

011778
2eg



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DE LA FACULTAD DE INGENIERÍA
(CAMPUS MORELOS)

TESIS

“EVALUACION DE LA REMOCIÓN DE AZUFRE DE UN
COMBUSTÓLEO POR MEDIO DE BACTERIAS SULFATO-
REDUCTORAS POR VIA ANAEROBIA”

Presenta:

Q.I. Abelardo Rodríguez Díaz

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN INGENIERÍA AMBIENTAL

Asesora:

Dra. Blanca E. Jiménez Cisneros

Coasesor:

M. en B. Luis G. Torres Bustillos

Noviembre, 1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

272700



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

El presente trabajo de tesis se llevó a cabo
en el Instituto de Ingeniería
de la Universidad Nacional Autónoma de México
bajo la asesoría de la
Dra. Blanca E. Jiménez Cisneros
y la coasesoría del
M. en B. Luis G. Torres Bustillos

DEDICATORIA



A mis Padres

Por sus oraciones y su fortaleza,
por sus enseñanzas y sus labranzas en mi ser
para llegar a ser una persona honesta en la vida.

A mis hermanos

A Mary y sus hijos Itzel, Rury y Edwin
por su gran cariño hogareño y permitirme
entrar en su mundo por un rato y soportarme.

A mis otros hermanos Arturo, Ana, Rogelio y Dali,
por su comprensión y sus oraciones.

A mis sobrinos Coque, Karen, Arturito, Marlen y Roge,
por sus sonrisas y su cariño.

A Josué por su apoyo, comprensión y su paciencia.

A Esther por contagiarme de entusiasmo

A todos mis amigos

Por las palabras de aliento y la amistad
que me han proporcionado.

AGRADECIMIENTOS



A la Directora de tesis Dra. Blanca Jiménez Cisneros por la oportunidad de participar con este trabajo en el Instituto de Ingeniería.

Al Coasesor de esta tesis M en B. Luis G. Torres Bustillos por la asesoría técnica otorgada para la elaboración del trabajo de tesis.

A el Jurado Revisor por el tiempo empleado para la revisión de esta tesis y sus sugerencias a la misma.

Al instituto de Ingeniería, por la oportunidad de participar con un trabajo de tesis en este proyecto y su apoyo técnico.

A los compañeros y amigos que me apoyaron en el laboratorio y por sus comentarios a la tesis (Norma, Verónica, Juan, Ruben, Edmundo).

AGRADECIMIENTO



A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico

(DGAPA)

por el apoyo económico otorgado
durante la realización de esta tesis.

INDICE

RESUMEN	I
LISTA DE TABLAS	II
LISTA DE FIGURAS	IV
OBJETIVOS	VI
I. INTRODUCCION	1
2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS	3
2.1. El petróleo y sus derivados	3
2.1.1. Origen	3
2.1.2. Refinación	3
2.1.3. Reservas de petróleo	4
2.1.4. Propiedades de los combustibles líquidos	5
2.1.5. Compuestos de azufre en el petróleo	6
2.1.6. Compuestos de azufre en el carbón	10
2.2. El combustóleo	10
2.2.1. Importancia del combustóleo	10
2.2.2. Producción y consumo	11
2.2.3. Tipos de combustóleo en México	11
2.3. Efectos de azufre en el ambiente	12
2.3.1. Azufre proveniente de derivados del petróleo	12
2.3.2. Azufre proveniente del combustóleo	12
2.3.3. Contaminación por emisiones de SO ₂	13
2.3.3.1. Grado de conversión de SO ₂ en SO ₃ y emisiones de SO ₃ en generadores de vapor	14
2.3.4. Impactos ambientales provocados por los compuestos de azufre	16
2.4. Normatividad del azufre en el combustóleo y otros combustibles	17
2.5. Microorganismos que degradan azufre	18
2.5.1. Requerimientos para el crecimiento microbiano	19
2.5.2. Bacterias sulfato-reductoras	19
2.5.2.1. Distribución y papel de la bacteria desulfurante en la naturaleza	20
2.5.2.2. Enriquecimiento y aislamiento	20

2.5.2.3. Formación de sulfuro de hidrógeno por reducción de sulfato	22
2.5.2.4. Posición sistemática	23
2.5.2.5. Reducción de sulfito	23
2.5.2.6. Reducción de sulfatos	24
2.5.2.7. Reducción de azufre a sulfuro de hidrógeno	24
2.6. Fermentación	26
2.6.1. Microorganismos en la fermentación	26
2.6.2. Escalamiento de fermentaciones	26
2.7. Opciones para desulfurar combustóleo y otras fracciones del petróleo	27
2.7.1. Eliminación biológica de azufre en petróleo y carbón	28
2.7.1.1. Dibenzotiofeno como un sistema modelo	30
2.8. Estudios de biodesulfuración realizados	31
3. DESARROLLO EXPERIMENTAL	35
3.1. Ubicación del sitio	35
3.2. Metodología	35
3.2.1. Inoculación de los cultivos mixtos	35
3.2.2. Selección de las cepas	36
3.2.2.1. Pruebas de crecimiento microbiano a pH 7 y 5	36
3.2.2.2. Pruebas de remoción de sulfatos a pH 7 y 5	37
3.2.3. Pruebas con las cepas seleccionadas	38
3.2.3.1. Efecto de la concentración de sulfatos	38
3.2.3.2. Efecto del pH	39
3.2.3.3. Efecto de la temperatura	39
3.2.3.4. Adecuación con medio de cultivo preparado con agua de mar	40
3.2.4. Determinación de las condiciones de proceso	40
3.2.4.1. Relación entre los Sólidos Suspendidos Volátiles y el crecimiento microbiano	40
3.2.4.2. Escalamiento del proceso a nivel matraz en presencia de combustóleo	41
3.2.4.3. Escalamiento del proceso al fermentador	41
3.2.5. Biodesulfuración de combustóleo	44
3.2.5.1. Pruebas en medio Postgate B	44
3.2.5.2. Prueba en medio de cultivo preparado con agua de mar	46

4. RESULTADOS	47
4.1. Selección de las cepas	47
4.1.1. Crecimiento microbiano y remoción de sulfatos a pH 5 y 7	47
4.2. Cepas seleccionadas	54
4.2.1. Pruebas a pH 8	54
4.2.2. Efecto de la concentración de sulfatos	55
4.2.3. Efecto de la variación de temperatura	57
4.2.4. Crecimiento microbiano y remoción de sulfatos en medio preparado con agua de mar	59
4.3. Escalamiento a nivel matraz	61
4.3.1. Relación entre los Sólidos Suspendidos Volátiles y el crecimiento microbiano	61
4.3.2. Efecto del crecimiento microbiano en presencia de combustóleo	62
4.4. Escalamiento al fermentador	62
4.4.1. Prueba preliminar con la cepa 5	62
4.4.2. Pruebas de crecimiento microbiano y remoción de sulfatos con cepa 22	63
4.4.2.1. Prueba 1	63
4.4.2.2. Prueba 2	63
4.4.2.3. Prueba 3	65
4.5. Biodesulfuración del combustóleo	66
4.5.1. Experiencia 1	66
4.5.2. Experiencia 2	68
4.5.3. Experiencia 3	70
4.5.4. Experiencia 4 (Medio de cultivo con agua de mar)	73
4.5.5. Resumen de las cuatro pruebas de biodesulfuración	75
5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	77
5.1. CONCLUSIONES	77
5.2. RECOMENDACIONES	79
6. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	80

APÉNDICE A.

PROPIEDADES DE LOS COMBUSTIBLES LIQUIDOS 83

APÉNDICE B.

TECNICAS ANALITICAS 85

APÉNDICE C

TABLAS DE RESULTADOS 97

RESUMEN

México en la actualidad, ocupa uno de los primeros lugares como productor y exportador de crudo en el mundo. El combustóleo mexicano es un energético de alto poder calorífico y bajo costo, sin embargo contiene concentraciones importantes de impurezas como: azufre, vanadio, níquel y sales. Principalmente, el alto contenido de azufre (entre 1.5 y 4.5%) que sobrepasa los requerimientos internacionales para cumplir con las emisiones al aire permitidas para los óxidos de azufre (menor al 1%), hace que el petróleo mexicano y sus derivados se coticen a un costo entre 35 y 40% menor que el de otros países cuyo contenido de azufre es inferior.

El problema de la ignición del combustóleo es la gran generación de SO_x emitidos a la atmósfera, los cuales junto con otros agentes producen la lluvia ácida, causante de diversos problemas de salud, así como alteraciones en los ecosistemas forestales. Actualmente en México se lleva a cabo la desulfuración del combustóleo por medio de la hidrodesulfuración catalítica, la cual utiliza altas temperaturas y presiones que hacen a este proceso costoso, además de que se pierde parte del poder calorífico del combustible. Como una alternativa a este proceso, se propone la biodesulfuración por vía anaerobia que, comparado con otros procesos de remoción de azufre, tiene la ventaja de reducir los costos por inversión y operación por el uso de presiones y temperaturas bajas, no tener costos por catalizadores metálicos ni por suministro de hidrógeno.

El objetivo principal de este trabajo fue el demostrar la factibilidad técnica para la remoción de azufre del combustóleo por vía biológica desarrollándola en condiciones anaerobias, como primer punto de referencia hacia otros combustibles.

La metodología llevada a cabo inició con el muestreo de las 24 cepas realizado con el apoyo del transporte marítimo del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología en sedimentos marinos de las zonas petroleras de Oaxaca y Campeche y de un reactor anaerobio de la ciudad de Toluca, logrando el desarrollo de estos consorcios en medio Postgate B; de aquí se realizó la selección de 5 de las mejores cepas, con las cuales se diseñaron las condiciones de operación tomando en cuenta el efecto del cambio de pH a un valor de 5, 7 y 8, el efecto de la temperatura de 35 y 45 °C y el efecto de la concentración de sulfatos tanto a nivel de vial como a nivel matraz. A esta misma escala se desarrolló una prueba de un medio de cultivo alterno caracterizado por ser de bajo costo preparado con agua de mar demostrando ser un medio efectivo tanto para el crecimiento de las bacterias como de su actividad sulfato-reductora; con las condiciones de operación encontradas (pH de 7, temperatura de 35 °C, 2.17 gSO₄/L y 2 semanas de operación) se llegó a la siguiente escala con el fermentador haciendo pruebas preliminares con la mejor cepa resultante obteniendo remociones de azufre como sulfatos del orden de 10 a 60%.

Con la cepa seleccionada por su actividad sulfato-reductora y durante las pruebas a nivel fermentador con el combustóleo, se lograron obtener remociones de azufre total que variaron entre 8.8 y 38.9%, resultando la más alta remoción con el medio preparado con agua de mar. Con esto se demostró que la biodesulfuración es una alternativa adecuada al proceso de desulfuración actualmente utilizado.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Página
Tabla 2.1.	Relación de fracciones en las que se puede separar un crudo	4
Tabla 2.2	Reservas de petróleo estimadas de varios países	5
Tabla 2.3	Contenido de azufre orgánico de algunos crudos	7
Tabla 2.4	Composición de un crudo mexicano	7
Tabla 2.5	Compuestos de azufre encontrados en un crudo	9
Tabla 2.6	Contenido de azufre en el carbón de diversas fuentes	10
Tabla 2.7	Valores comparativos de poder calorífico y costo para algunos combustibles industriales	10
Tabla 2.8	Consumo de combustóleo por la industria mexicana	11
Tabla 2.9	Aportación de emisiones de SO ₂ a la atmósfera por ramo	13
Tabla 2.10	Factores de emisión para procesos de combustión y carga contaminante por energía producida de cada combustible	14
Tabla 2.11	Ocurrencia de compuestos volátiles de azufre en los océanos (1 µg S/m ³) y en la atmósfera (ppb)	16
Tabla 2.12	Propiedades de algunos compuestos volátiles de azufre	17
Tabla 2.13	Normas Oficiales Mexicanas que regulan el contenido de azufre en combustibles	17
Tabla 2.14	Normas Oficiales Mexicanas que establecen los máximos niveles permisibles de emisión de contaminantes	18
Tabla 2.15	Algunos microorganismos degradadores de azufre orgánico y sus sustratos	21
Tabla 2.16	Constante de ionización del H ₂ S a diferentes temperaturas	25
Tabla 2.17	Solubilidad del H ₂ S para diferentes temperaturas	26
Tabla 2.18	Características de escalamiento de fermentación	27
Tabla 2.19	Biodesulfuración con <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	33
Tabla 2.20	Resumen de los estudios de biodesulfuración de combustibles realizados por otros investigadores	34
Tabla 3.1	Clave de cepas	36
Tabla 3.2	Sulfatos del medio de cultivo Postgate B	38
Tabla 3.3	Iones totales requeridos en la preparación del medio Postgate B	40
Tabla 3.4	Análisis del combustóleo proveniente de la refinería de Tula, Hgo	45
Tabla 4.1	Crecimiento microbiano de las 24 cepas a pH 5	48
Tabla 4.2	Remoción de sulfatos de las 24 cepas a pH 5	49
Tabla 4.3	Crecimiento microbiano de las 24 cepas a pH 7	50
Tabla 4.4	Remoción de sulfatos de las 24 cepas a pH 7	52
Tabla 4.5	Resultados del análisis del agua de mar proveniente de Pochutla, Oax.	59
Tabla 4.6	Crecimiento celular de la cepa 22 y remoción de sulfatos en medio de cultivo con agua de mar	60
Tabla 4.7	Crecimiento bacteriano de la prueba 2 con cepa 22	64
Tabla 4.8	Resultados de la experiencia 1 del proceso de biodesulfuración	68

Tabla 4.9	Resultados de la muestra residual de la experiencia 1 del proceso de biodesulfuración	68
Tabla 4.10	Resultados de la muestra de combustóleo de la experiencia 2 de biodesulfuración	70
Tabla 4.11	Resultados del agua residual de la experiencia 2 del proceso de biodesulfuración	70
Tabla 4.12	Resultados de la muestra de combustóleo de la experiencia 3 del proceso de biodesulfuración	72
Tabla 4.13	Resultados del agua residual de la experiencia 3 del proceso de biodesulfuración	73
Tabla 4.14	Resultados de la muestra de combustóleo de la experiencia 4 del proceso de biodesulfuración (con agua de mar)	75
Tabla 4.15	Resultados del agua residual del proceso de biodesulfuración (con agua de mar)	75
Tabla B.1	Medio de cultivo API (RP38)	94
Tabla B.2	Medio de cultivo Postgate B (por cada litro de agua)	95
Tabla C.1	Actividad específica de las 24 cepas a pH 5 y 7	97
Tabla C.2	Crecimiento microbiano y remoción de sulfatos con las cepas seleccionadas a pH 8	97
Tabla C.3	Crecimiento microbiano y remoción de sulfatos de las cepas seleccionadas a diferente concentración de sulfatos	98
Tabla C.4	Crecimiento microbiano y remoción de sulfatos con las cepas seleccionadas a 45 °C	98
Tabla C.5	Remoción de sulfatos y producción de sulfhídrico de la Prueba 2 con la cepa 22	98
Tabla C.6	Remoción de sulfatos y producción de sulfhídrico de la Prueba 3 con la cepa 22	99

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Página
Figura 2.1	Cambio en el contenido de azufre de un crudo refinado en los Estados Unidos entre 1981 y 1990	6
Figura 2.2	Compuestos orgánicos de azufre prototipo contenidos en el petróleo	8
Figura 2.3	Precio del combustóleo en diferentes países	12
Figura 2.4	Emisiones de contaminantes en México durante 1994	14
Figura 2.5	Fases del crecimiento microbiano	19
Figura 2.6	Diagrama del proceso de hidrosulfuración	28
Figura 2.7	Diagrama del proceso de biodesulfuración catalítica para hidrocarburos	29
Figura 3.1	Fermentador o bioreactor	42
Figura 4.1	Crecimiento microbiano de las 24 cepas a pH 5	47
Figura 4.2	Remoción de sulfatos de las 24 cepas a pH 5	49
Figura 4.3	Crecimiento microbiano de las 24 cepas a pH 7	51
Figura 4.4	Remoción de sulfatos de las 24 cepas a pH 7	51
Figura 4.5	Actividad específica de las 24 cepas a pH 5	53
Figura 4.6	Actividad específica de las 24 cepas a pH 7	53
Figura 4.7	Crecimiento microbiano de las cepas seleccionadas a pH 8	54
Figura 4.8	Remoción de sulfatos a pH 7 y 8 con las cepas seleccionadas	55
Figura 4.9	Crecimiento microbiano de las cepas seleccionadas en diferente concentración de sustrato	55
Figura 4.10	Remoción de sulfatos de las cinco cepas seleccionadas con diferente concentración de sustrato	57
Figura 4.11	Crecimiento bacteriano de las cepas bacterianas a 45 °C	58
Figura 4.12	Remoción de sulfatos con las cepas seleccionadas a 45 °C	58
Figura 4.13	Efecto de la temperatura sobre la remoción de sulfatos con cepas seleccionadas	59
Figura 4.14	Crecimiento bacteriano de las cepas seleccionadas en medio de cultivo con agua de mar	60
Figura 4.15	Crecimiento celular de la cepa 22 y remoción de sulfatos en medio de cultivo con agua de mar	61
Figura 4.16	Relación entre los SSV y el crecimiento microbiano	61
Figura 4.17	Efecto del combustóleo sobre el crecimiento bacteriano con las cepas seleccionadas en presencia o ausencia de sulfatos	62
Figura 4.18	Remoción de sulfatos y crecimiento microbiano de la Prueba 1 con cepa 22	63
Figura 4.19	Crecimiento microbiano de la cepa 22 en la Prueba 2 de remoción de sulfatos a nivel fermentador	64
Figura 4.20	Remoción de sulfatos y producción de sulfhídrico de la Prueba 2 con cepa 22	65
Figura 4.21	Remoción de sulfatos y producción de sulfhídrico de la Prueba 3 con cepa 22	66
Figura 4.22	Consumo de energía en la formación de la emulsión de la experiencia 1 de biodesulfuración con combustóleo	67

Figura 4.23	Concentración de sulfhídrico generado en la experiencia 1 de biodesulfuración del combustóleo	67
Figura 4.24	Consumo de energía en la formación de la emulsión de la experiencia 2 de biodesulfuración del combustóleo	69
Figura 4.25	Concentración de sulfhídrico generado en la experiencia 2 de biodesulfuración de combustóleo	69
Figura 4.26	Consumo de energía en la formación de la emulsión de la experiencia 3 de biodesulfuración de combustóleo	71
Figura 4.27	Concentración de sulfhídrico generado en la experiencia 3 de biodesulfuración del combustóleo	72
Figura 4.28	Consumo de energía en la formación de la emulsión de la experiencia 4 de biodesulfuración de combustóleo	74
Figura 4.29	Concentración de sulfhídrico generado en la experiencia 4 de biodesulfuración de combustóleo	74
Figura 4.30	Comparación de remoción de azufre con las 4 pruebas de biodesulfuración	76
Figura B.1	Curva de calibración de concentración de ion sulfuro en solución buffer antioxidante	90
Figura B.2	Curva de calibración de concentración de ion sulfuro en medio Postgate B	90

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Demostrar y evaluar la remoción del azufre presente en el combustóleo por medio de bacterias sulfato-reductoras en un medio anaerobio.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Demostrar que la biodesulfuración puede ser una alternativa adecuada de la hidrodesulfuración catalítica.
- Desarrollar los mecanismos de crecimiento y degradación del azufre de las bacterias sulfato-reductoras en presencia de combustóleo, a escala Laboratorio en matraces y en fermentador.
- Seleccionar las cepas promisorias que presenten mejores resultados de remoción de azufre como sulfato proveniente del medio de cultivo.
- Identificar los parámetros más adecuados de operación como pH, temperatura, concentración de sulfatos y tiempo.
- Proponer un medio de cultivo alternativo que demuestre ser ventajoso al medio de Postgate B.
- Adecuar la emulsión idónea en las prácticas de remoción del azufre por microorganismos, así como la metodología más adecuada para la ruptura de la emulsión.
- Identificar las técnicas analíticas y microbiológicas de detección de la actividad sulfato-reductora.
- Biodesulfurar el combustóleo a nivel fermentador con la cepa seleccionada cuya eficiencia fue óptima.
- Identificar las técnicas de recuperación o disposición de productos secundarios obtenidos durante el proceso de eliminación de azufre.

1. INTRODUCCIÓN

El problema de la emisión de los óxidos de azufre provenientes de la quema de combustibles, en general, ha sido poco estudiado, siendo la mayor parte de estas investigaciones alternativas biológicas que proponen un sistema aerobio y en menor escala los trabajos desarrollados con sistemas anaerobios, debido, probablemente, a la complejidad que implica. Por tal motivo, se inició un proyecto de colaboración académica entre el Instituto de Ingeniería y el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, del cual forma parte este trabajo de tesis donde se propone una alternativa para mejorar la calidad del combustóleo disminuyendo el contenido de azufre, utilizando para ello microorganismos adaptados a un sistema anaerobio. El desarrollo de este trabajo incluye cinco capítulos, siendo este el primero de ellos.

En el segundo capítulo se presentan los fundamentos teóricos que dan sustento a esta Tesis. En éste se da una idea generalizada del origen del combustóleo, se indican sus características remarcando principalmente el contenido de azufre, los tipos de combustóleo en México y los efectos al ambiente provocados por la quema de este combustible. Contiene, además un panorama general de los microorganismos degradadores del azufre, como es el caso de las bacterias sulfato-reductoras, los mecanismos de remoción del azufre, las opciones para desulfurar el combustóleo y los estudios realizados con anterioridad para combatir este problema.

En el tercer capítulo se describe la metodología experimental, la cual inició con el estudio de 24 muestras de microorganismos provenientes de sedimentos marinos y de un digestor anaerobio de una planta de tratamiento de aguas residuales, donde se incluye la inoculación y adaptación de las cepas a un medio de cultivo adecuado y seleccionando 5 de ellas para la determinación de los mecanismos de operación para el escalamiento a la fase final con el fermentador. En esta etapa también se desarrolló una técnica para la formación y el rompimiento de la emulsión para llevar a cabo las pruebas de biodesulfuración con el combustóleo.

En el cuarto capítulo se presentan los resultados obtenidos de la fase experimental con las 24 cepas estudiadas, de acuerdo con los resultados de crecimiento microbiano y remoción de sulfatos. Se da el detalle para la selección de las cepas y se indican cuales fueron los parámetros que se tomaron en cuenta para el escalamiento al fermentador. También se dan los resultados de las pruebas a esta escala al utilizar los sulfatos como indicadores de la remoción de azufre y de las pruebas realizadas con el combustóleo, determinando la remoción del azufre total.

En el capítulo 5 se resumen los principales resultados obtenidos, la factibilidad de la biodesulfuración con el combustóleo, la selección de la cepa más adecuada y el cumplimiento de los objetivos marcados inicialmente; así mismo se dan recomendaciones que ayuden al mejoramiento de la metodología empleada.

Al final se enlistan las referencias bibliográficas que se mencionan en cada capítulo y en las que se fundamentan algunos datos básicos.

Se presentan en forma anexa, datos que sirven de apoyo para el mejor entendimiento del desarrollo de esta tesis, incluyendo los datos de resultados mostrados en las gráficas que están dentro del capítulo 4.

2. FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1. EL PETRÓLEO Y SUS DERIVADOS

La mitad de la energía que se consume en el mundo proviene del petróleo y del gas natural. Pero, el petróleo no es sólo un combustible sino además es una fuente de diversas sustancias en la vida actual como los lubricantes, la parafina, la vaselina; por medio de la petroquímica, brinda además caucho sintético, fibras artificiales y toda clase de materiales de uso diario.

La palabra petróleo deriva del latín y significa aceite de piedra o aceite mineral. Se conoce y se utiliza desde la antigüedad. Una de sus formas el asfalto o betún de Judea. Entre los fenicios, el petróleo servía para calafatear las embarcaciones, para los Sumerios y Babilonios era una especie de argamasa empleada en la arquitectura y los egipcios lo aprovechaban hasta para la preparación de las momias.

Sólo al comenzar la edad de la máquina, el petróleo adquirió gran valor y hubo hombres que con extraordinario ahínco lo buscaron y extrajeron. En 1859, en Titusville, Pennsylvania, a sólo 20 metros de profundidad, se perforó el primer pozo de petróleo por el Coronel Drake que producía menos de 31 barriles de petróleo al día. Actualmente, sólo en México se producen 3,500,000 barriles por día.

2.1.1. Origen

Los grandes yacimientos que hoy se explotan se formaron hace millones de años con los depósitos de minúsculos cadáveres de plantas y animales que abundaban en mares tropicales interiores poco profundos. Allí los cubrían los sedimentos que desde la tierra arrastraban ríos y arroyos. El espesor de esa capa mineral aumentó gradualmente y, gracias a fenómenos químicos, que aún se discuten, los restos orgánicos se convirtieron en petróleo. Los factores más importantes fueron sin duda la presión producida por el peso de sedimentos ulteriores y el calor; pero la acción de las bacterias, especialmente en la transformación final, es desconocida.

2.1.2. Refinación

El líquido que se extrae de una región tiene una composición peculiar que, por lo general, no responde a las necesidades de la industria, contiene una amplia variedad de hidrocarburos desde gases ligeros, hasta residuos pesados. Contiene parafinas, cicloparafinas y compuestos aromáticos en variadas proporciones, con algunos compuestos orgánicos de azufre, pequeñas cantidades de nitrógeno, oxígeno y olefinas. Por medio de la destilación fraccionada, es decir, hirviendo el petróleo y condensando sus ingredientes según sus distintos puntos de ebullición, se separa cada componente (Tabla 2.1).

Tabla 2.1. Relación de fracciones en las que se puede separar un crudo

Temperaturas °C	Fracción
menos de 32	Butanos y más ligeros
32 - 104	Gasolina
104 - 157	Nafta
157 - 232	Queroseno
232 - 426	Gasóleo
426 y +	Residuo

Fuente: Speight, 1991

La refinación se inicia con un lavado con agua para eliminar sales y partículas suspendidas. Posteriormente, pasa a una torre de destilación atmosférica, en donde se separan gases ligeros como metano, etano, propano y butano, gasolina, nafta, queroseno, gasóleo ligero, gasóleo pesado y residuo. Los ligeros hasta queroseno, se les da un tratamiento para mejorar su calidad y eliminar el azufre.

El residuo de la destilación atmosférica pasa a la torre de alto vacío en donde se obtienen: gasóleos ligeros y pesados que se tratan posteriormente en un proceso de craqueo catalítico y residuos denominados de vacío pasan a una viscoreductora para facilitar su manejo. Al producto resultante se le llama combustóleo que en la mayoría de las refinerías es el producto final pero en algunas se somete a tratamientos más severos para obtener destilados y residuos sólidos.

2.1.3. Reservas de petróleo

En la tabla 2.2, se muestran las reservas de crudo en algunos países. México es el país de Latinoamérica que produce más barriles de petróleo al día. Sus reservas ascienden a 7.6 mil millones de toneladas, lo que representa un 7.8 % del mundial, sólo superado por Kuwait, Arabia Saudita y la antigua URSS.

Tabla 2.2. Reservas de petróleo estimadas de varios países

País	Miles de millones de toneladas	Miles de millones de barriles	Porción del total %	Relación Reservas / Producción
Japón	-	0.1	-	14.0
Ecuador	0.2	1.7	0.2	16.7
Australia	0.2	1.7	0.2	6.8
Argentina	0.3	2.3	0.3	14.4
Brasil	0.3	2.3	0.3	10.1
Reino Unido	0.7	5.3	0.8	5.5
Canadá	1.0	7.9	1.1	12.3
Nigeria	2.2	16.0	2.3	30.2
China	2.4	18.4	2.6	18.5
Libia	2.8	21.3	3.0	55.1
Venezuela	3.6	15.0	3.6	38.7
Estados Unidos	4.1	32.5	4.6	8.5
Irak	6.3	47.1	6.7	74.7
Irán	6.7	48.8	6.9	71.1
México	7.6	54.7	7.8	56.3
URSS	8.0	59.0	8.4	13.1
Kuwait	12.7	91.9	13.1	-
Arabia Saudita	22.7	166.6	23.7	90.3
Total	95.2	703.1	100.0	89.5

Fuente: Speight, 1991

2.1.4. Propiedades de los combustibles líquidos

A continuación se menciona las propiedades más importantes de los combustibles líquidos, las de orden secundario se indican en el Apéndice A.

Densidad. La densidad de un combustible líquido se determina fácilmente, cualquiera que sea la temperatura a que se encuentre, con auxilio de un densímetro y por estandarización se mide a 15 °C.

Poder calorífico. El poder calorífico superior (PCS) de un combustible líquido, expresado en kcal/kg depende de la densidad (d) según la fórmula:

$$PCS = 12,400 - 2,100 (d^2) \quad (2.1)$$

El calor específico de un combustible líquido a presión constante (cp) y a una determinada temperatura (t °C), expresado en kcal/kg, en función de la densidad y de la temperatura, es:

$$Cp = 1/\sqrt{d}(0.403 - 0.0008 t) \quad (2.2)$$

Viscosidad. Expresa el tiempo requerido para que una cantidad dada de combustible fluya por un tubo capilar en condiciones específicas. La viscosidad de un combustible líquido varía intensamente en función de la temperatura y resulta poco sensible a oscilaciones moderadas de presión.

Inflamabilidad. El punto de inflamación o inflamabilidad de un combustible líquido es el valor de la temperatura a la cual el producto, emite suficientes vapores para que pueda inflamarse la mezcla aire-gas en condiciones específicas.

Contenido en azufre. Esta determinación se realiza oxidando el azufre presente en presencia de oxígeno, empleando una mufla tubular de alta temperatura, con posterior detección continua del producto de oxidación (SO₂), por absorción infrarroja y define el contenido total de azufre (orgánico e inorgánico) en una muestra.

2.1.5. Compuestos de azufre en el petróleo

Los compuestos de azufre son los constituyentes heteroatómicos más importantes del petróleo, y son las condiciones prevalecientes durante la formación, maduración y aún en la alteración misma, los que dictaminan qué tipos de compuestos azufrados existirán en el crudo. La proporción de azufre en los productos incrementa con el punto de ebullición durante la destilación, sin embargo, las fracciones medias pueden contener más azufre que las fracciones pesadas como resultado de la descomposición de compuestos de peso molecular más altos durante la destilación. El contenido de azufre en fracciones de crudo, generalmente incrementan en la siguiente secuencia: saturados < aromáticos < resinas < asfáltenos.

En general, el contenido de azufre varía en función de la región geográfica de origen y con el tiempo (Figura 2.1)

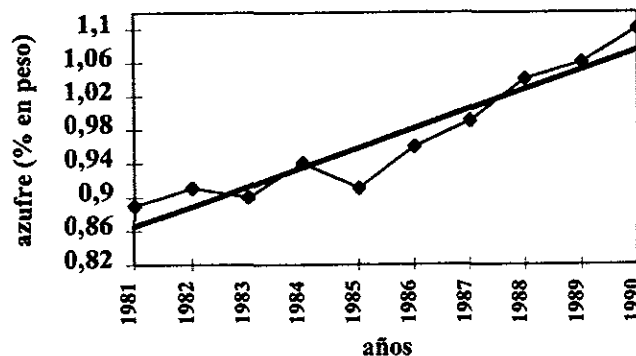


Figura 2.1. Cambio en el contenido de azufre de un crudo refinado en los Estados Unidos entre 1981 y 1990, (Klaus y Mieczyslaw, 1994)

El azufre total en las fracciones del petróleo varía de aproximadamente 0.04 % para una parafina ligera hasta cerca de 5 % para un crudo pesado.

En la tabla 2.3, se muestra el contenido de azufre orgánico de algunos crudos.

Tabla 2.3. Contenido de azufre orgánico de algunos crudos

Fuente	% Azufre
México (Istmo)	1.5
México (Maya)	3.3
México (Olmeca)	0.8
Kuwait	2.6
Venezuela	1.7
Mississippi	1.6
Oeste de Texas	0.05 - 5.0
California	1.0
Canadá	0.44
Este de Texas	0.26
Norte de África	0.18

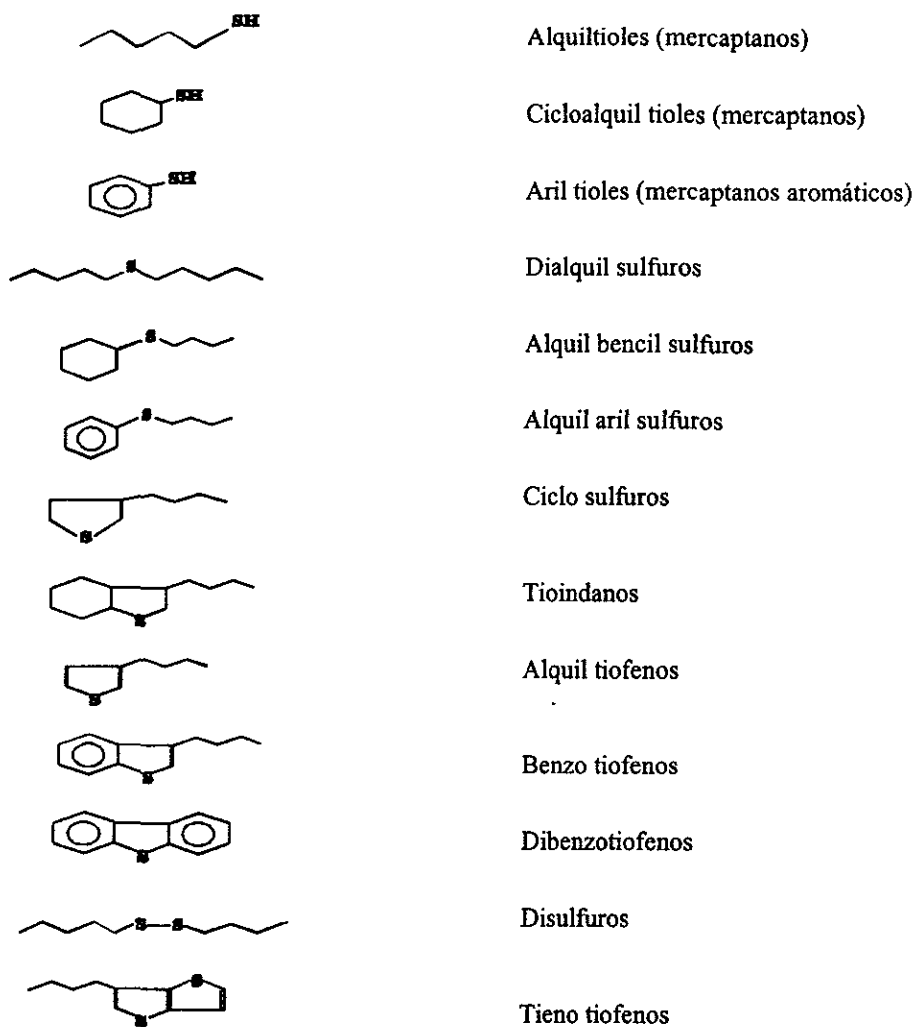
Fuente: Monticello y Finnerty, 1985

Según un estudio realizado a crudos de diferentes fuentes, se tiene que la composición del crudo mexicano es la siguiente:

Tabla 2.4. Composición de un crudo mexicano. Speight, 1991

Elemento	% en peso
Carbón	83.0
Hidrógeno	11.0
Oxígeno	1.70
Azufre	4.30

A grandes rasgos existe una fracción inorgánica compuesta por sulfatos (en baja proporción) y otra orgánica, en la cual se distinguen cinco clases de compuestos mayoritarios que incluyen tioles o mercaptanos, sulfuros, disulfuros, sulfóxidos y tiofenos. Los primeros cuatro pueden ser divididos en especies cíclicas y alicíclicas así como en derivados alquil-, aril- y alquilaril. Mientras que, los tiofenos, están relacionados con anillos aromáticos, entre los cuales están los benzo-, dibenzo-, naftobenzo-tiofenos y otros derivados. La figura 2.2 muestra las estructuras químicas de algunos compuestos prototipo de azufre. Los derivados del dibenzotiofeno tales como: Benzotiofeno y Dibenzotiofeno están usualmente presentes en fracciones del petróleo de alto punto de ebullición (se ha encontrado que el contenido de dibenzotiofenos constituye hasta en un 70 % del contenido de azufre orgánico en el crudo, como el de Texas). Por otro lado, los disulfuros no son considerados como verdaderos constituyentes del crudo y son generalmente formados por la oxidación de tioles durante el proceso.



**Figura 2.2. Compuestos orgánicos de azufre prototipo contenidos en el petróleo.
Hastings y Van Driesen, 1988**

Si el azufre elemental está presente en el crudo, existe una reacción que produce el sulfuro de hidrógeno y que comienza cerca de los 150 °C y es muy rápida a los 220 °C. En el caso de compuestos de azufre orgánicos no producen sulfuro de hidrógeno hasta que se alcanzan altas temperaturas. Cabe mencionar que el sulfuro de hidrógeno es un constituyente común de muchos crudos. De hecho, algunos crudos con más de 1% de azufre son acompañados con frecuencia por este gas. La tabla 2.5 presenta el análisis realizado a un crudo para determinar los posibles compuestos de azufre.

Tabla 2.5. Compuestos de azufre encontrados en un crudo

Nombre	Punto de ebullición °C	% en peso
Metanotiol	5.96	0.00240
Etanotiol	35.00	0.00530
2-Tiopropano	37.31	0.00088
2-Propanotiol	52.56	0.00199
2-Metil -propanotiol	64.22	0.00055
2-Tiobutano	66.65	0.00222
1-Propanotiol	67.50	0.00041
3-Metil -2- tiobutano	84.81	0.00064
2-Butanotiol	85.15	0.00386
2-Metil -1- propanotiol	88.72	0.00003
3-Tiopentano	92.10	0.00075
2-Tiopentano	95.52	0.00030
1-Butanotiol	98.40	Traza
2-Metil -2- butanotiol	99.00	0.00064
3,3-Dimetil -2- tiobutano	99.00	-
2-Metil -3- tiopentano	107.40	-
3-Metil -2- butanotiol	109.80	-
2-Pentanotiol	112.90	0.00140
3-Pentanotiol	113.90	0.00057
3-Tiohexano	118.50	0.00012
2,4-Dimetil -3- tiopentano	120.02	0.00053
2,2-Dimetil -3- tiopentano	120.41	0.000058
Tiociclopentano	121.12	0.000077
2-Tiohexano	123.20	0.000077
2-Metil 3- tiohexano	132.05	0.000078
Ciclopentanotiol	132.20	-
2-Metiltiociclopentano	133.23	0.00230
4-Metil -3- tiohexano	133.65	0.00050
3-Metiltiociclopentano	138.67	0.00046
2-Hexanotiol	138.90	0.00280
Tiociclohexano	141.75	0.00032
<i>trans</i> -2,5-Dimetiltiociclopentano	142.00	0.00250
<i>cis</i> -2,5-Dimetiltiociclopentano	142.28	0.00240
3-Tioheptano	144.24	0.000078
2-Metiltiociclohexano	153.04	0.00290
3-Metiltiociclohexano	158.04	0.000024
4-Metiltiociclohexano	158.64	0.000048
Ciclohexanotiol	158.80	0.00120
Total:		0.038

Fuente: Speight, 1991

2.1.6. Compuestos de azufre en el carbón

El porcentaje de azufre en el carbón varía ampliamente y va de 0.5 % a más de 11 % (Tabla 2.5). La mayoría del azufre se encuentra en dos formas: orgánica e inorgánica. El azufre elemental es raramente encontrado. El azufre inorgánico predomina como piritita o marcasita.

Tabla 2.6. Contenido de azufre en el carbón de diversas fuentes

Origen	Azufre total (%)
India	6.0 - 8.0
Oeste de Alemania	1.3 - 1.5
Gran Bretaña	1.0 - 3.6
Holanda	1.0 - 3.0
Francia	0.8 - 1.4
Bélgica	0.5 - 4.5
Polonia	0.5 - 2.8
Este de E. U. A.	0.2 - 7.0
Oeste de E. U. A.	0.2 - 1.0

Fuente: Monticello y Finnerty, 1985

2.2. EL COMBUSTÓLEO

2.2.1. Importancia del combustóleo

El combustóleo es el combustible que posee el mejor poder calorífico y la menor relación costo/energía producida, seguido por el carbón, el gas natural y el diesel (tabla 2.7).

Tabla 2.7. Valores comparativos de poder calorífico y costo para algunos combustibles industriales

Combustible	Poder calorífico	Costo*	Costo/energía \$/kcal
Combustóleo	157.8 kcal/L	170 \$/L	1.1
Gas Natural	133.2 kcal/m ³	243 \$/m ³	1.8
Diesel	145.5 kcal/L	516 \$/L	3.5
Carbón Micare	71.9 kcal/kg	103 \$/kg	1.4

* incluye 15% de IVA. Fuente: CFE, 1990

2.2.2. Producción y consumo

Se producen en México 450,000 barriles por día de combustóleo, de los cuales el 50% son absorbidos por la Comisión Federal de Electricidad para la generación de energía; mientras que el sector industrial consume el 21.3%, en diversos giros (tabla 2.8).

Tabla 2.8. Consumo de combustóleo por la industria mexicana

Tipo de industria	Consumo en calorías, (%)
Cemento	32.0
Química	14.5
Celulosa y papel	6.8
Siderúrgica	6.8
Petroquímica	3.6

Fuente: Secretaría de Energía, Minas e Industria Paraestatal, 1993

2.2.3. Tipos de combustóleo en México

En México se extraen principalmente tres tipos de crudo: el Istmo, el Maya, y el Olmeca. El primero es un crudo ligero que proviene de la región del Istmo de Tehuantepec, su comercialización inició en junio de 1974. El Maya, que es de tipo pesado y se obtiene de la sonda de Campeche, se empezó a comercializar en 1979. Finalmente, el Olmeca, es el crudo de mejor calidad que se produce en México y comenzó a exportarse en mayo de 1988 (CFE, 1990). Todos ellos son procesados en las refinerías de PEMEX instaladas en varios puntos de la República Mexicana.

Dependiendo del origen del petróleo y del tipo de proceso de transformación empleado (*i.e.* destilación, fraccionamiento, reforma catalítica y térmica, hidrólisis o destilación al vacío) es la calidad del combustóleo obtenido, y en consecuencia, el contenido de azufre. Morales, 1993, estudió varios tipos de combustóleo provenientes de termoeléctricas mexicanas, detectando niveles de azufre de 1.6% hasta 4.07% en peso.

Por otra parte, el precio del combustóleo varía de acuerdo al contenido de azufre. Como puede observarse en la figura 2.3, el precio del combustóleo mexicano siempre es inferior debido a su contenido de azufre y viscosidad.

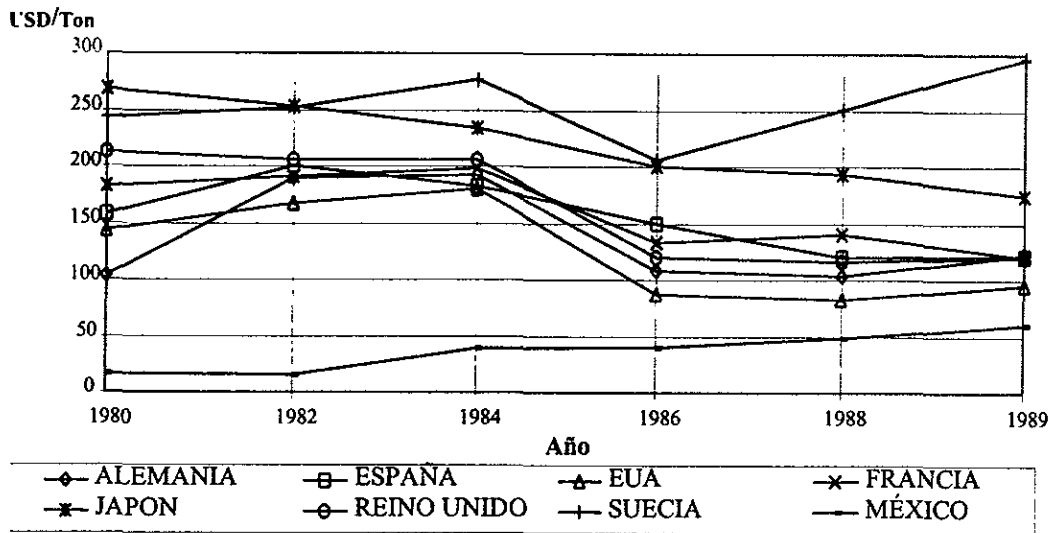


Figura 2.3. Precio del combustóleo en diferentes países. Speight, 1991

2.3. EFECTOS DEL AZUFRE EN EL AMBIENTE

2.3.1. Azufre proveniente de derivados del petróleo

Los compuestos de azufre en los productos del petróleo con frecuencia producen efectos dañinos. Por ejemplo, los de la gasolina promueven la corrosión de partes del motor, especialmente en invierno, cuando el agua proveniente de la combustión puede acumularse en el cigüeñal y formar ácido sulfúrico. Además, los mercaptanos contenidos en una solución de hidrocarburos también causan la corrosión del cobre y bronce en la presencia de aire. El azufre en forma libre también es corrosivo, como son los sulfuros, disulfuros, y tiofenos. Cabe mencionar que la gasolina, con un contenido de azufre entre 0.2 y 0.5 % ha sido usada sin efectos nocivos evidentes. En el diesel, los compuestos de azufre incrementan el consumo y pueden contribuir a la formación de depósitos en el motor.

2.3.2. Azufre proveniente del combustóleo

El combustóleo por ser una fracción pesada del petróleo que proviene de los procesos de destilación, contiene residuos e hidrocarburos de alto peso molecular y concentra algunos compuestos indeseables del crudo original como son el azufre, el vanadio, el níquel y algunas sales. En particular, el azufre genera la formación de óxidos que son gases muy tóxicos, los cuales son sólo etapas transitorias que conducen a la formación de sulfatos. Normalmente están presentes en la mayoría de los ambientes en muy bajas concentraciones. Sin embargo, la ignición de combustibles fósiles ha incrementado demasiado la concentración de óxidos volátiles en el aire, en especial en zonas urbanas.

2.3.3. Contaminación por emisiones de SO₂

El dióxido de azufre es muy dañino para el proceso fotosintético, produce alteraciones cardio-respiratorias, asfixia, endurecimiento del tórax, irritación del tracto respiratorio, inflamación de la mucosa nasal, disminución de la actividad ciliar, favorece el enfisema pulmonar y la bronquitis (ONU, OMS y OPS, 1982). Por otra parte, la combinación del bióxido de azufre con partículas suspendidas ha sido la responsable del incremento de la morbilidad y la mortalidad en enfermos crónicos del corazón y vías respiratorias (Quadri y Sánchez, 1994). Además, los óxidos de azufre combinados con otros compuestos presentes en el aire y con la participación de la luz solar y el oxígeno producen sulfatos y ácido sulfúrico, que a su vez generan la formación de la **lluvia ácida** que daña a los ecosistemas forestales, a los metales y a la piedra caliza (deterioro de monumentos y construcciones antiguas).

En cuanto a los aerosoles sulfatados, también derivados del azufre, son agentes irritantes de tres a cuatro veces más potentes que el dióxido de azufre y constituyen un problema serio para la salud, habiéndose demostrado que concentraciones muy bajas (de 8 a 10 µg/m³) ejercen efectos adversos sobre los asmáticos, los ancianos y otras personas susceptibles con problemas respiratorios crónicos (DDF, Gob. Edo. Mex., SEMARNAP y SSA, 1996).

En la tabla 2.9 se presenta la aportación de emisiones de SO₂ a la atmósfera por fuente para la zona metropolitana. Se observa que la industria es la responsable de la emisión anual de 41 mil toneladas, principalmente a partir de la combustión de combustóleo y/o gasóleo y, en mucho menor medida, del gas natural. De los giros industriales que más generan SO₂, son el de Celulosa y Papel seguido por el Textil y el de la industria Química.

Tabla 2.9. Aportación de emisiones de SO₂ a la atmósfera por ramo

Emisión	Fuente			
	Industria	Transporte	Servicios	Energía
SO ₂ (%)	76.87	15.80	5.61	1.72

Fuente: Quadri y Sánchez, 1994

De acuerdo con el balance nacional de energía el sector industrial consume 293,230 petacalorías¹ que corresponden al 33.9% del consumo nacional total que es de 970,106 petacalorías; las ramas industriales con mayor participación en consumo de energía e insumos materiales y con alto potencial de contaminación del aire son: Cemento, Azúcar, Petroquímica, Siderurgia, Química, Vidrio, Minería, Celulosa y Papel, Fertilizantes, Cerveza y Malta, Aguas Envasadas, Construcción, Producción de Electricidad, Automotriz, Hule, Aluminio y Tabaco.

En el sector industrial se utilizan diversos combustibles, aunque son tres los que se consumen en mayor cantidad, estos son el gas natural, el combustóleo y diesel, principalmente.

¹ 1 petacaloría = 1 x 10¹⁵ calorías

La generación de contaminantes emitidos a la atmósfera por el sector industrial es variada y depende de cada rama industrial y de su presencia en cada región del país. En 1994, el total de emisiones de SO₂ en todo el país fue de 1,161,231 ton/año (INE, 1994). En la figura 2.4 se presenta el porcentaje de emisiones por contaminante en todo el país durante 1994.

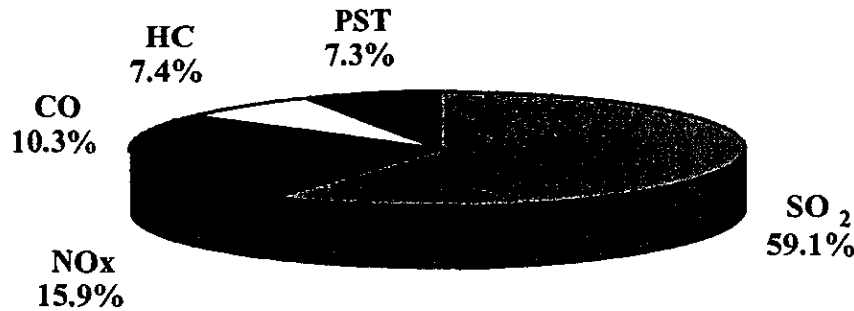


Figura 2.4. Emisiones de contaminantes en México durante 1994. INE, 1994

En cuanto a las emisiones producidas por los servicios, las mayores emisiones de SO₂ a la atmósfera son debidas a los baños públicos, siendo también aportadores importantes los deportivos y las tintorerías.

Los factores de generación de SO_x de cada combustible se muestran en la tabla 2.10, así como la carga contaminante producida por cada tipo de combustible y como es de esperarse, a pesar de su bajo precio es el combustóleo el que mayor contaminación genera, seguido del diesel.

Tabla 2.10. Factores de emisión para procesos de combustión y carga contaminante por energía producida de cada combustible

Contaminante	Combustóleo (x 10 ³ L)	Diesel (x 10 ³ L)	Gas natural (x 10 ³ m ³)
SO _x (kg)	76	42.5	0.0096
SO _x (kgSO _x /cal comb)	4.81 x 10 ⁻⁷	2.91 x 10 ⁻⁷	7.21 x 10 ⁻¹¹

Fuente: WB y DDF, 1990

2.3.3.1. Grado de conversión de SO₂ en SO₃ y emisiones de SO_x en generadores de vapor

Los compuestos de azufre, que forman parte de los combustibles sólidos y líquidos, se oxidan en SO₂, de acuerdo con la siguiente reacción



Durante el proceso de combustión una pequeña cantidad de este SO₂ (del 1 al 3%), se oxida en SO₃



El SO₂ y el SO₃, se combinan rápidamente con el oxígeno y la humedad, formando ácido sulfúrico (H₂SO₄), uno de los componentes de la lluvia ácida



Existen dos mecanismos para la oxidación del SO₂ a SO₃: en fase homogénea y en fase heterogénea.

Fase homogénea

En esta fase la oxidación es altamente dependiente de la temperatura, por lo que tiene lugar en el interior de la flama y a la salida del hogar de los generadores de vapor. A temperaturas entre 400 y 600 °C ocurre la máxima conversión de SO₂ en SO₃.

Fase heterogénea

La oxidación ocurre por los efectos catalíticos de los depósitos (Levy y Merryman, 1963), producidos por la oxidación de los metales contenidos en el combustóleo. En esta fase ocurre el mayor porcentaje de conversión de SO₂ en SO₃. La producción de SO₂ con combustóleo es aproximadamente el doble que la producción del SO₂ con carbón para porcentajes de 4 y 1% de azufre, respectivamente.

El SO₂ total producido para cualquier tipo de combustible (Espinosa *et al.*, 1996) puede obtenerse mediante la reacción

$$\text{SO}_2 = \frac{\frac{\text{S}}{32}(20.9 - \text{O}_2) * 10,000}{\frac{\text{C}}{12} + \frac{\text{S}}{32} + 0.79\left(\frac{\text{H}}{4} - \frac{\text{O}}{32}\right) + 0.21\left(\frac{\text{N}}{28}\right)} \quad (2.7)$$

donde

C, H, O, N y S: son las fracciones en peso de cada elemento en el combustible (adimensional),

O₂: es la concentración de oxígeno en los gases de combustión (%),

SO₂: está en ppm.

El grado de conversión de SO₂ en SO₃ no es proporcional al contenido de azufre en el combustible (Rendie, citado en Espinosa *et al.*, 1996). A mayores concentraciones de oxígeno la oxidación del SO₂ en SO₃ aumenta (Milán, citado en Espinosa *et al.*, 1996). La formación de SO₃ está influenciada por el tamaño del generador de vapor y, a su vez, por los tiempos de residencia de los gases de combustión (Squires, citado en Espinosa *et al.*,

1996).

Los valores de SO₃ medidos en chimeneas de generadores de vapor con capacidades de 25 a 350 MW no exceden por mucho las 7 ppm para combustóleo con contenidos de azufre de hasta 4%. (Espinosa *et al.*, 1992).

En generadores de vapor que utilizan carbón, la neutralización del SO₂ y del SO₃ es mayor por el alto contenido de cenizas. Por ello, las emisiones de SO₂ y de SO₃ son bajas.

2.3.4. Impactos ambientales provocados por los compuestos de azufre

Charlson *et al.*, 1987, sugieren que el dimetilsulfuro en particular, juega un papel importante en el control climático. En la atmósfera, el ácido metano-sulfónico, un producto de la degradación del dimetil sulfuro, tiene un papel significativo en la formación de nubes, tal como el dimetilsulfuro afecta también el clima.

Los compuestos que contribuyen al transporte del azufre oceánico y terrestre a la atmósfera son: carbonilsulfuro, carbonildisulfuro y los metilsulfuros, dimetildisulfuro, metanotiol, en menor grado, dimetildisulfuro. La ocurrencia natural promedio del dimetilsulfuro, carbonilsulfuro y carbonildisulfuro en los océanos y atmósfera se presenta en la tabla 2.11.

Tabla 2.11. Ocurrencia de compuestos volátiles de azufre en los océanos (1 µg S/m³) y en la atmósfera (ppb)

Sección	Dimetilsulfuro	Carbonilsulfuro	Carbonildisulfuro
Océano	45 ^(1,4)	3.2 - 10 ⁽⁶⁾	0.6 ⁽⁵⁾
Atmósfera	0.001 ⁽³⁾	0.5 ⁽¹⁾	0.02 ⁽¹⁾

Adaptado de: ¹ Khalil y Rasmussen, 1984; ² Brimblecombe, 1986; ³ Andreae y Barnard, 1984; ⁴ Cooper y Matrai, 1989; ⁵ Loverlock, 1974; ⁶ Ferek y Andreae, 1984.

El flujo de compuestos de azufre de la atmósfera hacia los océanos y al suelo es principalmente en la forma de sulfatos.

La mayoría de los compuestos organosulfurados son removidos por absorción con carbón activado, conversión catalítica a SO₂ o H₂S, y más recientemente, con biofiltros.

Los flujos de carbonilsulfuro de origen terrestre y oceánico a la atmósfera son relativamente pequeños, pero este compuesto es abundante en la tropósfera. La explicación es que el carbonilsulfuro tiene un tiempo de vida en la tropósfera de casi dos años.

A bajas altitudes, el carbonildisulfuro no ha sido detectado en concentraciones significantes en la atmósfera (Khalil y Rasmussen, 1984) y a altas altitudes (arriba de 6 km), no se detecta. El tiempo de vida del dimetildisulfuro es de cerca de 12 días.

El dimetilsulfuro, metanotiol, dimetildisulfuro, carbonilsulfuro y carbonildisulfuro tienen un bajo punto de ebullición, alta toxicidad y un olor ofensivo. En la tabla 2.12 se presentan algunas propiedades de estos compuestos de azufre.

Tabla 2.12. Propiedades de algunos compuestos volátiles de azufre

Compuesto	¹ LD ₅₀ (ppm)	² MAC (ppm)	³ O. t. (ppb)
H ₂ S	444	10	8.5 - 1000
Metilsulfuro	675	0.5	0.9 - 8.5
Dimetilsulfuro	40250	20	0.6 - 40
Dimetildisulfuro	5	20	0.1 - 3.6

¹ Concentraciones letales; ² Concentraciones máximas aceptadas; ³ Concentraciones para umbral de olor en gas. Adaptado de: Bhatia, 1978., Suylen, 1988., Merck Index Catalog, 1989.

2.4. NORMATIVIDAD DEL AZUFRE EN EL COMBUSTÓLEO Y OTROS COMBUSTIBLES

El gobierno ha mostrado preocupación por el problema de la contaminación por SO_x como lo revelan las Normas Oficiales Mexicanas de la tabla 2.13.

Tabla 2.13. Normas Oficiales Mexicanas que regulan el contenido de azufre en combustibles. Diario Oficial del 2 de Diciembre de 1994

Combustible	Contaminante	Norma	Nivel permisible % en peso
Magna sin	Azufre A. mercaptánico	NOM-086- ECOL-1994	0.10 máximo 0.002 máximo
Nova Plus	Azufre	NOM-086- ECOL-1994	0.15 máximo
Diesel sin	Azufre total	NOM-086- ECOL-1994	0.05 máximo
Diesel desulfurado	Azufre total	NOM-086- ECOL-1994	0.5 máximo
Diesel industrial	Azufre	NOM-086- ECOL-1994	2.0 máximo
Combustóleo pesado	Azufre	NOM-086- ECOL-1994	4.0*, 4.6** y 4.0*** máximo
Gas natural	Azufre total (dm ³ /m ³) ¹ H ₂ S (dm ³ /m ³)	NOM-086- ECOL-1994	0.32 máximo 0.012 máximo
Gas licuado de petróleo (Gas LP)	Azufre total (kg./ton)	NOM-086- ECOL-1994	0.140 máximo
Turbosina	Azufre total A. mercaptánico	NOM-086- ECOL-1994	0.3 máximo 0.003 máximo

* Combustóleo procedente de las refinerías de Cadereyta, Minatitlán, Salamanca, Salina Cruz y Tula

** Combustóleo de Cd. Madero *** Cualquier combustóleo a partir del 1 de enero de 1998. ¹ 1 dm³ = 1x10⁻³ m³

Desde el punto de vista normativo, la industria de acuerdo con lo estipulado en la Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente y su Reglamento en Materia de Prevención y Control de la Contaminación a la Atmósfera publicados en 1988, debe de tramitar su licencia de funcionamiento prevista en los artículos, 18, 19 y 20 del Reglamento, así mismo debe presentar su Cédula de Operación, Inventario de Emisiones, mediciones y resultados del monitoreo en fuente. Además debe cumplir con lo especificado en las Normas Oficiales Mexicanas.

Por lo que se refiere a la instalación de equipos para prevenir y controlar las emisiones generadas por algunos procesos industriales, existen muy pocas industrias que han realizado inversiones con estos propósitos. El INE ha analizado a las industrias inventariadas en la Zona

Metropolitana de la ciudad de México y de 4,623 industrias sólo el 13% reporta la existencia de equipos de control en sus procesos, de los cuales el 11.3% corresponde al control de partículas, el 1% corresponde al control de hidrocarburos, y el 1.3% al control de dióxido de azufre.

En la tabla 2.14 se presenta la parte de normas que rigen los niveles permisibles de emisión de SO_x en procesos de combustión y en los vehículos automotores, siendo más estrictas para la Zona Metropolitana del Valle de México, sobretudo a partir de 1998.

Tabla 2.14. Normas Oficiales Mexicanas que establecen los máximos niveles permisibles de emisión de contaminantes. Diario Oficial del 2 de Diciembre de 1994.

Fuente	Especificación	Norma	Nivel Permissible
	Capacidad de la planta (ton/día)		kg SO ₂ /ton H ₂ SO ₄
Plantas productoras de H ₂ SO ₄ ubicadas en zonas críticas	1 - 500	NOM-039- ECOL/1993	17.5
	501 - 700		13.0
	701 - 1000		9.0
	+ 1000		4.0
Plantas productoras de H ₂ SO ₄ ubicadas en el resto del País	1 - 500	NOM-039- ECOL/1993	28.0
	501 - 700		20.0
	701 - 1000		14.0
	+ 1000		7.0
Plantas nuevas elaboradoras de H ₂ SO ₄	1 - 500	NOM-039- ECOL/1993	13.0
	+ 500		3.0
Producción de ácido dodecilsulfónico (ADBS)		NOM-046- ECOL/1993	g SO ₂ /kg. (ADBS)
			3.0
			g SO ₃ /kg. (ADBS)
			1.2
Combustión de combustibles en fuentes fijas	Características de contenido de azufre		kg SO ₂ /10 ⁶ kcal
Combustóleo	1% en peso de S	NOM-085- ECOL-1994	2.04
	2% en peso de S		4.08
	4% en peso de S		8.16
Diesel	0.5% en peso de S	NOM-085- ECOL-1994	0.91
Combustóleo	Hasta 5250 MJ/h	NOM-085- ECOL-1994	4.08* (ZMCM)
			9.81* (resto del país)
	Más de 5250 MJ/h		2.04** (ZMCM)
			8.16** (resto del país)

De 1994 al 31 de diciembre de 1997 * Del 1 de enero de 1998 en adelante

2.5. MICROORGANISMOS QUE DEGRADAN AZUFRE

Actualmente se sabe que algunos microorganismos como las bacterias, hongos y levaduras son capaces de utilizar diversos sustratos para crecer. En especial, algunas cepas bacterianas pueden transformar compuestos orgánicos e inorgánicos con azufre. Debido a que la selectividad de los microorganismos por un sustrato específico puede llegar a ser alta, se puede evitar el consumo de hidrocarburos y, por tanto, pérdida del poder energético.

2.5.1. Requerimientos para el crecimiento microbiano

El microorganismo requiere para su crecimiento de una fuente de energía y de una fuente de materia. Una vez que se proveen los nutrientes necesarios, las células empiezan a crecer y/o a producir algunos compuestos metabólicos de interés. La transformación de nutrientes en células y/o productos se denomina metabolismo. La conversión del sustrato a células es un factor muy importante pues controla, además del rendimiento, la demanda de oxígeno y la producción de calor. Por lo general, cuanto más oxidado está el sustrato menor es el rendimiento; otro problema es que los rendimientos dependen también de las condiciones ambientales.

En un cultivo microbiano todas las partes están sujetas a las mismas condiciones de temperatura, pH, concentración de nutrientes, etc. En la Figura 2.5, se indican las diferentes fases que ocurren en un cultivo en las condiciones anteriores; estas fases reflejan cambios en la biomasa y en el medio ambiente. Después de un periodo lag, el crecimiento ocurre a la máxima rapidez y finalmente cesa, ya sea por carencia de un nutriente, por acumulación de un producto inhibitor, o por algún cambio en el ambiente fisicoquímico. Después de que la biomasa alcanza el máximo, aparece generalmente una fase estacionaria durante la cual la biomasa permanece constante; más adelante ésta disminuye como consecuencia del metabolismo de mantenimiento (endógeno) o por autólisis.

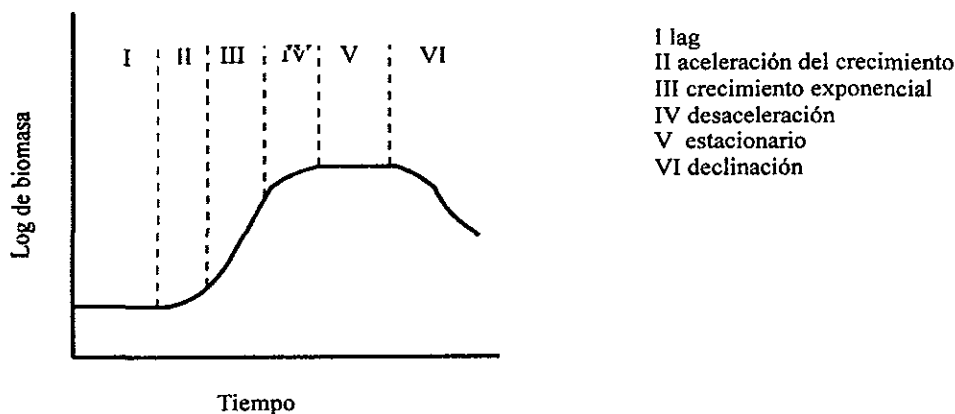


Figura 2.5. Fases del crecimiento microbiano. Quintero, 1993

2.5.2. Bacterias sulfato-reductoras

El descubrimiento de las bacterias sulfato-reductoras lo hizo M.W. Beijerinck quien fue capaz de aislar esta bacteria de un canal lodoso en Delft y las nombró como *Spirillum desulfuricans* (Quintero, 1993). El estudio de estas bacterias ha seguido un camino de altibajos, probablemente debido a la dificultad para obtenerlas y mantenerlas en cultivos puros. Después del año de 1960, las bacterias sulfato-reductoras se clasificaron en género y familia y las hay tanto Gram-negativas como Gram-positivas.

En 1861, Pasteur escribió acerca de la fermentación butírica: “Estas infusorias no sólo viven sin aire, sino que mueren por el aire”. Esta declaración se extendió a todas las bacterias anaerobias.

Hardy y Hamilton, 1981, demostraron que estos organismos no eran los “anaerobios típicos” definidos por Pasteur, a través de encontrar que la velocidad de supervivencia de un superóxido dismutasa conteniendo cepas de *D. vulgaris*, fue la misma en agua de mar oxigenada y desoxigenada. Postgate, 1984, escribió que cuando las bacterias sulfato-reductoras se exponen al aire, no sólo mueren, sino que permanecen inactivas.

Estas observaciones sugieren que el oxígeno juega un papel fisiológico en estas “anaerobias estrictas”, aunque no se ha proporcionado una demostración clara de la estimulación sostenida por el oxígeno en su crecimiento.

Dilling y Cypionka, 1990, reportaron algunas cepas *Desulfovibrio* que fueron capaces de desarrollar fosforilación oxidativa en presencia de aire.

Las bacterias sulfato-reductoras son conocidas por su capacidad de producir sulfuros tóxicos de la reducción de sulfatos. Estos sulfuros son los principales agentes implicados en la corrosión anaerobia de acero ligero. La bacteria sulfato-reductora también es capaz de utilizar como aceptor de electrones terminales a los sulfatos, fumaratos o nitratos con formación de ATP. Estas bacterias son ricas en proteínas relacionadas con las reacciones de óxido-reducción.

Hata *et al.*, 1964, aislaron a las bacterias sulfato-reductoras de aguas superficiales de la bahía de Hiroshima, al igual que Novozhilova y Berezina, 1968, así como de sedimentos de un lago altamente aireado en el semi-desierto de Rusia. Fueron los primeros en reportar que estas bacterias poseen una especie de mecanismo protector contra la exposición accidental del oxígeno.

De acuerdo a estos estudios, se puede decir que el oxígeno no es un eliminador potente de la bacteria sulfato-reductora, sin embargo, éstas no son capaces de sostener su crecimiento en su presencia.

2.5.2.1. Distribución y papel de la bacteria desulfurante en la naturaleza

Las bacterias sulfato-reductoras ocurren predominantemente en la descomposición de sedimentos y lodo negro donde los materiales orgánicos sufren la degradación anaerobia. Las desulfurantes parecen estar adaptadas especialmente a los productos de metabolismo de carbohidrato incompleto, por ejemplo, los ácidos fuertes, oxiácidos, alcoholes e hidrógeno de fermentaciones. La masa del sulfuro de hidrógeno que ocurre en la naturaleza puede ser considerada como el producto final de la sulfato respiración.

2.5.2.2. Enriquecimiento y aislamiento

Para el enriquecimiento de cultivos de bacterias sulfato-reductoras el medio nutritivo debe contener un donador de hidrógeno disponible, un sustrato asimilable, sales minerales y

sulfato. También se requieren condiciones anaerobias y un potencial redox suficientemente bajo (E_0 de - 200 mV).

La literatura señala la degradación de compuestos orgánicos de azufre como los tioles, disulfuros, tiofenos, benzo y dibenzotiofenos (Finnerty *et al.*, 1992). Ante la imposibilidad de evaluar un número indefinido de microorganismos que degraden a su vez diversos compuestos, muchos investigadores se han abocado a la identificación de cepas que degraden compuestos modelo como son el ácido sulfhídrico, algunos mercaptanos y dibenzotiofenos. La tabla 2.15 muestra una lista de los microorganismos de interés y los sustratos que metabolizan.

Tabla 2.15. Algunos microorganismos degradadores de azufre orgánico y sus sustratos

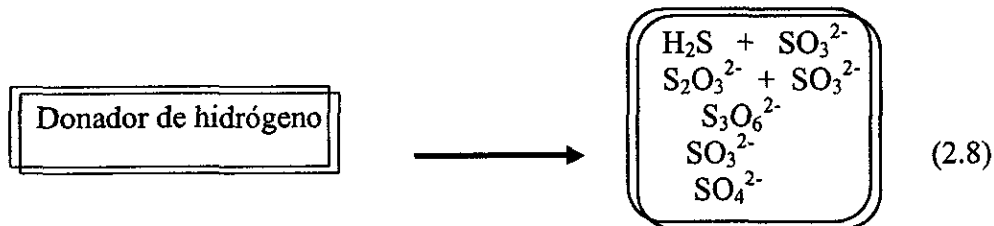
Microorganismo	Sustratos	Referencia
<i>Thiobacillus thioeparus</i> <i>T. neapolitanus</i> , <i>T. ferroxidans</i> <i>T. concretivorus</i> , <i>T. thiooxidans</i>	azufre elemental, tiosulfatos, sulfuros, sulfitos y politionatos	Starr <i>et al.</i> , 1981
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> <i>D. vulgaris</i> , <i>D. gigas</i>	sulfatos	Widdel y Bak, 1991 Starr <i>et al.</i> , 1981
<i>Desulfobacter postgatei</i>	sulfatos	Widdel y Bak, 1991 Starr <i>et al.</i> , 1981
<i>Desulfobulbus propionicus</i>	sulfatos	Widdel y Bak, 1991 Starr <i>et al.</i> , 1981
<i>Desulfococcus multivorans</i>	sulfatos	Widdel y Bak, 1991 Starr <i>et al.</i> , 1981
<i>Desulfomonile tiedjei</i>	sulfatos	Widdel y Bak, 1991
<i>Desulfomicrobium sp</i>	sulfatos	Widdel y Bak, 1991
<i>Desulfonema limicola</i> <i>D. magnum</i>	sulfatos	Widdel y Bak, 1991 Starr <i>et al.</i> , 1981
<i>Desulfosarcina variabilis</i>	sulfatos	Widdel y Bak, 1991 Starr <i>et al.</i> , 1981
<i>Desulfotomaculum nigrificans D.</i> <i>antarticum</i>	sulfatos	Starr <i>et al.</i> , 1981
<i>Desulfoarculus baarsii</i>	sulfatos	Widdel y Bak, 1991
<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	Azufre orgánico derivado del carbón	Kilbane y Jackowski, 1992
Bacterias aerobias Gram(-) que crecen en carbazol	Dibenzotiofeno, benzotiofeno, tiantreno, tioxiantina	Finnerty <i>et al.</i> , 1992
<i>Pseudomonas sp</i>	Dibenzotiofeno	Kodama <i>et al.</i> , 1973, Yamada, 1968
<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Azufre orgánico de carbón	Kargi y Robinson, 1986

	bituminoso	
<i>Rhodococcus rodochrous</i> + <i>Enterobacter sp</i>	Azufre orgánico	Bielage y Kilbane, 1989
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Dibenzotiofeno	Hou y Laskin, 1976
<i>Bacillus sphaericus</i> + <i>Enterobacter sp</i>	Azufre orgánico	Bielage y Kilbane, 1989
<i>Acinetobacter</i> y <i>Rhizobium sp</i>	Dibenzotiofeno	Malik, 1978
<i>Thiobacillus sp</i>	Azufre orgánico	Gockay y Yurteri, 1983
<i>Arthrobacter</i> y <i>Pseudomonas sp</i>	Dibenzotiofeno	Knecht, 1961
<i>Pseudomonas maltophila</i>	Sulfoacetato, sulfosuccinato, tetrametil sulfano, bencen sulfonato, toluen sulfonato, 3-piridina sulfonato, 2-sulfo benzoato, 1-naftalen sulfonato, 2-naftalen sulfonato, sulfopropil piridimina	Lee y Clark, 1993
<i>Rhodococcus sp</i>	Ácido sulfhídrico	Ohta <i>et al.</i> , 1990
<i>Pseudomonas sp</i>	Tiofeno	Kurita <i>et al.</i> , 1971
<i>Rhodopseudomonas sp</i>	Mercaptomalato, H ₂ S, malato	Visscher y Taylor, 1993
<i>Thiocapsa roseopersicina sp</i>	3 Mercaptopropionato, H ₂ S, mercaptomalato	Visscher y Taylor, 1993

Fuente: Aragón *et al.*, 1996

2.5.2.3 Formación de sulfuro de hidrógeno por reducción de sulfato

El grupo fisiológico de las bacterias sulfato-reductoras (también llamadas desulfurantes) está caracterizado por la habilidad de transferir el hidrógeno al sulfato como el aceptor final de electrones con la reducción del sulfato a sulfuro. Este proceso encierra el transporte de electrones con la participación de citocromo *c*, y la ganancia de energía se da por el transporte de electrones (fosforilación) bajo condiciones anaerobias.



Debido a que esta clase de reducción de sulfatos es similar a la respiración con oxígeno, es también llamada sulfato respiración o sulfato reducción. El principal producto de esta reducción es el sulfuro de hidrógeno:



La mayoría del sulfuro de hidrógeno producido en la naturaleza es debido a esta reacción. Las bacterias sulfato reductoras, en contraste a las nitrato reductoras, son anaerobias obligadas y estrictamente dependientes de condiciones anaerobias.

2.5.2.4. Posición sistemática

Diversos grupos de bacterias anaerobias son capaces de llevar a cabo la sulfato respiración. Algunas de ellas son eubacterias flageladas y no flageladas (*Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfomonas*, *Desulfobacillus*, *Desulfosarcina*, *Thermosulfobacterium*), bacterias gram-negativas (*Desulfonema*), eubacterias gram-positivas formadoras de endosporas (*Desulfatamaculum*), y archaeobacterias (*Archaeoglobus*). Varios compuestos de bajo peso molecular pueden servir como donadores de hidrógeno para diferentes miembros del grupo: lactato, acetato, propionato, butirato, formato, metanol, etanol, ácidos más pesados, compuestos aromáticos e hidrógeno molecular. Sin embargo, algunas especies no pueden usar todos estos compuestos. Este grupo de organismos es sin embargo muy heterogéneo con respecto a la utilización de sustrato y mecanismo metabólico. El siguiente es un breve resumen de los subgrupos sin adentrarse en detalles:

- a) Este grupo, puede crecer en lactato y otros ácidos y utilizar hidrógeno molecular. Ellos oxidan los donadores de electrones en forma incompleta y excretan acetato, el grupo contiene especies de *Desulfovibrio* y *Desulfatamaculum*.
- b) Recientemente se han aislado especies que utilizan acetato, ácidos de cadena corta y larga, alcoholes, compuestos aromáticos e hidrógeno molecular como donadores de hidrógeno. Ellos incluyen *Desulfatamaculum acetooxidans*, *Desulfobacter*, *Desulfonema* y otros.
- c) Algunas especies son capaces de crecer autotróficamente con hidrógeno molecular y tiosulfato. Este grupo incluye cepas de *Desulfovibrio*, *Desulfobacterium*, *Desulfococcus*, *Desulfobacter* y *Desulfatamaculum* así como *Archaeoglobus*.
- d) Un aislado descubierto recientemente, *Desulfovibrio dismutans* lleva a cabo el suministro de energía entre el tiosulfato o sulfito a sulfato y H₂S. Varias cepas crecen autotróficamente en la presencia de acetato como quimioheterótrofos. Su metabolismo puede ser considerado como “fermentación inorgánica”.

2.5.2.5. Reducción de sulfito

La reducción del sulfito a sulfuro es llevada a cabo en diferentes formas y por diferentes bacterias. La sulfito reductasa puede reducir el sulfito en un paso de seis electrones directamente a sulfuro sin la liberación de productos intermediarios, ésta clase de reducción así como la reducción asimilatoria de sulfito, generalmente involucra compuestos de hierro-forfirin (desulfovirodín, desulforubidín). En el segundo mecanismo, el sulfito es reducido en tres pasos sucesivos en el cual intermediarios libres son producidos (tritionato y tiosulfato),

esto es a través que los electrones para la reducción de sulfito son proporcionados vía citocromos (citocromo *b* en algunas bacterias, citocromo *c* en otras).

2.5.2.6. Reducción de sulfatos

Casi todas las bacterias, pueden crecer con sulfato y su fuente de azufre. Ellas producen el sulfuro el cual es necesario para la síntesis de aminoácidos que contienen azufre por “reducción asimilatoria de sulfato”. El sulfuro de hidrógeno y el azufre pueden obtenerse de la reducción de sulfatos de depósitos marinos con desechos de agua que contienen *Desulfovibrio*. Sin embargo, el *Desulfovibrio* también causa indirectamente una corrosión anaerobia del hierro; ésta corrosión es de gran importancia económica. En una atmósfera húmeda se lleva a cabo la siguiente reacción

a) Oxidación del hierro:



Normalmente, el hierro es protegido de una corrosión mayor por la película de hidrógeno. Cuando el sulfato y la bacteria desulfurante están presentes, causan una despolarización catódica, y el hierro es oxidado aún en la ausencia de oxígeno

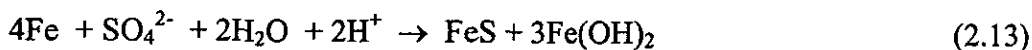
b) Reducción del sulfato:



c) Precipitación de hierro:



La suma de estas tres reacciones es



La bacteria *Desulfovibrio* ha sido la responsable del alto contenido de sulfuro de hidrógeno en el fondo (abajo de 200 m) del Mar Negro y por su color negro, debido a la corrosión del hierro.

2.5.2.7. Reducción de azufre a sulfuro de hidrógeno

Recientemente ha sido descubierto que algunas bacterias pueden crecer con azufre inorgánico como el aceptor de hidrógeno para el transporte anaerobio de electrones. El azufre se reduce a sulfuro de hidrógeno en este proceso, el cual se designa como “respiración de azufre”.

Propiedades del sulfuro de hidrógeno

El ácido sulfhídrico es maloliente, corrosivo a metales, también bastante soluble en agua. Los indoles, escatoles, tioles y mercaptanos son más olorosos. El H₂S es tóxico a la mayoría de las bacterias aún a baja concentración y es fatalmente tóxico a los humanos causando la muerte a exposiciones de 30 minutos a concentraciones gaseosas de 800 a 1000 ppm. A concentraciones más altas ocurre la muerte aún más rápido que a exposiciones de cianuro. El H₂S también paraliza el centro respiratorio y también los nervios del olfato, nulificando la señal normal del olor de gas característico a huevos podridos.

Equilibrio del sulfuro de hidrógeno

El sulfuro se ioniza en agua como sigue



$$k_1 = \frac{(\text{HS}^-)(\text{H}^+)}{\text{H}_2\text{S}} = 10^{-7.0} \quad (2.15)$$

El H₂S es más tóxico que el HS⁻

Influencia de la temperatura

La temperatura ejerce un fuerte impacto en la ionización y solubilidad del sulfuro. En la tabla 2.16 se presenta la ionización del H₂S para diversos valores de temperatura.

Tabla 2.16 Constante de ionización del H₂S a diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	Constante de ionización k_1
18	9.1×10^{-8}
25	11.2×10^{-8}
35	14.9×10^{-8}
45	19.4×10^{-8}
55	24.7×10^{-8}

Fuente: Lawrence y McCarty, 1966

En la tabla 2.17 se presenta la solubilidad del H₂S vs temperatura.

Tabla 2.17. Solubilidad del H₂S para diferentes temperaturas

Temperatura (°C)	H ₂ S (mg/L de H ₂ S)
15	4410
20	3850
25	3380
30	2980
35	2650
40	2360
45	2100
50	1880
60	1480

Fuente: Lange, 1979.

2.6. FERMENTACIÓN

Un proceso de fermentación comprende no sólo las reacciones bioquímicas efectuadas por microorganismos y/o por enzimas sino que además considera las características físicas y de operación del recipiente en donde se lleva a cabo (fermentador); éstas variables deben ser optimadas para lograr un proceso adecuado.

2.6.1. Microorganismos en la fermentación

Los microorganismos utilizados en la fermentación son generalmente bacterias, levaduras, hongos, algas y tejido celular vegetal y animal. En la gran mayoría de las fermentaciones se emplean cultivos puros (es decir, el uso de una cepa de una especie dada de microorganismos) y sólo en casos muy particulares se usan dos o más especies (denominado cultivo mixto).

2.6.2. Escalamiento de fermentaciones

El problema del paso de una escala a otra (escalamiento) es uno de los de mayor importancia en la fermentación. Por lo general en el laboratorio se opera con matraces agitados (< 500 mL) o pequeños fermentadores donde se buscan nuevos productos, se estudian mecanismos de control y se mejoran las cepas de producción. En la planta piloto se estudian efectos de aeración, temperatura y control de pH. Solomons (citado por Quintero R., 1993), indica cuales son los intervalos de operación más comunes en los que se refiere a potencia por unidad de volumen y a velocidad de agitación. En la tabla 2.18 se muestran las características de dicho escalamiento.

Tabla 2.18. Características de escalamiento de fermentación.

Escala del fermentador	Potencia de trabajo (W/L)	Capacidad del fermentador (L)	Velocidad de agitación (rpm)
Escala pequeña	8 - 10	3	200 - 2000
Escala piloto	3 - 5	10	200 - 1200
Escala industrial	1 - 3	50	100 - 800
		200	50 - 400
		500	50 - 300

Fuente: Quintero, 1993

2.7. OPCIONES PARA DESULFURAR COMBUSTÓLEO Y OTRAS FRACCIONES DEL PETRÓLEO

Existen dos opciones para controlar las emisiones de SO_x

- a) eliminar el azufre contenido en el combustóleo y
- b) usar lavadores de gases para el tratamiento de las corrientes gaseosas generadas por la combustión, antes de su liberación al ambiente.

La eliminación de azufre en el combustóleo puede lograrse mediante reducción química (tratamiento con ácido o "endulzamiento") o por hidrosulfuración (Hastings y Van Driesen, 1988). Esta última es el proceso más empleado y consiste en pasar los hidrocarburos a través de un lecho formado por un catalizador a elevadas temperaturas (550 a 880°C) y presiones (150 a 300 psi), inyectando hidrógeno. El azufre reacciona con este compuesto para producir sulfuro de hidrógeno (H_2S) y obtener un hidrocarburo desulfurado (figura 2.6). La hidrosulfuración catalítica presenta los siguientes inconvenientes (Monticello, 1992): el costo de inversión es muy elevado, al igual que el de operación (por el requerimiento de altas temperaturas y presiones); se destruye parte de los hidrocarburos disminuyendo el valor energético del compuesto tratado; genera una gran cantidad de sulfuro de hidrógeno que debe ser eliminado de la corriente por desorción con aire; y, tiene un alto consumo del catalizador por el propio subproducto formado. Además, el proceso no es muy eficiente ya que no todas las moléculas orgánicas azufradas se descomponen.

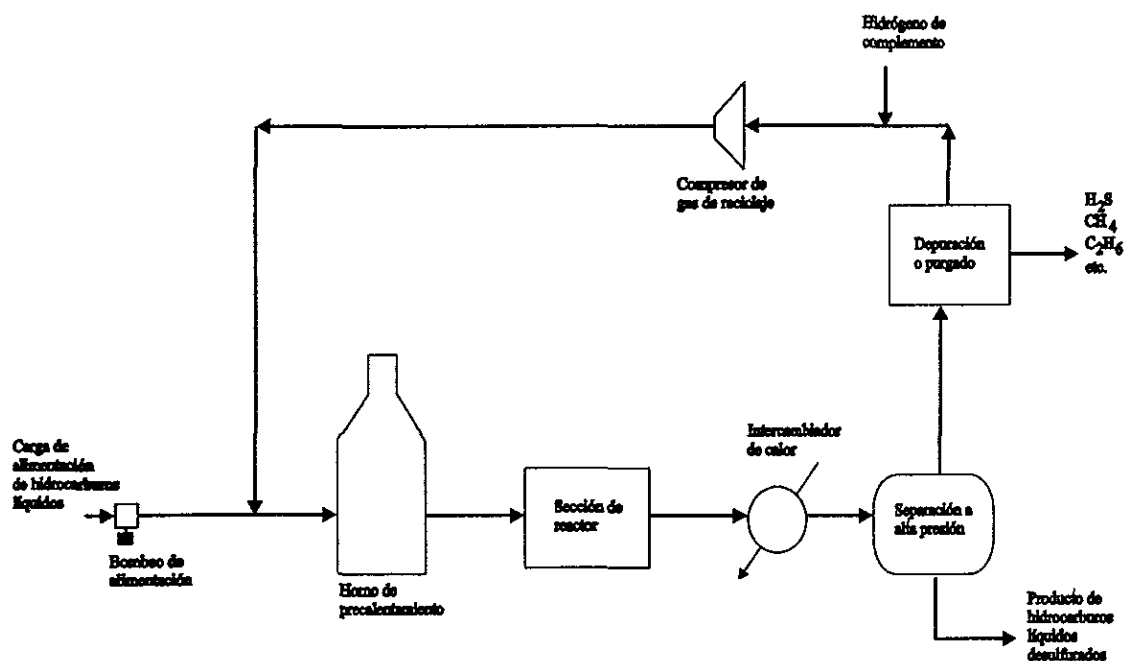


Figura 2.6. Diagrama del proceso de hidrodesulfuración.

Fuente: Kenneth *et al.*, 1988.

Una alternativa a la hidrodesulfuración catalítica es el tratamiento biológico (biodesulfuración); el cual, es menos costoso, no genera desechos peligrosos y es de fácil operación. Actualmente, se sabe que algunos microorganismos como las bacterias, hongos y levaduras son capaces de utilizar diversos sustratos para crecer. En especial, algunas cepas bacterianas pueden transformar compuestos orgánicos e inorgánicos con azufre. Debido a que la selectividad de los microorganismos por un sustrato específico puede llegar a ser alta, se puede evitar el consumo de hidrocarburos y, por tanto, pérdida del poder energético.

2.7.1. Eliminación biológica de azufre en petróleo y carbón

Se han reportado en la literatura pocos trabajos sobre la remoción de azufre en combustóleo por vía biológica; los antecedentes más cercanos son la biodesulfuración de petróleo, sus destilados medios y del carbón. Ohmura y Saiki, 1994, describieron un sistema para la desulfuración de carbón en una columna de flotación. Se sabe que el carbón contiene predominantemente azufre orgánico (*i.e.* 3 %), en menor concentración azufre pirítico (*i.e.* 0.3 %) y casi nada de sulfatos (*i.e.* 0.06 %). Estos investigadores prepararon un carbón azufrado con un contenido de 13.2 % como azufre total. Lo trataron en una columna de flotación utilizando como inóculo *Thiobacillus ferroxidans* y lograron la remoción desde el nivel inicial hasta un 1.8 %, con densidades bacterianas entre 1 y 3×10^9 células/mL.

Monticello, 1993, reportó un sistema para la desulfuración catalítica de petróleo y destilados medios. El diagrama de flujo se presenta en la figura 2.7 y consiste básicamente en la mezcla del biocatalizador (material biológico) con el petróleo en un tanque agitado para formar una emulsión. Después de cierto tiempo, la emulsión se rompe y el combustible desulfurado es separado. El biocatalizador es recuperado y el azufre separado por precipitación con óxido de

calcio y removido de la corriente acuosa. Este proceso logra una disminución de azufre del 5 al 25 %. Monticello enfatizó que los principales factores para la aplicación práctica de este sistema son: mejoramiento de la cepa bacteriana y del proceso fermentativo en sí; selección de una configuración adecuada del bioreactor y de una metodología de ruptura de la emulsión eficiente; y, determinación de un método de disposición de desechos (azufre, agua, catalizador agotado, etc.).

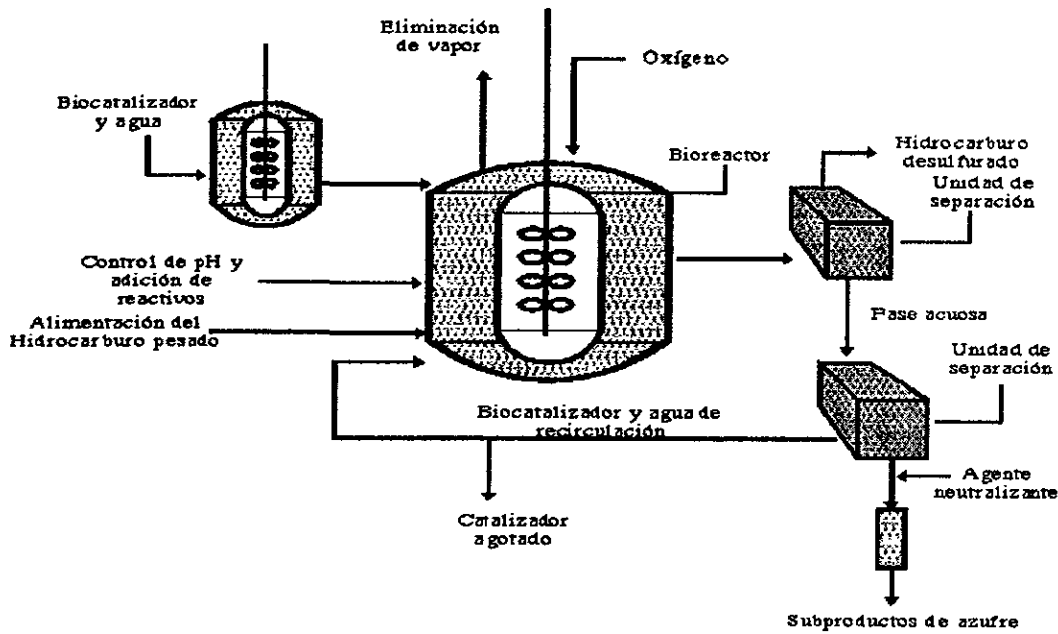


Figura 2.7. Diagrama del proceso de biodesulfuración catalítica para hidrocarburos.

Fuente: Monticello, 1993

Para lograr la degradación de los compuestos de azufre en el combustóleo se está trabajando con bacterias sulfato-reductoras (BSR) ya que éstas durante la respiración anaerobia utilizan el azufre en forma de sulfatos como aceptor final de electrones, oxidando los compuestos orgánicos. Este grupo de bacterias al activar los sulfatos, los reducen a H_2S mediante la conservación de energía. Además de los sulfatos, las BSR también pueden utilizar sulfitos, tiosulfatos, tetratiónatos y azufre elemental como aceptor de electrones (Pfennig *et al.*, 1981; Postgate, 1984).

La modificación microbiana de compuestos de azufre inorgánico en combustóleo puede ser la responsable de las fallas en las tuberías y el equipo, debido a los daños de corrosión por el ácido sulfúrico y sulfuro generado por la bacteria. El ácido se forma aeróbicamente a través de la acción de *Thiobacillus sp.*, por medio de la oxidación de compuestos de azufre reducido a sulfato. El sulfuro es generado anaerobicamente por *Desulfovibrio sp.* y otros microorganismos a través de la reducción de sulfato a sulfuro.

2.7.1.1. Dibenzotiofeno como un Sistema Modelo

La abundancia relativa en crudos de tiofeno aromático como dibenzotiofeno (DBT) ha permitido la aceptación calificada de ésta molécula como un modelo general de compuestos de azufre orgánico en petróleo y carbón. Sin embargo la validez de este modelo no ha sido claramente establecida. Algunos reportes describen la oxidación del DBT por especies de *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Acinetobacter*, *Arthrobacter*, *Beijerinckia*, *Sulfolobus acidocaldarius*, y cultivos no caracterizados que han aparecido en la literatura. El mecanismo para la oxidación bacteriana del DBT es esencialmente el mismo que el reportado para muchas moléculas aromáticas, especialmente naftaleno. Recientemente, Hartdegan *et al.*, (1984), propusieron un sistema para la biodesulfuración del petróleo, usando un derivado genéticamente alterado de *Pseudomonas alcaligenes* que oxida el DBT y relaciona moléculas a productos solubles en agua, y proponen un diseño de reactor usando membranas permeables para separar el crudo y la fase acuosa. La mayor desventaja de oxidar el DBT directamente a productos solubles en agua para removerlos del crudo es la pérdida de carbón (y consecuentemente su poder calorífico) asociado con el azufre orgánico.

Los cultivos microbianos usados en la desulfuración de petróleo deben ser tolerantes a la severa naturaleza de los crudos y sus procesos, especialmente con relación a los metales pesados, a los hidrocarburos potencialmente tóxicos, y los extremos de temperatura y pH.

La remoción de un porcentaje razonable de azufre en el crudo generará cantidades significantes de subproductos. En algunas ocasiones, la disposición de los subproductos puede ser más costosa que otros aspectos de la tecnología. Los esquemas de la desulfuración basados en la solubilización de moléculas como DBT podrían producir grandes cantidades de azufre heterocíclico. Estos compuestos pueden tener usos industriales, tal como estimuladores de crecimiento en planta, agentes antimicrobianos, o proveer alimentación de químicos. También pueden ser carcinógenos. Una opción para recuperar el carbón contenido en los subproductos de la desulfuración es quemarlos por su valor como combustible para producir procesos de vapor, utilizando postcombustión en sitio eficiente de desulfuración de gas-combustible para atrapar el azufre de combustión.

Varias bacterias han sido reportadas por tener la habilidad de remover azufre de combustibles fósiles, las cuales pueden dividirse en diferentes categorías de acuerdo con sus modos de acción: rompimiento oxidativo C-S, rompimiento reductivo C-S, rompimiento oxidativo C-C, bacteria fotosintética y otros.

Las bacterias fotosintéticas usan tioles orgánicos como su fuente de azufre, pero no degradan tiofenos, los cuales constituyen la mayor fuente de azufre orgánico en combustibles fósiles, y son recalcitrantes a los procesos de desulfuración termoquímica.

Los procesos oxidativos usan bacterias aerobias que requieren aereación. Se necesitarían precauciones necesarias para proporcionar aire al combustible. Los microorganismos degradan tiofenos por el rompimiento de enlace C-C, pero no degradan derivados de tiofenos encontrados en carbón y petróleo y reducen el contenido energético de los combustibles.

El rompimiento oxidativo de enlaces C-S producen compuestos de nitrógeno provenientes de dibenzotiofeno.

Por todo esto, la mejor elección serían los procesos que utilizan mecanismos de rompimiento reductivo de enlace C-S.

2.8. ESTUDIOS DE BIODESULFURACIÓN REALIZADOS

En cuanto a las bacterias, diversos son los mecanismos que emplean la vía anaerobia para la remoción de compuestos de azufre, la cual ha sido reportada desde hace varios años. Zobell, 1953, reportó que bacterias sulfato-reductoras con fuerte actividad hidrogenasa podrían reducir compuestos de azufre orgánico a sulfuro de hidrógeno. Unos años más tarde, Kurita *et al.*, 1971, aislaron cultivos los cuales producían sulfuro de hidrógeno a partir de compuestos de azufre orgánico, y observaron que el metil viológeno como un mediador de electrones era esencial para la desulfuración microbiana. También se han realizado estudios con bacterias aerobias, las cuales oxidan compuestos de azufre orgánico del petróleo a formas solubles en agua (Hartdegan, 1984).

La desulfuración del petróleo ha estado presente en estudios realizados por algunos investigadores como Eckart, 1986, quien usó un cultivo mezclado que consistía de *Desulfovibrio sp*; *micrococci*; *bacilli*; *clostridia*.

Tae Sung *et al.*, 1990, usaron dos bacterias sulfato reductoras, *Desulfovibrio desulfuricans* M6 (KCTC 2740) y *Desulfotomaculum nigrificans* KCTC 1909 (NCIB 8395) en una muestra del crudo de Kuwait que contiene cerca del 3 % en peso de azufre. La remoción de azufre lograda con la primera bacteria fue del 21%, mientras que con la segunda bacteria sólo se logró el 7%.

Monticello, 1993, presentó una alternativa biocatalítica para la reducción de azufre en combustibles fósiles. Utilizó la bacteria conocida como *Rhodococcus rhodochrous* (IGTS8), la cual una vez desarrollada en un fermentador convencional opera en una emulsión combustible-agua de 1 a 1. El proceso se limitó para la desulfuración de destilados medios y se tuvo una remoción de azufre del 80% (de 0.25 a 0.05% en peso de azufre). La volatilización del combustible en el reactor es insignificante y se pueden procesar 10,000 barriles por día con un tiempo de retención de 1 hora. Los costos de capital y operación oscilan entre 1.50 y 2.50 dólares por barril.

Steven, 1994, realizó experimentos en los cuales elimina del 0.75 al 0.50% en peso de azufre de destilados medios de petróleo (eficiencia del 33%). El proceso emplea tres etapas sucesivas con la bacteria *Rhodococcus rhodochrous* (IGTS8), pH entre 6 y 8, temperatura de 30 °C, así como velocidad de agitación y aeración específicas.

Se han realizado también estudios de biodesulfuración de compuestos específicos que existen en el petróleo. Entre ellos y por ser los de mayor contenido de azufre destacan los dibenzotiofenos (Monticello y Finnerty, 1985).

Afferden *et al.*, 1993, realizaron experimentos de desulfuración de dibenzotiofeno (DBT), usando un cultivo puro de *Brevibacterium sp.* El cultivo se hizo crecer previamente en DBT a 30 °C, con aeración de 1.5 L/min y en agitación a 600 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica de 0.8 (medida a 578 nm) en aproximadamente 70 horas. Este experimento se llevó a cabo en un bioreactor con un volumen de trabajo de 1.25 litros; se usaron 1125 mL de medio libre de azufre, 25 mL de petróleo (25 mg de DBT por g de petróleo) y 8 % de inóculo (100 mL). Los resultados indican una remoción de azufre máxima del 41.6 % (1.2% a 0.7% en peso de azufre). No se presentó pérdida calorífica del combustible.

Byung *et al.*, 1995, usaron *Desulfovibrio desulfuricans* M6 para examinar la degradación de compuestos de azufre modelo encontrados en combustibles fósiles y para remover azufre de crudos de diferentes orígenes y sus productos. La degradación varió de 96% para dibenzotiofenos a menos de 10% para tioles. En la desulfuración de los crudos se encontró que se remueve más azufre de fracciones pesadas de petróleo que de los crudos y las fracciones ligeras. Para una muestra de crudo y combustóleo provenientes de Kuwait, se obtuvieron porcentajes de desulfuración entre 25 y 58.9%. El tiempo de proceso fue de 5 días a 30 °C.

Otros trabajos realizados con dibenzotiofeno, fueron los de Julia De Fatima *et al.*, 1996, quienes disolvieron este compuesto en dos solventes orgánicos tales como dioctilftalato (DOC) y 2,2,4,4,6,8,8 heptametilnonano (HMN); logrando una remoción de azufre de 38.9% al usar el primer solvente en un tiempo de 16 días y de 30 % con el segundo solvente en un tiempo de 7 días. La desventaja de la experimentación con DOC, es que se tiene una pérdida de la fase orgánica del 30%, mientras que al usar el HMN, no se presenta pérdida de solvente.

Finnerty *et al.*, 1982, aislaron y modificaron una cepa de *Pseudomonas alcaligenes*, el sistema enzimático de este microorganismo muestra suficiente especificidad por lo que la velocidad de oxidación de un azufre aromático excede por mucho a la oxidación de un compuesto aromático sin azufre.

Se han realizado experimentos de remoción de azufre en carbón como el caso de Pieter *et al.*, 1992) quienes sugieren que la biodesulfuración del carbón es apropiada para casos en los cuales los minerales de azufre no estén presentes como partículas gruesas, sino como pequeños cristales finamente distribuidos en la matriz del carbón. Ellos proponen que la biodesulfuración del carbón se aplique en las plantas de producción de energía de pequeña escala; y que se utilice la técnica de limpieza de gases de chimenea en las plantas de mayor escala.

Así mismo, Stoner *et al.*, 1993, realizaron estudios de transformación de compuestos organosulfurados y material derivado de lignita soluble en agua por medio de microorganismos anaerobios, entre ellos a *Desulfovibrio africanus* y un cultivo mixto (91-3B). Sólo estos dos cultivos de bacterias sulfato-reductoras fueron capaces de modificar el contenido de azufre del material derivado de lignita soluble en agua de entre nueve cultivos, logrando una remoción del azufre orgánico de 12% en material de carbón tratado con *D. africanus* y 6% con el cultivo 91-3B.

Ohmura y Saiki, 1994, trataron un carbón azufrado con 13.2 % de azufre total, utilizando *Thiobacillus ferroxidans* en columna de flotación; logrando un nivel de 1.8 % de azufre.

Kilbane y Kathleen, 1992, comprobaron que la bacteria IGTS8 (*Rhodococcus rhodochrous*), si se hace crecer previamente (de 3 a 6 semanas aproximadamente) puede remover selectivamente azufre orgánico de material derivado del carbón soluble en agua en un promedio de 41.8% de biodesulfuración, comparado con un 29.1% para experimentos con cultivos celulares que se hacían crecer en el mismo proceso de biodesulfuración. La tabla 2.19 muestra el porcentaje de biodesulfuración logrado tanto en el proceso en el que se hizo crecer previamente la bacteria (Biotratamiento 1), como en el que el material derivado del carbón soluble en agua sirvió como la única fuente de azufre (Biotratamiento 2).

Tabla 2.19. Biodesulfuración con *Rhodococcus rhodochrous*. Kilbane y Kathleen, 1992

Proceso	Carbón (%)	Azufre (%)	Formas de azufre			Biodesulfuración (%)
			Sulfato (%)	Azufre pirítico (%)	Azufre orgánico (%)	
Origen	60.67	2.53	0.13	0.015	2.38	
Biotratam. 1 (promedio)	59.90	1.34	0.13	0.01	1.21	40.13
Biotratam. 2 (promedio)	56.48	1.54	0.39	0.013	1.14	29.1

En la tabla 2.20 se muestra un resumen de algunos estudios de biodesulfuración del petróleo, sus destilados y del carbón, que se han realizado, tanto en condiciones aerobias como anaerobias y en condiciones de proceso diferentes a este trabajo de tesis.

De estos trabajos se concluye que la remoción de azufre por vía biológica es factible en condiciones de anaerobiosis, usando un fermentador para mantener una temperatura de proceso entre 30 y 37 °C. Cabe mencionar que las condiciones de trabajo, el tipo de cultivo, el acceso a equipo de medición específico y otros factores, son diferentes a los nuestros, por lo que se ha limitado el grado de experimentación que se ha logrado por ellos.

Tabla 2.20. Resumen de los estudios de biodesulfuración de combustibles realizados por otros investigadores

Referencia	Sistema	Combustible	Bacteria	Azufre Inicial % peso	Azufre Final % peso	Remoción (%)
Tae sung 1990	Anaerobio	Crudo	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	3.0	2.78	7.0
Stoner <i>et al.</i> , 1993	Anaerobio	Carbón	<i>Desulfovibrio africanus</i>	-	-	12.0
Tae Sung, 1990	Anaerobio	Crudo	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	3.0	2.36	21.0
Steven, 1994	Aerobio	Destilados medios	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	0.75	0.50	33.0
Julia <i>et al.</i> , 1993	Anaerobio	DBT	-	-	-	40.0
Afferden, 1993	Aerobio	DBT	<i>Brevibacterium sp</i>	1.2	0.7	41.6
Kilbane y K, 1992	Aerobio	Carbón	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	-	-	41.8
Monticello, 1993	Aerobio	Destilados medios	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	0.25	0.05	80.0
Ohmura y Saiki, 1994	Aerobio	Carbón	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	13.2	1.8	86.0
Byung <i>et al.</i> , 1996	Anaerobio	DBT	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	-	-	96.0

3. DESARROLLO EXPERIMENTAL

En este capítulo se describe el lugar donde se llevó a cabo la experimentación, la cual se realizó en dos partes. La primera fue una fase de preparación de las cepas provenientes de sedimentos marinos. La segunda corresponde al proceso de inoculación de las cepas, la selección de las que presentan mejores resultados, la determinación de las condiciones de operación al proceso general de biodesulfuración del combustóleo y las pruebas realizadas con el medio alternativo propuesto. Se citan también las técnicas analíticas empleadas en cada una de las pruebas realizadas (descritas en el Apéndice B). En general, la metodología que se llevó a cabo durante la fase de experimentación se describe detalladamente.

3.1. UBICACIÓN DEL SITIO

El lugar donde se llevó a cabo la etapa experimental fue en el Laboratorio de la Coordinación de Ambiental del Instituto de Ingeniería; cabe aclarar que se contó con el apoyo por parte del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología para la primera parte que corresponde a la inoculación de las cepas promisorias.

3.2. METODOLOGÍA

3.2.1. Inoculación de los cultivos mixtos

El primer paso para el proceso de biodesulfuración era obtener las bacterias que tuvieran la capacidad de remoción de azufre en forma anaerobia; se conocía por antecedentes, que estas son las bacterias sulfato-reductoras, pero no se sabía con certeza su lugar de procedencia, sin embargo la poca literatura existente mencionaba que habían sido tomadas de sedimentos marinos cercanos a pozos petroleros y de lagos pantanosos donde la presencia del oxígeno es escasa o nula; por tal motivo, el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología seleccionó dos sitios de recolección que fueron sedimentos marinos de las zonas petroleras de Oaxaca y Campeche y de un reactor anaerobio que trata aguas residuales de la ciudad de Toluca, Edo. de Méx. Los muestreos los realizaron con el apoyo del transporte marítimo con que cuentan.

La primera parte del desarrollo experimental se llevó a cabo utilizando 24 cultivos mixtos identificados como bacterias anaerobias, cedidos por el Laboratorio de Microbiología del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología; de estos, 17 fueron de sedimentos marinos mientras que los 7 restantes provienen del reactor anaerobio mencionado anteriormente, las bacterias se aislaron primeramente en un medio de cultivo API (ver preparación en Apéndice B) estudiado previamente (Aragón *et al.*, 1996), y el cual contiene los nutrientes esenciales para su metabolismo. La clave que se manejó para reconocer las cepas de acuerdo a su origen, se muestra en la tabla 3.1.

Tabla 3.1 Clave de cepas

No.	Clave	Origen	No.	Clave	Origen
1	EPE1	Campeche	13	EPE2	Campeche
2	ON1	Oaxaca	14	EPE4	Campeche
3	ON4	Oaxaca	15	1BDIG	Toluca
4	R'N1'	Campeche	16	OGTDIG	Toluca
5	ON2	Oaxaca	17	2ADIG	Toluca
6	ON3	Oaxaca	18	SODIG	Toluca
7	EPE5	Campeche	19	R'N2'	Campeche
8	EPE6	Campeche	20	2DIG	Toluca
9	EPE3	Campeche	21	O'N4'	Oaxaca
10	SR1DIG	Toluca	22	O'N3'	Oaxaca
11	DGT	Toluca	23	O'N2'	Oaxaca
12	SRDGT	Toluca	24	O'N1'	Oaxaca

Fuente: Aragón *et al.*, 1996.

Las cepas se hicieron crecer en viales de 150 mL, conteniendo cada uno 120 mL de medio de cultivo además de 12 mL de inóculo y dejando un espacio libre. El porcentaje de inoculación fue del 10% incubando a una temperatura de 35 °C en condiciones anóxicas. Se inyectó nitrógeno gaseoso a cada vial para desplazar el oxígeno libre en él. De acuerdo a recomendaciones de Quintero, 1993, se realizó una resiembra de las 24 cepas cada 3 meses con la finalidad de agregar nuevos nutrientes a las cepas para su crecimiento. Estos crecimientos celulares (denominados "originales") fueron la base de donde se tomaron los inóculos necesarios para las experiencias realizadas.

3.2.2. Selección de las cepas

Debido a la problemática de realizar un estudio con las 24 cepas, se decidió hacer una selección de 5 de ellas, tomándose como base el crecimiento de la biomasa; la capacidad de retención de sustrato tanto del medio de cultivo como del combustóleo, y las características que representarían una economía y facilidad de manejo, tales como el pH y temperatura.

3.2.2.1. Pruebas de crecimiento microbiano a pH 7 y 5

El medio que se utilizó para las pruebas de crecimiento y actividad a diferentes valores de pH fue el medio Postgate B (Apéndice B). Se debe adicionar una solución reductora, la cual contiene los siguientes reactivos:

Tioglicolato de sodio	$C_2H_3O_2SNa$	0.1 g
Ácido ascórbico	$C_6H_8O_6$	0.1 g
Agua destilada	H_2O	10 mL

Adicionalmente, se debe agregar una solución de sulfato ferroso, que contiene lo siguiente:

Sulfato ferroso	$\text{FeSo}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.5 g
Agua destilada	H_2O	10 mL

Estas 2 soluciones deben ser esterilizadas separadamente (bajo atmósfera de nitrógeno) ya que son un poco ácidas y podrían cambiar el pH del medio al ser tratadas conjuntamente. Además, deben ser preparadas al momento de usarse.

El medio de cultivo se vació en los viales, se selló con tapones de aluminio, se les inyectó nitrógeno para desplazar el oxígeno y se esterilizaron en la autoclave (121 °C durante 15 minutos). Posteriormente, se les agregó la solución reductora por medio de una jeringa, todo esto en condiciones estériles.

El cambio de pH se realizó en cada una de las 24 cepas usando una solución de ácido clorhídrico al 10%, disminuyendo el pH de 7 a 5.

La inoculación de las 24 cepas para ésta prueba se llevó a cabo utilizando el 5% de cada una, empleando para ello jeringas de 5 mL. Posteriormente, se guardaron en la incubadora (35 °C) hasta completar el período de prueba (7 y 14 días).

El crecimiento celular se midió como el incremento en la densidad óptica de las cepas a pH 5 y 7 durante 14 días. La densidad óptica se midió a 610 nm utilizando una dilución del 10% de la muestra, para poder leerla en el espectrofotómetro. Se eligió esta longitud de onda debido a un ensayo que se realizó para detectar la absorbancia con las cepas de trabajo, esto con base en las indicaciones de otros trabajos donde se manejaron longitudes de onda de 450 a 600 nm, como el estudio realizado con cultivos mixtos por Kayser, 1993. La muestra (1 mL) se tomaba diariamente para llevar un control de crecimiento en forma continua, para ello se usaban jeringas estériles de 1 mL y diluyendo la muestra a 10 mL con agua destilada. Posteriormente, se realizaba una agitación con ayuda del Vortex y se leía en el espectrofotómetro.

3.2.2.2. Pruebas de remoción de sulfatos a pH 7 y 5

El medio de cultivo Postgate B contiene entre sus nutrientes a los sulfatos, los cuales fueron determinantes en las pruebas de remoción de azufre como sulfato realizada por las 24 cepas.

De los viales que se inocularon en las pruebas de crecimiento microbiano se tomaron muestras diarias (20 mL) para realizar la medición de sulfatos. La medición de los sulfatos del medio, se realizó por el método gravimétrico* (APHA *et al.*, 1995). Con estos resultados se calcula la remoción de sulfatos como sigue

* Ver Apéndice B

$$\% \text{remoción} = \frac{\text{gSO}_4^{-2} / \text{L}_{\text{iniciales}} - \text{gSO}_4^{-2} / \text{L}_{\text{finales}}}{\text{gSO}_4^{-2} / \text{L}_{\text{iniciales}}} \times 100 \quad (3.1)$$

Con los resultados del crecimiento microbiano y de sulfatos, se calcula la actividad volumétrica y la actividad específica como sigue:

$$\text{Actividad volumétrica} = \frac{\text{gSO}_4^{-2} / \text{L}_{\text{iniciales}} - \text{gSO}_4^{-2} / \text{L}_{\text{finales}}}{\text{tiempo (h)}} \quad (3.2)$$

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{gSO}_4^{-2} / \text{L}_{\text{iniciales}} - \text{gSO}_4^{-2} / \text{L}_{\text{finales}}}{\text{tiempo (h)} \times \text{densidad óptica}} \quad (3.3)$$

3.2.3. Pruebas con las cepas seleccionadas

3.2.3.1. Efecto de la concentración de sulfatos

Otra de las pruebas que se realizaron a nivel de Vial fue la de observar qué efecto ejerce sobre las bacterias sulfato-reductoras el aumento en la cantidad de sulfatos como sustrato del medio de cultivo, los cuales se presentan en la tabla 3.2.

Tabla 3.2. Sulfatos del medio de cultivo Postgate B

Sulfato del medio B	Peso Molecular (g/mol)	Peso requerido (g)	Sulfato como SO_4^{-2} (g)
CaSO_4	136.0	1.0	0.71
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	246.3	2.0	0.78
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	277.9	0.5	0.17
		TOTAL:	1.66

Las concentraciones de sulfatos agregadas al medio Postgate B con las que se trabajó en esta prueba fueron de 4.52, 8.34 y 16.06 g/L. Para ello se emplearon las 5 cepas seleccionadas, inoculando al 5% en cada vial. Los viales se guardaron en la incubadora a 35 °C y de aquí se tomaba la muestra para realizar la medición de los sulfatos durante un período de hasta 29 días.

El crecimiento microbiano se realizó midiendo la densidad óptica de las 5 cepas seleccionadas inoculadas en el medio Postgate B a pH de 7 a diferentes concentraciones. La densidad óptica se midió durante el tiempo de incubación de hasta 21 días, cada 24 horas.

3.2.3.2. Efecto del pH

Pruebas de crecimiento microbiano

Se realizó una prueba de crecimiento bacteriano que comprende las 5 cepas seleccionadas. El medio de cultivo Postgate B, se preparó con sulfatos y con la adición de la solución reductora, a este medio se ajustó el pH a un valor de 8 con NaOH 0.1 M. Se llenaron los viales con 95 mL del medio en cada uno de los viales. Los viales se inocularon con 5% de inóculo y se almacenaron en el cuarto caliente a 35 °C. Se realizó una determinación inicial de densidad óptica, así como determinaciones continuas hasta por un período de 504 horas.

Pruebas de remoción de sulfatos

De la prueba de crecimiento bacteriano de las 5 cepas seleccionadas inoculadas en medio Postgate B a pH 8, se tomaron muestras para la determinación de sulfatos por medio de la técnica gravimétrica. Inicialmente se toma una prueba en el momento de la inoculación, la cual sería la base de comparación para la determinación de la remoción de sulfatos. Las muestras fueron tomadas diariamente por un período hasta de 504 horas.

3.2.3.3. Efecto de la temperatura

Medición del crecimiento microbiano

La temperatura juega un papel muy importante en el crecimiento de las bacterias, ya que influye en el desarrollo y crecimiento de las mismas. Un buen crecimiento de las bacterias se espera entre 30 y 37 °C, mientras que a temperaturas menores, el crecimiento ocurre muy lentamente. Sin embargo no se tiene mucha información del efecto de una temperatura mayor sobre el crecimiento de estas bacterias; de tal forma que se realizó una prueba inoculando las 5 cepas seleccionadas (5%) en medio Postgate B a pH 7 en viales y llevando a cabo el proceso a una temperatura de 45 °C. Para ello se adaptó un termostato que mantendría la temperatura adecuada a lo largo de todo el proceso. Las muestras se tomaron durante un período de 504 h. La medición de crecimiento bacteriano se realizó a través de la densidad óptica de las muestras tomadas haciendo una dilución previa en agua destilada 1:10.

Medición de la remoción de sulfatos

De la prueba de crecimiento bacteriano en medio Postgate B a pH 7 y una temperatura de 45 °C, se tomaron muestras (20 mL) para la determinación de sulfatos realizada por la técnica gravimétrica. Estas mediciones se hicieron durante un tiempo de proceso de hasta 504 horas. Se realizó una medición inicial que sirve de base para el cálculo de la remoción de sulfatos con respecto al tiempo de proceso.

3.2.3.4. Adecuación con medio de cultivo preparado con agua de mar

El medio Postgate B que ha sido utilizado en las pruebas de crecimiento de las cepas con bacterias sulfato-reductoras, requiere una cierta cantidad de sales las cuales lo hacen costoso (aproximadamente 0.81 USD/L, Juárez, 1997). De tal forma se propuso probar un medio más económico tomando como base la formulación del medio Postgate B, en este caso la alternativa que se propuso fue la utilización de agua de mar. Esta alternativa no sólo ayudará a disminuir el costo por reactivos, sino que además abarata el costo por consumo del agua necesaria para la disolución. El único nutriente que se necesitaría agregar es la fuente de carbono, en este caso como lactato de sodio. El medio de cultivo Postgate B requiere para 1 litro de agua de los iones presentados en la tabla 3.3.

Tabla 3.3. Iones totales requeridos en la preparación del medio Postgate B

Ión	Peso requerido (g)	Ión	Peso requerido (g)
SO ₄ ⁻²	1.49	Cl ⁻	15.7
Ca ⁺²	0.29	NH ₄ ⁺	0.34
Na ⁺	10.0	PO ₄ ⁻²	0.35
K ⁺	0.14	Mg ⁺²	0.20
Fe ⁺²	0.17		

Una vez obtenida el agua de mar como medio de cultivo con los nutrientes necesarios, se procedió con la prueba de crecimiento de las 5 cepas seleccionadas.

Se utilizaron 6 viales agregando en cada uno 57 mL del medio de agua de mar ya estéril e inoculando las 5 cepas seleccionadas al 5%, es decir 3 mL de biomasa, dejando un vial como testigo. Se tomó una muestra (6 mL) de cada vial para hacer la medición de la densidad óptica inicial tomada como base del crecimiento bacteriano. Los viales se llevaron a temperatura de incubación a 35 °C, permaneciendo ahí hasta que finalizó la prueba.

Además de estos viales, se prepararon otros dos para inocular en ellos 5% de una cepa testigo y determinar la posible remoción de sulfatos en este tipo de medio. Los viales incluyendo al tercer vial que corresponde al testigo también se llevaron a la incubadora. Se realizó una medición del contenido inicial de sulfatos tomando 20 mL de muestra. La prueba de crecimiento bacteriano y medición de sulfatos del medio con agua de mar, se realizó hasta por un tiempo de 13 días.

3.2.4. Determinación de las condiciones de proceso

3.2.4.1. Relación entre los Sólidos Suspendidos Volátiles (SSV) y el crecimiento microbiano

Debido a que los sólidos suspendidos volátiles son un indicativo de la cantidad de masa orgánica presente en la solución, se decidió relacionar los SSV con el crecimiento celular de

las bacterias para encontrar la pendiente y con esta conocer el crecimiento bacteriano. Para ello se realizó una curva de calibración entre los SSV y el crecimiento microbiano medido como densidad óptica con la cepa 22. Se utilizaron 7 viales de 150 mL, en cada uno de ellos se adicionó 120 mL de medio Postgate B preparado con sulfatos y con solución reductora. La inoculación se hizo en 6 de los viales empleando el 5% (6 mL) de la cepa 22 proveniente de la original (en medio API). El vial restante se usó como testigo.

El primer vial se utilizó para determinar los SSV y la densidad óptica. Los análisis de los SSV se realizaron apoyados en la técnica gravimétrica (APHA, 1995). La medición de densidad óptica se hace tomando una muestra de 6 mL del vial correspondiente a cada día y realizando la lectura en forma directa (sin diluirla) en el espectrofotómetro a 610 nm.

Cada 24 horas se recuperó un vial tanto para la medición de los sólidos como para la densidad óptica hasta completar las 6 muestras correspondientes para la realización de la curva de calibración.

3.2.4.2. Escalamiento del proceso a nivel matraz en presencia de combustóleo

Se realizó una prueba de crecimiento microbiano para determinar el efecto que pudiera causar sobre él la presencia de combustóleo. Para ello se utilizó la cepa 22, seleccionada de acuerdo a los mejores resultados de remoción de sulfatos que presentó en comparación con los de las otras 4 cepas (5, 7, 8 y 15), inoculándose al 5% en medio Postgate B. Se colocaron 47.5 mL de medio preparado con sulfatos y con solución reductora en cada uno de los seis matraces de 250 mL, de los cuales 5 correspondían a las 5 cepas seleccionadas y el último utilizado como testigo. Se realizó la inoculación de las 5 cepas al 5% (2.5 mL), posteriormente se inyectó nitrógeno para desplazar el oxígeno presente en el espacio vacío del matraz, y finalmente se sellaron para mantener condiciones de anaerobiosis. Los matraces se llevaron a una temperatura de incubación de 35 °C además de colocarlos en agitación a 150 rpm.

Se realizó una medición inicial de densidad óptica tomando aproximadamente 3 mL de cada muestra y filtrándola para retener el combustóleo y tomar finalmente 1 mL para la dilución 1:10 y leer en el espectrofotómetro. De igual forma se realizó otra prueba con la diferencia de que el medio utilizado fue el medio Postgate B sin la adición de sulfatos como nutriente.

Cabe aclarar que para el testigo empleado se eligió la cepa 22 utilizando el mismo medio Postgate B y en ausencia de combustóleo. Las pruebas se llevaron a cabo en un tiempo de hasta 192 horas.

3.2.4.3. Escalamiento del proceso al fermentador

De acuerdo a su diseño modular, el bioreactor es la herramienta ideal para las fermentaciones de cultivos celulares cuando se requiere una escala mayor. El fermentador o bioreactor (Figura 3.1), es de la marca Applikon, el cual tiene las siguientes especificaciones:

- ◆ Material: vidrio de borosilicato y acero inoxidable

- ◆ Agitador con motor de velocidad variable y propela tipo marino
- ◆ Volumen máximo de trabajo: 4.81(H/D radio = 1.6)
- ◆ Volumen mínimo de trabajo: 2 L.
- ◆ Volumen de trabajo: 3.41 (H/D radio 1.1)
- ◆ Enchaquetado (volumen: 2.01 L)

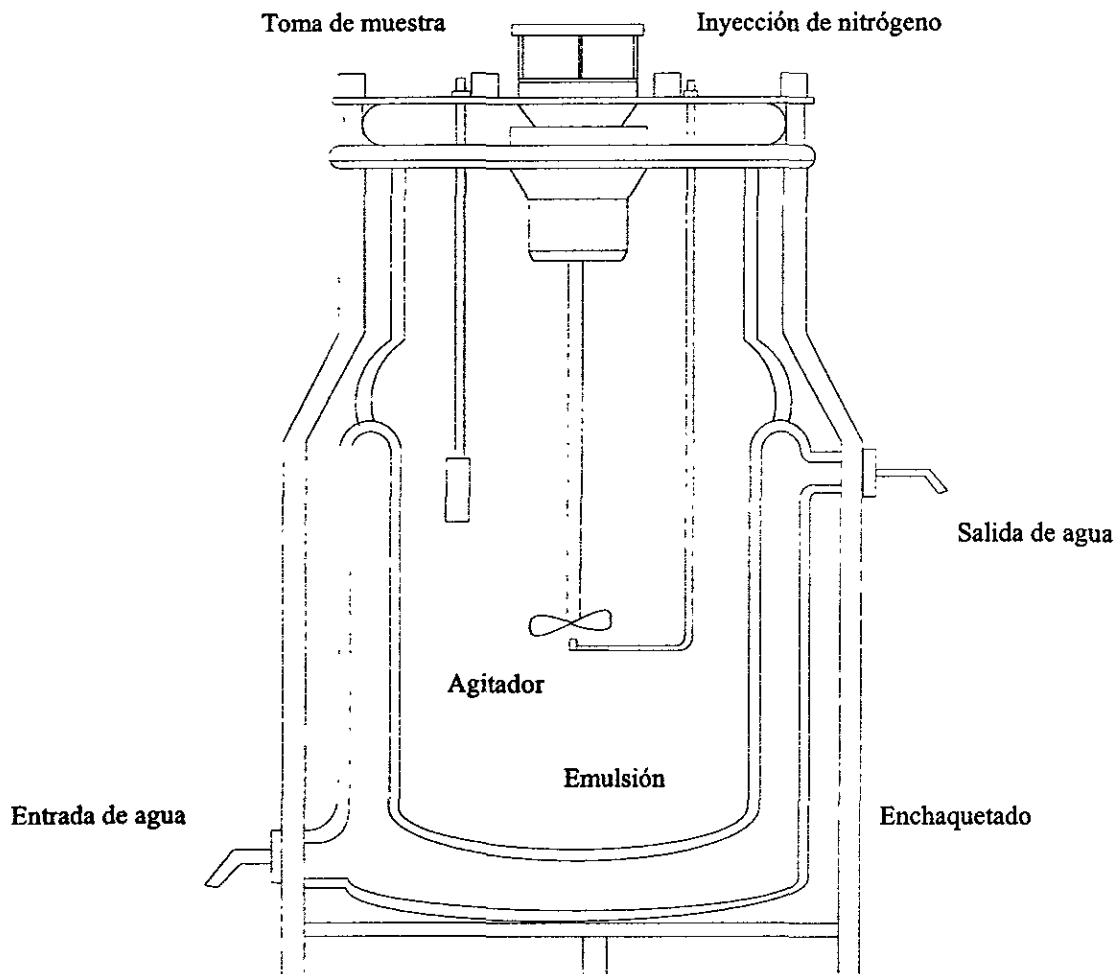


Figura 3.1. Fermentador o bioreactor

Prueba preliminar con la cepa 5

Para inocular con la cepa 5 el fermentador primero se preparó esta cepa en medio Postgate B sin sulfatos y sin solución reductora, proveniente de las cepas originales crecidas en medio API. Esta inoculación se hizo al 10% utilizando 3 viales de 150 mL. La cepa se dejó crecer a 35 °C durante un tiempo de 4 días.

Se preparó el fermentador de 5 litros para llevar a cabo la inoculación de la cepa 5, el volumen de trabajo fue de 3 litros. Se prepararon 2700 mL de medio Postgate B, se vaciaron al fermentador y se esterilizó, quitando previamente el motor del fermentador (para evitar dañarlo). Se sellaron los dispositivos de salida de aire. Después de esterilizado, se colocaron pinzas a presión para cerrar entradas o salidas de aire de las mangueras colocadas.

Las mediciones que se realizaron durante el tiempo de proceso, el cual fue de 5 días, fueron de densidad óptica, medida en el espectrofotómetro; pH, medido con el electrodo acoplado al fermentador; ácido sulfhídrico generado, medido por el método iodométrico (Apéndice B) y sulfatos, medidos por la técnica gravimétrica.

Pruebas de remoción de sulfatos con cepa 22

Prueba 1

Se realizó una primera prueba de remoción de sulfatos a nivel fermentador utilizando la cepa 22, que como se mencionó anteriormente, fue la cepa que mejores resultados presentó de su actividad sulfato-reductora después de la cepa 5. Al igual que la prueba realizada con la cepa 5, la inoculación de esta cepa fue al 10% utilizando un volumen total de 3 litros (2.7 L de medio y 0.3 L de biomasa). La cepa se hizo crecer previamente en 3 viales de 150 mL durante 10 días. Las mediciones realizadas fueron de pH, densidad óptica, de ácido sulfhídrico (H_2S) y de sulfatos. El tiempo límite de proceso fue de 8 días.

Prueba 2

Una segunda prueba con la cepa 22 a nivel fermentador fue realizada, utilizando para ello los microorganismos que se hicieron crecer previamente en matraces de 250 mL, con la finalidad de observar si el crecimiento celular para inoculación al fermentador podría ser en menor tiempo que la que se hacía crecer en viales. La cepa se inoculó al 5% (2.5 mL) en un volumen de 47.5 mL de medio Postgate B preparado con sulfatos y sin solución reductora en 4 matraces (uno de ellos empleado para medir continuamente el crecimiento bacteriano). A estos matraces se les inyectó nitrógeno para desplazar el oxígeno y se sellaron, llevándose a temperatura de incubación de 35 °C en el cuarto caliente y colocándolos en agitación a 170 rpm.

Cuando se tuvo la biomasa requerida después de 19 días, se inoculó en el fermentador al 5%. El medio de cultivo empleado fue el Postgate B preparado con sulfatos y con solución reductora, usando 2850 mL de medio y 150 mL de inóculo. Con el fin de cubrir la región mesófila y proponer una expectativa de ahorro de energía, se trabajó a una temperatura de proceso de 28 °C.

Se midió el pH de la mezcla (medio + inóculo) y se ajustó a pH 7 utilizando NaOH 1 M con ayuda del controlador de pH del fermentador. La agitación se ajustó a 700 rpm.

Prueba 3

Se realizó una tercera prueba de remoción de sulfatos utilizando la cepa 22 a nivel fermentador. La cepa se hizo crecer previamente en matraces de 250 mL en medio Postgate B preparado con sulfatos y sin solución reductora ni FeSO_4 a 35 °C sin agitación y durante un tiempo de 16 días.

Esta cepa (150 mL) se inoculó en el fermentador conteniendo 2850 mL de medio B con sulfatos y con solución reductora. El pH se ajustó a 7 con NaOH 1 M. Las mediciones que se llevaron a cabo fueron de densidad óptica, tanto a la cepa antes de inocularla al fermentador como a la biomasa formada durante el proceso; ácido sulfhídrico, medido con el electrodo de sulfuro, análisis de sulfatos, y pH del proceso. El tiempo que permaneció esta cepa en proceso fue hasta de 338 horas.

3.2.5. Biodesulfuración de combustóleo

3.2.5.1. Pruebas con medio Postgate B

Para llevar a cabo la inoculación de la cepa 22 al fermentador en la prueba de remoción del azufre en combustóleo, se preparó previamente el crecimiento bacteriano inoculándose esta cepa en viales con medio Postgate B preparado con sulfatos sin solución reductora y sin FeSO_4 . La inoculación se realizó al 5% de la cepa 22 de la muestra original (en medio API). Se colocaron 114 mL de medio Postgate B y 6 mL de biomasa en cada uno de los 4 viales, llegando a un volumen total de 120 mL. Se llevaron a 35 °C hasta alcanzar la densidad óptica requerida para inocular el fermentador en la prueba con combustóleo.

En la tabla 3.4, se presentan las características del combustóleo proveniente de la refinería de Tula, Hgo. utilizado en las pruebas de biodesulfuración, en la cual se observa principalmente el alto contenido de azufre 4.3% que es el reto a vencer, sin embargo, el contenido de azufre se analizó en cada una de las pruebas de biodesulfuración realizadas debido a la transformación que sufre con respecto al tiempo (Klaus *et al.*, 1994), de igual manera se puede observar que tiene una alta concentración de metales (vanadio y níquel) que llegan a ser un obstáculo en el desarrollo celular de las bacterias sulfato-reductoras.

Tabla 3.4. Análisis del combustóleo proveniente de la refinería de Tula, Hgo.

Determinación	Resultado	Norma usada
Azufre (% en peso)	4.33	ASTM D 1552-90
Cenizas (% en peso)	0.274	ASTM D 482-91
Visc. s.s.f. a 37.8°C	2110	ASTM D 87-88
Visc. s.s.f. a 50°C	700.4	ASTM D 87-88
Visc. s.s.f. a 60°C	306.1	ASTM D 87-88
Visc. s.s.f. a 82.2°C	78.36	ASTM D 87-88
Visc. s.s.f. a 98.9°C	40.59	ASTM D 87-88
V. calorífico (Kcal/g)	10.151	ASTM D 3286-91a
V. calorífico neto (Kcal/g)	9.632	ASTM D 3286-91a
P. específico a 20/4 °C	0.999	ASTM D 70-86
Temp. de ignición (°C)	197	ASTM D 92-85
Carbono (% en peso)	84.91	ASTM D 5373-93
Hidrógeno (% en peso)	10.25	ASTM D 5373-93
Nitrógeno (% en peso)	0.37	ASTM D 5373-93
Oxígeno (% en peso)	0.14	ASTM D 5373-93
Níquel (ppm)	5.54	-
Potasio (ppm)	4.17	-
Sodio (ppm)	15.45	-
Vanadio (ppm)	311	-
Fierro (ppm)	4.99	-
Cobre (ppm)	< 1.0	-
Calcio (ppm)	6.82	-
Magnesio (ppm)	0.55	-
Cloruros (ppm)	0.12	-

Realizado en el Laboratorio Químico del Instituto de Investigaciones Eléctricas

Se llevaron a cabo tres pruebas de biodesulfuración de combustóleo tomando en cuenta las mismas condiciones de preparación, así como de medición de parámetros.

El procedimiento llevado a cabo para el proceso de biodesulfuración de combustóleo fue el siguiente: en primer lugar se preparó una emulsión de combustóleo-agua 1:10 la cual contenía 890 mL de medio Postgate B (preparado con el ión cloruro en lugar del ión sulfato, además de solución reductora y sin FeSO_4), 10 mL de agente emulsificante tween 20 (Zamora, 1997) y 100 mL de combustóleo calentado este previamente para su mejor manejo y pesado antes de adicionarlo con el fin de relacionar el peso/volumen (su densidad a temperatura de 70 °C es de 0.99).

La emulsión se preparó con agitación usando la propela marina durante 5 minutos, de los cuales en minuto y medio se agregaba el combustóleo de forma continua. Se prepararon cuatro litros de emulsión, realizándola por separado (litro a litro) en un vaso de precipitado, después se vaciaba a un vaso de precipitado de 4 litros en agitación. Una vez preparada la emulsión, se pesaron 3150 g, se vaciaron en el fermentador estéril, se selló, y con un embudo se agregaron los 350 mL del inóculo preparado previamente (10%). Después de esto, comenzó el proceso de biodesulfuración de combustóleo, inyectándose nitrógeno para desplazar el oxígeno presente.

De la emulsión restante (850 mL aproximadamente), se tomaron 300 mL distribuidos en 3 matraces de 250 mL; para observar el efecto de la temperatura sobre la estabilidad de la emulsión. El primer matraz se llevó a una temperatura de (4 °C), el segundo matraz se colocó en la incubadora a 35 °C, mientras que el último matraz se mantuvo a temperatura ambiente (20 °C aproximadamente).

En un matraz se colocaron 250 mL de emulsión sobrante y se llevó a esterilización con la finalidad de romper la emulsión. Una vez esterilizada la emulsión, se separó la fase acuosa (parte inferior) en frascos de plástico para análisis de Demanda Química de Oxígeno (DQO), sulfatos, conductividad, pH, grasas y aceites y metales pesados (vanadio y níquel). Mientras tanto el combustóleo separado se guardó en un frasco de plástico para analizar azufre total, capacidad calorífica, humedad, vanadio y níquel.

Además, se tomó una muestra del combustóleo original utilizado para formar la emulsión con la finalidad de determinar el azufre total, la capacidad calorífica, humedad, vanadio y níquel y relacionar estos resultados con los obtenidos en el combustóleo de la separación después de un tiempo de proceso determinado.

Al iniciar el proceso se midió el ácido sulfhídrico generado, inyectando nitrógeno para desplazarlo durante aproximadamente 3 minutos y absorbiéndolo en la solución antioxidante. Este gas se midió cada 24 horas por el método del electrodo de sulfuro.

3.2.5.2. Prueba en medio preparado con agua de mar

Una cuarta prueba fue realizada utilizando la cepa 22. La modificación de esta prueba fue el utilizar agua de mar como medio de cultivo. La cepa se hizo crecer previamente también en medio preparado con agua de mar. La inoculación fue del 5% proveniente de las cepas originales mantenidas en medio API. Se llevaron a temperatura de incubación en agitación a 150 rpm hasta su crecimiento óptimo logrado en 11 días.

La preparación de las emulsiones se realizó también con medio preparado con agua de mar, siguiendo los mismos pasos que la preparación de las tres pruebas mencionadas anteriormente, con menos emulsificante, debido a que este medio preparado contiene mayor salinidad que el medio Postgate B.

Se hizo medición del crecimiento de la cepa 22 antes de inocularlo al proceso de biodesulfuración de combustóleo, así como el análisis del contenido de sulfatos. La inoculación al fermentador fue del 10%. Las condiciones para la operación de esta prueba fueron como las de las tres pruebas anteriores. Asimismo se tomaron las muestras correspondientes para las determinaciones de azufre total del combustóleo recuperado y las determinaciones físico-químicas del agua residual obtenida.

4. RESULTADOS

4.1. Selección de las cepas

4.1.1 Crecimiento microbiano y remoción de sulfatos a pH 5 y 7

Las primeras pruebas realizadas con las 24 cepas fueron las de crecimiento bacteriano, determinando el efecto del pH sobre el mismo. La biomasa celular presentó originalmente un valor de pH de 7, por lo cual y debido a recomendaciones de otros autores se realizaron pruebas a este pH, sin embargo se quiso experimentar con un pH modificado para comprobar ambos resultados.

En las pruebas de crecimiento microbiano y remoción de sulfatos provenientes del medio de cultivo, se pudo observar que al variar el pH del medio se obtuvieron cambios significativos que demuestran cuál es el pH más conveniente tanto para la reproducción de las bacterias, como para la remoción de los sulfatos.

El crecimiento microbiano a pH 5 del medio de cultivo se observa con variación en el punto de crecimiento máximo (tabla 4.1 y figura 4.1), ya que el 21% de las cepas necesita dos semanas para alcanzar su punto máximo, mientras que sólo el 8% necesita una semana, el mayor porcentaje de las cepas (46%) necesita 5 días, mientras que 6 de las cepas (1, 5, 8, 18, 19 y 23) alcanzan su punto de crecimiento máximo después de las dos semanas, o bien no se reproducen en estas condiciones.

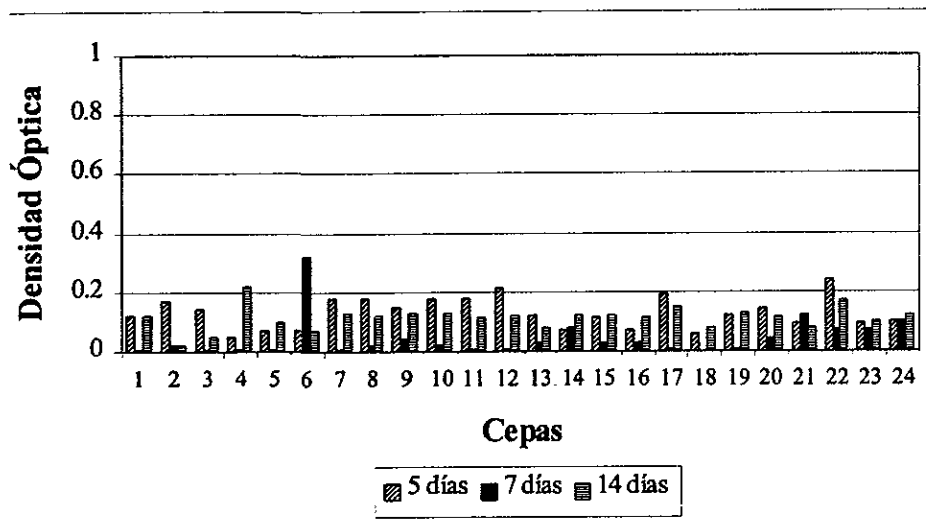


Figura 4.1. Crecimiento microbiano de las 24 cepas a pH 5

Tabla 4.1. Crecimiento microbiano de las 24 cepas a pH 5

Cepas	Tiempo (días)			
	0	5	7	14
1	0.23	0.12	0.01	0.12
2	0	0.17	0.02	0.02
3	0.03	0.14	0.01	0.05
4	0.13	0.05	0.004	0.22
5	0.18	0.07	0.01	0.1
6	0.29	0.07	0.32	0.07
7	0.03	0.18	0.004	0.13
8	0.26	0.18	0.02	0.12
9	0.12	0.15	0.04	0.13
10	0.04	0.18	0.02	0.13
11	0.05	0.18	0.01	0.11
12	0.06	0.21	0.01	0.12
13	0.06	0.12	0.03	0.08
14	0.02	0.07	0.08	0.12
15	0.1	0.11	0.03	0.12
16	0.02	0.07	0.03	0.11
17	0.06	0.19	0.01	0.15
18	0.1	0.06	0.003	0.08
19	0.14	0.12	0.01	0.13
20	0.07	0.14	0.04	0.11
21	0.01	0.09	0.12	0.08
22	0.09	0.24	0.07	0.17
23	0.13	0.09	0.07	0.1
24	0.06	0.1	0.1	0.12

En cuanto a la remoción de sulfatos a pH 5, todas las cepas (excepto la cepa 1 y 3) obtuvieron la remoción más alta a la segunda semana de inoculación. Las remociones más relevantes según la tabla 4.2 y figura 4.2, son para las cepas 9 y 6, cuyos valores son del 54.4% y 60.3% respectivamente. Las cepas restantes presentan un rango de remoción de 9 a 23%. El máximo de remoción que se logra en una semana de incubación es del 12.7% para la cepa 21. Estos resultados nos indican que el proceso de remoción de sulfatos es más conveniente en un tiempo de 336 horas.

Tabla 4.2. Remoción de sulfatos de las 24 cepas a pH 5

Cepas	Remoción de sulfatos (%)	
	día 5	día 14
1	9.49	5.51
2	8.45	10.72
3	6.93	5.98
4	8.63	11.76
5	8.63	9.58
6	8.83	54.41
7	10.91	14.23
8	11.66	12.52
9	9.01	60.38
10	5.51	13.85
11	9.11	16.41
12	10.44	23.23
13	9.68	15.46
14	12.62	15.51
15	10.91	21.43
16	10.53	12.42
17	8.16	21.15
18	8.64	16.98
19	4.65	20.19
20	10.15	19.82
21	12.71	18.21
22	6.36	13.56
23	5.03	20.01
24	11.95	15.55

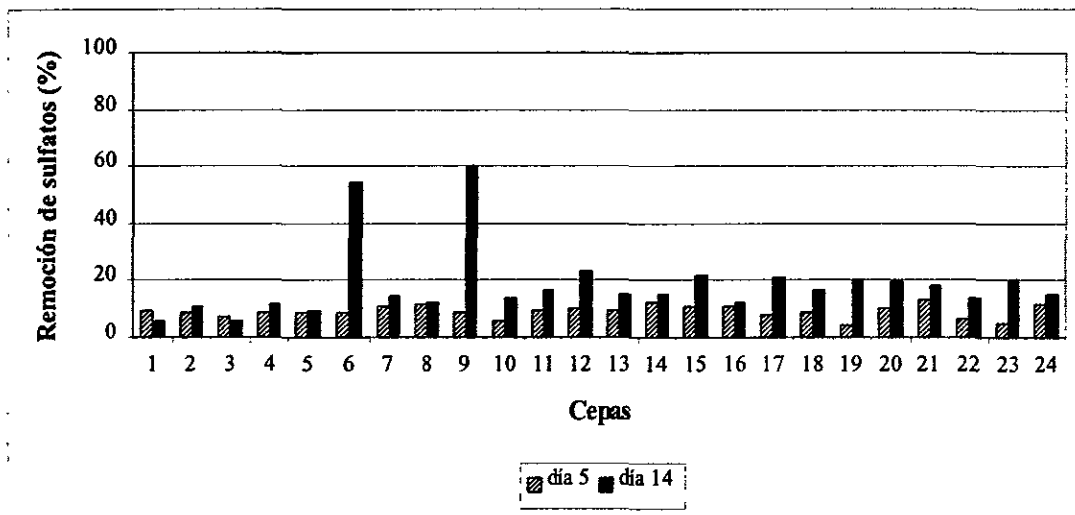


Figura 4.2. Remoción de sulfatos de las 24 cepas a pH 5

El crecimiento de las 24 cepas a pH 7, es muy variado, ya que el punto de crecimiento máximo lo presentan en diferentes tiempos de incubación (tabla 4.3 y figura 4.3). El 50% de ellas tiene su máximo crecimiento hasta las dos semanas de incubación, el 12.5% lo tiene a la primer semana y el 16.7% a los tres días. También hubo 5 cepas que no presentaron crecimiento por lo menos hasta las dos semanas en que finalizó la prueba (cepa 2, 16, 17, 18 y 24).

Tabla 4.3. Crecimiento microbiano de las 24 cepas a pH 7

Cepas	Densidad Óptica (nm)			
	0 días	3 días	7 días	14 días
1	0.23	0.15	0.66	0.14
2	0.37	0.16	0.24	0.27
3	0.24	0.18	0.39	0.87
4	0.15	0.15	0.51	0.63
5	0.21	0.39	0.31	0.3
6	0.22	0.38	0.36	0.37
7	0.19	0.1	0.3	0.28
8	0.12	0.17	0.25	0.25
9	0.14	0.22	0.21	0.26
10	0.15	0.13	0.12	0.21
11	0.12	0.13	0.17	0.21
12	0.1	0.14	0.12	0.19
13	0.22	0.13	0.19	0.3
14	0.18	0.08	0.21	0.38
15	0.13	0.07	0.28	0.29
16	0.1	0.07	0.07	0.1
17	0.11	0.06	0.06	0.04
18	0.11	0.09	0.09	0.04
19	0.12	0.08	0.18	0.18
20	0.11	0.15	0.13	0.1
21	0.12	0.31	0.23	0.3
22	0.12	0.31	0.37	0.47
23	0.12	0.09	0.31	0.35
24	0.14	0.09	0.08	0.09

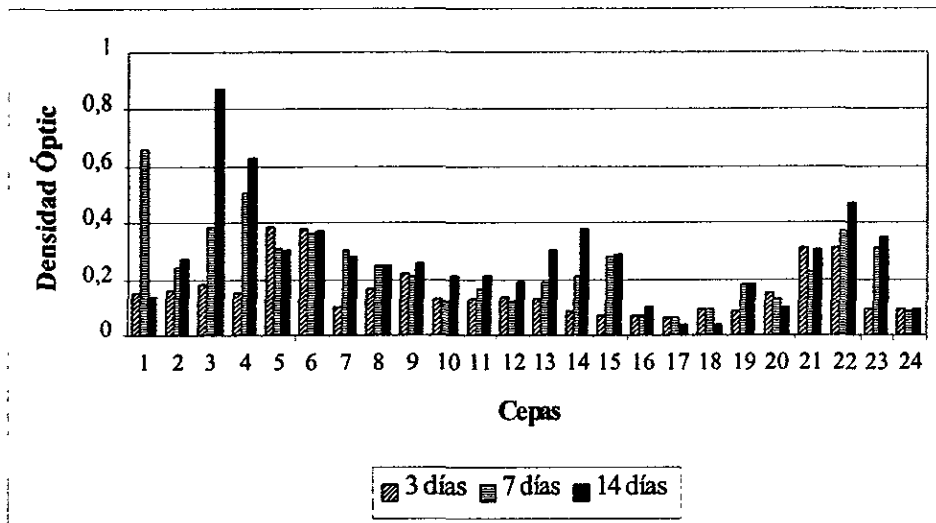


Figura 4.3. Crecimiento microbiano de las 24 cepas a pH 7

Los resultados de remoción de sulfatos a pH 7 (tabla 4.4 y figura 4.4), indican que a la primera semana de proceso se obtienen remociones más altas que para la segunda semana (excepto para las cepas 13, 15, 17 y 21) aunque con diferencias no significativas. La más alta remoción se logró para la cepa 5 (92.3%). Otros buenos valores de remoción se lograron con las cepas 22, 23, 8, 7, 9 y 15.

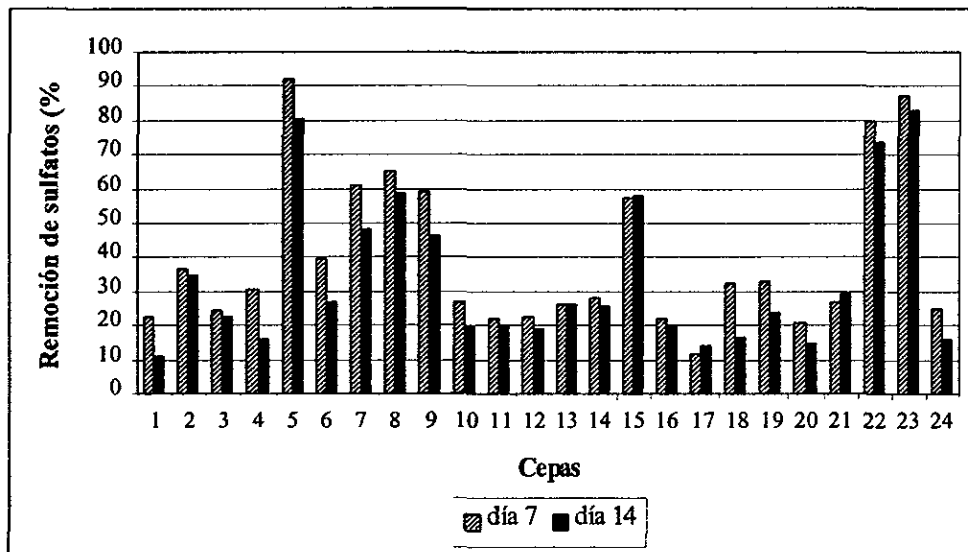


Figura 4.4. Remoción de sulfatos de las 24 cepas a pH 7

Tabla 4.4. Remoción de sulfatos de las 24 cepas a pH 7

Cepas	Remoción de sulfatos (%)	
	día 7	día 14
1	22.66	10.91
2	36.59	34.6
3	24.46	22.57
4	30.62	16.03
5	92.32	80.38
6	39.63	26.83
7	61.05	47.97
8	65.03	58.68
9	59.15	46.45
10	26.55	19.44
11	22.19	20.39
12	22.38	18.78
13	26.17	26.36
14	27.78	25.6
15	57.44	58.01
16	21.9	19.82
17	11.38	13.94
18	32.04	16.31
19	33.18	24.08
20	20.67	14.42
21	26.83	29.49
22	79.62	73.84
23	87.3	82.84
24	24.84	16.03

En cuanto a las actividades específicas, las cuales indican los miligramos de sulfato removido con respecto al crecimiento bacteriano en un período de tiempo, se observa que son más altos los valores cuando se trabaja a pH 5 que a pH 7, con una diferencia de un orden de magnitud (figuras 4.5 y 4.6).

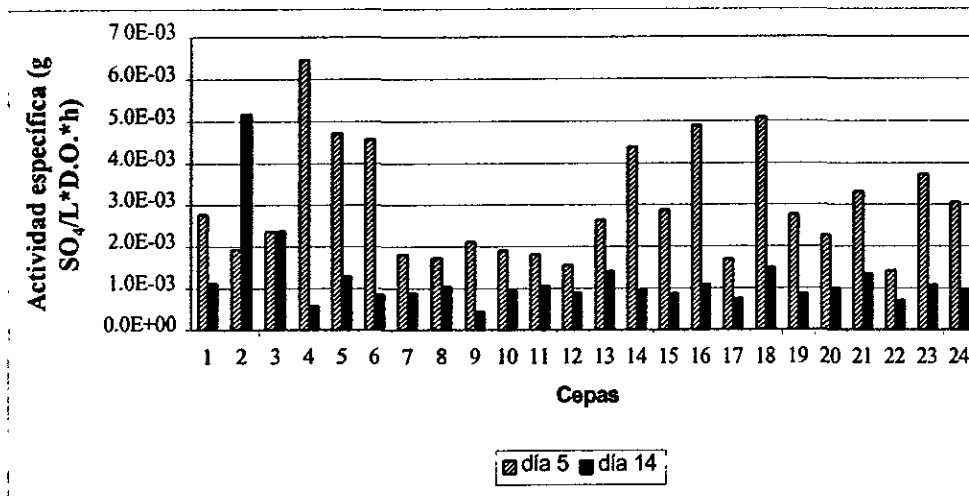


Figura 4.5. Actividad específica de las 24 cepas a pH 5

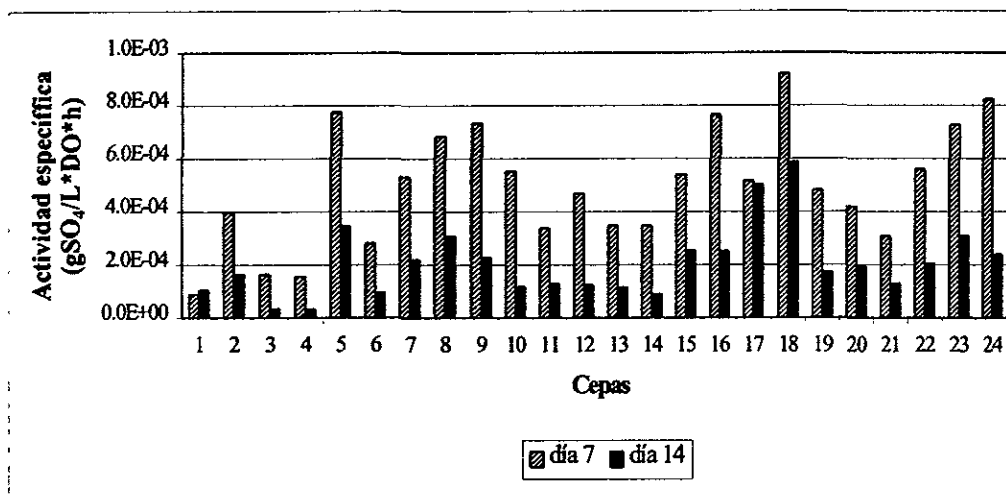


Figura 4.6. Actividad específica de las 24 cepas a pH 7

De acuerdo a estos resultados, se realizó una selección de cinco de las mejores cepas, considerando primordialmente la remoción alcanzada sobre todo a pH 7, ya que no se necesitaría modificarlo. También se consideró la actividad específica, tanto a pH 5 como a pH 7 y la actividad volumétrica.

Las cinco cepas seleccionadas fueron la 5, 7, 8 15 y 22. La cepa 23, aunque presentó buena remoción, se descartó por pertenecer al mismo lugar que la cepa 5 y presentar un crecimiento celular y remoción de sulfatos más lento. Asimismo, las cepas 6 y 9 aunque también presentan una buena remoción de sulfatos ésta es a pH 5 y puesto que ésta condición no es recomendable por el costo del reactivo para mantenerlo constante, se descartaron (ver tabla de resultados en Apéndice C).

4.2. Cepas seleccionadas

4.2.1. Pruebas a pH 8

Aun cuando se comprobó que es mejor trabajar a un pH de 7 que a un pH de 5, se decidió realizar unas pruebas modificando a un valor de pH de 8.

De la prueba realizada con las cinco cepas seleccionadas a pH 8 (Figura 4.7), se pudo observar lo siguiente: para la mayoría de las cepas el crecimiento celular fue en aumento en relación con el tiempo de incubación, llegando a su punto máximo a las 336 horas, después del cual comenzó a disminuir, el mejor crecimiento celular lo presentó la cepa 22. Este comportamiento no ocurrió para la cepa 8, la cual aumentó su biomasa a las 168 horas, después disminuyó y volvió a aumentar hasta su punto máximo a las 504 horas.

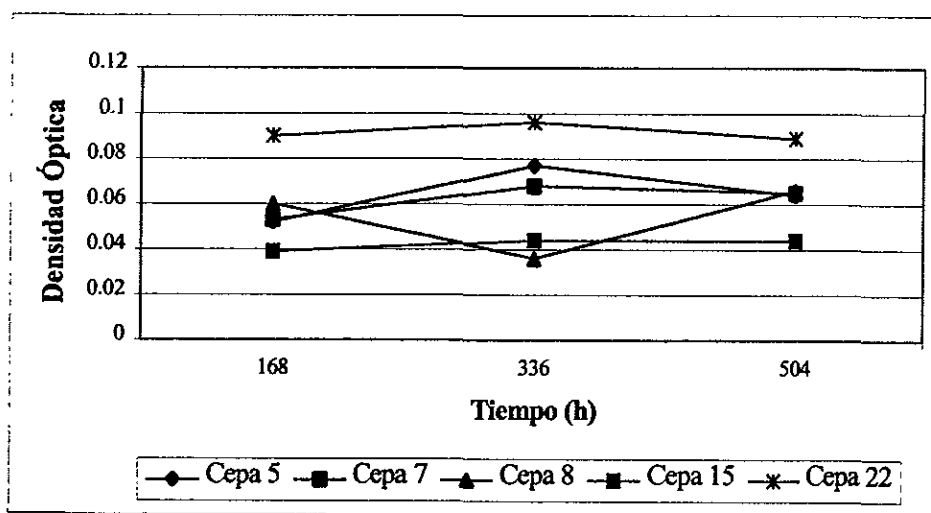


Figura 4.7. Crecimiento microbiano de las cepas seleccionadas a pH 8

De los resultados de remoción de sulfatos se observa que en general fueron satisfactorios para la mayoría de las cepas excepto para la cepa 15, la cual tuvo una remoción máxima de 11.8% en un tiempo de 336 horas. Los resultados oscilaron de 5.3 a 63.7% para las cepas 15 y 22 respectivamente durante un tiempo de 168 horas, mientras que a las 336 horas el rango fue de 11.8 a 87.6%, siendo estos mínimo y máximo para las cepas 15 y 5 respectivamente.

Comparando los resultados de remoción de sulfatos para las cinco pruebas seleccionadas a pH 7 y 8 (figura 4.8), se pudo observar que las remociones más altas en el menor tiempo de proceso fueron para las pruebas a pH 7 con una remoción promedio de 71.2% a 168 horas, contra un 28.4% obtenido en la prueba de las cepas a pH 8. Cabe destacar que la cepa que tuvo la mejor remoción fue la cepa 5, logrando hasta 92.8% a un pH de 7 y en un tiempo de 168 horas, seguida de la cepa 22 con una remoción de 79.6% al mismo pH y tiempo de proceso.

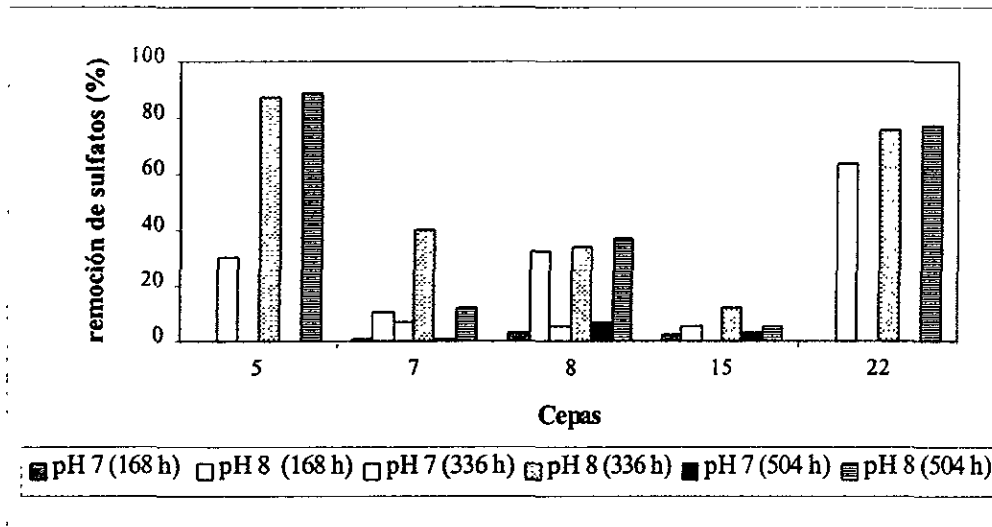


Figura 4.8. Remoción de sulfatos a pH 7 y 8 con las cepas seleccionadas

4.2.2. Efecto de la concentración de sulfatos

El crecimiento observado para las cinco cepas seleccionadas sometidas a diferente concentración de sustrato (4.52, 8.34 y 16.06 g SO₄/L) fue muy variado, debido a que el crecimiento máximo alcanzado se presentó en distintos tiempos de proceso de cada una de las concentraciones realizadas. El tiempo límite de proceso fue de 21 días y en algunas de ellas no se encontró un crecimiento de biomasa remarcado aún en este tiempo, como es el caso de la cepa 7 para las tres concentraciones probadas y para la cepa 15 en sus dos mayores concentraciones de sulfatos según como lo muestra la figura 4.9.

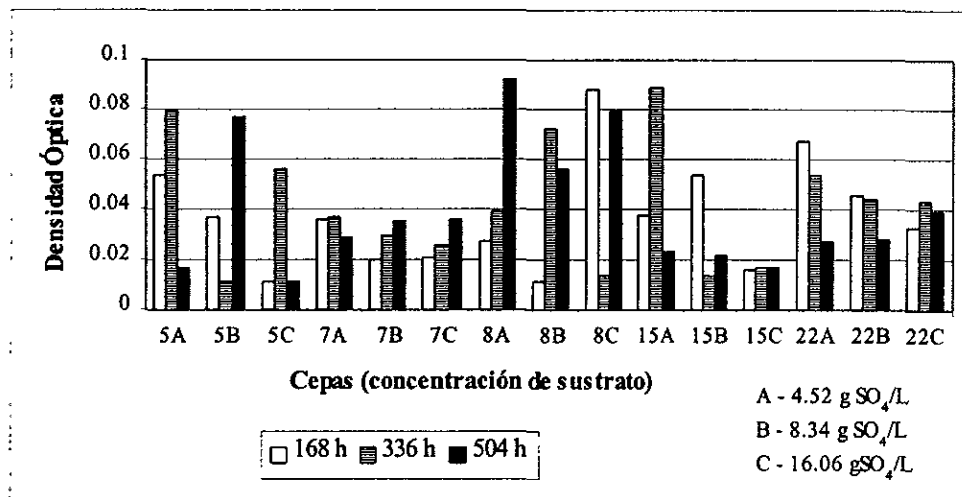


Figura 4.9. Crecimiento microbiano de las cepas seleccionadas en diferente concentración de sustrato

La remoción del azufre en estas pruebas se calculó como el contenido de este azufre contenido en sulfatos, sin embargo la remoción en las pruebas con el combustible fueron del azufre como porcentaje en peso. Para relacionar el azufre como porcentaje en peso contenido en los sulfatos manejando cuatro diferentes concentraciones (2.17, 4.52, 8.34 y 16.06 g SO₄/L), se hacen los siguientes cálculos:

Peso Molecular SO₄⁻² → 98 g/mol

Peso atómico del S → 32 g

$$32\text{g} \left(\frac{100\%}{98\text{g}} \right) = 32.6\% \text{S}$$

$$2.17 \text{ gSO}_4^{-2} / \text{L} \left(\frac{32.6\% \text{S}}{98\text{gSO}_4^{-2}} \right) = 0.72\% \text{ en peso S}$$

$$4.52 \text{ gSO}_4^{-2} / \text{L} \left(\frac{32.6\% \text{S}}{98\text{gSO}_4^{-2}} \right) = 1.50\% \text{ en peso S}$$

$$8.34 \text{ gSO}_4^{-2} / \text{L} \left(\frac{32.6\% \text{S}}{98\text{gSO}_4^{-2}} \right) = 2.77\% \text{ en peso S}$$

$$16.06 \text{ gSO}_4^{-2} / \text{L} \left(\frac{32.6\% \text{S}}{98\text{gSO}_4^{-2}} \right) = 5.34\% \text{ en peso S}$$

Estos cálculos nos permiten comprobar cuando un combustible con menor contenido de azufre (como los destilados medios) puede ser más fácilmente desulfurado de acuerdo a estudios realizados por otros investigadores.

En cuanto a la disminución de sulfatos para cada una de las cinco cepas seleccionadas (figura 4.10), se tiene que con la cepa 5, en las tres concentraciones empleadas, disminuyeron con el tiempo, siendo más alta la remoción con la prueba de la concentración mayor (16.06 g SO₄/L), alcanzando un porcentaje de 52.6% de remoción de sulfatos.

Con la cepa 7, resultó lo mismo que con la cepa 5, ya que la remoción de sulfatos aumentó con respecto al tiempo para cada una de las tres concentraciones de sustrato, logrando reducir los sulfatos hasta en un 44.6% para la prueba con mayor contenido de sustrato.

La cepa 8 fue la que menor remoción de sulfatos presentó ya que la máxima fue del 28.3% a la segunda semana de incubación, permaneciendo casi la misma concentración después de otra semana de proceso.

Para la cepa 15, la remoción de los sulfatos resultó adecuada, debido a que hubo una remoción máxima de 45.1% después de tres semanas de incubación.

En la cepa 22, se observó que la máxima disminución de sulfatos ocurrió en un menor tiempo comparado con el tiempo empleado por las otras cepas; se tuvo una remoción de hasta 31.0% en la segunda semana de incubación para la prueba con la menor concentración de sustrato.

En estos resultados se observa que las mejores remociones de sulfatos se presentaron en las pruebas con mayores concentraciones de sustrato iniciales, lo que nos indica que puede ser removido azufre en altas concentraciones, como es el caso del combustóleo (3.9% en peso de azufre). Sin embargo, estos resultados no son mejores que los obtenidos en las pruebas (con las 24 cepas) con concentración de sustrato de $2.17 \text{ gSO}_4^{-2}/\text{L}$ donde se tuvieron remociones más altas entre 48 y 92%.

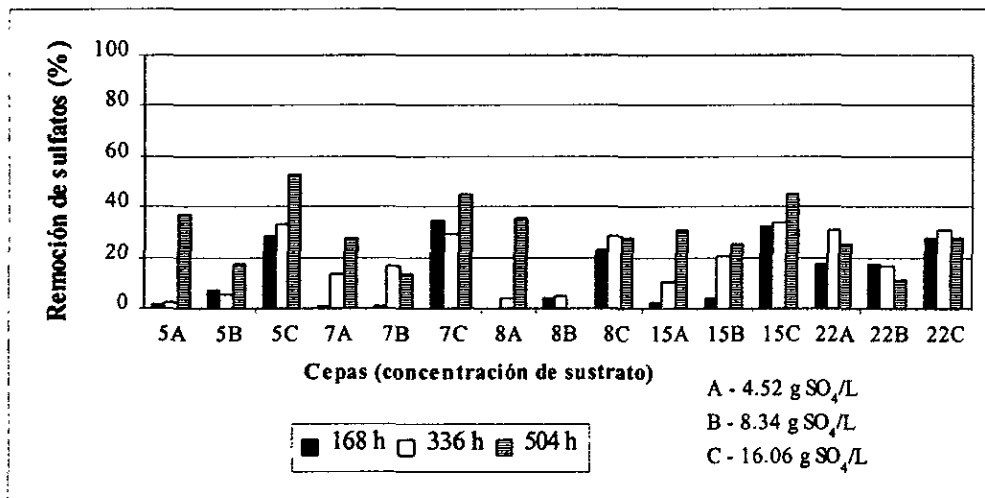


Figura 4.10. Remoción de sulfatos de las cinco cepas seleccionadas con diferente concentración de sustrato

4.2.3. Efecto de la variación de temperatura

Al realizar las pruebas de crecimiento bacteriano con las cinco cepas a 45°C , se observó que sí se presentó un crecimiento en todas las cepas a esta temperatura, sin embargo el crecimiento no fue tan marcado como con las pruebas a 35°C (figura 4.11), además de que el tiempo de crecimiento fue menor para las pruebas a esta última temperatura.

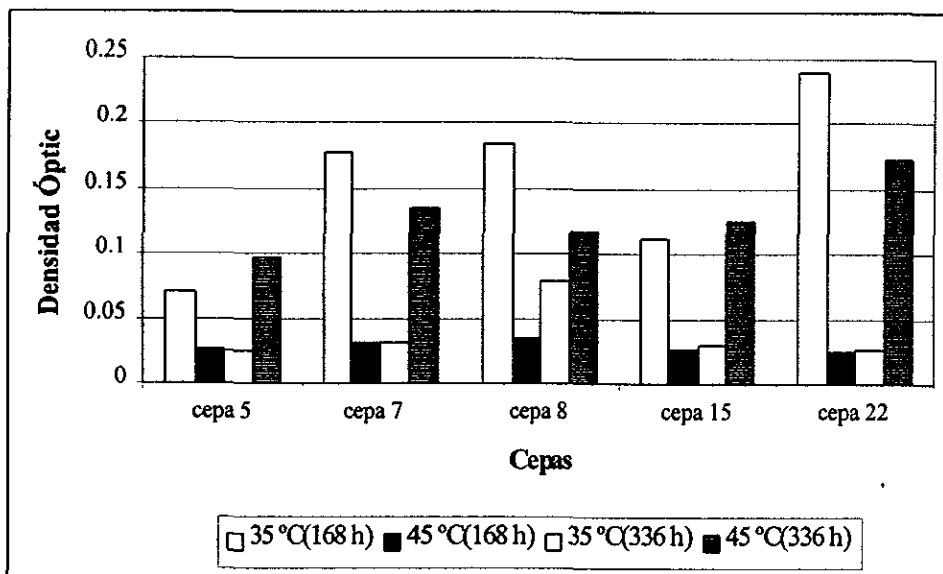


Figura 4.11. Crecimiento microbiano de las cepas seleccionadas a 35 y 45 °C

En cuanto a la remoción de sulfatos para la prueba a 45 °C de temperatura (figura 4.12) y haciendo una comparación con las pruebas realizadas a 35 °C (Figura 4.13), se puede observar que la remoción de sulfatos fue mayor cuando se trabajó a 35 °C, logrando remociones hasta de 92.8% para la cepa 5, seguida de la cepa 22 con 79.6%, en una semana de incubación; mientras que en las pruebas a 45 °C se pudo lograr una remoción del 91.7% y 88.9% para las cepas 8 y 7 respectivamente después de dos semanas de proceso. Esto nos indica que es mejor trabajar a la temperatura de 35 °C, ya que se reducirían los tiempos de operación, por lo que se propone operar a esta temperatura.

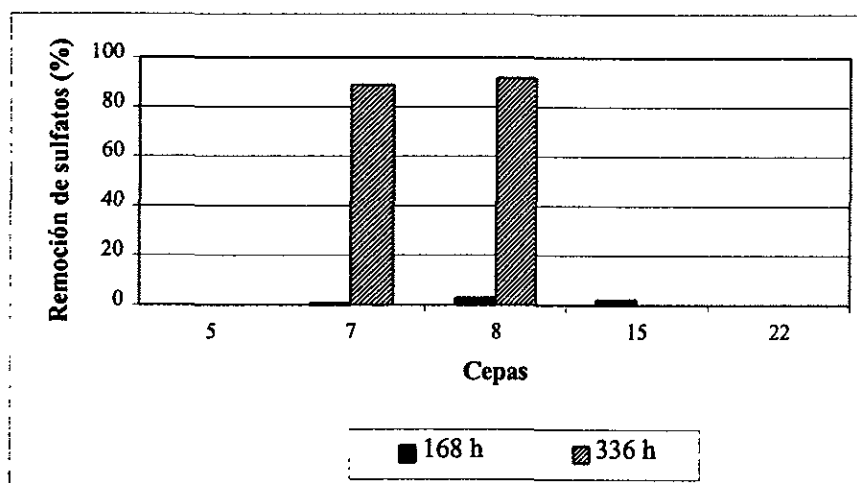


Figura 4.12. Remoción de sulfatos con las cepas seleccionadas a 45 °C

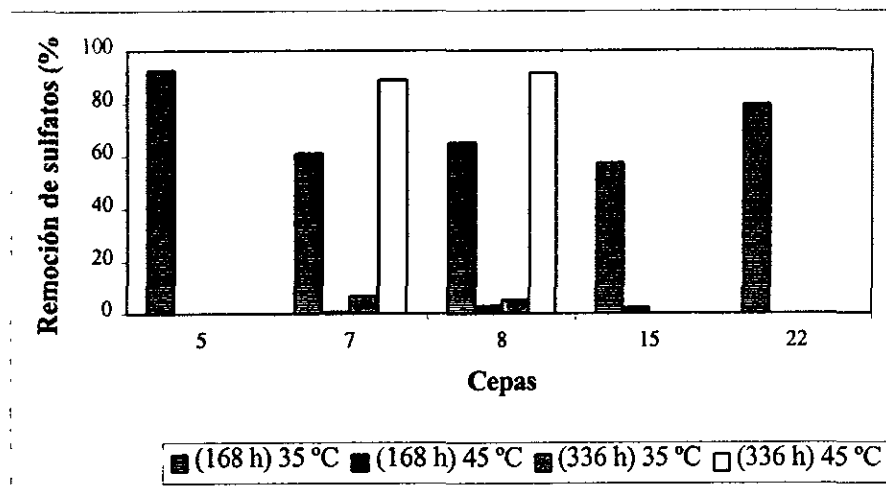


Figura 4.13. Efecto de la temperatura sobre la remoción de sulfatos con cepas seleccionadas

4.2.4. Crecimiento microbiano y remoción de sulfatos en medio preparado con agua de mar

Debido a que el agua de mar es rica en sales, se pensó que sería un buen medio de cultivo para el crecimiento de los inóculos y para llevar a cabo la sulfato-reducción, por tal motivo se hicieron estas pruebas con agua de mar. Para ello se realizó un análisis del agua de mar proveniente de Pochutla, Oaxaca, el cual se presenta en la tabla 4.5.

Tabla 4.5. Resultados del análisis del agua de mar proveniente de Pochutla, Oax.

Parámetros	Resultados (mg/L)
SO ₄ ²⁻	2,000
Fosfatos totales (PO ₄)	0.10
Nitrógeno amoniacal (NH ₄)	0.28
Cl ⁻	18,066
Na	4,851
K	375
Ca	364
Mg	422
Fe	0.21
Conductividad	68.9 mMhos/cm

Realizado por: Laboratorio Químico, Universidad de Morelos.

La prueba de crecimiento celular de las cinco cepas seleccionadas (figura 4.14) fue buena debido a que la mayoría presentó un crecimiento importante, a excepción de la cepa 15, ya que esta proviene de un digestor anaerobio y las condiciones son diferentes de las demás cepas que provienen precisamente de sedimentos marinos. Las cuatro cepas que tuvieron crecimiento

fueron la 5, 7, 8 y 22. La cepa 22 que fue la que tuvo mejor crecimiento (0.69) en un menor tiempo, alcanzó la fase estacionaria después de 192 horas de incubación, mientras que las otras tres cepas lo hicieron después de 264 horas aproximadamente.

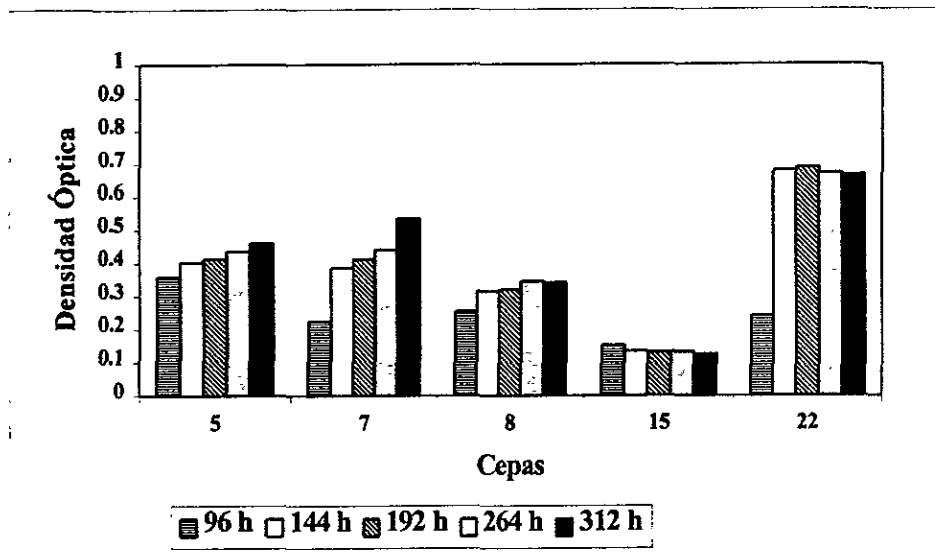


Figura 4.14. Crecimiento bacteriano de las cepas seleccionadas en medio de cultivo con agua de mar

Comparando estos resultados de crecimiento de las cinco cepas en este medio, con los resultados obtenidos con medio Postgate B, se observa que existe mejor crecimiento de las cepas 5, 7, 8 y 22 en medio preparado con agua de mar, mientras que para la cepa 15 el crecimiento celular es bajo en ambos medios. De esta prueba se seleccionó la cepa 22, por ser la que mejor crecimiento microbiano presentó, para la prueba de remoción de sulfatos.

En la prueba de remoción de sulfatos provenientes del medio con agua de mar con la cepa 22, los resultados indican una disminución de hasta el 50% en 11 días de proceso. Esta disminución de sulfatos coincide con el crecimiento microbiano de esta cepa, tal y como se muestra en la tabla 4.6 y figura 4.15. Sin embargo, comparando estos resultados de remoción con los obtenidos para esta misma cepa en la remoción de sulfatos del medio Postgate B, se observa que la remoción es mayor (79.6% en 7 días) al emplear este medio para un menor tiempo de proceso, surgiendo la inquietud de realizar esta prueba a nivel fermentador.

Tabla 4.6. Crecimiento celular de la cepa 22 y remoción de sulfatos en medio de cultivo con agua de mar

Tiempo (h)	Densidad Óptica (nm)	Remoción de sulfatos (%)
0	0.298	0
120	0.24	2.13
144	0.68	46.39
192	0.69	47.29
264	0.672	50.92

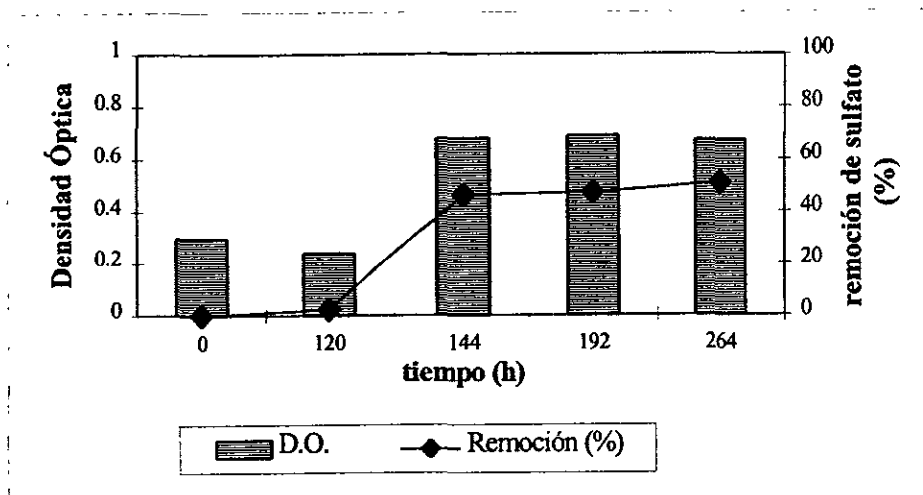


Figura 4.15. Crecimiento celular de la cepa 22 y remoción de sulfatos en medio de cultivo con agua de mar

4.3 Escalamiento a nivel matraz

4.3.1. Relación entre los Sólidos Suspendedos Volátiles y el crecimiento microbiano

De los resultados obtenidos de los análisis de SSV y crecimiento microbiano como densidad óptica, se realizó una curva de calibración (figura 4.16), la cual presenta una regresión lineal del 80%, lo cual no es un resultado aceptable para relacionar los valores de SSV y la DO.

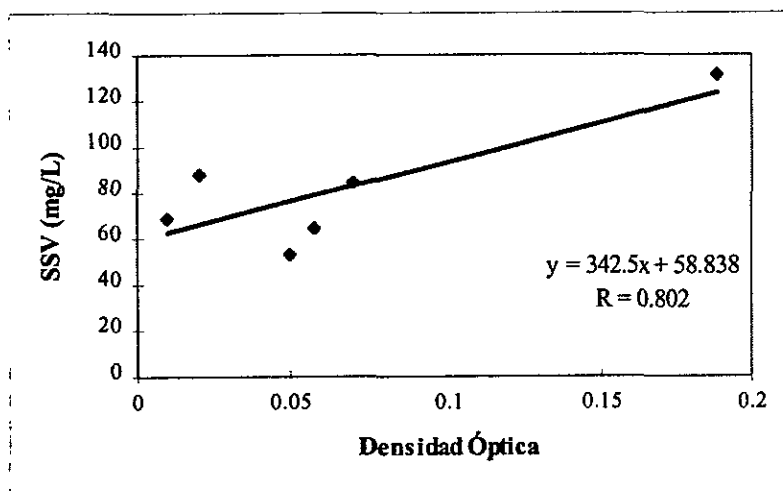


Figura 4.16. Relación entre los SSV y el crecimiento microbiano

4.3.2. Efecto del crecimiento microbiano en presencia de combustóleo

Los resultados de la medición de densidad óptica a las cinco cepas en presencia de combustóleo (figura 4.17), indican que las cepas 5, 7 y 22, alcanzan su máximo crecimiento en un tiempo de 192 horas en medio de cultivo ya sea con o sin sulfatos como aceptor de electrones y en presencia del combustóleo. Mientras, las cepas 8 y 15 no presentaron un marcado crecimiento. A partir de esta experiencia se pudo seleccionar las cepas con los resultados más importantes, de aquí que se optó por las cepas 5, 7 y 22, sin embargo la que mejores resultados había presentado fue la cepa 5 seguida de la 22 y la cepa 7; de esta forma se decidió primero probar con la cepa 5 a nivel fermentador.

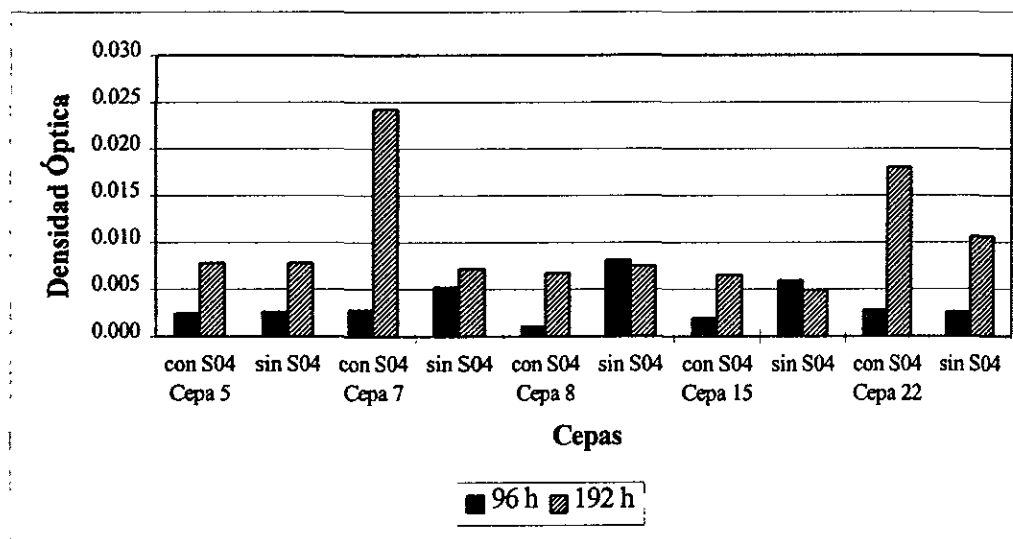


Figura 4.17. Efecto del combustóleo sobre el crecimiento bacteriano con las cepas seleccionadas en presencia o ausencia de sulfatos

4.4. Escalamiento al fermentador

4.4.1. Prueba preliminar con la cepa 5

De acuerdo a los datos obtenidos en la prueba de remoción de sulfatos provenientes del medio de cultivo utilizando la cepa 5, se puede observar que hay una gran variación en el crecimiento microbiano debido a que éste aumentó a su punto máximo a las primeras 19 horas de incubación, disminuyendo posteriormente, sin embargo este aumento del crecimiento bacteriano no corresponde a la menor concentración de sulfatos obtenida, ya que esta se logró hasta las 91 horas, logrando así una remoción menor a 2%.

Los resultados obtenidos indican que la cepa 5 no es idónea para el escalamiento del proceso a nivel fermentador. Por tal motivo se seleccionó la cepa 22 para realizar estas pruebas de escalamiento, ya que fue la segunda mejor cepa, de acuerdo a resultados de remoción de sulfatos en las pruebas anteriores.

4.4.2. Pruebas de crecimiento microbiano y remoción de sulfatos con la cepa 22

4.4.2.1. Prueba 1

El crecimiento bacteriano (figura 4.18) se presentó con una buena concentración de biomasa desde el quinto día, y continuando su crecimiento aún después de los siete días de proceso. Debido a estos resultados, los ensayos posteriores se realizaron a un tiempo de trabajo mínimo de siete días. Esta primera prueba se dejó trabajando hasta 192 horas, tiempo tomado con base en la percepción del gas sulfhídrico y tomando en cuenta el aumento en la concentración de sulfatos después de las 150 horas de proceso. El pH del proceso varió entre 6 y 8.

En la primera prueba de remoción de sulfatos provenientes del medio de cultivo Postgate B utilizando la cepa 22, se obtuvieron mejores resultados de disminución de sulfatos que en la prueba similar con la cepa 5, ya que antes de la primera semana de proceso ya se había alcanzado la máxima remoción (60.2 %). Desde el quinto y hasta el octavo día, los resultados de remoción de sulfatos oscilaron alrededor de una media del 55%, tal y como lo muestra la figura 4.18.

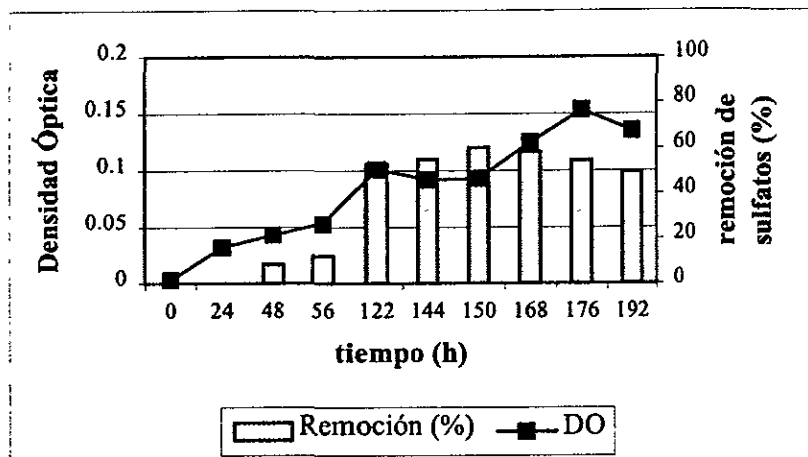


Figura 4.18. Remoción de sulfatos y crecimiento microbiano de la Prueba 1 con la cepa 22

4.4.2.2. Prueba 2

En la segunda prueba de remoción de sulfatos con la cepa 22, el pH del proceso se ajustó a 7 controlándolo durante el tiempo que tardó el mismo, adicionando NaOH 0.1 M en forma automática con la ayuda del controlador acoplado al fermentador. El inóculo se preparó en matraces con agitación durante 19 días. Este procedimiento de crecimiento microbiano en matraces requiere de mayor tiempo que el realizado en viales, por lo cual se adoptó el segundo para las pruebas posteriores. En la tabla 4.7 y figura 4.19 se muestra el desarrollo de los microorganismos de esta segunda prueba.

Tabla 4.7. Crecimiento bacteriano de la prueba 2 con la cepa 22

Tiempo (h)	Densidad Óptica (nm)
0	0.010
24	0.007
34	0.002
48	0.019
72	0.021
97	0.016
121	0.026
144	0.030

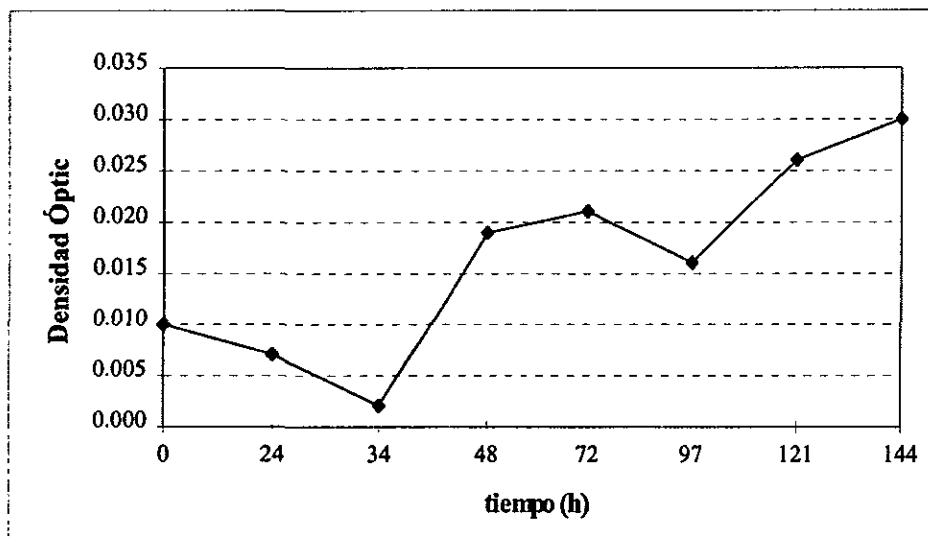


Figura 4.19. Crecimiento microbiano de la cepa 22 en la Prueba 2 de remoción de sulfatos a nivel fermentador

La cepa se inoculó al fermentador con una densidad óptica de 0.92. Al segundo día de operación, tal y como se observa en la figura 4.20, se llegó a la remoción de sulfatos máxima, al igual que la concentración de sulfhídrico, sin embargo se dejó operando el proceso por más tiempo (6 días), comprobando la disminución de la actividad sulfato-reductora.

La mayor remoción de sulfatos que se pudo lograr con esta prueba fue apenas del 10.0%. El crecimiento de la biomasa fue aproximadamente 3 veces menor que el crecimiento logrado con la cepa de la primera prueba en el mismo tiempo. Por lo anterior se puede decir que esta prueba resultó fallida, por lo que se optó por repetir la experiencia.

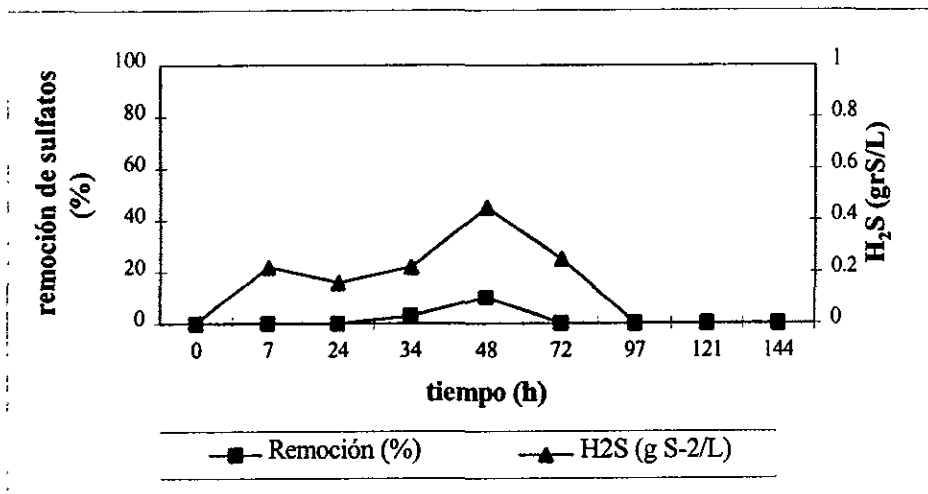


Figura 4.20. Remoción de sulfatos y producción de sulfhídrico de la Prueba 2 con la cepa 22

4.4.2.3. Prueba 3

La diferencia entre la prueba 3 y las pruebas 1 y 2, fue que el inóculo se hizo crecer en matraces sin agitación durante 16 días, tiempo suficiente para alcanzar una densidad óptica de 1.01. El pH del proceso se controló en un valor de 7 al igual que para la prueba 2.

En la prueba 3, se logró una remoción máxima de 10.7% cercana a la máxima obtenida en la prueba 2, pero hasta después de una semana de proceso (192 horas), sin embargo el proceso se dejó por más tiempo, aún sin que la remoción de sulfatos aumentara, tal y como se observa en la figura 4.21, donde a 198 horas la remoción de sulfatos se mantuvo en el punto máximo, así como la producción de sulfhídrico, el cual después de este tiempo disminuyó.

Cuando el proceso terminó (288 horas), se tomó una muestra de la biomasa del mismo para medir la concentración que pudiera existir de H₂S diluido, y el resultado fue que no se detectó este gas.

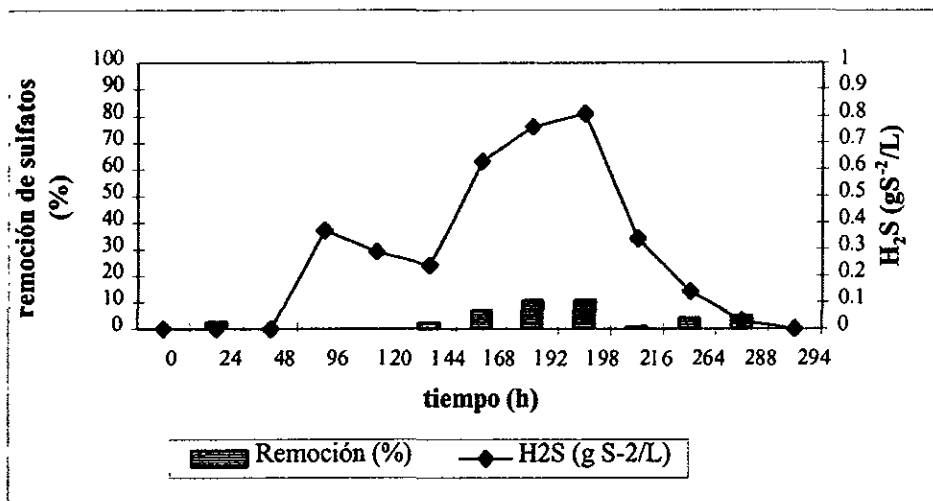


Figura 4.21. Remoción de sulfatos y producción de sulfhídrico de la Prueba 3 con cepa 22

Con las experiencias obtenidas de las tres pruebas se pudo hacer una adecuación de la metodología de remoción de azufre del combustóleo, es decir, tomar las condiciones idóneas de proceso (temperatura, tiempo, pH, agitación, toma y medición de sulfhídrico, toma de muestras y análisis) y llevarlas a la operación del proceso mismo de biodesulfuración del combustóleo

Temperatura:	35 °C
Tiempo:	2 semanas
pH:	7.0
Agitación:	1350 rpm
Toma de muestra del sulfhídrico:	Por inyección con nitrógeno

4.5. Biodesulfuración del combustóleo

4.5.1. Experiencia 1

La primera prueba de biodesulfuración llevada a cabo en el fermentador, sirvió como experiencia para las pruebas siguientes que se realizaron, ya que ésta sólo tuvo una duración de 7 días, debido a que se decidió probar si se obtenían buenos resultados en un menor tiempo. Al preparar las 4 emulsiones de un litro, se encontraron los valores de potencia mostrados en la figura 4.22. El consumo de energía promedio global fue de 8.5 watts, lo cual nos puede indicar la calidad de la emulsión. El peso del combustóleo total agregado para la formación de las emulsiones fue de 400 g. De aquí se tomaron 3150 g (aproximadamente 3150 mL).

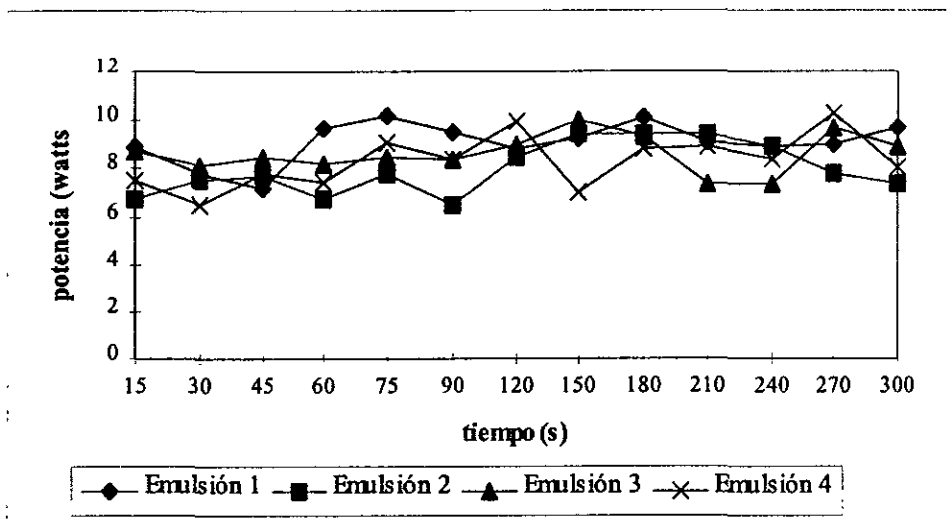


Figura 4.22. Consumo de energía en la formación de la emulsión de la experiencia 1 de biodesulfuración con combustóleo

El material celular, el cual se hizo crecer con 6 días de anticipación en medio Postgate B, logró 0.379 como densidad óptica.

La producción del ácido sulfhídrico (figura 4.23) disminuyó los dos primeros días debido, probablemente, a que las bacterias fueron consumiendo en primer lugar los sulfatos presentes (677.08 mg/L), hasta que se adaptaron al consumo del azufre del combustóleo, logrando su máxima producción a las 96 horas, después del cual la concentración del sulfhídrico nuevamente disminuye. La generación total del gas fue de 4.10 gS⁻²/L.

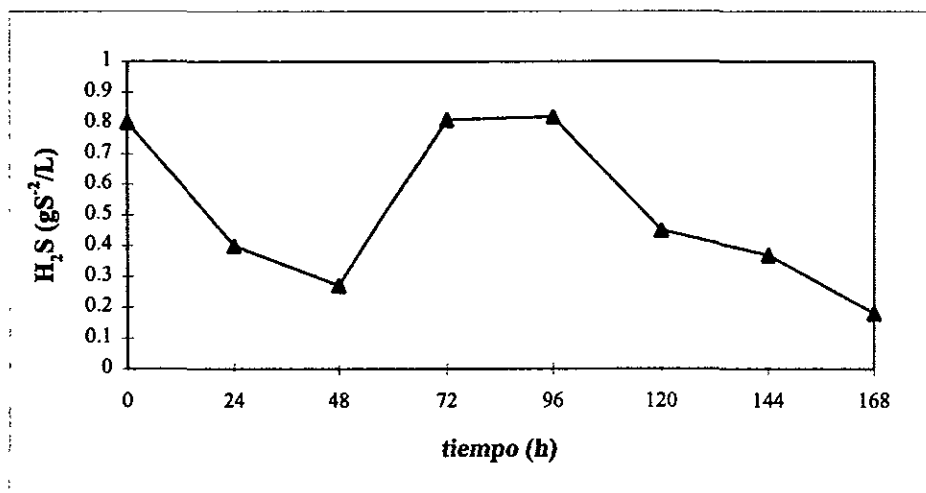


Figura 4.23. Concentración de sulfhídrico generado en la experiencia 1 de biodesulfuración del combustóleo

La primera prueba de remoción de azufre en combustóleo proporcionó resultados favorables como puede observarse en la tabla 4.8, logrando una disminución máxima del 17.7% en los 7 días que duró el proceso, lo que proporciona una velocidad de remoción de 0.7 % por día.

Tabla 4.8. Resultados de la experiencia 1 del proceso de biodesulfuración

Tiempo (h)	Azufre (% en peso)	Remoción de azufre (%)	Capacidad calorífica. (kcal/g)	Pérdida calorífica (%)	Humedad (% volumen)	Vanadio (ppm)	Níquel (ppm)
inicial	3.94	0	10.13	0	0.1	311	5.5
0	3.83	2.8	9.76	3.6	2.0	261	4.7
168	3.24	17.8	8.28	18.3	8.0	261	20.6

La pérdida calorífica del combustóleo fue del 18.3% debido a que al separar la emulsión, parte del combustóleo queda en la solución salina. La humedad que indica la cantidad de agua que aún queda en el combustóleo, fue de 8% en volumen. En cuanto a la concentración de los metales, el vanadio disminuyó en un 16%, mientras que el níquel en forma extraña aumentó en un 274%.

En cuanto a los resultados de la solución residual mostrados en la tabla 4.9, los valores de la conductividad indican que hubo un aumento en el contenido de sales durante el desarrollo del proceso, el cual fue de 55.2 mMhos/cm.

La cantidad de grasas y aceites disminuyó un 9.4%, lo cual significa que 27 mg/L se quedan retenidos en el combustóleo. La materia orgánica, medida como DQO, también disminuyó un 17.1%.

Tabla 4.9. Resultados de la muestra residual de la experiencia 1 del proceso de biodesulfuración

Tiempo (h)	Conductividad (m Mhos/cm)	Grasas y Aceites (mg/L)	DQO (mg/L)
0	55.2	286	39,462.2
168	59.3	259	32,714.6

4.5.2. Experiencia 2

Dado que se obtuvo una remoción de azufre del 17.7% en la primera prueba, se decidió ampliar el tiempo de proceso hasta dos semanas para la segunda prueba para observar si se obtenía una mejor remoción. Para realizarla se inoculó la cepa crecida previamente durante 7 días a 35 °C, el crecimiento alcanzado fue de 0.414 medido como densidad óptica. La concentración de sulfatos provenientes de la cepa antes de inocularla en el fermentador fue de 701.78 mg/L.

En la figura 4.24, se muestra la gráfica del consumo de energía durante la formación de las 4 emulsiones que se prepararon. El valor promedio total fue de 7.4 watts, menor que el de la primera prueba. El peso total de combustóleo agregado para la formación de las emulsiones fue de 405 g.

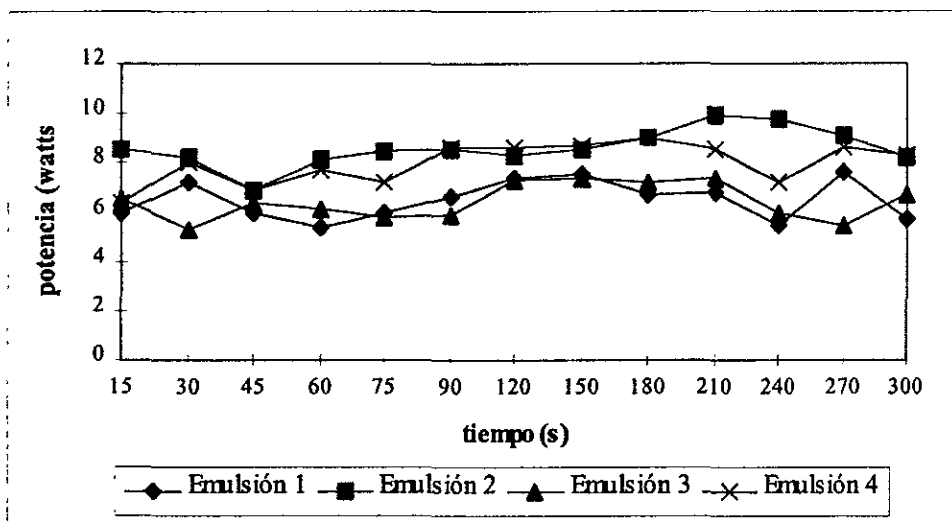


Figura 4.24. Consumo de energía en la formación de la emulsión de la experiencia 2 de biodesulfuración del combustóleo

Los resultados de la medición de sulfhídrico (figura 4.25) indican un comportamiento muy irregular debido a los altibajos en la producción del mismo, se generaron 3.31 gS²/L en la primera semana de proceso, mientras que en la segunda semana se generaron 2.30 gS²/L. La máxima concentración se obtuvo al onceavo día, sin embargo es notorio el valor de la concentración de este gas generado al inicio del proceso, el cual fue disminuyendo hasta el tercer día. La generación total fue de 6.14 gS²/L.

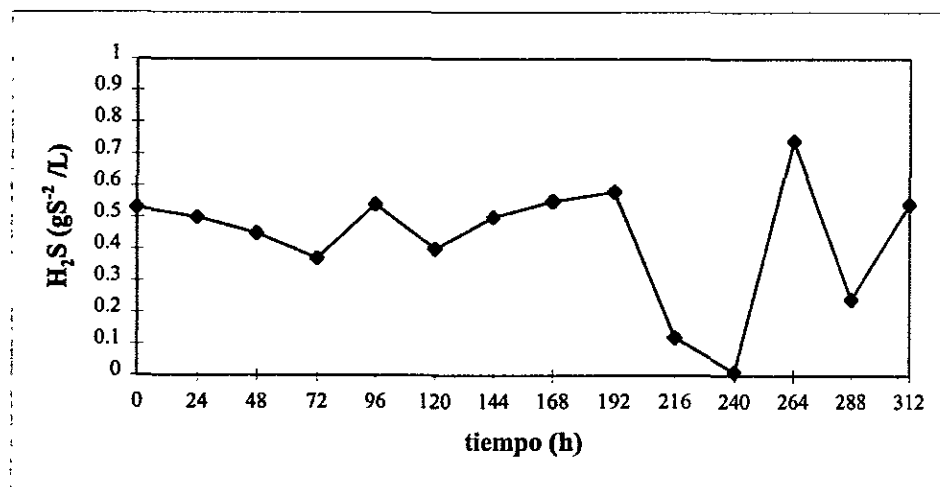


Figura 4.25. Concentración de sulfhídrico generado en la experiencia 2 de biodesulfuración de combustóleo

En cuanto a los resultados de la muestra de combustóleo presentados en la tabla 4.10, se observó que en la primer semana del proceso se obtuvo la mayor parte de remoción de azufre (casi el 6%), esto coincide con la mayor parte de sulfhídrico generado; la remoción de azufre total lograda fue de 8.7% en las dos semanas de proceso. La pérdida de la capacidad calorífica en esta prueba fue congruente con la remoción de azufre, ya que sólo se perdió el 9.6%. En cuanto a la humedad del subproducto, esta llegó a ser hasta de 27.4% en la primer semana de incubación. La concentración de vanadio aumentó en 81 mg/L, mientras que la del níquel aumentó 50.8 mg/L.

Tabla 4.10. Resultados de la muestra de combustóleo de la experiencia 2 de biodesulfuración

Tiempo (h)	Azufre (% en peso)	Remoción de azufre (%)	Capacidad calorífica. (kcal/g)	Pérdida calorífica (%)	Humedad (%) volumen)	Vanadio (ppm)	Níquel (ppm)
inicial	3.88	0	10.13	0	0.1	211	3.2
0	3.74	3.6	9.64	4.8		272	5.2
168	3.65	5.9	9.39	7.3	27.4	282	25.6
336	3.54	8.8	9.16	9.6	6.4	292	54

Los resultados de la muestra residual (tabla 4.11), indican que la conductividad eléctrica disminuyó un 8.6%.

Las grasas y aceites, al contrario de la experiencia 1, aumentaron en un 32.7% después de 2 semanas de proceso. La materia orgánica también aumentó un 25.7%.

Tabla 4.11. Resultados del agua residual de la experiencia 2 del proceso de biodesulfuración

Tiempo (h)	Conductividad (m Mhos/cm)	Grasas y Aceites (mg/L)	DQO (mg/L)
0	61.40	25.5	21317.78
168	60.60	169.0	25581.74
336	56.10	251.0	28682.10

4.5.3. Experiencia 3

Debido a que en la segunda prueba no se obtuvieron resultados favorables, probablemente por la preparación inadecuada de la emulsión, se optó por repetirla con las mismas condiciones que la primera.

En la tercera prueba de biodesulfuración del combustóleo, la cepa 22 inoculada, se hizo crecer previamente durante 12 días, alcanzando una densidad óptica de 0.422. Los sulfatos dieron un valor de 424 mg/L.

Los consumos de potencia que se obtuvieron en la preparación de las 4 emulsiones de esta prueba se presentan en la figura 4.26 El promedio de estos valores fue de 7.3 watts, exactamente igual que el de la segunda prueba. El peso del combustóleo total empleado para la formación de las emulsiones fue de 399 g.

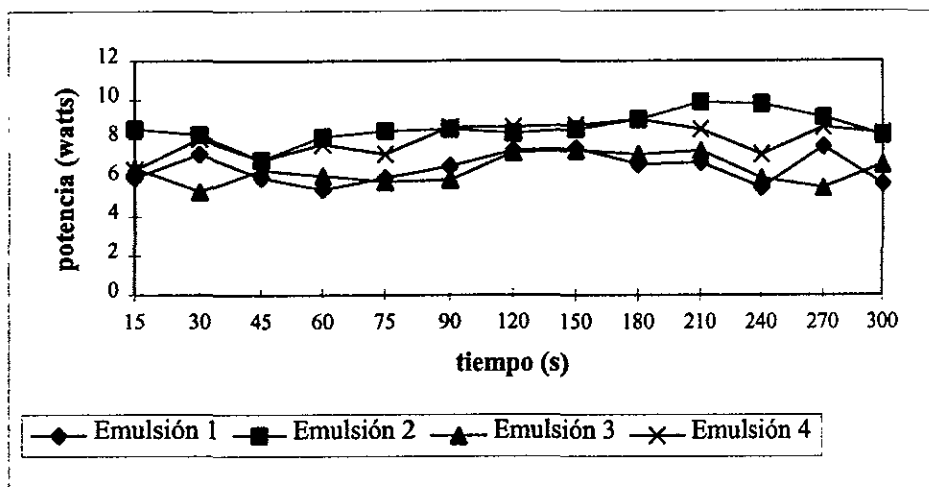


Figura 4.26 Consumo de energía en la formación de la emulsión de la experiencia 3 de biodesulfuración de combustóleo

La producción de ácido sulfhídrico presentada en la figura 4.27, se muestra un tanto irregular como en la segunda prueba, con un valor máximo de 1.1 g S²/L obtenido al tercer día y un mínimo de 0.14 g S²/L en el último día de proceso. La concentración total de sulfhídrico fue de 3.91 g S²/L.

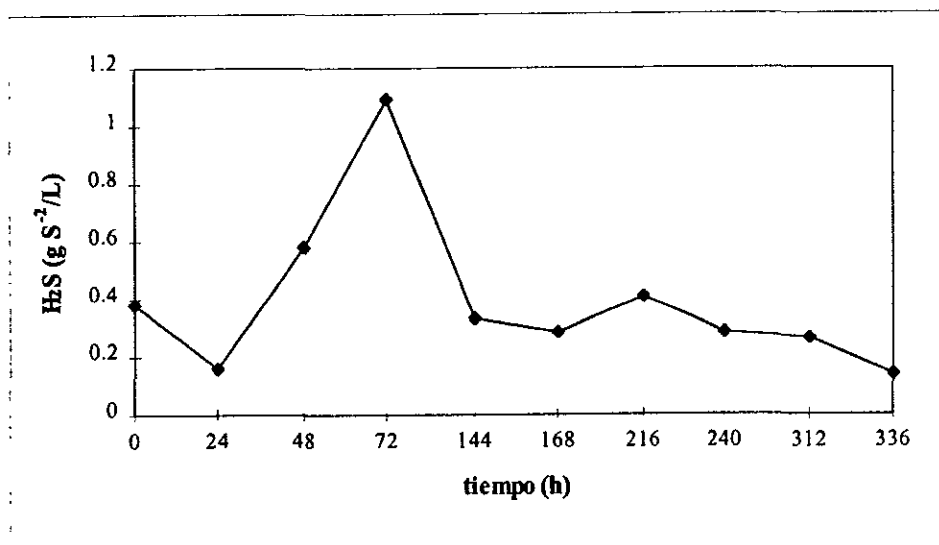


Figura 4.27. Concentración de sulfhídrico generado en la experiencia 3 de biodesulfuración del combustóleo

En la tabla 4.12, se presentan los valores para el combustóleo recuperado del rompimiento de la emulsión. En cuanto a la remoción de azufre, durante esta prueba se llegó a remover hasta un 25.1%, más que en las pruebas anteriores. Sin embargo es notorio que a la primer semana se logró sólo un 11.3% comparado con un 17.7% alcanzado en la primera prueba en el mismo tiempo de biodesulfuración.

La pérdida de la capacidad calorífica (9.2%) fue similar a la de la prueba anterior, mientras que las concentraciones de vanadio y níquel disminuyeron en 2.6 y 1.0% respectivamente.

Tabla 4.12. Resultados de la muestra de combustóleo de la experiencia 3 del proceso de biodesulfuración

Tiempo (h)	Azufre (% en peso)	Remoción de azufre (%)	Capacidad calorífica (kcal/g)	Pérdida calorífica (%)	Humedad (% volumen)	Vanadio (ppm)	Níquel (ppm)
inicial	3.98	0	10.13	0	0.1	308	49.3
0	3.85	3.3	9.94	1.9	2.0	305	51.2
168	3.53	11.3	8.83	12.8	16.0	280	44.3
336	2.98	25.1	9.20	9.2	9.2	300	48.8

En cuanto a los resultados de las aguas residuales del proceso (tabla 4.13), y al igual que en la experiencia 1, hubo un aumento en la concentración de sales del proceso indicados por los valores de la conductividad finales los cuales fueron de 62.9 mMhos/cm.

En el caso de las grasas y aceites, el comportamiento fue irregular, debido a que la primer semana disminuyó un 93%, para luego aumentar en la segunda semana a 186 mg/L. La concentración de materia orgánica se mantuvo disminuyendo hasta un 45% después de dos semanas de proceso.

Tabla 4.13. Resultados del agua residual de la experiencia 3 del proceso de biodesulfuración

Tiempo (h)	Conductividad (m Mhos/cm)	Grasas y Aceites (mg/L)	DQO (mg/L)
0	59.80	763.0	38,924.1
168	62.50	53.5	34,572.8
336	62.90	186.0	21,395.0

4.5.4. Experiencia 4 (Medio de cultivo con agua de mar)

Debido a los buenos resultados de crecimiento celular encontrados en medio de cultivo preparado con agua de mar, se decidió realizar una cuarta prueba utilizando este tipo de medio y las mismas condiciones de la prueba anterior.

La densidad óptica del inóculo crecido previamente durante 11 días fue de 0.4. Asimismo la cantidad de sulfatos fue de 1632 mg/L.

Los valores del consumo de potencia vs tiempo obtenidos en la preparación de las 4 emulsiones se muestran en la figura 4.28, el promedio global fue de 8.7 watts, que fue el valor más alto de las cuatro pruebas realizadas, lo que indica que esta pudo ser la mejor emulsión formada. El peso del combustóleo total empleado para la formación de la emulsión fue de 383 g.

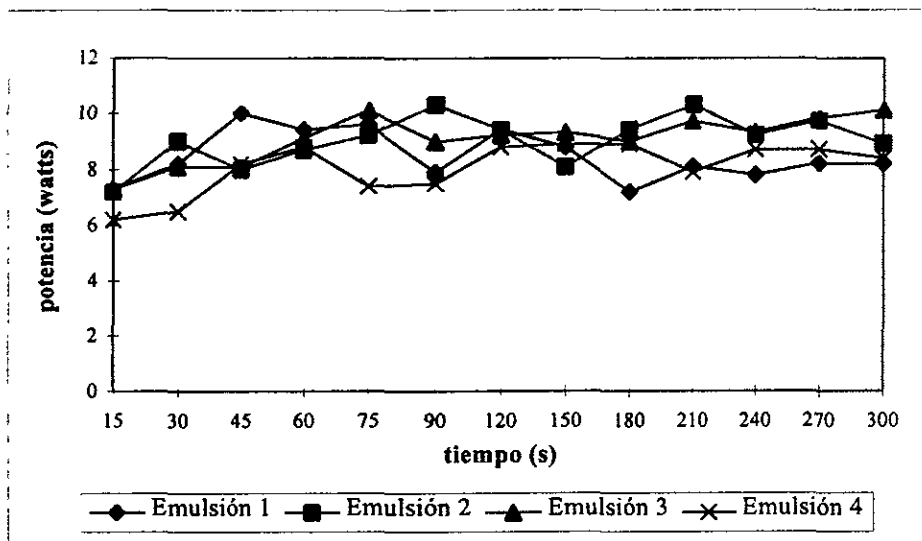


Figura 4.28. Consumo de energía en la formación de la emulsión de la experiencia 4 de biodesulfuración de combustóleo

En la figura 4.29 se muestra la cinética de producción del ácido sulfhídrico. La concentración acumulada total de gas alcanzada en el proceso después de 8 días fue de 6.62 g S²/L. La máxima concentración se obtuvo al tercer día, disminuyendo posteriormente hasta terminar al noveno día indicando tal vez que la función de las bacterias de transformar el azufre del combustóleo había cesado o llegado a su punto mínimo; debido a esto es que se decidió dar por terminada esta prueba al décimo día, ya que no se siguió presentando indicios de sulfhídrico.

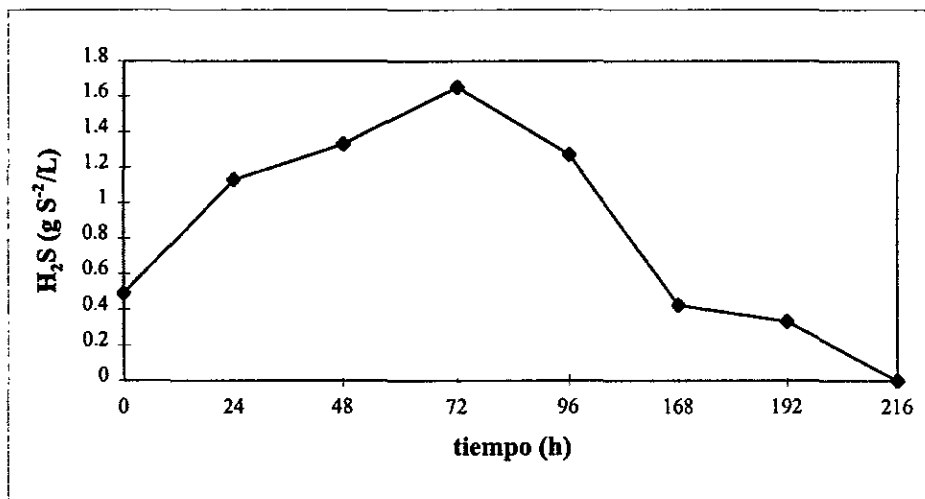


Figura 4.29. Concentración de sulfhídrico generado en la experiencia 4 de biodesulfuración de combustóleo

En la tabla 4.14, se presentan los resultados del combustóleo antes y después del proceso, como se puede observar, la mayor remoción de azufre obtenida fue de 39.8%, que fue el valor más alto logrado de las cuatro pruebas realizadas. Esta remoción está relacionada directamente con la mayor cantidad de gas sulfhídrico generada. Sin embargo en esta prueba se presentó la mayor cantidad de poder calorífico perdido que fue de 25.8%. En cuanto a los resultados del vanadio y el níquel, se observó que el primero disminuyó un 19.4% mientras que el segundo aumentó 15%.

Tabla 4.14. Resultados de la muestra de combustóleo de la experiencia 4 del proceso de biodesulfuración (con agua de mar)

Tiempo (h)	Azufre (% en peso)	Remoción de azufre (%)	Capacidad calorífica (kcal/g)	Pérdida calorífica (%)	Humedad (% volumen)	Vanadio (ppm)	Níquel (ppm)
inicial	3.99	0	10.126	0	0.1	294.2	34.1
0	3.89	2.5	9.964	1.6	1.6	311.8	51.2
168	3.05	23.5	7.633	24.6	30.0	242.7	39.4
336	2.40	39.8	7.514	25.8	32.8	237.2	39.2

En cuanto a los resultados del agua residual (tabla 4.14), se puede observar que la conductividad disminuyó de 76.2 a 70.6 mMHos/cm en tanto que la carga orgánica y las grasas y aceites aumentaron casi 70 g/L y más de 240 mg/L respectivamente.

Las grasas y aceites aumentaron casi cuatro veces su valor después de una semana, mientras que la DQO aumentó 1.5 veces su valor.

Tabla 4.15. Resultados del agua residual del proceso de biodesulfuración (con agua de mar)

Tiempo (h)	Conductividad (m MHos/cm)	Grasas y Aceites (mg/L)	DQO (mg/L)
0	76.20	63.5	41753.9
168	70.60	241.5	69929.0

4.5.5. Resumen de las cuatro pruebas de biodesulfuración

La comparación de los resultados más sobresalientes para las cuatro pruebas de biodesulfuración se presenta en la figura 4.30. Como se puede observar, las energías consumidas en la preparación de las emulsiones tuvo un rango de 7.36 a 8.65 watts, mientras que la remoción de azufre osciló entre 8.7 y 39.8% aunque a diferentes tiempos de proceso, ya que la primera duró 168 horas, la segunda y tercera 336 horas y la cuarta 216 horas.

Finalmente, se puede decir que es posible remover hasta casi un 40% de azufre como azufre total de un combustóleo con contenido inicial de 4%, realizándolo en un tiempo mayor a 200 horas.

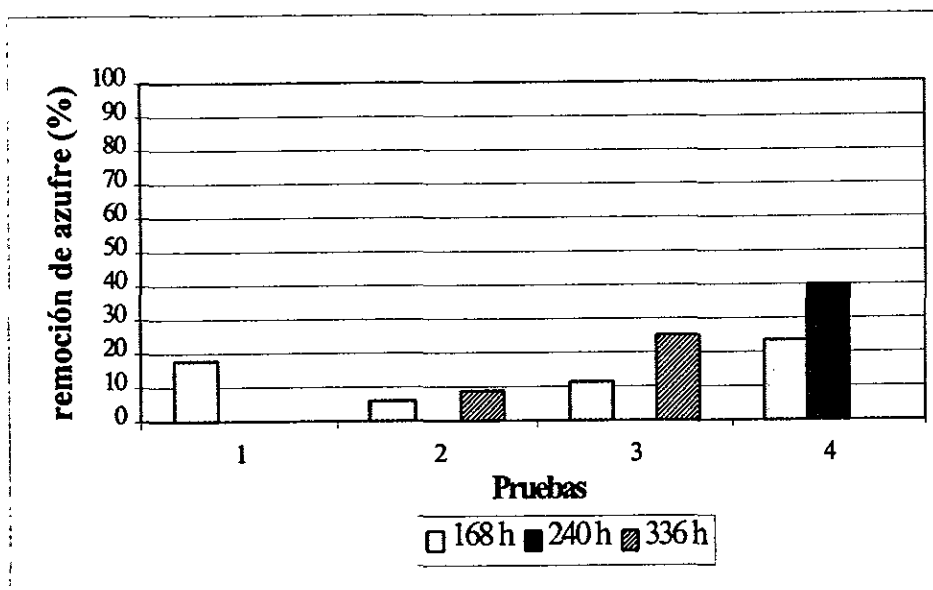


Figura 4.30. Comparación de remoción de azufre con las 4 pruebas de biodesulfuración

5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

5.1. CONCLUSIONES

- La biodesulfuración del combustóleo por bacterias sulfato-reductoras, representa una alternativa viable ante la hidrodeshulfuración catalítica, ya que reduciría el costo por consumo de energía, sin embargo, este estudio es sólo una etapa inicial de una cadena que tendría que desarrollarse para llegar a un grado de escalamiento mayor en el que se realizará en el ámbito industrial.
- La actividad sulfato reductora con las cepas bacterianas resultó ser mejor a pH 7 que a pH 5 y pH 8. Las mejores actividades específicas, las cuales involucran el crecimiento de las bacterias, resultaron ser mejor a un pH de 8. El pH original de la biomasa es de un valor de 7, el cual no presentó cambios significativos durante el desarrollo de los microorganismos.
- La temperatura de proceso para la remoción de sulfatos presentó mejores resultados a 35 °C que a 45 °C y 28 °C.
- La concentración de sustrato con la que se adaptan más rápido las bacterias fue con 2.17 gSO₄/L comparado con las concentraciones 4.52, 8.34 y 16.06 gSO₄/L; ya que el intervalo de remoción de sulfatos logrado con las tres últimas concentraciones fue de 28 a 52.6%, mientras que con la mínima concentración se logró una remoción de sulfatos entre 48 y 92%. Relacionando estos resultados como % en peso de azufre, se tiene que la mayor remoción de azufre fue de 0.72 a 0.06% en peso de azufre.
- Las cepas que mejores resultados de crecimiento microbiano y remoción de sulfatos en el menor tiempo presentaron, fueron la: 5, 7, 8, 15 y 22, de éstas, la seleccionada para las pruebas de biodesulfuración debido a su adaptación al proceso, fue la cepa 22 proveniente de la zona petrolera de Oaxaca.
- En resumen, los parámetros tomados en cuenta para el escalamiento del proceso al fermentador fueron los siguientes: pH de 7, temperatura de proceso 35 °C, concentración de sulfatos como sustrato para la actividad sulfato-reductora fue de 2.17 g/L; el desarrollo de las bacterias para ser inoculadas fue mejor a pH 8 y 45 °C.
- Se logró adecuar una emulsión combustóleo-agua en una proporción de 1:10 para las pruebas a nivel fermentador, empleando el proceso de la esterilización para la ruptura de la misma.
- Con el proceso de biodesulfuración, se logró una remoción de azufre del combustóleo en un intervalo de 8.8 a 38.9% disminuyendo la concentración de 3.99 a 2.4 % en peso para la más alta remoción en dos semanas de operación, sin embargo se llegó a perder hasta un 25.8% del poder calorífico. La diferencia en la remoción de azufre de las cuatro experiencias realizadas puede deberse en cierta medida a la selectividad del metabolismo microbiano por los compuestos orgánicos de azufre.

- El medio de cultivo preparado con agua de mar en lugar del medio Postgate B, resultó ser una buena propuesta para reducir los costos por uso de reactivos y agua de dilución.
- El ácido sulfhídrico fue capaz de detectarse por medio del electrodo de sulfuro así como por el olor característico que presenta; este es un indicativo de la actividad sulfato-reductora de las bacterias con las que se trabajó.
- Este trabajo contribuye a las expectativas de mejoramiento ambiental por los problemas generados por las emisiones de SO₂, como un mejor planteamiento al de la cada vez más estricta normatividad.
- El grado de desulfuración logrado en este trabajo es congruente con el obtenido por Kim B. H. *et al.*, 1994 con quienes se tuvo similares condiciones de operación:

Origen	Bacterias	Azufre total (%)		Grado de desulfuración (%)
		Inicial	Final	
Kuwait	<i>D. desulfuricans</i>	2.07	0.85	58.9
Basrah	<i>D. desulfuricans</i>	3.72	3.00	19.4
México (II.)	Cultivo mixto	3.99	2.4	39.8

La mayoría de los trabajos que se han realizado utilizando un sistema aerobio han reflejado mejores resultados de remoción de azufre que los sistemas anaerobios como lo muestra la siguiente tabla, a excepción de Byung *et al.*, 1996, esto puede ser probablemente a la dificultad de mantener este sistema para el desarrollo de los microorganismos.

Referencia	Sistema	Combustible	Bacteria	Azufre inicial	Azufre final	Remoción (%)
Tae sung, 1990	Anaerobio	Crudo	<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	3.0	2.78	7.0
Stoner <i>et al.</i> , 1993	Anaerobio	Carbón	<i>Desulfovibrio africanus</i>	-	-	12.0
Tae Sung, 1990	Anaerobio	Crudo	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	3.0	2.36	21.0
Steven, 1994	Aerobio	Destilados medios	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	0.75	0.50	33.0
Julia <i>et al.</i> , 1993	Anaerobio	DBT	-	-	-	40.0
Afferden, 1993	Aerobio	DBT	<i>Brevibacterium sp</i>	1.2	0.7	41.6
Kilbane y K. 1992	Aerobio	Carbón	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	-	-	41.8
Monticello, 1993	Aerobio	Destilados medios	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	0.25	0.05	80.0
Ohmura y Saiki, 1994	Aerobio	Carbón	<i>Thiobacillus ferroxidans</i>	13.2	1.8	86.0
Byung <i>et al.</i> , 1996	Anaerobio	DBT	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	-	-	96.0

5.2. RECOMENDACIONES

- ⇒ Es necesario mejorar la técnica de detección del gas sulfhídrico, así como adecuar un tratamiento para su eliminación.
- ⇒ Se recomienda llevar a cabo el desarrollo de las bacterias para su crecimiento a un pH de 8 y un pH de operación de 7.
- ⇒ Dado que se trabajó con cultivos mixtos y se sabe que están presentes las bacterias sulfato-reductoras, es importante que se realice una identificación del género y especie de las bacterias que lo conforman.
- ⇒ La composición del azufre presente en el combustóleo y su remoción sólo se pudo conocer como total, por lo que sería interesante identificar los tipos de compuestos de azufre removidos.
- ⇒ En el proceso de biodesulfuración del combustóleo hubo pérdida calorífica del mismo, por lo que se recomienda optimizar el sistema de rompimiento de la emulsión mediante pruebas en el laboratorio.
- ⇒ Debe diseñarse un sistema de tratamiento para las aguas residuales que se generan del proceso de biodesulfuración que ya no puedan ser regeneradas al mismo.
- ⇒ El problema de la generación excesiva de SO_2 en la quema del combustóleo para generación de energía debe resolverse lo antes posible antes de que se opte por el uso de otros combustibles alternos con una buena relación costo/energía o se siga importando más combustóleo del que se importa como sucedió en 1994 (DGAPA, UNAM 2° Informe anual).

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- APHA, AWWA, WPCF. (1995) "Standar Methods for the examination of Water and Wastewater" 1989, pp. 2-85.
- Aragón P., Romero J. Y Jiménez B. (1996) "Desulfuración del combustóleo mexicano por vía biológica", X Congreso Nacional de Ingeniería Sanitaria y Ambiental, disco 4, archivo XCNIS148, Toluca, Edo. De México, Febrero de 1996.
- Byung H. K., Hae. Y. K., Tae S. K., Doo H. P. (1995) "Selectivity of desulfurization activity of *Desulfovibrio desulfuricans* M6 on different petroleum products", Fuel Processing Technology, 43, 87-94, Elsevier Science Publishers.
- CFE. (1990), Comisión Federal de Electricidad, "Precios internos y externos de referencia de los principales energéticos", 5a edición: período, 1971-1990, Subdirección de Programación, Gerencia de Estudios Económicos, México.
- DDF, Gob. Edo. Mex., SEMARNAP y SSA. (1996), Departamento del Distrito Federal, Gobierno del Estado de México, Secretaria de Medio Ambiente, Recursos Naturales y Pesca y Secretaria de Salud, "Programa para mejorar la calidad del aire en el Valle de México 1995-2000", ISBN, México, D.F. 244 p.
- Dilling W. y Cypionka H. (1990) "Aerobic respiration in sulfate-reducing bacteria". FEMS Microbiol Lett. 71:123-128.
- Eckart V., Koehler M. y Hicke W. (1986), "Microbial desulfurization of petroleum and heavy petroleum fractions. 5 Anaerobic desulfurization of Romashkino petroleum" Zbl. Mikrobiol. 141: 291-300.
- Espinoza G., Peña G. y Huerta E. (1992), "Evaluación de la contaminación ambiental en centrales termoeléctricas de CFE", IIE (Reporte final, módulos 4.1.1 y 4.1.4).
- Espinoza G., Peña G. y Huerta E. (1996), "Grado de conversión de SO₂ en SO₃ y emisiones de SO_x en generadores de vapor" Boletín IIE, Enero/Febrero de 1996.
- Finnerty W., Shockey K. y Attaway H. (1992), "Microbial desulfurization and denitrogenation of hydrocarbons", Microbial enhanced oil recovery, p. 83-91.
- Gaudy A. y Gaudy E. (1981), "Microbiology for Environmental Scientists and Engineers"; Edit. Mc. Graw-Hill; 1st Printing, pp. 226-228.
- Hardy J. y Hamilton W. (1981), "The oxygen tolerance of sulfate-reducing bacteria isolated from north sea waters" Current Microbiology, 6: 259-262.
- Hartdegan F., Coburn J. y Roberts R. (1984), "Microbial desulfurization of petroleum" Chem. Eng. Process. 80: 63-67.
- Hastings K. y Van Driesen (1988), "Hidrodeshulfuración de fracciones de aceite crudo de petróleo y productos de petróleo" En: Tecnología del petróleo. D.M. Considine (Ed) Publicaciones Marcombo, México.
- Hata Y., Kadota H., Miyoshi H. y Kimata M. (1964), "Microbial production of sulfides in polluted coastal and estuarine regions" In Pearson E.A. (ed) Advances in Water Pollution Research, 3rd Edn. pp. 287-295. Pergamon Press, Oxford.
- INE (1994), "Programa Regional de Administración de la Calidad del Aire en Zonas Prioritarias", Instituto Nacional de Ecología.

- Julia De Fátima, Leonardo S., Gaetano L. y Pier G. (1996), "Dibenzothiophene Biodegradation by a *Pseudomonas sp.* in Poorly Degradable Organic Solvents", Process Biochemistry, Vol. 31, No. 7, pp. 711-717, Elsevier Science Ltd.
- Kayser K., Bielaga B, Jackowski K, Odusan O. y Kilbane J. (1993), "Utilization of organosulphur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8", J. G. Microbiology, 139:3123-3129.
- Kilbane J. y Jackowski K. (1992), "Biodesulfurization of Water Soluble Coal-Derived Material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8" Biotechnology and Bioengineering, vol. 40, pp. 107-114.
- Kim H., Tae S. y Byung H. (1990), "Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenil and hydrogen sulfide" Biotechnology Letters, vol. 12 No. 10, 761-764.
- Klaus H. y Mieczyslaw M. (1994), "Composition and analysis of heavy petroleum fractions"; edit. Dekker, 1st Edn., New York, pp. 3, 416-417.
- Kurita S., Endo T., Nokamura H., Yagi T. y Tamiya N. (1971), "Descomposition of some organic sulfur compounds in petroleum by anaerobic bacteria" J. Gen. Appl. Microbiol. 17: 185-198.
- Le Gall J. y Xavier A. (1996), "Anaerobes Response to Oxygen: The Sulfate-reducing Bacteria"; Anaerobe 2: 1-9.
- Levy A. y Meryman E. (1963), "Sulfur Chemistry and its role in corrosion and deposits", J. Of Energy for Power, (ASME No. 62-WA-124) pp. 229-234.
- Medrano V. (1995), "Gasificación de residuales de petróleo integrado a una refinería", Tesis de M. en Ingeniería E., DEPFI-UNAM, junio, México, D.F.
- Midgley D. Y Torrance K. (1991), Potenciometric Water Analisis, 2ª edición, John Wiley & sons.
- Monticello D. (1992), "Continuous process for biocatalytic desulfurization of sulfur-bearing heterocyclic moleculs", PCT/US92/02856. Patente Norteamericana.
- Monticello D. (1993), "Biocatalytic Desulfurization of Petroleum and Middle Distillates", Environmental Progress, vol. 12, No.1, february.
- Monticello D. y Finnerty W. (1985), "Microbial Desulfurization of Fossil Fueles", Ann. Rev. Microbiol. 39, 371-389.
- Morales R. (1993), "Desarrollo de una metodología para análisis de combustóleo", Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana, pg. 33-35.
- Novozhilova M. y Berezina F. (1968), "character of the distribution of sulfate-reducing and sulfur bacteria in the sediments of lake Balkhash" Mikrobiologiya, 37: 534-539.
- O'Brien R. y Morris J. (1971), "Oxigen and the growth and Metabolism of *Clostridium acetobutylicum*" J.Gen. Microbiol, 68: 307-318.
- Ohmura N. y Saiki H. (1994), "Desulfurization of coal by Microbiol column flotation" Biotechnology and Bioengineering, vol. 44, pp. 125-131.
- ONU, OMS y OPS (1982), " Criterios de Salud Ambiental No. 8; óxidos de Azufre y Partículas en Suspensión", Publicación científica No. 424.

- Pfenning N. y Finnerty W. (1981), "Ecology and physiology of some anaerobic bacteria from the microbial sulfur cycle" In: Bothe H. trebst A (eds), *Biology of inorganic nitrogen and sulfur*. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp. 169-177.
- Postgate I. (1984), "The Sulphate-reducing bacteria, 2nd ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- Quadri G. y Sanchez I. (1994), "La ciudad de México y la contaminación atmosférica", Edit. LIMUSA, México, D.F., 316 p.
- Quintero R. (1993), "Ingeniería Bioquímica (Teoría y aplicaciones), De. Alhambra Mexicana.
- Secretaria de Energía, Minas e Industria Paraestatal (1993), "Balance Nacional de Energía 1993". México.
- Speight G. (1991), "The chemistry and Technology of Petroleum", Western Research Institute, second edition, U.S.A.
- Tae S., Hae Y. y Byung H. (1990), "Petroleum Desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 using electrochemically supplied reducing equivalent", *Biotechnology Letters*, vol, 12, No, 10, 757-760.
- W.B. y DDF. (1990), Banco Mundial y Departamento del Distrito Federal, Short term program, "Air Pollutants Emissions Inventory for México City Metropolitan Area", inédito, México, D.F.
- Widdel F. y Bak F. (1991), "Gram-Negative Mesophilic Sulfate-Reducing Bacteria", Cap. 183., *The Prokaryotes.*, volume IV, second Edition, pp. 3356-57.
- Zobell C. (1953), U.S. Patent 2,64,564.

APÉNDICE A

A.1. PROPIEDADES DE LOS COMBUSTIBLES LÍQUIDOS

Densidad relativa. La densidad relativa de un combustible derivado del petróleo es la relación del peso de un volumen determinado del producto a 15 °C y el peso de un volumen igual de agua destilada a la misma temperatura, ambos pesos corregidos para tomar en cuenta la flotabilidad del aire. La relación entre la escala de densidad API (American Petroleum Institute) y la densidad relativa está dada por:

$$^{\circ}\text{API} = \frac{1415}{\frac{60}{\rho_{\text{rel } 60}} \text{ } ^{\circ}\text{F}} - 131.5 \quad (\text{A.1})$$

Viscosidad cinemática La viscosidad cinemática, ν es la viscosidad dinámica dividida entre la densidad, o sea $\nu = \mu/\rho$. La unidad en el sistema cgs es el stoke. La unidad acostumbrada es el centistoke. El valor aproximado en stokes de la viscosidad cinemática puede obtenerse mediante las siguientes ecuaciones, donde t es el tiempo de fusión en segundos.

$$\text{Saybolt Universal, cuando: } 32 < t < 100 = 0.00226 t - 1.95 \div t$$

$$\text{Saybolt Universal, cuando: } t > 100 = 0.00220 t - 1.35 \div t$$

$$\text{Saybolt furol, cuando: } 25 < t < 100 = 0.00224 t - 1.84 \div t$$

$$\text{Saybolt furol, cuando: } t > 40 = 0.00216 t - 0.60 \div t$$

Índice de cetano. El índice de cetano de un combustible es el porcentaje de volumen de cetano normal que hay en una mezcla de cetano y α -metal naftaleno, la cual iguala al combustible en calidad de ignición cuando se comparan en un motor Diesel, en condiciones específicas. La escala de índice de cetano va de 0 a 100 para combustibles equivalentes en calidad de ignición al α -metil naftaleno y al cetano, respectivamente. Para pruebas de rutina, combustibles de referencia secundaria con índices de cetano de aproximadamente 25 y 74 se mezclan en cualquier proporción elegida.

Fluidez crítica. Indica la temperatura mínima a la que un combustible puede ser trasladado y por tanto sirve de base para el cálculo de aislamiento y calentamiento de depósitos y tuberías en las zonas que lo requieran de acuerdo con las condiciones atmosféricas previsibles. Normalmente, el punto de fluidez está por lo menos 9 o 12 °C debajo de la temperatura de funcionamiento mínima prevista.

Punto de enturbiamiento. El punto de enturbiamiento de anilina es una medida de la parafinicidad de un combustible; un valor alto indica que se trata de un aceite parafínico de destilación directa mientras que uno bajo, que se trata de un aceite aromático, nafténico o altamente desintegrado.

Punto de combustión. Es la temperatura más baja a la cual un combustible se enciende y arde por lo menos 5 segundos en condiciones de prueba específicas.

Punto de humo. La tendencia a producir humo de un combustible es indicada por el punto de humo, que es la máxima altura que alcanza un tipo específico de flama (en una lámpara de mecha con características específicas) sin emitir humo visible.

Contenido en cenizas. El contenido en cenizas es el residuo de la combustión del producto. En las cenizas se encuentran presentes los sedimentos minerales y los óxidos de jabones metálicos solubles en el combustible o en las gotas de agua que los pueden arrastrar y contener en emulsión o suspensión.

APÉNDICE B

B.1. TECNICAS ANALÍTICAS

B.1.1. DETERMINACIÓN DE SULFATOS

En este análisis ocurre una precipitación en medio ácido como sulfato de bario (BaSO_4) por la adición de cloruro de bario (BaCl_2). Esta medición de sulfatos se realizó por el método gravimétrico (APHA, 1995), para lo cual se requiere del siguiente material, reactivos y equipo

1. Material, reactivos y equipo

Material

Matraz Erlenmeyer de 250 mL
 Probeta graduada de 100 mL
 Vaso de precipitado de 50 mL
 Papel filtro Whatman GFA 90 mm.
 Papel indicador de pH Whatman

Reactivos

Cloruro de bario (BaCl_2)
 Ácido clorhídrico (HCl al 10%)

Equipo

Parrilla de calentamiento
 Estufa de calentamiento
 Balanza analítica
 Desecador

2. Procedimiento

La precipitación del cloruro de bario se efectúa a temperatura cercana a la de ebullición y después de un período de digestión el precipitado se filtra, se lava con agua destilada hasta que esté exento de cloruros, se seca (a 105 °C) y se pesa como BaSO_4 , la cantidad de sulfatos se obtiene de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$\text{mgSO}_4^{-2} = \frac{\text{mgBaSO}_4 \times 411.6}{\text{mL muestra}} \quad (\text{B.1})$$

La remoción de sulfatos se obtiene de la diferencia entre los sulfatos obtenidos inicialmente y los sulfatos medidos después de un período de tiempo mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ remoción} = \frac{(\text{mg } SO_4^{-2} \text{ inicial}) - (\text{mg } SO_4^{-2} \text{ final})}{(\text{mg } SO_4^{-2} \text{ inicial})} \times 100 \quad (\text{B.2})$$

B.1.2. MEDICIÓN DEL ÁCIDO SULFÚRICO

La medición del ácido sulfhídrico generado durante el proceso de remoción de azufre en forma de sulfatos y orgánico, se realizó a través de dos métodos, el método de la titulación y el método directo con el electrodo de azufre.

A. Método Iodométrico

Para la medición del H_2S diluido en la solución acuosa, se empleó el método Iodométrico, el cual representa una titulación donde se lleva a cabo la reacción entre el yodo y el sulfuro en una solución ácida, oxidándolo a azufre. El material y reactivos empleados son los siguientes:

1. Material y reactivos

Material

Matraz Erlenmeyer de 250 mL
 Bureta de 50 mL
 Pipetas graduadas de 1,5 y 10 mL
 Pipeta volumétrica de 25 mL
 Pipetero para esterilización

Reactivos

Tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3 \cdot 5H_2O$)
 Hidróxido de sodio (NaOH 6 N)
 Yodo
 Almidón
 Ácido clorhídrico (HCl 6 N)
 Yoduro de potasio (KI)

2. Procedimiento

Primero se prepara la solución estándar de yodo 0.0025 N. Se disuelve 20 a 25 g de KI en un litro de agua destilada y 3.2 g de yodo. Después de que el yodo se ha disuelto, se diluye a 1000 mL y se valora con una solución de tiosulfato de sodio ($Na_2S_2O_3$), usando una solución de almidón como indicador.

La solución de tiosulfato de sodio se prepara disolviendo 6.205 g de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en agua destilada, se adiciona 1.5 mL de NaOH 6 N y se diluye a 1000 mL

El procedimiento que se lleva a cabo para la medición de este gas es: burbujear el H_2S generado en el proceso en agua destilada, tomar 1 mL de muestra. En un matraz de Erlenmeyer de 250 mL colocar la muestra, adicionar 25 mL de la solución de yodo, 2 mL de ácido clorhídrico 6 N, unas gotas de almidón y titular con tiosulfato de sodio 0.025 N hasta que el color azul desaparezca. El cálculo para la determinación del H_2S se realiza mediante la siguiente fórmula:

$$\text{mgS}^{-2} / \text{L} = \frac{[(A \times B) - (C \times D)] \times 16000}{\text{mL muestra}} \quad (\text{B.3})$$

donde

- A: mL de solución de yodo
- B : normalidad de la solución de yodo
- C: mL de solución de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
- D : normalidad de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

B. Método Potenciométrico

El potencial del electrodo de sulfuro junto con un electrodo de referencia varía con la actividad del ión sulfuro en la solución. Para corregir el coeficiente de actividad y pH de este ión, el potencial estima la concentración del ión sulfuro. Un electrodo de este tipo puede ser usado como indicador del punto final por titulación del sulfuro disuelto con una solución estándar.

1. Reactivos, equipo y soluciones

Reactivos

- Hidróxido de sodio (NaOH 10 M)
- Ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)
- Etilendinitrilotetracetato disódico ($\text{EDTA Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)

Equipo requerido

- Medidor de mV o ión selectivo
- Electrodo de ión sulfuro
- Electrodo doble unión de referencia
- Agitador magnético

Soluciones requeridas

- Buffer antioxidante (solución ajustadora iónica)
- Solución estándar
- Solución para el electrodo de referencia (KNO₃)

a) Solución *buffer* antioxidante: Mezclar en 600 mL de agua destilada, 200 mL de NaOH 10 M, 30 g. de ácido ascórbico, 67 g. de EDTA, y aforar a 1 litro con agua destilada. La solución antioxidante contiene hidróxido de sodio debido a que existe una gran proporción de sulfuro presente como ion S²⁻, contiene también ácido ascórbico para prevenir la oxidación del sulfuro, y un agente quelante para contrarrestar el efecto que pudiera ocasionar los metales pesados. Se recomienda que una vez preparada ésta solución se almacene en una botella de plástico, se purgue con nitrógeno el oxígeno que pudiera contener y se guarde a una temperatura de refrigeración (4 °C) hasta que se use. El tiempo recomendado de almacenamiento es hasta de 4 semanas. Si la solución se torna café oscura, significa que se ha oxidado, por lo cual debe desecharse.

b) Solución estándar: Para preparar un estándar de ion sulfuro se pipetea 10 mL de la solución de sulfuro saturado en un frasco volumétrico de un litro, se agrega 500 mL de buffer antioxidante y se diluye hasta la marca con agua destilada. La concentración de este estándar se determina titulando 10 mL de este en 0.1 molar de perclorato de plomo utilizando el electrodo de azufre como indicador de punto final. La fórmula para calcular la concentración del ion sulfuro es la siguiente:

$$\text{Concentraci3n ppm ion S}^{-2} = 3206 \left(\frac{V_t}{V_s} \right) \quad (\text{B.4})$$

V_t: Volumen de titulante al punto final

V_s: Volumen del estándar (10 mL).

$$\text{Concentraci3n ppm ion S}^{-2} = 3206 \left(\frac{V_t}{V_s} \right) \quad (\text{B.5})$$

V_t: Volumen de titulante al punto final

V_s: Volumen del estándar (10 mL).

Para preparar otro estándar se pipetea 10 mL del estándar anterior en un frasco de 100 mL, se agregan 45 mL de la solución ajustadora iónica y se diluye hasta la marca, se hace la medición con el electrodo de sulfuro.

Se prepararon 10 estándares, colocando los electrodos en la solución más baja a la más alta concentración, se anotó la lectura en volts y se elabora la curva de calibración tomando la escala volts en el eje de las abscisas y los ppm de ion azufre para la escala de las ordenadas.

2. Procedimiento

La medición del H_2S se hace considerando el gas presente en el espacio libre del matraz y la proporción disuelta en el medio. Se desplaza el gas presente en el matraz, con nitrógeno y se burbujea el H_2S producido durante 30 segundos en 20 mL de la solución ajustadora iónica. Se sumergen los electrodos en esta solución en un recipiente con una magneto para agitación, comenzar la agitación evitando la formación de un vortex y mantener la misma velocidad de agitación para todas las mediciones. Medir el potencial (E_1) y tomar la lectura cuando se estabilice. La concentración s_1 de la solución estándar deberá ser mayor que la que se espera tenga la muestra. Repetir esta operación con una segunda concentración de solución estándar (s_2), la cual deberá ser menor de la que se espere tenga la muestra y no mayor a $0.5 s_1$. Medir el potencial (E_2) y tomar la lectura cuando se estabilice. Repetir el procedimiento con la muestra previamente diluida con la solución buffer, medir el potencial (E_x) y tomar la lectura cuando se estabilice. El tiempo de respuesta de la lectura en el electrodo es de al menos dos minutos, aunque en algunas ocasiones requería de más tiempo. Este tiempo depende no sólo de la concentración de ion azufre, sino también de la velocidad de agitación de la muestra y de las condiciones de la membrana del propio electrodo (Midgley, 1991). Los cálculos de la pendiente se realizan como sigue:

a) Cálculo de la pendiente de calibración:

$$k = \frac{E_1 - E_2}{\log s_1 - \log s_2} \approx -29 mV \quad (B.6)$$

b) Concentración de S^{2-} :

Calcular la diferencia de potencial: $\Delta = E_1 - E_2$

Concentración: $c = 2s_1 \times \text{anti log} \left(\frac{-\Delta}{k} \right) \quad (B.7)$

c) Cantidad de H_2S producida:

$$mg H_2S = \left[(7 \times 10^{-9} e^{-0.0311A}) \times B + (2 \times 10^{-5} e^{-0.0195C}) \times D \right] \quad (B.8)$$

donde: A = mV en la solución buffer

B = mL de solución buffer (20 mL)

C = mV en el medio Postgate B

D = mL de medio Postgate B (100 mL)

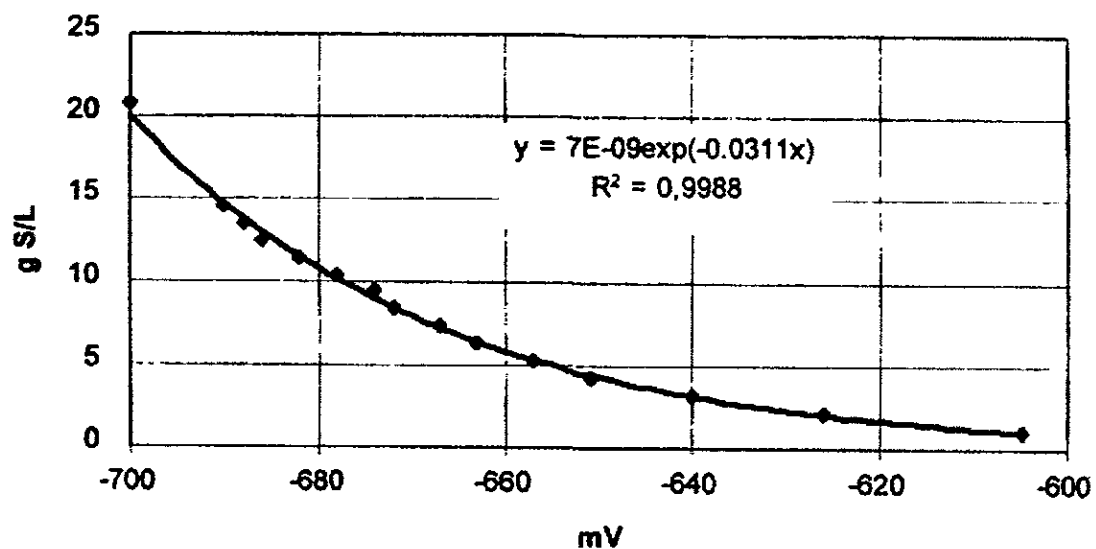


Figura B.1. Curva de calibración de concentración de ión sulfuro en solución buffer antioxidante

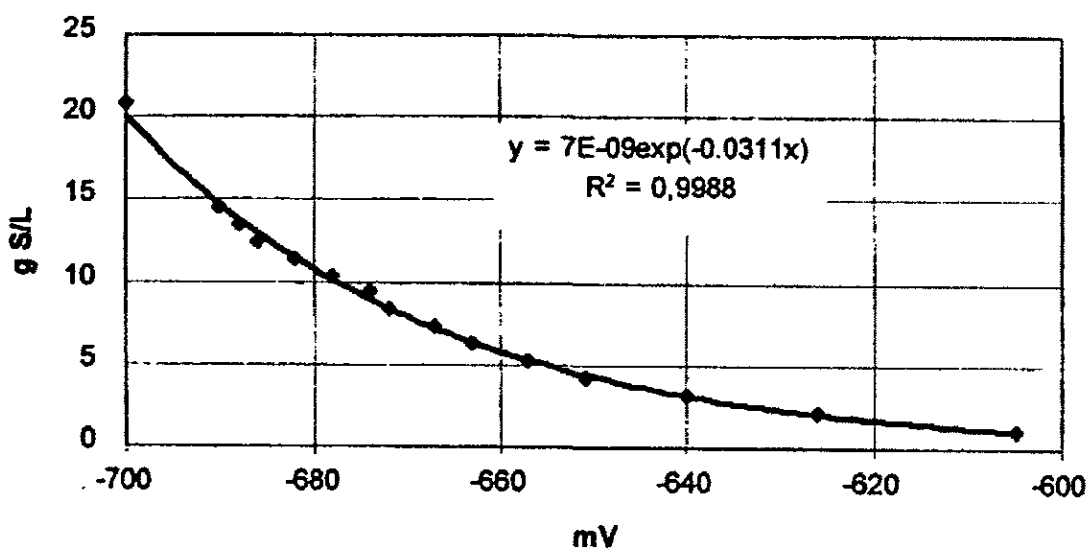


Figura B.2. Curva de calibración de concentración de ion sulfuro en medio Postgate B

B.1.3. DETERMINACION DEL AZUFRE TOTAL

La determinación del contenido de azufre se basa en la oxidación del azufre presente en la muestra, en presencia de oxígeno, empleando una mufla tubular de alta temperatura, con posterior detección continua del producto de oxidación, bióxido de azufre (SO₂), por medio de detección por absorción infrarroja.

1. Reactivos y equipo

Reactivos

- a) Oxido de magnesio (MgO), acelerador de la combustión y de grado reactivo analítico;
- b) Pentóxido de vanadio (V₂O₅);
- c) Perclorato de magnesio (MgClO₄), reactivo absorbente;
- d) Oxígeno, gas transportador y oxidante, con una pureza superior a 99.9%, se requiere comprimido a una presión superior de 2.1 kg/cm².

Equipo

Analizador de azufre LECO SC-32

2. Procedimiento

Se homogeneiza la muestra a analizar en un baño a una temperatura constante de aproximadamente 50 °C durante un tiempo de 20 a 30 minutos. Se enciende el analizador de azufre LECO SC-32, por un lapso mínimo de tres horas, conforme a las instrucciones del fabricante. El sistema deberá alcanzar una temperatura mínima estable de 2500 °F (1371 °C).

Se calibra el sistema empleando el patrón más cercano a la concentración esperada en la muestra. Se transfiere a una nave previamente tarada y se pesa una porción del patrón, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante, dependiendo de la concentración de azufre en el patrón. El producto de peso de la muestra y el porcentaje en peso de azufre no debe exceder 4%, por ejemplo:

- 4% de azufre - 1.0 g
- 8% de azufre - 0.5 g
- 16% de azufre - 0.25 g

Se siguen las recomendaciones del fabricante para el uso de aceleradores de combustión. Se ejecuta el procedimiento de calibración con base en las indicaciones del fabricante, hasta la indicación de una lectura estable.

Para el análisis, se transfiere la cantidad de muestra a una nave previamente tarada, se pesa con base a las indicaciones del fabricante para la concentración esperada de la misma. Se registra el peso de la muestra, concentración y condiciones del sistema.

La precisión relativa de este método en el intervalo de 0.005 a 99.99% de azufre, es de ± 0.001 g.

B.1.4. SÓLIDOS SUSPENDIDOS VOLÁTILES (SSV)

Se evapora una muestra correctamente mezclada en una placa pesada y secada a peso constante en un horno a 103 - 105 °C. El residuo obtenido se incinera, a peso constante, a una temperatura de 550 \pm 50 °C. Los sólidos remanentes representan los sólidos totales fijos, disueltos o en suspensión, mientras que la pérdida de peso por ignición representa los sólidos volátiles.

1. Material y equipo

Material

Desecador
Cápsulas de porcelana
Papel filtro Whatman GFA 40 mm
Pinzas para cápsulas
Probeta de 100 mL

Equipo

Estufa de calentamiento (105 °C)
Estufa de incineración (550 °C)
Balanza analítica
Equipo de filtración al vacío

2. Procedimiento

Se toman 100 mL de la muestra (del vial), se filtran en papel Whatman GFA de 40 mm de diámetro previamente tarado (P_1), se pone a secar el papel a 105 °C en la estufa durante 2 horas aproximadamente, se sacan, enfrían y se pesan (P_2), después se calcina a 550 °C durante 15 minutos, se enfrían y se pesan (P_3). El cálculo para determinar los Sólidos Suspendedos Totales (SST) y los SSV se hace mediante la siguiente fórmula:

$$SST = \frac{P_2 - P_1}{\text{mL muestra}} \times 10^6 \quad (\text{B.9})$$

$$SSV = \frac{P_3 - P_1}{\text{mL muestra}} \times 10^6 \quad (\text{B.10})$$

Los pesos se realizan en gramos, mientras que las unidades obtenidas para los SST y los SSV están en mg/L o ppm.

B.1.5. MEDICIÓN DE LA DENSIDAD ÓPTICA (D.O.)

Una suspensión dispersada de microorganismos como un sistema coloidal, presenta un efecto Tyndall, y la luz absorbida o esparcida como un haz de luz monocromático pasa a través de la suspensión que puede ser usada como una medición relativa del incremento en la biomasa.

Esta medición se realiza con la ayuda de un espectrofotómetro del tipo Spectronic 21 D, con un haz de luz de aproximadamente 16 a 20 mm. La transmitancia T está vinculada con la absorbancia de la luz o densidad óptica, por la relación. $DO = \log (1/T)$. La lectura se realiza en el intervalo visible a una longitud de onda de 610 nm. En caso de que el aparato no detecte el valor de absorbancia, debe realizarse una dilución de la muestra.

B.1.6. PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

Diferentes tipos de medio han sido usados para el cultivo de bacterias sulfatoreductoras, sin embargo, ninguno de los medios satisface totalmente a todas las especies (Widdel y Bak, 1991). A continuación se muestran dos medios que son empleados frecuentemente.

A. Medio API

El medio API (American Petroleum Institute) se empleó generalmente para que se llevara a cabo el crecimiento de las cepas originales tomadas de sedimentos del mar. Este medio se prepara diluyendo los nutrientes presentados en la tabla B.1 en un litro de agua destilada. Este medio debe esterilizarse después de preparado para poder utilizarlo.

1. Material y reactivos

Material

Cajas de aluminio para peso de reactivos.
Vasos de precipitado de 250, 500, 1000 y 2000 mL.
Matraz aforado de 250, 500, 1000 y 2000 mL.

Equipo

Balanza analítica.
Parrilla agitadora.
Autoclave para esterilización

TABLA B.1. Medio de cultivo API (RP38). (API 1965)

Reactivos	Peso por cada litro de agua (g)
Fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4)	0.01
Sulfato de magnesio ($MgSO_4$)	0.2
Sulfato ferroso amoniacal ($FESO_4(NH_4).6H_2O$)	0.1
Cloruro de sodio (NaCl)	10.0
Acetato de sodio (CH_3COONa)	4.0
Extracto de levadura (Y)	1.0
Acido ascórbico ($C_6H_8O_6$)	0.1
TOTAL	15.41

B. Medio Postgate B

El medio Postgate B contiene lactato el cual sirve como donador de electrones y como fuente de carbón. La preparación de este medio requiere además de ciertos nutrientes los cuales se especifican en la tabla B.2. Para evitar la formación de precipitados, se recomienda que las sales sean adicionadas sucesivamente durante la agitación del agua destilada. Para la utilización de este medio en el crecimiento y pruebas de remoción de sulfatos, debe esterilizarse.

Tabla B.2. Medio de cultivo Postgate B (por cada litro de agua)

Reactivo	Peso (g)
Lactato de sodio ($CH_3CHOHCOONa$)	7.0
Sulfato de calcio (caso4)	1.0
Cloruro de amonio (NH_4Cl)	1.0
Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4)	0.5
Sulfato de magnesio ($MgSO_4 * 7H_2O$)	2.0
Cloruro de sodio (NaCl)	25.0
Extracto de levadura (y)	1.0
TOTAL	37.5

B.1.7. INOCULACIÓN MICROBIOLÓGICA

Esta etapa se refiere al transporte de las cepas desde las muestras tomadas de sedimentos marinos hasta su inoculación en los medios de cultivo para su crecimiento como el medio API y Postgate B.

1. Material y equipo**Material**

Cepas bacterianas
Medios de cultivo (API y Postgate B)
Frascos viales de 150 mL
Tapas de aluminio para viales
Jeringas de insulina de 1, 5 y 10 mL

Equipo

Estufa de incubación o cuarto de incubación
Refrigerador o cuarto de refrigeración
Equipo para inyección de vacío
Equipo para inyección de nitrógeno
Campana de reflujo de microbiología

B.1.8. PROCESO DE BIODESULFURACIÓN

En ésta etapa se realizan las pruebas de remoción de azufre como sulfato proveniente del medio de cultivo, así como la remoción de azufre como azufre total del combustóleo a nivel fermentador, tal y como se explica en la metodología.

1. Material, reactivos y equipo

Material

Termómetro de 150 °C
Tubos de ensaye roscados de capacidad de 30 y 50 mL
Gradilla de metal para tubo de ensaye
Papel aluminio y Parafilm
Matraces Erlenmeyer de 250, 500, 1000 y 2000 mL
Vaso de precipitado de 2000 y 4000 mL
Probeta graduada de 50, 100 y 1000 mL

Reactivos

Combustóleo
Ácido clorhídrico al 10%
Hidróxido de sodio NaOH 0.1 M
Emulsificante Tween 20
Medio Postgate B

Equipo

Autoclave para esterilización
Agitador de propela con motor integrado para mezclado de la emulsión combustóleo-agua

Bioreactor

Termostato

Parrilla de calentamiento

Estufa de incubación

Campana de extracción de gases generados

Equipo de protección personal para la generación de gases

APÉNDICE C

TABLAS DE RESULTADOS

Tabla C.1. Actividad específica de las 24 cepas a pH 5 y 7

Cepas	Actividad específica gSO ₄ /L*DO*h		Actividad específica gSO ₄ /L*DO*h	
	pH 5		pH 7	
	día 5	día 14	día 7	día 14
1	2.77E-03	1.12E-03	8.84E-05	1.04E-04
2	1.93E-03	5.18E-03	3.99E-04	1.63E-04
3	2.37E-03	2.38E-03	1.63E-04	3.36E-05
4	6.48E-03	5.60E-04	1.54E-04	3.26E-05
5	4.72E-03	1.29E-03	7.75E-04	3.46E-04
6	4.58E-03	8.57E-04	2.81E-04	9.32E-05
7	1.82E-03	8.84E-04	5.30E-04	2.20E-04
8	1.73E-03	1.05E-03	6.83E-04	3.08E-04
9	2.12E-03	4.21E-04	7.35E-04	2.27E-04
10	1.90E-03	9.52E-04	5.53E-04	1.17E-04
11	1.82E-03	1.06E-03	3.37E-04	1.27E-04
12	1.56E-03	8.90E-04	4.67E-04	1.25E-04
13	2.64E-03	1.40E-03	3.47E-04	1.14E-04
14	4.39E-03	9.75E-04	3.47E-04	8.78E-05
15	2.88E-03	8.75E-04	5.38E-04	2.54E-04
16	4.90E-03	1.08E-03	7.65E-04	2.51E-04
17	1.70E-03	7.47E-04	5.16E-04	5.01E-04
18	5.09E-03	1.50E-03	9.20E-04	5.86E-04
19	2.76E-03	8.68E-04	4.79E-04	1.72E-04
20	2.27E-03	9.96E-04	4.18E-04	1.92E-04
21	3.32E-03	1.34E-03	3.06E-04	1.27E-04
22	1.42E-03	6.99E-04	5.59E-04	2.04E-04
23	3.73E-03	1.08E-03	7.26E-04	3.09E-04
24	3.06E-03	9.48E-04	8.23E-04	2.38E-04

Tabla C.2. Crecimiento microbiano y remoción de sulfatos con las cepas seleccionadas a pH 8

Cepas	Densidad Óptica				Remoción de sulfatos (%)		
	0 h	168 h	336 h	504 h	168 h	336 h	504 h
5	0.024	0.052	0.077	0.064	30.2	87.6	88.9
7	0.035	0.053	0.068	0.065	10.1	40.3	11.8
8	0.036	0.06	0.036	0.066	32.1	34.4	36.7
15	0.03	0.039	0.044	0.044	5.4	11.9	5.2
22	0.033	0.09	0.096	0.089	63.8	75.5	76.7

Tabla C.3. Crecimiento microbiano y remoción de sulfatos de las cepas seleccionadas a diferente concentración de sulfatos

Cepas	Densidad Óptica				Remoción de sulfatos (%)		
	0 h	168 h	336 h	504 h	168 h	336 h	504 h
5A	0.06	0.054	0.079	0.017	1.2	2.7	36.8
5B	0.055	0.037	0.011	0.077	6.8	5.5	17.4
5C	0.025	0.011	0.056	0.011	28.2	32.7	52.6
7A	0.073	0.036	0.037	0.029	0.5	13.7	27.5
7B	0.073	0.02	0.03	0.035	1.1	16.5	13.0
7C	0.042	0.021	0.026	0.036	34.5	29.1	44.6
8A	0.072	0.027	0.039	0.092	0.2	3.9	35.3
8B	0.07	0.011	0.072	0.056	4.0	4.7	0.2
8C	0.023	0.088	0.014	0.079	23.2	28.3	27.5
15A	0.05	0.038	0.089	0.023	2.7	10.5	31.0
15B	0.075	0.054	0.014	0.022	4.2	20.4	25.5
15C	0.019	0.016	0.017	0.017	32.0	33.5	45.1
22A	0.045	0.067	0.054	0.027	17.1	31.0	24.9
22B	0.087	0.046	0.044	0.028	17.7	16.3	11.1
22C	0.04	0.033	0.043	0.039	27.3	30.4	27.9

A = 4.52 gSO₄/L B = 8.34 gSO₄/L C = 16.06 gSO₄/L

Tabla C.4. Crecimiento microbiano y remoción de sulfatos con las cepas seleccionadas a 45 °C

Cepas	Densidad Óptica			Remoción de sulfatos (%)	
	0 h	168 h	336 h	168 h	336 h
5	0.019	0.026	0.024	0	0
7	0.028	0.032	0.032	0.7	89.0
8	0.028	0.034	0.079	2.8	91.7
15	0.014	0.027	0.03	2.1	0
22	0.015	0.025	0.026	0	0

Tabla C.5. Remoción de sulfatos y producción de sulfhídrico de la Prueba 2 con la cepa 22

Tiempo (h)	Remoción de sulfatos (%)	H ₂ S (g S ⁻² /L)
0	0	0
7	0	0.22
24	0	0.16
34	2.7	0.22
48	10.0	0.45
72	0	0.25
97	0	0
121	0	0
144	0	0

Tabla C.6. Remoción de sulfatos y producción de sulfhídrico de la Prueba 3 con la cepa 22

Tiempo (h)	Remoción (%)	H₂S (g S⁻²/L)
0	0	0
24	2.8	0
48	0	0
96	0	0.37
120	0	0.29
144	2.5	0.24
168	7.1	0.63
192	10.7	0.76
198	10.7	0.81
216	1.0	0.34
264	4.3	0.14
288	5.2	0.03
294	34.2	0