escala.
- El tiempo de residencia es alto.
- La eficiencia varía de acuerdo a la calidad el combustible.

Existen factores biológicos y fisicoquímicos que afectan el grado de transformación en el proceso de biodesulfuración. Los factores biológicos dependen del tipo de microorganismo empleado, su estabilidad genética, su velocidad de catálisis y su tiempo de duplicación. Los factores fisicoquímicos incluyen la agitación, pH, temperatura, aireación para los procesos aerobios ó presencia de hidrógeno para los procesos anaerobios ^(Setti, 1994, Mäka 1989)

Como se mencionó anteriormente, la biodesulfuración (BDS) es potencialmente aplicable a diferentes fracciones de destilados ^(Yashui, 1994). En la figura 3.2 se presenta el diagrama de las oportunidades de utilización del proceso, los cuadros punteados señalan la posición en la que se puede integrar el esquema de biodesulfuración al tren de refinación ^(Monticello, 1991 b). El proceso puede remplazar al proceso de hidrodesulfuración (HDS) o bien complementarlo, para obtener una mejor remoción de azufre.

3.2 El dibenzotiofeno como molécula patrón

La búsqueda de bacterias desulfuradoras se ha enfocado al aislamiento de microorganismos capaces de degradar compuestos orgánicos heterocíclicos de azufre como el dibenzotiofeno (DBT) que se muestra en la figura 3.1.

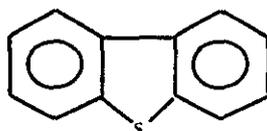


Figura 3.1 Estructura del dibenzotiofeno (DBT).

El DBT representa más del 40 % del total de los compuestos organosulfurados en los destilados medios, además es una de las especies más resistentes al hidrotreamiento, por lo cual se emplea comúnmente como referencia para estudios de procesos de biodesulfuración ^(Monticello, 1991 y Kilbana, 1992).

El DBT tiene una baja reactividad debido a la deslocalización de los electrones en el anillo bencénico, lo cual dificulta la transformación por métodos químicos ^(Klyachko, 1992), adicionalmente tiene una baja solubilidad en agua ^(Wu, 1994).

3.3 Vías metabólicas de la desulfuración

El proceso puede realizarse en condiciones aerobias o anaerobias ^(Pifferi, 1990). En el proceso aerobio, ocurre la oxidación de la molécula por lo cual se denomina como desulfuración oxidativa o aerobia, mientras que en la anaerobia o reductiva se emplea hidrógeno para reducir a la molécula.

Desulfuración reductiva

Los microorganismos tienen la capacidad de obtener energía a través de la reducción del azufre del compuesto organosulfurado a H₂S, el cual es excretado al medio ^(Grossman, 1995 y Kim, 1988). La reacción requiere de la adición de hidrógeno siendo de forma general:



Dentro de los microorganismos empleados están el *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfotomaculum orientis* y *Thermodesulfobacterium commune* ^(Lizama M, 1995, James 1990). Una variante del tratamiento es emplear una celda electroquímica para liberar electrones, los productos de la desulfuración del DBT reportados fueron bifenilo y H₂S, con una reducción del 20 % del total de azufre en diesel ^(Kim, 1990).

En México se han estudiado bacterias sulfato reductoras, se ha logrado la disminución del contenido de azufre en combustóleo, bajo condiciones anaerobias ^(Aragon, 1997, Jiménez, 1997).

Desulfuración oxidativa

La degradación oxidativa del azufre ocurre cuando los compuestos azufrados se emplean como donadores de electrones. El resultado de esta ruta metabólica es la producción de biomasa, productos parcialmente oxidados y sulfato ^(Grossman, 1995).

Los microorganismos aerobios degradan diversos compuestos sulfurados de acuerdo al siguiente orden ^(Setti, 1994):

alifáticos > aromáticos > asfaltenos

Dentro de los microorganismos aerobios estudiados están *Rhodococcus rhodochrous* ^(Kilbane 1991), *Rhodococcus erythropolis* ^(Mamie, 1996), *Corynebacterium* y *Arthrobacter* ^(Grossman, 1995).

La tabla 3.1 resume las diferencias de los procesos aerobio y anaerobio, mientras que en la figura 3.3 se muestran los productos de las distintas vías metabólicas.

Tabla 3.1 Comparación de los procesos aerobios y anaerobios en la biodesulfuración.

Característica	Proceso aerobio	Proceso anaerobio
Agente oxidante o reductor	Oxígeno del aire	Hidrógeno
Costo	Bajo	Elevado
Velocidad de reacción	Rápida	Lenta
Producto	Iones sulfato	Ácido sulfihídrico

En la tabla anterior se hace evidente que el proceso aerobio presenta mayores ventajas que el proceso anaerobio, debido a que el tiempo de reacción así como el costo es menor.

3.4 *Rhodococcus rhodochrous*

En Kuwait se aislaron diversos microorganismos con capacidad de degradar hidrocarburos entre ellos *Rhodococcus rhodochrous* (Sorkhoh, 1990, Kayser, 1993). El microorganismo se caracteriza por su habilidad para liberar el azufre del carbono y emplearlo en su crecimiento (Monticello, 1993 b, Johnson, 1994).

R. rhodochrous es una bacteria gram positiva de 0.5 μm de largo (figuras 3.4 y 3.5), es positiva a la catalasa, sensible a la lisozima, arilsulfatasa negativa, su contenido GC del DNA es de 67-73 % en mol (Sprieger, 1991, Bergey 1957). Esta clasificado como un actinomiceto del grupo nocardia, el cual tiene la tendencia de crecer en forma de micelio. En los estados iniciales presenta la forma de coco y en la fase logarítmica de su crecimiento su forma cambia a bacilo. En los estados finales del desarrollo se producen hifas y subsecuentemente se fragmenta dando bacilos cortos o cocos (Stanier, 1988, Pelczar, 1986). En un medio de agar nutritivo forma colonias de color durazno (Kilbane, 1991).

En 1988, en E.U., el Intituto de Tecnología del Gas (IGT) estudió, aisló y mutó al microorganismo designado como *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, siendo su principal característica que podía remover el azufre del carbono de forma selectiva sin degradar al combustible (Energy Biosystems, 1992).

Se comprobó que el microorganismo desulfuraba otros compuestos azufrados del petróleo, como: triantreno, metiltiofeno y la sulfona del DBT (Johnson, 1994).

La capacidad selectiva del microorganismo de romper enlaces carbono-azufre en materiales carbonáceos, abre la posibilidad de realizar la desulfuración sin que por ello se vea afectada la capacidad energética del hidrocarburo. Estudios realizados demuestran que, *Rhodococcus rhodochrous*, tiene una vía oxidativa de desulfuración la cual es específica y estable, produciendo 2- hidroxibifenilo y SO_4^{--2} a partir de DBT (Kilbane, 1992, y Gallagher, 1993).

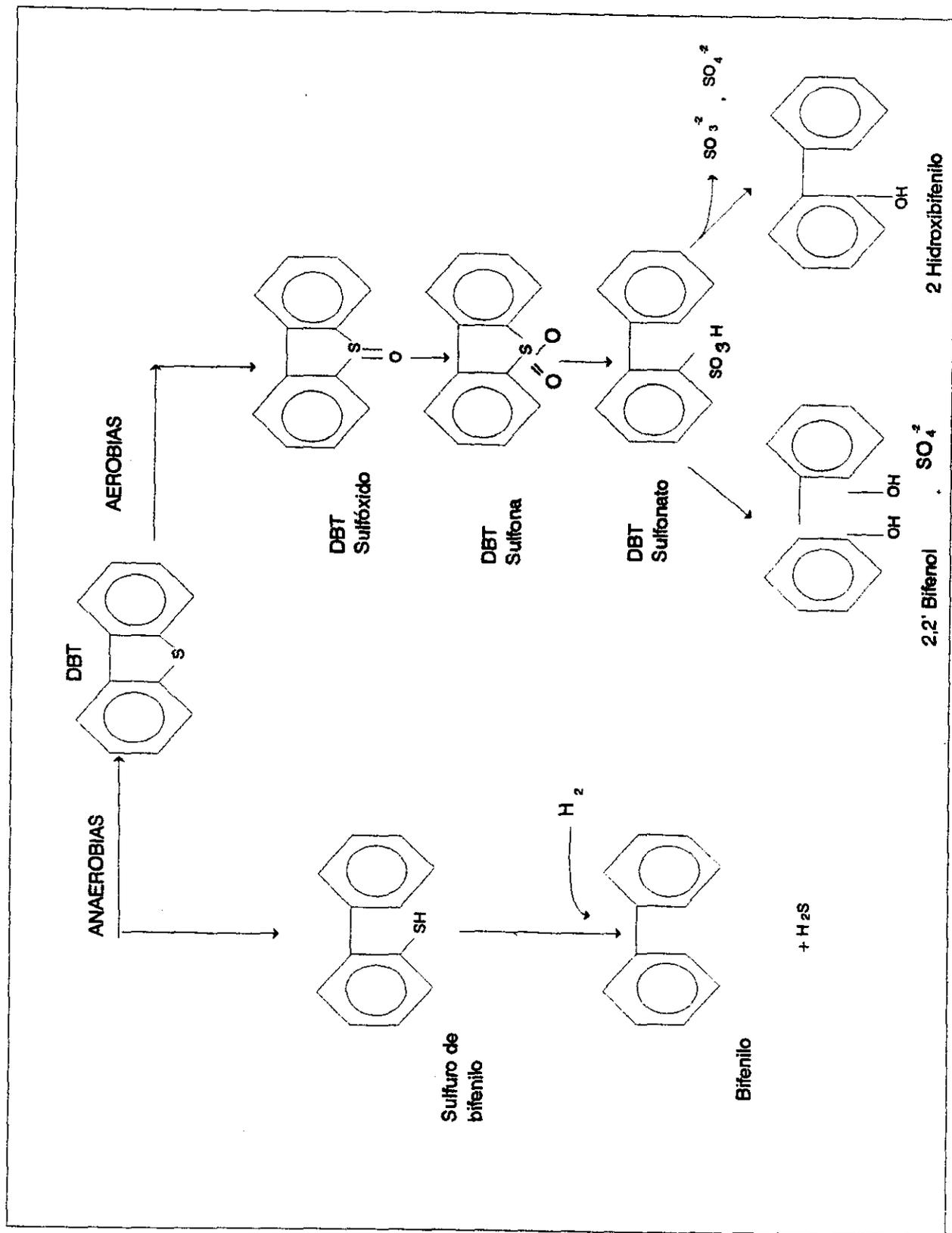
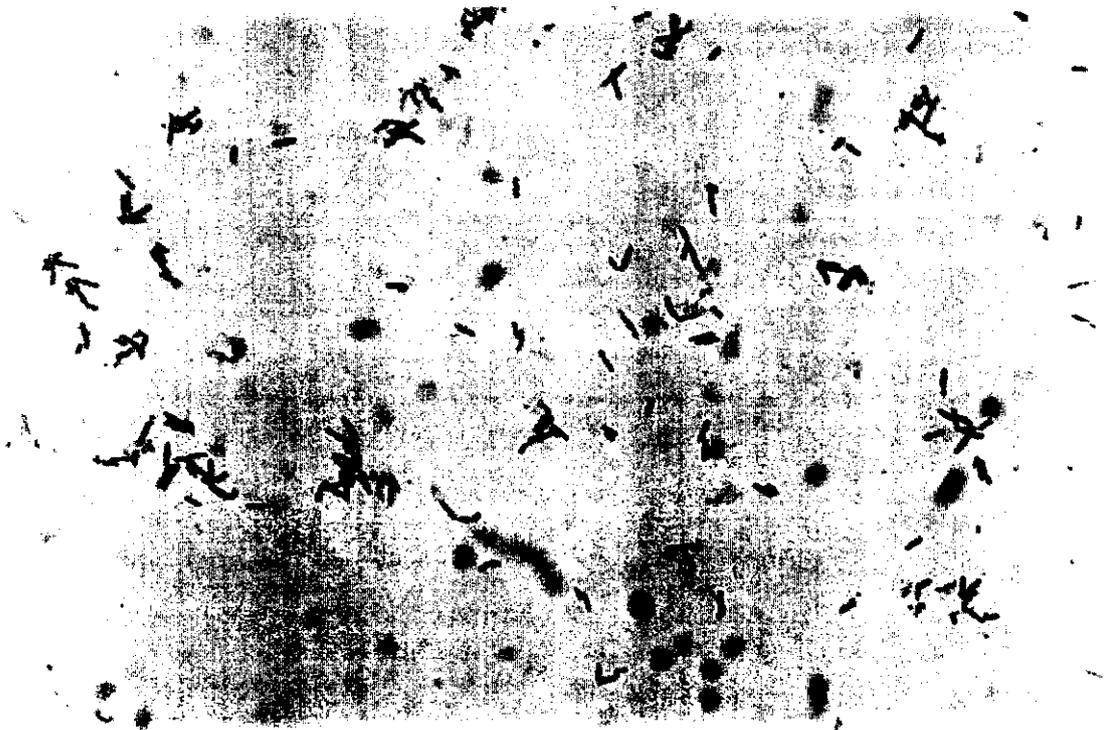
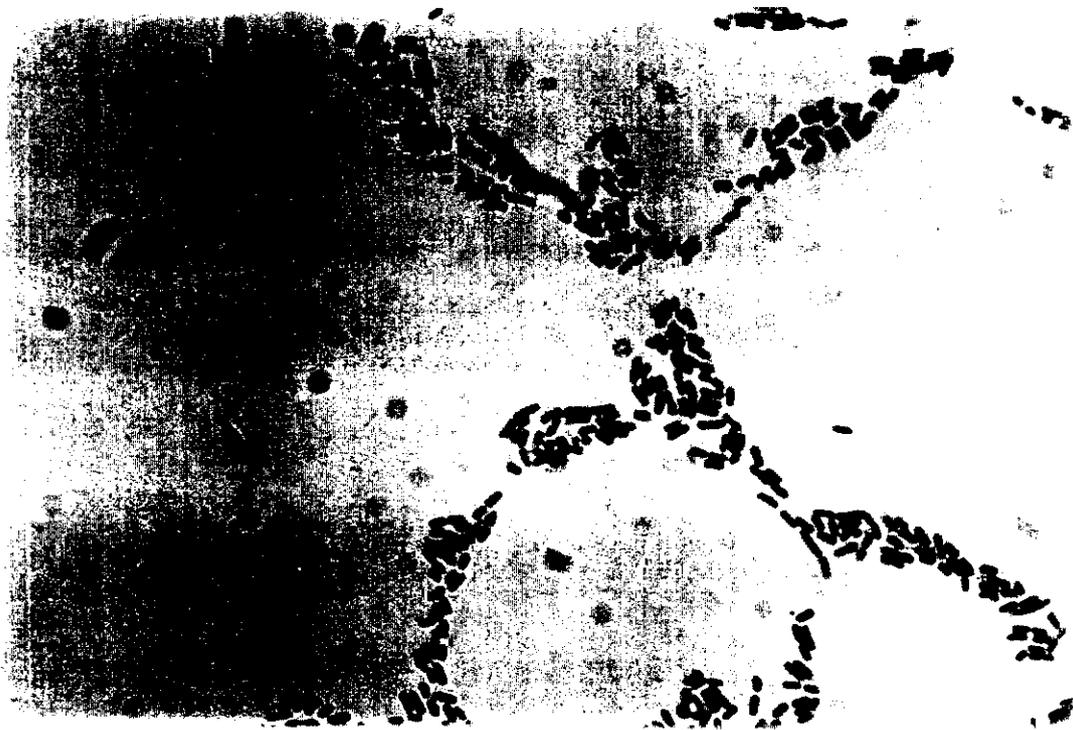


Figura 3.3 Propuesta de las vías metabólicas aerobia y anaerobia, para la desulfuración del DBT (Grossman 1995).



3.4 Estados morfológicos de *Rhodococcus ruber*: bacilo.



3.5 Estados morfológicos de *Rhodococcus rhodochrous*: bacilo y coco.

Se han descrito otros microorganismos con patrones metabólicos similares a IGTS8, como son *Rhodococcus erythropolis*, y *Corynebacterium SY1* (Grossman, 1995, Mamie, 1996). Además se ha aislado un microorganismo capaz de desulfurizar dibenzotiofenos sustituidos adyacentes al átomo de azufre, como el 4,6-dietildibenzotiofeno, de una manera selectiva. El microorganismo ha sido identificado como *Arthrobacter* (Lee, 1995).

3.5 Rutas metabólicas propuestas para la desulfuración del DBT por *Rhodococcus rhodochrous*

Se han propuesto diversas rutas metabólicas de la desulfuración del DBT por *Rhodococcus rhodochrous*, la más aceptada es la ruta denominada 4S (Gallagher, 1993, Kilbane, 1992), en la cual el DBT sufre una primera oxidación para producir el sulfóxido del DBT, posteriormente se forma la sulfona del DBT a consecuencia de una segunda oxidación. El tercer intermediario propuesto es el DBT sulfonato, del cual se libera el sulfato para dar finalmente el 2 hidroxibifenilo (figura 3.6).

Gray (1996) propone que la conversión de DBT a 2 hidroxibifenilo (HBF) está catalizado por un sistema multienzimático el cual consiste en dos monooxigenasas y una desulfinasas, dando como producto 2-hidroxibifenilo, el cual se libera al medio mientras que el azufre inorgánico producido se asimila por otras rutas metabólicas.

La última reacción catalizada por la desulfurinasas parece ser el paso limitante en la ruta metabólica (Gray, 1996). Se han realizado estudios a nivel de la secuencia de DNA de las enzimas que participan en la biodesulfuración y se han caracterizado los genes involucrados (Denome, 1994 y 1995).

Estudios con azufre radiactivo demuestran que el sulfito es el producto final de la desulfuración del DBT por *Rhodococcus* IGTS8. El sulfito es liberado en la fase acuosa, en la cual bajo condiciones de aireación se convierte a sulfato (Johnson, 1994).

En base a isótopos se ha demostrado que el oxígeno, que se emplea en la oxidación del dibenzotiofeno, se obtiene a partir del aire adicionado al sistema (Lei, 1996).

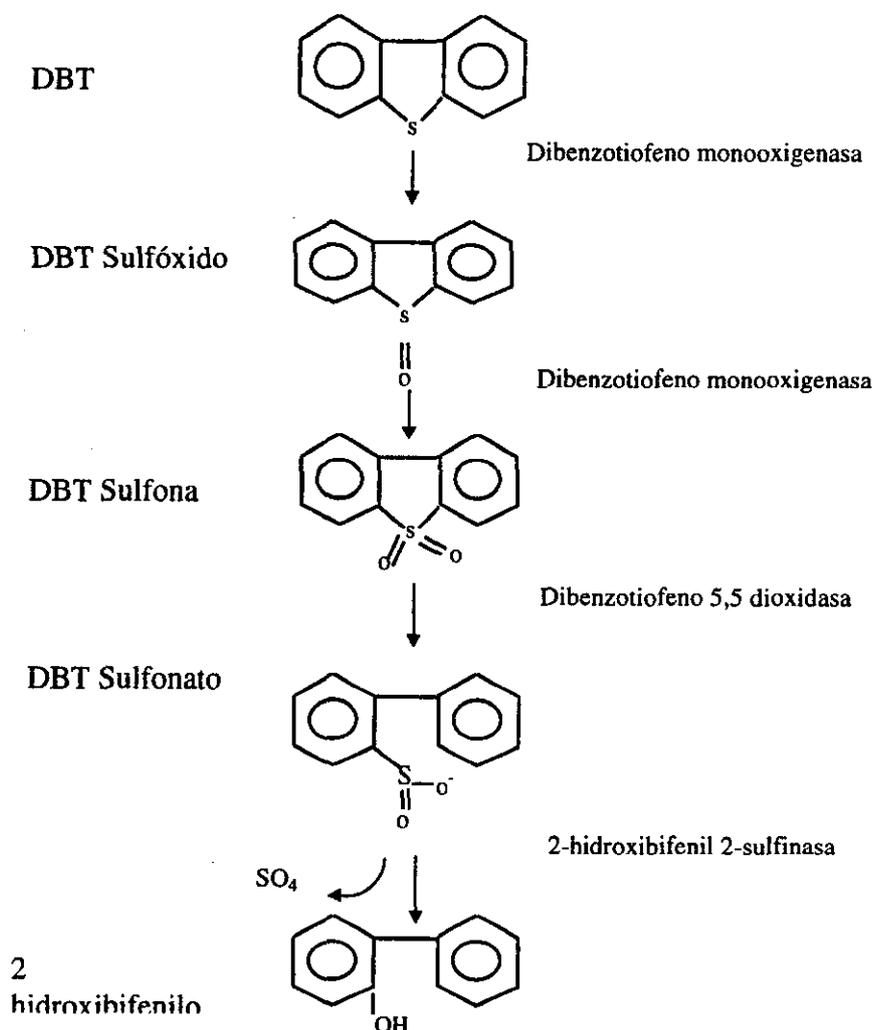


Figura 3.6 Diagrama que muestra la acción de las diferentes enzimas de *Rhodococcus rhodochrous* que participan en la desulfuración del DBT.

3.6 Proceso

Diversas compañías han propuesto un tren de proceso para la biodesulfuración de hidrocarburos^(Cooney, 1992, Energy Biosystems, 1992). El proceso consiste en poner en contacto al microorganismo (el cual se hace crecer previamente en un fermentador) con el combustible en un reactor agitado continuo para que se forme una emulsión, se adiciona oxígeno y se controla el pH, así como la temperatura. El producto de la reacción es una mezcla de hidrocarburo con bajo contenido de azufre y microorganismos en la fase acuosa. El combustible y el agua son separados por un equipo de decantación, el microorganismo se recircula al sistema mientras que el hidrocarburo puede seguir los pasos normales de refinación. El proceso se observa en la figura 3.7.

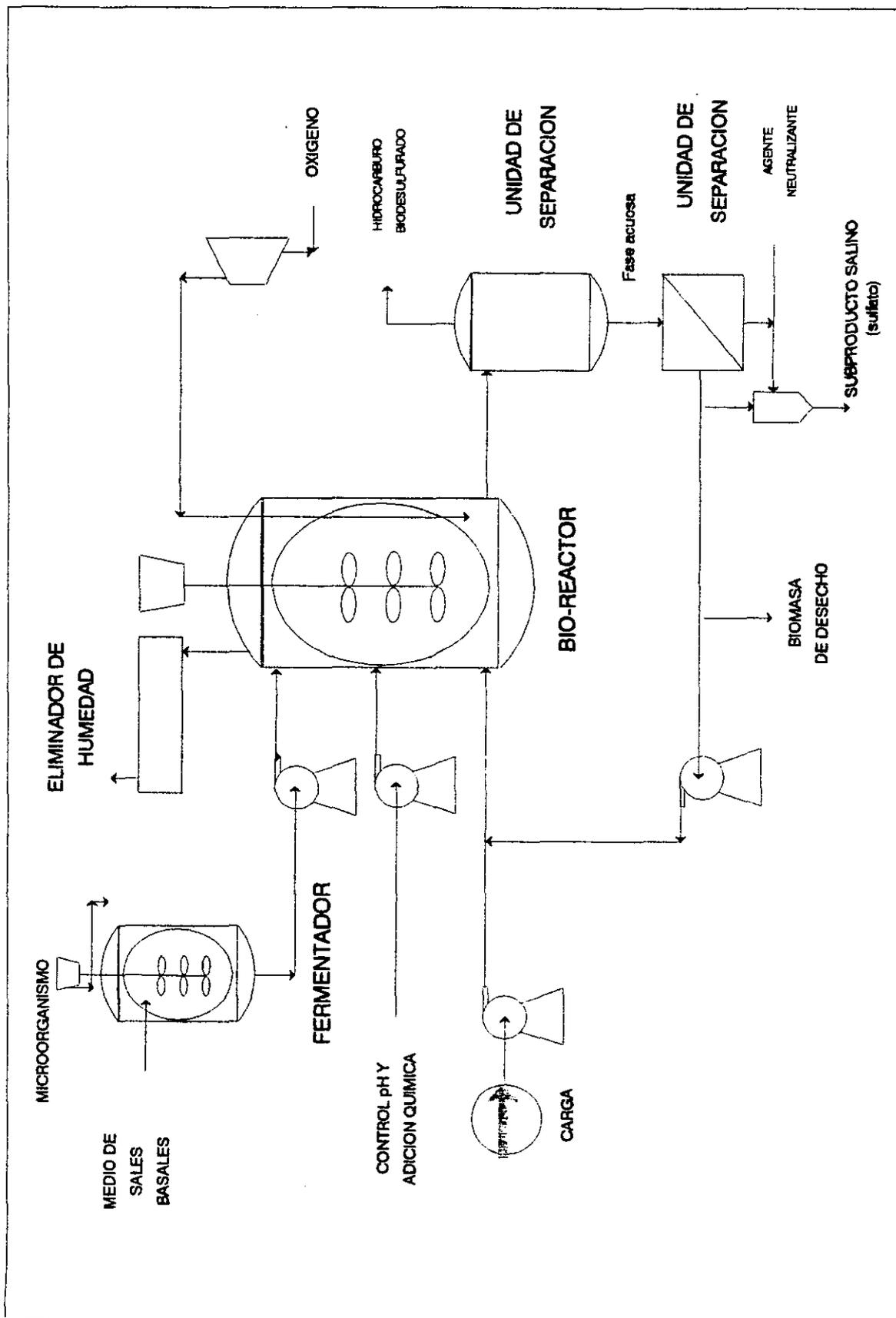


Fig.ura 3.7 Esquema de un posible proceso de biodesulfuración (Cooney 1992).

Debido a que el sulfato puede inhibir la biodesulfuración, los iones sulfato se deben remover y neutralizar. Una de las alternativas es la precipitación de sulfato, para producir sulfato de calcio para su posterior disposición como desecho no peligroso o bien combinarlo con amonio para producir sulfato de amonio como fertilizante (Monticello, 1993 b).

El proceso puede plantearse como multietapas, consistente en reactores en serie, con el fin de incrementar la eficiencia (Valentine, 1992) o bien se puede combinar con el proceso de hidrodesulfuración para tener un producto con un contenido de azufre menor al 0.05 % en peso (Monticello, 1991). El costo estimado del proceso de biodesulfuración es de 2 dólares por barril de crudo (Energy Biosystems, 1992, Rhodes, 1995).

3.7 Comparación entre la hidrodesulfuración y la biodesulfuración

A diferencia del proceso de hidrodesulfuración (HDS) el cual se opera bajo condiciones severas, el proceso de biodesulfuración (BDS) se trabaja a una temperatura moderada (aproximadamente 30-35°C) y una atmósfera de presión, siendo portanto un sistema energeticamente más barato. Las diferencias más importantes entre los dos procesos se enlistan en la tabla 3.2.

Tabla 3.2 Comparación entre la hidrodesulfuración y la biodesulfuración.

Característica/ tipo de proceso	HDS	BDS
Presión atm	54.75	1
Temperatura °C	350	35
Tiempo de residencia (h)	2	6
Catalizador o agente biológico	Cobalto/molibdeno Níquel/molibdeno	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>
Aplicaciones	Gasolinas, naftas combustóleo, diesel y gasóleo	Gasolina, diesel, naftas, combustóleo

Fuente: Bremauntz, 1996.

Capítulo 4

Desarrollo experimental

El desarrollo experimental de la tesis se describe a continuación siguiendo la secuencia de eventos con que fue planeada y ejecutada.

En primer lugar se estudiaron diferentes formulaciones de medio de cultivo con el fin de propagar a la bacteria y obtener suficiente biomasa para las pruebas posteriores (punto 4.1). A la par se implemento un método, mediante cromatografía de líquidos (punto 4.2) para detectar y cuantificar al dibenzotiofeno (DBT) y a los posibles productos de la desulfuración: 2-hidroxibifenilo (HBF), 2,2-bifenol (BF) y la sulfona del dibenzitiofeno (DBTS).

En las pruebas de actividad (punto 4.3) se estudiaron diferentes factores que inciden en la desulfuración del DBT como son el pH, la fuente de carbono y la concentración de inóculo. Por otra parte se evaluó el efecto que tenía en la remoción, la presencia de los posibles productos de la desulfuración (sulfato, HBF y BF), debido a que estos compuestos se consideran inhibidores del sistema enzimático de la desulfuración (punto 4.4).

Por último se realizaron pruebas de biodesulfuración utilizando diesel proveniente de la refinería RIAMA de Salamanca (punto 4.5).

4.1 Producción de biomasa

4.1.1 Microorganismo y medios de cultivo

El Microorganismo que se empleó en los experimentos fue *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, adquirido de la American Type of Culture Collection (ATCC). La bacteria se conservó en refrigeración a 4 °C.

Para las pruebas de actividad y de biomasa se empleó el medio basal de sales (MBS) indicado por Olson⁽¹⁹⁹³⁾ (tabla 4.1), como fuente de carbono se utilizó glicerol al 1% y dibenzotiofeno al 0.1 % como fuente de azufre.

Tabla 4.1 Formulación del medio basal de sales (MBS).

Compuesto	Concentración en g/l
NaH ₂ PO ₄	4
K ₂ HPO ₄	4
MgCl ₂	0.2
FeCl ₃	0.001
CaCl ₂	0.001

El medio de propagación fue el medio basal de sales suplementado con extracto de levadura (3 g/l) y glicerol al 1 %.

Los medios, así como los materiales utilizados para los cultivos fueron esterilizados por calor húmedo en autoclaves, empleando una presión de 15 lb/in² (1 atm) durante 15 minutos. El manejo de los medios de cultivo, así como la del microorganismo, se realizó en condiciones de esterilidad empleando una campana de flujo laminar marca Enviroco.

4.1.2 Condiciones de incubación

El microorganismo fue incubado en una agitadora New Bruswick a 100 r.p.m. con temperatura controlada a 30 ° C, el periodo de incubación fue de 96 horas.

4.1.3 Preparación del inóculo

Rhodococcus rhodochrous se sembró en tubos inclinados formulados con el medio basal de sales y agar, los cuales se refrigeraron a 4°C para su preservación. El microorganismo se propagó cultivándolo en un medio líquido de sales con extracto de levadura, después del

periodo de incubación, el medio se centrifugó a 7000 r.p.m. durante 15 minutos, posteriormente, en condiciones de esterilidad, las células fueron lavadas y resuspendidas con solución salina (NaCl al 0.85 %), y se determinó la densidad óptica con un espectrofotómetro Hach DR2000. La suspensión se refrigeró y se utilizó para inocular los matraces de las pruebas posteriores.

4.1.4 Determinación del peso seco

El peso seco se determinó por el método gravimétrico. Los recipientes previamente acondicionados (24 horas en una estufa a 120 ° C) fueron pesados en una balanza analítica, posteriormente se les colocó un volumen conocido de una suspensión celular y se les dejó en una estufa hasta peso constante (24 horas a 120 ° C). Los recipientes se pesaron nuevamente y se determinó la diferencia de pesos.

4.1.5 Efecto combinado de la fuente de carbono, nitrógeno y azufre

Como fuente de carbono se probaron: etanol, sacarosa, glucosa y glicerol, al 1 y 3 %. Para el nitrógeno se utilizó el extracto de levadura y el cloruro de amonio a 3 g/l. Como fuente de azufre se empleó dibenzotiofeno (DBT) y sulfato de sodio en una concentración de 1 g/l. Los matraces se inocularon con 0.3 ml de una suspensión celular con una densidad óptica de 10 unidades. Cada 24 horas se monitoreó la absorbancia (a 550 nm) de los medios con un espectrofotómetro. Al final del periodo de incubación se determinó el peso seco de la biomasa.

4.2 Desarrollo del método analítico

4.2.1 Perfil de estándares en ultravioleta (UV)

Se realizó el perfil del espectro ultravioleta visible (200-400 nm. de longitud de onda) para cada uno de los siguientes estándares: dibenzotiofeno, 2,2-bifenol, 2-hidroxibifenio y la sulfona del DBT, se utilizó un espectrofotómetro Varian modelo Cary I. Se determinó el máximo de absorción de cada compuesto, con el fin de seleccionar la longitud de onda a emplear en el equipo de HPLC.

4.2.2 Separación y cuantificación de los metabolitos

Se preparó una solución de los cuatro metabolitos estudiados (DBT, HBF, BF y DBTS) (tabla 4.2) la cual se analizó en el cromatógrafo de líquidos Hewlett Packard modelo 1050 empleando una columna de fase reversa ODS-hypersil y un sistema de gradiente agua-acetonitrilo. El detector fue una lámpara ultravioleta la cual se manejó a 245 nm. El testigo interno fue naftaleno a una concentración de 0.26 mg/ml.

Tabla 4.2 Concentración de estándares para las pruebas de detección en el HPLC.

Concentración	mg/ml
Sulfona DBT	2
2,2 Bifenol	2
2 hidroxibifenilo	1.2
DBT	1.2

La concentración de cada compuesto en la mezcla varió, dependiendo de la sensibilidad para su detección. En el caso de la sulfona del DBT y el 2,2 bifenol, que son más polares y que dan picos de menor tamaño, se utilizó una mayor cantidad del compuesto.

Se inyectaron muestras de la mezcla de estándares a diversas concentraciones, cada una por triplicado. Los resultados fueron promediados y a partir de ellos se obtuvieron las curvas de calibración que relacionan la altura observada en el cromatograma, para cada muestra, con su concentración (Anexo I).

4.2.3 Tratamiento de las muestras para la extracción de metabolitos

Las células de *Rhodococcus rhodochrous* fueron incubadas 96 horas a una temperatura de 30 °C en matraces nefelométricos de 250 ml, empleando 20 ml de volumen de medio de sales y DBT a 1 g/l. Terminado el tiempo de incubación se adicionó acetonitrilo 1:1 volumen/volumen (v/v). Posteriormente, la preparación se centrifugó y se cuantificó el DBT del sobrenadante por HPLC, empleando una columna de fase reversa ODS-hypersil y un sistema de gradiente agua-acetonitrilo.

4.3 Pruebas de actividad

4.3.1 Cinética y velocidad de remoción del DBT

Las pruebas consistieron en colocar 14 matraces nefelométricos con 20 ml del medio basal de sales y 20 mg de DBT. Los matraces se esterilizaron, inocularon y posteriormente se incubaron. Cada 24 horas se analizaron 2 matraces, durante un intervalo de 7 días. Las muestras se procesaron y se determinó la concentración del DBT residual. La toma de muestras fue por duplicado y se determinó el peso seco de cada muestra.

4.3.2 Efecto del pH

Se probaron 4 diferentes condiciones de pH: 5, 6.5, 7 y 8. La prueba consistió en colocar 20 ml del medio basal de sales y 20 mg de DBT en matraces nefelométricos. Se empleó NaOH 0.1 N y HCl 0.1 N para ajustar el pH de los medios. Terminado el tiempo de incubación las muestras se procesaron y se determinó la concentración del DBT. Se utilizó como referencia el pH 6.5, que corresponde al pH del medio de cultivo recién preparado. Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.3.3 Efecto de la fuente de carbono

En matraces nefelométricos se colocaron 20 ml del medio basal de sales y 20 mg de DBT, las diferentes fuentes de carbono empleadas fueron: glicerol, glucosa, sacarosa y etanol. Con el fin de conocer el efecto de la concentración, se utilizó cada sustrato al 1 y 3 % peso/volumen. Después de 96 horas, los matraces se procesaron y se determinó el porcentaje de remoción del diebenzotiofeno. Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.3.4 Efecto de la concentración inicial de inóculo

Los ensayos consistieron en inocular los matraces con 0.3 ml de las suspensiones celulares de *Rhodococcus rhodochrous*, con diferentes concentraciones de biomasa: 14, 8, 4, 3, 1.8 (g/l en peso seco), cada matraz contenía 20 ml del medio basal de sales y 20 mg de DBT. Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.3.5 Reutilización de la biomasa

Para el experimento se emplearon matraces nefelométricos con 20 ml de medio basal de sales y 20 mg de DBT, los cuales se esterilizaron y se inocularon inicialmente con 0.3 ml de una suspensión celular de *Rhodococcus rhodochrous*. Los matraces se incubaron durante 96 horas, se disolvió el DBT adicionando acetonitrilo. Posteriormente, la muestra se centrifugó a 7000 r.p.m. El sobrenadante se analizó por HPLC mientras que la biomasa se resuspendió y se lavó con solución salina, centrifugando nuevamente a la velocidad descrita, se midió la densidad óptica de la suspensión y se resembró la biomasa (0.3 ml por matraz) en medio fresco de sales con DBT. El proceso se repitió 4 veces.

4.4 Pruebas de inhibición

4.4.1 Inhibición por sulfato

Se probaron 4 diferentes concentraciones de sulfato de sodio: 0.1, 0.5, 1 y 2 g/l. Los ensayos consistieron en colocar 20 ml del medio basal de sales y 20 mg de DBT en matraces nefelométricos. Se tomaron como testigo medios sin sulfato. Las pruebas se realizaron por triplicado.

4.4.2 Efecto de la concentración de dibenzotiofeno

El propósito de la prueba fue evaluar la actividad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 en diferentes concentraciones de DBT. Los ensayos se realizaron colocando 20 ml del medio basal de sales y diferentes concentraciones de dibenzotiofeno (0.25, 0.5, 1, 2, 3 y 5 g /l). Los ensayos se realizaron por triplicado; se tomaron como testigo medios con 1g/l de DBT, que es la concentración comúnmente empleada en los ensayos de desulfuración^(Olson, 1993).

4.4.3 Efecto del 2,2- bifenol

Se trabajaron 15 matraces cada uno con 20 ml del medio basal de sales y 20 mg de DBT. Se manejaron 4 diferentes concentraciones del 2,2 bifenol: 0.25, 0.5, 1 y 2 g/l. Se realizaron los ensayos por triplicado, tomándose como testigos medios sin adición de 2,2-bifenol.

4.4.4 Inhibición por el 2-hidroxibifenilo

El ensayo se realizó utilizando 4 diferentes concentraciones del 2-hidroxibifenilo: 0.1, 0.5, 1 y 2 g/l. El sistema de reacción consistió en matraces con 20 ml del medio basal de sales y 20 mg de DBT. Se trabajaron 3 muestras, sin éste compuesto, como testigo. Lo ensayos se realizaron por triplicado.

4.5 Pruebas con diesel

4.5.1 Pruebas de desulfuración con diesel

Se probó diesel primario de la refinería de Salamanca con un contenido de azufre del 1.73 % en peso. Las pruebas se realizaron colocando en un matraz nefelométrico, 50 ml de medio, el cual consistía en una mezcla de diesel y solución salina (0.85 % de NaCl). El diesel se filtró utilizando membranas millipore de 0.45 μm . La solución salina y los matraces se esterilizaron en autoclave a 15 lb/in² (1 atm) durante 15 minutos. Se probaron las siguientes relaciones: 10%, 15 % y 20% de diesel v/v. Cada matraz se inoculó con 1 ml de una suspensión de *Rhodococcus rhodochrous* con una absorbancia de 75 unidades. Los matraces se incubaron a 30 °C a 100 r.p.m. durante 8 días. La muestra se centrifugó a 7000 r.p.m. durante 15 minutos para separar la solución acuosa de la fase orgánica, a la cual se le determinó el contenido de azufre total con un detector marca Horiba, modelo Sifa 1100H^(Premuzic, 1994). Cada una de las pruebas se realizó por triplicado.

4.5.2 Pruebas con una fracción organosulfurada del diesel

Se aisló del diesel, mediante cromatografía de adsorción y de complejamiento, una fracción de compuestos aromáticos, con alto contenido de azufre^(Aguilar, 1997). La fracción azufrada se disolvió en 1 ml de dodecano y esta mezcla se utilizó para realizar pruebas con el microorganismo. En matraces nefelométricos de 250 ml de volumen se colocaron 18.5 ml de solución salina al 0.85 % y 0.45 ml de la mezcla de dodecano y 1 ml de una suspensión concentrada de células de *Rhodococcus rhodochrous* proveniente de un cultivo con DBT. Los matraces se incubaron durante una semana y se realizó la extracción de la fase orgánica con tolueno. Se separó la fase acuosa y la mezcla se concentró evaporando el solvente. El concentrado de la fracción azufrada se inyectó en un equipo de cromatografía de gases Perkin Elmer modelo 8500. Se obtuvieron los cromatogramas antes y después del tratamiento.

4.6 Diseño de experimentos

4.6.1 Diseño factorial

Para el análisis del efecto combinado de la fuente de carbono, nitrógeno y azufre (punto 4.1.5) se determinó emplear un diseño factorial^(Montgomery 1991). Este tipo de análisis se utiliza para estudiar el efecto conjunto de varios factores sobre una respuesta, permitiendo determinar su grado de interacción.

Como análisis preliminar debe probarse la independencia y la normalidad de los datos, además de la igualdad de las variancias.

El diseño factorial de dos factores puede describirse por la siguiente ecuación:

$$y_{ijk} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk} \begin{cases} i = 1, 2, \dots, a \\ j = 1, 2, \dots, b \\ k = 1, 2, \dots, n \end{cases}$$

Donde μ es el efecto medio general, τ_i es el efecto del i -ésimo nivel del factor renglón A, β_j es el efecto del j -ésimo nivel del factor columna B, $(\tau\beta)_{ij}$ es el efecto de la interacción entre τ_i y β_j , el error aleatorio está simbolizado por ε_{ijk} . Se supone que ambos factores son fijos y que los efectos de tratamiento se definen como desviaciones de la media general.

El análisis consiste en probar la hipótesis nula (H_0), donde se plantea de la igualdad de los efectos de tratamientos de renglón, es decir:

$$H_0: \tau_1 = \tau_2 = \dots = \tau_a$$

$$H_1: \text{al menos una } \tau_i \neq 0$$

De la igual forma los efectos de tratamientos de columna tienen que ser probados:

$$H_0: \beta_1 = \beta_2 = \dots = \beta_b$$

$$H_1: \text{al menos una } \beta_j \neq 0$$

También es importante probar si los tratamientos de renglón y columna interaccionan. Es decir se tiene que probar:

$$H_0: (\tau\beta)_{ij} = 0 \quad \text{para toda } i, j$$

$$H_1: \text{al menos una } (\tau\beta)_{ij} \neq 0$$

- Los factores estudiados para desarrollar la prueba fueron:
 - a) Fuente de nitrógeno.
 - b) Fuente de azufre.
 - c) Fuente de carbono.
- La variable de respuesta fue el peso seco de la biomasa del microorganismo.

Las consideraciones que se hicieron fueron:

- Los factores que intervienen se consideran fijos (fuente de carbono, nitrógeno y azufre).
- Pueden existir interacciones entre estos factores.
- Los ensayos se realizaron por triplicado para cada combinación de factores .
- Se realizaron un total de 48 observaciones (4 fuentes de carbono x 2 fuentes de azufre x 2 fuentes de nitrógeno x 3 réplicas).

En el caso que se determine que existen diferencias significativas se realizará un análisis de medias utilizando los intervalos múltiples de la prueba de Duncan^(Montgomery, 1991).

4.6.2 Comparación por intervalos múltiples de Duncan

Para estudiar el efecto del pH (4.3.2), la fuente de carbono (4.3.3) y la cantidad inicial de inóculo (4.3.4) en la remoción del DBT, se realizó la comparación de medias de tratamientos individuales. La hipótesis nula a probar es $H_0: \mu_i = \mu_j$ para toda $i \neq j$. Si se encuentran diferencias se utilizara la comparación por intervalos múltiples de Duncan. En este procedimiento se comparan todas las parejas de medias. La técnica se realiza con muestras del mismo tamaño, los promedios de las mismas son ordenadas de forma ascendente y se determina el error estándar de cada promedio:

$$S_{\bar{y}_i} = \sqrt{\frac{MS_e}{n}}$$

Donde MS_e es la media de cuadrados y n es el número de elementos por tratamiento. A partir de la tabla de intervalos significativos de Duncan se obtienen los valores $r_{\alpha}(p, f)$ para $p= 2,3,\dots, a$. Donde a es el número de tratamientos, α es el nivel de significación y f es el número de grados de libertad del error. Estos intervalos deben transformarse en un conjunto de $a-1$ mínimos intervalos significativos R_p para $p= 2,3,\dots,a$, calculando:

$$R_p = r_{\alpha}(p, f) S_{yi} \quad \text{Para } p= 2,3,\dots,a$$

Se prueban las diferencias observadas entre las medias, comenzando por el valor más alto contra el más pequeño, comparando la diferencia con el intervalo mínimo significativo R_a . Después se calcula la diferencia entre el valor más alto y el segundo más pequeño y se compara con el intervalo significativo R_{a-1} . Este procedimiento continúa hasta que todas las medias han sido comparadas. Si una diferencia observada es mayor que el intervalo mínimo significativo correspondiente, se considera que la pareja de medias es significativamente diferente.

Para el análisis se realizaron las siguientes consideraciones:

- En los experimentos la variable de respuesta fue la remoción de azufre.
- Los ensayos se realizaron por triplicado.
- Se probó la independencia de los datos, normalidad y la igualdad de las variancias.

Capítulo 5

Resultados

5.1 Producción de biomasa

5.1.1 Efecto combinado de la fuente de carbono, nitrógeno y azufre

El objetivo principal al formular un medio de cultivo, consiste en proporcionar al microorganismo los nutrientes en cantidades apropiadas para su desarrollo. Por lo tanto el medio debe contener carbono, nitrógeno, hidrógeno, oxígeno, fósforo, azufre, calcio y potasio en forma de compuestos que sean asimilables para la bacteria. Además, el medio debe contener pequeñas cantidades de metales como son el fierro, magnesio, manganeso, zinc, etc.

El punto inicial para la preparación del medio de cultivo, fue utilizar un medio mineral (Olson, 1993), el cual proporcionó los nutrientes inorgánicos necesarios para el crecimiento del microorganismo. Se probaron diferentes combinaciones de fuentes de carbono, nitrógeno y azufre, para determinar cual era la formulación más adecuada para el crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous*.

Los diferentes medios de cultivo se planearon y ejecutaron de acuerdo al diseño factorial que se muestra en el anexo III A. Los datos obtenidos de los experimentos se sometieron a un análisis de varianza.

En el caso de los medios que emplean extracto de levadura no se observaron diferencias significativas entre el medio que se le adicionó sulfato y el medio sin sulfato. Esto se explica porque el extracto de levadura contiene aminoácidos y compuestos azufrados que puede emplear la bacteria. Sin embargo se encontró que existe una variación por la fuente de carbono. Se realizó una comparación utilizando la técnica estadística de intervalos múltiples de Duncan, el análisis señala que el glicerol presenta resultados

significativamente mayores que los azúcares y el etanol. Resultado que se observa al comparar las figuras 5.1, 5.2 5.3 y 5.4.

Al comparar los medios con extractos de levadura y cloruro de amonio, el análisis estadístico señala que en relación a la fuente de nitrógeno, el primero presentó mayor crecimiento. Por otra parte existe una interacción importante con la fuente de carbono y el compuesto nitrogenado. El mejor resultado se presentó al utilizar glicerol y extracto de levadura (figura 5.1).

En los medios que utilizaron cloruro de amonio como fuente de nitrógeno, el diseño factorial señala que existe variación por la fuente de azufre y la de carbono. En relación a la primera, el análisis indica que los medios formulados con sulfato de sodio presentaron un mayor crecimiento con respecto a los que contenían DBT. Esto es, porque el microorganismo asimila más fácilmente el primer compuesto. Por otra parte, existen diferencias con respecto a la fuente de carbono. Realizando comparaciones por la prueba de intervalos múltiples de Duncan se encontró que el glicerol y la glucosa presentan los mejores resultados.

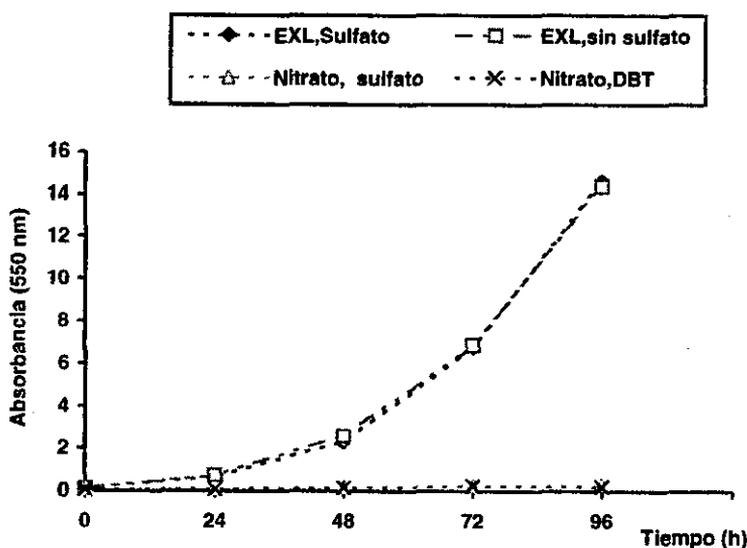


Figura 5.1 Crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* en diferentes fuentes de nitrógeno y azufre en medios formulados con glicerol al 1 %.

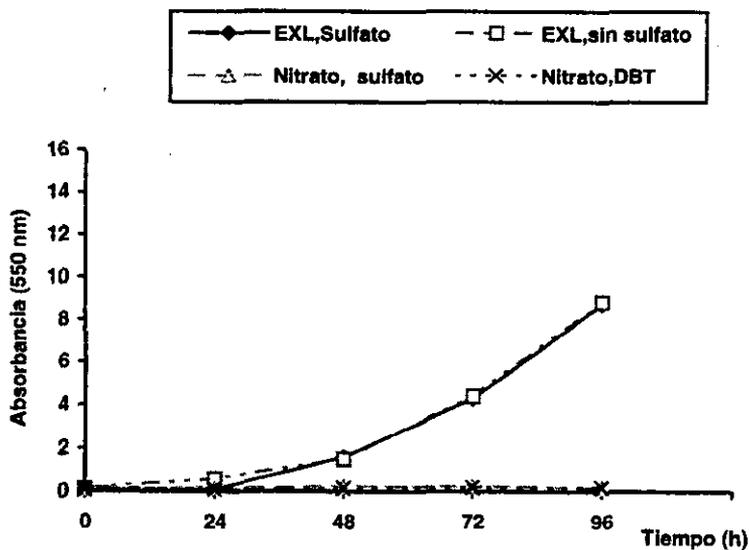


Figura 5.2 Crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* en diferentes fuentes de nitrógeno y azufre en medios formulados con glucosa al 1 %.

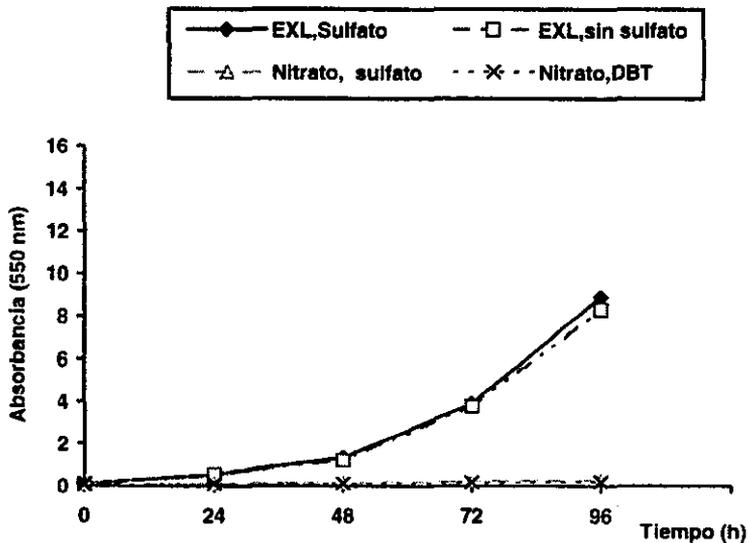


Figura 5.3 Crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* en diferentes fuentes de nitrógeno y azufre en medios formulados con sacarosa al 1 %.

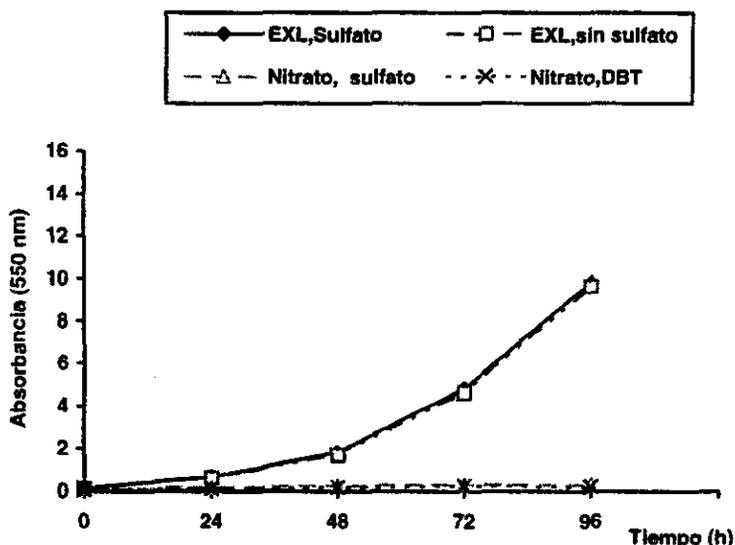


Figura 5.4 Crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* en diferentes fuentes de nitrógeno y azufre en medios formulados con etanol al 1 %.

Los resultados indican que la fuente de nitrógeno es la que tiene mayor efecto sobre el crecimiento del *Rhodococcus*. Los valores de biomasa más altos se presentaron al emplear el extracto de levadura (tabla 5.1).

Tabla 5.1 Biomasa en peso seco del *Rhodococcus rhodochrous* en diferentes formulaciones de medio.

	NH ₄ Cl		Extracto de levadura	
	DBT	Na ₂ SO ₄	Na ₂ SO ₄	Sin sulfato
Glicerol 1 %	1.6	1.9	8.1	7.9
Glucosa 1 %	1.4	1.8	4.2	4.1
Sacarosa 1 %	1.3	1.4	3.9	4
Etanol 1 %	1.5	1.9	4	3.8

Datos en g/l.

Se realizó también una prueba del efecto de la concentración de la fuente de carbono en medios formulados con cloruro de amonio y DBT. No se observó una diferencia significativa en la producción de biomasa por el aumento de la concentración de la fuente de carbono. Sin embargo, los resultados señalan que la fuente de carbono más propicia para la obtención de biomasa es el glicerol, seguida de la glucosa, independientemente de que la concentración utilizada sea del 1 ó 3 %. Los resultados se presentan en la tabla 5.2 .

Tabla 5.2 Biomasa en peso seco de *Rhodococcus rhodochrous* en diferentes fuentes de carbono.

Fuente de carbono	Concentración de la fuente de carbono	
	1%	3%
Glicerol	1.6	1.8
Glucosa	1.4	1.5
Etanol	1.3	1.3
Sacarosa	1.5	1.5

Datos en g/l.

En función del análisis de resultados, se seleccionó emplear el medio de sales, con extracto de levadura y glicerol. Por otra parte es importante señalar que este medio se utilizó únicamente para la propagación de la biomasa.

5.1.2 Cinética de crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* en MBS

Los estudios cinéticos son necesarios para entender el comportamiento de cualquier fermentación y en general consisten en la medición o estimación de las velocidades de síntesis celulares, formación de productos y de los efectos del medio ambiente sobre estas velocidades.

El crecimiento de las poblaciones bacterianas está limitado normalmente por el agotamiento de nutrientes o bien por la acumulación de productos tóxicos del metabolismo. Como consecuencia la velocidad de crecimiento disminuye y el crecimiento se detiene.

La figura 5.5 muestra la cinética de crecimiento del *Rhodococcus rhodochrous* en el medio basal de sales con glicerol, cloruro de amonio y DBT al 0.1 %, se observa que la fase de crecimiento exponencial inicia aproximadamente a las 48 horas y se prolonga hasta las 96 horas.

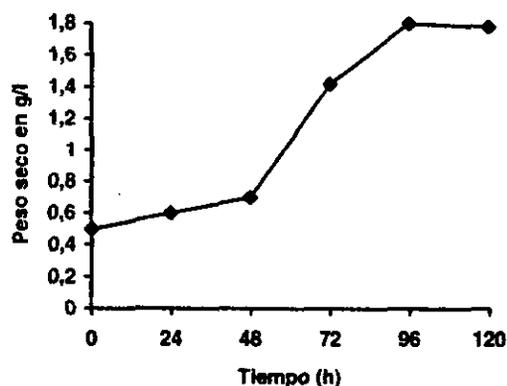


Figura 5.5 Cinética de crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* en el MBS, cloruro de amonio, glicerol al 1 % y DBT al 0.1 %.

A partir de la curva de crecimiento se pueden determinar algunas variables importantes como la constante de velocidad de crecimiento μ ^(Stanier, 1990).

$$\mu = \frac{\ln b_1 - \ln b_0}{t_1 - t_0} \quad (5.1)$$

Donde "b" es la masa celular en g/l y "t" es el tiempo en horas, el subíndice "o" indica el inicio de la fase exponencial y el "1" señala el término de la fase exponencial.

Otro parámetro importante es el tiempo de generación (ecuación 5.2) el cual indica el tiempo requerido para que el número de células en un cultivo se duplique.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} \quad (5.2)$$

Utilizando las ecuaciones anteriores se calculó la constante de crecimiento y el tiempo de duplicación del microorganismo en el medio de cultivo propuesto.

$$\mu = 0.0228\text{h}^{-1}$$

$$t_d = 30.2 \text{ h}$$

El valor calculado indica que el microorganismo creció muy lentamente en relación a otras bacterias aerobias ^(Stanier, 1990), además de que la cantidad de biomasa producida es baja. Es importante señalar que el experimento se realizó a nivel matraz, por lo que es de esperar que al realizar la cinética en un fermentador instrumentado, el tiempo de duplicación disminuya, debido a que existe una mejor transferencia de nutrientes, oxígeno y un mejor control del pH y la temperatura, lo cual debe favorecer el crecimiento del microorganismo.

5.2 Pruebas analíticas

5.2.1 Pruebas de solubilidad

Los cuatro metabolitos estudiados son compuestos no polares, por lo que para su análisis se requiere utilizar cromatografía de fase reversa, en la cual se emplean metanol, acetonitrilo y/o agua como solventes.

Los resultados experimentales indican que los estándares no son solubles en agua ni en la mezcla de metanol con agua. Al emplear metanol puro los compuestos se disolvieron

lentamente y fueron completamente solubles en acetonitrilo al 100 %, así como en la mezcla con agua al 50 %.

La bibliografía indica que el DBT presenta una baja solubilidad en agua ^(Wu, 1994), debido a que es un compuesto no polar y por lo tanto es de esperar que los compuestos semejantes como la sulfona del DBT, el 2,2-bifenol y el 2-hidroxibifenilo, también sean poco solubles.

Los resultados permitieron determinar el empleo de un gradiente agua acetonitrilo como fase móvil, con el fin de crear una diferencia de polaridades que permitiera la separación de los compuestos.

5.2.2 Perfil de estándares en Ultravioleta (UV)

En las siguientes figuras se presenta el perfil de absorción en el espectro UV, de los cuatro metabolitos de interés disueltos en acetonitrilo.

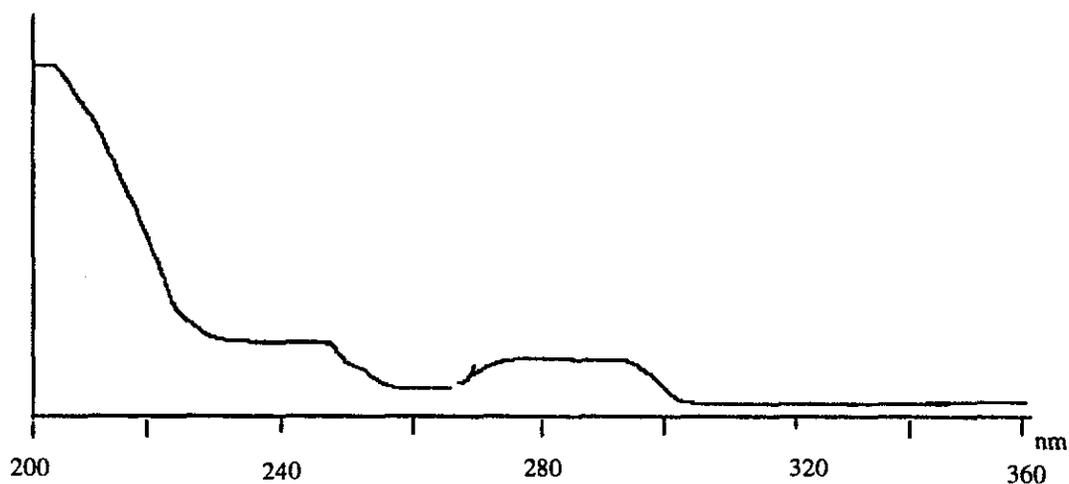


Figura 5.6 Espectro de absorción del 2,2-bifenol (BF) en acetonitrilo.

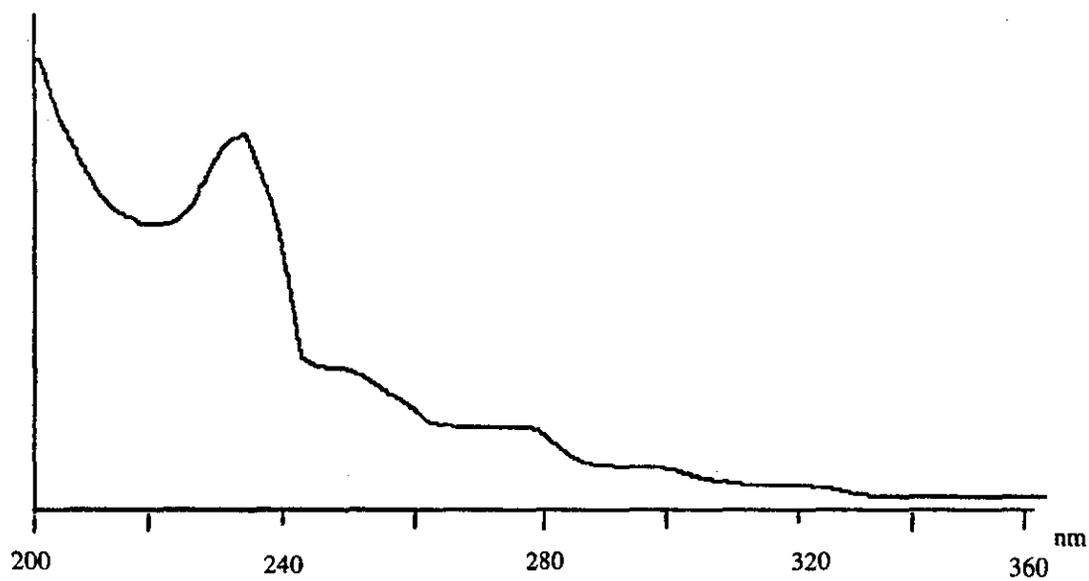


Figura 5.7 Espectro de absorción del dibenzotiofeno (DBT) en acetonitrilo.

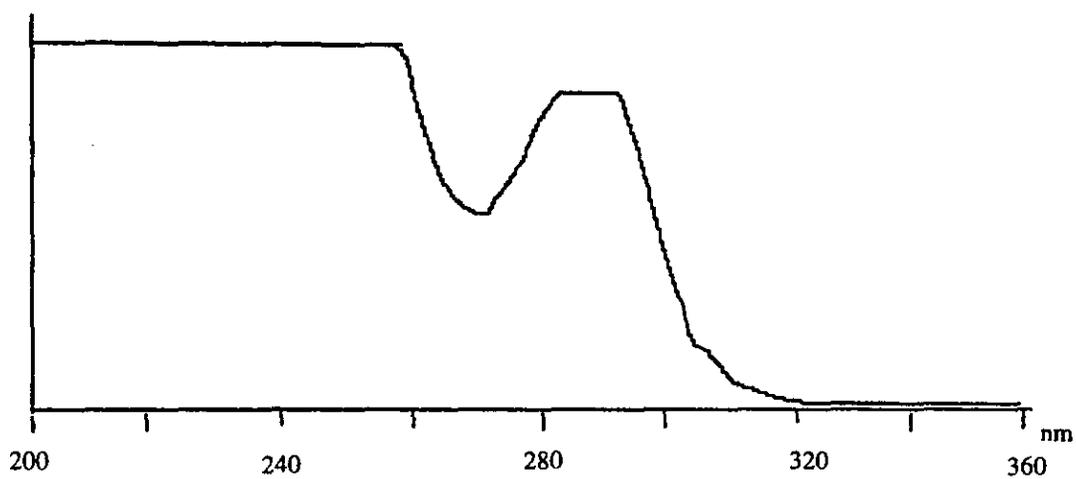


Figura 5.8 Espectro de absorción del 2 hidroxibifenilo (HBF) en acetonitrilo.

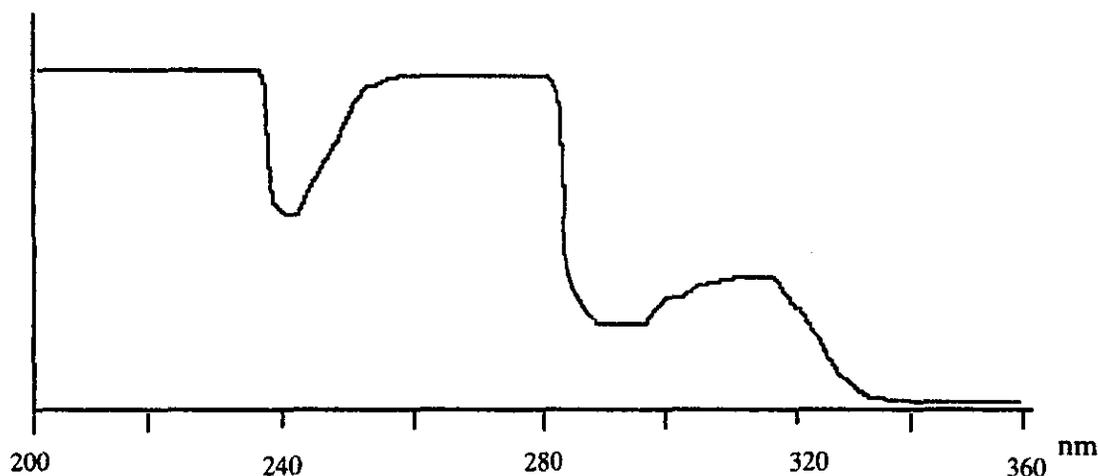


Figura 5.9 Espectro de absorción de la sulfona del DBT (DBTS) en acetonitrilo.

El perfil señala que el máximo de absorción para el 2,2-bifenol es de 205 nm, para el DBT 235 nm, en el caso del 2-hidroxibifenilo se tiene un intervalo máximo de 200 a 250 nm y de 280 a 295, para la sulfona del DBT se tienen 200-235 y de 250 a 280 nm. La selección de la longitud onda, se basó en aquella condición que permitiera la detección de los cuatro componentes, por lo que en primera instancia se probaron 238 y 230 nm como longitud de onda. Sin embargo, conforme ésta disminuía, la sensibilidad del equipo era mayor y se detectaban señales de impurezas de los estándares (la pureza de los estándares utilizados era aproximadamente del 98 %), que interferían en la determinación, por lo que se aumentó gradualmente la longitud de onda. Finalmente se decidió emplear 245 nm en el detector del HPLC, aunque no es el máximo de absorción para todos los compuestos, dicha longitud permitió la identificación de los 4 compuestos y se eliminó la interferencia por impurezas.

5.2.3 Separación y cuantificación de los metabolitos

La figura 5.10 muestra el cromatograma de los estándares de los posibles intermediarios de la desulfuración del DBT realizada por *Rhodococcus rhodochrous*, así como del naftaleno (pico 4) el cual fue utilizado como testigo interno para fines cuantitativos.

El método se validó de acuerdo a los procedimientos establecidos para el aseguramiento de la calidad ^(Keenan, 1989) probándose su exactitud, precisión y repetibilidad. La mezcla de estándares se inyectó varias veces en el cromatógrafo determinándose el promedio y la dispersión del tamaño de los picos con respecto al testigo interno. Los datos se encuentran en el anexo I.

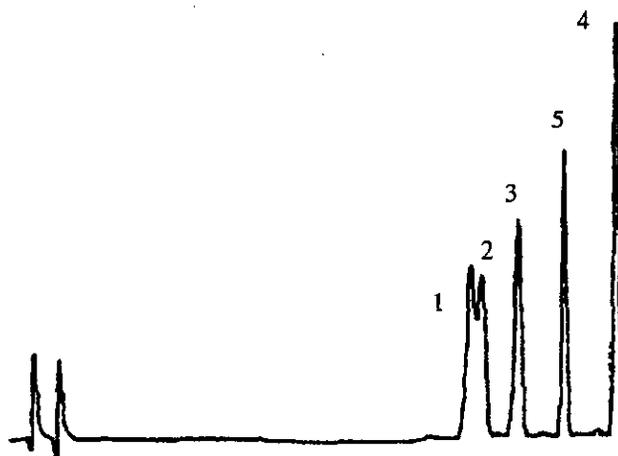


Figura 5.10 Cromatograma de los estándares: (1) DBTS, (2) BF, (3) HBF, (4) Naftaleno, (5) DBT.

Para cada uno de los compuestos se determinó un intervalo lineal de detección (tabla 5.3).

Tabla 5.3 Intervalo lineal de concentraciones detectables en HPLC .

No de pico	Compuesto	Concentración mínima (mg/ml)	Concentración máxima (mg/ml)
1	DBTS	0.040	0.160
2	DHBF	0.040	0.160
3	HBF	0.024	0.79
4	DBT	0.024	0.82
5	Testigo interno naftaleno	0.27 mg/ml	

La técnica descrita permite una fácil identificación y cuantificación de estos compuestos, a diferencia de otras metodologías ^(Sandip, 1997) no se requiere cambiar las condiciones del detector para analizar en la misma corrida los 4 compuestos. El método es aplicable para evaluar la capacidad desulfuradora de diferentes tipos de microorganismos.

Lo más relevante del método desarrollado radica en el análisis del DBT y los intermediarios metabólicos en el mismo medio de cultivo, con la adición de acetonitrilo para solubilizar los compuestos orgánicos. En otras técnicas como la de cromatografía de gases, el DBT y los productos de la desulfuración tienen que ser extraídos de la muestra adicionando un solvente orgánico (tolueno), realizando la extracción repetidas veces. La fase acuosa se separa y se concentra el compuesto evaporando el solvente ^(Olson, 1993). Esta metodología es laboriosa y tiene como principal desventaja que existen pérdidas porque la extracción no es del 100%. Se realizaron pruebas de luminiscencia (el DBT fluoresce en presencia de luz ultravioleta) y se comprobó que al realizar esta técnica, el DBT se adhiere a las paredes del recipiente que se emplea para la extracción, lo que provoca errores en la cuantificación.

Por otra parte se realizaron pruebas de eficiencia del método propuesto, utilizando como testigos 3 ensayos con 20 mg de DBT disueltos en 20 ml del medio basal de sales, se adicionó acetonitrilo, se centrifugó y el sobrenadante se analizó en el HPLC, se determinó la concentración a partir de la curva de calibración y se calculó el porcentaje de error respecto a la concentración inicial (20 mg), el cual fue menor al 5 %. En las pruebas de luminiscencia no se detectaron residuos en el recipiente donde se solubilizó el DBT.

5.2.4 Determinación de la actividad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous*

El método se ha utilizado para determinar la actividad del *Rhodococcus rhodochrous* en estudios de biodesulfuración. En la figura 5.11 se muestra un cromatograma de un medio basal de sales con DBT, después de la actividad del microorganismo.

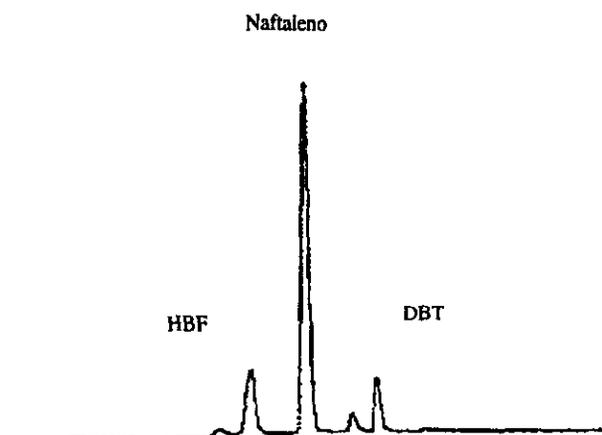


Figura 5.11 Cromatograma del HBF y el DBT.

Los resultados del cromatograma mostraron la disminución del DBT y la presencia del 2-hidroxibifenilo como un producto de la desulfuración. En ninguno de los cromatogramas, de los diferentes ensayos, se detectaron picos de otros metabolitos involucrados en la vía de desulfuración como la sulfona del DBT o el 2- bifenol.

5.3 Pruebas de actividad

5.3.1 Velocidad de remoción del DBT

Al realizar una cinética es importante conocer las velocidades que tiene un microorganismo para producir algún metabolito o bien degradar cierto sustrato. Es importante además determinar si la actividad metabólica de interés está asociada al crecimiento.

En la figura 5.12 se observa la curva de remoción del DBT, en las primeras 48 horas no se presenta actividad, a las 72 horas se detectó actividad desulfuradora, teniéndose la actividad máxima alrededor de las 96 horas.

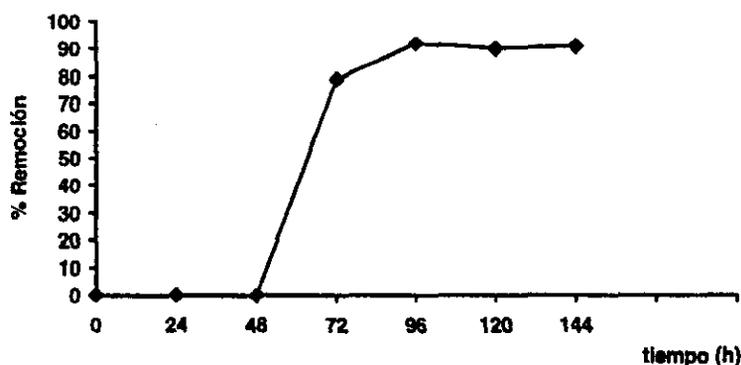


Figura 5.12 Velocidad de remoción del DBT por *Rhodococcus rhodochrous* en MBS.

Es importante señalar que la actividad desulfuradora del microorganismo coincide con la fase exponencial (figura 5.5), lo que podría indicar la utilización del azufre para su crecimiento. Tomando en cuenta que el tiempo de duplicación del microorganismo, la utilización del azufre fue lenta.

5.3.2 Efecto del pH

Además de conocer los nutrientes necesarios para el cultivo del microorganismo, también es conveniente estudiar las condiciones físicas del medio en donde la bacteria pueda desarrollarse mejor. El pH es una de estas variables y tiene gran influencia en la actividad de las enzimas, por lo que es importante determinar el pH óptimo para la desulfuración.

Se realizó una comparación de medias de tratamientos por la prueba de intervalos múltiples de Duncan (anexo III B). Los resultados indican que el pH 6.5 y 7 fueron equivalentes, siendo los que presentan mayor porcentaje de remoción, mientras que al emplear medios con pH 5 y 8 la actividad fue significativamente menor (figura 5.13).

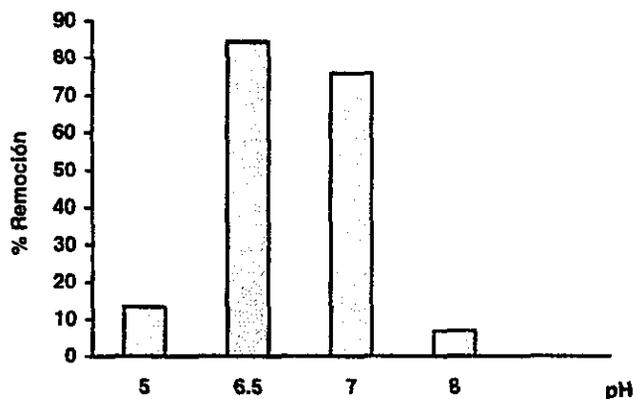


Figura 5.13 Efecto del pH en la actividad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* en MBS.

Para la prueba se realizó la medición del pH antes y después de la incubación para los diferentes valores de pH empleados. Los resultados se observan en la tabla 5.4.

Tabla 5.4 Cambio de pH en la fermentación.

pH inicial	pH final
5	5
6.5	5
7	5
8	8

Los medios formulados con pH 5 y 8 no variaron al finalizar el ensayo, lo cual corrobora la poca actividad microbiana, al no ser una condición favorable para su crecimiento. En contraste, los medios con pH 6.5 y 7 presentaron al final una acidificación, probablemente por los metabolitos acumulados, como pueden ser iones sulfato.

5.3.3 Efecto de la fuente de carbono

En la figura 5.14 se puede observar el porcentaje de DBT removido en el medio en función de la fuente de carbono.

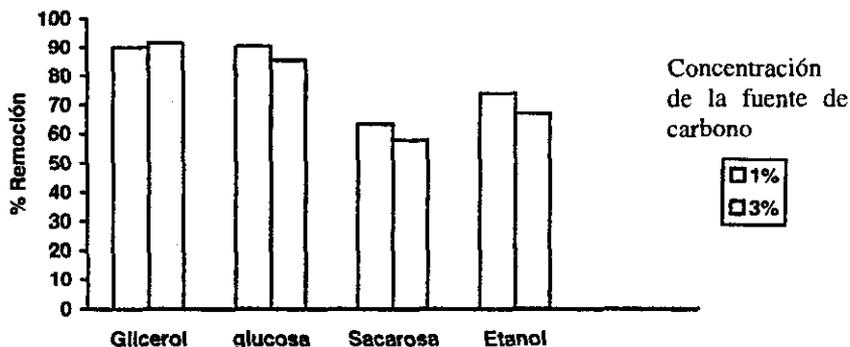


Figura 5.14 Efecto de la fuente de carbono en la actividad desulfuradora.

Se realizó la comparación de medias de los datos obtenidos por la prueba de intervalos múltiples de Duncan (anexo III C). Los resultados indican que no se observaron diferencias importantes por la concentración de las fuentes de carbono, es decir que el porcentaje de remoción fue semejante al utilizarlos al 1 ó 3 %, sin embargo, difieren en relación al tipo de fuente de carbono. El análisis indica que el glicerol junto con la glucosa se presentan como las mejores fuentes de carbono para la formulación de medio, dando resultados equivalentes ($\mu_{\text{glicerol}} = \mu_{\text{glucosa}}$) mientras que los medios formulados con etanol y sacarosa, el porcentaje de remoción fue significativamente menor.

5.3.4 Efecto de la concentración inicial de inóculo

Según la ecuación 5.1 (ver 5.1.2) la producción de microorganismos esta en relación a su concentración inicial, por lo tanto a mayor inóculo, mayor cantidad de microorganismo y por consecuencia mayor desulfuración.

En la figura 5.15 pueden observarse los resultados de la prueba de actividad de diferentes concentraciones de inóculo de *Rhodococcus rhodochrous*.

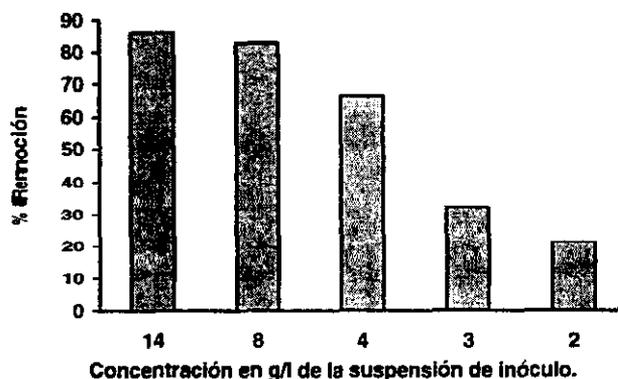


Figura 5.15 Efecto de la concentración inicial del microorganismo.

Los resultados se analizaron por la prueba de Duncan para la comparación de medias. Se encontró que la actividad está en relación con la concentración inicial de inóculo y que los ensayos de 14 y 8 g/l en peso seco son semejantes (Anexo III D), mientras que en los demás casos la actividad baja conforme disminuye la concentración inicial de la bacteria. Se puede estimar entonces que una concentración de microorganismo de 8 g/l (peso en gramos que corresponde a 14.5 unidades de absorbancia) es suficiente para la remoción de 1 g/l de DBT.

5.3.5 Reutilización de la biomasa

En la figura 5.16 se observa una disminución paulatina de la remoción del DBT por *Rhodococcus rhodochrous*, la cual puede explicarse por una pérdida de actividad por las resiembras continuas. Debe aclararse que se realizaron pruebas cualitativas para determinar si el solvente podía afectar al microorganismo, el ensayo consistió en dejar biomasa en una mezcla de acetonitrilo-agua 50/50 durante varias horas, posteriormente se sembró la biomasa en cajas de petri y se incubó, dando como resultado la aparición de colonias a las 72 horas, es decir que la bacteria permaneció viable, sin embargo se debe considerar que el acetonitrilo puede producir cierto grado de toxicidad a las células y que esto afecte su capacidad desulfuradora.

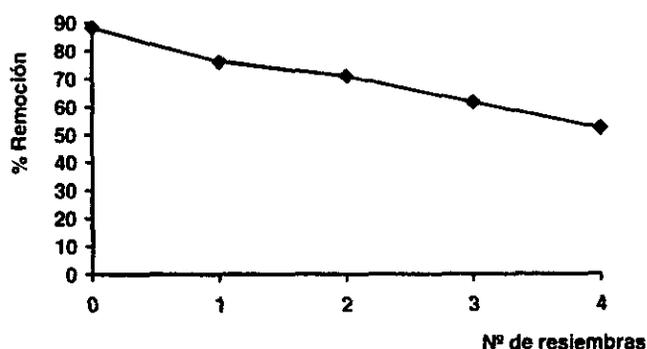


Figura 5.16 Efecto en la remoción del DBT por la reutilización de la biomasa de *Rhodococcus rhodochrous* en MBS .

La bibliografía reporta que la cepa IGTS8 de *Rhodococcus* es estable y conserva su actividad a través de resiembras continuas^(Kilbane, 1992). La experiencia que se ha tenido con la cepa es que la actividad desulfuradora se mantiene siempre y cuando se crezca en medios con DBT o compuestos organosulfurados. Si se emplean continuamente medios ricos como el extracto de levadura o medios con sulfatos la bacteria pierde la capacidad desulfuradora,

posiblemente, debido a que la información se encuentra codificada en plásmido, por lo que al no ser información esencial, ésta se puede perderse si no se utiliza.

Por otra parte se ha observado una disminución de la actividad, por resiembras continuas de la cepa (manipulación por varios meses). De cualquier forma se puede establecer que para condiciones de proceso el microorganismo puede reutilizarse por varios ciclos.

5.4 Pruebas de inhibición

5.4.1 Inhibición por sulfato

Los resultados de la figura 5.17, muestran que a concentraciones bajas de sulfato se presenta remoción del DBT. Sin embargo, se observa que la actividad disminuye, al utilizar una concentración de 0.1 g/l la actividad decrece cerca del 50 %, a 0.5 g/l se pierde más del 70 % de la actividad y a 1 g/l prácticamente no hay remoción del DBT.

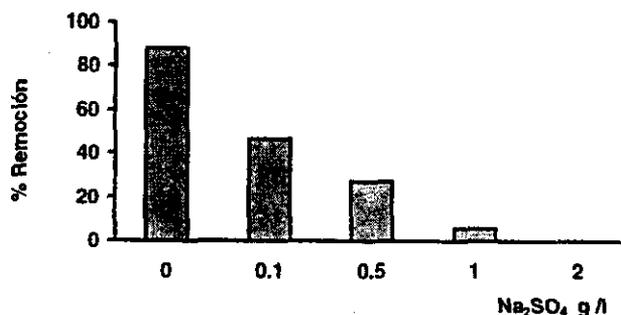


Figura 5.17 Inhibición de la actividad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* por la presencia de sulfato.

Trabajos realizados con *Rhodococcus sp.* IGTS8 (Piddington, 1994) señalan que al adicionar sulfato de sodio a una concentración de 40 mg/l, la remoción del DBT se reduce un 80 %. Los estudios realizados indican que las enzimas involucradas en la conversión del DBT a HBF son reprimidas por la presencia de metionina, cisteína o sulfato (Mamie, 1996).

La biodesulfuración del DBT tiene como objetivo principal para el microorganismo la obtención de azufre, el cual es incorporado a las rutas metabólicas. De acuerdo al principio de economía de la célula, cuando en el medio se presenta suficiente sulfato no se estimula la síntesis de las enzimas involucradas en la desulfuración.

En base a los resultados es importante que se considere en el proceso la remoción del sulfato del medio, con el fin de mantener activo al microorganismo.

5.4.2 Efecto de la concentración del dibenzotiofeno

En la tabla 5.5 se observa que en todos los casos se presentó remoción del DBT. Sin embargo, el porcentaje de desulfuración con respecto a la concentración inicial del compuesto disminuyó a partir de 60 mg que corresponde a una concentración de 3 g/l.

Tabla 5.5 Efecto de la concentración del DBT en la remoción por *Rhodococcus rhodochrous*.

Miligramos inicial de DBT (g/l)	Miligramos de DBT al final del ensayo	Porcentaje de Remoción.
5 (0.25)	0.66	86.67
10 (0.5)	2.06	79.4
20 (1.0)	2.69	86.48
40 (2.0)	4.3	89.16
60 (3.0)	23.66	59.83
100 (5.0)	86.7	13.5

Esta disminución en la actividad puede explicarse por la acumulación sulfato, producto de la desulfuración, en el medio y como se indicó en el punto anterior, la presencia de éste inhibe la actividad de las enzimas involucradas en la desulfuración, lo que trae como consecuencia que el microorganismo no remueva más azufre del DBT.

Es importante señalar que una concentración pequeña de DBT como es 0.25 g/l en el medio fue suficiente para estimular la síntesis de las enzimas involucradas en la desulfuración.

5.4.3 Efecto del 2,2-bifenol

El 2,2- bifenol es uno de los posibles productos de la desulfuración del DBT (figura 3.3). Se ha establecido que su presencia en el medio puede inhibir la actividad de las enzimas desulfuradoras de *Rhodococcus rhodochrous* (Kilbane, 1993 y Gallagher, 1993).

Los resultados señalan que la presencia del hidroxibifenilo en el medio ocasiona una inhibición de las enzimas desulfuradoras, la cual se vio reflejada en la drástica disminución de actividad conforme aumenta su concentración en el medio, al parecer las concentraciones mayores a 1 g/l de BF ocasionan la pérdida total de actividad.

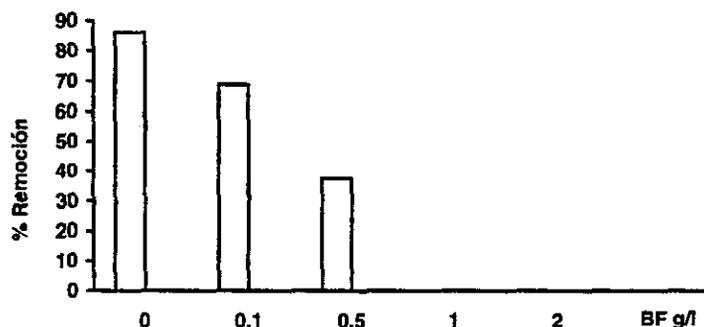


Figura 5.18 Inhibición de la actividad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* por la presencia de 2,2-bifenol.

En la bibliografía se indica que la actividad del extracto enzimático de *Rhodococcus erythropolis* se ve inhibida por la presencia del 2,2-bifenol, este compuesto a concentraciones 1 mM (0.18 g/l) puede disminuir la actividad desulfuradora hasta un 80 % (Oshiro, 1996). El autor propone que los grupos hidroxilos de este compuesto son tóxicos para el microorganismo.

Es importante mencionar que las condiciones experimentales utilizadas por Oshiro y colaboradores⁽¹⁹⁹⁶⁾, fueron diferentes a las empleadas en el presente trabajo, ya que ellos reportaron el uso de un extracto de células, a concentraciones bajas de DBT (0.18 g/l). En el presente estudio se llevaron a cabo los experimentos con células completas y 1 g/l de DBT. En función de los resultados se puede establecer que la pérdida de actividad, por la presencia del 2-bifenol es menor con las células completas; aparentemente el microorganismo puede desulfurar soportando mayores concentraciones del BF que el extracto.

Por otra parte se observó que la densidad óptica de los ensayos fue similar, es decir la presencia del bifenilo no afectó la producción de biomasa (tabla 5.6), por lo se considera que el efecto del compuesto solo actúa a nivel de las enzimas involucradas en la desulfuración. Sin embargo, el resultado debe considerarse con reserva, debido a que el MBS no es favorable para el crecimiento.

Tabla 5.6 Efecto en la actividad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* por la presencia de BF.

g/l BF	Densidad óptica del medio al finalizar el ensayo	Densidad óptica del medio al finalizar el ensayo
0	0.115	0.512
0.1	0.109	0.535
0.5	0.098	0.489
1	0.103	0.460
2	0.112	0.0505

5.4.4 Inhibición por 2-hidroxibifenilo

El 2-hidroxibifenilo es el producto que se ha detectado en las pruebas la desulfuración del DBT (figura 5.11), por lo cual es importante estudiar el efecto que ejerce en la actividad del microorganismo.

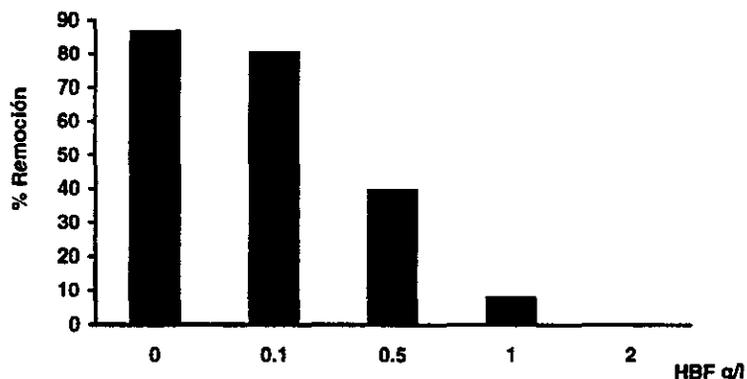


Figura 5.19 Inhibición de la actividad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* por la presencia de 2- hidroxibifenilo.

Oshiro y colaboradores⁽¹⁹⁹⁶⁾ indican que el 2-hidroxibifenilo también inhibe la actividad desulfuradora de *Rhodococcus erythropolis*. Esto coincide con los resultados experimentales de este trabajo como se muestra en la figura 5.19. Se observa que la presencia de éste compuesto ocasiona una pérdida de la actividad desulfuradora. A concentraciones pequeñas (0.1 g/l) no se observa un efecto importante en la remoción, pero conforme su concentración aumenta la remoción disminuye. A concentraciones mayores de 1 g/l no se detectó actividad.

Al igual que en el caso del 2,2-bifenol, los valores de absorbancia al finalizar las 96 horas de incubación, fue semejante para todos los ensayos (tabla 5.7), incluyendo los testigos, por lo que posiblemente el 2-hidroxibifenilo no afecta la producción de biomasa, pero ejerce una inhibición sobre las enzimas desulfuradoras.

Tabla 5.7 Efecto en la actividad desulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* por la presencia de HBF.

g/l HBF	Densidad óptica inicial	Densidad óptica final
0	0.101	0.515
0.1	0.093	0.493
0.5	0.107	0.486
1	0.104	0.463
2	0.102	0.475

5.5 Pruebas con diesel

5.5.1 Pruebas de desulfuración con diesel

Se encontró en uno de los ensayos de diesel primario, la remoción de un 15 % del contenido de azufre, este dato no se ha repetido y requerirá pruebas posteriores para su comprobación. Es importante señalar que el microorganismo utilizado como inóculo, en este experimento, se mantuvo en un medio sin azufre, con el fin de someterlo a condiciones de estrés y que al pasarlo al medio con diesel tuviera que metabolizar los compuestos azufrados, para satisfacer sus requerimientos nutricionales.

El contenido de azufre en el diesel es del 1.8 % en peso, lo que representa 18,000 ppm, mientras que las pruebas realizadas con DBT al 0.1 % contienen 0.017% en peso de azufre es decir 173 ppm. En los ensayos con diesel al 10 % se tienen 1,800 ppm lo cual representa una cantidad de azufre 10 veces mayor a la que se maneja con los ensayos del DBT. En el punto 5.4.1 y 5.4.2 se probó que la actividad desulfuradora se inhibe al emplear concentraciones altas de sulfato o DBT. Lo cual pudiera ser la explicación de que el porcentaje de azufre removido por el microorganismo sea bajo.

5.5.2 Pruebas con una fracción azufrada del diesel

Para detectar en cromatografía de gases la disminución de azufre por la actividad del microorganismo (la cual es en ppm en el caso de los ensayos), es necesario aislar la fracción de diesel que sea rica en compuestos organosulfurados, con el fin de eliminar la interferencia de los compuestos restantes que conforman al combustible.

Los cromatogramas que se presentan a continuación muestran los perfiles de una fracción aislada del diesel, rica en compuestos organosulfurados, antes y después de su tratamiento con *Rhodococcus rhodochrous* (figura 5.20 y 5.21).

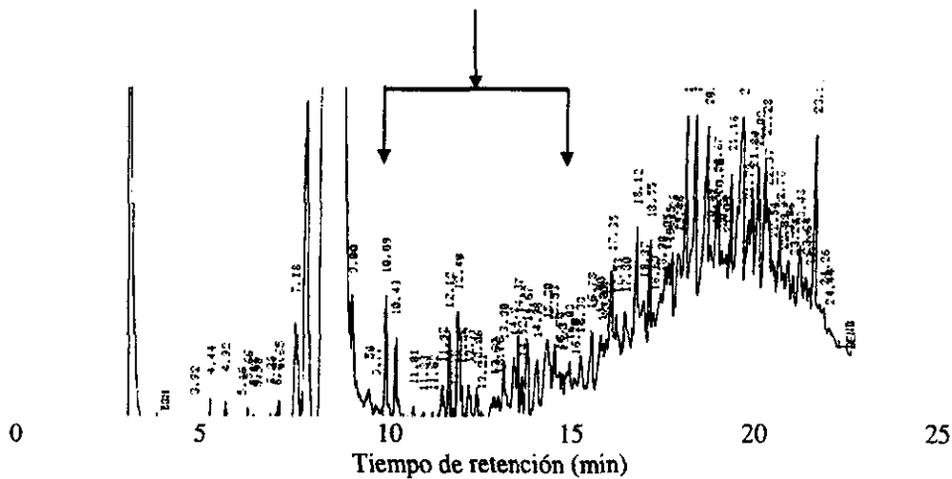


Figura 5.20 Cromatograma de una fracción de compuestos organosulfurados del diesel disueltos en dodecano y tolueno.

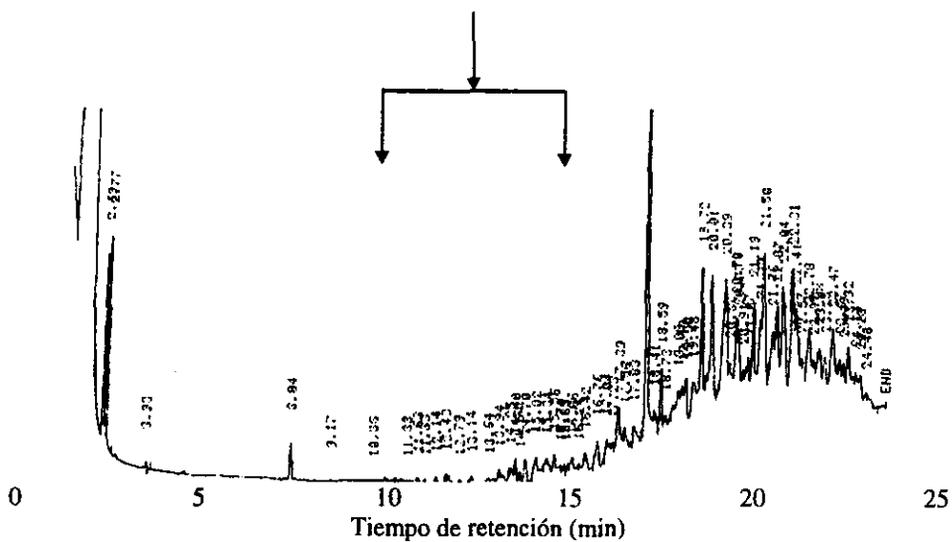


Figura 5.21 Cromatograma de una fracción de compuestos organosulfurados del diesel, disueltos en dodecano y tolueno después de la interacción con *Rhodococcus rhodochrous*.

La comparación de perfiles muestra la desaparición de ciertos compuestos azufrados (aproximadamente de tiempo 10 al 15) lo cual señala que hubo una transformación por la actividad metabólica del *Rhodococcus rhodochrous*. Debe mencionarse que en el cultivo que sirvió de inóculo a la prueba se detectó la presencia de hidroxibifenilo, indicativo de una cepa activa. Lo más relevante de la prueba fue demostrar que el microorganismo tiene la capacidad de remover compuestos azufrados en diesel.

Conclusiones

En este estudio se probó la capacidad para remover el azufre del diesel, de la bacteria *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, utilizando como molécula patrón el dibenzotiofeno, el cual es un compuesto representativo de las especies organosulfuradas presentes en dicho combustible.

El tiempo de duplicación del microorganismo a nivel matraz y en un medio de sales con DBT al 0.1% y glicerol al 1%, fue de 30 horas.

La formulación de medio de cultivo seleccionado para la propagación del microorganismo fue el medio basal de sales, glicerol al 1% como fuente de carbono y extracto de levadura al 3% como fuente de nitrógeno.

La condición más adecuada para que el microorganismo desulfure, es utilizar el medio basal de sales con glicerol o glucosa al 1%, cloruro de amonio y DBT como única fuente de azufre.

El pH óptimo para que el microorganismo desulfure es cercano al neutro (pH 6.5 a pH 7).

Se comprobó que *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 es capaz de metabolizar el dibenzotiofeno y dar como producto de la desulfuración hidroxibifenilo.

El tiempo necesario para que el microorganismo (a una concentración de 8 g/l) desulfure el 90% del DBT a 1 g/l es de 96 horas.

Los ensayos de inhibición indicaron que la remoción de azufre del DBT por *Rhodococcus rhodochrous*, disminuye hasta un 50% a una concentración de 0.1 g/l de sulfato. Por otra parte, la presencia de 0.5 g/l de 2,2-dihidroxibifenilo o del 2-bifenol, en el medio, provoca que la remoción disminuya aproximadamente un 60%. A concentraciones mayores de 1 g/l de sulfato, hidroxibifenilo o bifenol se inhibe completamente la actividad desulfuradora.

Las pruebas en diesel señalan que la cepa puede remover compuestos organosulfurados, sin embargo el porcentaje es relativamente bajo.

El proceso de desulfuración se presenta como una alternativa para eliminar el azufre de los combustibles y así disminuir las emisiones contaminantes de bióxido de azufre. Esta tecnología tiene como ventaja sobre el proceso de hidrosulfuración, menor consumo de energía al trabajar a presión y temperatura ambiente, mínimas pérdidas del poder calorífico del combustible, operación segura y facilidad de manejo de los residuos generados.

La biodesulfuración no ha podido llegar a realizarse a escalas mayores debido a la complejidad que presentan los procesos biológicos por los sistemas de regulación enzimática, la estabilidad de la cepa y que aún faltan conocimientos sobre la bioquímica de la desulfuración.

Recomendaciones

De acuerdo con la experiencia obtenida en la presente investigación, el desarrollo del proceso de biodesulfuración de hidrocarburos requiere de varios estudios, entre los que destacan:

Biotecnología

Se tiene que contemplar el estudio de otros microorganismos con capacidad desulfuradora. Una opción son las bacterias aisladas de hidrocarburos en refinerías del país, las cuales están adaptadas a las condiciones de los combustibles nacionales. Por lo cual es importante realizar estudios para evaluar su actividad con respecto a *Rhodococcus*.

La ingeniería genética puede conducir a la obtención de bacterias recombinantes, las cuales tengan una alta capacidad de desulfuradora .

Otro de los campos en los que se debe investigar, es el aislamiento, purificación e inmovilización de las enzimas desulfuradoras.

Fermentación

El desarrollo y la actividad de los agentes biológicos, dependen de las condiciones ambientales como el pH, temperatura, oxígeno disuelto, mezclado, etc. Por limitaciones en el trabajo no se realizó la evaluación del efecto de las últimas variables, las cuales son importantes para poder implantar el bioproceso.

El oxígeno es un elemento esencial en las fermentaciones aerobias. Un nivel bajo de oxígeno disuelto en el cultivo, limita la tasa de crecimiento del organismo, así como la de actividad del mismo. En muchos casos el mantener determinada concentración de oxígeno, es la clave para el escalamiento del proceso. Por lo cual es importante su monitoreo y control.

La importancia del control de temperatura radica en mantener un ambiente que permita un óptimo crecimiento y/o actividad del agente biológico, ya que la operación fuera del

intervalo adecuado puede presentar desventajas, como la disminución de la biosíntesis, daño al microorganismo y en general una reducción del rendimiento.

Una de las preocupaciones más comunes en el desarrollo y escalamiento de los procesos biológicos es una mezclado adecuado, que permita una buena transferencia de oxígeno y nutrientes, así como un contacto adecuado del agente biológico con el hidrocarburo, para que se realice la bioconversión. Es importante mencionar que al trabajar con una mezcla acuosa con una fase orgánica se forman una emulsión que dificulta la transferencia de masa.

Escalamiento

El escalamiento de procesos desempeña un papel de vital importancia en el éxito de las biotecnologías por lo cual es necesario trasladar los esquemas de laboratorio a sistemas de mayor escala. El estudio a nivel planta piloto permite visualizar la factibilidad técnico económica de los procesos antes de trasladarlos a un nivel de producción industrial.

El empleo de fermentadores instrumentados permite un control adecuado de las variables ambientales y un monitoreo continuo de los cambios en la fermentación. Permite además estudiar el crecimiento y actividad del microorganismos en diferentes cultivos como son: por lote, cultivo alimentado y proceso en continuo.

Es importante realizar el análisis de la adecuación del bioproceso, con el tren normal de refinación, a fin de que la adaptación sea económica y fácil de operar. El punto crucial es realizar la separación del hidrocarburo de la fase acuosa.

Bibliografía

Aragón E. (1997) "Biodesulfuración de combustóleo Mexicano por medio de bacterias sulfato reductoras " Tesis de Maestría UNAM-DEPI, México

Aguilar M. (1997) "Organic sulphur compounds in Mexican diesel enrichment, isolation and identification". 5º Congreso De Química de América del Norte. Cancun, México.

Bergey H., Breed R., y otros. (1957) "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ". Ed. Williams & Wilking E.U.

Beyer M., Klein J., Vaupel K. y Wiegand D. (1990) "Microbial coal desulphurization : Calculation of costs". *Bioprocess Engineering*, 5: 97-101.

Bravo H., Sosa R., Saavedra R., Sánchez A. y Torres J. (1991) "Impact of acid deposition in the decay of Mexican Mayan Monuments". Air & Waste Management Association 84 th Annual Meeting.

Bremauntz M., Aguilar M. y Cid R. (1996) "Procesos de desulfuración microbiológica en Petróleo Crudo". *Boletín de Actividades Tecnológicas Pemex refinación*, 3 (3): 7-10.

Cancheyta J. (1995) "Estudio técnico sobre la desulfuración catalítica del petróleo y sus productos". Tesis, ESQUIE-IPN; México.

Caselli M. (1992) "La contaminación atmosférica sus causas y sus efectos". Siglo XXI: 47-51, 91-97, 152-173, México.

Cooney, L., Hopkis D. y Pretides D. (1992) "Microbial Desulfurization of Fuels: a process engineering perspective". Comunicación, E.U.

Denome A., Oldfield C., Nash L., y Young K. (1994) "Characterization of Desulfurization genes from *Rhodococcus* sp Strain IGTS8". *Journal of Bacteriology*, 176 (21): 6707-6716.

Denome A., Oldson E., y Young K. (1993) "Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp Strain IGTS8". *Applied and Environmental Microbiology*, 59 (9): 2837-2843.

Energy Biosystems. (1992) "Biocatalytic Desulfurization". Comunicación, E.U.

- Finnerty W., Shockley K. y Attaway H. (1990) "Microbial Desulphurization and Desnitrogenation of hidrocarbans". *Microbial Enhanced Oil Recovery*: 83-90.
- Gallagher J., Olson E. y Stanley C. (1993) "Microbial desulfurization of dibenzothiophene a sulfur -specific pathway". *FEMS Microbiology Letters*, **107**:31-36.
- Godish T. (1991) "Air Quality". Ed. Lewis, E.U.
- Gray A. y Pogrebinsky S. (1996) "Molecular mechanisms of biocatalytic desulfuration of fossil fuels". *Nature Biotechnology*, **14**:1705-1709.
- Grossman M. (1995) "Microbiological Removal of organic sulfur from fuel". Exxon Research and Engineering. E.U.
- INE (1995) "Estadísticas del Medio Ambiente 1994". INE, México.
- INE (1994) "Informe de la situación general en materia de equilibrio ecológico y Protección al Ambiente". Sedesol, México.
- James V. (1990) "Biodesulfurization of bitumen fuels". European Patent WO92/097/706.
- Jiménez B. y Rodríguez A (1997) "Biodesulfuración del combustoleo utilizando un consorcio anaerobio " VII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, México.
- Johnson S., Oldfields C., Brozowski J. y Monticello D. (1994) "Fate of Sulfur Released in Biodesulfurization by *Bacterium IGTS8*". Comunicaciones, E.U.
- Kabe T., Ishihara A., y Tajima H. (1992) "Hydrodesulfurization of sulfur -Containing Polyaromatic Compounds in Ligt Oil". *Industrial Engineering Chemical Research*, **31**: 1577-1580.
- Kayser K., Bielaga B., Jackowski K. y Odusan O. (1993) "Utilization of organosulphur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous IGTS8*". *Journal of General Microbiology*, **139**: 3123-3129.
- Keenan T. (1989) "Quality Assurance of chemical measurements " Ed. Lewis Publishers. E.U.
- Kilbane J. (1990) "Sulfur-specific Microbial Metabolism of organic compounds". *Resources Conservation and Reecycling*, **3**: 69-79.
- Kilbane J. (1991) "Bacterial produced extracts end enzymes for cleavage of organic C-S bonds". European Patent Application 0 445 896 A2.

- Kilbane J. (1992) "Enzymes from *Rhodococcus rhodochrous* strain ATCC No 53968, *Bacillus sphaericus* strain ATCC No 53969 and mixture thereof for cleavage of organic C-S bonds of carbonaceous material". United State patent No 5 132 219.
- Kim B., Kim T y Kim H. (1988) "Bioelectrochemical desulphurisation of petroleum". European patent application, No 0 323 749.
- Kim. H., Kim T. y Kim B. (1990) "Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and hydrogen sulfide". *Biotechnology letters*, **12** (20): 761-764.
- Klyachko L. y Klivanov M. (1992) "Oxidation of dibenzothiophene catalyzed by hemoglobin and other hemoproteins in various aqueous-organic media". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **37**: 52-68.
- Kulpa F. (1995) "Biodesulphurisation of petroleum distillates: a microbial approach". comunicación, E.U.
- Laredo S., Mungía C., Domínguez C. y Martínez G. (1995) "Distribución de compuestos de azufre en la fracción de 200 a 400 ° C en los crudos Istmo y Maya". *Revista del IMP*, **27** (1) :22-29.
- Lee M., Senius D. y Grossman J. (1995) "Sulfur -specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene". *Applied and Environmental Microbiology*, **61** (12): 4362-4366.
- Lei B. y Tu S. (1996) "Gene overexpression, purification, and identification of desulfurization enzyme from *Rhodococcus* sp. Strain IGTS as a sulfide/ sulfoxide Monooxygenase". *Journal of Bacteriology*, **178** (19): 5699-5705.
- Lizama M., Wilkins A. y Scott T. (1995) "Dibenzothiophene sulfur can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria". *Biotechnology Letters*, **17** (1): 113-116.
- Maka A. y Akin C. (1989) "Microbial Desulfurization of Eastern Oil Shale: Bioreactor Studies". Eastern Oil Shale Symposium : 471-479.
- Mamie E., Squieres H, Monticello D. y Childs J. (1996) "Genetic analysis of dzs promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8". *Journal of Bacteriology*, 6409-6411.
- Montgomery D. (1991) " Diseño y análisis de experimentos". Ed. Grupo Iberoamérica, México.
- Monticello D. (1991) "Multi-stage system for deep desulfurization of fossil fuels". United States patent 5,232,854.

- Monticello D. y Kilbane J. (1991 b) "Practical considerations in biodesulfurization of petroleum". Environmental Bioscience Corporation Institute of Gas Technology.
- Monticello D. (1993) "Biological Desulfurization of middle distillates". National Petroleum Refiners Association. Annual Meeting: 1-17.
- Monticello D. (1993 b) "Biocatalytic desulfurization of Petroleum and Middle Distillates". *Environmental Progress*, **12** (1) :1-4.
- Monticello D. (1994) "Biocatalytic desulfurization". *Hydrocarbon processing*, 39-45.
- Nebel B. y Wright R. (1996) "Environmental Science". Ed. Prentice Hall, E.U.
- NOM -086-ECOL-1994 (1995) "Gaceta Ecologica". **VII**: 50-71, México.
- Olson E., Stanley C. y Gallagher J. (1993) "Characterization of intermediates in the microbial desulfurization of dibenzothiophene". *Energy Fuels*, **7**: 159-164.
- OMS (1982) "Óxidos de azufre y partículas en suspensión". OMS, E.U.
- Oshiro T., Suzuki K y Izumi Y. (1996) "Regulation Dibenzothiophene degrading enzymes activity of *Rhodococcus erythropolis* D-1". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **81**. (2): 121-124.
- Oshiro T., Suzuki K., y Hirata T. (1996) "Characterization of Dibenzothiophene desulfurization reaction by whole cell of *Rhodococcus erythropolis* H-2 in the presence of hydrocarbon". *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **82** (6):610-612.
- Pelczar M., Reid R. y Chan E. (1986) "Microbiología". Ed. Mc Graw Hill, México.
- Piddington C., Kovacevich B. y Rambossek J. (1995) "Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of *Rhodococcus* sp. strain IGTS8". *Applied and Environmental Microbiology*, **61**: 468-475.
- Pifferi P., y Lanzarini G. (1990) "Anarobic desulfurization process from crude oil and petroleum products". European patent application No 0401 922.
- Premuzic E. y Lin S. (1994) "Chemical characterization of biotreated fossil fuels" Symposium of microbial degradation and modification of hydrocarbons. American Chemical Society August 21-26.
- Rhodes K. (1995) "Enzymes desulfurizing diesel fuel in pilot plant test". *Oil and Gas Journal*, 39-40.

- Sabido C y Fernando Cano. (1992) "La contaminación Atmosférica en México sus Causas y efectos en la salud". CNDH, México.
- Sandip B., Kilbane J. y Webster D. (1997) "Biodesulfurization of dibenzothiophene hydrophobic media by *Rhodococcus sp.* strain IGTS8". *Journal Chemical Technology Biotechnology*, **69**:100-106.
- Setti L., Lanzarini G. y Pifferi P. (1994) "Diffusion as a rate controlling step in heavy-oil biodesulfurization processes". *Fuel Processing Technology*, **40**: 311-317.
- Setti L., Lanzarini G. y Pifferi P. (1995) "Dibenzothiopheno Biodegradation by a *Pseudomonas sp.* in Model Solutions". *Process Biochemistry*, **30** (8):721-728.
- Sorkhoh A., Ghannoum A. y Ibrahim A. (1990) "Crude Oil and hydrocarbon degrading strain of *Rhodococcus rhodochorous* isolated from soil and marine environments in Kuwait". *Environmental Pollution*, **65**: 1-17.
- Spengler J. (1989) "Exposure to acid rain". *Environmental Health Perspect*, **79**: 43-41.
- Sprieger V., Balows A. (1991) "The prokaryotes, Handbook on the biology of Bacteria" 2 Ed. Springer-Verlang, E.U.
- Stanier M. (1990) "Microbiología". Ed. REPLA S.A., México.
- Stoner D., Wey E., Barrett K., Jolley G., Wright B. y Dugan P. (1990) "Modification of water soluble coal derived products by dibenzothiophene degrading microorganisms". *Applied and Environmental Microbiology*, **56** (9): 2666-2676.
- Strauss C. (1989) "Contaminación del aire, causas efectos y soluciones". Ed. Trillas, México.
- Valentine J. (1992) "Biodesulfurization of Bitumen fuels". Patent Cooperation Treaty, WO/92/09706, E.U.
- Wang P., Krawiec S. (1994) "Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by some newly isolated bacterial strains". *Archives Microbiology*, **161**: 266-271.
- Wark K. y Warner C. (1990) "Control y contaminación del aire, origen y control". Ed. Limusa:, México.
- Wu. S. Lin J. y Chan S. (1994) "Oxidation of dibenzothiophene catalyzed by heme containing Enzymes encapsulated in soil-Gel Glass". *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **47**: 11-20.

Yashui Y. (1994) "Biodesulfurization in Japan: Possible applications of Biotechnology in oil Refining". Comunicación, Japon

Zobell E. (1953) "Process of removing sulfur from petroleum hydrocarbons and apparatus". United State, Patent Office 2 641 564.

Anexos

Validación del método analítico

Anexo I

Concentración de la solución madre

Bifenol	2
Sulfona	2.01
Fenilfenil	1.21
DBT	1.2

alturas de los picos a diferentes concentraciones

ml adionados	bifenol		Sulfona del DBT		hidroxibifenilo		DBT		Promedio Naftaleno
	2.60	2.40	2.60	2.70	2.68	3.30	3.60	3.46	
0.20	2.60	2.40	2.60	2.70	2.68	3.30	3.60	3.46	7.40
0.30	3.00	3.05	2.90	3.00	2.20	3.70	3.90	4.00	8.50
0.040	3.50	3.50	3.30	3.40	3.30	4.30	4.50	4.30	8.90
0.50	4.30	4.30	3.80	3.84	3.80	5.10	5.20	5.15	10.20
0.70	5.90	6.00	5.00	4.70	4.8'	7.40	7.10	7.10	11.80
0.80	6.50	6.70	5.30	5.20	5.40	7.95	7.80	8.10	11.95
									12.00
									12.00

Concentración (mg/ml) en la solución

ml adionados	DBTS		GBF		DBT	
	0.04	0.04	0.024	0.024	0.024	0.024
0.20	0.04	0.04	0.024	0.024	0.024	0.024
0.30	0.06	0.06	0.036	0.036	0.036	0.036
0.40	0.08	0.08	0.048	0.048	0.048	0.048
0.50	0.10	0.10	0.061	0.061	0.06	0.06
0.70	0.14	0.14	0.085	0.085	0.084	0.084
0.80	0.16	0.16	0.097	0.097		

Promedio de alturas

ml adicióBF	Sulfona		HBF		DBT		Prom.Naf
	2.66	3.03	3.87	4.37	7.51	5.95	
0.20	2.50	2.66	3.45	3.87	7.51	5.95	
0.30	2.98	3.03	3.87	4.37	8.57	5.90	
0.40	3.43	3.33	4.37	4.37	9.10	5.85	
0.50	4.30	3.80	5.15	5.15	10.25	5.85	
0.70	6.03	4.83	7.20	7.20	11.77	5.80	
0.80	6.60	5.30	7.95	7.95	12.00	5.80	

Validación del Método analítico

Anexo I

Relación de alturas entre el metabolito y el testigo interno

ml adicionado	Relación de alturas del bifenol		Relación de alturas del bifenol	
0.20	0.42	0.43	0.40	0.43
0.30	0.49	0.51	0.51	0.49
0.40	0.56	0.59	0.59	0.56
0.50	0.73	0.73	0.73	0.64
0.70	1.07	1.01	1.03	0.86
0.80	1.13	1.12	1.15	0.91

ml adicionado	Relación de alturas del bifenol		Relación de alturas del bifenol	
0.20	0.554	0.605	0.581	1,243
0.30	0.627	0.661	0.678	1,440
0.40	0.731	0.762	0.735	1,521
0.50	0.871	0.889	0.880	1,743
0.70	1.27	1,224	1,224	2,034
0.80	1.37	1,344	1,396	2,017

Datos de ajuste de las curvas por regresión lineal

	bifenol	sulfona	DBT	Fenil fenol
pendiente	6,285	3,937	12,68	11,42
ordenada	0.129	0.271	0.971	0.244
correl	0.994	0.996	0.9978	0.99

Validación de método analítico

Anexo I

Calculo de parámetros estadísticos

ml adicionados	Con real de fenol	Concentración detectada de fenilfenol	% de recobro	x	s	cv				
0.20	0.024	0.027	0.031	0.029	113.15	131.54	122.96	121.55	9.20	7.50
0.30	0.036	0.033	0.036	0.038	93.06	101.31	105.43	99.93	6.29	6.29
0.40	0.048	0.043	0.043	0.043	89.48	95.71	89.48	91.55	3.59	3.93
0.50	0.061	0.054	0.054	0.055	90.03	92.48	91.26	91.29	1.22	1.34
0.70	0.085	0.090	0.085	0.085	106.23	100.9	100.9	102.68	3.07	2.99
0.80	0.097	0.098	0.096	0.100	101.64	99.31	103.98	101.64	2.33	2.29

$x = 101.6$
 $s = 11.49$
 $t = 0.34$
 $cv = 11.22$
 $t(0.975,5) = 2.57$
 $u = 101.6 \pm 13.1$

ml adicionados	Concentración real de DBT	Concentración detectada de DBT	% de recobro	x	s	cv				
0.20	0.024	0.021	0.024	0.023	89.581	100.6	96.75	95.65	5.6	5.85
0.30	0.036	0.037	0.039	0.037	102.86	110.3	102.86	105.33	4.28	4.07
0.40	0.048	0.043	0.048	0.046	90.39	101.6	96.01	96.01	5.61	5.84
0.50	0.06	0.061	0.062	0.061	101.52	103.8	102.64	102.64	1.12	1.09
0.70	0.084	0.083	0.082	0.083	99.81	98.2	99.81	99.27	0.93	0.94

$x = 99.78$
 $s = 4.19$
 $t = -0.12$
 $cv = 4.2$
 $t(0.975,5) = 2.57$
 $u = 99.78 \pm 4.82$

Validación del método analítico

Anexo I

Calculo de parámetros estadísticos

ml adicionados	conc real de bifenol	Concentración detectada de bifenol	% de recobro	x	s	cv
0.20	0.04	0.0462 0.0489 0.0435	115.52 122.21 108.84	115.52	6.6843	5.7861
0.30	0.06	0.0576 0.0603 0.0616	95.936 100.43 102.68	99.681	3.4323	3.4433
0.40	0.08	0.0691 0.0745 0.0745	86.384 93.183 93.183	90.917	3.9251	4.3173
0.50	0.10	0.0963 0.0963 0.0963	96.302 96.302 96.302	96.302	0	0
0.70	0.14	0.1494 0.1412 0.1412	106.73 100.85 102.81	103.47	2.9927	2.8925
0.80	0.16	0.1604 0.1577 0.1631	100.25 98.533 101.96	100.25	1.7143	1.7101

$x = 101.02$
 $s = 8.2834$
 $t = 0.3024$
 $cv =$
 $t(0,95) = 2.571$
 $u = 101.02$

Calculo de parámetros estadísticos

ml adicionados	conc, real sulfona	Concentración detectada de la sulfona del DBT	% de recobro	x	s	cv
0.20	0.04	0.042 0.046 0.045	104.94 115.61 113.47	111.34	5.64	5.64
0.30	0.06	0.055 0.06 0.068	93.04 100.22 114.57	102.61	10.95	10.95
0.40	0.08	0.074 0.078 0.074	92.82 98.25 92.82	94.63	3.13	3.13
0.50	0.101	0.096 0.096 0.096	95.01 95.01 95.01	95.01	0	0
0.70	0.141	0.149 0.136 0.014	106.34 97.02 100.13	101.16	4.73	4.69
0.80	0.161	0.163 0.158 0.016	101.29 98.56 104.01	101.29	2.71	4.68

$x = 101.01$
 $s = 6.09$
 $t = 0.4$
 $cv =$
 $t(0,95) = 2.51$
 $u = 101.01$

7.011

Densidad óptica de los cultivos en diferentes medios

Anexo II A

0	0.074	0.068	0.075	0.062
24,	0.093	0.123	0.115	0.133
28	0.121	0.183	0.165	0.163
72	0.182	0.193	0.18	0.201
96	0.273	0.189	0.172	0.203
0	0.062	0.055	0.063	0.058
24	0.087	0.124	0.103	0.082
48	0.145	0.184	0.135	0.123
72	0.225	0.234	0.19	0.183
96	0.216	0.194	0.173	0.201
0	0.091	0.093	0.101	0.073
24	0.111	0.157	0.153	0.134
48	0.168	0.238	0.199	0.165
72	0.245	0.283	0.212	0.244
96	0.306	0.294	0.183	0.284
0	0.119	0.123	0.13	0.093
24	0.694	0.649	0.614	0.543
48	2.3	1.8	1.6	1.35
72	6.8	4.8	4.3	3.9
96	14.6	9.8	8.7	8.9
0	0.109	0.115	0.123	0.101
24	0.745	0.612	0.592	0.522
48	2.6	1.7	1.5	1.2
72	6.9	4.6	4.4	3.8
96	14.4	9.5	8.8	8.3

Pruebas de actividad

Anexo II B

Cinética

Edad Muestra hr	Altura estándar	Altura Muestra	Relación alturas	Volumen inicial	Volumen final	Dilución 1:	Concentración final (mg)	Concentración inicial (mg)	Porcentaje de Remoción	Promedio
0	6.2	10.2	1.6451613	8	19	20	20.18924189	20	0	0
0	6.2	10.5	1.6935484	10	18	20	20.49944199	20	0	0
24	6.3	10.3	1.6349206	8	19.5	20	20.40578829	20	0	0
24	6.2	10.1	1.6290323	10	20	20	20.74339217	20	0	0
48	6.3	10	1.5873016	12	21	20	20.39929598	20	0	0
48	6.2	9.9	1.5967742	11	20	20	19.72650937	20	1.36745314	0
72	6.4	5.9	0.921875	14	22	10	4.069589186	20	79.6520541	79.0246465
72	6.2	7.1	1.1451613	13	19	10	4.320552207	20	78.397239	0
96	6.4	2.6	0.40625	10	21	10	1.827663568	20	90.8616822	91.9034568
96	6.3	1.8	0.2857143	14	22	10	1.410953707	20	92.9452315	0
120	6.2	2.3	0.3709677	13	20	10	1.60658542	20	91.9670729	90.0836464
120	6.3	3.4	0.5396825	13	21	10	2.35995603	20	88.2002199	0
144	6.1	2.3	0.3770492	12	19	10	1.548205879	20	92.2589706	91.1079193
144	6.2	2.8	0.4516129	14	21	10	2.008626409	20	89.956868	0
168	6	3.1	0.5166667	14.5	23	10	2.484153911	20	87.5792304	86.4478923
168	6.3	4.1	0.6507937	14	22	10	2.936689155	20	85.3165542	0
192	6.2	1.9	0.3064516	13	21	10	1.429545318	20	92.8522734	91.7378668
192	6.3	2.5	0.3968254	15	22	10	1.875307974	20	90.6234601	0

rel alt < 1.3 con = (rel + 0.0519) / 52.64 * vol fin * dil

rel alt > 1.3 con = (rel - 0.9719) / 12.648 * vol fin * dil

Pruebas de actividad

Anexo II C

Efecto del pH

Muestra	Altura estándar	Altura Muestra	Relación alturas	Volumen inicial	Volumen final	Dilución 1:	Concentración final (mg)	Concentración inicial (mg)	Porcentaje de Remoción	Promedio	%Rem relativo
pH 5	6.2	8.5	1.3709677	15	25	20	15.77196956	20	21.14015221	13.42148	15.9081183
pH 5	6.2	9	1.4516129	14	23	20	17.44322703	20	12.78386485		
pH 5	6.2	9.2	1.483871	12	22	20	17.80702291	20	10.96488543		
pH 6.5	6	1.7	0.2833333	14	21	10	3.200627626	20	83.99686187	84.36873	100
pH 6.5	6	1.4	0.2333333	13.5	20	10	2.858257286	20	85.70871357		
pH 6.5	6.2	2.2	0.3548387	13	20	10	3.319879299	20	83.40060351		
pH 7	6.3	3.9	0.6190476	14	21	10	4.539842106	20	77.30078947	76.06376	90.1563496
pH 7	6.3	4.8	0.7619048	14	21	10	5.109720608	20	74.45139696		
pH 7	6.1	4.4	0.7213115	13	20	10	4.71217897	20	76.43910515		
pH 8	6	9	1.5	12	22	20	18.36812144	20	8.159392789	6.680991	7.91880055
pH 8	5.9	9.3	1.5762712	11	20	20	19.1104107	20	4.447946483		
pH 8	6.1	9.5	1.557377	10	20	20	18.51287316	20	7.435634222		

rel alt <1.3 con = (rel+0,0519)/52.64*vol fin *dil
 rel alt >1.3 con= (rel -09719/12.648*vol fin*dil

Fuentes de carbono

Muestra	Altura estándar	Altura Muestra	Relación alturas	Volumen inicial	Volumen final	Dilución 1:	Concentración final (mg)	Concentración inicial (mg)	Porcentaje de Remoción	Promedio
Gli 1 %	6.2	2	0.3225806	11	17	20	2.412816555	20	87.93591722	89.91
Gli 1 %	6.3	1.5	0.2380952	13	18	20	1.976989934	20	90.11505033	
Gli 1 %	6.3	1.4	0.2222222	12	16	20	1.660837021	20	91.6958149	
Gli 3 %	6.2	2.2	0.3548387	10	15	10	1.156393779	10	94.2180311	91.56
Gli 3 %	6.3	3.4	0.5396825	13	18	10	2.019703685	10	89.90148158	
Gli 3 %	6	3.2	0.5333333	12	17	10	1.886994359	10	90.5650282	
Glu 1 %	6	0.7	0.1166667	11	20	30	1.910992576	20	90.44503712	90.30
Glu 1 %	6	0.6	0.1	14	21	30	1.80708473	20	90.96457635	
Glu 1 %	6	0.8	0.1333333	14	20	30	2.100952077	20	89.49523961	
Glu 3 %	6.3	1.3	0.2063492	13	20	30	2.933155604	20	85.33422198	85.64
Glu 3 %	6.1	1.2	0.1967213	11	20	30	2.823420997	20	85.88289501	
Glu 3 %	6.4	1.2	0.1875	13	21	30	2.854236477	20	85.72881762	
Sac 1 %	6	5	0.8333333	13	22	20	7.391450809	20	63.04274595	63.23
Sac 1 %	6.2	7	1.1290323	11	20	20	8.966333539	20	55.16833231	
Sac 1 %	6.2	4.1	0.6612903	12	21	20	5.682865187	20	71.58567406	
Sac 3 %	6.3	3.2	0.5079365	14	22	30	7.007569796	20	64.96215102	57.67
Sac 3 %	6.3	5.2	0.8253968	13	20	30	9.988794199	20	50.05602901	
Sac 3 %	6.3	4.1	0.6507937	13	21	30	8.398679402	20	58.00660299	
Et 1 %	6.1	1.8	0.295082	15	22	30	4.338942806	20	78.30528597	73.84
Et 1 %	6	2.2	0.3666667	12	20	30	4.760385086	20	76.19807457	
Et 1 %	6	3	0.5	14	21	30	6.594064146	20	67.02967927	
Et 3 %	6.3	3.3	0.5238095	12	22	30	7.206574987	20	63.96712507	66.93
Et 3 %	6.5	3	0.4615385	11	20	30	5.841693013	20	70.79153494	
Et 3 %	6	3.1	0.5166667	13	21	30	6.793521621	20	66.03239189	

rel alt<1.3

rel alt>1.3

con = (rel+0,0519)/52,64*vol fin *dil

con = (rel -09719/12,648*vol fin*dil

Pruebas de actividad

Anexo II E

Efecto de la concentración inicial de inóculo

Muestra D.O.	Altura estándar	Altura Muestra	Relación alturas	Volumen inicial	Volumen final	Dilución 1:	Concentración. final (mg)	Concentración inicial(mg)	Porcentaje de Remoción	Promedio	%Reim relativo
74.25	6.1	1.6	0.2622951	12	19	10	2.78753924	20	86.0623038	86.88779	100
74.25	6	1.2	0.2	12	20	10	2.697568389	20	86.51215805		
74.25	6	0.9	0.15	10	19	10	2.382218845	20	88.08890578		
14.85	6.2	2.4	0.3870968	11	18	10	3.067580155	20	84.66209923	82.91124	95.4233465
14.85	6.1	3.4	0.557377	10	17	10	3.447076337	20	82.76461832		
14.85	6	3.5	0.5833333	9	18	10	3.738601824	20	81.30699088		
4.95	6	6.1	1.0166667	12	23	10	6.670466059	20	66.64766971	66.70425	76.7705712
4.95	6.2	6.7	1.0806452	12	22	10	6.647833121	20	66.7608344		
1.65	6.5	7.8	1.2	11	21	20	13.64361702	15	31.78191489	32.87208	37.8327949
1.65	6	7.1	1.1833333	13	20	20	12.86727457	15	35.66362715		
1.65	6.3	8.2	1.3015873	12	20	20	13.76586095	15	31.17069523		
0.55	6.2	8.5	1.3709677	12	24	20	15.13595996	15	24.3202002	21.10024	24.2844698
0.55	6.1	9.1	1.4918033	11	20	20	16.42394446	15	17.88027772		

rel alt <1.3 con = (rel+0,0519)/52.64*volfin *dil
 rel alt >1.3 con = (rel -09719/12.648*vol fin*dil

Pruebas de actividad

Anexo II F

Efecto del sulfato

Muestra g/l	Altura estándar	Altura Muestra	Relación alturas	Volumen inicial	Volumen final	Dilución 1:	Concentra. final (mg)	Concentración inicial (mg)	Porcentaje de Remoción	Promedio	%Rem relativ
0.1	6.1	5.2	0.85245902	13	21	20	10.94191	20	45.290449	46.452097	52.711
0.1	6.4	3.8	0.59375	14	22	20	9.300607	20	53.496964		
0.1	6.3	5.3	0.84126984	14	23	20	11.88622	20	40.568879		
0.5	6	6.7	1.11666667	12	22	20	13.67126	20	31.643707	27.396846	31.088
0.5	6	7	1.16666667	11	24	20	15.37	20	23.149984		
1	6.3	9.5	1.50793651	13	20	20	16.93272	20	15.336407	16.071298	18.237
1	6	9	1.5	14	22	20	18.35068	20	8.2466099		
1	6.1	8.7	1.42622951	11	21	20	15.07382	20	24.630876		
2	6.3	10.1	1.6031746	10	20	20	19.93613	20	0.3193625	0	0
2	6.4	10.2	1.59375	11	21	20	20.62086	20	0		
2	6.2	10.3	1.66129032	12	20	20	21.76885	20	0		
0	6.1	1.2	0.19672131	12	17	10	2.311287	20	88.443565	88.125487	100
0	6.2	1.3	0.20967742	13	18	10	2.491546	20	87.542272		
0	6	1.2	0.2	14	17	10	2.321875	20	88.390625		

rel alt<1.32

con = (rel+0.0519)/52.64*vol fin *dil

rel alt>1.3

con= (rel -0.9719)/12.648*vol fin*dil

Pruebas de actividad

Anexo II G

Efecto de la concentración del DBT

Muestra	Altura estándar	Altura Muestra	Relación alturas	Volumen inicial	Volumen final	Dilución 1:	Concentra final (mg)	Concentración inicial (mg)	Porcentaje de Remoción	Promedio	% Rem rel
0.25	6.1	0.4	0.0655738	10	12	10	1.332544	5	73.34911803	86.674559	100.223
0.25	6.1	0	0	14	17	10	0	5	100		
0.25	6	1.1	0.1833333	10	15	10	2.001223	10	79.9876661	79.589786	92.0305
0.50	6.3	0.9	0.1428571	11	15	10	1.885891	10	81.14109215		
0.50	6	1.3	0.2166667	13	16	10	2.23595	10	77.64050038	86.482002	100
1	6.2	1.4	0.2258065	13	18	10	2.546695	20	87.26652445		
1	6	1.7	0.2833333	11	19	10	2.895806	20	85.52097026		
1	6	1.1	0.1833333	14	20	10	2.668298	20	86.65851107		
2	6.2	0.9	0.1451613	10	19	20	4.794222	40	88.01444403	89.16805	103.106
2	6.2	0.6	0.0967742	11	16	20	3.743109	40	90.64222734		
2	6	0.8	0.1333333	12	18	20	4.461009	40	88.84747772	59.844117	69.1983
3	6.3	7.1	1.1269841	12	25	30	23.45027	60	60.91620965		
3	6.2	6.7	1.0806452	13	24	30	21.87848	60	63.53586448		
3	6	7.8	1.3	12.5	26	30	26.95183	60	55.08027688		
5	6.1	10.5	1.7213115	11	29	50	85.77354	100	14.22645543	13.511624	15.6236
5	6.2	11.1	1.7903226	13	27	50	87.20321	100	12.7967925		

rel alt <1.3 con = (rel+0.0519)/52.64*vol fin *dil
 rel alt >1.3 F5 con = (rel -0.9719)/12.648*vol fin *dil

Pruebas de actividad

Efecto de la concentración del bifenol

Muestra g/l	Altura estándar	Altura Muestra	Relación alturas	Volumen inicial	Volumen final	Dilución 1:	Concentración final (mg)	Concentración inicial (mg)	Porcentaje de Remoción	Promedio	% Rem rel
0	6.1	1.4	0.2295082	10	17	10	2.417166	20	87.91416932	88.068738	100
0	6	1	0.1666667	12	18	10	2.34448	20	88.27759922		
0	6.2	0.9	0.1451613	13	19	10	2.397111	20	88.01444403		
0.1	6	3.3	0.55	12	26	10	5.279734	20	73.6013282	68.782725	78.1012
0.1	6	5.2	0.8666667	11	27	10	7.106955	20	64.46522601		
0.1	6.1	3.2	0.5245902	13	32	10	6.343676	20	68.28162137		
0.5	6	6.8	1.1333333	10	43	10	13.49669	20	32.5165708	37.539046	42.6247
0.5	6.4	6.2	0.96875	10	40	10	11.30449	20	43.47755059		
0.5	6.1	6.3	1.0327869	12	43	10	12.6754	20	36.62301771		
1											
1	6	9.2	1.5333333	12	20	20	17.73363	20	0	0	0
1	6.4	9.5	1.484375	14	24	22	21.37039	20	0	0	0
2	6.2	10	1.6129032	13	20	20	20.24293	20	0	0	0
2	6.3	10.5	1.6666667	11	20	20	21.9384	20	0	0	0
2	6.1	10.2	1.6721311	10	22	20	24.3218	20	0	0	0

rel alt <1.3
rel alt >1.3

con = (rel+0.0519)/52.64*vol fin *dil
con = (rel -09719/12.648*vol fin *dil

Pruebas de actividad

Efecto de la concentración del 2- hidroxibifenilo

Muestra	Altura estándar	Altura Muestra	Relación alturas	Volumen inicial	Volumen final	Dilución 1:	Concentrac final (mg)	Concentración inicial (mg)	Porcentaje de Remoción	Promedio	% Rem Rel
0	6	2	0.33333333	13	18	10	2.914359	20	85.428207	86.689586	100
0	6	1.4	0.23333333	10	17	10	2.429519	20	87.852407		
0	6.1	1.3	0.21311475	12	19	10	2.642371	20	86.788145		
0.1	6.2	3.2	0.51612903	11	20	10	3.932652	20	80.336741	80.643127	93.025
0.1	6.2	3	0.48387097	10	20	10	3.810097	20	80.949513		
0.5	6.1	5.4	0.8852459	12	21	20	11.20349	20	43.982531	39.77485	45.882
0.5	6.2	6	0.96774194	13	22	20	12.42651	20	37.867434		
0.5	6.2	6.5	1.0483871	12	21	20	12.50508	20	37.474585		
1	6	8.5	1.41666667	12	23	20	18.18004	20	9.0997775	7.7169547	8.9018
1	6.3	9.2	1.46031746	11	20	20	17.18978	20	14.051087		
1	6.4	10.1	1.578125	12	21	20	21.9629	20	0	0	0
2	6.2	10	1.61290323	10	20	20	22.01738	20	0	0	0
2	6.3	10.5	1.66666667	11	19	20	22.53246	20	0		

rel alt <1.3
rel alt >1.3

con = (rel+0.0519)/52.64*vol fin *dil
con= (rel -09719/12.648*vol fin*dil

Pruebas de actividad

Reutilización de la biomasa

No de resembra	Altura estándar	Altura Muestra	Relación alturas	Volumen inicial	Volumen final	Dilución 1:	Concentración final (mg)	Concentraci inicial (mg)	Porcentaje de Remoción	Promedio	% Rem relativa
0	6.1	1	0.163934	10	18	10	2.33513789	20	88.3243106	88.434356	100
0	6.3	1.2	0.190476	14	17	10	2.29111963	20	88.5444019		
1	6.2	4.5	0.725806	14	20	10	4.72925624	20	76.3537188	75.903041	85.8298111
1	6.3	5.3	0.84127	11	19	10	4.90952742	20	75.4523629		
2	6.2	5.1	0.822581	13	22	10	5.60661177	20	71.9669412	70.834675	80.0985933
2	6.3	6.3	1	14	21	10	6.05951811	20	69.7024094		
3	6	9.1	1.516667	12	21	10	9.05993042	20	54.7003479	61.415135	69.4471441
3	6.3	7.3	1.15873	13	20	10	6.37401566	20	68.1299217		
4	6.1	10.1	1.655738	14	21	10	11.3689847	20	43.1550767	52.197663	59.0241903
4	6	8.5	1.416667	13	22	10	7.75195024	20	61.2402488		

rel alt > 1.3 con = (rel+0.0519)/52.64*volfin *dil

rel alt < 1.3 con = (rel -0.09719)/12.648*vol fin *dil

Diseño Factorial :Producción de biomasa en diferentes medios de cultivo
Extracto levadura con y sin azufre

Anexo III A

	Extracto de levadura con Sulfato	Extracto levadura sin sulfato
Glicerol	8.2 8 8 24.2	67.24 64 64 23.6
	x1=8,066	586 x5=7,86
Glucosa	4.1 3.9 4 12	16.81 15.21 16 12.3
	x2=4	144 x6=4,1
sacarosa	3.9 3.8 4.1 11.8	15.21 14.44 16.81 12.1
	x3=3,93	139 x7=4,03
Etanol	4 4 4.1 12.1	16 16 16.81 11.4
	x4=4,03	146 x8=3,8
	y.i.	60.1
		59.4
		151.29
		146.41
		129.96

Yi.. Y2i..

47.8 2284.84

24.3 590.49

23.9 571.21

23.5 552.25

y.. 119.5

3998.79

667.03

1999.9

328.5

984.62

338.53

1015

Extracto levadura con y sin azufre

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo	Fo teórica
Total	72.019583	23			
Fuente carbono	71.454583	3	23.8182	968.876	> 3.24
Fuente azufre	0.0204167	1	0.02042	0.83051	< 4.49
Interacción	0.15125	3	0.05042	2.05085	< 3.24
Error	0.3933333	16	0.02458		

Comparación por intervalos múltiples de Duncan

Anexo III A

Extracto de levadura con y sin azufre

Error estándar

$s_y=0.09051$

Intervalos significativos

Rp2= 3 *sy= 0.27153
 Rp3= 3.15 *sy= 0.2851065
 Rp4= 3.23 *sy= 0.2923473
 Rp5= 3.3 *sy= 0.298683
 Rp6= 3.34 *sy= 0.3023034
 Rp7= 3.37 *sy= 0.3050187

Promedios
 x1= 8.06
 x5= 7.87
 x6= 4.1
 x7=x4= 4.03
 x2= 4
 x3= 3.93
 x8= 3.8

x1-x8= 4.26	>Rp7	x6-x8= 0.3	>Rp5
x1-x3= 4.13	>Rp6	x6-x3= 0.17	<Rp4
x1-x2= 4.06	>Rp5	x6-x2= 0.1	<Rp3
x1-x7= 4.03	>Rp4	x6-x7= 0.07	<Rp2
x1-x6= 3.96	>Rp3	x7-x8= 0.23	<Rp4
x1-x5= 0.19	<Rp2	x7-x3= 0.1	<Rp3
x5-x8= 4.07	>Rp6	x7-x2= 0.03	<Rp2
x5-x3= 3.94	>Rp5	x2-x8= 0.2	<Rp3
x5-x2= 3.87	>Rp4	x2-x3= 0.07	<Rp2
x5-x7= 3.84	>Rp3	x3-x8= 0.13	<Rp2
x5-x6= 3.77	>Rp2		

Diseño Factorial .Producción de biomasa en diferentes medios de cultivo
Medio con DBT vs Medio con Sulfato

Anexo III A

	Cloruro de Amonio y DBT	Cloruro (de amonio y sulfato de sodio	Yi..	Y2i..
Glicerol	1.8 1.6 1.5	3.24 2.56 2.25	1.8 2.1 1.7	3.24 4.41 2.89
	4.9	24.01	5.6	110.25
	x1=1.63	x5=1.86		31.36
Glucosa	1.4 1.4 1.5	1.96 1.96 2.25	2 1.7 1.8	4 2.89 3.24
	4.3	18.49	5.5	96.04
	x2=1.43	x6=1.83		30.25
sacarosa	1.2 1.4 1.4	1.44 1.96 1.96	1.5 1.3 1.5	2.25 1.69 2.25
	4	16	4.3	68.89
	x3=1.33	x7=1.43		18.49
Etanol	1.5 1.4 1.6	2.25 1.96 2.56	1.8 1.9 1.9	3.24 3.61 3.61
	4.5	20.25	5.6	102.01
	x4=1.5	x8=1.86		31.36
	y.j.	17.7	21	38.7
		26.35	37.32	63.67
		78.75	111.46	190.21
				377.19

Diseño factorial

Anexo III A

Medio con DBT vs Medio con Sulfato

Fuente de variación	Suma de cuadrados	grados de libertad	Media de cuadrados	Fo	Fo teórica
Total	1.26625	23			
Fuente carbono	0.46125	3	0.154	9.225	> 3.24
Fuente azufre	0.45375	1	0.454	27.225	> 4.49
Interacción	0.08458	3	0.028	1.691667	> 3.24
Error	0.26667	16	0.017		

Comparación por intervalos múltiples de Duncan

Medio con DBT vs Medio con sulfato de sodio

Error estándar	Intervalo significativo	Promedios
$s_y = 0,0745$		
$Rp2 = 3 \cdot s_y = 0,224$		$x8 = x5 = 1,86$
$Rp3 = 3,15 \cdot s_y = 0,235$		$x6 = 1,83$
$Rp4 = 3,23 \cdot s_y = 0,241$		$x1 = 1,63$
$Rp5 = 3,3 \cdot s_y = 0,246$		$x4 = 1,5$
$Rp6 = 3,34 \cdot s_y = 0,249$		$x2 = x7 = 1,43$
		$x3 = 1,33$

$x8 - x3 = 0,53$	$> Rp6$
$x8 - x2 = 0,43$	$> Rp5$
$x8 - x4 = 0,36$	$> Rp4$
$x8 - x1 = 0,23$	$< Rp3$
$x8 - x6 = 0,03$	$< Rp2$
$x6 - x3 = 0,5$	$> Rp5$
$x6 - x2 = 0,4$	$> Rp4$
$x6 - x4 = 0,33$	$> Rp3$
$x6 - x1 = 0,2$	$< Rp2$
$x1 - x3 = 0,3$	$> Rp4$
$x1 - x2 = 0,2$	$< Rp3$
$x1 - x4 = 0,13$	$< Rp2$
$x4 - x3 = 0,17$	$< Rp3$
$x4 - x2 = 0,07$	$< Rp2$
$x2 - x3 = 0,1$	$< Rp2$

**Diseño Factorial :Producción de biomasa en diferentes medios de cultivo
Medio con DBT y amonio vs Medio de Extracto de levadura sin azufre**

Anexo III A

	Extracto de levadura sin sulfato	Medio con DBT y cloruro de amonio
Glicerol	8.2 67.24 8 64 8 64 x1=8.06 24.2 585.64 5=1.63 4.9 24.01	1.8 3.24 1.6 2.56 1.5 2.25
Glucosa	4.1 16.81 3.9 15.21 4 16 x2=4 12 144 6=1.43 4.3 18.49	1.4 1.96 1.4 1.96 1.5 2.25
sacarosa	3.9 15.21 3.8 14.44 4.1 16.81 x2=3.93 11.8 139.24 7=1.33 4 16	1.2 1.44 1.4 1.96 1.4 1.96
Etanol	4 16 4 16 4.1 16.81 x4=4.03 12.1 146.41 x8=1.5 4.5 20.25	1.5 2.25 1.4 1.96 1.6 2.56
y.j.	60.1 17.7	

Yi.. Y2i..

29.1 846.81

16.3 265.69

15.8 249.64

16.6 275.56

77.8

1637.7

364.88

1094.04

26.35

338.5

78.75

1015.3

Medio con DBT y amonio vs Medio de Extracto de levadura sin azufre

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo	Fo teórica
Total	112.678	23			
Fuente de Carbono	20.7483	3	6.9161111	553.2889	> 3.24
Fuente de nitrógeno	74.9067	1	74.906667	5992.533	> 4.49
Interacción	16.8233	3	5.6077778	448.6222	> 3.24
Error	0.2	16	0.0125		

Medio con extracto de levadura vs medio con DBT y cloruro de amonio

promedio
 x1= 8.066
 x4= 4.033
 x2= 4
 x3= 3.93
 x5= 1.63
 x8= 1.5
 x6= 1.43
 x7= 1.33

intervalo significativo
 Rp2= 3 *sy= 0.192
 Rp3= 3.15 *sy= 0.202
 Rp4= 3.23 *sy= 0.207
 Rp5= 3.3 *sy= 0.211
 Rp6= 3.34 *sy= 0.214
 Rp7= 3.37 *sy= 0.216
 Rp8= 3.39 *sy= 0.217

Error estándar
 sy=0.064

x1-x7= 6.736	>Rp8	x2-x8= 2.5	>Rp4
x1-x6= 6.636	>Rp7	x2-x5= 2.37	>Rp3
x1-x8= 6.566	>Rp6	x2-x3= 0.07	<Rp2
x1-x5= 6.436	>Rp5	x3-x7= 2.6	>Rp5
x1-x3= 4.136	>Rp4	x3-x6= 2.5	>Rp4
x1-x2= 4.066	>Rp3	x3-x8= 2.43	>Rp3
x1-x4= 4.033	>Ep2	x3-x5= 2.3	>Rp2
x4-x7= 2.703	>Rp7	x5-x7= 0.3	>Rp4
x4-x6= 2.603	>Rp6	x5-x6= 0.2	<Rp3
x4-x8= 2.533	>Rp5	x5-x8= 0.13	<Rp2
x4-x5= 2.403	>Rp4	x8-x7= 0.17	<Rp3
x4-x3= 0.103	<Rp3	x8-x6= 0.07	<Rp2
x4-x2= 0.033	<Rp2	x6-x7= 0.1	<Rp2
x2-x7= 2.67	>Rp6		
x2-x6= 2.57	>Rp5		

Diseño Factorial :Producción de biomasa en diferentes medios de cultivo
Medio con extracto de levadura vs medio con sulfato y cloruro de amonio

Anexo III A

	Cloruro de amonio y sulfato de sodio	Extracto levadura sin sulfato
Glicerol	1.8 3.24	8 64
	2.1 4.41	7.8 60.84
	1.7 2.89	7.8 60.84
	5.6	23.6
	x1=1.86 31.36	x5=7.86 556.96
Glucosa	2 4	4.1 16.81
	1.7 2.89	4.3 18.49
	1.8 3.24	3.9 15.21
	5.5	12.3
	x2=1.83 30.25	x6=4.1 151.29
sacarosa	1.5 2.25	4 16
	1.3 1.69	3.9 15.21
	1.5 2.25	4.2 17.64
	4.3	12.1
	x3=1.43 18.49	x7=4.03 146.41
Etanol	1.8 3.24	4.1 16.81
	1.9 3.61	3.7 13.69
	1.9 3.61	3.6 12.96
	5.6	11.4
	x4=1.867 31.36	x8=3.8 129.96
Y.I.	21	59.4

Yl. Y2l.

29.2 852.64

17.8 316.84

16.4 268.96

17 289

y..

80.4

1727.44

365.82

328.5

37.32

984.62

1096.08

111.46

328.5

1096.08

Medio con extracto de levadura y azufre vs medio con sulfato y cloruro de amonio

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Media de cuadrados	Fo	Fo teórica
Total	96.48	23			
Fuente carbono	18.57	3	6.188889	215.2657	> 3.24
Fuente nitrógeno	61.44	1	61.44	2137.043	> 4.49
Interacción	16.01	3	5.337778	185.6618	> 3.24
Error	0.46	16	0.02875 X		

Extracto de levadura vs Medio con sulfato y cloruro de amonio

Error estándar	Intervalo significativo	promedios
sy=0,0978		
Rp2=	3 *sy= 0.2934	x5= 7.86
Rp3=	3.15 *sy= 0.30807	x6= 4.1
Rp4=	3.23 *sy= 0.31589	x7= 4.03
Rp5=	3.3 *sy= 0.32274	x8= 3.8
Rp6=	3.34 *sy= 0.32665	x1=x4= 1.866
Rp7=	3.37 *sy= 0.32959	x2= 1.833
		x3= 1.43
x5-x3= 6.43		
x5-x2= 6.027	x8-x3= 2.37	>Rp4
x5-x1= 5.994	x8-x2= 1.967	>Rp3
x5-x8= 4.06	x8-x1= 1.934	>Rp2
x5-x7= 3.83	x1-x2= 0.4	>Rp3
x5-x6= 3.76	x1-x3= 0.03	<Rp2
x6-x3= 2.67	x2-x3= 0.4	>Rp2
x6-x2= 2.267		
x6-x1= 2.234		
x6-x8= 0.3		
x6-x7= 0.07		
x7-x3= 2.6		
x7-x2= 2.197		
x7-x1= 2.164		
x7-x8= 0.23		

Comparación por intervalos múltiples de Duncan

Anexo III B

Efecto del pH en la remoción

MUESTRA	DATOS			SUMA	PROMEDIO
	21.14	12.78	10.96		
pH 5				44.88	14.96
pH 6.5	83.99	85.7	83.4	253.09	84.3633333
pH 7	77.3	74.45	76.43	228.18	76.06
pH 8	8.16	20.52	7.43	36.11	12.0366667

SUMA 190.59 193.45 178.22 562.26

MUESTRA	CUADRADOS			SUMA
	446.8996	163.3284	120.1216	
pH 5				2014.2144
pH 6.5	7054.3201	7344.49	6955.56	64054.5481
pH 7	5975.29	5542.8025	5841.5449	52066.1124
pH 8	66.5856	421.0704	55.2049	1303.9321
				119438.807

SUMA 13543.0953 13471.6913 12972.4314 39987.218

Comparación por intervalos múltiples de Duncan

Anexo III B

Efecto del pH en la remoción

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Media de cuadrados	Fo	Fo teórica
Total	13642.5257	11			
Tratamiento	13468.2434	3	4489.41446	206.075481	>4.07
Error	174.282333	8	21.7852917		

Error estándar

sy = 2.69476602

rp2 =	3.26	*sy =	8.78493722	y2 =	84.36
rp3 =	3.39	*sy =	9.13525668	y3 =	76.06
rp4 =	3.47	*sy =	9.35083808	y1 =	13.42
rp5 =	3.54	*sy =	9.5394717	y4 =	12.04

y2-y4 =	72.32	> Rp4
y2-y1 =	70.94	> Rp3
y2-y3 =	8.3	< Rp2
y3-y4 =	64.02	> Rp3
y3-y1 =	62.64	> Rp2
y1-y4 =	1.38	< Rp2

Comparación por intervalos múltiples de Duncan

Anexo III C

Efecto de la fuente de carbono en la remoción

MUESTRA	DATOS			SUMA	PROMEDIO
glicerol 1 %	87.93	90.11	91.69	269.73	89.91
Glicerol 3 %	94.21	89.9	90.56	274.67	91.55666667
Glucosa 1 %	90.44	90.96	89.49	270.89	90.29666667
Glucosa 3%	85.33	85.88	85.72	256.93	85.64333333
Sacarosa 1 %	63.04	55.16	71.58	189.78	63.26
Sacarosa 3 %	64.96	50.05	58	173.01	57.67
Etanol 1 %	78.3	76.19	67.02	221.51	73.83666667
Sacarosa 3 %	63.96	70.69	66.03	200.68	66.89333333

SUMA 628.17 608.94 620.09 1857.2

Efecto de la fuente de carbono en la remoción

MUESTRA	CUADRADOS					
glicerol 1 %	7731.6849	8119.8121	8407.0561			72754.2729
Glicerol 3 %	8875.5241	8082.01	8201.1136			75443.6089
Glucosa 1 %	8179.3936	8273.7216	8008.4601			73381.3921
Glucosa 3%	7281.2089	7375.3744	7347.9184			66013.0249
Sacarosa 1 %	3974.0416	3042.6256	5123.6964			36016.4484
Sacarosa 3 %	4219.8016	2505.0025	3364			29932.4601
Etanol 1 %	6130.89	5804.9161	4491.6804			49066.6801
Sacarosa 3 %	4090.8816	4997.0761	4359.9609			40272.4624
	50483.4263	48200.5384	49303.8859	147987.851		442880.35

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Media de cuadrados	Fo	Fo teórica
Total	4271.52393	23			
Tratamiento	3910.4566	7	558.636657	24.7549022	>2.66
Error	361.067333	16	22.5667083		

Comparación por intervalos múltiples de Duncan

Anexo III C

Efecto de la fuente de carbono en la remoción

Error estándar

sy= 2.742669523

	Intervalo	Significativo	Promedios	
rp2=	3	*sy= 8.22800857	y2= 91.56	
rp3=	3.15	*sy= 8.639409	y3= 90.3	
rp4=	3.23	*sy= 8.85882256	y1= 89.91	
rp5=	3.3	*sy= 9.05080943	y4= 85.64	
rp6=	3.34	*sy= 9.16051621	y7= 73.84	
rp7=	3.37	*sy= 9.24279629	y8= 66.89	
rp8=	3.39	*sy= 9.29764968	y5= 63.26	
			y6= 57.67	
y2-y6 = 33.89	>Rp8		y1-y5 =	26.65 >Rp5
y2-y5 = 28.3	>Rp7		y1-y8 =	23.02 >Rp4
y2-y8 = 24.67	>Rp6		y1-y7 =	16.07 >Rp3
y2-y7 = 17.72	>Rp5		y1-y4 =	4.27 <Rp2
y2-y4 = 5.92	<Rp4		y4-y6 =	27.97 >Rp5
y2-y1 = 1.65	<Rp3		y4-y5 =	22.38 >Rp4
y2-y3 = 1.26	<Rp2		y4-y8 =	18.75 >Rp3
y3-y6 = 32.63	>Rp7		y4-y7 =	11.8 >Rp2
y3-y5 = 27.04	>Rp6		y7-y6 =	16.17 >Rp4
y3-y8 = 23.41	>Rp5		y7-y5 =	10.58 >Rp3
y3-y7 = 16.46	>Rp4		y7-y8 =	6.95 >Rp2
y3-y4 = 4.66	<Rp3		y8-y6 =	9.22 >Rp3
y3-y1 = 0.39	<Rp2		y8-y5 =	3.63 <Rp2
y1-y6 = 32.24	>Rp6		y5-y6 =	5.59 >Rp2

Comparación por intervalos múltiples de Duncan

Anexo III D

Efecto de la concentración inicial de inóculo

MUESTRA	DATOS		SUMA	PROMEDIO
74.25	86.06	87.86	89.34	87.7533333
14.85	79.15	79.22	80.26	79.5433333
4.95	66.4	66.7	133.1	66.55
1.65	31.78	35.66	31.17	32.87
0.55		24.32	17.8	21.06
SUMA	263.39	293.76	218.57	775.72

MUESTRA	CUADRADOS		SUMA
74.25	7406.3236	7719.3796	7981.6356
14.85	6264.7225	6275.8084	6441.6676
4.95	4408.96	4448.89	0
1.65	1009.9684	1271.6356	971.5689
0.55	0	591.4624	316.84
SUMA	19089.9745	20307.176	15711.7121
			55108.8626
			155463.741

Comparación por intervalos múltiples de Duncan

Efecto de la concentración inicial de inóculo

Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados libertad	Media de cuadrados	Fo	Fo teórica
Total	8821.05349	12			
Tratamiento	8781.72196	4	2195.43049	446.54867	
Error	39.3315333	8	4.91644167		

Error estándar

$$s_y = 1.40234684$$

Intervalo	significativo	Promedio
rp2=	3.26 *sy=	4.57165071
rp3=	3.39 *sy=	4.7539558
rp4=	3.47 *sy=	4.86614354
rp5=	3.52 *sy=	4.93626089
y1-y5 = 66.65	> Rp5	87.75
y1-y4 = 54.88	> Rp4	79.54
y1-y3 = 21.05	> Rp3	66.7
y1-y2 = 8.21	< Rp2	32.87
y2-y5 = 58.44	> Rp4	21.1
y2-y4 = 46.67	> Rp3	
y2-y3 = 12.84	> Rp2	
y3-y5 = 45.6	> Rp3	
y3-y4 = 33.83	> Rp2	
y4-y5 = 11.77	> RP2	