



01177 2  
31

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**  
**Facultad de Ingeniería**

**BIODESULFURACIÓN DE COMBUSTÓLEO MEXICANO POR**  
**MEDIO DE BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS**

PERLA EDITH ARAGÓN ESCAMILLA

**TESIS DE MAESTRÍA**

PRESENTADA A LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO DE LA

**FACULTAD DE INGENIERÍA**  
DE LA  
**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

COMO REQUISITO PARA OBTENER  
EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN INGENIERÍA  
(AMBIENTAL)

CIUDAD UNIVERSITARIA  
1997

**TESIS CON**  
**FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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

## DEDICATORIAS

*Con amor, respeto y admiración a mis padres Jorge y Linda, por su constante cariño, comprensión, apoyo, y por los valores éticos y morales que me han inculcado.*

*Con especial cariño a mis hermanos Araceli, Jorge, Lety, Deizy y Linda; por los buenos momentos que siempre paso con ellos.*

*A mi sobrino Roberto (Tito), por ser una gran alegría en mi vida.*

*A Eduardo, por su gran amor, apoyo y comprensión.*

*Con especial afecto al Ing. Victor Franco, por su estima, apoyo y preocupación.*

*A mis amigos: José Luis, Daniel, Ceci, Silvia, Lupita, José, Ivette, Mónica, Ruth, Elizabeth, Saúl, Bianca, Lourdes, Carlos, Raúl, Germán y Claudia; por la amistad que me brindan y que espero siempre conservar.*

## TESTIMONIO DE AGRADECIMIENTO

Agradezco sinceramente al Doctor Pedro Martínez Pereda y al Doctor Jorge M. Romero Jarero por brindarme sus sabios consejos, sus conocimientos y su calidad humana.

Muchas gracias.

# INDICE

	Página
ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN .....	iv
OBJETIVO Y ALCANCES .....	viii
<b>I. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>II. EL AZUFRE EN LA NATURALEZA .....</b>	<b>5</b>
2.1. Presencia del azufre en la naturaleza .....	5
2.2. Ciclo biogeoquímico del azufre .....	7
2.2.1. <i>Sulfuretum</i> .....	7
2.2.2. Microorganismos en el ciclo del azufre .....	9
2.3. Química del azufre .....	10
2.3.1. Estructura química y propiedades del azufre .....	10
2.3.2. Usos del azufre .....	13
<b>III. REVISIÓN Y ANÁLISIS DE BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>15</b>
3.1. BIODESULFURACIÓN DE PETRÓLEO .....	15
3.2. BIODESULFURACIÓN DE COMPUESTOS DE AZUFRE PUROS .....	23
3.2.1. Tiofenos .....	23
3.2.2. Benzotiofenos .....	24
3.2.3. Dibenzotiofenos (DBT) .....	24
3.2.4. Dibencilsulfuro .....	25
3.2.5. Otros compuestos de azufre orgánico .....	25
3.3. BIODESULFURACIÓN DE CARBÓN .....	26
3.4. Discusión .....	29
<b>IV. LAS BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS Y SU FUNCIÓN .....</b>	<b>35</b>
4.1. Definición .....	35
4.2. Clasificación .....	35
4.3. Metabolismo .....	39
4.4. Condiciones de crecimiento .....	39

## INDICE

	Página
<b>V. COMPUESTOS DE AZUFRE IDENTIFICADOS EN CRUDOS</b> . . . . .	41
5.1. El azufre en crudos Estadounidenses . . . . .	41
5.2. El azufre en crudos de México . . . . .	44
<b>VI. PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DE LOS COMPUESTOS DE AZUFRE</b> . . . . .	47
6.1. Bióxido de azufre (SO <sub>2</sub> ) en el aire . . . . .	47
6.1.1. Efectos en la visibilidad atmosférica . . . . .	49
6.2. Bióxido de azufre en la atmósfera de la Ciudad de México . . . . .	50
6.3. Efectos en la salud y en los seres vivos . . . . .	56
6.4. Efectos de la degradación en los materiales . . . . .	57
6.5. Efectos de la precipitación ácida (lluvia ácida) . . . . .	58
<b>VII. CARACTERÍSTICAS DEL COMBUSTÓLEO MEXICANO</b> . . . . .	60
7.1. Definición . . . . .	60
7.2. Obtención del combustóleo . . . . .	61
7.3. Propiedades del combustóleo . . . . .	61
7.4. Producción . . . . .	63
7.5. Consumo . . . . .	64
7.6. Importación y Exportación . . . . .	65
7.7. Normatividad . . . . .	66
<b>VIII. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</b> . . . . .	69
8.1. Pruebas exploratorias para detectar la presencia de bacterias sulfato-reductoras . . . . .	75
8.2. Proliferación celular . . . . .	76
8.3. Determinación del número de células en cada cultivo mediante conteo directo del número de colonias . . . . .	79
8.3.1. Diluciones en medio mineral . . . . .	79
8.3.2. Preparación de los tubos de Vanielli . . . . .	80
8.4. Prueba exploratoria de biodesulfuración en combustóleo . . . . .	83
8.5. Prueba de biodesulfuración en combustóleo utilizando un medio modificado . . . . .	83
8.5.1. Segunda prueba de biodesulfuración en combustóleo . . . . .	85
8.5.2. Tratamiento dado a las muestras de combustóleo para la determinación de azufre remanente . . . . .	88

## INDICE

	Página
<b>IX. RESULTADOS: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN</b> .....	91
9.1. Resultados cualitativos de las pruebas exploratorias para detectar bacterias sulfato-reductoras .....	91
9.2. Resultados cualitativos de la proliferación celular .....	92
9.3. Resultados cuantitativos del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en 25 cultivos mixtos silvestres .....	92
9.4. Resultados cualitativos de la prueba exploratoria de biodesulfuración en combustóleo .....	95
9.5. Resultados cualitativos de la primera prueba de biodesulfuración .....	97
9.5.1. Resultados cuantitativos de la biodesulfuración utilizando "Metil viologen" como indicador de la sulfato-reducción ..	98
<b>X. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES</b> .....	103
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	106
Referencias .....	107
Otras publicaciones consultadas .....	118
<b>APÉNDICE A</b> .....	120
<b>APÉNDICE B</b> .....	125

## **ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN**

### **Antecedentes**

El estudio de la biodesulfuración es un tema que en México se ha tocado muy poco, debido a esto se tiene poca información y conocimiento sobre el tema. Sin embargo, en otros países como Canadá, Francia, Alemania, Corea y principalmente en Estados Unidos se ha seguido esta línea de estudio; a raíz de que, investigaciones realizadas por diversas instituciones, han manifestado que la tendencia en la concentración de azufre en todos los crudos a nivel mundial va en aumento.

Los primeros resultados trágicos por contaminación de compuestos de azufre asociados a partículas suspendidas, datan desde 1930, este primer episodio ocurrió en el Valle de Meuse, en Bélgica, estimándose que la concentración máxima de dióxido de azufre alcanzó 8.0 ppm en el aire. En 1948, en Donora, Pensilvania, Estados Unidos, se registró una concentración máxima de 2.0 ppm como SO<sub>2</sub> asociado a partículas suspendidas en el aire. En el episodio de Londres de 1952, las concentraciones promediadas en cinco días fueron de 0.6 ppm, con un promedio diario máximo de 1.3 ppm. En 1953, hubo un incidente por contaminación en la Ciudad de Nueva York, en este caso las concentraciones de bióxido de azufre subieron hasta 0.9 ppm en tres días consecutivos; diez años después se repitió el episodio alcanzándose concentraciones de 0.5 ppm durante 15 días, en este caso el máximo registrado fue de 1.5 ppm en cuatro horas. Las concentraciones máximas permitidas en 1969 por el congreso de este país, indican valores de 0.08 ppm como promedio en 24 horas. Cabe mencionar que en estos episodios de contaminación se registró un aumento de la morbilidad principalmente en niños y ancianos, así como mayor número de hospitalizaciones por afecciones respiratorias.

### **Justificación**

En los crudos mexicanos el azufre es un compuesto natural que se encuentra en concentraciones importantes; por ejemplo: el Ebanó Pánuco contiene 5.38% en peso como azufre total, y el crudo Maya contiene 3.4% de este mismo elemento (reporte anual de CFE, 1993). Esto ocasiona que los productos derivados de los crudos, especialmente los combustibles, deterioren la calidad del aire al ser utilizados como energéticos.

En la Zona Metropolitana de la Ciudad de México se tienen datos que muestran las principales fuentes emisoras de bióxido de azufre, en primer lugar está la industria que contribuye con el 32.0% (65 732 Ton/año); en segundo lugar están las termoeléctricas aportando el 28.3% (58 247 Ton/año); y en tercer lugar se encuentra el transporte, tanto público como privado, contribuyendo con el 21.7% (44 794 Ton/año). Estos tres sectores, junto con las emisiones de los servicios mercantiles, refinerías de PEMEX, incendios y otros procesos, aportan anualmente



205 745 toneladas de este contaminante al valle de México. Las delegaciones más afectadas son: la Cuauhtémoc, que presenta el mayor porcentaje de emisiones (33.4%), la Miguel Hidalgo (19.1%) y la Venustiano Carranza (8.4%), en estas delegaciones se concentra poco más del 60% del bióxido de azufre total (Departamento del Distrito Federal, evaluaciones de 1989). La actualización de datos efectuada en 1994 por el DDF, manifiesta que las emisiones de SO<sub>2</sub> han disminuido considerablemente (poco más del 75%); reportando 45,467.98 ton/año. Cabe mencionar, que éste último dato no resulta confiable; ya que, a pesar de que las políticas para mejorar la calidad del aire, han aumentado, el inventario de emisiones para el dióxido de azufre en 1994, no esta completo; argumentando que los datos que no aparecen en la matriz de emisiones para este contaminante, se verificarán con nuevos cálculos (Programa para Mejorar la Calidad del Aire en el Valle de México, DDF; 1994).

En México, se producen diariamente más de 2.5 millones de barriles de crudo, incluyendo crudo ligero y pesado, exportándose más de 1.3 millones de barriles diarios principalmente hacia Estados Unidos, España y Japón. De combustóleo, se producen diariamente 419,400 barriles, exportándose 39,800 barriles diarios, para mantener la participación en el mercado internacional; y ya que, el consumo ha aumentado en años recientes (435,300 barriles diarios), se necesita importar 55,700 barriles diarios para satisfacer la demanda de combustóleo (anuario estadístico de PEMEX, 1994). Como se puede apreciar la participación de México como país productor de crudo es considerable, por lo tanto, la producción de energéticos derivados así como su calidad es importante para México; ya que de esto depende el grado de contaminación atmosférica al momento de emplearlos, y por consiguiente su precio en el mercado.

El combustóleo de México es un energético de alto valor calorífico y bajo costo, derivado de los procesos de refinamiento del crudo, el cual consiste en una mezcla de hidrocarburos pesados y residuos provenientes de las torres de fraccionamiento y destilado, debido a esto contiene concentraciones importantes de impurezas (azufre, vanadio, níquel, potasio, cobre y diversas sales). Uno de los principales contaminantes que contiene el combustóleo es el azufre, ya que durante la combustión se transforma en bióxido de azufre (SO<sub>2</sub>); por consiguiente, su uso como combustible representa un problema importante para la contaminación ambiental. Las industrias que más lo consumen son principalmente: la industria del cemento, química, celulosa y papel, siderúrgica y petroquímica.

Una vez obtenido el combustóleo no es sometido a ningún proceso de refinamiento para mejorar su calidad, debido a esto tiene un alto potencial contaminante. Al ser utilizado como energético en la producción de energía y en otros usos produce bióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), este compuesto está considerado como uno de los principales contaminantes ambientales debido a los daños que ocasiona en la salud, en animales, materiales y en la vegetación. Además, sus propiedades físicas y químicas lo hacen un gas muy reactivo por lo que fácilmente es capaz de formar otros compuestos contaminantes igualmente peligrosos (sulfatos diversos y ácido sulfúrico).

El bióxido de azufre como tal, es un gas que inhalado a diferentes concentraciones ocasiona: irritación del tracto respiratorio, inflamación de la mucosa nasal, disminución de la actividad ciliar, endurecimiento del tórax, asfixia y favorece el enfisema pulmonar y la bronquitis (ONU, OMS, y, OPS; 1982). Estudios realizados en Rusia, han demostrado que los compuestos de azufre provocan efectos sobre las funciones sensoriales o reflejos de voluntarios durante exposiciones breves (ver Tabla 1).

Cuando el dióxido de azufre entra en contacto con la humedad de la atmósfera, se hidrata rápidamente para formar ácido sulfúrico como aerosol, el cual se asocia a otros contaminantes en forma de gotitas ó partículas de diferente tamaño (Waller, 1963). Este fenómeno se conoce como precipitación ácida (lluvia ácida) y es capaz de dañar a los ecosistemas forestales, acelerar la corrosión de los metales, deteriorar fachadas de edificios, casas, construcciones antiguas y monumentos expuestos a la intemperie; así como reducir el pH natural de cuerpos de agua.

Otro problema que ocasiona la presencia de azufre en los combustibles, es durante el proceso de refinamiento ya que corroe tuberías, bombas, máquinas de combustión y componentes metálicos. Disminuye la eficiencia de los productos químicos utilizados como catalizadores, que son empleados durante este proceso; esto trae como consecuencia, el aumento en el costo de operación por el mantenimiento y la reposición de piezas dañadas.

**TABLA 1. CONCENTRACIONES LIMINALES DE COMPUESTOS DE AZUFRE QUE OCASIONAN EFECTOS EN LAS FUNCIONES SENSORIALES O REFLEJAS EN HUMANOS A EXPOSICIONES BREVES ( $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ).**

Efectos	ácido sulfúrico	dióxido de azufre	ácido sulfúrico más dióxido de azufre
percepción de olor e irritación de la mucosa	0.6 a 0.85	1.6 a 2.8	0.3+0.5
supresión de la adaptación a la oscuridad	0.63 a 0.73	0.92	0.3+0.5
elevación de la cronaxia óptica	0.73	1.5	0.6+1.2
alteración del ritmo alfa	0.63	0.9	0.3+0.5
condicionamiento del reflejo electrocortical	0.4	0.6	0.15+0.5 o 0.3+0.25

Resumido de varios estudios efectuados en Rusia (Bustueva *et al.*, 1960; Bustueva, 1961b; Rjazanov, 1962). Tomado de "Criterios de Salud Ambiental 8, Óxidos de Azufre y Partículas en Suspensión"; ONU, OMS, OPS (1982).

En lo que se refiere a los costos, se tienen datos de 1980 a 1989 en donde se puede observar la variación de precios del combustóleo de México en comparación con otros países (figura 1), como se puede apreciar el costo del combustóleo (Fuel oil) de Estados Unidos, Japón y varios países europeos siempre es superior al del energético mexicano, principalmente por su baja calidad ya que presenta mayor viscosidad y contenido de azufre.

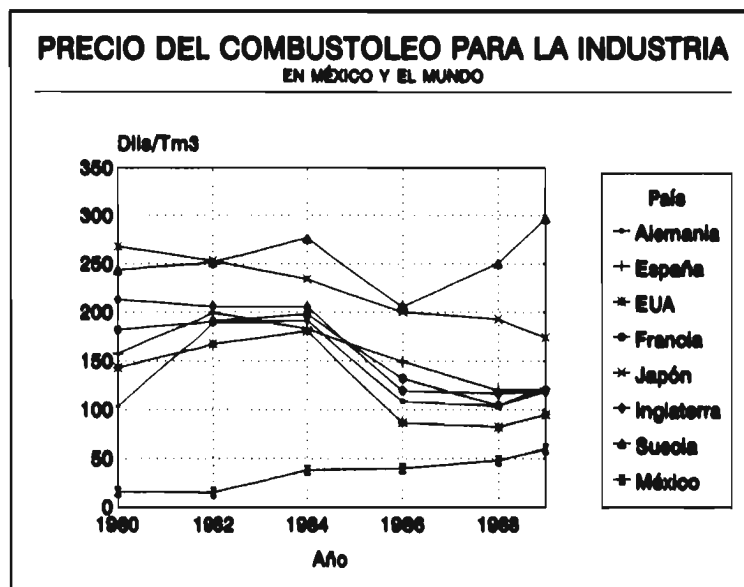


Figura 1 Gráfica de costos para el combustóleo  
(Informe Anual de la C.F.E., 1993).

Resulta evidente que cualquier esfuerzo realizado por buscar desarrollos tecnológicos, enfocados a la extracción del azufre contenido en los energéticos mexicanos está ampliamente justificado. En esta investigación se exploró la utilización de bacterias sulfato-reductoras, como método de tratamiento biológico para disminuir los compuestos de azufre presentes en el combustóleo mexicano, ya que su concentración de azufre es importante (hasta 5% en peso de azufre total).

## **OBJETIVO**

Evaluar la viabilidad de la aplicación en la desulfuración biológica al combustóleo mexicano, mediante cultivos mixtos silvestres de bacterias sulfato-reductoras, provenientes de sedimentos marinos y digestores anaerobios.

## **ALCANCES**

En este trabajo se realizó una evaluación general de la viabilidad que representa la aplicación del proceso biológico, en la eliminación de azufre del combustóleo. Para esto, se inició con la selección de microorganismos capaces de metabolizar compuestos de azufre (se eligieron cultivos mixtos silvestres con predominancia de bacterias sulfato reductoras). Una vez seleccionados los microorganismos, se estimuló la proliferación celular y se realizaron pruebas exploratorias para determinar su actividad. A continuación, se probó el crecimiento de los cultivos en presencia de combustóleo, utilizando un medio especial para bacterias sulfato-reductoras; una vez que se observó que el combustóleo no fue tóxico para los microorganismos, permitiendo su crecimiento dentro del mismo, se hizo una prueba definitiva de conversión del azufre contenido en el combustóleo, usando un medio modificado en el cual crecieron los microorganismos, utilizando solamente la porción de azufre presente en el combustóleo, de esta forma se probó que los microorganismos empleados, son capaces de metabolizar el azufre del combustóleo. Después de dar un tratamiento a la muestras de combustóleo biodesulfurado, se midió el porcentaje de azufre biodegradado en términos de azufre total; utilizando el método de alta temperatura establecido por la ASTM.

Ya que las pruebas experimentales son exclusivamente microbiológicas, se seguirán los procedimientos estándar establecidos en la literatura y en artículos consultados. Los resultados de esta investigación, son en su gran mayoría de tipo cualitativo.

## ***CAPÍTULO 1***

### **INTRODUCCIÓN.**

Cada persona en promedio diariamente respira de 14 a 18 kg de aire, consume de 1.5 a 2.0 kg de agua en diversas formas; y no más de 0.7 kg de materia sólida seca como alimento (Albert Parker, 1983). El hombre, puede sobrevivir solamente unos pocos minutos sin aire mientras que logra mantenerse vivo durante días sin beber agua y semanas sin ingerir alimento. Aunque se ha insistido durante mucho tiempo sobre la necesidad de consumir agua potable y alimentos sanos libres de contaminación, ha sido hasta hace relativamente pocos años que se ha empezado a reconocer, en forma seria, la importancia que para la salud tiene el aire limpio.

Algunos óxidos de azufre y partículas en suspensión se encuentran naturalmente en el aire en grandes cantidades; sin embargo, las contribuciones que provienen de las actividades humanas tienen una importancia primordial, sobre todo, en las zonas urbanas densamente pobladas. Se considera que el empleo de combustibles para calefacción y para producción de energía causan la mayor parte de la contaminación por dióxido de azufre y partículas a que está expuesta la población.

El dióxido de azufre proveniente de la actividad humana o natural, es un gas incoloro altamente reactivo, lo absorben con facilidad las partículas higroscópicas y se transforma en trióxido de azufre, éste compuesto se hidrata rápidamente (en cuestión de segundos) para formar ácido sulfúrico. En consecuencia, en el aire se encuentra ácido sulfúrico en forma de aerosol; a esto se le llama precipitación ácida o lluvia ácida, la cual reacciona con contaminantes higroscópicos o partículas de diferentes tamaños provocando la formación de compuestos sulfatados. Estos contaminantes provocan daño a las áreas de cultivo, a la vegetación y a los ecosistemas

forestales, aceleran la corrosión de los metales, y atacan a la piedra caliza deteriorando las fachadas de los edificios y otras construcciones (monumentos o esculturas expuestas al ambiente).

**Aspectos legales.**

En lo referente a la legislación mexicana, la Norma Oficial Mexicana: NOM-CCAT-015-ECOL/1993, establece un contenido máximo de un 2% en peso de azufre para el gasóleo líquido cuando es empleado por fuentes fijas, ubicadas en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México. Sin embargo, a la fecha no hay una norma que regule la cantidad de azufre permisible en el combustóleo. En el Diario Oficial del 29 de noviembre de 1982, se publicaron los criterios de evaluación de la calidad del aire, los cuales son equivalentes a los que rigen en la mayoría de los países industrializados; debido a esto el DDF (Departamento del Distrito Federal) emite diariamente un reporte de la calidad del aire llamado: "Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA)", indicador que engloba varios contaminantes como: partículas suspendidas totales (PST), partículas suspendidas menores a 10 µm (PM10), bióxido de azufre (SO<sub>2</sub>), bióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO), y ozono (O<sub>3</sub>). La determinación numérica se realiza a partir de promedios horarios ponderados a través de valores de referencia que se tienen ya establecidos (Tabla 2).

**TABLA 2. CONCENTRACIONES LÍMITE DE LA ESCALA IMECA Y CRITERIOS DE EVALUACIÓN.**

IMECA	CALIDAD DEL AIRE	PST µg/m <sup>3</sup> (24h)	PM10 µg/m <sup>3</sup> (24h)	SO <sub>2</sub> ppm (24h)	NO <sub>2</sub> ppm (1h)	CO ppm (8h)	O <sub>3</sub> ppm (1h)
0-100	Satisfactoria	275	150	0.13	0.21	13	0.11
101-200	No satisfactoria	546	350	0.35	0.66	22	0.23
201-300	Mala	637	420	0.56	1.10	31	0.35
301-500	Muy mala	1000	600	1.00	2.00	50	0.60

(Quadri y Sánchez, (1992). "La Ciudad de México y la Contaminación Atmosférica".)

Un valor IMECA de 100 puntos indica una calidad satisfactoria del aire y corresponde a la concentración máxima para cada contaminante de acuerdo a la norma, un valor de 500 puntos representa un nivel de contaminación para el cual es evidente el daño a la salud. Dentro de la Norma Mexicana, se puede ver que la concentración límite para el bióxido de azufre es de 0.13 ppm en un tiempo promedio de 24 horas.

Estudios realizados sobre los efectos en la salud ocasionados por el dióxido de azufre, han demostrado que una exposición directa con 5.01 ppm ( $14\ 300\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) de dióxido de azufre sobre personas sanas, por espacio de 30 minutos, ocasiona reacciones fisiológicas adversas (Frank y Cols, 1962). Las concentraciones máximas permisibles de dióxido de azufre en el aire en los Estados Unidos, aprobadas por el congreso de ese país y publicadas en el Air Quality Criteria de 1969, indican una concentración de 0.08 ppm ( $229\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) como promedio durante 24 horas; y para una exposición de una hora, se tiene 0.5 ppm ( $1430\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ ). En la Unión Soviética los límites máximos permisibles son de 0.058 ppm ( $166\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) para una exposición de 24 horas y 0.19 ppm ( $543\ \mu\text{g}/\text{m}^3$ ) en un período de 20 minutos (ONU, OMS, OPS; 1982).

México, actualmente ocupa uno de los primeros lugares como productor y exportador de crudo en el mundo. La producción de petróleo en México es de alrededor de 44,043 millones de barriles por año, las reservas totales se estiman en 64,516 millones de barriles (anuario estadístico de PEMEX 1994). Actualmente, se producen principalmente tres tipos de crudo, que se clasifican con base en su viscosidad y contenido de azufre; estos son: el tipo Maya con una viscosidad de 320 SSV (viscosidad en segundos Seybolt) y un contenido de azufre de 3.4% en peso; el tipo Istmo, que es un crudo de calidad intermedia con una viscosidad de 60 SSV y un contenido de azufre de 1.8% en peso; y, finalmente se tiene el crudo tipo Olmecca, que es el de mejor calidad, con una viscosidad de 2.94 SSV y 0.77% en peso de azufre (Informe Anual de CFE, 1993).

El combustóleo de México, es un energético que posee un alto poder calorífico y bajo costo en el mercado; diariamente se producen 450,000 barriles los cuales son producto de los residuos provenientes de las torres de fraccionamiento y destilado, a los que se le adiciona gasóleo ligero, diesel o kerosina, nafta, aceite ligero y residuo catalítico. Ya que es un energético formado principalmente por residuos, posee concentraciones importantes de impurezas como son: Azufre, Vanadio, Níquel, Potasio, Cobre y diversas sales (predominando cloruros). Consecuentemente, el combustóleo es un energético con un alto potencial contaminante ambiental.

El sector eléctrico consume más del 50% de la producción nacional de combustóleo. Una planta termoeléctrica de 2X350 MW con 4.8% de azufre en su combustóleo, emite 85 000 toneladas de dióxido de azufre al año (Tovar y Rosado, 1993). El segundo consumidor de combustóleo es el sector industrial (cementos, química, celulosa y papel, siderúrgica, y petroquímica) que utiliza el 21.3% de este mismo energético; y el resto es utilizado por establecimientos mercantiles (panaderías, hoteles, baños, molinos, tintorerías, deportivos, hospitales y otros).

En el inventario de emisiones realizado por el Departamento del Distrito federal en 1989, se obtuvo que en la Zona Metropolitana se producen anualmente 205 745 toneladas de dióxido de azufre. Esta cifra fue inferida a través de datos proporcionados por la EPA, evaluación del consumo de energéticos, volumen de producción, y estimaciones porcentuales de emisiones en

las fuentes fijas y móviles. Los sectores que contribuyen con emisiones de SO<sub>2</sub> a la atmósfera son: energía, industria y servicio, transporte y degradación ecológica (áreas con erosión, incendios y otros procesos). Las cantidades emitidas por sector se presentan en la Tabla 3.

**TABLA 3. EMISIONES DE BIÓXIDO DE AZUFRE EN LA ZONA METROPOLITANA EN 1989\*.**

<b>SECTOR INVENTARIADO</b>	<b>BIÓXIDO DE AZUFRE (Ton/año)</b>
Energía	73,028
Industria y Servicios	87,792
Transporte	44,794
Degradación ecológica	131

(Programa Integral Contra la Contaminación Atmosférica, en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México-DDF, 1990). \*Los datos de 1994 no se consideraron, por que, los datos del inventario de emisiones para el SO<sub>2</sub> no estan completos.

#### **Aspectos microbiológicos.**

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

En este trabajo se utilizaron 25 cultivos mixtos silvestres, provenientes en su mayoría de sedimentos marinos impactados por crudo de las plataformas petroleras de México, ubicadas en las costas de Oaxaca y Chiapas; otros cultivos se obtuvieron de lodos de digestores anaerobios de la Ciudad de Toluca. En los 25 cultivos se comprobó la presencia de BSR, posteriormente se aumentó la biomasa y se realizó un conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC), esto, nos proporcionó la cantidad de células existentes en cada cultivo. Posterior a esto, se hicieron pruebas exploratorias de la actividad metabólica de los microorganismos en presencia de combustóleo, y un medio de cultivo especial para BSR (API RP38, 1965) formulado por el American Petroleum Institute. Para finalizar, se probaron los cultivos en un medio modificado libre de sulfatos y en presencia de combustóleo, obteniéndose resultados cualitativos y cuantitativos del grado de biodesulfuración que lograron las BSR. La metodología y los resultados de este estudio se presentan en los capítulos siguientes de este trabajo.



## ***CAPÍTULO 2***

### **EL AZUFRE EN LA NATURALEZA.**

#### **2.1. Presencia del azufre en la naturaleza.**

Los compuestos de azufre están ampliamente distribuidos en este planeta, y al igual que los elementos más comunes, los átomos de azufre son importantes en la biosfera ya que este elemento forma parte de la estructura química de todos los seres vivos, en forma de compuestos orgánicos de azufre; por ejemplo, el protoplasma contiene entre 0.4% y 1% de azufre en función del tipo de célula y del ambiente del cual proviene. Ahora se sabe que desde hace 500 millones de años el azufre ha estado presente sobre la superficie de la tierra, por lo que, el contenido de azufre promedio en la corteza exterior es de un 0.05%. En cuanto a cantidad este elemento, ocupa el decimoquinto lugar (Schmidt y Siebert 1973).

El azufre se encuentra principalmente como sulfuro formando galenas de sulfuro de plomo, sulfuro de zinc y pirita ( $\text{FeS}_2$ ). Forma sulfatos cuando produce sales como el yeso (sal de Gypsum:  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), sulfato de bario, sulfato de magnesio natural o, regularmente, se le encuentra en su forma elemental ( $\text{S}^\circ$ ). La forma oxidada se encuentra en ambientes volcánicos, pantanos, océanos, manantiales de agua caliente y en capas de rocas sedimentarias del período terciario o de edad más reciente. En el petróleo crudo, el azufre es uno de los elementos más abundantes después del carbono e hidrógeno, formando una gran variedad de compuestos; se encuentra en un intervalo de 0.04% hasta un 5% en peso (Speight, 1980).

Los depósitos de azufre sobre la tierra pueden estar formados por fenómenos naturales como son: aguas termales, volcanes, pantanos, o bien, pueden tener origen biológico. Los depósitos

de azufre libre se encuentran principalmente en Italia (en Sicilia), en la parte norte de América, en la parte sur de América (Perú y Chile), en México, Polonia, Rusia y Japón. Los estratos de Azufre se localizan en las costas y en sedimentos del Golfo de México (Louisiana, Texas y México) en donde la producción fue ciertamente por acción de bacterias anaerobias, las cuales realizaron la reducción de sulfatos sedimentarios localizados en grandes depósitos. Estos estratos se encuentran ubicados a unos 150 a 750 m por debajo de la superficie y pueden tener un espesor de 1 hasta 75 m con un contenido de azufre promedio de un 20% hasta un 40% (Fischer, 1982). En las minas de azufre elemental procedentes de los domos salinos de capas rocosas el azufre se obtiene mediante el "Proceso Frasch" ("Encyclopedia of Chemical Technology" of Kirk and Othmer, 1983).

Otra fuente importante de azufre para la purificación del mismo, son los gases naturales y de refinerías que tienen un alto contenido de sulfuro de hidrógeno; la cantidad de este compuesto en un gas puede ser muy alta como la del gas ácido que tiene más de un 90%, o bien, puede ser muy baja como la del gas dulce que tiene menos del 0.1% como H<sub>2</sub>S. Algunas áreas en donde podemos localizar gases ácidos, ricos en sulfuro de hidrógeno se presentan en la Tabla 3.

**TABLA 3. LUGARES DE DIFERENTES PARTES DEL MUNDO DONDE SE PRESENTA ABUNDANCIA DE SULFURO DE HIDRÓGENO.**

LOCALIZACIÓN	SULFURO DE HIDRÓGENO (%)
Lacq (Francia)	16.0
Varnhorn (Alemania)	22.4
Harmattan (Canadá)	53.5
Bearberry (Canadá)	90.0
Missisipi (EUA)	25-45
Zhaolanzhuang (China)	60-90

(Hyne, J. B., 1982. Sulfur: New Sources and Uses.)

La producción de azufre elemental proveniente de gases ricos en sulfuro, tiene importancia económica y como se mencionó antes también es necesario en la conservación del ambiente. Existen diferentes procedimientos químicos para la eliminación del sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) de los gases para obtener azufre elemental. Uno de los procedimientos más eficientes es el "Proceso Sulfinol", el cual consiste en separar el H<sub>2</sub>S y el bióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) del metano; y el "Proceso Claus" (Hochgesand, 1975), en el cual las reacciones se basan en la combustión y oxidación del sulfuro de hidrógeno con el oxígeno del aire para formar azufre elemental con la ayuda de catalizadores.

Una posible alternativa de la desulfuración química podría ser la utilización de bacterias que metabolizan el azufre, como las bacterias fototróficas verdes y púrpuras. Actualmente, se tiene desarrollado un bioproceso anaerobio que remueve los gases ácidos de azufre, este proceso ha sido desarrollado por Cork en 1982. En este sistema biológico, el oxígeno es reemplazado por bióxido de carbono como aceptor final de electrones, obteniendo como producto final azufre elemental.

Para que el azufre pueda ser utilizado por la actividad biológica, primero debe ser reducido, debido a esto, la reducción microbiana de los sulfatos es tan importante como la fijación del nitrógeno y la producción de oxígeno por vía biológica, ya que de todos estos procesos depende la vida del planeta.

## **2.2. Ciclo biogeoquímico del azufre.**

### **2.2.1. Sulfuretum.**

En la naturaleza el azufre forma un ciclo permanente, debido a que continuamente está oxidándose o reduciéndose por una serie de procesos biológicos o químicos. En el ciclo biogeoquímico del azufre, las transformaciones biológicas pueden deberse tanto a funciones metabólicas asimiladoras como desasimiladoras. A excepción de animales y humanos, muchas plantas, hongos y bacterias son capaces de realizar una asimilación por reducción de sulfatos para propósitos biosintéticos; durante este proceso el sulfato es transformado a sulfuro, el cual es necesario para la biosíntesis del azufre contenido en los compuestos celulares. Las bacterias sulfato-reductoras, sulfuro-reductoras, así como las sulfuro oxidantes quimiotróficas, fototróficas y las que oxidan el azufre, metabolizan el azufre mediante una función desasimiladora, la cual provee a todos estos microorganismos de energía.

Las bacterias sulfato-reductoras (BSR) intervienen en el ciclo del azufre mediante una función desasimiladora; este grupo de bacterias oxidan los compuestos orgánicos y transfieren los electrones liberados hacia los sulfatos como aceptor final de electrones. En este procedimiento el sulfato también es reducido, a través de diferentes pasos enzimáticos hasta formar sulfuro, el cual es excretado por las células.

Los microorganismos oxidadores también intervienen en la parte desasimiladora del ciclo del azufre; dentro de este grupo se encuentran: los *Thiobacillus* quimiolitótrofos y las bacterias del azufre fototróficas anoxigénicas. Estos grupos oxidan los compuestos de azufre reduciéndolos hasta formar sulfatos. Los electrones obtenidos son entonces transportados al oxígeno o son introducidos dentro de la cadena fotosintética transportadora de electrones. Una forma esquemática del ciclo del azufre se muestra en la Figura 2.

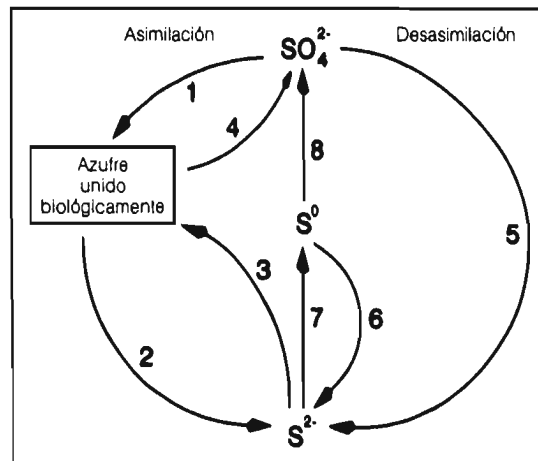


Figura 2 Ciclo del azufre  
(Modificado de Fischer, 1986; y Trüper, 1984).

Con respecto al proceso biológico, el sulfuro de hidrógeno (H<sub>2</sub>S) y el dimetil sulfuro (DMS) son los principales compuestos de azufre reducidos; estos, escapan a la atmósfera provenientes de los océanos, estuarios y continentes. Se ha calculado que 90 millones de toneladas de sulfuro de hidrógeno al año se liberan a la atmósfera provenientes de las zonas costeras; esto, se debe a la actividad de las bacterias sulfato-reductoras y proteolíticas. El principal compuesto de azufre volátil que escapa de los océanos hacia la atmósfera, es el dimetil sulfuro; este es producido principalmente por algas y se emiten anualmente 39 millones de toneladas (Fischer, 1986).

De acuerdo a Baas-Becking (1925), las comunidades bacterianas del azufre son llamadas "Sulfuretum", si éstas consisten de bacterias reductoras de sulfatos y oxidadoras de sulfuros, y si están a su vez involucradas dentro del ciclo biológico del azufre. La desasimilación del ciclo del azufre en una "Sulfuretum" es una combinación de un ciclo pequeño y uno grande. Dentro del ciclo del azufre pequeño, el azufre está solamente girando entre sulfuro y azufre elemental, este proceso ocurre principalmente en sedimentos marinos e involucra a una comunidad microbiana sintrófica anaerobia, como son: las reductoras de azufre (*Desulfuromonas*) y las bacterias del azufre fototróficas verdes.

El ciclo grande del azufre en el cual el azufre se encuentra cambiando continuamente entre sulfuro y sulfato, es el de mayor importancia para el balance del azufre en el ambiente, debido a que establece la interrelación entre las zonas óxicas y anóxicas de la *sulfuretum* (Trüper, 1984). Existen diferentes grupos de bacterias que son involucrados en este ciclo, por ejemplo, bacterias fototróficas anoxigénicas y oxigénicas, reductoras de sulfatos, *Thiobacillus*, bacterias metanogénicas, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thiobacterium*, *Thiospira*, *Thiovalum* y algunas bacterias heterotróficas (Trüper, 1984; Fischer, 1986). Los compuestos de azufre usados por estos organismos pueden servir como aceptores de electrones o como donadores de electrones.

Las "sulfuretum" no están restringidas a los sedimentos marinos, también se encuentran en los lagos meromíticos y en las partes oscuras de los océanos, estos yacimientos de azufre están regularmente en estado estacionario. Otros ambientes, en los cuales existen grandes cantidades de compuestos de azufre y no exceden de ciertas temperaturas, se les llama "solfataras". Las arqueobacterias termoacidófilas anaerobias se encuentran predominantemente en este tipo de habitat y contribuyen a que el azufre se mueva de una forma reducida de azufre elemental a sulfuro de hidrógeno. Entre los miembros de este grupo bacteriano se encuentran: *Thermoproteus*, *Thermodiscus*, *Pyrodictium*, *Desulfurococcus* o *Thermococcus*. Las bacterias metanogénicas encontradas en sedimentos marinos, desechos de digestores o en aguas termales azufrosas, son capaces de realizar también una desasimilación en la reducción de sulfatos para formar sulfuro de hidrógeno añadiendo metano (Stetter y Gaag, 1985).

### 2.2.2. Microorganismos en el ciclo del azufre.

Como se ha visto, diferentes grupos de bacterias están involucradas en el ciclo del azufre de manera natural, y es posible clasificar a estos microorganismos dentro de cinco diferentes tipos metabólicos de bacterias, dependiendo de la manera en que ellas utilizan los compuestos de azufre inorgánico (Trüper, 1984):

a) Desasimilación anaerobia en la reducción de sulfatos ( $\text{SO}_4$ ).- Los organismos de este tipo son bacterias sulfato-reductoras, tales como: *Desulfovibrio*, *Desulfotomaculum*, *Desulfomonas*, *Desulfobacter*, *Desulfobulbus*, *Desulfococcus* o *Desulfosarcina*. Estas bacterias utilizan sulfatos, tiosulfatos o sulfito como aceptor de electrones y compuestos orgánicos o hidrógeno molecular como donadores de electrones, produciendo sulfuro de hidrógeno. Diferentes compuestos orgánicos y el bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) sirven como fuente de carbono.

b) Desasimilación anaerobia en la reducción de azufre ( $\text{S}^0$ ).- Esta parte del metabolismo, puede ser realizada por *Desulfovibrio* y cepas de *Campylobacter*, *Desulfuromonas*, *Beggiatoa*, arqueobacterias metanogénicas y termoacidófilas y solamente en la oscuridad por bacterias del azufre fototróficas verdes y otras púrpuras.

En este caso, el azufre elemental sirve como aceptor de electrones y es reducido a sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ). Los compuestos donadores de electrones, son: los compuestos orgánicos y el hidrógeno molecular y las fuentes de carbono que utilizan son el bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) y diferentes compuestos orgánicos.

c) Oxidación del azufre por bacterias fototróficas anaerobias.- Algunas cianobacterias y muchas bacterias fototróficas anoxigénicas pertenecen a este tipo de metabolismo. Los organismos necesitan reducir los compuestos de azufre (por ejemplo:  $\text{S}^0$ ,  $\text{S}^{2-}$  y  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ) como donadores de

electrones para realizar su fotosíntesis anaerobia y para la fijación del  $\text{CO}_2$ . Generalmente los compuestos de azufre son oxidados a sulfatos y el  $\text{CO}_2$  y/o los compuestos orgánicos son usados como fuentes de carbono.

d) Oxidación del azufre por bacterias quimiotróficas aerobias.- Las bacterias que realizan esta clase de metabolismo, oxidan los compuestos de azufre reducidos bajo condiciones aerobias hacia sulfatos y transfieren los electrones liberados al oxígeno como aceptor de electrones final. Sus fuentes de carbono son  $\text{CO}_2$  o compuestos orgánicos. Microorganismos tales como *Thiobacillus*, *Sulfolobus*, *Thermothrix*, *Paracoccus*, *Pseudomonas*, *Beggiatoa*, *Thiothrix*, *Thiospira*, *Thioploca*, *Achromatium*, *Thiobacterium*, algunas cromatiáceas (sólo en la oscuridad) y muchos heterótrofos realizan este tipo de metabolismo.

e) Oxidación del azufre por bacterias quimiotróficas anaerobias.- Con las bacterias fototróficas, sólo especies como *Thiobacillus desnitificans* y *Thiomicrospira desnitificans* pueden oxidar los compuestos de azufre reducidos en ausencia de oxígeno hacia sulfato. El  $\text{CO}_2$  es la única fuente de carbono utilizada siendo el nitrato el aceptor final de electrones, el cual es reducido a nitrógeno.

*Desulfurolobus Ambivalens* es un microorganismo quimiolitio-autótrofo obligado, se le encuentra en las aguas sulfatadas calientes y ácidas, así como en lodos o suelos de limo. Utilizan solamente el bióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ) como fuente de carbono y el azufre elemental ( $\text{S}^0$ ) como fuente de energía. En presencia de oxígeno el azufre elemental es oxidado hacia ácido sulfúrico y bajo condiciones anaerobias estrictas es reducido hasta sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Zillig *et al.*, 1986).

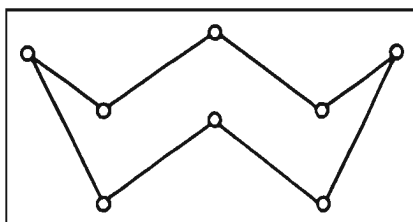
## 2.3. Química del azufre.

### 2.3.1. Estructura química y propiedades del azufre.

El azufre es el séptimo y último elemento del grupo VI del sistema periódico, perteneciente a los macrominerales. Sus estados oxidativos van desde +6 como ión sulfato (sulfatos diversos y ácido sulfúrico), hasta -2 como ión sulfuro (sulfuro de hidrógeno). El azufre elemental cuyo estado oxidativo es cero, es casi insoluble en agua ( $5 \mu\text{gS}_8/\text{l}$  a  $25^\circ\text{C}$ ), pero presenta una alta solubilidad en el disulfuro de carbono ( $\text{CS}_2$ ). Actualmente, se conocen 19 diferentes formas alotrópicas de azufre, y gran cantidad de estos compuestos están formados por moléculas cíclicas  $\text{S}_n$  (Schmidt, 1973; Steudel, 1984). Los alotropos de azufre más importantes son el alfa-azufre (azufre ortorrómbico con moléculas cíclicas  $\text{S}_8$ ), los beta-azufre (azufre monoclinico con moléculas cíclicas  $\text{S}_8$ ), y los  $\mu$ -azufre (moléculas amorfas  $\text{S}_x$  con largas cadenas variables).

Los cristales ortorrómbicos amarillos de alfa-azufre, son los compuestos más estables a temperatura ambiente. Debido a esto todas las configuraciones de azufre a temperaturas normales se invierten cambiando a alfa-azufre, el cual es ampliamente encontrado en la naturaleza (Fischer, 1986 y Meyer, 1968).

Dentro de las propiedades físicas, se sabe que el azufre ordinario es una sustancia sólida y amarilla que forma cristales ortorrómbicos ó monoclinicos cuando cristaliza después de ser fundido. Las moléculas de azufre de ambas formas cristalinas son moléculas ciclo-octánicas ( $S_8$ ) que poseen la configuración de un anillo en zigzag (Fischer, 1986 y Meyer, 1968); siendo esta la forma más estable en la cual se encuentra el azufre (ver Figura 3).



*Figura 3 Conformación molecular del azufre ciclo-octánico ( $S_8$ ) (Fischer, 1986; y Meyer, 1968).*

Por lo que se refiere a las propiedades químicas del azufre éste comparte propiedades muy similares a las del oxígeno; debido a la posición que guardan dentro de la tabla periódica, lo cual los hace compartir el mismo grupo, y por consiguiente asemejan sus propiedades. Las propiedades químicas del azufre se presentan en la Tabla 4.

**TABLA 4. PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DEL AZUFRE.**

PROPIEDAD QUÍMICA	VALOR OBTENIDO
Símbolo	S
Número atómico	16
Peso atómico	32.06
Punto de fusión	119.25 °C (monoclinico) 112.80 °C (ortorrómbico)
Punto de ebullición	444.6 °C
Electronegatividad	2.44
Estructura	ortorrómbica y monoclinica

(Ulrich Fischer, 1989. Sulfur in Biotechnology.)

El azufre producido por las bacterias que lo metabolizan, está formado por átomos de azufre ortorrómbico (Truper y Hathaway, 1967). En 1970 Hageage *et al.* demostraron que el azufre intracelular de las bacterias púrpuras, se observa como un líquido ligeramente viscoso al cual se le conoce como "azufre plástico"; este compuesto tiene una forma lineal muy larga y guarda pequeñas cantidades de agua dentro de su estructura. Por otra parte Steudel *et al.* (1987) pudieron comprobar que los aglomerados de azufre provenientes de *Thiobacillus ferrooxidans*, están formados por un núcleo hidrofóbico lo cual hace a los aglomerados hidrofílicos de tal forma que estos se encuentran rodeados por agua de hidratación (Figura 4).

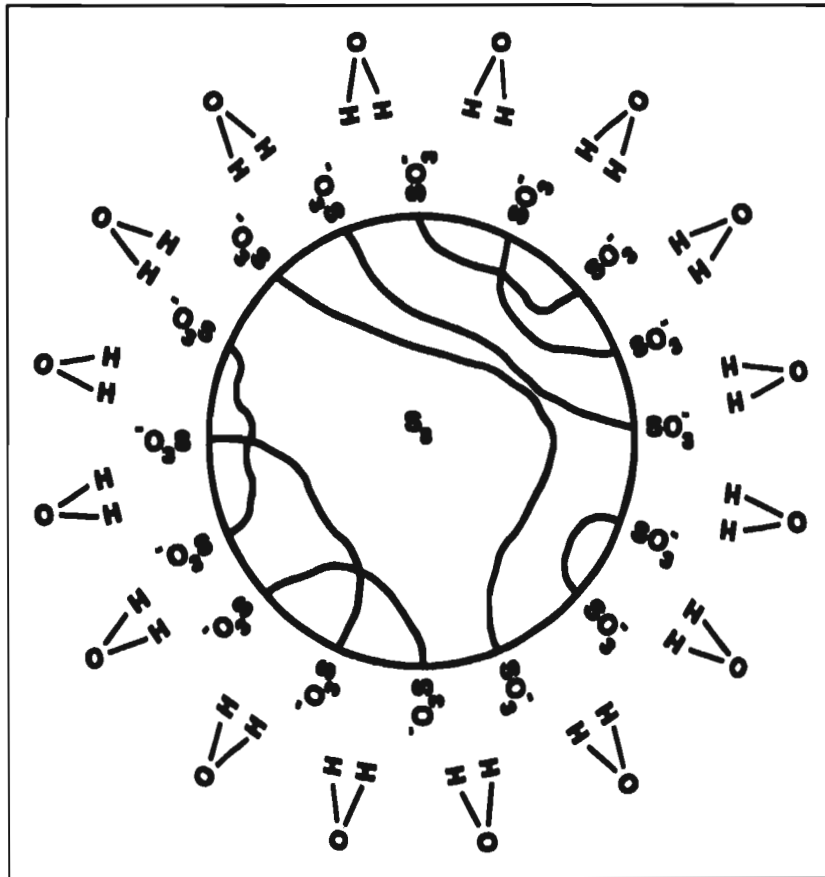


Figura 4 Estructura del azufre elemental formado por microorganismos (*Thiobacillus ferrooxidans*). Steudel *et al.*, 1987.

Con base en lo anterior, Steudel y colaboradores (1987) propusieron la siguiente fórmula química para el azufre elemental formado por la actividad metabólica de *Thiobacillus ferrooxidans*.





### 2.3.2. Usos del azufre.

El azufre elemental es utilizado dentro de una gran variedad de compuestos principalmente como materia prima y muy rara vez es usado como componente de un producto final. Gran parte del azufre es convertido a productos químicos como intermediarios antes de ser usados por la industria. El compuesto más importante proveniente del azufre es el ácido sulfúrico. Mundialmente se consume alrededor del 88% del azufre para fabricar este producto, mientras que el 12% restante se emplea para producir otros compuestos de azufre. Más de la mitad del ácido sulfúrico producido es utilizado en la agricultura para la preparación de fertilizantes (sulfato de amonio, fosfato de amonio y polifosfatos). Desafortunadamente, los fertilizantes fosfatados de alto grado no contienen las cantidades de azufre que la planta necesita para crecer; debido a esto, se adicionan cantidades pequeñas de tiosulfato de amonio y polisulfuros. En otras ocasiones se adiciona yeso (sal de Gypsum:  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) para cumplir con este requisito (Bixby *et al.*, 1983).

Otra importante aplicación que se le está dando al azufre en Estados Unidos es para la preparación de material para la construcción de caminos al cual se le ha llamado "pavimento asfalto-azufre". Tanto en los asfaltos como en el concreto el azufre sirve como pegamento. Se ha comprobado que al adicionar un 30% de azufre al asfalto provoca disminución en la viscosidad a temperaturas superiores a los  $130^\circ\text{C}$ , lo cual no ocurre con los asfaltos convencionales. Además, estos pavimentos asfalto-azufre mejor conocidos como pegamentos son más resistentes a las altas temperaturas que se presentan durante el verano; esto protege a las carreteras ya que las hace más resistentes a los baches y deformaciones durante los meses más calurosos.

Los concretos reforzados con azufre y utilizados como pegamento forman una mezcla consistente de alta calidad, las propiedades mecánicas de estos materiales son muy semejantes e incluso comparables a los concretos fabricados con el cemento comercial (por ejemplo: el Portland). También, se ha demostrado que los concretos con azufre son resistentes a la corrosión de sales y ácidos. Este material ha sido utilizado en puentes cubiertos, tanques, columnas y tuberías; obteniéndose buenos resultados. Existen muchas otras aplicaciones para el azufre, como se indica en la Tabla 5.

**TABLA 5. DIFERENTES USOS DE LOS COMPUESTOS DE AZUFRE**

ÁREAS DE APLICACIÓN	CONSUMO (%)	USO 1*	USO 2*	EJEMPLOS
Agricultura	54	+		fertilizantes
Química	17	+		detergentes, resinas, farmacéutica, colorantes, aditivos, insecticidas, anticongelantes.
Pigmentos	5	+		pinturas, esmaltes, tintas, pigmentos de titanio.
Rayón y películas	3	+		textiles, rayón, celofán, goma, películas fotográficas.
Refinerías	2	+		gasolinas, lubricantes y otros combustibles
Hierro y acero	1	+		agentes limpiadores de acero
Otras industrias	6	+		explosivos, caucho, baterías, metales no ferrosos
Celulosa y papel	3		+	procesamiento de la pulpa para rayón, películas y papel.
Tratado y purificado	3		+	vulcanización, insecticidas, fungicidas, azufre para suelos.
Disulfuro de carbono	3		+	rayón, celofán y caucho.
Otros usos	3		+	tratamiento de pieles, fotografía, colorantes, blanqueadores, extracción de la semilla de soya.

Uso 1\* es cuando se utiliza como ácido sulfúrico. Uso 2\* es cuando se emplea en forma de otros compuestos no-ácidos de azufre, (Greenwood N. N. y Earnshaw A., 1986. Chemistry of the Elements.).

## **CAPÍTULO 3**

### **REVISIÓN Y ANÁLISIS DE BIBLIOGRAFÍA.**

#### **3.1. Biodesulfuración de petróleo.**

En México, no hay experiencias con procesos de biodesulfuración aplicados a crudo o derivados. Por lo tanto se carece de información en el tema. En Estados Unidos y varios países europeos este proceso ha sido aplicado al carbón desde hace más de 30 años (Zarubina *et al.*, 1959; Silverman, 1963).

Por lo que respecta a la biodesulfuración de crudo y sus derivados los estudios que se tienen son más recientes; los primeros resultados se obtuvieron a partir de estudios de biorrestauración de derrames de crudo sobre las costas (Walker *et al.*, 1975, 1976). A partir de esto se han seguido líneas de investigación más detalladas en biodesulfuración de petróleo y algunos derivados (Tae Sung Kim *et al.*, 1990; Monticello, 1994; Limaza *et al.*, 1995).

Se tienen algunas investigaciones en la literatura que describen la biodesulfuración de los crudos pesados. Este tipo de petróleo ha sido clasificado con base a su localización geográfica señalándose un rango en el contenido de azufre total de 4% a 8.4% en peso, y una densidad mayor a los 10° API (Rühl, 1982).

Estudios de laboratorio realizados principalmente en Estados Unidos, Alemania, Francia y Canadá sobre biodesulfuración de petróleo, en donde se ha trabajado con cultivos mixtos puros (Walker *et al.*, 1975; Fedorak *et al.*, 1988; Deroo *et al.* 1974; Atlas *et al.*, 1981; Eckart *et al.*, 1980; y otros), han demostrado que la biodegradación de los compuestos de azufre se lleva a

cabo *in vitro* e incluso *in situ*; esto se ha comprobado en yacimientos de petróleo y derrames en donde las condiciones ambientales han sido propicias para que asociaciones bacterianas lleven a cabo una degradación selectiva.

México es uno de los países cuya calidad de crudo no es muy favorable ya que contiene un alto porcentaje de azufre en comparación con sus principales competidores, como: Arabia Saudita, Kuwait, Irak, Estados Unidos, y otros países (Anuario Estadístico de PEMEX, 1994); esto se puede apreciar en la Tabla 6.

**TABLA 6. CONTENIDO DE AZUFRE TOTAL EN CRUDOS DE MÉXICO Y DE OTROS PAÍSES.**

<b>PAÍS</b>	<b>AZUFRE TOTAL (%)</b>	<b>GRAVEDAD (°API)</b>
<b>MÉXICO:</b>		
Ebano Pánuco	5.38	12
Maya	4.38	22.6
Naranja-Cerro Azul	3.80	20
Poza Rica	2.00	35
<b>PERÚ</b>	0.12	33.5-35.5
<b>ARABIA SAUDITA</b>	1.30-3.03	27-38
<b>LIBIA</b>	0.23-0.52	37-41
<b>IRAK</b>	1.97	35-36
<b>IRÁN</b>	1.12-1.66	31-38
<b>INDONESIA</b>	0.10	35
<b>CANADÁ:</b>		
Alberta	0.80	41
Midale	1.89	28-32
Weyburn	2.12	24-33
<b>ESTADOS UNIDOS:</b>		
Alaska-Cook Inlet	0.00	36
Alaska-Swanson River	0.16	29.7
Arkansas-Smackover	2.10	22.2

(Datos proporcionados por el Dr. Martínez Pereda P., 1995. Apuntes de la materia: Tratamiento de Aguas Residuales Industriales; DEPMI-UNAM)

Para solucionar el problema se está aplicando la hidrodesulfuración catalítica (Hastings y Van Driesen, 1988), proceso químico que opera a elevadas temperaturas (550 a 880°C) y presiones (150 a 300 psig). Ocasiona residuos contaminantes de alto riesgo por la gran cantidad de productos químicos que utiliza, los cuales se desechan por medio de una corriente acuosa; además, es un método muy costoso, difícil de operar, y no muy eficiente ya que destruye parte de los hidrocarburos tratados disminuyendo su valor energético.

Entre las investigaciones encontradas sobre biodesulfuración aplicada a crudos, se destaca la oxidación de los compuestos heterocíclicos de azufre presentes en el petróleo convencional, realizada por Walker y colaboradores (1975, 1976). En este trabajo se emplearon microorganismos provenientes de muestras de sedimentos contaminados por petróleo; por los resultados obtenidos, se concluyó que los compuestos con un núcleo aromático en el cual se encuentre presente el azufre ofrecen mayor resistencia a la biodegradación, y lo mismo ocurrió con hidrocarburos análogos.

Fedorak y Westlake (1983) reportaron la remoción de alquil-tiofenos, dibenzotiofenos puros y dibenzotiofenos con una y dos moléculas de carbono en su estructura. En esta investigación se trabajó con un crudo derramado en las costas de Francia y con microorganismos provenientes de muestras de agua marina, los cuales mostraron una respuesta favorable a la biodegradación; por los resultados obtenidos, se pudo apreciar que los microorganismos degradaban los compuestos de azufre en el siguiente orden de preferencia: C<sub>2</sub>-benzotiofenos presentó mayor preferencia a la biodegradación que C<sub>3</sub>-benzotiofenos; el dibenzotiofeno (DBT) puro fue mejor que el C<sub>1</sub>-DBT y este a su vez fue mejor que el C<sub>2</sub>-DBT. Con esto se concluyó que la susceptibilidad disminuye con el aumento del peso molecular y la sustitución de otras moléculas; no obstante algunos de estos compuestos heterocíclicos de azufre, fueron metabolizados sin una aportación de nutrientes en el medio lo cual se compensó con nitrato de amonio y fosfato, esto provocó un incremento en la cantidad y número de compuestos degradados.

En otra investigación realizada por Westlake (1983), se trabajó con dos tipos de crudo Americano, encontrándose que los heterocíclicos de azufre de bajo peso molecular (benzotiofenos con 2 y 3 átomos de carbono, DBT puros y con un átomo de carbono), sufrían degradación o se metabolizaban en 14 días usando una población microbiana mixta. Sin embargo, en este petróleo se pudo observar que dos de los compuestos complejos de azufre (un isómero de benzonaftotiofeno y otro compuesto no identificado) fueron resistentes a la acción bacteriana.

Un petróleo de Kumak (Japón) encontrado a una profundidad de 2300 m, se sometió a un ataque bacteriano *in vitro*; en los resultados obtenidos se pudo ver que este petróleo sufrió degradación en los compuestos heterocíclicos de azufre, quedando con una caracterización muy semejante a

los crudos de Kumak pero encontrados a una profundidad de 1350 a 2150 m en los cuales, se ha demostrado la existencia de microorganismos degradadores de compuestos de azufre trabajando *in situ* de manera natural (Westlake, 1983).

Posteriormente, trabajando en biorrestauración, Fedorak *et al.* (1988) demostraron la remoción de dos compuestos de azufre (sulfuro monocíclico y n-alquil), los cuales estaban presentes en un crudo proveniente del lago Bellshill, Escocia; para lograrlo se utilizaron dos cultivos bacterianos dentro del mismo lago, llegándose a la conclusión de que la biodegradación *in situ* es posible si se tienen las condiciones adecuadas para que los microorganismos se desarrollen.

En investigaciones anteriores se ha demostrado que el metabolismo *in situ* de los compuestos de azufre presentes en un petróleo crudo, ocurre en una forma natural. Deroo *et al.* (1974) observaron la disminución de varios compuestos tiofénicos como benzotiofenos, dibenzotiofenos y naftobenzotiofenos, provenientes de un crudo del oeste de Canadá; de igual manera se observó la disminución de los n-parafínicos e isoprenos del petróleo; esta pérdida de compuestos de azufre e hidrocarburos en el crudo, se atribuyó a una degradación *in situ* ayudada por un lavado con agua que se realizaba en forma natural dentro del yacimiento de petróleo.

En 1976, ocurrieron dos derrames importantes de petróleo en las costas de Francia y de México. En un detallado estudio químico realizado al derrame del Amoco Cádiz en Francia, se pudo ver que la mezcla de petróleo residual en la zona litoral se enriqueció con componentes de hidrocarburos complejos y compuestos aromáticos de azufre orgánico como los dibenzotiofenos (Atlas *et al.*, 1981). Gundlach *et al.* (1983) reportaron que los alquilos de los dibenzotiofenos persistieron como las principales moléculas aromáticas, estando presentes tres años después de este derrame. Esto dio como conclusión la presencia de un metabolismo selectivo a compuestos susceptibles, sugiriéndose que los dibenzotiofenos son más recalcitrantes a la biodegradación que otros compuestos del petróleo.

En el derrame de petróleo ocurrido en México por el pozo Ixtoc, el enriquecimiento de los dibenzotiofenos en la emulsión formada por el petróleo (conocida como "Mousse") se atribuyó a procesos fotoquímicos y físicos (Patton *et al.*, 1981). En estas pruebas no se encontró evidencia de que la degradación microbiana provocara el enriquecimiento; a pesar de estas observaciones se piensa que los compuestos de azufre orgánicos de alto peso molecular no pueden ser totalmente recalcitrantes a la biodegradación, debido a que no se acumularon en el ambiente. Finalmente, se piensa que la remoción *in situ* probablemente depende de un contacto prolongado con el consorcio microbiano.

De manera semejante en otros derrames estudiados por Atlas R.M. (1975) y Fedorak *et al.* (1983), se pudo observar la permanencia de los Dibenzotiofenos. Posteriormente, Dillon T.M. y colaboradores (1984) estudiaron la acumulación de los compuestos de azufre en plantas

marinas y animales; los análisis realizados en laboratorio y en campo, dieron como resultado la acumulación de los compuestos de azufre orgánico de alto peso molecular en varias especies de plantas marinas y animales.

En trabajos realizados a escala "Banco" sobre biodesulfuración, se ha demostrado que aparentemente en estudios *in vitro* e *in situ*, los heterocíclicos de azufre del petróleo son los menos susceptibles a la biodegradación comparándolos con sus hidrocarburos análogos. A pesar de ello, se ha producido una disminución de los compuestos de azufre del petróleo a través de la biodegradación, se piensa que las condiciones podrían ser mejoradas para desarrollar un proceso de biodesulfuración en crudos.

En 1980 Eckart *et al.* evaluaron la habilidad de varios cultivos mixtos aerobios para desulfurar petróleo crudo con 1.69% en peso como azufre total. En dos de los cultivos más activos se produjo un crecimiento satisfactorio, utilizando un medio mineral libre de azufre con petróleo como la única fuente de carbón y azufre. Después de cinco días de incubación a 30°C se midió la cantidad de petróleo perdido, dando como resultado un 25% de pérdida. A pesar de esto, los resultados fueron satisfactorios ya que se observó una disminución del 55% como azufre total en el crudo, el cual se pudo recuperar en la fase acuosa del efluente obtenido.

En otros estudios se ha tratado primeramente a los microorganismos para lograr un precrecimiento usando un medio inducido, con una solución salina como biocatalizador. Estas células al ser utilizadas, efectivamente oxidaron el dibenzotiofeno disuelto en un crudo con poco azufre. De la misma manera, al ser probadas en un petróleo pesado se pudo ver que efectivamente removieron el dibenzotiofeno del crudo convirtiendo el 100% de este compuesto en productos polares en un tiempo de 5 horas a temperaturas de 55°C (Finnerty *et al.*, 1983; Finnerty y Hartdegen, 1984). El biocatalizador demostró ser específico en la remoción de los heterocíclicos de azufre bajo condiciones específicas de operación y con una oxidación no importante de los hidrocarburos.

En lo que se refiere a la biodesulfuración aplicada a crudos de tipo pesado (densidad mayor a 10° API) se tienen pocos estudios, algunos de estos son los siguientes:

Foght y Westlake (1985) estudiaron la biodesulfuración de dos tipos de crudo pesado bajo condiciones aerobias, para esto se trabajó con un cultivo bacteriano mixto y otro puro. Usando cromatografía de gases se pudo observar sólo cambios menores en los compuestos de azufre y un pequeño decremento en el contenido de azufre total. Esto hace pensar que la mayoría del azufre orgánico en el crudo pesado no es realmente viable a la oxidación microbiana, debido a la complejidad de las moléculas; a esto se añade la reducción del área de contacto interfacial ocasionada por la alta viscosidad que presenta el crudo pesado.

Eckart *et al.* (1981, 1982) aplicaron la biodesulfuración a fracciones provenientes de destilados de petróleo pesado. Emplearon cultivos mixtos aerobios y con las siguientes fracciones: Gas de petróleo (1.2-2.0% de azufre total); destilados de vacío (1.8-2.0% de azufre total); y combustible residual (con más de un 4% de azufre total). Los cultivos fueron alimentados con estas fracciones como única fuente de carbón y azufre; además, se utilizó un emulsificante para mejorar la desulfuración. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: después de 5 a 7 días de proceso, se logró una remoción de azufre de solamente un 5% en el destilado de vacío; más del 20% se obtuvo en el gas de petróleo y arriba del 25% en el combustible residual. Posteriormente se trató de mejorar la eficiencia en la remoción de azufre usando un medio mineral con extracto de levadura y glucosa; sin embargo, esto no incrementó la eficiencia en la biodesulfuración.

En otro estudio realizado por Eckart *et al.* (1982) se utilizó un combustible diesel derivado de un petróleo pesado, obteniéndose una remoción de azufre del 30% con un cultivo mixto de bacterias aerobias y empleando un espectrofotómetro de masas para realizar los análisis. Los resultados mostraron la remoción de dibenzotiofenos, benzotiofenos, y naftobenzotiofenos. Sin embargo, también se produjo una reducción de los compuestos aromáticos y en los n-alcanos del petróleo en un 60%.

Finnerty y Hartdegen (1984) mencionan que aislaron un microorganismo (sin especificar) el cual reducía la viscosidad del crudo pesado desde un 95% hasta un 98%. Después de realizar una emulsión estable con este organismo, se aplicaba otro cuya capacidad lograba cometabolizar a los dibenzotiofenos obteniéndose la eliminación de los compuestos de azufre orgánico, en un porcentaje bastante significativo. Se piensa que el disminuir la viscosidad del crudo, provocó que los microorganismos tuvieran mayor área de contacto lo cual mejoró de manera notable la eficiencia en la biodesulfuración.

Hartdegen y colaboradores (1984) propusieron un sistema para la biodesulfuración del petróleo, utilizaron una cepa alterada genéticamente la cual oxidaba a los dibenzotiofenos y liberaba como producto final compuestos sulfatados solubles en agua. Estos investigadores, propusieron un reactor el cual está diseñado con una membrana permeable que separa el petróleo de la fase acuosa. Para llevar este sistema a gran escala, una de las principales complicaciones se ha encontrado en el aspecto tecnológico más que en el biológico.

En 1986 Eckart, Köhler y Hieke reportaron que cultivos bacterianos mixtos bajo condiciones anaerobias fueron capaces de degradar los compuestos de azufre orgánico presentes en un petróleo crudo; para esto, emplearon cuatro cultivos que se obtuvieron de sedimentos marinos, en los que los principales microorganismos resultaron ser bacterias sulfato-reductoras del tipo *Desulfovibrio*, algunos micrococci y clostridia. En dos de los cultivos ensayados se pudo lograr una eficiencia en la biodesulfuración del petróleo superior al 40%, con tiempo de retención de



2 a 3 días bajo condiciones anaerobias estrictas, utilizando un fermentador en continuo con lactato como fuente de carbón y energía; sin embargo, la reacción de biodesulfuración se vio acompañada con una degradación de los hidrocarburos del petróleo, la cual no fue medida.

En estudios más recientes se ha trabajado principalmente con cepas de *Desulfovibrio desulfuricans*, *Desulfotomaculum orientis* y *Thermodesulfobacterium commune* pertenecientes al grupo de las bacterias sulfato-reductoras; este tipo bacteriano ha resultado eficiente en el proceso de biodesulfuración anaerobio. Estos estudios informan lo siguiente.

Tae Sung Kim y colaboradores (1990) trabajaron con un sistema innovador de biodesulfuración bajo condiciones anaerobias con ayuda electroquímica, para un petróleo crudo con 3% de azufre total. En esta investigación, se seleccionó una cepa de *Desulfovibrio desulfuricans* cultivándose en un medio "C" libre de sulfatos dentro de un sistema electroquímico al cual se le incorporó "metil viologen" ( $C_{12}H_{14}N_2C_{12}$ ) en el cátodo para regular el flujo de electrones. Debido a que la biodesulfuración anaerobia es un proceso Redox, éste se llevó a cabo con un equivalente reductor generado electroquímicamente (gas hidrógeno) el cual se incorporó dentro del metabolismo de electrones normal de la bacteria (Kim Y. y Kim H., 1988). Este estudio se enfocó a la evaluación del equivalente reductor generado electroquímicamente, observándose una mayor reducción de los compuestos de azufre orgánico mediante el gas inducido y la actividad de las bacterias sulfato-reductoras. Todo el proceso se llevó a cabo en el cátodo donde se encontraba la suspensión bacteriana en medio "C", petróleo con 3% de azufre, utilizando un voltaje de 2.5 y una temperatura de 30°C. Después de tres días de reacción se analizó el azufre orgánico del crudo, observándose una reducción del 21% y la disminución del mismo a partir de la producción de sulfuro de hidrógeno dentro del cátodo. Este estudio confirmó que las bacterias sulfato-reductoras pueden remover de manera más eficiente el azufre orgánico del crudo, si se utiliza un suministro electroquímico de electrones. Además, la actividad de desulfuración está relacionada con la actividad de hidrogenación del grupo bacteriano (Köhler *et al.*, 1984).

Realizando una ampliación del estudio anterior, Kim H. y colaboradores (1990) analizaron el porcentaje de remoción de diferentes compuestos orgánicos de azufre y los productos resultantes del proceso biológico. Una cepa de *Desulfovibrio desulfuricans* aislada de suelo fue utilizada. La biomasa se hizo crecer en un medio "C" (Postgate, 1984) bajo condiciones anaerobias, y utilizando una temperatura de 30°C. Los cultivos crecieron por espacio de tres días en tubos de presión anaerobia con 5% de inóculo. Posterior a esto, se utilizaron 70 ml del cultivo que se adicionaron a un medio "C" pero ahora libre de sulfatos; se le añadió un equivalente reductor (sulfuro de sodio) y una solución formada por compuestos de azufre orgánico al 2%. Esta suspensión se incubó por espacio de 5 días a una temperatura de 30°C. Los resultados muestran que la degradación se logro desde un 7% para el butanotiol, hasta un 96% para el benzotiofeno. Además, el producto resultante de la degradación del dibenzotiofeno fue el bifenilo,

determinándolo con un espectrofotómetro de Infrarrojo. La Tabla 7, muestra el porcentaje de degradación llevado a cabo por las bacterias sulfato-reductoras (*Desulfovibrio desulfuricans*) después de 5 días de reacción en varios compuestos de azufre orgánico.

Los autores concluyeron que las bacterias sulfato-reductoras utilizadas son eficientes en la degradación de los compuestos de azufre orgánico y que la aplicación de un equivalente reductor facilita el proceso de biodegradación. Además, con base en los resultados obtenidos, se puede decir que las bacterias reducen los compuestos de azufre orgánico mediante la ruptura solamente de los enlaces carbón-azufre. Y que, al parecer el azufre adherido a los anillos de benceno es removido más fácilmente.

**TABLA 7. PORCIENTO DE DEGRADACIÓN EN DIFERENTES COMPUESTOS DE AZUFRE ORGÁNICO, UTILIZANDO UNA CEPA DE *Desulfovibrio desulfuricans*.**

COMPUESTOS PROBADOS	PORCIENTO DEGRADADO (%)
Benzotiofeno	96
Fenilsulfur	73
Bencilsulfuro	49
Dibenzotiofeno	42
Bencildisulfuro	21
Etanotiol	9
Butanotiol	7

Monticello D.J. (1994) ha enfocado el biorefinamiento de las fracciones de petróleo hacia un proceso de desulfuración biocatalítico utilizando un reactor en continuo que opera a bajas temperaturas y presiones. Además, no requiere hidrógeno para llevar a cabo la reacción. En este reactor se adiciona petróleo crudo pesado, reactivos químicos y el biocatalizador; la mezcla resultante después de reaccionar es separada obteniéndose subproductos de azufre en fase acuosa, el biocatalizador es reincorporado al proceso (reciclado) y el crudo final queda libre de azufre.

Este proceso biocatalítico utiliza bacterias o sus enzimas correspondientes, las cuales funcionan como catalizadores dentro de reacciones muy específicas para liberar azufre, y dejar sin alteración los enlaces de hidrocarburos. Esto es análogo con la tecnología química que también utiliza catalizadores inorgánicos para producir sulfuro de hidrógeno y crudo desulfurado. Solo que en un proceso biológico las reacciones son más lentas por su misma naturaleza.

Estudios recientes como el de Lizama H. y colaboradores (1995) han seguido esta línea de trabajo, corroborando los resultados obtenidos por Tae Sung Kim *et al.* (1990). Lizama trabajó con tres especies de bacterias sulfato-reductoras las cuales crecieron en presencia de dibenzotiofeno (DBT) como única fuente de azufre y único aceptor de electrones; en esta investigación se pudo observar que el sulfuro de hidrógeno efectivamente es el producto de desasimilación en la reducción de azufre, y que, la especie *Desulfovibrio desulfuricans* fue mas eficiente que las otras dos especies probadas (*Desulfotomaculum orientis*, y, *Thermodesulfobacterium commune*). En los resultados de este trabajo se pudo ver que la producción de sulfuro de hidrógeno a partir del dibenzotiofeno fue abundante y visible, debido a la formación de sulfuro de hierro (precipitado negro generado a partir de la reacción del disulfuro de hidrógeno con el hierro ferroso soluble dentro del medio utilizado). Las tres especies de bacterias sulfato-reductoras fueron capaces de crecer con DBT aunque este crecimiento fue lento (3 días para *D. desulfuricans*, y, 5 para *T. Commune*). La relación de hierro a sulfuro fue muy cercana a uno, la producción de sulfuro total fue del 20% (FeS más H<sub>2</sub>S). Sin embargo, en la especie de *D. desulfuricans* no se menciona el porcentaje de remoción logrado en el dibenzotiofeno. En resumen, los resultados concluyen que especies como *D. Desulfuricans* y otras especies pertenecientes al grupo de las bacterias sulfato-reductoras, ofrecen la mejor alternativa frente a otros microorganismos en el proceso de biodesulfuración.

### **3.2. Biodesulfuración de compuestos de azufre puros.**

Por otra parte, hay investigaciones sobre el comportamiento del metabolismo microbiano en compuestos de azufre orgánicos puros. En estos estudios se ha probado que la degradación provoca la aparición de cambios extensivos en estas moléculas, como son: división de los anillos o pérdida de átomos en el compuesto. Los compuestos analizados en la biodegradación son los siguientes.

#### **3.2.1 Tiofenos (C<sub>4</sub>H<sub>4</sub>S).**

Se cree que el tiofeno puro es recalcitrante a la oxidación microbiana, ya que no se tienen resultados de la utilización de tiofeno por vía aerobia; y en estudios en donde se han utilizado cepas puras se ha visto que éstas no lo metabolizan por la vía aerobia (Amphlett y Callely, 1969; Cripps, 1973). Sin embargo, cuando se han utilizado compuestos tiofénicos sustituidos (no puros), la degradación microbiana aerobia ha ocurrido; provocando división del núcleo tiofénico y liberación de azufre inorgánico.

La viabilidad del metabolismo anaerobio en el tiofeno, ha dado buenos resultados. Kurita *et al.* (1971), utilizaron cultivos bacterianos provenientes de lodos de petróleo; después de cierto tiempo de contacto de los microorganismos con el tiofeno, se pudo ver la producción de sulfuro de hidrógeno y un crecimiento satisfactorio con polipeptona. Posteriormente, se trabajó con un

extracto de células libres, observándose producción de sulfuro de hidrógeno a partir del tiofeno usando la vía anaerobia y bajo la presencia de "metil viologen" ( $C_{12}H_{14}N_2C_{12}$ ); la degradación fue satisfactoria, pero no se aclara el destino de la fuente de carbono.

### 3.2.2. Benzotiofenos ( $C_8H_6S$ ).

La degradación anaerobia de los benzotiofenos mediante bacterias provenientes de lodo de petróleo producen sulfuro de hidrógeno y compuestos de carbón desconocidos (Kurita *et al.*, 1971). Maka *et al.* (1987) encontraron que los benzotiofenos pueden ser degradados bajo condiciones anaerobias, empleando cultivos mixtos aislados de carbón. Sin embargo el metabolismo no pudo ser identificado. En otro estudio desarrollado por Bohonos y colaboradores (1977), en donde se trabajó con cultivos mixtos enriquecidos recuperados de varias muestras de agua, se pudo demostrar la capacidad degradativa de estos microorganismos en los benzotiofenos, usando naftaleno como fuente de carbono. El análisis cromatográfico de los productos provenientes del cometabolismo, mostró oxidación de diferentes puntos de la estructura molecular de los anillos tiofénicos; en cambio, los anillos aromáticos no se vieron afectados.

La degradación de los benzotiofenos a través de un consorcio metanogénico que provenía de un acuífero, fue exitosa (Godsy y Grbic-Galic, 1988), obteniéndose como productos de la ruptura de anillos tiofeno-2-ol y ácido sulfónico 4-hidroxibenceno. En general, los compuestos heterocíclicos son más susceptibles a la degradación anaerobia (Godsy y Grbic-Galic, 1988).

### 3.2.3. Dibenzotiofenos (DBT: $C_{12}H_8S$ ).

Este compuesto se ha utilizado en forma bastante común para estudios de biodesulfuración en petróleo (Yamada *et al.*, 1968; Hou y Laskin, 1976; Claus, 1976; Monticello *et al.*, 1985). El dibenzotiofeno, generalmente se cometaboliza por bacterias (Hou y Laskin, 1976; Kodama, 1977; Monticello *et al.*, 1985; Foght y Westlake, 1988); no obstante, algunas cepas de *Acinetobacter* y *Rhizobium* (Malik y Claus, 1976), así como *sulfolobus acidocaldarius* (Kargi y Robinson, 1984), han sido capaces de crecer con dibenzotiofeno como única fuente de carbono.

Se han identificado productos provenientes del cometabolismo sobre los dibenzotiofenos, en estudios con *Pseudomonas* de varias especies. Con base en esto se han propuesto varias rutas metabólicas, las cuales por vía aerobia involucran la oxidación, seguida por la ruptura de un anillo de benceno pero sin la liberación del átomo de azufre, luego, el tercer carbón es fragmentado y liberado dentro de una etapa enzimática que aún no ha sido identificada (Kodama *et al.*, 1973; Monticello *et al.*, 1985; Laborde y Gibson, 1977; Foght, 1985). Un mecanismo diferente para el metabolismo aerobio en los dibenzotiofenos, involucra la liberación del azufre inorgánico del anillo tiofénico; esto se ha observado en estudios de biodesulfuración en carbón.

Isbister *et al.* (1988) demostraron con un sistema de radioclasificación para DBT, y con una bacteria modificada genéticamente y aislada de un sitio con abundante carbón, la capacidad de liberación específica que presentó éste microorganismo al ser tratado con S<sup>35</sup>-DBT (dibenzotiofeno isotópico). Esta bacteria liberó sulfato-S<sup>35</sup>, produciendo 2,2-dihidroxibifenil como un residuo orgánico no asimilable. Por otra parte, los organismos mixotrópicos termofílicos (*S. acidocaldarius*) liberaron sulfatos a partir de dibenzotiofeno (Kargi y Robinson, 1986; Blount F. *et al.*, 1986); sin embargo los residuos producidos no fueron identificados.

Los dibenzotiofenos también pueden ser metabolizados por vía anaerobia. Köhler *et al.* (1984) realizaron un estudio en el cual incubaron un cultivo de *Desulfovibrio spp* agregándole una solución de dibenzotiofeno diluido en petróleo parafínico, bajo condiciones sulfato-reductoras, después de 6 días de incubación, obtuvieron un 15.9% de desulfuración. Otra investigación similar usando dibenzotiofeno puro, fue la desarrollada por Maka *et al.* (1987), en donde se encontró una efectiva degradación bajo condiciones anaerobias utilizando cultivos mixtos aislados de yacimientos de carbón.

#### **3.2.4. Dibencilsulfuro (C<sub>14</sub>H<sub>14</sub>S).**

El metabolismo aerobio del dibencilsulfuro en cultivos bacterianos mixtos genera diversos productos solubles en agua, uno de los cuales es el ácido benzilmercaptoacético (Babenzien *et al.*, 1979). Esto ocurre bajo condiciones ácidas de pH (3.4 hasta 6.8) y con períodos de incubación de 4 días encontrando que se remueve el 14.5% del dibencilsulfuro. Una observación muy importante en este estudio se dio cuando al mantener un pH estable de 6.8 el cultivo bacteriano incrementa la velocidad de su metabolismo sobre el dibencilsulfuro.

Köhler *et al.* (1984) estudiaron el metabolismo anaerobio del dibencilsulfuro dentro de la especie de *Desulfovibrio sp.* en un medio de lactato. Cultivos incubados con dibencilsulfuro-S<sup>35</sup> liberaron sulfuro-S<sup>35</sup>. Por otra parte, el tolueno y el bencilmercaptano fueron identificados como metabolitos del dibencilsulfuro.

#### **3.2.5. Otros compuestos de azufre orgánico.**

Se ha investigado el metabolismo de la biodesulfuración en compuestos orgánicos de azufre más específicos como: alquiltiofenos, fenil sulfuros, n-octil sulfuro, tioxanteno, trianteno, trianafteno, dibencildisulfuro, butilsulfuro, y octilsulfuro.

Fedorak *et al.* (1988) demostró la degradación del alquiltiofeno usando bacterias y hongos. El proceso dio como resultado la oxidación y ruptura del alquil unido a la cadena de carbonos para formar principalmente ácido carboxílico 2-tetrahidrotiofeno y ácido acético 2-tetrahidrotiofeno.

La velocidad en la biodegradación no fue determinada; pero se observó una importante degradación del anillo tiofénico.

Isbister y Doyle (1985) al utilizar una cepa pura de *Pseudomona putida*, lograron la oxidación del fenil sulfuro y n-octil sulfuro; sin embargo, el grado de eficiencia y los productos finales no fueron determinados. Por otra parte, al probar el tioxanteno y el tiantreno, estos fueron metabolizados hasta productos solubles en agua que no pudieron ser identificados (finnerty *et al.*, 1983; Foght y Westlake, 1988).

El tianafteno, dibencildisulfuro, butilsulfuro y octilsulfuro fueron probados en forma individual en la biodegradación. Estos cuatro compuestos fueron mezclados con petróleo parafínico e incubados bajo condiciones anaerobias utilizando cultivos de *Desulfovibrio sp.* (Köhler *et al.*, 1984). Los resultados condujeron a decrementos en el contenido de azufre desde un 3.5% hasta un 10%. Además, la actividad metabólica fue muy clara. Desafortunadamente, algunos compuestos de azufre orgánico encontrados en forma abundante en el petróleo crudo no se trabajan comercialmente como sustancias puras; éste es el caso de los alquilos de dibenzotiofenos y otros compuestos más complejos. Debido a esto, su metabolismo microbiano dentro de la biodesulfuración no ha sido investigado.

### **3.3. Biodesulfuración de carbón.**

La formación del carbón tiene su origen en las eras geológicas, a través de este tiempo el carbón se originó inicialmente por procesos biológicos terminando su formación con procesos químicos complejos. La composición del carbón así como sus propiedades, dependen en su totalidad de las condiciones ambientales que existieron durante el período de formación, el cual se ha dividido en dos etapas. En la primera se dio una alteración bioquímica de la materia orgánica (plantas principalmente) mediante microorganismos, los cuales redujeron los sulfatos presentes a formas activas de sulfuro ( $H_2S$ ) reaccionando con los sedimentos presentes formando piritita, cuando hay hierro; y compuestos de azufre orgánico en presencia de materia húmica (celulosa y lignito). En términos generales, el carbón con un alto contenido de azufre proviene de ambientes acuáticos salinos y el carbón con menor contenido de azufre fue producto de la formación en aguas dulces.

Los diferentes tipos de carbón son clasificados de acuerdo al número de átomos de carbono existentes en su molécula, resultando: turbas, lignito, carbón subbituminoso, carbón bituminoso, hasta antracita. La estructura molecular del carbón esta formada principalmente por átomos de carbono, hidrógeno, oxígeno y azufre; pero también se ha encontrado cierta concentración de metales pesados. Los compuestos de azufre orgánico en el carbón no son bien conocidos; sin embargo, se presume la presencia de sulfuros orgánicos, disulfuros, tioles, y tiofenos (Kargi, 1982).

En lo que se refiere a la desulfuración microbiana del carbón, existen varios estudios que tratan este tema ya que en Estados Unidos y otros países de Europa, uno de sus principales problemas es el elevado contenido de azufre en los combustibles fósiles, especialmente carbón. Además, debido a la crisis del petróleo de 1973 y 1979 se le ha dado mayor importancia al carbón como energético y también por su gran abundancia en la naturaleza (Schilling y Wiegand, 1987) en comparación con otros combustibles fósiles. En esta revisión bibliográfica se analiza en forma general la biodesulfuración aplicada al carbón.

Se tienen diferentes métodos químicos y físicos para remover los compuestos de azufre antes de la combustión del carbón los cuales son ya tradicionales, como la técnica de flotación de fondo que se aplica en la eliminación de partículas minerales que contienen azufre inorgánico (Palowitch y Deurbrouck, 1979); la flotación por espuma (Zimmerman, 1979), consiste en la separación física que se aplica a los minerales azufrados finamente distribuidos; y otras, como la separación electrostática y la separación magnética de alto gradiente (Beddow, 1981).

En una evaluación realizada por Morrison (1981) se asegura que los procesos químicos son viables para la remoción de azufre inorgánico del carbón pero no en la remoción de la porción orgánica, debido a la inexactitud que representa su determinación en este combustible.

En paralelo con el desarrollo de la tecnología química y física ha estado la biotecnología, en la cual se han aplicado diversos microorganismos para lograr la desulfuración del carbón. Existen varios autores que han enfocado sus investigaciones al desarrollo de este tema (Monticello y Finnerty, 1985; Olso y Brinckman, 1986; Finnerty y Robinson, 1986; Gouch, 1987; Kawatra *et al.*, 1987; Klein *et al.*, 1988). Uno de los estudios que más auge ha tenido dentro de esta área es la remoción de azufre inorgánico en carbón; el cual lleva más de 30 años de investigación (Zarubina *et al.*, 1959; Silverman, 1963).

La eliminación de azufre inorgánico en carbón es un proceso oxidativo, basado en la habilidad de los microorganismos para oxidar los compuestos de azufre reducidos que se encuentran en el carbón, logrando así, su transformación a productos solubles en agua. Los microorganismos capaces de oxidar los compuestos de azufre inorgánico como la pirita, pertenecen al grupo de las bacterias acidofílicas, y al de las bacterias oxidadoras de hierro entre las cuales se tiene a *Thiobacillus ferrooxidans* (autótrofa-mesofílica) una de las más estudiadas; esta bacteria convierte la pirita mediante una reacción oxidativa completa a ácido sulfúrico y sulfato férrico soluble en agua. Esta bacteria ha demostrado ser bastante eficiente logrando remociones hasta del 90% en la pirita con tiempos de residencia de 8 días (Chandra *et al.*, 1979).

Detz y Barvinchak (1979) estudiaron la oxidación microbiana en la pirita, para ello utilizaron 10 diferentes tipos de carbón cuyos tiempos de formación distaban entre si, observándose una gran variación en la cinética de reacción. En las muestras de carbón con mayor tiempo de

formación, los resultados no fueron satisfactorios ya que el proceso oxidativo fue muy lento y deficiente. En cambio en las muestras de carbón más recientes la cinética se vio favorecida así como el proceso oxidativo, el cual resultó bastante favorable, logrando una remoción del 90% en la pirita con tiempos de residencia de 15 días. Los autores concluyeron que los microorganismos trabajan mejor con muestras recientes de carbón; debido a que en las muestras de carbón con mayor tiempo de formación la superficie se cubre con productos oxidados, lo cual dificulta el acceso de los microorganismos y disminuye su eficiencia.

Aunque varios autores (Dugan y Apel, 1978; Detz y Barvinchak, 1979; Hoffmann *et al.*, 1981; Jilek y Beranova, 1982; y Pocas, 1984) han trabajado con bacterias mesofílicas (20 a 35°C) como la ya mencionada *T. ferrooxidans* o cultivos mixtos en los cuales predominaba este mismo microorganismo, otros han preferido el uso de *T. thiooxidans*, el cual remueve el azufre elemental formado en la superficie de la pirita (Norris y Kelly, 1982; Harrison, 1984). La mayoría de los autores han recomendado el uso de poblaciones mixtas ya que de acuerdo a las investigaciones realizadas, los cultivos mixtos resultan más eficientes que las cepas puras en el proceso.

Hoffmann *et al.* (1981) probaron 9 diferentes muestras de carbón. En una de ellas la velocidad de remoción de la pirita fue menor de lo que se esperaba. Al analizar el lixiviado de esta muestra se encontró una alta concentración de plomo y cromo mayor a las otras muestras de carbón. Este ejemplo es único ya que por lo general la microflora que oxida la pirita es tolerante a las altas concentraciones de metales pesados que presenta el carbón. En las muestras que mostraron una oxidación favorable, se logró una remoción de pirita hasta del 90% en 8 días.

Kos *et al.* (1981); McCready y Zentilli (1985); y Bos *et al.* (1986) comprobaron que el proceso de biodesulfuración reduce el contenido de los metales pesados en carbón mediante la oxidación, esto representa una gran ventaja ya que previene los problemas que ocasionan las cenizas con altas concentraciones de metales pesados, provenientes de las fábricas en donde se quema carbón; las cuales son desechadas en rellenos sanitarios y otra parte es incorporada a la atmósfera por el viento. Esto indica que un tratamiento microbiano previo a la combustión del carbón sería de gran ayuda para evitar los problemas de contaminación, como los que se tienen en aguas subterráneas y en la atmósfera.

Robinson y Kargi (1984) demostraron la habilidad de un microorganismo termófilo acidófilo (*Sulfolobus acidocaldarius*) para biodegradar dibenzotiofeno. Estos autores trabajaron con un sistema de reactores en dos etapas en el que *Sulfolobus acidocaldarius* removió el 40% del azufre orgánico a partir de compuestos inorgánicos.

Kargi (1986) desarrollo su investigación en un sistema de dos etapas, en la primera de ellas se llevaba a cabo una oxidación con microorganismos termofílicos (70°C) lográndose una remoción



completa de la pirita dentro de un tiempo de 4 a 6 días. En la segunda etapa, el inóculo empleado logró remover el 40% del azufre orgánico en 28 días; el microorganismo utilizado se cultivó previamente en un medio con dibenzotiofeno.

En el estudio realizado por Bos y colaboradores (1986) se pudo ver que las bacterias mesofílicas utilizadas en la oxidación de la pirita dejaban de crecer a un pH menor a 1.6; sin embargo, el proceso oxidativo continuó hasta llegar a un pH de 1.4. Se piensa que la variación en el pH depende del tipo de cultivo bacteriano utilizado, especie de carbón empleado, y de las condiciones aplicadas al proceso.

Muyzer *et al.* (1987) utilizaron anticuerpos fluorescentes específicos en una cepa de *T. ferrooxidans* para monitorear su crecimiento en el carbón. Se pudo ver que este microorganismo es muy fácil de aislar a partir de una muestra de carbón mediante una lixiviación; sin embargo, su importancia cuantitativa es baja. *T. ferrooxidans* es hábil para colonizar la pirita del carbón si se inocula como cultivo puro en una muestra de carbón esterilizado; no obstante, si la inoculación se hace en una muestra de carbón con una población propia y aclimatada; entonces, *T. ferrooxidans* no es capaz de establecerse y crecer. Obviamente, por que hay otras especies bacterianas activas que se lo impiden. Esto quiere decir que *T. ferrooxidans* es fácil de aislar a partir de una muestra de carbón pero no es capaz de interactuar con otro consorcio microbiano ya existente.

Kawakami *et al.* (1988) indicaron que el ión férrico producido por la oxidación ataca no solamente a la pirita y a los minerales azufrados, sino también a la estructura molecular del carbón provocándole una oxidación. Por otra parte, el cambiar la superficie del carbón ayudaría al proceso y en la adecuación del carbón para diferentes aplicaciones. En lo que se refiere a los minerales azufrados se ha visto que la reacción de oxidación ocasiona una disolución de los metales cuyos enlaces están unidos al sulfuro.

### **3.4. Discusión.**

Los estudios a escala "banco" en laboratorio (Eckart *et al.*, 1980, 1986; Finnerty *et al.*, 1983; Köhler *et al.*, 1986; Hartdegen *et al.*, 1984; Tae Sung Kim *et al.*, 1990; Monticello D.J., 1994), han demostrado que la biodesulfuración del petróleo se lleva a cabo de manera relativamente eficiente (ver Tabla 8). Sin embargo, en la mayoría de las investigaciones realizadas; se ha cuantificado una pérdida del hidrocarburo lo que ocasiona una disminución del poder calorífico en el crudo tratado y por consiguiente existe una pérdida de su valor como energético. Esto demuestra que el proceso de biodesulfuración debe de ser mejorado; para esto, podría ser viable el aplicar los avances en ingeniería genética y biotecnología. Además de estudiar más a fondo la química de los compuestos de azufre y su relación con los hidrocarburos del petróleo.

Es importante el desarrollo de la tecnología en esta área, ya que en la mayoría de las investigaciones realizadas, uno de los principales problemas ha sido el diseño del bioproceso. Otras opciones que se están utilizando en la biodesulfuración es el uso de técnicas como la electroquímica, que al parecer han mejorado la eficiencia del bioproceso.

Las investigaciones realizadas sobre biodesulfuración utilizando cultivos bacterianos mixtos y puros, han demostrado que varios compuestos de azufre orgánico pertenecientes al petróleo crudo y a algunos de sus derivados, pueden ser metabolizados o cometabolizados bajo condiciones aerobias; cabe mencionar que esto mismo ha ocurrido en condiciones anaerobias, pero con una mayor eficiencia y sin afectar al hidrocarburo, obteniéndose resultados viables. Por ejemplo, Tae Sung Kim *et al.* (1990) lograron eficiencias en la remoción del benzotiofeno hasta del 96% bajo condiciones anaerobias, utilizando bacterias sulfato-reductoras (*Desulfovibrio desulfuricans*). Eckart *et al.* (1986) utilizaron un fermentador en continuo obteniendo eficiencias mayores al 50% en la biodesulfuración medida como azufre total, estos autores trabajaron bajo condiciones anaerobias y con cultivos mixtos aislados de sedimentos de diferente origen; los microorganismos identificados fueron principalmente bacterias sulfato-reductoras del género *Desulfovibrio*.

Los estudios desarrollados dejan ver que una de las mejores opciones es la vía anaerobia, ya que las eficiencias obtenidas en la biodegradación de los compuestos de azufre por esta vía, han resultado satisfactorias (hasta del 96%). Dentro de la variedad de microorganismos probados en el proceso de biodesulfuración, las bacterias sulfato-reductoras han demostrado una mayor eficiencia, en comparación con otros microbios probados (*Acinetobacter*, *Rhizobium*, *Pseudomonas*, y otros). Este tipo de bacterias utiliza los compuestos de azufre para llevar a cabo su respiración anaerobia, es por esto, que les resulta relativamente fácil metabolizar los compuestos de azufre presentes en crudo o derivados; estos microorganismos funcionan mejor dentro de un consorcio microbiano (cultivos mixtos silvestres) que como cepas puras.

El biorefinamiento catalítico propuesto por Monticello (1994) ha demostrado ser eficiente en la remoción de los heterocíclicos de azufre, compuestos que son muy difíciles de remover con la hidrodesulfuración química. Este proceso utiliza bacterias o sus enzimas como biocatalizadores para remover el azufre de los hidrocarburos sin afectar su poder calorífico. Aunque, este concepto de "desulfuración biocatalítica" esta aún en desarrollo y no se ha manifestado el grado de eficiencia, se tiene confianza en que pueda ser viable técnica y económicamente en la desulfuración del petróleo pesado y algunos de sus derivados.

La Tabla 8, resume los principales estudios realizados en biodesulfuración de petróleo y algunos de sus derivados.

**TABLA 8. PRINCIPALES ESTUDIOS EN BIODESULFURACIÓN DE PETRÓLEO Y DERIVADOS.**

<b>AUTORES</b>	<b>MICROBIOS USADOS</b>	<b>COMPUESTOS PROBADOS</b>	<b>PORCIENTO DEGRADADO</b>	<b>AÑO</b>
Deroo <i>et al.</i>	*	benzotiofenos dibenzotiofenos naftobenzotiofenos	*	1974
Walker <i>et al.</i>	cultivo mixto	heterocíclicos de azufre	*	1975-1976
Eckart <i>et al.</i>	BSR	azufre total en: -petróleo -residuo -diesel	55% 25% 30%	1980-1982
Westlake <i>et al.</i>	cultivo mixto	alquiltiofenos, DBT, C <sub>1</sub> -DBT, C <sub>2</sub> -DBT	*	1983
Finnerty y Hartdegen	*	dibenzotiofeno	*	1984
Köhler <i>et al.</i>	BSR	Azufre-orgánico en crudo pesado	< 40%	1986
Fedorak <i>et al.</i>	cultivo mixto in situ	sulfuro monoclinico y n-alquil	*	1988
Tae Sung Kim <i>et al.</i>	<i>Desulfovibrio desulfuricans</i>	azufre-orgánico en crudo Bencildisulfuro DBT bencilsulfuro benzotiofeno	21% 21% 42% 49% 96%	1990
Monticello	*	azufre total en fracciones de crudo	*	1994
Lizama <i>et al.</i>	BSR	dibenzotiofeno	*	1995

\* No especificado.

Son pocos los compuestos de azufre orgánico puros que han sido probados (DBT, Tioles, Sulfuros, y Disulfuros) en estudios sobre degradación microbiana (ver Tabla 9). Uno de los compuestos más utilizados es el dibenzotiofeno por su fácil disponibilidad y por ser uno de los compuestos que están presentes en el petróleo; otros investigadores se han enfocado a evaluar el porcentaje de remoción en términos de azufre total (orgánico e inorgánico). Por otra parte, debemos de tomar en cuenta que los crudos y sus fracciones contienen moléculas de azufre orgánico tan complejas, que a la fecha no se conocen con exactitud todos los compuestos de azufre presentes en los crudos analizados. En el crudo mexicano no existen estudios que indiquen los tipos de compuestos de azufre que contiene.

**TABLA 9. ALGUNOS ESTUDIOS DE BIODESULFURACIÓN CON COMPUESTOS DE AZUFRE PUROS.**

AUTORES	MICROBIOS USADOS	COMPUESTOS PROBADOS	PORCIENTO DEGRADADO	AÑO
Yamada <i>et al.</i>	bacterias	Dibenzotiofeno	*	1968
Kurita <i>et al.</i>	cultivo mixto	Tiofeno	*	1971
Hou y Laskin	bacterias	Dibenzotiofeno	*	1976
Malik y Claus	<i>Acinetobacter rhizobium</i>	Dibenzotiofeno	*	1976
Babenzien <i>et al.</i>	cultivo mixto	Dibencilsulfuro	14.5%	1979
Kargi y Robinson	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	Dibenzotiofeno	*	1984
Köhler <i>et al.</i>	<i>Desulfovibrio spp.</i>	Dibenzotiofeno	15.9%	1984
Köhler <i>et al.</i>	<i>Desulfovibrio sp.</i>	Tianafteno Dibencildisulfuro Butilsulfuro y Octilsulfuro	desde un 3.5% hasta un 10%	1984
Monticello <i>et al.</i>	cultivo bacteriano	Dibenzotiofeno	*	1985
Fedorak <i>et al.</i>	bacterias y hongos	Alquiltiofenos	*	1988

\* No especificado.

En lo que se refiere a biodesulfuración de carbón, se están utilizando bacterias acidófilas y oxidadoras de hierro lográndose la oxidación de los compuestos de azufre reducidos hasta obtener productos solubles en agua. Debido a que el análisis del carbón muestra una concentración de azufre inorgánico muy elevada en comparación con la parte orgánica, la cual es difícil de cuantificar, las investigaciones se han enfocado principalmente a la biodegradación de la parte inorgánica como la pirita. En esta área se han obtenido excelentes resultados alcanzándose eficiencias de remoción hasta del 100% en azufre piritico (Kargi, 1986). Un resumen de algunos estudios realizados en biodesulfuración de carbón, se muestra en la Tabla 10.

**TABLA 10. PRINCIPALES INVESTIGACIONES EN BIODESULFURACIÓN DE CARBÓN.**

<b>AUTORES</b>	<b>MICROBIOS USADOS</b>	<b>COMPUESTOS PROBADOS</b>	<b>PORCIENTO DEGRADADO</b>	<b>AÑO</b>
Chandra <i>et al.</i>	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	pirita	90%	1979
Detz y Barvin	*	pirita	90%	1979
Hoffmann	Microflora del carbón	pirita	90%	1981
Robinson y Kargi	<i>Sulfolobus acidocaldarius</i>	azufre orgánico	40%	1984
Bos <i>et al.</i>	bacterias mesofílicas	pirita	*	1986
Kargi	*	pirita azufre orgánico	100% 40%	1986
Muyzer <i>et al.</i>	<i>Thiobacillus ferrooxidans</i>	pirita	*	1987
Kawakami <i>et al.</i>	microflora del carbón	minerales azufrados	*	1988

\* No especificado.

A pesar de que la remoción biológica del azufre inorgánico en el carbón ha dado resultados positivos, solo se considera solucionado en forma parcial el problema de las emisiones de SO<sub>2</sub> por la combustión del carbón; es por esto que varios autores se han inclinado por la

biodesulfuración del azufre orgánico en el carbón. Sin embargo, los resultados hasta ahora obtenidos no son del todo convincentes ya que las técnicas para determinar los compuestos de azufre orgánico en carbón no son confiables presentando error en la medición.

Existen pocos estudios de remoción de azufre orgánico en carbón (Robinson y Kargi, 1984; Kargi, 1986), en los cuales se han logrado eficiencias máximas del 40% a partir de microorganismos acidofílicos trabajando a altas temperaturas (hasta 70°C); sin embargo, esta parte del proceso no es muy viable ya que los tiempos mínimos de residencia en los cuales se logró la remoción del azufre orgánico fueron de 28 días, utilizando a *Sulfolobus acidocaldarius* en un proceso de dos etapas. Por otra parte, se ha comprobado que el proceso de biodesulfuración logra reducir el contenido de metales pesados presentes en el carbón, esto representa una gran ventaja ya que previene el problema de las cenizas con altas concentraciones de metales pesados, las cuales al ser confinadas en los rellenos sanitarios provocan la contaminación del agua subterránea por los lixiviados que se producen y otra parte de las cenizas se incorporan a la atmósfera por el viento. Esto indica que la aplicación de la biodesulfuración previa a la combustión del carbón, resultaría de gran ayuda para resolver parte del problema de contaminación ambiental que se vive.

En resumen los métodos biológicos aplicados a la biodesulfuración de carbón, crudo y algunos derivados, han recibido impulso en Estados Unidos, Alemania, Francia, Japón, Canadá y otros países. Sin embargo, este bioproceso aún está en investigación y los resultados que se tienen hasta el momento no son definitivos; debido a esto no se ha concretado su aplicación. En México se carece de información en el tema. En lo referente a biodesulfuración de combustóleo, no se tienen estudios específicos con este hidrocarburo en otros países, ya que la mayoría, se ha enfocado a la biodesulfuración de petróleo crudo ó carbón.

## **CAPÍTULO 4**

### **LAS BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS Y SU FUNCIÓN.**

#### **4.1. Definición.**

El nombre de bacterias sulfato-reductoras es proporcionado a una clase de microbios los cuales realizan una desasimilación en la reducción de sulfatos. En este proceso el ión sulfato actúa como un agente oxidador para lograr la desasimilación de la materia orgánica, función que hace el oxígeno en la respiración convencional. Una pequeña cantidad de azufre reducido es asimilado por el microorganismo, pero la mayor parte es liberado hacia el exterior del organismo en forma de ión sulfuro.

#### **4.2. Clasificación.**

Los dos géneros de bacterias sulfato-reductoras mayormente establecidos son: *Desulfovibrio* y *Desulfotomaculum*. Recientemente se han descubierto nuevos géneros como son: *Desulfobacter*, *Desulfonema*, *Desulfobulbus* y otros.

El género de *Desulfovibrio* es el mejor conocido, debido a que este tipo de bacterias son fáciles de aislar y purificar; generalmente son mesofílicas y pueden ser halófilas (salinas). Este género de bacterias no forma esporas y morfológicamente son curvas o sigmoides, bajo condiciones adversas de crecimiento o en cultivos viejos este género toma forma espiralada, la especie típica se le conoce como: *Desulfovibrio desulfuricans*. Por otra parte, el género de *Desulfotomaculum* puede ser mesofílica o termofílica, adoptando generalmente formas rectas; sin embargo bajo

condiciones adversas de crecimiento forma filamentos largos provocando confusión en la identificación, su movilidad es libre mediante flagelos peritricus. La especie termofílica más común es: *Desulfotomaculum nigrificans*. Todos los organismos pertenecientes a este género forman esporas y esto es precisamente lo que la distingue de los demás géneros de sulfato-reductoras. Tanto *Desulfovibrio* como *Desulfotomaculum* son Gram-negativas.

Los nuevos géneros descubiertos recientemente (Widdel, 1980; Pfennig, Widdel y Truper, 1981), son caracterizados de manera superficial por su morfología; pero también es importante determinar su habitat de crecimiento, fuente de carbón y movilidad, ya que estos factores determinan de manera más exacta el tipo de microorganismo estudiado. Una de las características taxonómicas principales para su clasificación es la determinación de la desasimilación en la reducción de sulfatos.

La Tabla 11 presenta la clasificación de las bacterias sulfato-reductoras realizada por Campbell & Postgate (1965, 1969); y, Postgate & Campbell (1966), bajo condiciones normales de crecimiento. Una característica importante que muestran las bacterias sulfato-reductoras, es su preferencia por ciertos sustratos que favorecen su crecimiento. La selección de estos sustratos de acuerdo al género y la especie ayudan en su clasificación (Tabla 12).

Existen otros sustratos más específicos como el piruvato, en el cual crecen solamente *D. desulfuricans*, *D. sapovorans*, *D. propionicus*, *D. multivorans*, *D. variabilis*, *D. nigrificans*, y *D. ruminis*; para *D. antarcticum* no se ha determinado y en las demás especies el crecimiento es nulo. El formiato acompañado de sulfato, permite el crecimiento de *D. baarsii*, *D. multivorans*, *D. limicola*, *D. variabilis* y *D. ruminis*; *D. magnum* y *D. acetoxidans* crecen de manera regular si se les agrega acetato. De manera general todas las especies pertenecientes al género *Desulfovibrio* crecen regularmente a excepción de *D. sapovorans* que no presenta crecimiento al igual que *D. postgatei*, *D. propionicus*, *D. nigrificans*, *D. orientis* y *D. antarcticum*.

El uso de glucosa y sulfato es un sustrato no muy favorable ya que solo permite el crecimiento de *Desulfotomaculum antarcticum*. En *D. desulfuricans* y *D. nigrificans* se ha observado crecimiento ocasional; el resto de las especies no crecen con este sustrato. En benzoato y sulfato se reproducen *D. multivorans*, *D. limicola*, y *D. magnum*, en *D. thermophilus*, *D. baculatus*, *D. baarsii*, *D. sapovorans*, *D. nigrificans*, *D. orientis* y *D. ruminis*; y en *D. antarcticum* no se ha estudiado el crecimiento. En el resto de las especies no hay crecimiento.

Las únicas especies termófilas de bacterias sulfato-reductoras encontradas son: *D. thermophilus*, y *D. nigrificans*. Las necesidades de cloruro de sodio son importantes para *D. salexigens*, *D. postgatei*, *D. limicola*, *D. magnum*, y *D. variabilis*. Estas dos características junto con el sustrato elegido por el microorganismo y su morfología, ayudan en su clasificación.



**TABLA 11. CLASIFICACIÓN DE BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS.**

<b>GÉNERO</b>	<b>ESPECIE</b>	<b>FORMA</b>	<b>MOVILIDAD</b>	<b>ESPORAS</b>
<i>Desulfovibrio</i>	<i>desulfuricans</i>	vibrio	+	-
	<i>vulgaris</i>	vibrio	+	-
	<i>gigas</i>	espiralada	+	-
	<i>africanus</i>	sigmoide	+	-
	<i>salexigens</i>	vibrio gordo	+	-
	<i>thermophilus</i>	bastón	+	-
	<i>baculatus</i>	bastón	+	-
	<i>baarsii</i>	vibrio	+	-
	<i>sapovorans</i>	vibrio	+	-
<i>Desulfobacter</i>	<i>postgatei</i>	bastón elíptico	-	-
<i>Desulfobulbus</i>	<i>propionicus</i>	limón o cebolla	-	-
<i>Desulfococcus</i>	<i>multivorans</i>	esférica	-	-
<i>Desulfonema</i>	<i>limicola</i>	filamento largo	deslizamiento	-
	<i>magnum</i>	filamento largo	deslizamiento girando	-
<i>Desulfosarcina</i>	<i>variabilis</i>	paquetes irregulares	algunas veces	-
<i>Desulfotomaculum</i>	<i>nigrificans</i>	bastón	rodando	+
	<i>orientis</i>	vibrio gordo	+	+
	<i>ruminis</i>	bastón	+	+
	<i>acetoxidans</i>	bastón	+	+
	<i>antarcticum</i>	bastón	+	+

(+) se mueven libremente a través de flagelos. (-) no tienen movilidad (no poseen flagelos).  
(adaptada de J. R. Postgate: The sulphate-reducing bacteria, 1984).

**TABLA 12. SUSTRATOS QUE FAVORECEN EL CRECIMIENTO DE LAS BACTERIAS SULFATO-REDUCTORAS.**

GÉNERO	ESPECIE	LACTATO + SO <sub>4</sub>	PIRUVATO + SO <sub>4</sub>	ACETATO + SO <sub>4</sub>	MALATO + SO <sub>4</sub>
<i>Desulfovibrio</i>	<i>desulfuricans</i>	+	+	-	+
	<i>vulgaris</i>	+	+	-	-
	<i>gigas</i>	+	+	-	-
	<i>africanus</i>	+	+	-	+
	<i>saalexigens</i>	+	+	-	+
	<i>thermophilus</i>	+	+	-	-
	<i>baculatus</i>	+	+	-	+
	<i>baarsii</i>	-	-	+	-
	<i>sapovorans</i>	+	+	-	-
<i>Desulfobacter</i>	<i>postgatei</i>	(±) <sup>h</sup>	-	+	-
<i>Desulfobulbus</i>	<i>propionicus</i>	+	+	-	-
<i>Desulfococcus</i>	<i>multivorans</i>	+	+	+	-
<i>Desulfonema</i>	<i>limicola</i>	+	+	+	-
	<i>magnum</i>	-	-	+	+
<i>Desulfosarcina</i>	<i>variabilis</i>	+	+	+	-
<i>Desulfotomaculum</i>	<i>nigrificans</i>	+	+	-	*
	<i>orientis</i>	+	+	-	*
	<i>ruminis</i>	+	+	-	*
	<i>acetoxidans</i>	-	-	+	-
	<i>antarcticum</i>	+	*	-	-

\* No especificado; (±)<sup>h</sup> crecimiento lento; + crecimiento satisfactorio; - no hay crecimiento. (adaptada de J. R. Postgate: The sulphate-reducing bacteria, 1984).

### 4.3. Metabolismo.

La desasimilación en la reducción de los sulfatos es un metabolismo de tipo oxidativo, a pesar del ambiente anaerobio en el cual se desarrollan este tipo de organismos y la división de dos procesos no oxidativos (desasimilación y transporte de electrones). Posterior a estos, está finalmente un proceso oxidativo, debido a esto, su metabolismo es muy cuestionado y no es aceptado de manera general (Postgate, 1984).

La reducción de los sulfatos se realiza mediante una serie de reacciones dentro de las cuales se tiene un sistema de tipo citocromo. Uno de los aspectos más interesantes de las sulfato-reductoras es la habilidad para reducir los sulfatos hasta sulfuro dentro de su protoplasma. Los sulfatos reducidos deben estar enlazados a un grupo enzimático o bien asociados a un sistema de transferencia de hidrógeno excepcional, ya que estas son las únicas bacterias capaces de utilizar a los sulfatos como aceptores de hidrógeno dentro de su metabolismo energético. La Figura 5 describe la posible ruta metabólica que siguen las bacterias sulfato-reductoras.

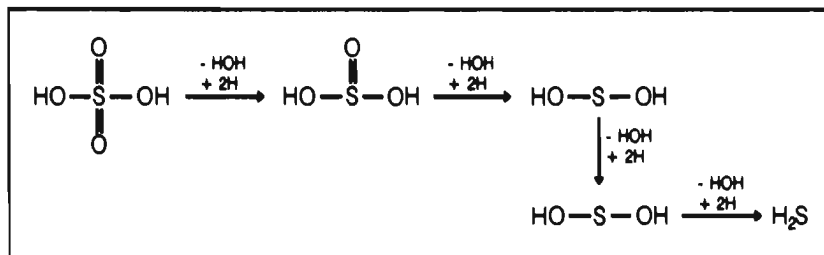


Figura 5 Posible ruta metabólica de las bacterias sulfato-reductoras (Ross E. McKinney, 1962. *Microbiology for Sanitary Engineers*).

### 4.4. Condiciones de crecimiento.

Las bacterias sulfato-reductoras son estrictas anaerobias y como tales requieren condiciones anaerobias para su crecimiento. Este grupo bacteriano se desarrolla en presencia de sulfatos excretando sulfuro; esto asegura la ausencia de oxígeno y el mantenimiento de un ambiente reducido. Otras veces se utilizan agentes oxido-reductivos como: cisteína, tioglicolato, o sulfuro de sodio, sustancias que aseguran un potencial negativo de -100 mV (Postgate, 1979) lo cual garantiza crecimientos exitosos.

El rango óptimo de pH para bacterias sulfato-reductoras va de 7.2 a 7.6 esto excluye la posibilidad de aislar bacterias sulfato-reductoras encontradas en ambientes ácidos (Satake, 1977). El valor del pH puede alterarse durante el crecimiento debido a la formación de bicarbonatos o por la pérdida del sulfuro producido (Abd-El Malek y Rizk, 1963).

La temperatura de incubación depende de la especie de sulfato-reductora que se esté estudiando. Las especies termofílicas como *D. thermophilus* y *D. nigrificans* son incubadas a 55°C, las especies mesofílicas como *Desulfovibrio* son incubadas a 30°C. Temperaturas mayores a 55°C pueden ser utilizadas en bacterias sulfato-reductoras aisladas de reservorios petroleros.

Las bacterias sulfato-reductoras encontradas en agua dulce tienen diferentes requerimientos de salinidad en comparación con las sulfato-reductoras aisladas de ambientes marinos. El género *Desulfotomaculum* no es nativo de ambientes salinos por lo que no requiere altas concentraciones de salinidad, los medios de crecimiento para cepas marinas generalmente son complementados con la adición de cloruro de sodio; sin embargo, muchas cepas marinas muestran una amplia tolerancia a diferentes salinidades (Kimata *et al.*, 1955; Postgate, 1963; Hardy, 1981). En un estudio desarrollado por Truper *et al* (1969) se observó que el requerimiento obligado en la salinidad estaba en el ión sodio y no en el ión cloruro como se esperaba.

Las bacterias sulfato-reductoras pueden crecer en un medio químicamente específico, pero generalmente su crecimiento es estimulado por la adición de extracto de levadura, esto incrementa la concentración del hierro disuelto (Postgate, 1951) proporcionando una fuente de carbono y nitrógeno así como un factor de crecimiento. El aislamiento y el crecimiento de algunos tipos de sulfato-reductoras en fuentes de carbono no muy comunes, requieren la adición de una mezcla vitamínica; por ejemplo, una solución de elementos traza como la formulada por Macpherson y Miller (1963) puede ser empleada cuando el medio carezca de extracto de levadura.

Muchos de los medios más comunes para bacterias sulfato-reductoras tienen una similitud en la jerarquía de los nutrientes inorgánicos, proporcionando los elementos esenciales para el crecimiento así como un exceso de sulfatos para lograr la desasimilación reductiva. Este grupo bacteriano requiere concentraciones importantes de hierro. Esto se comprueba perfectamente en la formulación de la mayoría de los medios de cultivo; por ejemplo, el medio "B" de Postgate requiere 97 mg/l de hierro lo que ayuda a la formación de sulfuro ferroso negro, la solubilidad del hierro puede verse incrementada por la adición de agentes quelantes como el citrato.

En este trabajo de investigación se utilizó un medio de cultivo formulado por el American Petroleum Institute, conocido como medio API RP38 (1965); este medio de cultivo es especial para bacterias sulfato-reductoras provenientes de zonas costeras y yacimientos de petróleo. El medio API RP38 utiliza como fuente de carbono lactato, otros compuestos que comprende este medio es cloruro de sodio, sulfato de magnesio, sal de Mohr, extracto de levadura, ácido ascórbico y fosfato de potasio. Al igual que el medio "B" y "C" de Postgate, el pH se ajusta entre 7 y 7.5. Los medios modificados utilizados, fueron modificaciones a este mismo medio (API RP38); el medio de cultivo sólido para contar las colonias de bacterias, que se uso fue el de Postgate modificado por Jacq; especial para gérmenes sulfato-reductores.

## ***CAPÍTULO 5***

### **COMPUESTOS DE AZUFRE IDENTIFICADOS EN CRUDOS.**

#### **5.1. El azufre en crudos estadounidenses.**

Se ha encontrado que la cantidad y tipo de compuestos de azufre en los crudos es muy variable, dependiendo del origen del crudo analizado. Sin embargo, para fines prácticos se ha considerado un contenido de azufre promedio desde 0.025 % hasta un 5 % para petróleo crudo convencional. Por otra parte, Ruhl (1982) caracterizó diferentes crudos de tipo pesado encontrando desde un 4 % hasta un 8.4 % como azufre total.

Monticello y Finnerty (1985) investigaron los diferentes compuestos de azufre en petróleo crudo, encontrando: azufre elemental, sulfatos, sulfitos, tiosulfatos, sulfuros y más de 200 compuestos orgánicos de azufre, entre los cuales se ha identificado sulfuros, tioles, tiofenos, benzotiofenos, dibenzotiofenos sustituidos, y gran variedad de moléculas complejas que aún no han sido identificadas. El contenido de azufre dentro de las fracciones provenientes de crudos, generalmente aumenta conforme se incrementa el peso molecular de acuerdo a la siguiente secuencia: los compuestos saturados tienen un contenido de azufre menor a los aromáticos, estos a su vez son menores a las resinas y estas últimas pueden ser menores o iguales a los asfaltenos.

En el petróleo de Texas, más del 70 % del azufre orgánico está presente como dibenzotiofeno (Finnerty y Robinson, 1986); mientras que en diferentes crudos del Este de Middle, Estados Unidos, el 40 % del azufre orgánico se encuentra como compuestos sustitutos de benzotiofenos y dibenzotiofenos.

En un estudio que duró 20 años realizado por el American Petroleum Institute (API) al que se le conoce como proyecto 48, se trató de evaluar los diferentes tipos de compuestos de azufre pertenecientes al petróleo crudo. En un inicio, solamente 25 compuestos orgánicos de azufre se habían identificado; entre estos se incluían a los tioles de bajo peso molecular, alquil sulfuros, sulfuros cíclicos, y tiofenos. Sin embargo, cuando terminó el proyecto se tenían identificados 176 compuestos orgánicos de azufre; estos fueron aislados, identificados, y agrupados dentro de 13 clases (Rall *et al.*, 1972). Las pruebas se llevaron a cabo con un crudo de Wason Texas, con 1.85% en peso de azufre total y una gravedad en grados API de 32.8°. La Figura 6 muestra la estructura química de los 13 compuestos orgánicos azufrados identificados en el crudo de Texas, agrupándolos dentro de 4 grupos químicos.

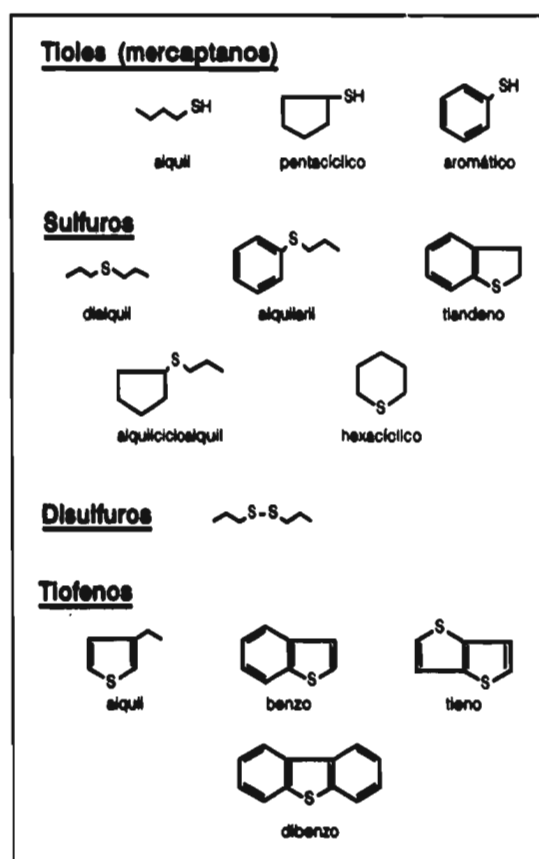


Figura 6 Compuestos orgánicos de azufre identificados por el proyecto 48 del American Petroleum Institute (Rall *et al.*, 1972).

Los disulfuros encontrados por el API en el petróleo fueron muy pocos, debido a que estos compuestos no son vistos como verdaderos constituyentes del petróleo; ya que se forman por la oxidación de los tioles (Speight, 1981).

Los derivados de los tiofenos son particularmente abundantes en el petróleo crudo con un alto contenido de aromáticos, resinas y asfaltenos (Tissot y Welte, 1984). Los dibenzotiofenos (DBTs) son frecuentemente los principales compuestos tiofénicos que maduran; esto quiere decir que van cambiando con el tiempo hasta que llegan a estabilizarse; en consecuencia, estos compuestos van modificando la calidad del petróleo crudo, lo que ocurre con mayor frecuencia en los crudos de tipo pesado.

Son pocas las fracciones del petróleo en las cuales se ha intentado determinar los compuestos de azufre que las forman. En los asfaltenos, naftas, y combustóleos se ha encontrado una gran cantidad de sulfuros, benzotiofenos, dibenzotiofenos, y anillos tiofénicos de elevado peso molecular en forma coloidal. Sin embargo, existen muchas otras moléculas complejas de azufre que no han podido ser identificadas (Cyr *et al.*, 1987). Drushel y Sommers (1967) investigaron los compuestos de azufre en las fracción de petróleo con elevado punto de ebullición (350°C hasta 500°C); encontrando grandes estructuras químicas con cuatro y cinco anillos bencénicos unidos a tiofenos (Figura 7). Por otra parte, se tienen trabajos (Later *et al.*, 1981; y Willey *et al.*, 1981) en combustibles sintéticos y crudos de lutitas (Shale) en los cuales se han separado, identificado y sintetizado compuestos heterocíclicos de azufre tales como: alquildihidrobenzotiofenos, alquildibenzotiofenos, benzonaftotiofenos, fenantrotiofenos, dinaftotiofenos, y benzofenantrotiofenos (Figura 8).

En 1974 Ho y otros investigadores propusieron tres tipos de petróleo; en base a la composición del azufre encontrado en diferentes crudos analizados (Tabla 13).

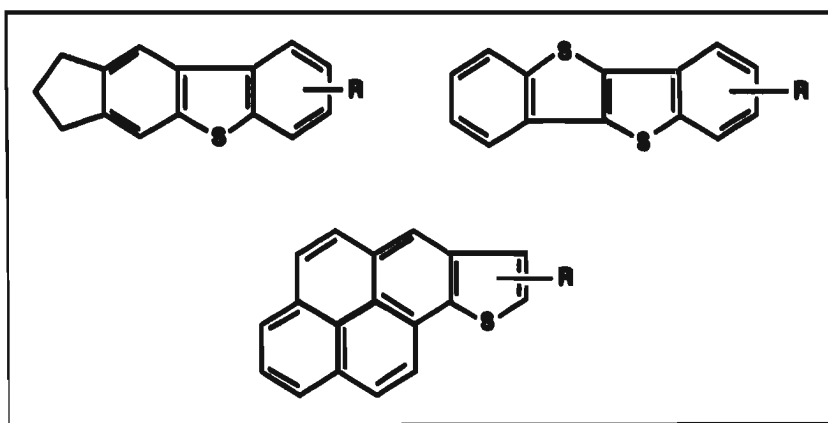


Figura 7 Compuestos de azufre identificados en diferentes fracciones de crudo (Drushel y Sommers, 1967).

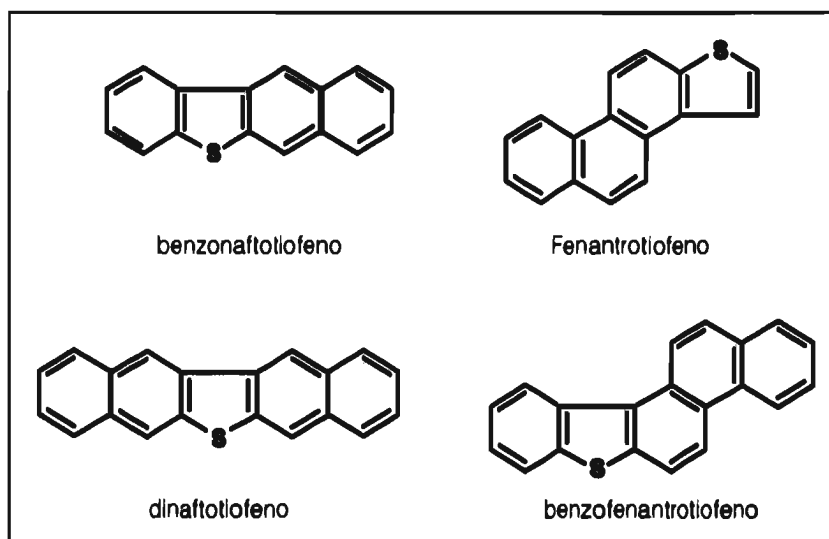


Figura 8 Compuestos de azufre identificados en combustibles sintéticos y lutitas de petróleo (Later et al., 1981; Willey et al., 1981).

**TABLA 13. CLASIFICACIÓN DE CRUDO DE ACUERDO AL TIPO DE COMPUESTOS DE AZUFRE IDENTIFICADOS.**

TIPO DE PETRÓLEO	TIPO DE YACIMIENTO	COMPUESTOS DE AZUFRE
Crudo no-maduro	yacimientos jóvenes no profundos	sulfuros no tiofénicos y benzotiofenos
Crudo maduro	yacimientos viejos más profundos	dibenzotiofenos y muy pocos benzotiofenos inestables
Crudo alterado	yacimientos poco profundos con lavado de agua y degradación microbiana <i>in situ</i>	composición de azufre entre el maduro y el no-maduro

(Ho et al., 1974. Evolution of Sulfur Compounds in Crude Oils.)

## 5.2. El azufre en crudos de México.

En México no se tienen estudios detallados que proporcionen la identificación de compuestos de azufre en crudo y en sus fracciones. El petróleo de México solamente es manejado por Petróleos Mexicanos (PEMEX) y es precisamente esta paraestatal la encargada de realizar estudios de



caracterización de combustibles a través del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP). La Comisión Federal de Electricidad (CFE) también realiza caracterizaciones generales de combustibles que recibe de PEMEX y otras instituciones a través del Instituto de Investigaciones Eléctricas (IIE); sin embargo, estos energéticos son en su mayoría combustóleos de diversos orígenes y aceites para lubricación y otros usos. Los análisis solo incluyen determinación de azufre total; sin que se conozcan los diversos tipos de compuestos de azufre orgánico e inorgánico en los energéticos analizados.

México ocupa uno de los primeros lugares como productor y exportador de crudo en el mundo. Se tienen varios tipos de petróleo crudo; pero, el Maya, el Istmo y el Olmeca, son los tres principales tipos de crudo que se comercializan. El petróleo Maya, es un crudo de tipo pesado que se extrae de la sonda de Campeche; el Istmo, es un petróleo crudo de tipo ligero obteniéndose de la región del Istmo de Tehuantepec; y finalmente se tiene el Olmeca, éste crudo es el de mejor calidad en el país, exportándose a partir de mayo de 1988. Desafortunadamente, la caracterización realizada a estos crudos, solo incluye la determinación de azufre total y otras propiedades generales. La Tabla 14, presenta el porcentaje de azufre total, densidad y viscosidad para los 3 crudos principales.

**TABLA 14. PRINCIPALES CARACTERÍSTICAS DE LOS CRUDOS MEXICANOS.**

<b>TIPO DE CRUDO</b>	<b>AZUFRE TOTAL (% peso)</b>	<b>DENSIDAD (°API)</b>	<b>VISCOSIDAD (ssv°)</b>
Maya	3.4	22.0-22.6	320
Istmo	1.8	32.0-33.0	60
Olmeca	0.77	39.0-40.0	2.94

ssv: viscosidad en segundos seybolt. (Informe Anual de la CFE, 1993)

Desafortunadamente, la información disponible en cuanto a clasificación de los compuestos de azufre en crudos mexicanos y sus fracciones es escasa. Lo más que se ha llegado a determinar es la estructura molecular de algunos asfaltenos, sin que se tengan identificados a los compuestos de azufre que los comprenden (Figura 9).

En este estudio se trabajo con combustóleo proveniente del crudo maya, tratado en la refinería de Tula, Hidalgo. Este combustóleo al ser analizado por el Instituto de Investigaciones Eléctricas, se le determinó un 4.33% en peso como azufre total y una viscosidad de 2110.0 SSF a 37.8°C.

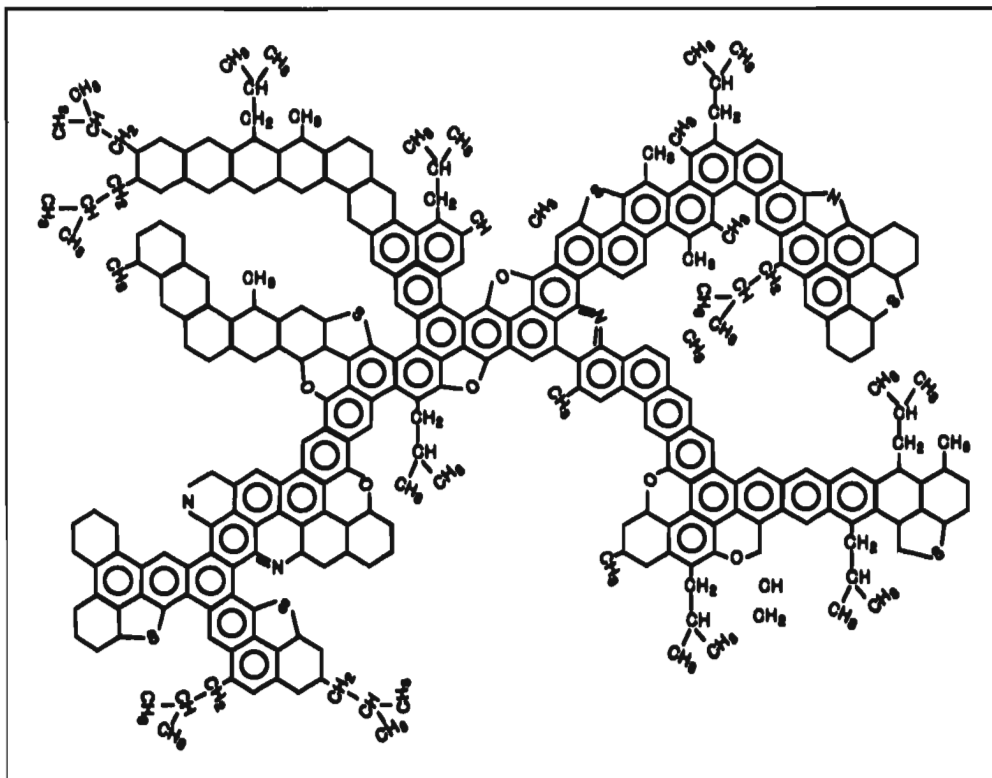


Figura 9 Estructura molecular del Asfalteno Maya  
 (Proporcionada por el Ing. J. Medina O.; 1996.  
 Facultad de Química, UNAM).

## ***CAPÍTULO 6***

### **PROBLEMÁTICA AMBIENTAL DE LOS COMPUESTOS DE AZUFRE.**

#### **6.1. Dióxido de azufre (SO<sub>2</sub>) en el aire.**

En forma general, las causas de la contaminación del aire por compuestos azufrosos incluyen: las emisiones contaminantes, factores meteorológicos, fisicoquímicos, y un grupo de causas inmediatas entre las que se encuentran: consumo regional de energía, calidad y tipo de energéticos, tecnología de combustión y de procesos, control de emisiones y usos del suelo (Lipfer, F. W., 1989b). La más importante de las variables que explican la contaminación atmosférica es el consumo energético, en términos de los combustibles fósiles que se queman. Este concepto es muy importante, tanto en el diagnóstico como en el diseño de estrategias para mejorar la calidad del aire y evitar su contaminación.

Los efectos ocasionados al ambiente por la combustión de energéticos, dependen directamente de las impurezas encontradas en estos, de la eficiencia en la combustión, de la capacidad de dispersión de la atmósfera, y de la altura de las chimeneas a través de las cuales son descargados los gases a la atmósfera (Quadri y Sánchez, 1992). Lo anterior repercute directamente en la calidad del aire, y por consiguiente en la salud pública.

La deposición de azufre dentro de regiones en donde los suelos presentan deficiencias de este elemento, tiene un efecto benéfico. Sin embargo, este sería un ejemplo único, ya que todos los demás efectos ocasionados por la contaminación de óxidos de azufre en la atmósfera son adversos. Dentro de los efectos negativos, están los relacionados con la salud humana, degradación de materiales, daños a la vegetación y la acidificación de suelos, cuencas y ríos.

Existen tres tipos de daño ocasionados por las emisiones de compuestos de azufre a la atmósfera, dependiendo de la forma en que se percibe; estos son: daños por dióxido de azufre, por partículas de sulfatos derivadas de procesos industriales y por precipitación ácida. Generalmente suponemos que todo el azufre presente en los combustibles es oxidado para producir dióxido de azufre durante el proceso de combustión, sin importar la forma química en la cual esté presente; sin embargo, en todo proceso de combustión un pequeño porcentaje es emitido en forma de ácido sulfúrico o bien como partículas de sulfatos metálicas (Lipfer, F. W., 1989b).

En las transformaciones atmosféricas el dióxido de azufre puede ser oxidado para formar ácido sulfúrico dentro de cualquier fase gaseosa, a través de reacciones fotoquímicas o mediante una fase acuosa como serían las nubes formadas por agua condensada (Schwartz, 1989). Cuando las nubes se evaporan dejan en el ambiente partículas de sulfatos cuyo tamaño va de 0.1 hasta 1.0  $\mu\text{m}$ . Las reacciones fotoquímicas son bastante lentas (velocidad de un 1%-3% por hora), pero se llevan a cabo de forma constante durante todas las horas de luz del día. Las reacciones acuosas son más rápidas pero requieren la presencia de nubes. La importancia relativa de estas dos rutas para formar sulfatos varían en base a las estaciones y los factores climáticos.

La forma química del azufre presente en el medio ambiente, juega un papel muy importante en la determinación del tipo y velocidad de algunos efectos adversos sobre la salud. Las partículas de sulfato generalmente van asociadas al amonio, y ocasionalmente cuando son partículas más grandes se asocian a elementos incrustantes como el calcio (Lipfer *et al.*, 1989). En términos generales, el carácter ácido de las partículas de sulfatos, depende de su fuente y del tiempo de contacto con el amoníaco del ambiente.

La baja presión de vapor del ácido sulfúrico y del sulfato de amonio, es una propiedad muy importante, ya que esto asegura que dichos compuestos permanezcan como partículas bajo condiciones atmosféricas normales. En contraste, el ácido clorhídrico y el nítrico están presentes como vapores, mientras que el nitrato de amonio tiende a ser inestable. Por esta razón, el término aerosol ácido (lluvia ácida) que es uno de los principales contaminantes que afectan a la salud, se le relaciona generalmente con la formación de los sulfatos ácidos (Lipfer *et al.*, 1989).

La cantidad de azufre presente en los diversos combustibles, varía de acuerdo al tipo de energético que se utiliza. Sin embargo, la gran mayoría de los energéticos contiene azufre, esto se puede apreciar en la Tabla 15. Como ya se mencionó, la emisión del dióxido de azufre proviene principalmente de la combustión, resultado de la oxidación de los compuestos de azufre orgánico e inorgánico contenido en los combustibles. El dióxido de azufre, incrementa los problemas de partículas respirables y de visibilidad por medio de la formación de sulfatos y la aglomeración de otros gases y partículas con los cuales interactúan. Por otra parte, el trióxido de azufre ( $\text{SO}_3$ ) que se forma a partir del dióxido de azufre o proveniente de procesos

industriales (producción de ácido sulfúrico), es un intermediario importante en la cadena de oxidación del azufre que ocasiona la producción tanto de ácido sulfúrico como de sulfatos.

**TABLA 15. CONTENIDO DE AZUFRE EN DIFERENTES TIPOS DE COMBUSTIBLES.**

<b>TIPO DE COMBUSTIBLE</b>	<b>CONTENIDO DE AZUFRE (g/10<sup>6</sup> Kcal)</b>
Carbón Bituminoso	1800-14400
Antracita	1800
Lignito	2160-5400
Residuos de petróleo	540-5400
destilados de petróleo	180-540
Gas natural	1.08
Gasolina	54
Diesel	0-180
Madera	270

(Environmental Protection Agency, 1988).

#### **6.1.1. Efectos en la visibilidad atmosférica.**

De todos los compuestos de azufre atmosféricos que se forman, solamente las partículas de sulfatos se ven involucradas en este tipo de trastornos ambientales. Las mezclas atmosféricas juegan un papel muy importante en la visibilidad, ya que estas ocasionan que las partículas de sulfatos crezcan higroscópicamente, provocando cambios en sus propiedades ópticas.

El rango visual está inversamente relacionado con el coeficiente de dispersión atmosférico, y es proporcional a la concentración másica de las partículas finas. Los dos constituyentes más importantes en las áreas urbanas son carbón particulado (cenizas) y sulfatos.

En investigaciones realizadas en países industrializados, se ha observado que la visibilidad se ve reducida a lo largo de hasta 5 Km cuando está nublado (EPA, 1982). En zonas áridas la disminución de la visibilidad puede ser por distancias de 200 Km dependiendo de las condiciones atmosféricas. En resumen, la visibilidad atmosférica es evaluada en base a la distancia que alcanzamos a ver, más la cantidad de energía solar que llega a la tierra y la seguridad para transportarse bajo estas condiciones de visibilidad.

## **6.2. Bióxido de azufre en la atmósfera de la Ciudad de México.**

En la Ciudad de México, el bióxido de azufre es emitido preponderantemente por el sector industrial. Su perfil de concentraciones a lo largo del día muestra el comportamiento típico de una sustancia proveniente de chimeneas altas. Este compuesto tiene una concentración máxima matutina por acumulación alrededor de las 9:00 horas; en este lapso de tiempo, la turbulencia y los patrones de circulación vertical hacen que descienda parte del SO<sub>2</sub> emitido a niveles de chimenea industrial y aumenten momentáneamente su concentración a nivel de piso; posteriormente se inicia un proceso de dispersión y la concentración decrece con la circulación del aire hasta un mínimo alrededor de las tres de la tarde. A partir de esta hora y hasta las 7:00 de la mañana del día siguiente, el nivel del bióxido de azufre se mantiene estable, presentando pequeñas fluctuaciones entre 0.06 y 0.07 ppm (Quadri y Sánchez, 1992). Cabe mencionar que el Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA), establece como norma para el SO<sub>2</sub> un valor de 0.13 ppm como promedio diario; ésta concentración corresponde a un valor IMECA de 0-100 puntos, para la cual se establece la calidad del aire como satisfactoria tomando en cuenta la valoración de otros 5 contaminantes: partículas suspendidas totales (PST), partículas suspendidas menores a 10 µm (PM10), bióxido de nitrógeno (NO<sub>2</sub>), monóxido de carbono (CO) y ozono (O<sub>3</sub>).

En la Zona Metropolitana de la ciudad de México se tiene la Red Automática de Monitoreo Atmosférico (RAMA), la cual comprende 25 estaciones distribuidas por regiones; la Tabla 16 muestra las estaciones de monitoreo y los contaminantes medidos (Quadri y Sánchez, 1992). El bióxido de azufre es uno de los contaminantes cuya medición abarca la mayor cantidad de estaciones junto con el monóxido de carbono (se valoran en 15 estaciones cada uno).

Las estaciones de monitoreo de la Ciudad de México han mostrado que el bióxido de azufre permanece en la mayoría de los meses por debajo de la norma, pero también existen los casos de excepción, que van de Noviembre a Enero, en los cuales se han presentado hasta 6 días con violaciones a la norma (Figura 10). Los promedios diarios registrados por las estaciones, también han coincidido en que en los meses invernales la concentración promedio del bióxido de azufre se mantiene con lecturas levemente superiores a las del resto del año (Quadri y Sánchez, 1992). A pesar de que las concentraciones de bióxido de azufre se conservan por debajo de la norma, destacan las observaciones de noviembre y diciembre de 1991 en que se alcanzaron promedios de 0.09 ppm (Figura 11).

Dentro de los valores IMECA, el bióxido de azufre conserva un perfil de excedencias bajo, que incluso se mantiene en menos del 3% de los días del año. Lo mismo puede incluirse con respecto a las concentraciones máximas observadas (Quadri y Sánchez, 1992). En esto ha influido la sustitución de combustóleo por gas natural en algunas termoeléctricas y en pocas industrias; así como, el uso de combustibles con un contenido limitado de azufre.

**TABLA 16. ESTACIONES QUE INTEGRAN LA RED AUTOMÁTICA DE MONITOREO ATMOSFÉRICO, Y CONTAMINANTES MEDIDOS.**

ESTACIÓN	SO <sub>2</sub>	NO <sub>2</sub>	NO <sub>x</sub>	CO	O <sub>3</sub>	HC
1. Lagunilla				*		
2. Vallejo	*					
3. Sta. Úrsula	*					
4. Tacuba	*					*
5. ENEP Acatlán	*					
6. Los Laureles	*					
7. La Presa	*					
8. La Villa	*					
9. san agustín	*				*	
10. Azcapotzalco	*				*	
11. Tlanepantla	*	*	*	*	*	
12. Xalostoc	*	*	*	*	*	
13. Merced	*	*	*	*	*	*
14. Pedregal	*	*	*	*	*	
15. C. de la Estrella	*	*	*	*	*	
16. Plateros				*	*	
17. Hangares	*					*
18. UAM Iztapalapa				*		
19. Aragón				*		
20. Nezahualcóyotl				*		
21. I.M.P.				*		
22. Benito Juárez				*		
23. Tasqueña				*		
24. Insurgentes				*		
25. Cuitláhuac				*		

(Quadri y Sánchez, 1992. "La Ciudad de México y la Contaminación Atmosférica".)

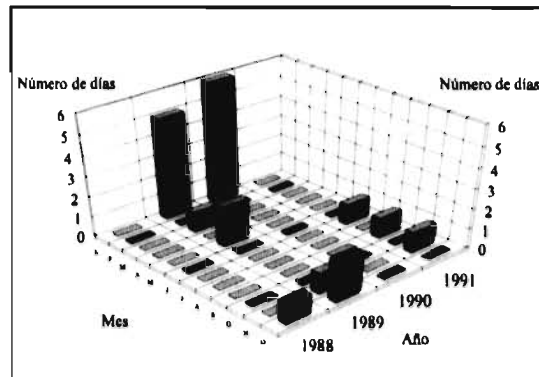


Figura 10 Bióxido de azufre (SO<sub>2</sub>). Número de días con violaciones a la norma (1988-1991) (Quadri y Sánchez; 1992).

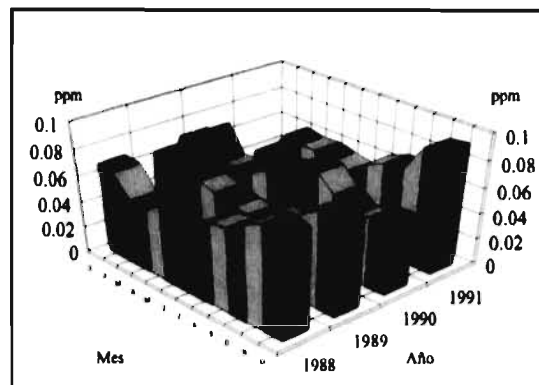


Figura 11 Bióxido de azufre (SO<sub>2</sub>). Promedio de máximos diarios (1988-1991) (Quadri y Sánchez; 1992).

De acuerdo con los registros de máximos reportados por las estaciones de monitoreo se ha comprobado que los seis contaminantes monitoreados regularmente han podido rebasar las normas por lo menos un día, de cada uno de los últimos cuatro años. En el caso del bióxido de azufre no se ha rebasado los 200 IMECA durante este lapso de tiempo (Quadri y Sánchez, 1992).

En 1990 con el fin de evaluar la exposición crónica de la población a los niveles de contaminación del aire durante períodos anuales, se realizó una comparación de los promedios anuales del bióxido de azufre con las normas de Estados Unidos y Canadá, debido a que en México no se tienen normas anuales. El estudio se llevó a cabo en la estación Merced (No. 13) de la zona centro, encontrando un promedio anual de 0.069 ppm. Si este valor lo comparamos con la norma de Canadá que exige 0.02 ppm al año, encontramos que en este año la concentración del bióxido de azufre sobrepasó los niveles de seguridad para la salud de acuerdo a Canadá. En cambio, los promedios diarios para 1991 indican que los niveles máximos de bióxido de azufre están siempre dentro de la norma (0.13 ppm en 24 h), para cualquier zona de



la Ciudad de México. Como se observa en la Tabla 17 la zona centro es la más afectada (0.066 ppm), a esta le sigue la zona suroeste; esto se explica en forma sencilla por el patrón de arrastre de vientos a esta parte de la ciudad. Sin embargo, en ninguna zona se viola la Norma Mexicana.

**TABLA 17. PROMEDIO DE CONCENTRACIONES MÁXIMAS DIARIAS EN LAS DISTINTAS ZONAS DE LA CIUDAD PARA 1991.**

ZONA MONITOREADA	PROMEDIO DIARIO DE SO <sub>2</sub>
Norma Establecida	0.13 ppm
Suroeste	0.061 ppm
Sureste	0.049 ppm
Centro	0.066 ppm
Noroeste	0.046 ppm
Noreste	0.059 ppm

(Quadri y Sánchez, 1992. "La Ciudad de México y la Contaminación Atmosférica".)

A pesar de los esfuerzos realizados por las autoridades y por dependencias e investigadores nacionales y extranjeros, debe reconocerse que la caracterización de las fuentes contaminantes, así como su clasificación y sistematización son problemas que aún no se han resuelto de manera satisfactoria. Debido a esto, se ha propuesto una matriz de emisiones para la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, la cual es una síntesis de la información proveniente de diversas fuentes (SEDUE, Agencia de Cooperación Internacional de Japón, e investigadores como: Bravo, Mortoreaux, Babcock y Espinoza; Complementada por Quadri y Sánchez, 1992).

La matriz de emisiones, pretende englobar a la mayor cantidad de fuentes contaminantes aclarando su origen y mostrando de manera extensa los sectores más contaminantes. Estos giros de actividad urbana considerados en la matriz de emisiones son los siguientes: dentro de transporte se incluyen al transporte privado, transporte de servicio público (taxis y colectivos), transportes urbanos y suburbanos (transporte del Estado de Méx. público y privado), transporte foráneo de pasajeros, transporte ligero de carga a diesel, transporte pesado de carga a diesel, y transporte de carga a gasolina; dentro de producción y manejo de energéticos está la termoeléctrica del Valle de México "Jorge Luque", y Petróleos Mexicanos; en el ramo industrial están contempladas en forma general todas las industrias; dentro de degradación ecológica se considera a los suelos; y por último se incluyen a los servicios generales. De acuerdo con esta matriz de emisiones, las principales fuentes productoras de bióxido de azufre provienen del sector industrial, transporte y, en menor proporción, servicios y energía. La industria contribuye con el 76.87% lo que significa 90,017 toneladas por año de este contaminante; el transporte

aporta 18,518 toneladas anuales lo cual equivale al 15.81%; servicios aporta 6,569 toneladas anuales (5.61%) y el sector energético contribuye con el 1.71% (2,005 Ton/año) (DDF, 1990). Considerando lo anterior, tenemos una producción total de 117,109 toneladas por año de SO<sub>2</sub>.

Como parte de las acciones del Programa Integral Contra la Contaminación Atmosférica en la Zona Metropolitana de la Ciudad de México, ha sido desarrollada una nueva versión del inventario de emisiones. Las cifras se infirieron principalmente mediante factores de emisión de la EPA, consumos de combustibles, volúmenes de producción y porcentajes estimados del control de emisiones en las fuentes. La matriz desagregada se presenta en la Tabla 18, mostrándose los resultados únicamente para el bióxido de azufre.

**TABLA 18. INVENTARIO DE EMISIONES DE BIÓXIDO DE AZUFRE EN 1989, EN LA ZONA METROPOLITANA DE LA CIUDAD DE MÉXICO.**

SECTOR INVENTARIADO	FUENTES CONTEMPLADAS	SO <sub>2</sub> EN Ton/Año	PORCIENTO EN PESO
ENERGÍA	PEMEX	14 781	7.2
	Termoeléctricas	58 247	28.3
INDUSTRIA Y SERVICIOS	Industria E.	65 732	32.0
	Mercantiles	22 060	10.7
TRANSPORTE	Autos privados	3 577	1.7
	Taxis	806	0.4
	Combis y minibuses	856	0.4
	R-100	5 224	2.5
	Autobuses edo. de Méx.		6.3
	Carga a gasolina	13 062	0.5
	Carga a diesel	955	9.8
	Otros (trenes, aviones, etc.)	20 063	0.1
	251		
DEGRADACIÓN ECOLÓGICA	Áreas con erosión	0	0.0
	incendios y otros procesos	131	0.1
TOTAL		205 725	100.0

(DDF. Programa Integral Contra la Contaminación Atmosférica, Méx., 1990)

De acuerdo a los datos reportados en la matriz de emisiones de la Tabla 18, se puede mostrar que las principales fuentes emisoras de bióxido de azufre son en primer lugar la industria establecida, la cual contribuye con el 32.0% (65 732 Ton/año); en segundo lugar están las

termoeléctricas aportando el 28.3% (58 247 Ton/año); y en tercer lugar está el transporte contribuyendo con el 21.7% (44 794 Ton/año). Estos sectores junto con los demás rubros mencionados aportan anualmente 205 725 toneladas de bióxido de azufre, si esto lo comparamos con la matriz anterior propuesta por Quadri y Sánchez, en la cual se obtiene 117 109 toneladas anuales, podemos observar que la diferencia es bastante considerable (88 616 Ton/año). Sin embargo, aún con estas diferencias podemos ver que la problemática en las emisiones de bióxido de azufre es de suma importancia para la salud pública y para comprender mejor la complejidad que encierra la cuantificación de las fuentes emisoras. Los datos de 1994 para el bióxido de azufre no se mencionan por considerarse incompletos.

El total de establecimientos de servicios emiten a la atmósfera 4 135 toneladas anuales de SO<sub>2</sub> en el Distrito Federal. La delegación Cuauhtémoc, es la que presenta el mayor porcentaje de emisiones (33.4%), le sigue la Miguel Hidalgo con 19.1% y la Venustiano Carranza con 8.4%. En estas tres delegaciones se concentra poco más del 60% del bióxido de azufre; estos datos, fueron evaluaciones obtenidas en 1988, por el Programa Integral Contra la Contaminación Atmosférica de 1990. Por tipo de actividad los establecimientos que generan mayores problemas son los baños públicos, ya que emiten 19 veces más bióxido de azufre que una tintorería y 8 veces más que un hotel. La Tabla 19 presenta el porcentaje de emisiones para el bióxido de azufre producido por giro del establecimiento.

**TABLA 19. EMISIONES DE BIÓXIDO DE AZUFRE POR GIRO DE ESTABLECIMIENTO PARA EL DISTRITO FEDERAL.**

<b>GIRO DEL ESTABLECIMIENTO</b>	<b>BIÓXIDO DE AZUFRE EMITIDO</b>
Baños públicos	54.4%
Deportivos	13.9%
Tintorerías	11.1%
Hoteles	10.7%

(DDF. Programa Integral Contra la Contaminación Atmosférica, Méx., 1990)

Como se puede apreciar, el problema de la contaminación atmosférica no es fácil de evaluar; ya que tan solo un contaminante (como el bióxido de azufre) presenta varios obstáculos; por ejemplo: determinación exacta de las fuentes emisoras, cuantificaciones reales, evaluación de la causa contaminante (como la mala calidad de los combustibles) y políticas de gobierno erróneas. Esto impide realizar una evaluación correcta y objetiva de la emisión de bióxido de azufre, que nos lleve a la solución real del problema.

### 6.3. Efectos en la salud y en los seres vivos.

El  $\text{SO}_2$  es un irritante respiratorio muy soluble, esto provoca que la mayor parte que se inhala se absorba por la nariz y las vías respiratorias superiores; por consiguiente muy poca cantidad llega a los pulmones. Sin embargo, la concentración del bióxido de azufre en combinación con el tiempo de exposición juegan un papel muy importante, ya que de estos dos parámetros depende la gravedad del daño ocasionado en la salud. Esto se puede ver en la Figura 12.

Existe un efecto sinérgico del bióxido de azufre y las partículas en suspensión, se ha observado que esta combinación es muy peligrosa ya que paraliza los cilios epiteliales del tracto respiratorio, impidiendo su función normal de barrido para detener las impurezas, en consecuencia las partículas podrían penetrar en los pulmones y sedimentarse; acarreado con ellas cantidades significativas de  $\text{SO}_2$ , estas son depositadas en los delicados tejidos de los pulmones durante períodos prolongados.

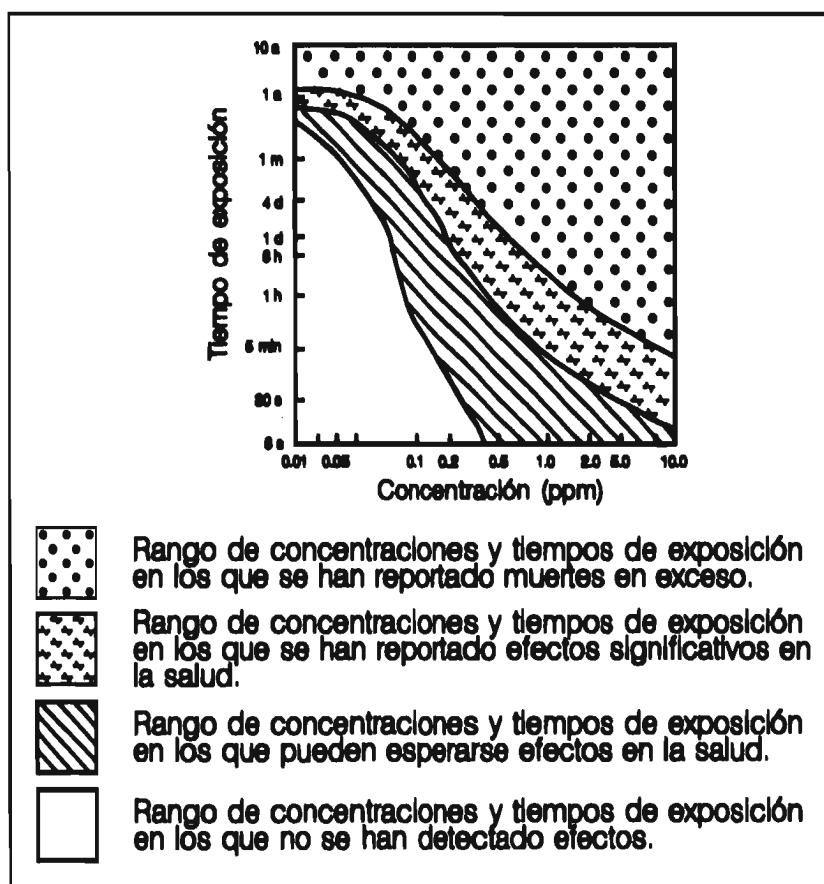


Figura 12 Efectos del bióxido de azufre sobre la salud  
(Citado por Quadri y Sánchez, 1992).

En estudios realizados (Quadri y Sánchez, 1992) se ha observado un aumento de la mortalidad en la población general cuando las concentraciones tanto de partículas en suspensión como de bióxido de azufre pasan de  $500 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (equivalente a 0.91 ppm de  $\text{SO}_2$ ) durante 24 horas. Los grupos más vulnerables de la población son individuos con problemas cardíacos o pulmonares, también se ha visto, que con estas concentraciones ha aumentado el número de las hospitalizaciones. Cuando se han reportado concentraciones diarias de  $250 \mu\text{g}/\text{m}^3$  como partículas suspendidas en combinación con 0.09-0.10 ppm de  $\text{SO}_2$ , se ha tenido un aumento y agravación de las enfermedades pulmonares. Con promedios anuales de  $100 \mu\text{g}/\text{m}^3$  como PST y 0.03 ppm de  $\text{SO}_2$ , se tienen efectos sobre la visibilidad y molestias leves. Por otra parte, en estudios realizados en Estados Unidos por el Departamento de Salud, Educación y Bienestar de E.U., han planteado que una reducción del 50% en la concentración de sulfatos y partículas en suspensión de las áreas urbanas de Estados Unidos, traería como consecuencia una reducción del 4.7% en la tasa de mortalidad general y un aumento de casi un año en la esperanza de vida (Levy P., 1989).

#### **6.4. Efectos de la degradación en los materiales.**

Todos los efectos corrosivos provocados por el bióxido de azufre en los materiales, están asociados con la disolución de este compuesto sobre las superficies húmedas de los materiales con los cuales puede tener contacto. La presencia de humedad es un factor decisivo dentro del mecanismo corrosivo del  $\text{SO}_2$  (Lipfer F.W., 1989a). Por lo anterior, un ambiente apropiado para ocasionar daño a los materiales, no solamente debe incluir concentraciones de bióxido de azufre en el ambiente si no también humedad abundante sobre la superficie del material.

El azufre atmosférico, tiene un efecto adverso adicional en algunos materiales, a través de la acidificación de la lluvia; sin embargo, para ambas precipitaciones de  $\text{SO}_2$  (proveniente de lluvia y atmosférico), la principal forma de daño es el ataque por dilución ácida.

Los materiales que son sensibles a este tipo de daño, son principalmente aquellos que presentan una fachada delgada y formada por materiales que reaccionan rápidamente con los ácidos diluidos (especialmente el ácido sulfúrico). Algunos de estos materiales son: acero galvanizado, ciertas pinturas, acero al carbón sin revestimiento, bronce y piedras carbonatadas (arenisca, piedra caliza, mármol). La sensibilidad de estos materiales depende del espesor de la materia prima y del servicio al cual se destinen; en el caso de monumentos y esculturas al aire libre, estos son especialmente sensibles al ataque ácido, especialmente si se trata de materiales como el zinc o el carbonato de calcio. Investigaciones (Lipfer F.W., 1989b) han demostrado que la reacción entre el material afectado y el azufre depositado es estequiométrica, esto significa que la velocidad de deposición del azufre es igual a la velocidad de remoción del material base. Existen algunas excepciones como en el caso del alambre galvanizado para cercas, en donde la velocidad de deposición del  $\text{SO}_2$  puede ser de 2 a 3 veces más rápida que sobre superficies

planas (Haynie F. H., 1980). En el caso del carbonato de calcio, su disolución por la lluvia es una forma importante de pérdida de material; esto se debe a la formación de sulfato de calcio el cual es fácilmente removible; esto provoca condiciones favorables para que las deposiciones del  $\text{SO}_2$  continúen sobre el material (Lipfer F. W., 1989c).

En el caso de las pinturas, su sensibilidad depende del tipo de sustancias que las forman. Estudios realizados, han mostrado que los compuestos solubles al ácido como el carbonato de calcio y el óxido de Zinc, son lixiviados en forma selectiva hacia afuera del revestimiento de pintura (Balik *et al.*, 1989). El efecto provocado en el tiempo de vida útil de las pinturas no ha sido cuantificado.

### 6.5. Efectos de la precipitación ácida (lluvia ácida).

Desde 1970 la lluvia ácida o más apropiadamente llamada precipitación ácida (acidez en deposiciones de polvo seco y del agua de lluvia) ha sido un tema de investigación científica, así como tema publicitario. La combustión de los energéticos fósiles, contribuyen con más del 90% de las emisiones de azufre y óxidos de nitrógeno hacia la atmósfera, esto ha sido cuantificado en los Estados Unidos por el National Research Council en 1986. Estos óxidos son transformados en la atmósfera a sulfatos y nitratos a través de una serie de reacciones complejas, posteriormente se remueven por acción de la humedad y por precipitación seca.

La Figura 13 muestra la relación entre las fuentes primarias (emisiones de  $\text{SO}_x$  y  $\text{NO}_x$ ), y sus efectos en la atmósfera y biosfera.

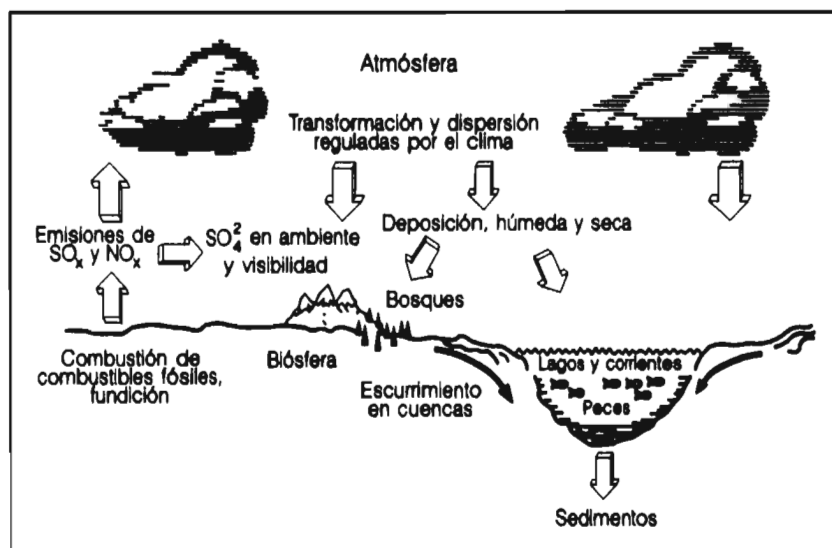


Figura 13 Precipitación ácida (lluvia ácida): Fuentes y ecosistemas afectados (Lipfer F. W.; 1989c).

La deposición de los aerosoles ácidos sobre los ecosistemas les provocan diferentes efectos adversos; que dependen de su capacidad de amortiguamiento. Las sustancias acidificantes están compuestas de precipitaciones ácidas y deposición seca de  $\text{SO}_2$  además de partículas de sulfatos. En regiones no áridas cuando llueve el agua disuelve los depósitos contaminantes, enviándolos a los ríos y cuencas; posteriormente estos contaminantes terminan en los océanos.

Dentro de los efectos negativos a los ecosistemas está el daño a la vegetación (deterioro en la productividad de bosques y cultivos), acidificación de suelos, daño a los edificios y esculturas, afectación a la salud humana y acidificación de aguas superficiales, cuyo impacto repercute en la flora y fauna. En el caso de la acidificación de suelos, se está utilizando cal (óxido de calcio) para solucionar el problema; este método se está usando también para controlar el pH en los lagos.

Los cambios de pH en las aguas superficiales van más allá de una variación en los niveles de alcalinidad. En investigaciones realizadas en Suiza (Swedish Ministry of Agriculture Environment, 1982), se ha demostrado que algunos crustáceos y plankton, pueden desaparecer del agua a niveles de pH por abajo de 6, algunas especies de peces no resisten un pH menor de 5 y otras a un pH menor a 4.5 dependiendo de la especie. Por otra parte, los lagos alcalinos (pH mayor a 7) suelen ser menos nocivos que los acidificados.

Los efectos nocivos de la lluvia ácida sobre la flora se han estudiado en Estados Unidos y Europa, y han dado como resultado muerte del Abeto Rojo, del Abeto común, del Arce del azúcar y deterioro en árboles de madera dura. En las regiones cercanas a plantas eléctricas y fundidoras, se ha observado un deterioro en la vegetación, causado por las emisiones de bióxido de azufre y por deposición ácida. En pruebas de laboratorio, se ha demostrado que a niveles de pH desde 3.5 y por abajo de este valor, se producen efectos adversos en el follaje de las plantas. Sin embargo, se piensa que el daño a los bosques se produce por un efecto combinado, en donde se incluye al ozono y a la deposición ácida; actuando conjuntamente con otros factores propios del ambiente como lo son los fenómenos naturales.

Es evidente, que las emisiones de bióxido de azufre a la atmósfera por la combustión de energéticos, tiene efectos ampliamente adversos en el medio ambiente. Debido a esto, es importante buscar nuevas técnicas que permitan obtener combustibles de mejor calidad.

## ***CAPÍTULO 7***

### **CARACTERÍSTICAS DEL COMBUSTÓLEO MEXICANO.**

#### **7.1. Definición.**

Se le define al combustóleo (Fuel oil) como un producto líquido derivado del proceso de refinamiento del crudo, el cual es quemado en un horno para producir calor o se usa en un motor para generar energía; sin embargo, los combustóleos con un punto de inflamación inferior a 38°C no son usados en estas aplicaciones.

Debido a que los combustóleos son utilizados en quemadores de varios tipos y capacidades, se requieren varias calidades, por lo que en Estados Unidos la ASTM ha dado especificaciones para 6 clases de combustóleo, siendo las siguientes.

No. 1.- Es un producto de destilación directa algo más pesado que la kerosina, utilizado casi exclusivamente para uso doméstico.

No. 2.- Este tipo de energético se le conoce como: "Fuel oil-diesel" y es un producto de destilación directa que se usa como combustible de uso general en comercios o en aplicaciones domésticas, por lo general se quema en hornos de tipo atomizador.

No. 4.- Se hace con productos pesados de destilación directa (cracking), es utilizado en quemadores comerciales o industriales que no están equipados con dispositivos precalentadores.

No. 5 y 6.- Pertenecen a estas clases los combustóleos residuales viscosos, generalmente se les conoce como combustibles de caldera y requieren de un precalentamiento antes de ser quemados.



Las últimas especificaciones de la ASTM señala dos calidades para el combustóleo No. 5, la primera clase incluye a los combustóleos que no requieren de precalentamiento bajo ciertas condiciones climáticas y que son más ligeros; en la segunda calidad entran los combustóleos pesados de muy alta viscosidad; este tipo de combustible es usado en hornos y calderas de plantas generadoras de electricidad, barcos, locomotoras, operaciones metalúrgicas, calderas de tintorerías y plantas de energía para usos industriales.

Los combustóleos son transportados en vagones, camiones cisterna, barcasas y oleoductos. Las precauciones de transporte no son muy estrictas, ya que no requieren de alguna etiqueta especial y únicamente se le coloca la leyenda "líquido combustible".

### **7.2. Obtención del combustóleo.**

El combustóleo puede ser una fracción de destilación del petróleo (destilación atmosférica y al vacío), un residuo de las operaciones de refinación (descomposición térmica o catalítica), un petróleo bruto o una mezcla de dos o más de estos compuestos. Esto da lugar a un líquido viscoso de composición muy variada y compleja, que depende del origen del crudo y de las características de refinación a que ha sido sometido. El diagrama de proceso para obtener combustóleo se muestra en la Figura 14.

### **7.3. Propiedades del combustóleo.**

Las propiedades físicas y químicas del combustóleo son difíciles de obtener cuando las características de los combustóleos varían grandemente, pero su correlación daría la pauta a seguir para tomar medidas correctivas en parámetros de operación y para la evaluación de la calidad del combustible. Las propiedades físicas más importantes son: viscosidad, densidad, agua y sedimento, agua por destilación, temperatura de inflamación y poder calorífico. Dentro de las propiedades químicas se incluye el análisis elemental, que consiste en determinar carbono, hidrógeno, nitrógeno y oxígeno; otro análisis muy importante e indispensable es la determinación de azufre total; así como, asfaltenos, carbón residual Conradson, cenizas totales y la determinación de elementos por absorción atómica; entre los que se determinan se encuentran los siguientes: V, Na, Ca, Fe, Mg, Ni, Al, K, Cu, Cr, Zn y Mn. Únicamente en ocasiones específicas se determina dióxido de silicio, sulfatos, materia orgánica y trióxido de carbono.

El combustóleo lleva consigo todas las impurezas eliminadas por el proceso de refinamiento del crudo y sus derivados, tanto pesados como ligeros. Cuando se empezó a usar el combustóleo, estos compuestos no causaban problemas, debido a que las concentraciones eran aceptables; sin embargo, con el aumento de la eficiencia en los procesos de refinamiento del crudo; estas impurezas se han concentrado a niveles alarmantes, provocando un descontrol en la contaminación ambiental.

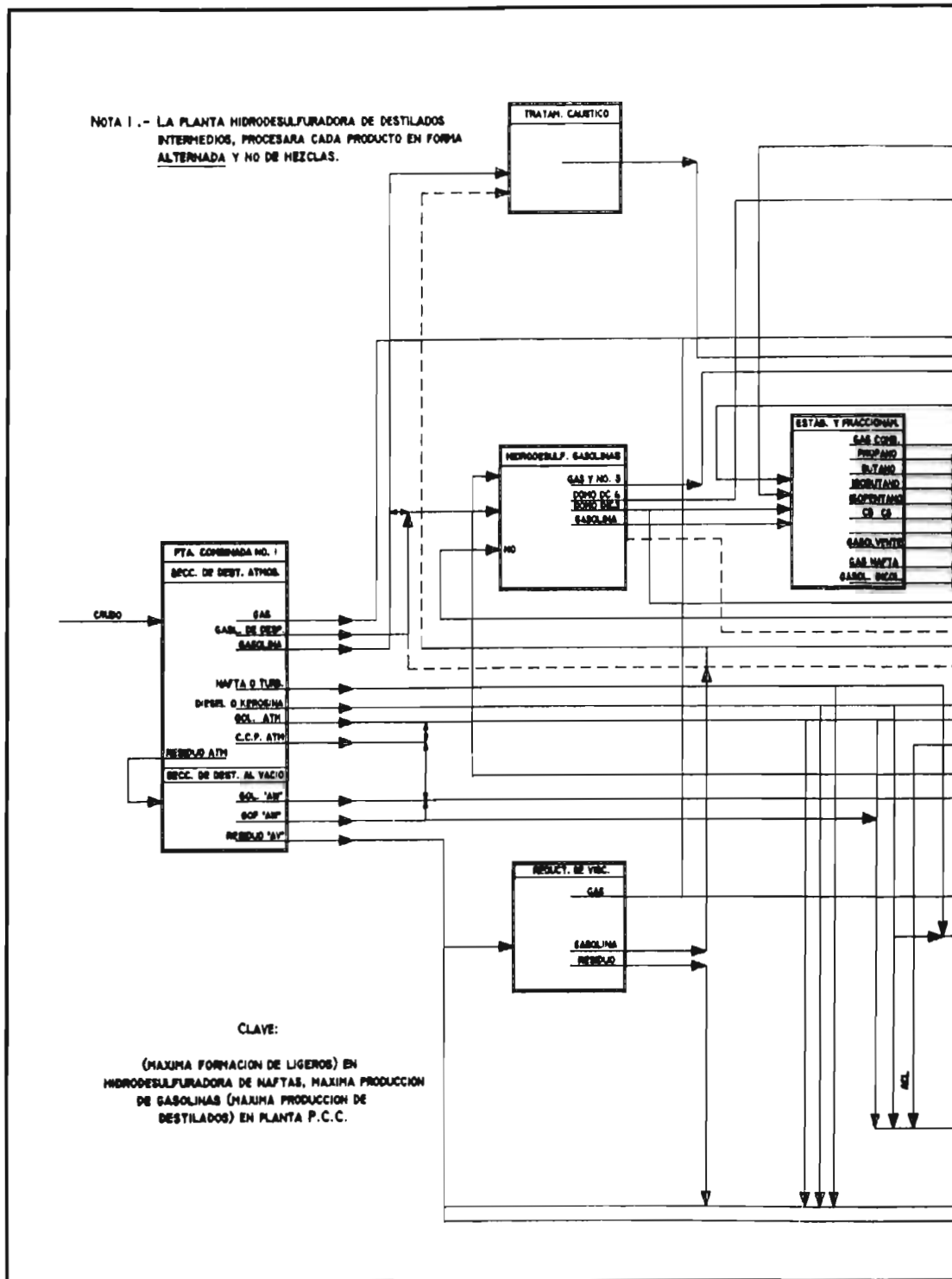


Figura 14 Diagrama de proceso del combustóleo (1)

HIDRODESULFURADORA DE DESTILADOS  
 Y PROCESARA CADA PRODUCTO EN FORMA  
 Y NO DE MEZCLAS.

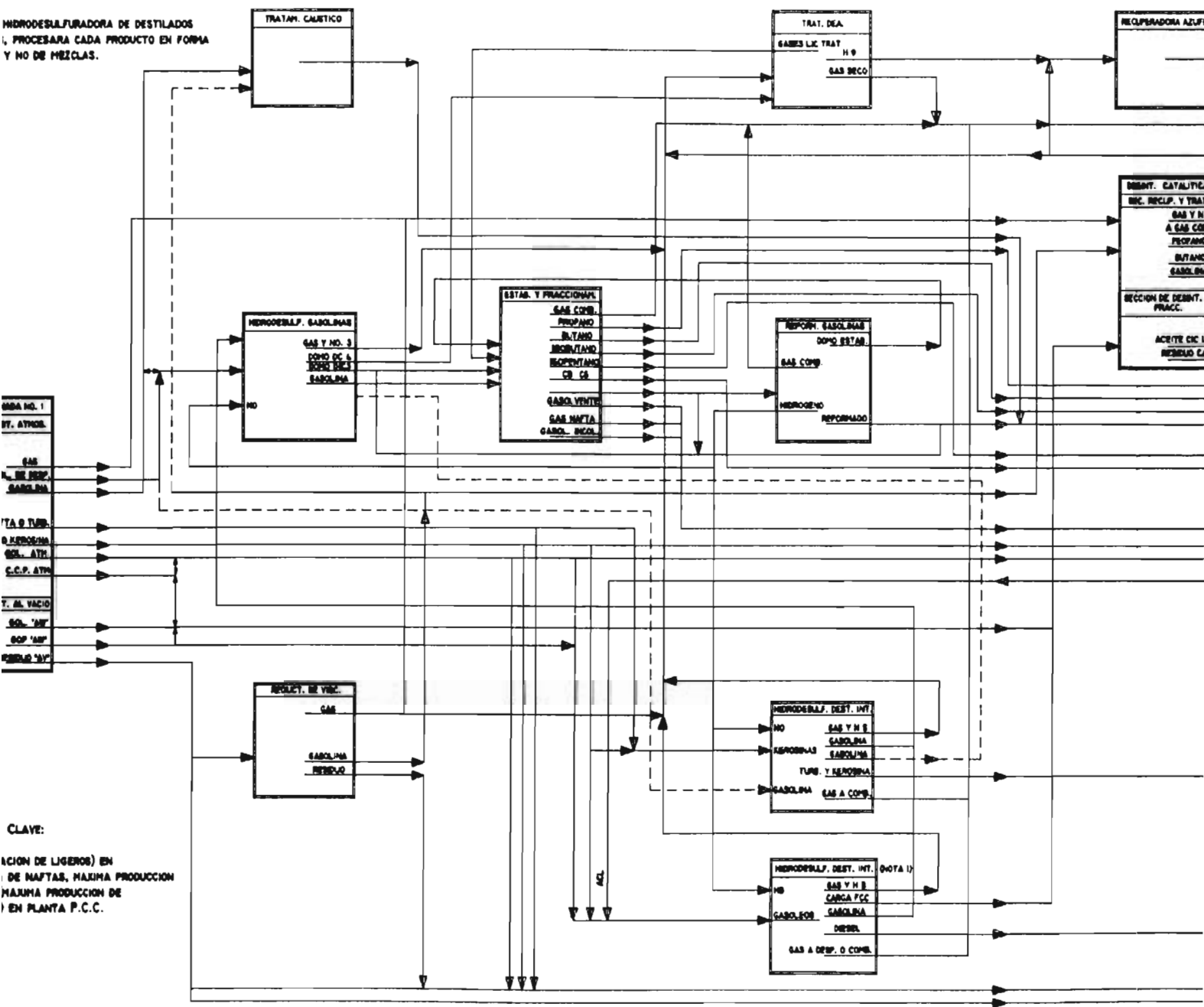


Figura 14 Diagrama de proceso del combustóleo (Proporcionado por J. Medina O.; 1996, Facultad de Química)

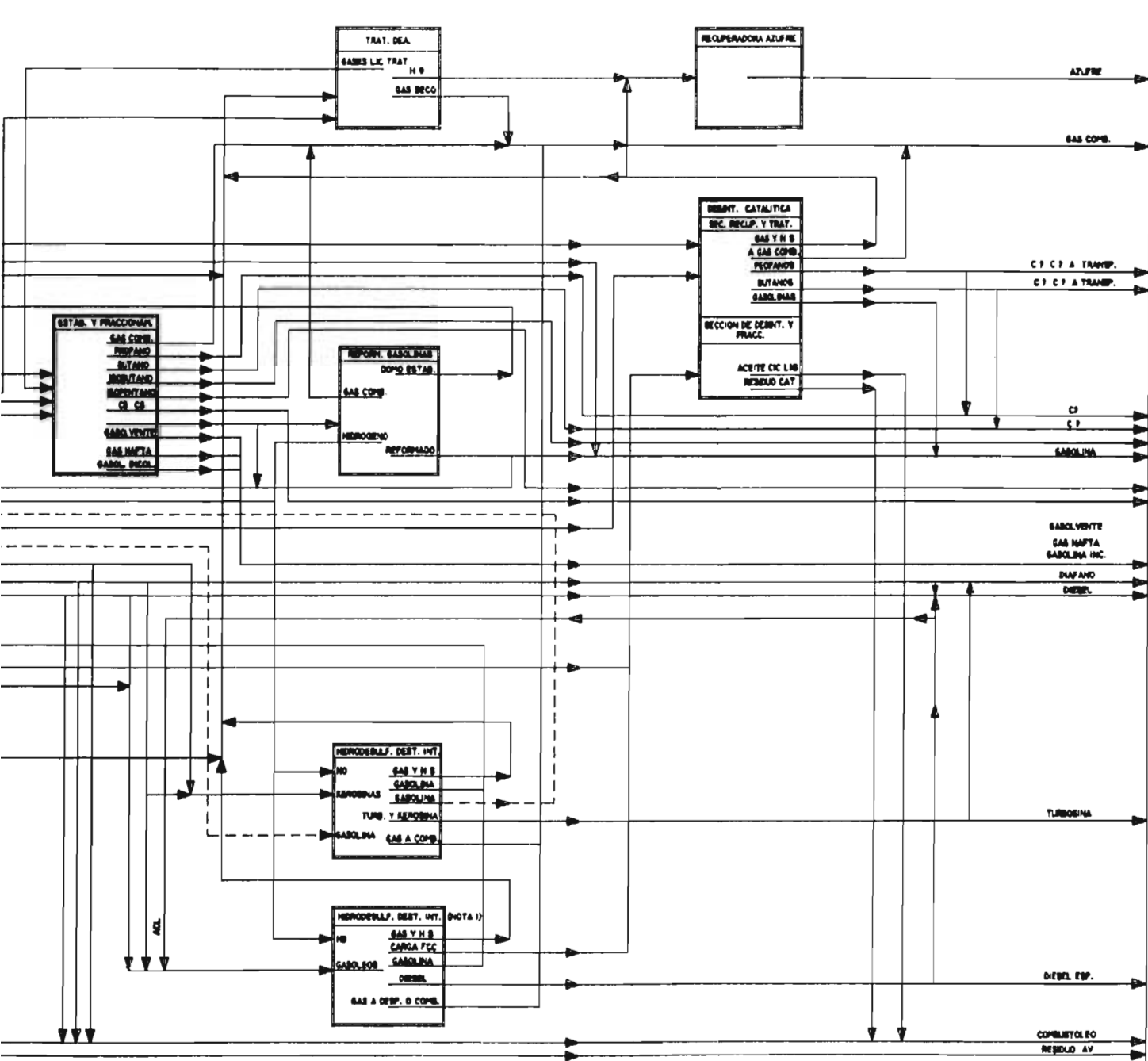


Diagrama de flujo del combustible (Proporcionado por J. Medina O.; 1996, Facultad de Química, UNAM).

Las impurezas del combustóleo son llamadas "impurezas de origen del crudo", estas impurezas ya estaban presentes en la materia orgánica que dio origen al combustóleo; a su vez, la materia orgánica contiene diferentes sustancias contaminantes como son: compuestos orgánicos complejos provenientes de las sustancias vegetales y animales que dieron origen al petróleo; metales como hierro, níquel, vanadio, cobre y otros; compuestos de azufre los cuales forman complejos orgánicos diversos (no se han determinado los tipos de compuestos de azufre); compuestos de sodio en forma de complejos organometálicos, cloruros y sulfatos.

Existen especificaciones para combustóleos del tipo pesado y ligero, estas características se basan principalmente en la viscosidad de este combustible y en el contenido de azufre total. En cuanto a la eficiencia de combustión para el combustóleo ésta ha sido evaluada, dando como resultado un 72% para diferentes equipos que operan dentro del Distrito Federal (Quadri y Sánchez, 1992). La Tabla 20 muestra las especificaciones que debe cumplir un combustóleo pesado, de acuerdo a los parámetros establecidos por Comisión Federal de Electricidad.

**TABLA 20. ESPECIFICACIONES PARA EL COMBUSTÓLEO PESADO.**

CONCEPTO	UNIDADES	ANÁLISIS TÍPICO
Peso específico a 20/4°C	kg/l	0.982
Temperatura de inflamación	°C	103.0
Viscosidad	SSF a 50°C	103.0
Carbón Conradson	% en peso	12.4
Cenizas	% en peso	0.38
Azufre total	% en peso	3.3
Agua y sedimentos	% en volumen	0.11
Poder calorífico neto	Kcal/barril	1 592 959.00

(Comisión Federal de Electricidad, anuario estadístico de 1990).

#### 7.4. Producción.

La producción de combustóleo en México de acuerdo a datos proporcionados por Petróleos Mexicanos (PEMEX) es de 450 000 barriles diarios, dentro de esta cantidad se incluyen los dos tipos de combustóleo (pesado y ligero). La producción anual de combustóleo es variable dependiendo de las necesidades de la oferta y la cantidad de crudo que se produzca para ese año. Los datos de la Tabla 21 muestran esta tendencia, las cifras se presentan en miles de barriles diarios analizando 10 años.

**TABLA 21. PRODUCCIÓN ANUAL DE COMBUSTÓLEO EN MÉXICO.**

<b>AÑO EVALUADO</b>	<b>PRODUCCIÓN DE COMBUSTÓLEO (en miles de barriles diarios)</b>
1983	350.2
1984	374.9
1985	397.9
1986	405.4
1987	424.5
1988	420.8
1989	426.9
1990	435.1
1991	414.2
1992	407.7
1993	419.4

(Anuario estadístico de PEMEX, 1994).

### **7.5. Consumo.**

En cuanto a consumo de combustóleo, este registró una tendencia creciente hasta 1990, después de este año comenzó a disminuir su consumo y la recuperación hasta ahora no se ha dado, esto se debe a las restricciones que recientemente se han adoptado en el uso de este energético por su mala calidad y por que, su uso se ha sustituido principalmente por gas natural y otros energéticos (ver Tabla 22) de mejor calidad.

Datos más recientes verifican que las ventas nacionales de combustóleos han seguido desplomándose, vendiéndose un promedio de 390 500 barriles diarios en 1995. Atribuyendo esto al aumento de la generación de energía a base de carbón, energía hidroeléctrica y nuclear, por lo que bajaron en forma general las ventas anuales de todos los combustibles industriales en un 5.1% (periódico "El Financiero", 6 de mayo de 1996).

**TABLA 22. CONSUMO DE COMBUSTÓLEO EN MÉXICO.**

<b>AÑO EVALUADO</b>	<b>CONSUMO DE COMBUSTÓLEO (miles de barriles diarios)</b>
1983	324.3
1984	362.8
1985	382.4
1986	395.9
1987	438.3
1988	438.7
1989	471.5
1990	479.2
1991	453.1
1992	438.1
1993	435.3

(Anuario estadístico de PEMEX, 1994).

### **7.6. Importación y Exportación.**

Las importaciones y exportaciones se muestran en la Tabla 23. Se puede apreciar que las importaciones son muy escasas, hasta 1985; ya que, generalmente con el combustóleo producido, se cubría la mayor parte de la demanda nacional; sin embargo, el consumo nacional se ha incrementado desde 1986 a la fecha, haciendo necesarias las importaciones de este combustible. En cuanto a exportaciones estas se manejan de acuerdo a la oferta del extranjero y para mantener un lugar en el mercado internacional, debido a esto son muy variables. La participación internacional del combustóleo mexicano para 1993 fue de un 31.6% (55,700 barriles diarios) en las importaciones, y de un 25.4% (39,800 barriles diarios) en las exportaciones.

**TABLA 23. IMPORTACIONES Y EXPORTACIONES DE COMBUSTÓLEO MEXICANO.**

<b>AÑO EVALUADO</b>	<b>IMPORTACIONES (miles de barriles diarios)</b>	<b>EXPORTACIONES (miles de barriles diarios)</b>
1983	-	25.9
1984	-	12.1
1985	13.6	29.1
1986	30.4	39.9
1987	47.3	33.5
1988	59.1	41.2
1989	69.5	24.9
1990	51.8	7.7
1991	46.6	7.7
1992	53.3	22.9
1993	55.7	39.8

(Anuario estadístico de PEMEX, 1994)

### **7.7. Normatividad.**

Los objetivos que guían el desarrollo y la aplicación de las políticas de calidad del aire, se expresan mediante normas de calidad del aire que en su papel de instrumentos de regulación establecen las pautas que evalúan el grado de calidad del aire para la realización de las actividades humanas, la protección a la salud, la preservación de la vegetación y la fauna, así como la prevención de daños a los materiales de construcción y al bienestar en general. Sin embargo, las normas de calidad del aire no son valores universalmente aceptados, sino que reflejan los niveles de limpieza del aire que se pretenden alcanzar y mantener. De esta manera, un requisito fundamental para la adecuada formulación de un programa de gestión ambiental, lo constituye la expedición de normas de calidad del aire que tengan un respaldo toxicológico, epidemiológico, análisis económico y técnico, que garantice su validez y asegure su cumplimiento.

En el Diario Oficial del 29 de noviembre de 1982 se publicaron los criterios de evaluación de la calidad del aire, los cuales, son equivalentes a los que rigen en la mayoría de los países industrializados; debido a esto el DDF (Departamento del Distrito Federal) emite diariamente



un reporte de la calidad del aire llamado: "Índice Metropolitano de la Calidad del Aire (IMECA)", este indicador engloba a varios contaminantes como son: partículas suspendidas totales (PST); partículas suspendidas menores a 10  $\mu\text{m}$  (PM10); bióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ); bióxido de nitrógeno ( $\text{NO}_2$ ); monóxido de carbono (CO); y ozono ( $\text{O}_3$ ); su determinación numérica se realiza a partir de promedios horarios ponderados a través de valores de referencia que se tienen ya establecidos.

En relación con las normas de emisiones emitidas en 1988, se han dado avances importantes con la promulgación de las "Normas Técnicas Ecológicas" (actualmente conocidas como "Normas Oficiales Mexicanas"), orientándose principalmente al control de los procesos de combustión en fuentes fijas y vehículos automotores. Sin embargo, no existen hasta el momento regulaciones que se dirijan hacia el origen del problema; es decir, hacia los propios procesos de fabricación, sus insumos y materias primas; así como mala calidad de los combustibles empleados (como el combustóleo). Las "Normas Técnicas Ecológicas" que establecen los niveles máximos permisibles de emisiones contaminantes para compuestos de azufre y otros contaminantes asociados con el uso de combustóleo, diesel, carbón, gas natural, y la producción de ácido sulfúrico y dodecilbencensulfónico, se presentan en la Tabla 24.

**TABLA 24. NORMAS TÉCNICAS ECOLÓGICAS EMITIDAS EN 1988 PARA CONTROL DE EMISIONES DE COMPUESTOS DE AZUFRE Y OTROS.**

TIPO DE FUENTE O PROCESO EMISOR	CONTAMINANTES REGULADOS	NORMA TÉCNICA ECOLÓGICA
Plantas productoras de ácido sulfúrico	bióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) y trióxido de azufre ( $\text{SO}_3$ )	NTE-CCAT-001/88
Combustión del diesel en fuentes fijas	partículas, CO, $\text{SO}_2$ , $\text{NO}_x$	NTE-CCAT-005/88
Combustión de carbón en carboeléctricas	partículas, CO, $\text{SO}_2$ , $\text{NO}_x$	NTE-CCAT-006/88
Combustión de combustóleo en fuentes fijas	partículas, CO, $\text{SO}_2$ , $\text{NO}_x$	NTE-CCAT-007/88
Combustión de gas natural en fuentes fijas	partículas, CO, $\text{SO}_2$ , $\text{NO}_x$	NTE-CCAT-008/88
Producción de ácido dodecilbencen sulfónico	$\text{SO}_2$ , $\text{SO}_3$ (neblinas), $\text{H}_2\text{SO}_4$ (neblinas)	NTE-CCAT-0012/88

(Quadri y Sánchez, 1992).

La Norma Técnica Ecológica que regula la combustión de combustóleo en fuentes fijas (NTE-CCAT-007/88), establece un máximo emitido para el bióxido de azufre de 57 Kg por metro cúbico de combustible (a 25°C) en zonas críticas (de alta contaminación); y en el resto del país el límite es de 95 Kg/m<sup>3</sup> de combustible a 25°C.

En lo referente a la nueva legislación de México, se tiene la Norma Oficial Mexicana: NOM-CCAT-015-ECOL/1993, que establece un contenido máximo de un 2% en peso de azufre para el gasóleo líquido, cuando es utilizado por fuentes fijas ubicadas en la zona Metropolitana de la ciudad de México. Sin embargo, a la fecha no hay una norma que regule la cantidad de azufre permisible en el combustóleo.

Como se ha visto en este capítulo, el combustóleo es un energético de uso común que no recibe ningún tipo de tratamiento durante su obtención, ni al momento de utilizarlo como combustible; esto provoca graves problemas de deterioro ambiental. Es por esto, que en este estudio se investiga, en forma preliminar la posibilidad de extracción del azufre por medios biológicos.

## ***CAPÍTULO 8***

### **PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL.**

Esta investigación a nivel laboratorio, se enfocó fundamentalmente a determinar la viabilidad de microorganismos sulfato-reductores en la biodesulfuración de un combustóleo mexicano obtenido del refinamiento del crudo Maya.

Los estudios se realizaron utilizando 25 cultivos mixtos silvestres provenientes de sedimentos marinos de las costas de Puerto Escondido, Oaxaca (8 muestras) y Estero Pargo, Campeche (9 muestras), y con lodos de un digester anaerobio (8 muestras) perteneciente a una planta de tratamiento de una fábrica de cerveza localizada en la ciudad de Toluca. Las muestras de lodo anaerobio y sedimento marino fueron recolectadas y proporcionadas por el Laboratorio de Microbiología Marina, perteneciente al Instituto de Ciencias del Mar y Limnología (ICMyL) de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A cada muestra se le asignó una clave de acuerdo con el lugar de muestreo, quedando identificadas como se indica en la Tabla 25. En la Figura 15, se indican los sitios de obtención de las muestras de sedimentos marinos y de los lodos anaerobios usados en las pruebas experimentales.

El combustóleo utilizado se obtuvo de la "Refinería de Tula", localizada en Hidalgo a partir del crudo Maya. Su caracterización se hizo en el Instituto de Investigaciones Eléctricas (IIE) en el departamento de combustibles, basándose en las Normas ASTM para Combustibles. Las Tablas 26 y 27 muestran los datos de la caracterización realizada al combustóleo utilizado en la investigación.

**TABLA 25. CLAVE ASIGNADA Y ORIGEN DE LAS 25 MUESTRAS UTILIZADAS EN LA INVESTIGACIÓN.**

<b>NÚMERO DE MUESTRA</b>	<b>CLAVE ASIGNADA</b>	<b>LUGAR DE MUESTREO</b>
1	O' N-1'	OAXACA
2	O' N-2'	OAXACA
3	O' N-3'	OAXACA
4	O' N-4'	OAXACA
5	O N-1	OAXACA
6	O N-2	OAXACA
7	O N-3	OAXACA
8	O N-4	OAXACA
9	R' N-1'	CAMPECHE
10	R' N-2'	CAMPECHE
11	EP E1	CAMPECHE
12	EP E2	CAMPECHE
13	EP E3	CAMPECHE
14	EP E4	CAMPECHE
15	EP E5	CAMPECHE
16	EP E6	CAMPECHE
17	R N-4	CAMPECHE
18	2 DIG	TOLUCA
19	2A DIG	TOLUCA
20	1B DIG	TOLUCA
21	2B DIG	TOLUCA
22	SO DIG	TOLUCA
23	SR1 DIG	TOLUCA
24	DGT	TOLUCA
25	SR DGT	TOLUCA

(Romero. J. J., 1995. Laboratorio de Microbiología Marina, ICMyL de la UNAM.)

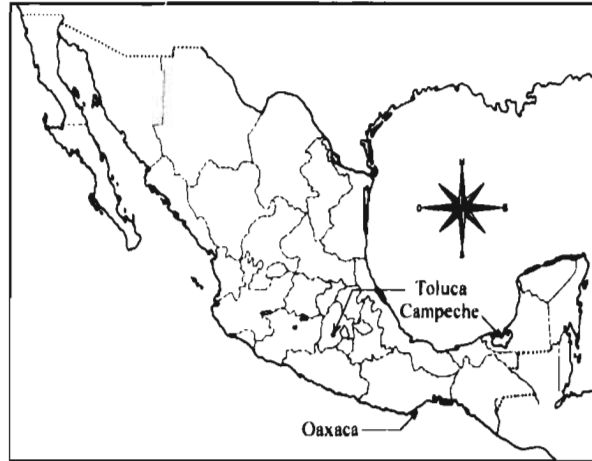


Figura 15 Zonas de obtención de sedimentos y lodos.

**TABLA 26 CARACTERÍSTICAS DEL COMBUSTÓLEO PROVENIENTE DE LA REFINERÍA DE TULA, HIDALGO.**

DETERMINACIÓN	RESULTADO	NORMA USADA	PRECISIÓN
Cenizas (% en peso)	0.274	ASTM D482-91	± 0.003
Viscosidad (SSF/37.8°C)	2110.0	ASTM D87-88	no especificado
Viscosidad (SSF/50°C)	700.40	ASTM D87-88	no especificado
Viscosidad (SSF/60°C)	306.10	ASTM D87-88	no especificado
Viscosidad (SSF/82.2°C)	78.36	ASTM D87-88	no especificado
Viscosidad (SSF/98.9°C)	40.59	ASTM D87-88	no especificado
Azufre (% en peso)	4.33	ASTM D1552-90	± 0.13
V. calorífico (Kcal/g)	10.151	ASTM D3286-91A	± 26 cal
V. calorífico Neto (Kcal/g)	9.632	ASTM D3286-91A	± 26 cal
Peso específico (20/4°C)	0.999	ASTM D70-86	± 0.005
T. de ignición (°C)	197.0	ASTM D92-85	8°C
Carbono (% en peso)	84.91	ASTM D5373-93	± 0.64
Hidrógeno (% en peso)	10.25	ASTM D5373-93	± 0.16
Nitrógeno (% en peso)	0.37	ASTM D5373-93	± 0.11
Oxígeno (% en peso)	0.14	ASTM D5373-93	calculado

(Longoria R., 1995. Departamento de Combustibles, IIE. Combustóleo obtenido de crudo Maya).

La caracterización realizada al combustóleo, incluyó también la determinación de metales pesados, otros elementos y cloruros. Los resultados de este análisis se presentan en la Tabla 27.

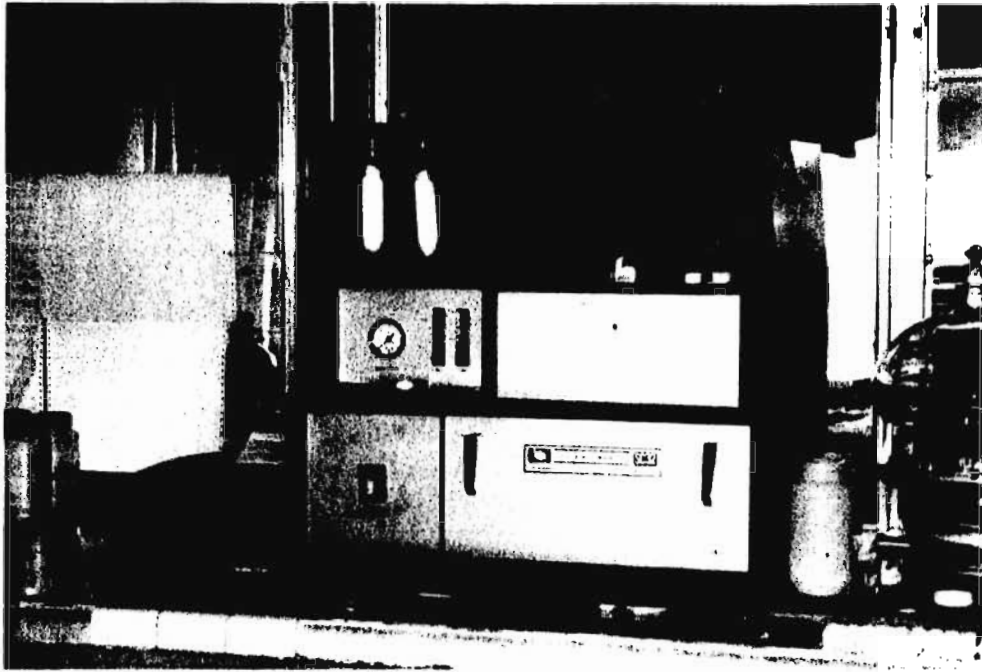
**TABLA 27. CONTENIDO DE METALES Y CLORUROS PARA LA MUESTRA DE COMBUSTÓLEO PROVENIENTE DE LA REFINERÍA DE TULA, HIDALGO.**

<b>METALES DETERMINADOS</b>	<b>RESULTADO (PPM)</b>
Níquel	5.54
Potasio	4.17
Sodio	15.45
Vanadio	311
Hierro	4.99
Cobre	> 1.00
Calcio	6.82
Magnesio	0.55
Cloruros	0.12

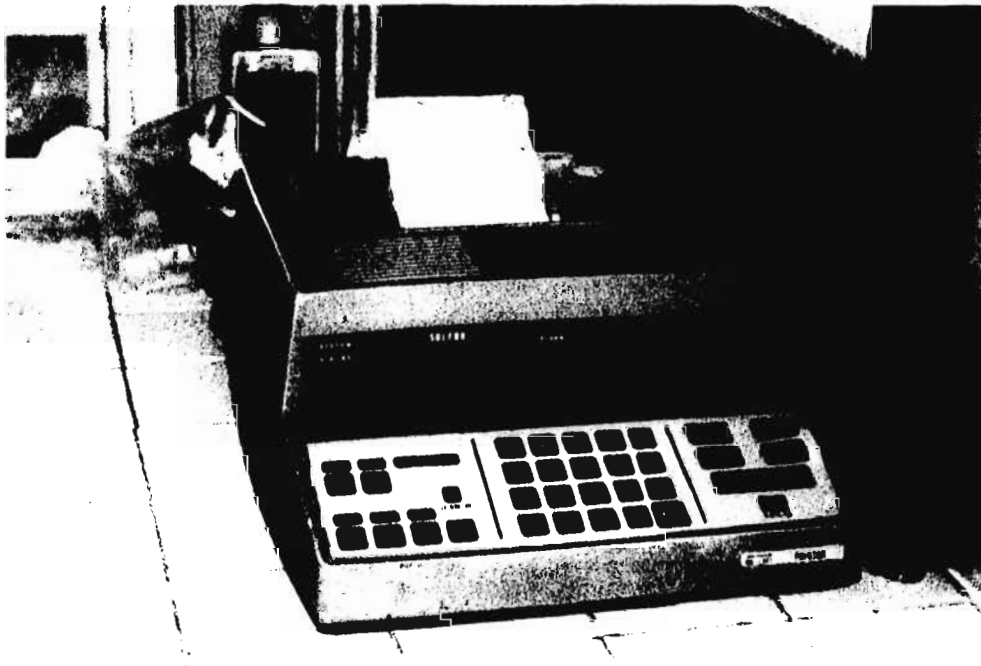
(Longoria, R., 1995. Departamento de Combustibles, IIE).

El equipo utilizado por el IIE para determinar el porcentaje de azufre en peso, fue de la marca Leco SC32 que opera con base en el método de alta temperatura establecido por la Norma ASTM D1552-90 (Ver fotografías 1 y 2, así como figura 16). Este equipo utiliza un horno eléctrico con detección por infrarrojo, registrando el dióxido de azufre producido por combustión de la muestra previamente pesada en el mismo equipo; este dato se traduce automáticamente y es registrado como porcentaje en peso de azufre total en la impresora del equipo (Las fotografías 3 y 4 muestran parte del procedimiento).

En el apéndice "A" se indica la formulación y preparación de los medios de cultivo y demás soluciones empleadas en la parte experimental. La esterilización de los medios de cultivo, soluciones preparadas así como el material de laboratorio utilizado (jeringas, acrodiscos, puntas para micropipeta etc.), se llevó a cabo a 15 lbs de presión durante 15 minutos, manteniendo la temperatura a 121°C. Esto se realizó utilizando una olla de presión de 12 litros de capacidad. La esterilización en calor seco aplicada a las pipetas serológicas (de 1 ml de capacidad), se realizó a 160°C durante 2 horas en un horno para esterilización en seco. Algunas soluciones se inocularon mediante esterilización por filtración; para esto se utilizó un acrodisco de 0.2  $\mu$ m colocado a una jeringa para insulina, ambos estériles.



*Fotografía 1 Equipo LECO SC32 para la determinación del porcentaje en peso de azufre total en combustibles.*



*Fotografía 2 Consola de control e impresora de resultados.*



*Fotografía 3 Introducción del crisol con muestra de combustóleo en la cámara de combustión.*



*Fotografía 4 Crisol fuera de la cámara de combustión después de la determinación de azufre.*



Todas las inoculaciones se realizaron bajo condiciones estériles usando un mechero y trabajando dentro de un radio de 15 cm. El material utilizado en la preparación de los medios y para realizar las pruebas fue de vidrio.



*Figura 16 Equipo de marca Leco SC32 para medición del porcentaje de azufre en peso.*

### **8.1. Pruebas exploratorias para detectar la presencia de bacterias sulfato-reductoras.**

Estas pruebas se aplicaron a 17 muestras de sedimento marino y 8 muestras de lodo anaerobio. El procedimiento que se siguió, se describe a continuación.

En un vaso de precipitado de 1 litro, se preparó la misma cantidad del medio API RP38 (ver apéndice A: medio No. 1); a continuación con una pipeta volumétrica se colocaron 20 ml de este medio en tubos de ensaye con tapón de rosca (se usaron 25 tubos grandes uno por cada muestra). Los tubos se cerraron, se esterilizaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Para verificar que la esterilización de los tubos con el medio fuera la correcta, se dejaron en observación durante 3 días; transcurrido este tiempo el medio de cultivo no presentó ningún cambio aparente (medio turbio, precipitado o diferente a la apariencia inicial); procediendo a colocar cada muestra de lodos y sedimentos dentro de los tubos con el medio como se indica a continuación:

Bajo condiciones estériles se pesó 1 g de muestra en una balanza granataria; para esto, cada muestra se colocó con una espátula en una charola de aluminio lavada con alcohol y secada a la flama con el mechero. El gramo de muestra se colocó en los tubos con medio API RP38 previamente esterilizados y se cerraron cerca del mechero. Después de la inoculación se marcó cada tubo de ensaye con la clave del cultivo correspondiente y se incubaron a 35°C durante 3 días, registrándose resultados cualitativos; después de estos 3 días los tubos se mantuvieron en incubación.

El procedimiento realizado se ilustra por medio del esquema de la Figura 17.

## **8.2. Proliferación celular.**

Para aumentar la biomasa se preparó 1 litro de medio API RP38 y se colocaron 40 ml de este medio en cada uno de los 25 viales (de 55 ml de capacidad); los viales se cerraron con un tapón de goma sobre el que se puso otro de aluminio (utilizando una pinza para viales) y se esterilizaron. Después de esto se dejaron enfriar a temperatura ambiente.

En un vaso de precipitado de 300 ml se preparó 100 ml de solución vitamínica de Stock (ver apéndice A: solución No. 2). De esta solución se colocó 0.1 ml mediante esterilización por filtración dentro de cada vial con el medio de cultivo. Enseguida, se tomaron 10 ml de biomasa con una jeringa, de cada uno de los tubos del punto anterior (8.1.); esta biomasa se inyectó dentro de los mismos viales con el medio de cultivo y la solución vitamínica de Stock (bajo condiciones estériles). Estos 25 viales formaron la serie 1 y se mantuvieron en incubación a 35°C. Después de 15 días se apreciaron resultados cualitativos y se siguieron manteniendo en incubación por un período de dos meses.

Al término de este período se reemplazaron los 25 cultivos siguiendo el mismo procedimiento (preparación del medio API RP38, esterilización, preparación de la solución vitamínica etc.), pero ahora se tomaron los 10 ml de inóculo de los viales en incubación (serie 1); con ello se obtuvo una segunda serie que fue incubada en las mismas condiciones durante dos meses. Esto se siguió haciendo cada dos meses para mantener cultivos activos. El procedimiento seguido se ilustra por medio del esquema de la Figura 18.

### Esquema ilustrativo de pruebas exploratorias para detectar la presencia de bacterias sulfato-reductoras

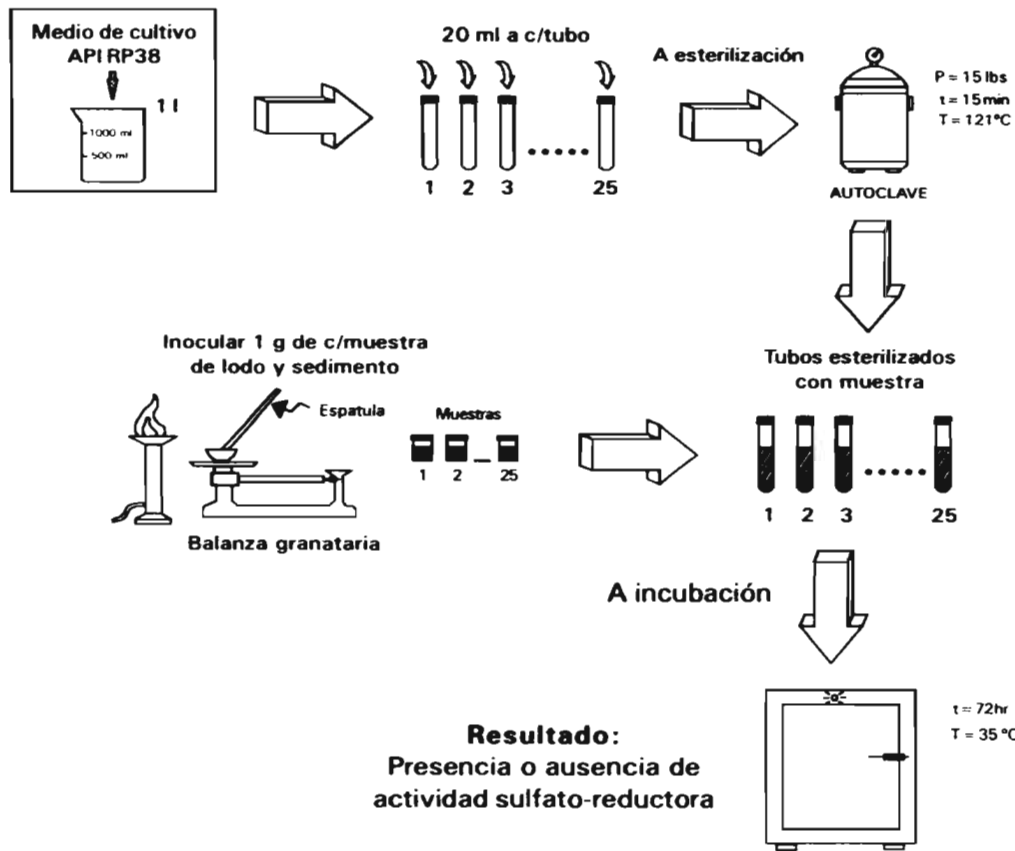


Figura 17

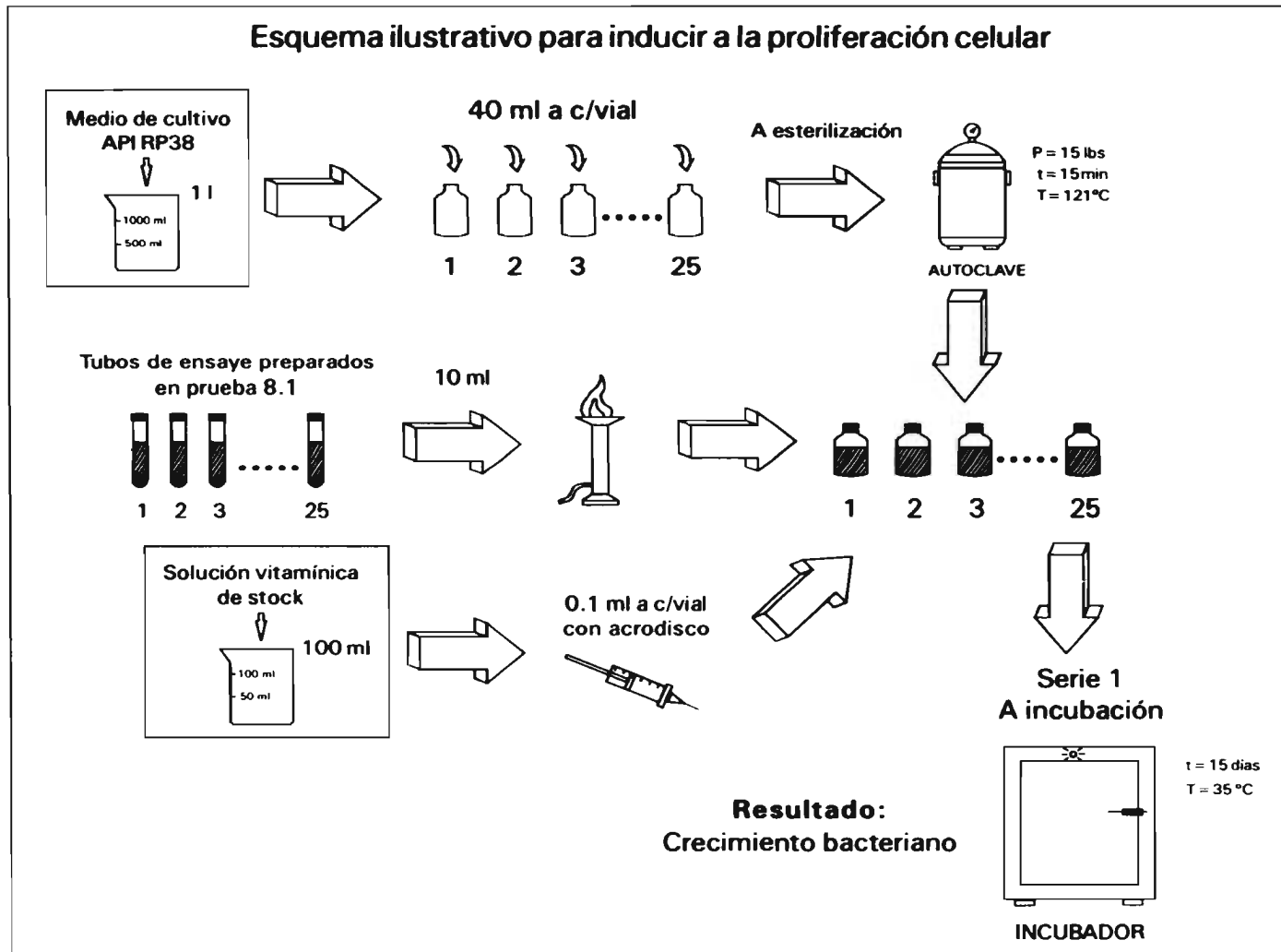


Figura 18

### **8.3. Determinación del número de células en cada cultivo mediante conteo directo del número de colonias.**

Para realizar el conteo de unidades formadoras de colonias, se aplicó el medio de Postgate modificado por Jacq utilizando tubos de Vanielli (tubos de 300X8 mm) y trabajando bajo condiciones estériles.

#### **8.3.1. Diluciones en medio mineral.**

Antes de preparar y usar los tubos de Vanielli se realizaron tres diluciones por cultivo ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$ ). Para esto, primero se hizo 1 litro de medio mineral (ver apéndice A: solución No. 3) repartiéndose 9 ml de este medio en tubos de ensaye (de 20 ml de capacidad) con tapón de rosca (usando una pipeta de 10 ml), se cerraron y se esterilizaron.

Después de esto se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Posteriormente las diluciones se ampliaron hasta la sexta dilución con el fin de distinguir fácilmente las unidades formadoras de colonias (ver esquema de la Figura 19).

##### **a) Primera dilución.**

Trabajando en condiciones estériles se tomó 1 ml de biomasa proveniente de cada uno de los 25 viales que se tenían en incubación (punto 8.2), esto se hizo con una jeringa de insulina estéril (se uso una por cultivo) colocándose esta medida de 1 ml dentro de los tubos que contenían 9 ml de medio mineral (1 ml en cada tubo hasta tener 25 tubos); se cerraron los tubos, se agitaron y con esto se obtuvo la primera dilución ( $10^{-1}$ ). El procedimiento seguido se muestra en el esquema de la Figura 19.

##### **b) Segunda dilución.**

Se tomaron porciones de 1 ml de la primera dilución ( $10^{-1}$ ), inciso a arriba, utilizando pipetas serológicas (esterilizadas en calor seco) una por cada tubo con dilución y se colocaron en cada uno de los siguientes 25 tubos con 9 ml de medio mineral. Los tubos se cerraron y se agitaron obteniéndose así la segunda dilución ( $10^{-2}$ ). El procedimiento se ilustra en el esquema de la Figura 19.

##### **c) Tercera dilución.**

Se tomó 1 ml de cada tubo de la segunda dilución ( $10^{-2}$ ) utilizando pipetas serológicas y se colocaron en los 25 tubos con medio mineral que quedaron; cada tubo se cerró y se agitó,

obteniéndose así la tercera dilución ( $10^{-3}$ ).

El esquema de este procedimiento se muestra en la Figura 19.

Las diluciones se aumentaron hasta la sexta ( $10^{-6}$ ), siguiendo la misma metodología, debido a que la tercera dilución resultó insuficiente para contar las unidades formadoras de colonias por el rápido crecimiento que presentaron las bacterias.

### **8.3.2. Preparación de los tubos de Vanielli.**

Después de haber realizado todas las diluciones se prepararon los tubos de Vanielli (tubos de 300X8 mm), para esto se preparó 1 litro de medio de Postgate modificado por Jacq para sulfato-reductoras (ver apéndice A: medio No. 4). Se colocaron 4 ml de este medio en los tubos de Vanielli, se les puso una torunda hecha con algodón y gasa, a continuación se esterilizaron y después se dejaron enfriar a temperatura ambiente quedando el medio sólido.

En un vaso de precipitado de 100 ml se preparó 50 ml de una solución reductora (ver apéndice A: solución No. 5) y se colocaron 0.5 ml de esta solución esterilizada por filtración, en cada uno de los tubos de Vanielli al momento de ser inoculados con la biomasa contenida en los viales preparados en la segunda prueba (punto 8.2).

Cinco minutos antes de usar los tubos de Vanielli se colocaron en baño maría a  $40^{\circ}\text{C}$  hasta que el medio se licuó; en este momento se agregaron 0.5 ml de la solución reductora y  $10\ \mu\text{l}$  de biomasa tomada de la primera dilución ( $10^{-1}$ ) utilizando una micropipeta con sus puntas previamente esterilizadas. A continuación, cada tubo se agitó hasta homogenizar su contenido, y se agregó 1 ml de parafina líquida para uso microbiológico; ésta se había calentado previamente para que al momento de agregarla a cada tubo formara un tapón aislante lo cual ayudo a mantener las condiciones anaerobias. El mismo procedimiento se siguió para el resto de las diluciones (hasta  $10^{-6}$ ).

La incubación de los tubos de Vanielli se hizo a  $35^{\circ}\text{C}$  durante 24 horas y después se contaron las unidades formadoras de colonias. Como fue necesario aumentar el número de diluciones hasta  $10^{-6}$ , se prepararon finalmente 150 tubos de Vanielli y 1.5 litros de medio mineral. El esquema que ilustra esta metodología se presenta en la Figura 20.

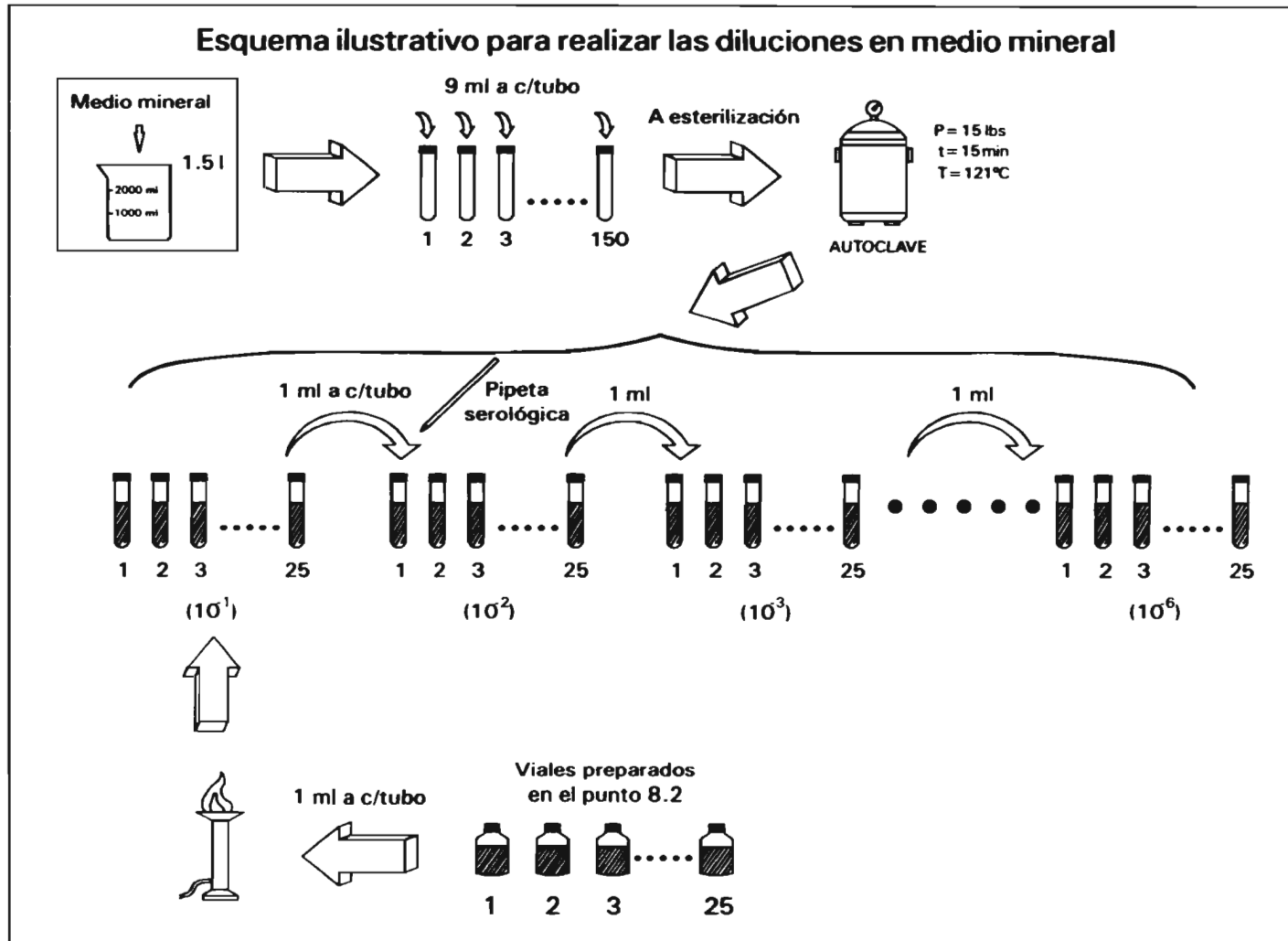


Figura 19

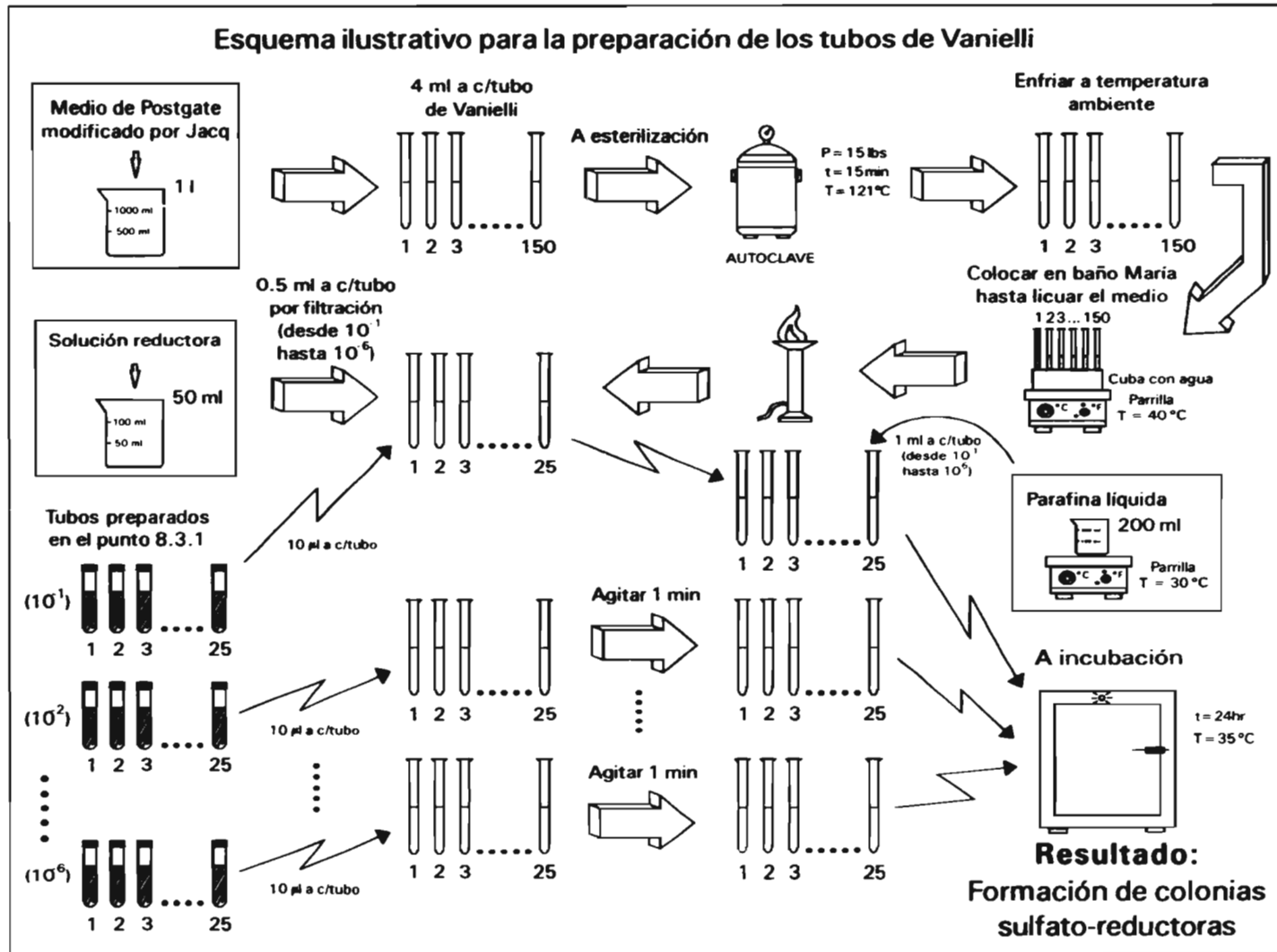


Figura 20



#### **8.4. Prueba exploratoria de biodesulfuración en combustóleo.**

Esta prueba se realizó para los 25 cultivos utilizando el medio de cultivo API RP38 (1965). Se utilizó el siguiente material: 27 tubos de ensaye medianos con tapón de rosca (dos para testigos), 25 jeringas para insulina previamente esterilizadas, una pipeta volumétrica (de 20 ml de capacidad), un vaso de precipitado de 1 litro y una asa de platino calibrada.

Se preparó 1 litro de medio API RP38, se colocó en cada tubo de ensaye 20 ml de este medio con la pipeta volumétrica, se esterilizaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente; antes de inocular la biomasa y el hidrocarburo se verificó que el medio no estuviera contaminado. A continuación, en cada uno de estos tubos de ensaye se les colocó 1 ml (1000  $\mu$ l) de biomasa tomada de los 25 viales preparados en el punto 8.2 con las jeringas de insulina; enseguida se agregaron 200  $\mu$ l de combustóleo en los mismos tubos; para ello, se calentó previamente el combustóleo en una plancha a 40°C (aproximadamente) y se tomó con una asa de platino calibrada y esterilizada a la flama colocándose el combustóleo dentro de cada tubo. Se incubaron a 35°C por espacio de tres a cuatro días.

Simultáneamente se prepararon dos testigos uno conteniendo 20 ml de medio API RP38 y 1 ml de biomasa del cultivo 2B DIG, el segundo conteniendo 200  $\mu$ l de combustóleo y 20 ml de medio API RP38. Estos testigos son un indicador (por comparación visual) del cambio presentado en los tubos con medio de cultivo, combustóleo y biomasa. Los testigos se incubaron junto con los tubos de ensaye a las mismas condiciones.

El esquema que ilustra este procedimiento se muestra en la Figura 21.

#### **8.5. Prueba de biodesulfuración en combustóleo utilizando un medio modificado.**

En esta prueba se tomó la formulación esencial del medio API RP38 pero se le eliminaron los compuestos sulfatados sustituyéndolos por otros; debido a esto, se le llamó medio modificado (ver apéndice A: medio modificado No 6). Se utilizaron 53 tubos medianos de ensaye con tapón de rosca (3 para testigos), jeringas de insulina esterilizadas, una asa de platino calibrada, una pipeta volumétrica de 20 ml y un vaso de precipitado de 1 litro.

Las veinticinco muestras de microorganismos fueron probadas por duplicado cada una, cambiando la relación combustóleo-cantidad de microorganismos. Primero se preparó 1.5 litros de medio modificado No 6, transfiriéndose con la pipeta 20 ml de este medio en cada uno de los tubos de ensaye, se esterilizaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. De estos tubos se tomaron 25 y a cada uno se les fue inyectando 1 ml (1000  $\mu$ l) de biomasa, tomada de cada uno de los viales que se tienen en incubación (punto 8.2).

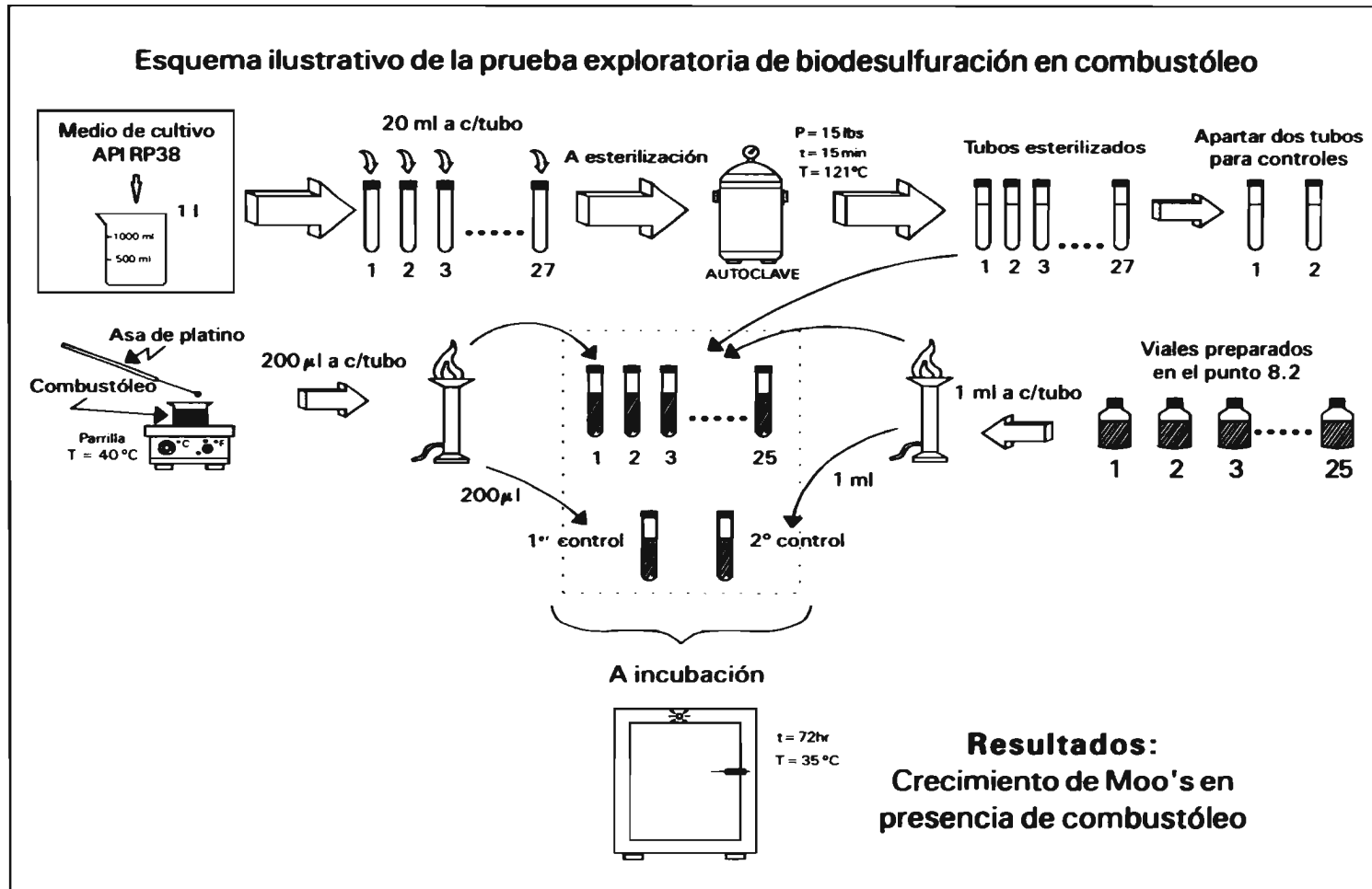


Figura 21

A continuación se les agregaron 200  $\mu$ l de combustóleo (previamente calentado) tomado con una asa de platino esterilizada a la flama cada vez que se tomó el hidrocarburo (se tomaron dos porciones de combustóleo). Las mismas operaciones se realizaron nuevamente en los siguientes 25 tubos de ensaye con medio de cultivo, pero ahora se inocularon con 500  $\mu$ l de biomasa tomada de los mismos viales en incubación y 200  $\mu$ l de combustóleo. Los 50 tubos se incubaron durante 7 días manteniendo la temperatura a 35°C.

En esta prueba se hicieron tres testigos, a dos de ellos se les colocó 20 ml de medio modificado No. 6 y se inocularon con 1000  $\mu$ l de biomasa en uno y 500  $\mu$ l en el otro. Un tercer testigo se hizo con 20 ml del mismo medio y 200  $\mu$ l de combustóleo sin inocular biomasa. Los testigos se incubaron a las mismas condiciones (a 35°C por 7 días). Los resultados se registraron cualitativamente.

El procedimiento se ilustra en el esquema que muestra la Figura 22.

#### **8.5.1. Segunda prueba de biodesulfuración en combustóleo.**

Esta segunda prueba se realizó utilizando mayor cantidad de combustóleo y aumentando la biomasa; con el medio modificado No. 7 (ver apéndice "A"), al cual se le adicionó un indicador orgánico de la actividad sulfato-reductora conocido como "metil viologen" ( $C_{12}H_{14}N_2Cl_2$ ). Las pruebas se hicieron por triplicado para cada cultivo, debido a que se necesitaba mayor cantidad de combustóleo para que pudiera ser registrado por el equipo del IIE.

Se utilizaron 77 tubos grandes con tapón de rosca (2 testigos), una asa de platino calibrada, jeringas esterilizadas, vaso de precipitado grande y una probeta graduada.

En el vaso de precipitado se prepararon 3.5 litros de medio modificado No. 7, se agregaron 40 ml de este medio en cada tubo de ensaye con la probeta. Una vez que se llenaron los 77 tubos se esterilizaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. De estos tubos se tomaron 75 para agregarles 400  $\mu$ l de combustóleo (con el asa de platino esterilizada a la flama) y 2000  $\mu$ l (2 ml) de biomasa (usar las jeringas una por cultivo) tomada de cada uno de los 25 viales preparados en el punto 8.2. Se prepararon tres series por cada cultivo de microorganismos.

Se hicieron dos testigos, uno de ellos contenía 40 ml de medio modificado No. 7 y 400  $\mu$ l de combustóleo, al segundo se le colocó 2000  $\mu$ l (2 ml) de biomasa del cultivo EP E3 y 40 ml del mismo medio modificado. Los 77 tubos de ensaye se incubaron a 35°C por espacio de 45 días. Los resultados se registraron en forma cualitativa después de este tiempo.

La metodología que se siguió en esta prueba se ilustra en la Figura 23.

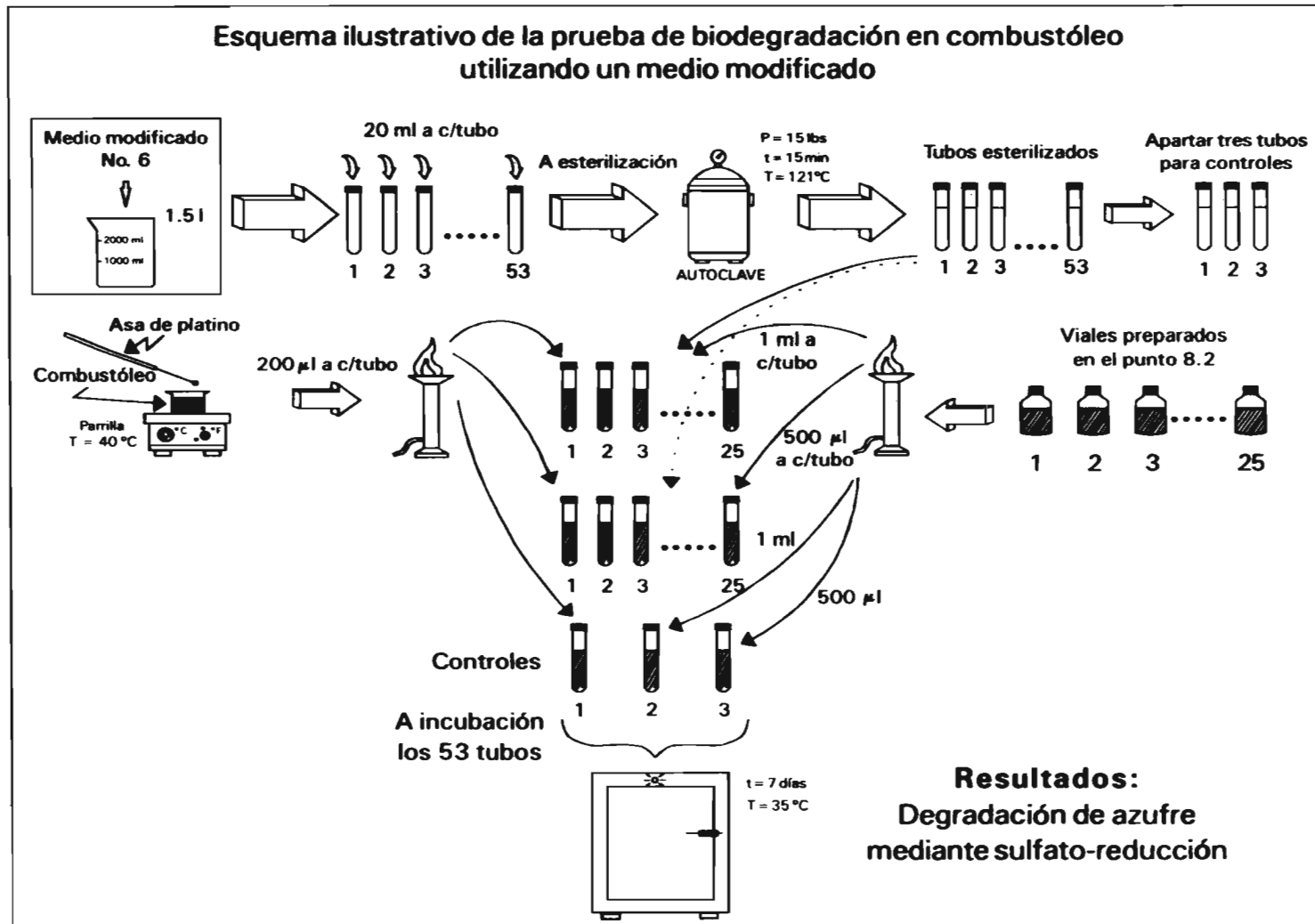


Figura 22

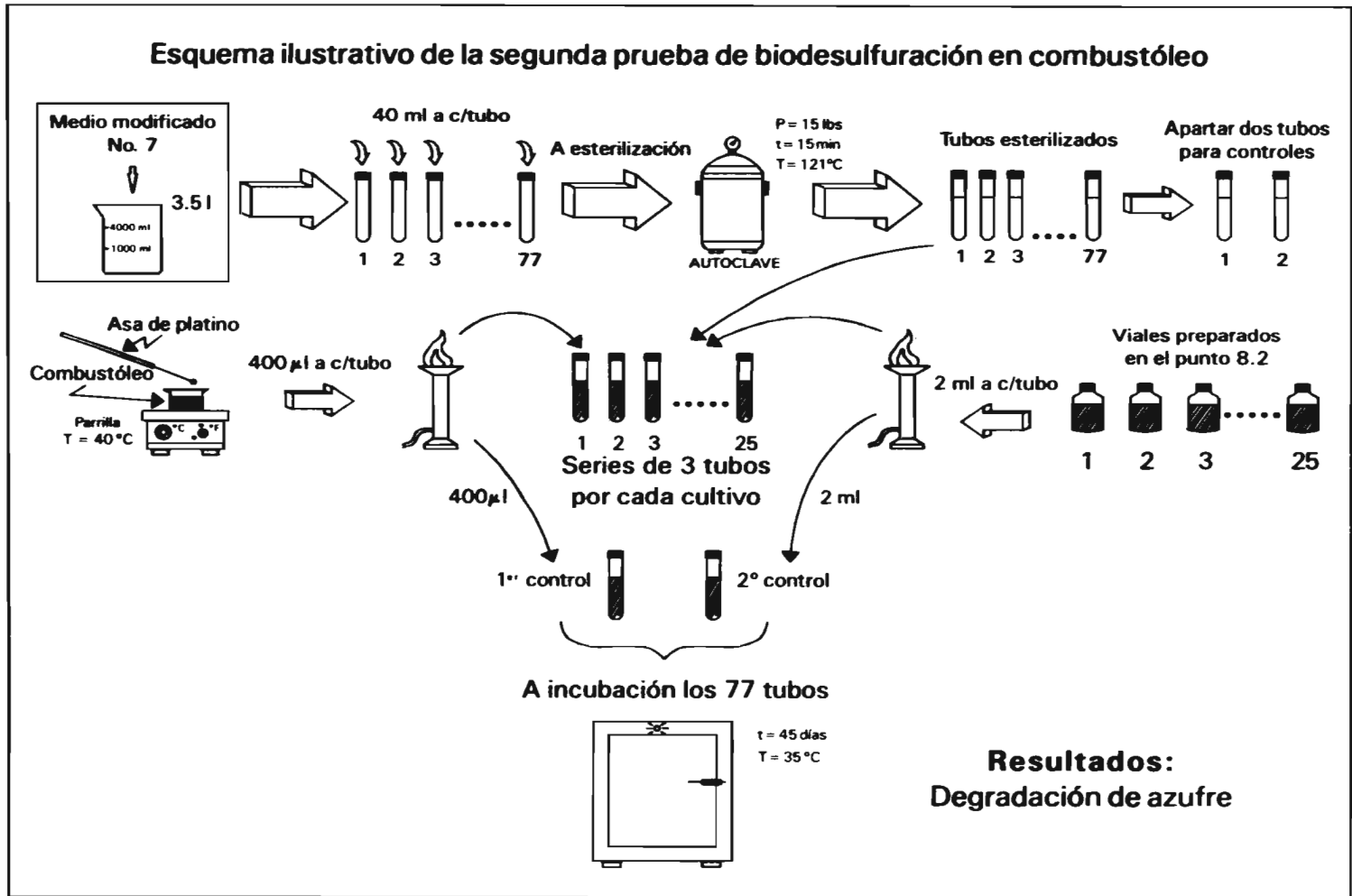


Figura 23

### **8.5.2. Tratamiento dado a las muestras de combustóleo para la determinación de azufre remanente.**

Este tratamiento se le dio a las 75 muestras de combustóleo preparadas en el punto anterior (8.5.1), después de haber estado expuestas a la acción de los microorganismos (45 días), para que se les midiera el azufre remanente que no fue utilizado por las bacterias.

El tratamiento se hizo debido a la interferencia provocada en el equipo de medición de azufre (Leco SC32), por una pequeña cantidad de medio de cultivo (llevando microorganismos) que se mezcló con la muestra de combustóleo, esto fue resultado del proceso biológico; nos percatamos de esta interferencia hasta que se intentó medir el azufre remanente en el equipo del IIE, ya que al momento de la combustión la muestra explotaba bruscamente; esto ocasionó error en la medición por lo que se tubo que realizar el tratamiento que a continuación se describe.

Se usaron 26 frascos de 10 ml con tapón de rosca, una parrilla con calentamiento controlado, una pipeta volumétrica, un recipiente de aluminio, una espátula chica y una balanza analítica digital.

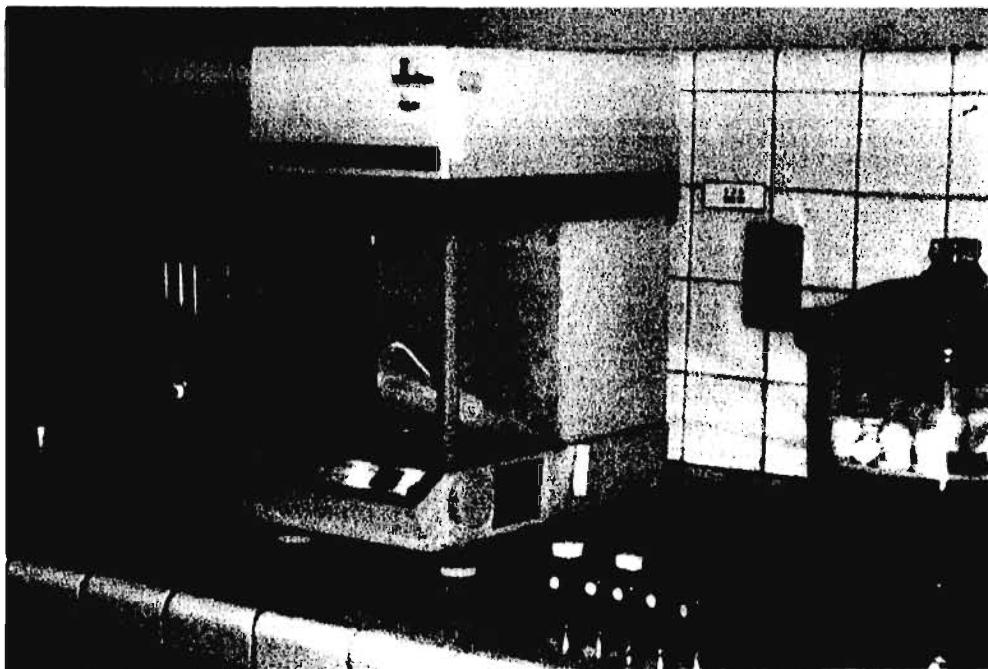
Los frascos sin tapa se pesaron y se enumeraron; a continuación, se tomaron con la espátula las 75 muestras de combustóleo biodesulfurado y se colocaron en los frascos; la parte de la muestra de combustóleo que se quedó adherida a la espátula, se disolvió agregando 2 ml de tolueno a cada frasco con una pipeta volumétrica, disolviéndose así la muestra. Enseguida, se colocaron los frascos en baño maría hasta evaporar completamente el tolueno y el agua del medio de cultivo (ver fotografía 5), quedando únicamente la muestra de combustóleo en el frasco. Una vez hecha la evaporación, se pesaron nuevamente los frascos en la balanza analítica y se les agregó 2 ml de gasolina Nova para facilitar el manejo de la muestra al momento de la medición con el equipo del IIE. Estas muestras homogenizadas con gasolina se pesaron por tercera ocasión en la balanza analítica, para obtener la cantidad exacta de gasolina agregada a cada muestra. Los frascos cerrados y etiquetados se enviaron al Instituto de Investigaciones Eléctricas para que se les determinara el porcentaje en peso de azufre remanente (ver fotografía 6).

En esta prueba se preparó un testigo con el mismo tipo de combustóleo sin exponerlo al proceso biológico, sometiéndolo al mismo tratamiento (adición de tolueno, evaporación, determinación del peso, adición de gasolina, etc.) que se le dio a las muestras biodesulfuradas de combustóleo. En total fueron 25 muestras de combustóleo biodesulfurado y un testigo de combustóleo. A la gasolina Nova utilizada en esta prueba, también se le determinó el porcentaje de azufre total con el mismo equipo. Los resultados cuantitativos se presentan en el capítulo correspondiente de esta tesis.

El procedimiento de esta prueba se ilustra en el esquema de la Figura 24.



*Fotografía 5 Tratamiento proporcionado a las muestras bioprocesadas para la determinación de azufre remanente.*



*Fotografía 6 Muestras preparadas para la medición de azufre remanente en el Instituto de Investigaciones Eléctricas.*

### Esquema ilustrativo del tratamiento efectuado a las muestras de combustóleo para la determinación de azufre remanente

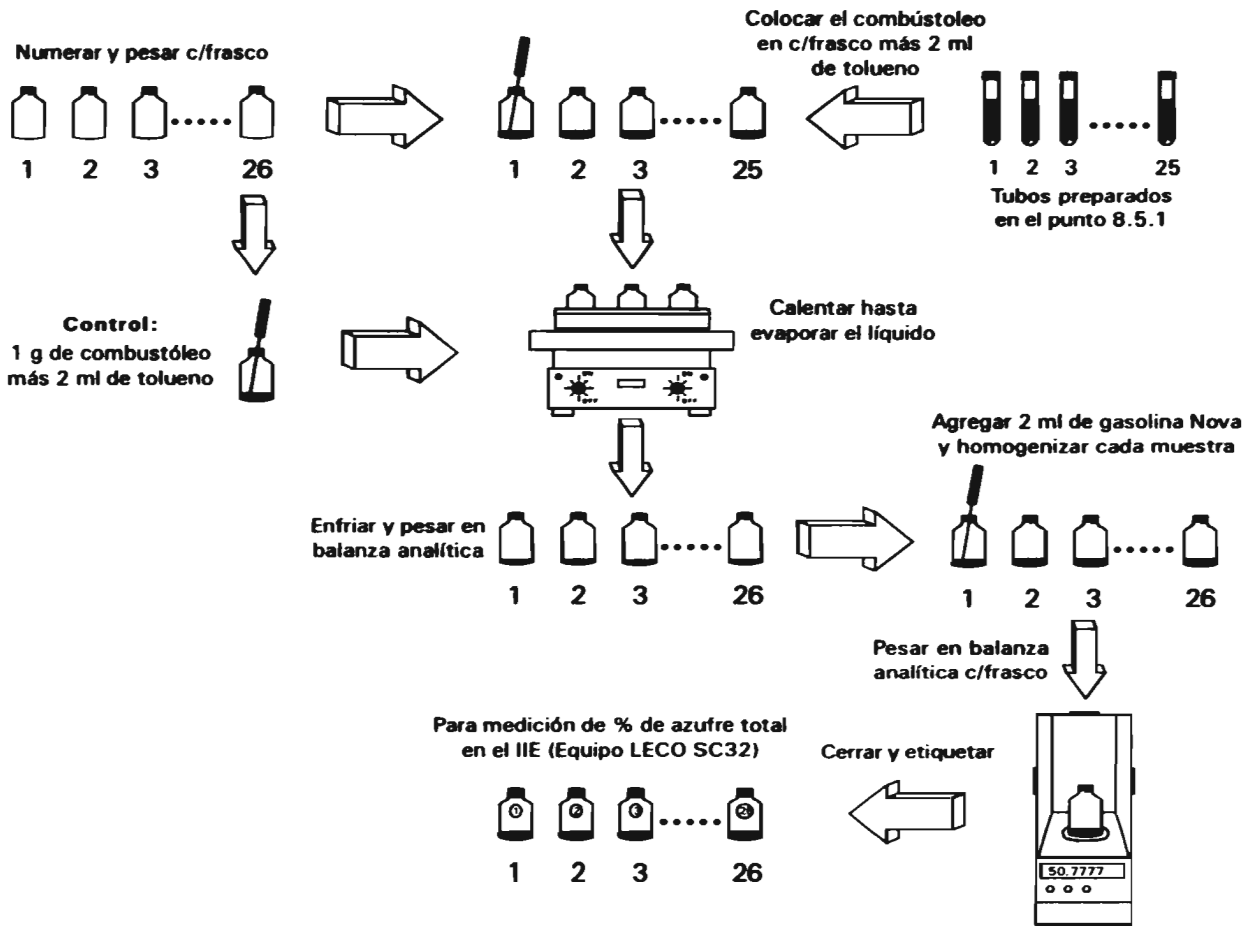


Figura 24



## ***CAPÍTULO 9***

### **RESULTADOS: ANÁLISIS Y DISCUSIÓN.**

En este capítulo se presentan y se analizan los principales resultados que se han obtenido en esta investigación. Cabe destacar que los resultados, en su mayoría, son de naturaleza cualitativa.

#### **9.1. Resultados cualitativos de las pruebas exploratorias para detectar bacterias sulfato-reductoras.**

En esta prueba se observó un claro crecimiento de microorganismos sulfato-reductores después de 3 días de incubación. Los tubos presentaron ennegrecimiento en la parte superior y el medio cambió de un amarillo claro a un color gris oscuro y turbio; además, la muestra de lodo anaerobio y sedimento marino que se colocó en los tubos cambio de color poniéndose más oscuro (pasó de color café a negro). En el fondo de los tubos se formó un precipitado negro bastante visible y el olor a sulfuro de hidrógeno fue intenso. Estas características indican actividad sulfato-reductora propia de estas bacterias. Sin embargo, cabe mencionar que a pesar de que las 25 muestras presentaron actividad sulfato-reductora, no fue con el mismo grado; a juzgar por la cantidad de precipitado que se formó en el fondo de los tubos y la intensidad del olor a sulfuro de hidrógeno.

La zona de muestreo de Estero Pargo, Campeche, es una zona impactada por derrames de crudo y la contaminación es tan abundante que existen zonas anaerobias, de las cuales se obtuvieron las muestras de sedimento marino.

Ya que tanto las muestras de lodo anaerobio como las de sedimento marino, provenían de sitios anaerobios, existía una alta posibilidad de encontrar gérmenes sulfato-reductores; sin embargo, esto se tenía que comprobar cualitativamente. Afortunadamente, las muestras dieron positivo a la sulfato-reducción; por lo que, se continuó la investigación trabajando con estas muestras.

## **9.2. Resultados cualitativos de la proliferación celular.**

Cuando se indujo la proliferación celular, el crecimiento bacteriano fue abundante después de 15 días de incubación a 35°C. Los cultivos presentaron diferente proliferación celular ya que algunos se observaron con más concentración de biomasa formando aglomerados negros que se situaban en la parte inferior del vial (ver fotografía 7); en algunos otros, como en el SR DGT, SR1 DIG, 1B DIG, SO DIG y R N-4 se formaron ligeros precipitados amarillos y el medio no cambió de color quedando con una tonalidad amarillo claro (ver fotografía 8).

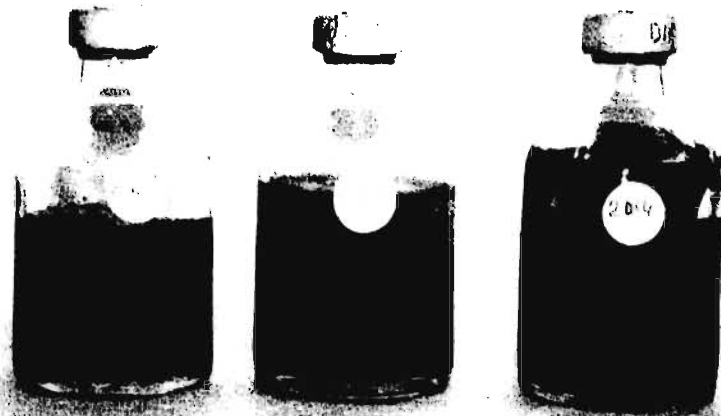
Lo anterior indica que los géneros de microorganismos sulfato-reductores no son del mismo tipo en todas las muestras, y que su concentración celular varía aleatoriamente dependiendo del cultivo microbiano de que se trate; esto último se confirmó cuando se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) con la técnica de los tubos de Vanielli.

## **9.3. Resultados cuantitativos del número de unidades formadoras de colonias (UFC) en 25 cultivos mixtos silvestres.**

El número de células en cada cultivo aplicando el medio de Postgate modificado por Jacq en los tubos de Vanielli, se realizó por conteo directo del número de colonias, observándose puntos negros de diferente tamaño. Las colonias fueron contadas después de 24 horas de la cuarta a la sexta dilución. La abundante concentración de biomasa impidió realizar el conteo en las diluciones menores.

En esta prueba el crecimiento de microorganismos fue muy rápido. Las diluciones se ampliaron hasta la sexta para que pudieran ser contadas las colonias y se disminuyó la cantidad inoculada de biomasa a 10  $\mu$ l. Los cultivos microbianos con mayor concentración celular fueron los provenientes de digestores variando desde 18 UFC hasta 52 UFC; debido a que provienen de lodos previamente poblados. Las muestras de sedimento marino de Oaxaca y Campeche, mostraron menor cantidad de células encontrándose desde 2 UFC hasta 38 UFC. Sin embargo, la actividad degradativa de los compuestos de azufre fue mayor como se pudo comprobar en las pruebas siguientes.

Los resultados del conteo de unidades formadoras de colonias se muestran en la Tabla 27.



*Fotografía 7 Viales mostrando la proliferación celular de cultivos mixtos silvestres.*



*Fotografía 8 Viales mostrando la proliferación celular de cultivos mixtos silvestres.*

**TABLA 27. RESULTADOS DEL CONTEO DIRECTO DE COLONIAS USANDO EL MEDIO DE POSTGATE MODIFICADO POR JACQ EN TUBOS DE VANIELLI.**

Clave de los cultivos	Cantidad de inóculo en $\mu$ l	Diluciones en medio mineral	Dilución tomada	Unidades formadoras de colonias	Temperatura de Incubación
O' N-1'	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	13	35°C
O' N-2'	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-4}$	2	35°C
O' N-3'	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-5}$	12	35°C
O' N-4'	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-4}$	7	35°C
O N-1	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	33	35°C
O N-2	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-4}$	4	35°C
O N-3	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-4}$	4	35°C
O N-4	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	38	35°C
R' N-1'	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-4}$	3	35°C
R' N-2'	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-4}$	9	35°C
EP E1	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-4}$	4	35°C
EP E2	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-5}$	4	35°C
EP E3	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	15	35°C
EP E4	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-4}$	2	35°C
EP E5	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-5}$	12	35°C
EP E6	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-4}$	5	35°C
R N-4	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-5}$	6	35°C
2 DIG	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	46	35°C
2A DIG	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	52	35°C
1B DIG	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	26	35°C
2B DIG	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	32	35°C
SO DIG	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	23	35°C
SR1 DIG	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	20	35°C
DGT	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	18	35°C
SR DGT	10	$10^{-1}$ - $10^{-6}$	$10^{-6}$	19	35°C

#### **9.4. Resultados cualitativos de la prueba exploratoria de biodesulfuración en combustóleo.**

En esta prueba de exploración se pretendía observar el comportamiento de los 25 cultivos de microorganismos en presencia de 200  $\mu$ l de combustóleo. En forma general, se observó que 21 cultivos presentaron actividad sulfato-reductora en presencia del hidrocarburo, a juzgar por el olor a sulfuro de hidrógeno ( $H_2S$ ) que se percibió, y la presencia visible de un precipitado negro (sal de hierro). En los cuatro cultivos restantes el combustóleo resultó aparentemente tóxico, ya que impidió el crecimiento de las bacterias sulfato-reductoras, pues no se observó cambio en el medio de cultivo al compararlo con los testigos y tampoco se percibió olor a sulfuro de hidrógeno. En la Tabla 28 se especifican los cultivos que presentaron actividad sulfato-reductora, indicándose con un signo positivo (+); y aquellos en los cuales no se observó sulfato-reducción señalados con signo negativo (-). En los cultivos que presentaron actividad sulfato-reductora en presencia de combustóleo, se pudo observar lo siguiente:

a) A pesar de las altas concentraciones de Vanadio, 311 ppm, en el combustóleo, éste no resultó tóxico para las bacterias ya que mostraron sulfato-reducción.

b) En algunos cultivos la actividad se detectó a los 3 días, en otros fue hasta el cuarto día. Sin embargo, todas las muestras positivas cambiaron el color inicial del medio, del amarillo claro al gris turbio; y se observó una ligera emulsificación en el hidrocarburo y fraccionamiento en el mismo, visto como partículas dispersas de combustóleo. Además, se detectó un intenso olor a sulfuro de hidrógeno y la presencia de un precipitado negro (sulfuro de hierro), indicador característico de este tipo de bacterias cuando se produce sulfuro (Postgate, 1981).

c) La emulsificación obtenida en el combustóleo permaneció en todas las muestras. La cantidad de sal de hierro que precipitó y el sulfuro de hidrógeno observados, parecen depender del número de células por cultivo y la actividad propia de cada muestra, ya que en algunos cultivos el olor fue más intenso que en otros; lo mismo ocurrió con el precipitado de sulfuro de hierro que se formó.

Los sedimentos marinos fueron los que mostraron mayor actividad sulfato-reductora (mejor emulsificación y fraccionamiento en el combustóleo, olor intenso y precipitado visible) en comparación con los lodos anaerobios de la cervecería. Esto seguramente se debe a que los sedimentos marinos provienen de una zona petrolera impactada por la presencia de hidrocarburos, debido a los derrames de crudo que existen en la zona desde hace varios años. Esto ha provocado la formación de zonas anaerobias propicias para el crecimiento de microorganismos anaerobios que se han aclimatado a las altas concentraciones de hidrocarburos. En el caso de los lodos provenientes de la cervecería, en tres muestras de microorganismos, no se detectó acción sulfato-reductora apreciable (ver Tabla 28).

**TABLA 28. RESULTADOS DE LA PRUEBA EXPLORATORIA DE BIODEGRADACIÓN EN COMBUSTÓLEO USANDO EL MEDIO API RP38.**

<b>Clave</b>	<b>Actividad</b>	<b>Observaciones</b>
O' N-1'	+	Emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S, precipitado negro
O' N-2'	+	Emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado negro
O' N-3'	±	Poca emulsificación, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado negro
O' N-4'	+	Emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S, precipitado negro
O N-1	±	Poca emulsificación, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado negro
O N-2	+	Emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S, precipitado negro
O N-3	+	Buena emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado
O N-4	+	Emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S, precipitado negro
R' N-1'	+	Emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S, precipitado negro
R' N-2'	-	Sin cambio aparente, permaneciendo igual al testigo
EP E1	+	Buena emulsificación y fraccionamiento; olor a H <sub>2</sub> S
EP E2	+	Buena emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado
EP E3	+	Buena emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado
EP E4	+	Buena emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado
EP E5	+	Emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado
EP E6	+	Emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado
R N-4	+	Emulsificación, fraccionamiento, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado
2 DIG	-	Sin cambio visible, permaneciendo igual al testigo.
2A DIG	-	Sin cambio visible, permaneciendo igual al testigo.
1B DIG	+	Emulsificación, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado negro
2B DIG	+	Emulsificación, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado negro
SO DIG	-	Sin cambio visible, permaneciendo igual al testigo
SR1 DIG	+	Emulsificación, olor a H <sub>2</sub> S y escaso precipitado
DGT	+	Emulsificación, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado negro
SR DGT	+	Buena emulsificación, olor a H <sub>2</sub> S y precipitado negro

(±) Actividad sulfato-reductora baja.

### 9.5. Resultados cualitativos de la primera prueba de biodesulfuración.

Al agregar 200  $\mu\text{l}$  de combustóleo a un medio libre de sulfatos, se vió en algunos cultivos sulfato-reducción; tanto en las inoculaciones con 1000  $\mu\text{l}$  como en las de 500  $\mu\text{l}$  de biomasa. Los resultados cualitativos se muestran en la Tabla 29.

**TABLA 29. RESULTADOS DE LA 1ª PRUEBA DE BIODESULFURACIÓN EN COMBUSTÓLEO.**

Clave	Actividad	Observaciones
O' N-1'	1000 $\mu\text{l}$ (+)	Emulsificación, precipitado negro (sal de hierro), olor a H <sub>2</sub> S, cambio de color en el medio del amarillo al gris.
O' N-2'	1000 $\mu\text{l}$ (+)	Emulsificación, presencia de sal de hierro, olor a H <sub>2</sub> S, cambio de color en el medio del amarillo al gris.
O' N-4'	1000 $\mu\text{l}$ ( $\pm$ )	Poco precipitado de la sal de hierro y débil olor. Sin emulsificación
O N-2	1000 $\mu\text{l}$ (+)	Emulsificación, precipitado negro, olor a H <sub>2</sub> S y vire del amarillo al gris.
O N-3	500 $\mu\text{l}$ ( $\pm$ )	Poco precipitado y olor, el medio no cambio, poca emulsificación.
	1000 $\mu\text{l}$ (+)	Emulsificación, presencia de sal de hierro, fuerte olor a H <sub>2</sub> S, el medio cambio del amarillo al gris oscuro.
O N-4	500 $\mu\text{l}$ (+)	Emulsificación, precipitado negro, fuerte olor, cambio en el medio de amarillo al gris oscuro.
	1000 $\mu\text{l}$ (+)	
R' N-1'	1000 $\mu\text{l}$ (+)	Emulsificación, olor a H <sub>2</sub> S, precipitado de la sal de hierro, y el medio viró del amarillo al gris.
R' N-2'	1000 $\mu\text{l}$ ( $\pm$ )	Poca emulsificación y olor, escaso precipitado y el medio no cambio.
EP E1	500 $\mu\text{l}$ (+)	En ambas muestras hubo emulsificación, fuerte olor a H <sub>2</sub> S, presencia de sal de hierro, y el medio viró del amarillo al gris oscuro.
	1000 $\mu\text{l}$ (+)	
EP E2	500 $\mu\text{l}$ (+)	En ambas muestras hubo emulsificación, fuerte olor a H <sub>2</sub> S, presencia de sal de hierro, el medio viró del amarillo al gris oscuro.
	1000 $\mu\text{l}$ (+)	
EP E5	500 $\mu\text{l}$ (+)	Emulsificación, precipitado negro, olor y cambio de color en el medio del amarillo al gris.
	1000 $\mu\text{l}$ (+)	
EP E6	500 $\mu\text{l}$ (+)	Emulsificación, precipitado negro, olor a sulfuro de hidrógeno y cambio de color en el medio del amarillo al gris.
	1000 $\mu\text{l}$ (+)	
R N-4	500 $\mu\text{l}$ (+)	En ambas muestras hubo emulsificación, fuerte olor a H <sub>2</sub> S, presencia de sal de hierro, y el medio viró del amarillo al gris oscuro.
	1000 $\mu\text{l}$ (+)	
1B DIG	1000 $\mu\text{l}$ (+)	Emulsificación, precipitado negro, olor y cambio de color al gris.
SRDGT	1000 $\mu\text{l}$ (+)	Emulsificación, precipitado negro, olor y cambio de color al gris.

En relación con la Tabla 29; en esta, no se presentan los cultivos que permanecieron igual a los testigos (sin cambio visible), ya que se consideraron sin actividad. Solo se incluyeron los cultivos que mostraron buena actividad; estos son, los marcados con signo positivo (+); así como los que mostraron una sulfato-reducción parcial, indicándose con signo más-menos ( $\pm$ ).

Como se puede apreciar en la Tabla 29, los cultivos que mostraron una respuesta positiva observable a la biodesulfuración, fueron en su mayoría, los provenientes de Campeche y Oaxaca. En esta prueba se confirmó que los microorganismos provenientes de sedimentos marinos de zonas impactadas por crudo, son los más aptos para llevar a cabo la degradación de los compuestos de azufre en el combustóleo. Dentro de estos cultivos, los más activos fueron EP E1, EP E2, EP E5, EP E6, R N-4 y O N-4; ya que, dieron positivo a la sulfato-reducción aún con 500  $\mu$ l de biomasa. La actividad sulfato-reductora en la mayoría de las muestras con 500  $\mu$ l de biomasa fue nula o menor; esto hace pensar que la cantidad de células inoculadas también es importante para llevar a cabo la biodesulfuración.

#### **9.5.1. Resultados cuantitativos de la biodesulfuración utilizando "Metil Viologen" como indicador de la sulfato-reducción.**

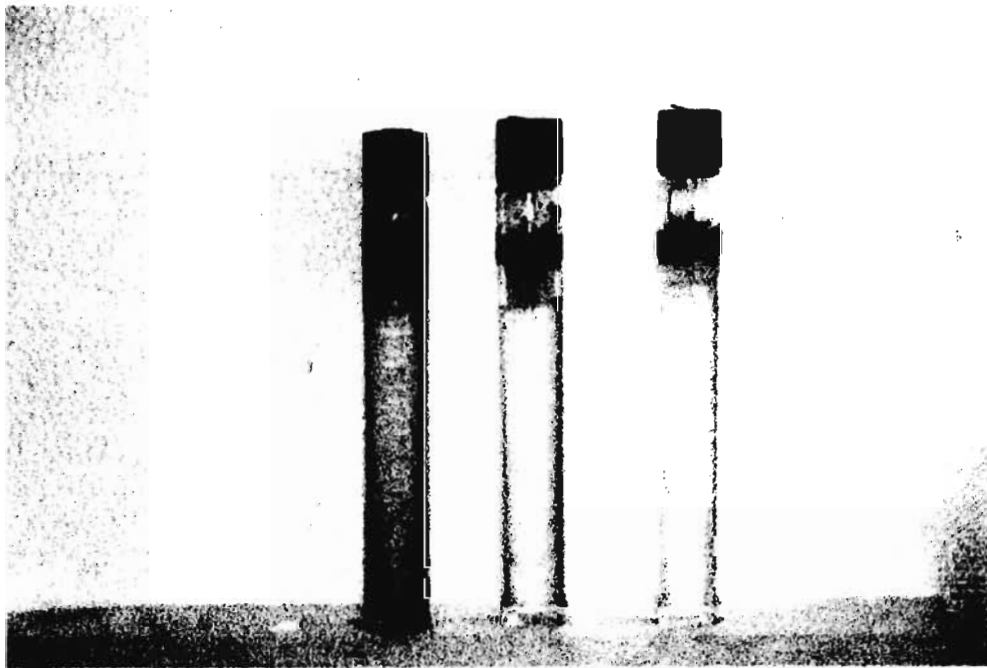
En esta última prueba de degradación de azufre aumentando la biomasa y la cantidad de combustible, se observó un claro abatimiento de la actividad, ya que los resultados solo se pudieron detectar después de 3 semanas a partir de la inoculación. Para confirmar actividad sulfato-reductora, se tomaron como base los cambios ya comunes observados en las pruebas anteriores y en el cambio del medio a color azul que provoca el metil viologen cuando hay sulfato-reducción (Kim *et al.*, 1995). Cabe mencionar que aunque varias muestras no fueron positivas al cambio de color, si presentaron un ligero fraccionamiento en el combustóleo; así como olor a sulfuro de hidrógeno (ver fotografía 9).

Los cultivos que cambiaron el medio de color del amarillo al azul (ver fotografía 10), mostraron un claro crecimiento; a juzgar por la formación de la sal de hierro que precipitó, el olor a H<sub>2</sub>S y la emulsificación y fraccionamiento visibles en el combustóleo; estos cultivos fueron: 1B DIG, SR DGT, O N-4, EP E1, EP E2, EP E5, EP E6 y R N-4, en estas muestras, provenientes de lodos anaerobios y de sedimentos marinos de Oaxaca y Campeche, se observó que después de 45 días de incubación, el color del medio cambió del azul claro a un azul más intenso, el cual permaneció. Como se puede apreciar, los microorganismos provenientes de zonas impactadas, han tenido un contacto prolongado con los heterocíclicos de azufre del petróleo, enriqueciéndolos metabólicamente para que posean actividad degradativa. Otros autores basándose en esto, han trabajado con lodo de crudo (Kurita *et al.*, 1971), suelo mojado con petróleo (Sagardia *et al.*, 1975; Monticello *et al.*, 1985), y sitios con carbón (Isbister *et al.*, 1988; Ochman y Kluber, 1986), para aislar bacterias desulfurizantes.





*Fotografía 9 Tubos de ensaye mostrando la sulfato-reducción en presencia del combustóleo.*



*Fotografía 10 Tubos de ensaye mostrando la sulfato-reducción en presencia del combustóleo.*

En cultivos como: O'N-1', O'N-2', O'N-4', O N-2, O N-3, R'N-1', R'N-2', EP E3, SO DIG y SR1 DGT hubo un fuerte olor a sulfuro de hidrógeno y sal de hierro como precipitado. Sin embargo, no mostraron ningún cambio de color al indicador; el fraccionamiento en el combustóleo fue menor en comparación con aquellas muestras que si cambiaron al azul. El resto de las muestras que en su mayoría fueron las provenientes de los digestores de cervecería, no mostraron actividad permaneciendo igual a los testigos usados en esta prueba.

Los resultados cuantitativos del por ciento de azufre degradado por los microorganismos, fueron determinados por el Instituto de Investigaciones Eléctricas en el departamento de combustibles utilizando un equipo Leco SC32 (método de alta temperatura). Las mediciones finales indican que la concentración de azufre ha disminuido desde un 81 % en las muestras con menor actividad hasta un 91 % en los cultivos cuya actividad fue mayor. Obteniéndose un promedio global de la biodesulfuración del 86.76% considerando los 25 cultivos de microorganismos. Los resultados individuales se muestran en la Tabla 30.

**TABLA 30 RESULTADOS DE LA BIODESULFURACIÓN EN COMBUSTÓLEO.**

<b>Muestra</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Azufre (%)</b>	<b>Promedio (%)</b>	<b>Resultado (%)</b>	<b>% desulf.</b>
1	106	0.202	0.198	0.146	85.31
	112	0.194			
2	115	0.194	0.179	0.127	87.25
	112	0.163			
3	110	0.230	0.240	0.188	81.08
	109	0.250			
4	104	0.198	0.195	0.143	85.56
	110	0.193			
5	112	0.210	0.227	0.175	82.43
	113	0.243			
6	114	0.181	0.205	0.153	84.57
	117	0.229			
7	115	0.192	0.192	0.140	85.96
	115	0.191			

**TABLA 30 RESULTADOS DE LA BIODESULFURACIÓN EN COMBUSTÓLEO.  
(CONTINUACIÓN)**

<b>Muestra</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Azufre (%)</b>	<b>Promedio (%)</b>	<b>Resultado (%)</b>	<b>% desulf.</b>
8	107	0.147	0.156	0.104	89.53
	108	0.165			
9	104	0.198	0.187	0.135	86.37
	105	0.177			
10	111	0.195	0.186	0.134	86.49
	118	0.178			
11	107	0.133	0.140	0.088	91.10
	120	0.147			
12	112	0.174	0.181	0.129	86.97
	111	0.189			
13	120	0.206	0.203	0.151	84.84
	111	0.199			
14	111	0.216	0.212	0.160	83.88
	104	0.208			
15	116	0.155	0.160	0.108	89.11
	125	0.165			
16	103	0.143	0.142	0.090	90.94
	108	0.141			
17	107	0.154	0.151	0.099	90.03
	106	0.148			
18	111	0.209	0.221	0.169	82.94
	110	0.234			

**TABLA 30 RESULTADOS DE LA BIODESULFURACIÓN EN COMBUSTÓLEO.  
(CONTINUACIÓN)**

<b>Muestra</b>	<b>Peso (mg)</b>	<b>Azufre (%)</b>	<b>Promedio (%)</b>	<b>Resultado (%)</b>	<b>% desulf.</b>
19	111	0.193	0.210	0.158	84.10
	111	0.227			
20	107	0.149	0.141	0.089	91.04
	108	0.133			
21	109	0.212	0.209	0.157	84.19
	103	0.206			
22	111	0.167	0.170	0.118	88.17
	111	0.172			
23	112	0.172	0.164	0.112	88.75
	105	0.155			
24	109	0.180	0.176	0.124	87.51
	141	0.173			
25	118	0.145	0.143	0.091	90.83
	108	0.141			
26	105	1.030	1.045	0.993	
	111	1.060			
<b>Blanco de gasolina:</b>		0.052			
<b>Muestra sin biodesulfuración (%):</b>				0.993	
<b>Promedio con biodesulfuración (%):</b>				0.132	86.76

En el apéndice "B" se han anexado los resultados originales del porcentaje de azufre remanente, determinado por el IIE.

## **CAPÍTULO 10**

### **CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.**

La utilización de bacterias sulfato-reductoras para el aprovechamiento de los compuestos de azufre presentes en el combustóleo mexicano, es posible, en base a los experimentos efectuados en esta investigación. Los resultados obtenidos respaldan otros trabajos (Eckart *et al.*, 1980-1986; Bosecker, 1984; Ehrlich, 1986; Tae Sung Kim *et al.*, 1990; Monticello, 1994; y otros).

Si bien es evidente que los principales microorganismos involucrados en los cultivos mixtos silvestres son bacterias del grupo de las sulfato-reductoras, se desconoce todavía que géneros de este grupo y otros estén involucrados en las muestras probadas de sedimento marino y lodo anaerobio; ya que generalmente, este tipo de microorganismos trabaja en comunidad formando consorcios microbianos.

Los cultivos que mostraron crecimiento en presencia de combustóleo, provocaron emulsificación y fraccionamiento en el hidrocarburo, así como producción de olor a sulfuro de hidrógeno y un precipitado negro de sulfuro de hierro. Los cultivos que mostraron estas características presentaron una mayor eficiencia en la remoción de azufre. Cabe mencionar que este tipo de microorganismos creció satisfactoriamente en un medio de cultivo para sulfato-reductoras libre de compuestos con azufre, por lo que, la única fuente de azufre fue la propia del combustóleo. Por lo anterior podemos suponer que estas bacterias reducen los compuestos de azufre orgánico, mediante la ruptura de los enlaces carbón-azufre. Esto mismo, se ha demostrado en otros estudios de biodesulfuración anaerobia aplicada a petróleo crudo (Kim *et al.*, 1990; Monticello *et al.*, 1985).

Las bacterias sulfato-reductoras que biodesulfuraron las muestras con combustóleo, mostraron una gran resistencia a las altas concentraciones de vanadio (311 ppm) y de otros metales pesados presentes en el combustóleo utilizado en la investigación.

Los cultivos procedentes de la zona de Estero Pargos en Campeche y de Puerto Escondido en Oaxaca, fueron los que mostraron mayor actividad y eficiencia en la remoción de azufre (alcanzándose eficiencias en la remoción de azufre hasta del 91 %); esto seguramente se debe a que en estas zonas existe una fuerte contaminación por hidrocarburos, causada por las plataformas petroleras existentes en esa área, lo que ha inducido, seguramente, a que microorganismos ahí existentes adquieran una mayor resistencia a los hidrocarburos y logren metabolizar los compuestos que necesitan para sobrevivir.

Los cultivos utilizados provenientes de lodos del digester industrial (cervecería), no arrojaron resultados tan satisfactorios en este estudio. Las remociones de azufre fueron en promedio del 87 por ciento, con mayor tiempo de residencia (hasta 7 semanas). Esto se puede deber a la carencia de un suficiente número de microorganismos específicos para metabolizar compuestos de azufre en hidrocarburos.

#### **Recomendaciones.**

Debido a que el combustóleo es un hidrocarburo formado principalmente por residuos del proceso de refinamiento del crudo, lo que incluye a una gran variedad de sustancias contaminantes, y ya que no recibe ningún tratamiento para mejorar su calidad, su viscosidad es muy elevada (2110 SSF a 37.8°C). Debido a esto, su manejo al momento de llevar a cabo las pruebas de biodegradación, es muy complejo, por lo que se recomienda someterlo a un tratamiento previo para facilitar su manipulación.

Es importante realizar una caracterización completa del hidrocarburo utilizado, determinando en él las clases de compuestos de azufre que contiene y la concentración de los mismos.

Asimismo, es recomendable el bioproceso anaerobio por las siguientes razones:

- a) El costo energético que implica la aireación, se elimina en el proceso anaerobio.
- b) La lenta velocidad de transformación al momento de reducir los compuestos de azufre, resulta una ventaja, ya que la calidad del hidrocarburo no se reduce debido a un ataque específico en los enlaces carbón-azufre (Kim *et al.*, 1990).
- c) Los productos finales del proceso anaerobio como el sulfuro de hidrógeno, pueden ser recuperados fácilmente con algún proceso químico ya existente. En cambio el proceso aerobio

produce productos polares solubles en agua, que aún no se sabe como tratarlos.

Los cultivos microbianos usados en la biodesulfuración del hidrocarburo, deben ser fuertes para que toleren la naturaleza agresiva del energético, especialmente por los metales pesados, las altas concentraciones de vanadio, temperaturas extremas y el pH.

Se puede inducir algún tipo de modificación genética para aumentar la eficiencia de los microorganismos, una de estas modificaciones podría ser la diferenciación de los hidrocarburos que tienen azufre y los que no contienen azufre, para que la capacidad calorífica no se vea disminuida; otra sería aumentar la capacidad degradativa para que degraden moléculas de azufre complejas presentes en residuos de petróleo, las cuales no se eliminan con la desulfuración química aplicada comúnmente.

Es mejor trabajar con cultivos mixtos provenientes de zonas impactadas por hidrocarburos; ya que, como que se ha visto su resistencia y efectividad en la biodesulfuración es superior al encontrado en cepas puras, debido seguramente al aclimatamiento previo que han tenido en su habitat, de manera natural.

Es conveniente seguir con estos estudios de biodesulfuración, aplicándolos a mayor escala, y trabajando solamente con aquellos cultivos que en esta investigación dieron resultados favorables (eficiencias en la biodesulfuración mayores al 90%).

Aunque en este trabajo no se llevó a cabo una evaluación económica del bioproceso, los análisis económicos realizados en Estados Unidos (Monticello, 1994), no son favorables para el proceso biológico en caso de que se aplique a un petróleo crudo convencional, debido a que la cinética de reacción en la biodesulfuración es más lenta que en la hidrodiesulfuración química aplicada. En la desulfuración microbiana se emplean tiempos prolongados para llevar a cabo las reacciones bioquímicas (5 días o más), en cambio en el proceso de hidrodiesulfuración solo se utilizan unas horas para lograr la eliminación de azufre en el crudo. Sin embargo, se ha visto que la biodesulfuración aplicada a las fracciones pesadas del petróleo (combustóleo, nafta, aceite pesado, etc.) es bastante factible, debido a la desproporción de costos que se presentan al aplicar una hidrodiesulfuración química, ya que ésta va asociada con los altos requerimientos de hidrógeno, elevadas temperaturas (270°C en naftas y 430°C para fracciones residuales), complejidad del proceso (presiones de 14 Mpa), y la reacción catalítica que provoca deposición de coque y metales pesados peligrosos en los subproductos obtenidos.

Se espera que esta primera investigación en biodesulfuración de combustóleo mexicano, sea el inicio y sirva de apoyo para lograr su aplicación a nivel industrial en México, y de esta forma contribuir a la disminución de la contaminación ambiental ocasionada por las emisiones de óxidos de azufre a la atmósfera.

# **BIBLIOGRAFÍA**



## **Referencias.**

Abd-El Malek, Y., and Rizk, S. G. (1963). "Bacterial sulphate reduction and the development of alkalinity", III. Experiments under natural conditions. *Journal of Appl. Bacteriology*, vol 26, pp. 20-26.

Acidification today (1982). Swedish Ministry of Agriculture, Environment 1982 committee.

Air Quality Criteria for Particulate Matter and Sulfur Oxides (1982). EPA-600/8-82-029, U.S. Environmental Protection Agency: Research triangle Park, NC.

Amphlett, M. J., and Callely, A. G. (1969). "The degradation of 2-thiophenecarboxylic acid by a *Flavobacterium* species", *Biochem. J.*, vol. 112:12p.

Anthropogenic Emissions Data for the 1985, NAPAP Inventory (1988). EPA-600/7-88-022, V. S. Environmental Protection Agency.

Anuario Estadístico de PEMEX (1994). Gerencia de evaluación e información. Dirección corp. de oper. y subdirección de oper. e inv. México, D.F.

Atlas, R. M. (1975). In *Microbiol. Rev.* Vol. 45; pp. 180-209.

Atlas, R. M., Boehm, P. D., and Calder, J. A. (1981). "Chemical and biological weathering of oil, from the Amoco Cadiz spillage". Within the littoral zone, estuarine coastal shelf sci. vol. 12, pp. 589-608.

Baas-Becking, L. G. M. (1925). *Ann. Bot.* vol. 39; pp. 613-650.

Babenzien, H. D., Genz, I., and Köhler, M. (1979). "Oxydativer Abbau von Dibenzylsulfid", *Z. Allg. Mikrobiol.* vol. 19, pp. 527-533.

Balik, C. M., Fornes, R. E., Gilbert, R. D., Williams, R. S. (1989). "The Micro-macro effects of acid deposition on painted wood substrates", draft report to U.S. EPA.

Bixby, D. W., Fike, H. L., Shelton, J. E., and Wiewiorowski, T. K. (1983). In "Encyclopedia of chemical technology" (R. E. Kirk and D. F. Othmer, eds.), vol. 22. New York.

Blount-Fronefield, D. D., Gottlund, K., Krawiec, S., and Montenecourt, B. S. (1986). "Correlation of dibenzothiophene disappearance and growth of *sulfolobus acidocaldarius*", in proc. 86th Ann. Meeting American Society for Microbiology, Abstract #Q-12.

Bohonos, N., Chou, T. W., and Spangord, R. J. (1977). "Some observations on biodegradation of pollutants in aquatic systems", *Jap. J. Antibiot.* vol. 30 (suppl.), pp. 275-285.

Campbell, L. L. & Postgate, J. R. (1965). "Classification of the spore-forming sulphate-reducing bacteria", *Bacteriological Reviews* 29, pp. 359-362.

Campbell, L. L. & Postgate, J. R. (1969). "Revision of the holotype strain of *Desulfotomaculum ruminis*", (Coleman). Campbell and Postgate. *Int. J. Syst. Bact.* vol. 19, pp. 139-140.

Comisión Federal de Electricidad, Informe Anual (1993). Dirección General de Información. México, D.F.

Beddow, J. K. (1981). Dryseparation techniques, *Chem. Eng.* 88:70-84.

Bosecker, K. (1984). In "Sulfur, its significance for chemistry, for the Geo-Bio- and cosmosphere and technology". (A. Müller and B. Krebs, eds.). *Studies in inorganic chemistry*, vol. 5, pp. 331-348. Elsevier Amsterdam.

Bos, P., Huber, T. F., Kos, C. H., Ras, C., and Kuenen, J. G. (1986). A dutch feasibility study on microbial coal desulfurization, in R. W. Lawrence, R. M. N. Brannion, and H.G. Ebner (eds.). *Fundam. and Appl. Biohydrometallurgy, Proc. 6th Intern. Symp. on Biohydro.*, pp. 129-150. Elsevier, Amsterdam.

Cripps, R. E. (1973). The microbial metabolism of thiophene-2-carboxylate; *Biochem. J.*, vol 134:353-366.

Criterios de Salud Ambiental 8, Oxidos de Azufre y Partículas en Suspensión (1982); publicaciones de la ONU, OMS y OPS; publicación científica No. 424, pp. 3-25.

Cyr, N., MacIntyre, D. D., Toth, G., and Strausz, O. P. (1987). "Hydrocarbon structural group analysis of Athabasca asphaltene and its g. p. c. fractions by  $C^{13}$  n.m.r.", *Fuel*, vol.66, pp. 1709-1714.

David Shields (1996). "Mejora la venta interna de petroquímicos y combustibles"; periódico "El Financiero"; Lunes 6 de Mayo de 1996; México. D.F.

Departamento del Distrito Federal (1990). "Programa integral contra la contaminación atmosférica, en la zona metropolitana de la ciudad de México", Octubre-1990, DDF-Méx.

Deroo, G., Tissot, B., McCrossan, R. G., and Der, F. (1974). In "Geochemistry of the heavy

oils of Alberta", in L. V. Hills (ed.), oil sands, fuel of the future, Can. Soc. Pet. Geol. Mem. vol. 3, pp. 148-167. Canada.

Detz, C. M., and Barvinchak, G. (1979). Microbial desulfurization of coal, Min. Congr. J. vol. 65, pp. 75-86.

Dillon, T. M., Neff, J. M., Warner, J. S. (1984). Bull. Environ. Contam. Toxicol. vol. 20, pp. 320-325.

Drushel, H. V., and Sommers, A. L. (1967). "Isolation and characterization of sulfur compounds in high-boiling petroleum fractions, Anal. Chem. vol. 39, pp. 1819-1829.

Dugan, P. R., and Apel, W. A. (1978). Microbial desulfurization of coal (L.E. Murr; A.E. Torma; J.A. Brierley eds.). Metallurgical Applications of bacterial leaching and related microbiological phenomena, Academic Press, pp. 223-250, New York.

Eckart, V., Hieke, W., Bauch, J., and Gentzsch, H. (1980). "Microbial desulfurization of petroleum and heavy petroleum fractions", 1. Studies on microbial aerobic desulfurization of Romashkino-crude oil, Zbl. Bakt. II; Abt. vol. 135, pp. 674-681.

Eckart, V., Hieke, W., Bauch, J., and Bohlmann, D. (1981). "Microbial desulfurization of petroleum and heavy petroleum fractions", 2. Studies on microbial aerobic desulfurization of heavy petroleum fractions, Zbl. Bakt. II, Abt. vol. 136, pp. 152-160.

Eckart, V., Hieke, W., Bauch, J., and Gentzsch, H. (1982). "Microbial desulfurization of petroleum and heavy petroleum fractions", 3. The change of chemical composition of fuel-D-oil by microbial aerobic desulfurization, Zbl. Microbiol. vol. 137, pp. 270-279.

Eckart, V., Köhler, M., and Hieke, W. (1986). "Microbial desulfurization of petroleum and heavy petroleum fractions", 5. Anaerobic desulfurization of Romashkino petroleum, Zbl. Mikrobiol. vol. 141, pp. 291-300.

Ehrlich, H. L. (1986). Biotechnol. Bioeng. Symp. #16, pp. 227-237.

Fedorak, P. M., and Westlake, D. W. S. (1983). "Microbial degradation of organic sulfur compounds in Prudhoe Bay crude oil", Can. J. Microbiol. vol. 29, pp. 291-296.

Fedorak, P. M., Payzant, J. D., Montgomery, D. S., and Westlake, D. W. S. (1988). "Microbial degradation of n-alkyltetrahydrothiophenes found in petroleum, Appl. Environ. Microbiol. vol. 54, pp. 1243-1248.

Pfenning, N., Widdel, F., and Trüper, H. G. (1981). In "The Prokaryotes", (M. P. Starr, H. Stolp, H. G., Trüper, A. Balows, and H. G. Schlegel, eds.), vol.1, pp. 926-940. Springer, Berlin.

Finnerty, W. R., Shockley, K., and Attaway, H. (1983). "Microbial desulfurization and denitrification of hydrocarbons", in J. E. Zajic, D. C. Cooper., T. R. Jack, and N. Kosaric (eds.), Microbial Enhanced Oil Recovery, pp. 83-91. PennWell, Tulsa, Okla.

Finnerty, W. R., and Hartdegen, F. J. (1984). "Microbial desulfurization of fossil fuels", in the World Biotech Report 1984, vol. 1, pp. 611-622, Europe, Online Publications, U. K.

Finnerty, W. R., and Robinson, M. (1986). "Microbial desulfurization of fossil fuels", A review, Biotechnol. Bioeng. Symp. vol. 16, pp. 205-221.

Fischer, H. (1982). In "Ullmanns encyklopädie der technischen chemie" (E. Bartholomé, E. Biekert, H. Hellmann, H. Ley, M. Weigert, and E. Weise, eds.), 4 th ed., vol. 21, pp. 1-32, Verlag Chemie, Weinheim.

Fischer, U. (1986). Habilitationsschrift, Universität Oldenburg, FRG.

Foght, J. M. (1985). "Plasmids and the biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons", Ph. D. Thesis, University of Alberta, Canada.

Foght, J. M., and Westlake, D. W. S. (1985). "Degradation of some polycyclic aromatic hydrocarbons by a plasmid-containing *Flavobacterium* species", in Proc. 85 th Ann. Meeting American Society for Microbiology, Abstract No. Q-20.

Foght, J. M., and Westlake, D. W. S. (1988). "Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons and aromatic heterocycles by a *Pseudomonas* species", Can. J. Microbiol, vol. 34, pp. 1135-1141.

Godsy, E. M., and Grbic-Galic, D. (1988). "Anaerobic degradation pathways for benzothiophene in aquifer-derived methanogenic microcosms", in proc. 88th Ann. Meeting American Society for Microbiology, Abstract #Q111.

Gouch, G. R. (1987). Biotechnology and coal, IEA Coal Research, London.

Greenwood, N. N., and Earnshaw, A. (1986). "Chemistry of the elements", Pergamon Press, pp. 757-881; Oxford.

Gundlach, E. R., Boehm, P. D., Marchand, M., Atlas, R. M., Ward, D. M., and Wolfe, D. A. (1983). In "The fate of Amoco Cadiz oil", *Science* vol. 221, pp. 122-129.

Hageage, G. J., Eanes, E. D., and Gherna, R. L. (1970), *Journal of Bacteriology* No. 101, pp. 464-469.

Hardy, J. A. (1981). "The enumeration, isolation and characterisation of sulphate-reducing bacteria from North Sea waters", *Journal of Applied Bacteriology*, vol 51, pp. 505-516.

Harrison, A. P. (1984). The acidophilic thiobacilli and other acidophilic bacteria that share their habitat, *Ann. Rev. Microbiol.* 38: 265-292.

Hartdegen, F. J., Coburn, J. M., and Roberts, R. L. (1984). "Microbial desulfurization of petroleum", *Chem. Eng. prog.* vol. 80, pp. 63-67.

Hastings, K. H., Van Driesen, R. P. (1988). "Hidrodesulfuración de fracciones de aceite crudo de petróleo y productos de petróleo", *Tecnología del Petróleo*. D. M. Considine (edit.), publicaciones Marcombo. México.

Haynie, F. H. (1980). In "Durability of building materials and components", ASTM STP-691, Amer. Soc. for Testing Materials, Philadelphia, pp. 157-175.

Hochgesand, G. (1975). In "Ullmanns Encyklopädie der technischen chemie" (E. Bartholomé, E. Biekert, H. Hellmann, H. Ley, and M. Weigert, eds.), 4th ed., vol. 10, pp. 581-598. Verlag Chemie, Weinheim.

Hoffmann, M. R., Faust, B. C., Panda, F. A., Koo, H. H., and Tsuchiya, H. M. (1981). Kinetics of the removal of iron pyrite from coal by microbial catalysis. *Appl. Environ. Microbiol.* vol. 42, pp. 259-271.

Ho, T. Y., Rogers, M. A., Drushel, H. V., and Koons, C. B. (1974). "Evolution of sulfur compounds in crude oils", *Am. Assoc. Pet. Geol. Bull.* vol. 58, pp. 2338-2348.

Hou, C. T., and Laskin, A. L. (1976). "Microbial conversion of dibenzothiophene", *Dev. Ind. Microbiol.*, vol 17, pp. 351-362.

Hyne, J. B. (1982). In "Sulfur: New sources and uses", (M. E. D. Raymont, ed.); American Chemical Society, pp. 37-56. Washington, D. C.

Isbister, J. D., and Doyle, R. C. (1985). "A novel mutant microorganism and its use in

removing organic sulfur compounds", Eur. Pat. Appl. EP 218, 734.

Isbister, J. D., Wyza, R., Lippold, J., Desouza, A., and Anspach, G. (1988). "Bioprocessing of coal", in G. S. Omenn (ed.), *Environmental Biotechnology: Reducing Risks from Environmental Chemical through Biotechnology*, Plenum Press, pp. 281-293.

Jilek, R. and Beranova, E. (1982). Some experiments with bacterial leaching of brown coal, in proc. Intern. conf. on Use of Microorganisms in Hydrometallurgy, Hung. Acad. Sci. Local Comm., Pecs., pp. 167-174.

Kargi, F. (1982). Enhancement of microbial removal of pyritic sulphur from coal using concentrated cell suspension of *Thiobacillus ferrooxidans* and an external carbon dioxide supply, *Biotechnol. Bioeng.* 24, pp. 749-752.

Kargi, F., and Robinson, J. M. (1984). "Microbial oxidation of dibenzothiophene by the thermophilic organism *sulfolobus acidocaldarius*", *Biotechnol. Bioeng.* vol. 26, pp. 687-690.

Kargi, F. (1986). Microbial methods for desulfurization of coal. *Trends Biotechnol.* vol. 4, pp. 293-297.

Kargi, F., and Robinson, J. M. (1986). "Removal of organic sulfur from bituminous coal", *Fuel*, vol. 65, pp. 397-399.

Kawakami, K., Fujio, K., Kusunoki, K., Kusakabe, K., and Morooka, S. (1988). Kinetic study of coal slurry electrolysis. Oxidation and desulfurization of Illinois no. 6 coal by aqueous ferric chloride, *Fuel Process. Technol.* vol 19, pp. 15-29.

Kawatra, S. K., Eisele, T. C., and Bagley, S. (1987). Coal desulfurization by bacteria, *Miner. Metall. Process.* vol.4, pp. 189-192.

Kimata, M., Kadota, H., Hata, Y. & Tajima, T. (1955). "Studies on the marine sulphate-reducing bacteria". II. influence of various environmental factors on sulphate-reducing activity of marine sulphate-reducing bacteria. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, vol. 21, pp. 109-112.

Kim, H. Y., Kim T. S., and Kim B. H. (1990). In "Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of Dibenzothiophene to Biphenyl and Hydrogen Sulfide by *Desulfovibrio desulfuricans* M6". *Genetic Engineering Centre, KIST. Biotechnology Letters*, vol. 12, No. 10, pp. 761-764.

Kim, T. S., Kim H. Y., and Kim B. H. (1990). In "Petroleum desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 using electrochemically supplied reducing equivalent". Genetic Engineering Centre, KIST. Biotechnology Letters, vol. 12, No 10, pp. 757-760; Cheongryang, Seoul, Korea.

Klein, J., Beyer, M., Van Afferden, M., Hodek, W., Pfeifer, F., Seewald, H., Wolff-Fischer, E., and Juntgen, H. (1988). Coal in biotechnology, in H. J. Rehm and G. Reed (eds.), Biotechnology, vol. 6b, pp. 497-567. VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim.

Kodama, K., Umehara, K., Shimizu, K., Nakatani, S., Minoda, Y., and Yamada, K. (1973). "Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway", Agric. Biol. Chem. vol. 37, pp. 45-50.

Kodama, K. (1977). "Co-metabolism of dibenzothiophene by *Pseudomonas Jianii*", Agric. Biol. Chem. vol. 41, pp. 1305-1306.

Köhler, M., Genz, I. L., Schicht, B., and Eckart, V. (1984). "Microbial desulfurization of petroleum and heavy petroleum fractions", 4. Anaerobic degradation of organic sulfur compounds of petroleum, Zbl. Mikrobiol. vol. 139, pp. 239-247.

Kos, C. H., Poorter, R.P.E., Bos, P., and Kuenen, J.C. (1981). Geochemistry of sulfides in coal and microbial leaching experiments, in Proc. Intern. Conf. on Coal Science, Düsseldorf, pp. 842-847.

Kurita, S., Endo, T., Nakamura, H., Yagi, T., and Tamiya, N. (1971). "Decomposition of some organic sulfur compounds in petroleum by anaerobic bacteria". J. Gen. Appl. Microbiol., vol. 17, pp. 185-198.

Laborde, A. L., and Gibson, D. T. (1977). "Metabolism of dibenzothiophene by a *Beijerinckia* species", Appl. Environ. Microbiol. vol. 34, pp. 783-790.

Later, D. W., Lee, M. L., Bartle, K. D., Kong, R. C., and Vassilaros, D. L. (1981). "Chemical class separation and characterization of organic compounds in synthetic fuels", Anal. Chem. vol. 53, pp. 1612-1620.

Levy, P. (1989). "Where does it hurt, answer to questions about smog and health, south coast", Air Quality Management District". California.

Lipfer, F. W. (1989a). J. APCA, vol. 39, pp. 446-452.

Lipfer, F. W. (1989b). In "Handbook of environmental chemistry", Hutzinger O. (ed.),

Springer-verlag: Heidelberg, vol. 4, part B.

Lipfer, F. W. (1989c). "Atmospheric Environment", vol. 23, pp. 415-429.

Lipfer, F. W., Morris, S. C., Wyzga, R. E. (1989). Environment Science Technology, in press.

Lizama, M. H., Wilkins A. L., and Scott, C. T. (1995). In "Dibenzothiophene sulfur can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria", Oak Ridge National Laboratory. Biotechnology Letters, vol. No.1, pp. 113-116. tennessee, USA.

Macpherson, R. and Miller, J. D. A. (1963). "Nutritional studies on *Desulfovibrio desulfuricans*", Journals of General Microbiology, vol. 31, pp. 365-373.

Maka, A., Mckinley, V. L., Conrad, J. R., and Fannin, K. F. (1987). "Degradation of benzothiophene and dibenzothiophene under anaerobic conditions by mixed cultures", in proc. 87th Ann. Meeting American Society for Microbiology, Abstract No. 0-54.

Malik, K. A., and Claus, D. (1976). "Microbial degradation of dibenzothiophene", in Fifth Intern. Fermentation Symp., Abstract #23.03; Berlin.

Martínez, P. P. (1996). Comunicación personal, profesor titular de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Ingeniería; UNAM.

McCready, R. G. L., and Zentilli, M. (1985). Beneficiation of coal by bacterial leaching, Can. Metall. Q.24, pp. 135-139.

Medina. O. J. (1995). Apuntes de la materia de Química Orgánica. Comunicación personal; profesor titular de la Facultad de Química; UNAM.

Meyer, B. (1968). In "Inorganic sulphur chemistry" (G. Nickless, ed.), pp. 241-258. Elsevier, Amsterdam.

Monticello, D. J., Bakker, D., and Finnerty, W. R. (1985). "Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas species*", Appl. Environ. Microbiol. vol. 49, pp. 756-760.

Monticello, D. J., and Finnerty, W. R. (1985). "Microbial desulfurization of fossil fuels", Ann. Rev. Microbiol. vol. 39, pp. 371-389.

Monticello, D. J. (1994). In "Biocatalytic desulfurization: The biorefining of petroleum fractions", Energy Biosystems corp., Hydrocarbon Processing, pp. 39-45, Woodlands, Texas.



Morrison, G.F. (1981). Chemical desulphurization of coal. IEA coal Research, London 1981.

Muyzer, G., de Bruyn, A. C., Schmedding, D. J. M., Bos, P., Westbroek, P., and Kuenen, J. G., "A combined immunofluorescence-DNA-staining technique for enumeration of *Thiobacillus ferrooxidans* in a population of acidophilic bacteria", Appl. Environ. Microbiol. 53:660-664 (1987).

Norris, P. R., and Kelly, D. P., "The use of mixed microbial cultures in metal recovery", in A. T. Bull and J. H. Slater (eds.), Microbial Interactions and Communities, Vol. 1, Academic Press, London, 1982. pp. 443-474.

Ochman, M., and Klubek, B. (1986). "Isolation of thiophene utilizing bacteria from soil and stripmine spoil", in proc. 86th Ann. Meeting American Society for Microbiology, Abstract #Q-11.

Olson, G. J., and Brinckman, F. E., "Bioprocessing of fuel", 65:1638-1646 (1986).

Palowitch, E. R., and Deurbrouck, A. W., "Wet concentration of coarse coal. 1. Dense medium separation", in J. W. Leonard (ed.), "Coal preparation", 4th ed., The American Institute of Mining, Metallurgical and Petroleum Engineers, New York, 1979, pp. 9.1-9.36.

Patton, J. S., Rigler, M. W., Boehm, P. D., and Fiest, D. L. (1981). "Ixtoc 1 oil spill: Flaking of the surface mousse in the Gulf of Mexico". Nature vol. 290, pp. 235-238.

Pfennig, N., and Widdel, F. (1981). In "Biology of inorganic Nitrogen and Sulfur" (H. Bothe and A. Trebst, eds.), pp. 169-177. Springer, Berlin.

Pocas, M. F., "Kinetics of microbially catalyzed removal of sulphur from coals", Actas Simp. Iberoam. Catal. 9:1489-1490 (1984).

Postgate, J. R. (1951). "On the nutrition of *Desulfovibrio desulfuricans*", Journal of General Microbiology, vol 5, pp. 714-724.

Postgate, J. R. (1963). "A strain of *Desulfovibrio* able to use oxamate", Arch. Mikrobiol. vol. 46, pp. 287-295.

Postgate, J. R. and Campbell, L. L. (1966). "Classification of *Desulfovibrio* species, the nonsporulating sulphate-reducing bacteria", Bacteriological Reviews 30, pp. 732-738.

Postgate, J. R. (1984). "The sulphate-reducing bacteria". Cambridge University press,

Cambridge.

Quadri, de la T. G., y Sánchez C. L. R. (1992). "La ciudad de México y la contaminación atmosférica". Limusa Noriega Editores, Cap. 1,2,3 y 6; México, D.F.

Rall, H. T., Thompson, C. J., Coleman, H. J., and Hopkins, R. L. (1972). "Sulfur compounds in crude oil", U. S. Department of the Interior, Bureau of Mines, Bulletin 659.

Ruhl, W., Tar. (1982). In Extra heavy oil, sands and oil shales; Geology of petroleum, vol. 6, Ferdinand Enke, Stuttgart, FRG.

Sagardia, F., Rigau, J. J., Martínez-Lahoz, A., Fuentes, F., López, C., and Flores, W. (1975). Degradation of benzothiopene and related compounds by a soil *Pseudomonas* in an oil-aqueous environment; Appl. Microbiol. vol. 29, pp. 722-725.

Satake, K. (1977). "Microbial sulphate reduction in a volcanic acid lake having pH 1.8 to 2.0", Japanese Journal of Limnology, vol. 38, pp. 33-35.

Schilling, H.-D., and Wiegand, D., "Coal resources", in D. J. McLaren and B. J. Skinner (eds.), Resources and World Development, Wiley, New York, 1987, pp. 129-156.

Schmidt, M. (1973). Chem. Unserer Zeit vol 7, pp. 11-17.

Schmidt, M., and Siebert, W. (1973). In "Comprehensive inorganic chemistry", (J. C. Bailar, H. J. Emeleus, R. Nyholm, and A. F. Trotman-Dickenson, eds.), vol. 2, pp. 795-934. Pergamon Press, Oxford, USA.

Schwartz, S. E. (1989). "Science". vol 243, pp. 753-763.

Silverman, M. P., Rogoff, M. H., and Wender, I. (1963). In "Removal of pyritic sulphur from coal by bacterial action", Fuel vol. 42, pp. 113-124.

Speight, J. G. (1980). In "The chemistry and technology of petroleum", Dekker ed., New York, USA.

Speight, J. G. (1981). "The desulfurization of heavy oils and residua", Dekker, New York.

Stetter, K. O., and Gaag, G. (1985). Nature vol. 305, pp. 309-311.

Studel, R. (1984). In "Sulfur, its significance for chemistry, for the Geo-Bio- and cosmosphere

and technology", (A. Muller and B. Krebs, eds.). Studies in inorganic chemistry, vol. 5, pp. 3-37. Elsevier, Amsterdam.

Studel, R., Holdt, G., Gobel, T., and Hazen, W. (1987). *Angew. Chem.* vol. 99, pp. 143-146.

Tissot, B. P., and Welte, D. H. (1984). "Petroleum formation and occurrence", 2nd. ed., Springer verlag, New York.

Tovar P. y José M. Rosado (1993). "Estudio de externalidades de una planta termoeléctrica", Cap.11, Facultad de Ingeniería, UNAM; Tesis profesional. Méx.

Trüper, H. G., and Hathaway, J. C. (1967). *Nature* vol. 215, pp. 435-436.

Trüper, H. G., Kelleher, J. J. and Jannasch, H. W. (1969). "Isolation and characterisation of sulphate-reducing bacteria from various marine environments". *Archives fur Mikrobiologies*, vol. 65, pp. 208-217

Trüper, H. G. (1984). In "Sulfur, its significance for chemistry, for the Geo-Bio- and cosmosphere and technology", (A. Muller and B. Krebs, eds.). Studies in inorganic chemistry, vol. 5, pp. 351-365. Elsevier, Amsterdam.

Walker, J. D., Colwell, R. R., and Petrakis, L. (1975). In "Microbial petroleum degradation: application of computerized mass spectrometry", *Can. J. Microbiol.* vol. 21, pp. 1760-1767.

Walker, J. D., Colwell, R. R., and Petrakis, L. (1976). In "Biodegradation of petroleum by Chesapeake Bay sediment bacteria", *Can. J. Microbiol.* vol. 22, pp. 423-428.

Waller, R. E. (1963). Acid droplets in town air. *Int. J., Air Water Pollut., Vol. 7.*, pp. 773-778.

Westlake, D. W. S. (1983). "Microbial activities and changes in the chemical and physical properties of oil", in E. C. Donaldson and J. B. Clark (eds.), *Proc. 1982 intern. conf. on Microbial Enhancement of oil recovery*, Shangrila, Afton. Energy Technology Center, pp. 102-111. Bartlesville, Oklahoma.

Widdel, F. (1980). "Anaerobierabbau von fettsäuren und benzoessäure durch neu isoliertearten sulfat-reduzierender bakterien". Doctoral dissertation: Gottingen.

Willey, C. Iwao, M., Castle, R. N., and Lee, M. L. (1981). "Determination of sulfur heterocycles in coal liquids and shale oils", *Anal. Chem.* vol 53, pp. 400-407.

Yamada, K., Minoda, Y., Kodana, K., Nakatani, S., and Akasaki, T. (1968). "Microbial conversion of petro-sulfur compounds", I. Isolation and identification of dibenzothiophene utilizing bacteria", *Agric. Biol. Chem.* vol. 32, pp. 840-845.

Zillig et al. (1986). Citado por Ulrich Fischer (1989).

Zarubina, N. N., Lyalikova, N. N., and Shmuk, E. I. (1959). "Investigation of microbiological oxidation of coal pyrite", *Invest. Akad. Nauk. SSR. Otdel. Tekh. Nauk. Me. Toplivo.* 1, pp. 117-119.

Zimmerman, R. E., "Wet concentration of fine coal. Part 3: Froth flotation", in J. W. Leonard (eds.), *Coal Preparation*, 4th ed., The American Institute of Mining, Metallurgical and Petroleum Engineers, New York, 1979, pp. 10.75-10.104.

### **Otras publicaciones consultadas.**

A. Biachi; V. Jacq; M. Bensoussan (1975). "Distribution des populations bactériennes hétérotrophes dans les sédiments et dans les eaux proches du fond en mer de Norvège". *Revue de L'Institut Français du Pétrole*, 1975, XXX-I, No. 2, p. 204-211,

Albert Parker (1983). "Contaminación del aire por la industria". Editorial revertè, S. A. Primera edición 1983, Barcelona; Caps. 1, 2 (parte 2), 4, 9 y 10; Barcelona España.

APHA; AWWA; WPCF (1985). "Standard Methods for the examination of water and wastewater". Publication Office of American Public Health Association, 16th 1985; Washington, USA.

Campbell, R. (1987). *Ecología Microbiana*. Departamento de Botánica, Universidad de Bristol, (Limusa ed.), pp. 25-43, 93-101.

Comisión Nacional de Derechos Humanos (1995). "La Contaminación atmosférica en México; sus causas y efectos en la salud". Coord. I. Restrepo; cap.-III, México, D.F.

Davis, J. B. (1967). "Petroleum Microbiology", Research Associate, Field Research Lab., Dallas, Texas USA., Elsevier Publishing Company, Amsterdam, London New York.

ONU, OMS y OPS (1982). "Criterios de salud ambiental 8, óxidos de azufre y partículas en suspensión". Publicación científica No. 424. Méx., D.F.

Pardavell J. Ma. A. (1993). "Estudio de la degradación térmica de asfaltenos de petróleo". Tesis de Licenciatura; Facultad de Química, UNAM; Méx., D.F.

Postgate, J. R. (1984). "The sulphate-reducing bacteria". Printed in Great Britain by the University Press, Cambridge.

Quadri, de la T. G. y Sánchez C. L. R. (1992). "La ciudad de México y la contaminación atmosférica". Limusa Noriega Editores, Primera edición 1992, Cap. 1,2,3 y 6; México, D.F.

Ross E. McKinney (1962). Microbiology for Sanitary Engineers. Department of Civil Engineering, University of Kansas (McGraw-Hill, ed.). pp. 97-111.

Spedding D. J. (1981). "Contaminación Atmosférica"; Editorial revertè, S. A. Primera edición 1981, Barcelona; Caps. 2, 5 y 8. Barcelona, España.

Ulrich Fischer (1989). "Sulfur in Biotechnology", Chapter 15, pp. 463-469. Universität Oldenburg, Federal Republic of Germany.

Zajic James E. (1969). "Microbial Biogeochemistry". Faculty of Engineering Science, The University of western Ontario, Academic Press, London, Canada.

# **APÉNDICE A**

**FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO  
Y SOLUCIONES UTILIZADAS EN LA INVESTIGACIÓN**

**MEDIO No. 1: Medio API RP38 (1965) del American Petroleum Institute, para bacterias sulfato-reductoras. Tomado de "Isolation and Growth of Sulphate-Reducing Bacteria" of B. N. Herbert and P.D. Gilbert (1984).**

Para preparar 1 litro de medio.

Fosfato de potasio $K_2HPO_4$ . . . . .	0.01 g
Sulfato de magnesio heptahidratado $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ . . . . .	0.20 g
Sal de mohr $FeSO_4 \cdot (NH_4)_2SO_4 \cdot 6H_2O$ . . . . .	0.10 g
Cloruro de sodio NaCl . . . . .	10.00 g
Acetato de sodio $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ . . . . .	4.00 g
Extracto de levadura . . . . .	1.00 g
ácido ascórbico $C_6H_8O_6$ . . . . .	0.10 g
agua destilada . . . . .	1.00 l

Pesar todos los compuestos en una balanza analítica e incorporarlos poco a poco en el orden listado en un litro de agua destilada, utilizando un agitador magnético; después de que se hayan incorporado bien todos los compuestos, esterilizar a 15 lbs durante 15 minutos a una temperatura de 121°C.

**SOLUCIÓN No. 2: Solución vitamínica de Stock. Tomado de "Isolation and Growth of Sulphate-Reducing Bacteria" of B. N. Herbert and P.D. Gilbert (1984).**

Para preparar 100 ml de solución de Stock.

Biotín . . . . .	1.0 mg
Ácido p-aminobenzóico . . . . .	5.0 mg
Vitamina B12 . . . . .	5.0 mg
Tiamina . . . . .	10.0 mg
Agua destilada . . . . .	100 ml

La solución vitamínica de Stock es preparada en 100 ml de agua destilada. Los compuestos se pesan cuidadosamente en una balanza analítica y son incorporados mediante agitación en los 100 ml de agua destilada. Posteriormente, la solución vitamínica es esterilizada por filtración (utilizar un acrodisco de 0.2  $\mu m$ ) al momento de emplearla para evitar la degradación de las vitaminas.

**SOLUCIÓN No. 3: Medio mineral para diluciones. Tomado del Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 16th edition (1985).**

Para prepara 1 litro de medio mineral.

Agua de mar artificial . . . . .	150 ml
Agua destilada . . . . .	850 ml

En un vaso de precipitado de 1 litro se incorporan el agua de mar artificial y el agua destilada; despues de agitar, se colocan 9 ml del medio mineral en tubos de ensaye medianos con tapón de rosca, y se esterilizan a 15 lbs por 15 minutos con una temperatura de 121°C.

**MEDIO No. 4: Medio de Postgate (1966) modificado por Jacq para sulfato-reductoras. Tomado de A. Bianchi, V. Jacq y M. Bensoussan (1975).**

Para preparar 1 litro de medio No. 4.

Fosfato de potasio $K_2HPO_4$ . . . . .	0.5 g
Cloruro de amonio $NH_4Cl$ . . . . .	1.0 g
Sulfato de sodio $Na_2SO_4$ . . . . .	1.0 g
Cloruro de calcio hexahidratado $CaCl_2 \cdot 6H_2O$ . . . . .	1.0 g
Cloruro de magnesio hexahidratado $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ . . . . .	2.0 g
Lactato de sodio $CH_3CH(OH)CO_2Na$ . . . . .	3.5 g
Extracto de levadura . . . . .	1.0 g
Agar microbiológico . . . . .	15 g
Agua de mar añejada . . . . .	600 ml
Agua destilada . . . . .	400 ml

Pesar todos los reactivos en una balanza analítica e incorporarlos a un vaso de precipitado de 1 litro con el agua de mar y el agua destilada. Después de diluir perfectamente el medio, se reparte un volumen de 4 ml en tubos de Vanielli de 300X8 mm. Los tubos de Vanielli se esterilizan a 115°C durante 30 minutos o bién a 15 lbs/15 min manteniendo la temperatura a 121°C. Cinco minutos antes de usarlos se colocan a baño María, y al momento de emplearlos se agregan 0.5 ml de la solución No.5 esterilizada por filtración más 1 ml de parafina líquida para uso microbiológico.



**SOLUCIÓN No. 5: Solución reductora para gérmenes sulforreductores. Tomado de A. Bianchi, V. Jacq y M. Bensoussan (1975).**

Para preparar 50 ml de solución reductora.

Clorhidrato de cisteína . . . . .	0.400 g
Sal de Mohr . . . . .	0.125 g
Agua destilada . . . . .	50 ml

El clorhidrato de cisteína se disuelve en 40 ml de agua destilada y se neutraliza a pH de 7 con hidróxido de sodio (NaOH); antes de agregar la sal de Mohr disuelta en 10 ml de agua destilada, un color violeta debe aparecer al agitar la solución. Esta solución es esterilizada por filtración al momento de colocarla en los tubos de Vanielli.

**MEDIO MODIFICADO No. 6: Medio para bacterias sulfato-reductoras modificación al medio API RP38 (1965).**

Para preparar 1 litro de medio modificado.

Fosfato de potasio $K_2HPO_4$ . . . . .	0.01 g
Cloruro de magnesio hexahidratado $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ . . . . .	0.20 g
Cloruro férrico hexahidratado $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ . . . . .	0.10 g
Cloruro de sodio NaCl . . . . .	10.00 g
Acetato de sodio $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ . . . . .	4.00 g
Extracto de levadura . . . . .	1.00 g
Ácido ascórbico $C_6H_8O_6$ . . . . .	0.10 g
Agua destilada . . . . .	1.00 l

Después de pesar todos los compuestos en una balanza analítica, se incorporan poco a poco en el orden listado a un litro de agua destilada usando un agitador magnético. Después de obtener un medio homogéneo se esteriliza a 15 lbs/15 min con una temperatura de 121°C.

**MEDIO MODIFICADO No. 7: Medio para bacterias sulfato-reductoras con indicador Redox ("metil viologen"). Modificación al medio API RP38 (1965).**

Para preparar 1 litro de medio modificado No.7.

Fosfato de potasio $K_2HPO_4$ . . . . .	0.01 g
Cloruro de magnesio hexahidratado $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ . . . . .	0.20 g
Citrato férrico $FeC_6H_5O_7$ . . . . .	0.10 g
cloruro de sodio NaCl . . . . .	10.00 g
Acetato de sodio $CH_3COONa \cdot 3H_2O$ . . . . .	4.00 g
Metil viologen $C_{12}H_{14}N_2Cl_2$ . . . . .	0.33 g
Extracto de levadura . . . . .	1.00 g
Ácido ascórbico $C_6H_8O_6$ . . . . .	0.10 g
Agua destilada . . . . .	1.00 l

Se pesan en balanza analítica todos los compuestos y se incorporan en el orden listado a un litro de agua destilada, utilizando un agitador magnético. Una vez homogenizado el medio se esteriliza a 15 lbs/15 min manteniendo la temperatura a 121°C.

# **APÉNDICE B**

**RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE AZUFRE REMANENTE POR  
EL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES ELÉCTRICAS**

**DIVISION FUENTES DE ENERGIA.  
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS DE COMBUSTION.  
LABORATORIO DE ANALISIS DE COMBUSTIBLES.**

**RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ANALISIS DE VEINTISEIS  
MUESTRAS DE COMBUSTOLEO MEZCLADO CON GASOLINA  
PROCEDENTES DE LA  
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**SOLICITADO POR EL DR. JORGE ROMERO JARERO**

Original: Solicitante  
Copia 1 : Archivo del L.A.C.  
Copia 2 : Asistente administrativo del L.A.C.  
Copia 3 : Responsable del L.A.C.

**ESTE INFORME CONSTA DE 5 HOJAS.**

APARTADO POSTAL 5-849  
COLONIA ANZURES  
DELEGACION CUAUHTEMOC  
11590. MEXICO. D.F.

APARTADO POSTAL 11  
CENTRO  
CUERNAVACA, MOR  
62000. MEXICO



INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
ELÉCTRICAS

AL: DR. JORGE ROMERO JARERO. U.N.A.M.	DEL: DR. RIGOBERTO LONGORIA RAMIREZ DEPTO: SISTEMAS DE COMBUSTION.	REF: SC/110/RLR
		FECHA: AGO/8/96

ASUNTO: ENTREGA DE RESULTADOS.

Por medio de la presente, envío a su atención los resultados obtenidos en los análisis de veintiseis muestras de combustóleo mezclado con gasolina en diferentes proporciones y un blanco de gasolina Nova.

Le informo también que el costo de estos análisis es de \$3,105.00 (Tres mil ciento cinco pesos 00/100 m.n.) más 15% de I.V.A.

Sin otro particular quedo de usted.

A T E N T A M E N T E .

DR. RIGOBERTO LONGORIA RAMIREZ.

RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE ANALISIS DE COMBUSTIBLES

HOJA No. 2/5



INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
ELÉCTRICAS

AL: DR. JORGE ROMERO JARERO. U.N.A.M.	DEL: DR. RIGOBERTO LONGORIA RAMIREZ DEPTO: SISTEMAS DE COMBUSTION.	REF: SC/110/RLR FECHA: AGO/8/96
--	---	---------------------------------------

ASUNTO: ENTREGA DE RESULTADOS.

Por medio de la presente, envío a su atención los resultados obtenidos en los análisis de veintiseis muestras de combustóleo mezclado con gasolina en diferentes proporciones y un blanco de gasolina Nova.

Le informo también que el costo de estos análisis es de \$3,105.00 (Tres mil ciento cinco pesos 00/100 m.n.) más 15% de I.V.A.

Sin otro particular quedo de usted.

A T E N T A M E N T E .

DR. RIGOBERTO LONGORIA RAMIREZ.

RESPONSABLE DEL LABORATORIO DE ANALISIS DE COMBUSTIBLES

HOJA No. 2/5



DIVISION: FUENTES DE ENERGIA  
DEPTO: SISTEMAS DE COMBUSTION  
LABORATORIO DE ANALISIS DE COMBUSTIBLES

No. de Solicitud:  
1 6

TITULO: RESULTADOS DE ANALISIS DE VEINTISIETE MUESTRAS  
PROCEDENTES DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO.

DETERMINACION: CONTENIDO DE AZUFRE % EN PESO.

No. DE MUESTRA	PESO EN mg	RESULTADO
1	106	.202
"	112	.194
2	115	.194
"	112	.163
3	110	.230
"	109	.250
4	104	.198
"	110	.193
5	112	.210
"	113	.243
6	114	.181
"	117	.229
7	115	.192
"	115	.191
8	107	.147
"	108	.165
9	104	.198
"	105	.177
10	111	.195
"	118	.178
11	107	.133
"	120	.147
12	112	.174
"	111	.189



INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
ELECTRICAS


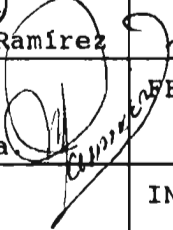

DETERMINACION: CONTENIDO DE AZUFRE % EN PESO. (continuación)

No. DE MUESTRA	PESO EN mg	RESULTADO
13	120	.206
"	111	.199
14	111	.216
"	104	.208
15	116	.155
"	125	.165
16	103	.143
"	108	.141
17	107	.154
"	106	.148
18	111	.209
"	110	.234
19	111	.193
"	111	.227
20	107	.149
"	108	.133
21	109	.212
"	103	.206
22	111	.167
"	111	.172
23	112	.172
"	105	.155
24	109	.180
"	141	.173
25	118	.145
"	108	.141
26	105	1.03
"	111	1.06
BLANCO DE GASOLINA		.052





**INSTITUTO DE  
INVESTIGACIONES  
ELECTRICAS**

RESPONSABLE:  Dr. Rigoberto Longoria Ramirez	No. DE INFORME: (muestras 23-49)
SIGNATARIO: Francisco Ramirez Guerra 	FECHA: Agosto 8 de 1996.
	INFORME ELABORADO POR: Victor Sosa. 

**ESTE INFORME SOLO PODRA SER REPRODUCIDO TOTALMENTE CON LA  
AUTORIZACION PREVIA DEL LABORATORIO.  
HOJA 5/5**

IIE/15/5506/SER

16/96

APARTADO POSTAL 5-849  
COLONIA ANZURES  
DELEGACION CUAUHEMOC  
11590, MEXICO, D F

APARTADO POSTAL 475  
CENTRO  
CUERNAVACA, MOR  
62000, MEXICO