



FACULTAD DE FARMACIA
LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA

**“OPTIMIZACIÓN OPERACIONAL DE UN BIOREACTOR PARA LA
BIODESULFURACION DE GASOIL Y DBT UTILIZANDO *Pseudomona stutzeri*
INMOVILIZADA SOBRE SEPIOLITA”**

Tesis para optar al Título de Químico Farmacéutico

LUIS FERNANDO ORELLANA HERMOSILLA

Director:

Dr. Juan Ricardo Ojeda Herrera

Universidad de Valparaíso

2014

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN.....	v
ABSTRACT.....	vii
I - INTRODUCCIÓN.....	9
I.1 - ANTECEDENTES GENERALES.....	10
I.2 – EL AZUFRE EN LOS COMBUSTIBLES FÓSILES.....	10
I.3 - EFECTOS DE LOS ÓXIDOS DE AZUFRE.....	12
I.4 - LEGISLACIÓN ACTUAL.....	14
I.5 - METODOLOGÍAS DE DESULFURACIÓN.....	17
I.6 - BIODESULFURACIÓN.....	18
I.6.1 - RUTAS METABÓLICAS DE BIODESULFURACIÓN.....	19
I.6.2 - BIODESULFURACIÓN CON BACTERIAS INMOVILIZADAS.....	22
I.7 - AVANCES EN EL DISEÑO DE BIOREACTORES PARA BDS.....	24
II - HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	27
II.1 - HIPÓTESIS.....	28
II.2 - OBJETIVOS.....	29
II.2.1 - OBJETIVO GENERAL.....	29
II.2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
III - MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
III.1 - MATERIALES.....	32
II.1.1 - REACTIVOS.....	32

II.1.2 - MATERIALES DE LABORATORIO.....	33
III.1.3 - EQUIPOS.	34
III.2 - METODOLOGÍA	37
III.2.1 - OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS.	37
III.2.2 - CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y CULTIVO.	37
III.2.3 - CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Pseudomona stutzeri</i>	38
III.2.4 - SOPORTES EN ESTUDIO.	38
III.2.5 - ADSORCIÓN DE <i>Pseudomona stutzeri</i> SOBRE SEPIOLITA.	39
III.2.6 - IMPREGNACIÓN IN SITU DE LAS BACTERIAS SOBRE EL SOPORTE.....	40
III.2.7 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE DBT.....	41
III.2.8 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE UN GASOIL COMERCIAL.	43
III.2.9 - EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL OXÍGENO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA.....	43
III.2.10 - EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DEL BIOCATALIZADOR.	44
III.2.11 – EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE UN SURFACTANTE...	45
III.2.12 - ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS.	45
IV - RESULTADOS	46
IV. 1. - CRECIMIENTO, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS.....	47
IV. 2 - CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Pseudomona stutzeri</i>	47
IV. 3 - ADSORCIÓN DE <i>Pseudomona stutzeri</i> sobre SEPIOLITA.	49
IV. 4 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE DBT.....	51
IV.4.1 - INFLUENCIA DEL LARGO DE LECHO CATALÍTICO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA.	51
IV.4.2 - INFLUENCIA DEL FLUJO DE REACCIÓN SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA.....	52

IV.4.3 - INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA.....	55
IV. 5 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE UN GASOIL COMERCIAL.....	58
IV. 6 - EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL OXÍGENO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA.....	61
IV. 7 - EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DEL BIOCATALIZADOR.....	63
IV. 8 - EFECTO DE LA ADICIÓN DE UN SURFACTANTE.....	65
V - DISCUSIÓN	67
V. 1 - CRECIMIENTO, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS.....	68
V. 2 - CURVA DE CRECIMIENTO DE <i>Pseudomona stutzeri</i>	68
V. 3 - ADSORCIÓN DE <i>Pseudomona stutzeri</i> SOBRE SEPIOLITA.....	70
V. 4 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE DBT.....	71
V.4.1 - INFLUENCIA DEL LARGO DEL LECHO CATALÍTICO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA.....	72
V.4.2 - INFLUENCIA DEL FLUJO DE REACCIÓN SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA.....	72
V.4.3 - INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA.....	73
V.5 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE UN GASOIL COMERCIAL.....	74
V. 6 - EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL OXIGENO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA.....	75
V. 7 – EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DEL BIOCATALIZADOR.....	76
V. 8 - EFECTO DE LA ADICIÓN DE UN SURFACTANTE.....	77
VI - CONCLUSIONES	78

VII - REFERENCIAS.....80

Resumen

La contaminación por dióxido de azufre (SO_2) se ha convertido en un serio problema de salud pública, por lo que se requiere aplicar procesos que disminuyan los niveles de compuestos sulfurados en el combustible. Sin embargo, con la explotación de yacimientos cada vez más profundos se obtienen compuestos sulfurados cada vez más refractarios a los procesos convencionales, haciéndose necesaria la aplicación de nuevas metodologías. En este contexto, surge como alternativa la biodesulfuración (BDS), en donde específicamente la utilización de bacterias inmovilizadas ha surgido como alternativa para los procesos de biotransformación.

En este trabajo, se estudiaron los parámetros de operación de un Bioreactor Experimental Continuo utilizando como biocatalizador bacterias del tipo *Pseudomonas stutzeri*, inmovilizadas sobre partículas de sepiolita, en reacciones de biodesulfuración de DBT y gasoil. Las variables estudiadas fueron el largo del lecho catalítico, flujo de sustrato y tamaño de partícula del soporte. Los resultados demostraron que la mayor actividad fue encontrada en el sistema que utilizó un largo de lecho catalítico de 5 cm, un flujo del sustrato de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y tamaños de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm. Las razones por las cuales este sistema fue el más activo se relacionan con una mayor concentración de oxígeno presente en lechos cortos, un mayor tiempo de contacto entre las bacterias y el sustrato a flujos menores y a una mayor superficie de reacción a tamaños mayores de partículas.

Mejoras en el diseño experimental permitieron, por una parte, comprobar la importancia del oxígeno en la reacción de biodesulfuración, y por otro, establecer la influencia de un compuesto surfactante sobre la actividad biocatalítica.

Este tipo de tecnologías se presenta como una alternativa innovadora y complementaria a los procesos convencionales de tratamiento, resultando beneficioso para la salud de la población y para el medio ambiente.

Abstract

Contamination by sulfur dioxide (SO₂) is considered a serious public health problem, so it is required to implement processes that reduce the levels of sulfur compounds in the fuel. However, with the exploitation of deeper petroleum fields significant quantities of refractory sulfur compounds are obtained, making necessary the application of new methodologies. In this context, the biodesulfurization (BDS), that use immobilized bacteria, has arisen as a new alternative method in biotransformations processes.

In this work, the operating parameters of an Experimental Continuous Bioreactor, using *Pseudomonas stutzeri* immobilized on sepiolite, for BDS of DBT and gasoil, were studied. The operation variables analyzed were the catalyst bed length, flow of sulfured substrate and the support particle size. The results showed the highest activity in systems that used a long catalyst bed of 5 cm, a flow of substrate of 27 cm³/h and a particle size of 3,35 mm – 5,6 mm. The increased of BDS activity was associated with a higher oxygen concentration present in short beds, a longer time of contact between bacteria and substrate at lower flows and the increased of reaction surface at larger particle sizes.

Improvements in experimental design of bioreactor, allowed to verify the importance of oxygen load in the biodesulfurization reactions, and the influence of surfactant compound.

This technology is considered as an innovative and complementary alternative to conventional treatment processes, proving beneficial to the health of the population and the environment.

I - Introducción

I.1 - ANTECEDENTES GENERALES

La mayor parte de la energía que se utiliza en la sociedad moderna actual se obtiene a partir del carbón, el gas natural y el petróleo, los cuales se conocen como combustibles fósiles. La mayoría de estos compuestos son utilizados para la generación de energía eléctrica, el transporte y la calefacción.

A pesar que la proporción de energía proveniente de los combustibles fósiles ha experimentado un ligero descenso a partir de la década del ochenta, el consumo de energía procedente principalmente del petróleo sigue en aumento, y para hacer frente a esta creciente demanda, la producción de energía primaria casi se ha duplicado entre 1973 y 2007 (Calzada, 2010).

I.2 - EL AZUFRE EN LOS COMBUSTIBLES FÓSILES

Uno de los principales problemas derivados de la combustión del carbón y los derivados del petróleo, es la emisión de diferentes gases, entre ellos, óxidos de azufre y de nitrógeno. Tales gases producen efectos negativos en el medio ambiente y en la salud de las personas, así como también graves consecuencias en el ámbito económico (Monticello, 2000; Soleimani, 2007).

Existen numerosos procesos que son propios de la actividad normal del planeta que generan diferentes compuestos volátiles azufrados, tales como la descomposición de la materia orgánica en pantanos y suelos, la descomposición fotoquímica sobre la superficie del mar, el metabolismo de las plantas y las emisiones volcánicas (Bates, 1992). Sin embargo, alrededor del 75% del azufre emitido a la atmósfera está relacionado con la obtención de energía a partir de combustibles fósiles, y en menor grado, con

actividades de la industria metalúrgica. Se ha estimado que durante los procesos de combustión, aproximadamente un 90% del azufre contenido en el petróleo y sus derivados es emitido a la atmósfera en forma de óxidos de azufre (Monticello, 1985).

El contenido de azufre en los combustibles fósiles varía según el origen del combustible (Monticello, 1985), y en el petróleo es el elemento más abundante después del carbono y del hidrógeno. En el petróleo crudo, el azufre se encuentra formando parte de compuestos orgánicos e inorgánicos (Kropp, 1998), y su porcentaje en peso varía entre el 0,03 y 7,89%. Generalmente, los compuestos orgánicos azufrados se presentan como formas aromáticas o saturadas de tioles, heterociclos y sulfuros, tal como se observa en la Figura I.1 (Soleimani, 2007).

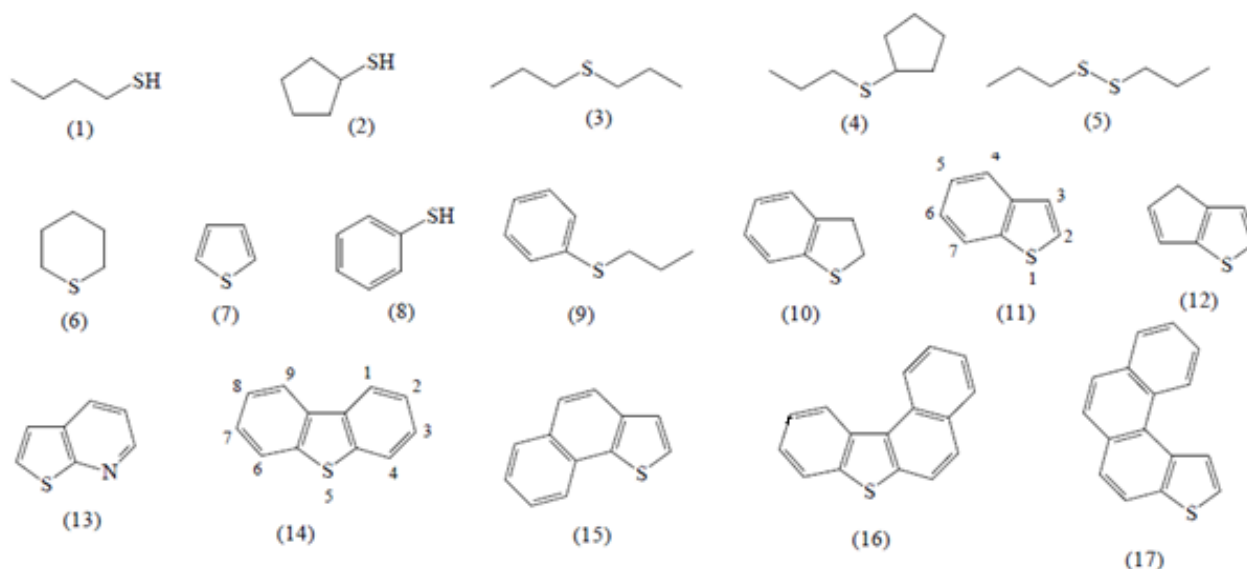


Figura I.1 - Principales compuestos azufrados presentes en el petróleo: (1) alcano tioles; (2) cicloalcano tioles; (3) sulfuros dialquílicos; (4) sulfuros alquil-cicloalquílicos; (5) polisulfuros; (6) sulfuros cíclicos; (7) tiofenos; (8) areno tioles; (9) sulfuros aril-alquílicos; (10) tiindanos; (11) benzotiofenos; (12) tienotiofenos; (13) tienopiridinas; (14) dibenzotiofenos; (15) naftotiofenos; (16) benzonaftotiofenos; (17) fenantrotiofenos.

I.3 - EFECTOS DE LOS ÓXIDOS DE AZUFRE

El material particulado del aire está formado por un aerosol de partículas sólidas y gotas de líquido, y aquellas de diámetro menor a 10 micras pueden ser inhaladas y llegar a los pulmones. Los problemas que estas partículas pueden causar o agravar son asma, edema pulmonar, eritema orofaríngeo, rinoфаринgitis y adelgazamiento de la mucosa del tracto respiratorio, aumentando el riesgo de contraer una infección bacteriana (Meng, 2003), principalmente en niños, adultos mayores y personas afectadas por dolencias respiratorias, quienes constituyen la principal población de riesgo (Gong, 2001).

Además, el SO_2 puede provocar alteraciones en el ADN (Meng, 2004), estimular la peroxidación celular en diversos órganos, y por su gran solubilidad, es capaz de disolverse en fluidos acuosos y pasar al torrente sanguíneo, causando acidosis metabólica. Por último, el contacto con este gas puede causar irritación ocular debido a la formación de ácido sulfuroso al entrar en contacto con la membrana ocular húmeda.

En el año 2012, el Health Effects Institute (HEI) realizó un proyecto llamado Estudio de Salud y Contaminación del Aire (ESCALA), en el cual se estudio y analizó la relación entre la contaminación del aire y la mortalidad (CEMDA, 2013). Este proyecto fue evaluado en nueve ciudades de Latinoamérica tomando como parámetro los cambios porcentuales de riesgo (RPC), que corresponde al aumento en el riesgo de mortalidad asociado con un incremento de 10 mg/m^3 en la concentración promedio de 24 horas de PM_{10} (partículas de tamaño menor a $10 \mu\text{m}$). La mayoría de los resultados fueron positivos y estadísticamente significativos, observándose un aumento del riesgo de mortalidad con el aumento de las concentraciones en el ambiente.

En este mismo estudio se observó el efecto de las concentraciones ambientales de PM10 en la mortalidad infantil por causas respiratorias y las infecciones respiratorias bajas. Los resultados confirmaron la asociación positiva y significativa entre PM10 y las causas de mortalidad, en donde se observa una RPC del 77%. Para la mortalidad por causas específicas, el porcentaje de aumento de la mortalidad oscila entre el 72% para la enfermedad cardiovascular y de un 2,44% para la Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC). Estos datos vienen a confirmar lo que se proyectaba para el año 2010, en donde la tasa de mortalidad fue de 27,73 por cada 100.000 habitantes para las enfermedades respiratorias (DEIS, 2010).

Los óxidos de azufre, junto con los óxidos de nitrógeno, pueden oxidarse en presencia del agua de lluvia, ya sea en fase acuosa o gaseosa, generando la llamada "lluvia ácida" (Soleimani, 2007), lo que constituye la principal causa de la acidificación del suelo y las aguas. Los efectos de la lluvia ácida no solamente afectan las inmediaciones de los sitios de emisión, ya que los compuestos que la forman tienen una vida media aproximada de hasta 6 días, y pueden dispersarse a cientos de kilómetros de distancia por efecto del viento (Castillo, 2007).

La capacidad de los suelos para compensar los efectos de la lluvia ácida, depende en gran medida de la presencia del humus, el que actúa como intercambiador iónico, generando así un efecto tampón. La disminución del pH de los suelos tiene una influencia directa en la solubilización de metales tóxicos y la pérdida de nutrientes (Ca, K, Mg, etc.) por procesos de lixiviación (Haines, 1986). Esto los hace menos accesibles para los vegetales, por lo tanto, la vegetación se ve afectada por esta pérdida de nutrientes y el aumento de sustancias tóxicas, provocando, además, que las plantas se vuelvan cada vez más vulnerables al ataque de plagas (Henry, 1999).

Pero no solamente los suelos se ven afectados por la lluvia ácida y el material particulado proveniente de la combustión del petróleo y sus derivados, también los ríos, lagos y todo el medio acuático ve reducida la población de peces y alterada su flora, la que es menos resistente a los bajos pH en estos ecosistemas (Haines, 1986).

La presencia de azufre en los combustibles también causa la corrosión de los materiales de construcción, tuberías y circuitos, pero el mayor deterioro es el que se produce en los monumentos históricos. Principalmente se ven afectados todos aquellos fabricados en piedra caliza y mármol, ocasionando no solamente un costo económico para la sociedad, sino además una enorme pérdida en el patrimonio cultural (Soleimani, 2007; Bhatia, 2006).

I.4 - LEGISLACIÓN ACTUAL

En vista de la gran cantidad de problemas que origina la emisión de óxidos de azufre, tanto para la salud humana como para el medio ambiente, muchos países en el mundo han establecido normas cada vez más estrictas referentes al contenido máximo de azufre en los combustibles (Monticello, 2000; Soleimani, 2007).

Según datos del Gobierno de Chile, actualmente las fundiciones de cobre son la principal fuente emisora de material particulado y compuestos azufrados. Cabe destacar que las emisiones de dióxido de azufre de este sector industrial alcanzaron un total cercano a las 400 mil toneladas en el año 2010, lo que equivale a casi cuatro veces lo que emite todo el parque de termoeléctricas a nivel nacional. Para el Ministerio del Medio Ambiente es prioritario reducir las emisiones de SO₂, y por tal razón, a mediados del año

2012 se aprobó un anteproyecto que regula la emisión no solamente de SO₂, sino además de material particulado, arsénico y mercurio (Ministerio del Medio Ambiente, 2012).

Estados Unidos y los países de la Unión Europea han reducido en forma gradual los niveles de azufre en los combustibles, a medida que adaptan la calidad de éstos a los requerimientos de las nuevas tecnologías vehiculares (Lev-On, 2007). Además de estas iniciativas, en materia de legislación europea se han creado normas contra la contaminación atmosférica causada por las emisiones de vehículos a motor, las que están en directa relación con la calidad de los combustibles que se utilizan.

En la Tabla I.1 se indican los límites de azufre en las gasolinas utilizadas en Estados Unidos y Europa.

Tabla I.1 - Límites del azufre en la gasolina en Estados Unidos y Europa

Estados Unidos		Europa	
Año	Máx. azufre en combustible (ppm)	Año	Máx. azufre en combustible (ppm)
1975	1000	Pre-1993	1000-2000
1980	1000	1993	1000
1994	1000	1996	500
1999	1000	2000	150
2004	80(30)	2005	50(10)

En Chile, la Empresa Nacional del Petróleo (ENAP), dependiente del Ministerio de Minería, es la encargada de la producción y distribución de combustibles y sus derivados. En abril del año 2001, ENAP lanzó al mercado el Diesel Ciudad, reduciendo el contenido de azufre en el combustible de 3000 a 300 ppm, y en julio de 2004, con la comercialización en la Región Metropolitana del Diesel Ciudad Plus, los contenidos de

azufre se redujeron desde 300 a 50 ppm. En el año 2010, ENAP comenzó a abastecer a las regiones de Chile con Diesel Grado B, similar al Diesel Ciudad Plus, cuyo contenido de azufre es de solo 50 ppm (ENAP, 2013).

El Decreto Supremo N° 60, del 5 de septiembre de 2011, y publicado en el Diario Oficial de la República de Chile el 17 de marzo de 2012, establece las especificaciones nacionales de calidad de los combustibles y los límites máximos de azufre permitidos en cada uno de ellos (ver Tabla I.2).

Para cumplir con el Decreto 60 del Ministerio de Energía, en septiembre del año 2012, ENAP presentó las nuevas gasolinas de 93 y 97 octanos, las que solo tienen 15 ppm de azufre, convirtiéndose así en las más limpias de Latinoamérica, superiores, incluso, a las comercializadas en Estados Unidos (ENAP, 2013).

Tabla I.2 - Límites máximos de azufre permitidos en los combustibles

Combustible	Límite
Gasolina para motores de ignición por chispa	30 ppm (i)
Petróleo Diesel Grado B	50 ppm
Kerosene	500 ppm (ii)
Petróleo Combustible N° 5	3,0 % m/m
Petróleo Combustible N° 6	3,0 % m/m

(i) A partir de septiembre de 2012, este valor varía a 15 ppm
(ii) A partir del 2013, este valor varía a 100 ppm

I.5 - METODOLOGIAS DE DESULFURACIÓN

Debido a los efectos de los óxidos de azufre sobre el ambiente y la salud humana, en las refinerías debe llevarse a cabo un proceso de desulfuración al crudo con el propósito de eliminar los compuestos sulfurados, y obtener así combustibles que cumplan con las normativas ambientales.

Las diferentes tecnologías que se han ido desarrollando pueden clasificarse según estén basadas en el grado de descomposición de los compuestos azufrados, en operaciones de separación y transformación, o bien, en el empleo de sistemas biológicos con capacidad desulfuradora (Babich, 2003).

Entre las metodologías de tratamiento se encuentra la Hidrodesulfuración (HDS), que consiste en un proceso de hidrogenación catalítica a elevadas presiones (1-20 mPa) y temperaturas medias-altas (290-455°C), en presencia de catalizadores de CoMo/Al₂O₃ y NiMo/Al₂O₃ (Mc Farland, 1999), generándose como principal producto sulfuro de hidrógeno (H₂S) e hidrocarburos libres de azufre.

Otras tecnologías de desulfuración se basan en métodos fisicoquímicos, en las que no se emplea hidrógeno, sino catalizadores ácidos (BF₃, AlCl₃, ZnCl₂ o SbCl₅) soportados en alúmina, sílice o sílice-alúmina. Con estas metodologías se obtienen productos con bajos contenidos de azufre (hasta 20 ppm), afectándose levemente la calidad del combustible. Entre estas tecnologías se encuentra la desulfuración extractiva, la que emplea acetona, etanol y otros solventes nitrogenados como agentes desulfurantes, obteniéndose porcentajes de desulfuración entre 50 y 90% (Babich, 2003).

Si bien la HDS es un proceso altamente eficiente, el aumento en el consumo de combustibles ha llevado a la necesidad de explotar yacimientos más profundos, desde los

cuales se obtienen combustibles ricos en compuestos sulfurados más complejos (Alcántar y Cruz, 2011) y más refractarios a las reacciones de hidrotratamiento (Maghsoudi, 2000; Gray, 2003). Esto último ha conducido a la generación de un proceso denominado “hidrotratamiento profundo”, el cual utiliza presiones y temperaturas más altas que las usadas en el proceso convencional. El problema de trabajar con estas condiciones extremas, es que el proceso de HDS se hace mucho menos selectivo, ocasionando una disminución en el grado de octanaje y una baja en la calidad de los combustibles (Gálvez, 2008).

Es por tal motivo que se hace necesaria la aplicación de procesos nuevos o complementarios a los utilizados convencionalmente.

I.6 - BIODESULFURACIÓN

Una tecnología alternativa a la HDS es la utilización de microorganismos que sean capaces de degradar selectivamente moléculas organosulfuradas sin alterar el esqueleto carbonado (Monticello, 1985). Esta técnica fue utilizada a mediados de los años 50 sin mucho éxito, sin embargo, los avances más importantes se desarrollaron en la década de los 90, cuando fue descubierta la capacidad de la bacteria *Rhodococcus erythropolis* de metabolizar selectivamente el azufre procedente de moléculas organosulfuradas de dibenzotiofeno (DBT), eliminándolo en forma de sulfato, y transformándolo en 2-hidroxibifenilo (2-HBP), conservándose además las propiedades energéticas de los combustibles (Kilbane, 1992).

Una ventaja de la BDS en comparación con la HDS, es que emplea condiciones normales de presión y temperatura, sin pérdida de la calidad del combustible (Gupta,

2005). Por otro lado, la producción de bacterias es relativamente sencilla, lo que implica un menor costo de operación y una menor complejidad de las instalaciones.

Sin embargo, la gran selectividad de estos biocatalizadores no permite que un solo microorganismo elimine todos los compuestos azufrados. Además, para la supervivencia del biocatalizador es imprescindible una fase acuosa, la que debe tenerse en cuenta en la etapa de separación de fases al final del proceso (Setti, 1997). Por otro lado, se hace necesario desarrollar biocatalizadores con mayor actividad y resistencia a la inhibición por productos (Quintero, 2003). Debido a estas razones, la BDS es un procedimiento que continúa en fase de estudio, por lo que aún no es aplicable a gran escala.

I.6.1 - RUTAS METABÓLICAS DE BIODESULFURACIÓN

Entre las rutas metabólicas que utilizan las bacterias se encuentran las aerobias y las anaerobias, siendo las primeras las más predominantes en la literatura. Entre las rutas aerobias para degradar el DBT se distinguen tres tipos de metabolismo (McFarland, 1998).

El metabolismo tipo I consiste en una oxidación parcial del compuesto azufrado sin afectar los enlaces C-S; a este proceso se denomina *degradación*, ya que no constituye una desulfuración propiamente tal y no elimina el azufre de la estructura inicial (ver Figura I.2). Esta ruta degradativa es conocida como la Ruta de Kodama, la cual consta de tres etapas: hidroxilación, ruptura del anillo aromático e hidrólisis (McFarland, 1998).

En el metabolismo tipo II, los microorganismos utilizan el compuesto sulfurado como única fuente de azufre, carbono y energía. Aunque el azufre de la molécula es

eliminado, la estructura carbonada se ve alterada, como se observa en la Figura I.2, lo que altera la calidad calorífica del producto final (Van Affender, 1990).

Finalmente, el metabolismo tipo III se produce en bacterias capaces de producir una ruptura selectiva del enlace carbono-azufre sin alterar su estructura carbonada. Esta ruta no destructiva, conocida como ruta 4S, elimina completamente el azufre de la molécula, manteniendo prácticamente intactas las propiedades del combustible (Bhatia, 2006).

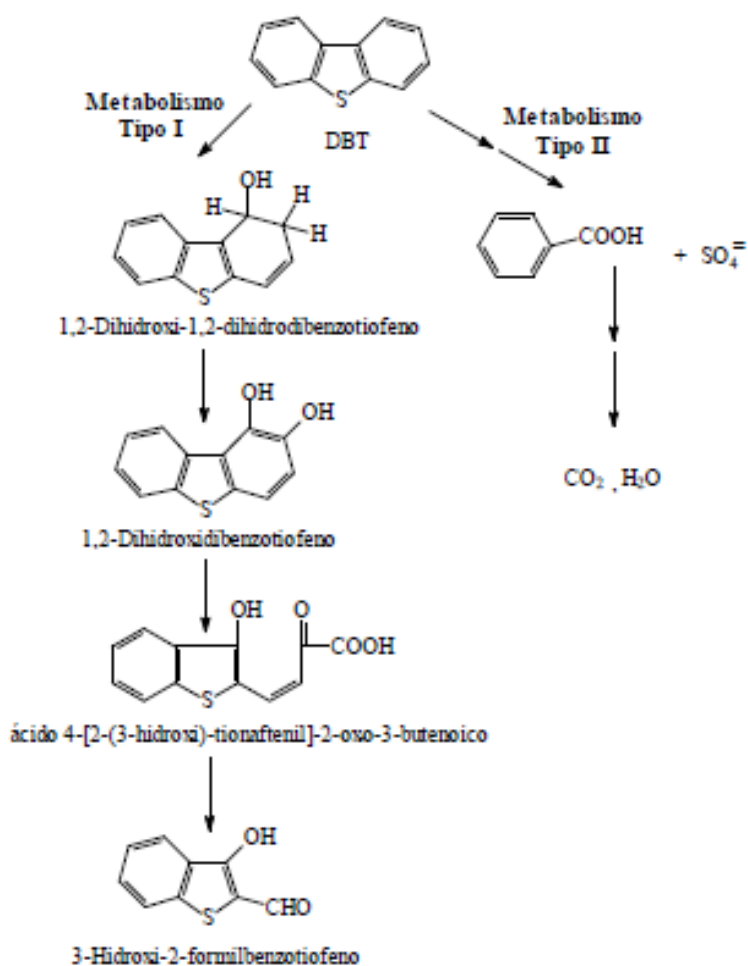


Figura I.2 – Esquema de los metabolismos tipo I y II en las rutas anaerobias

En la ruta metabólica 4S interfieren dos monooxigenasas citoplasmáticas (DszA y DszC), una flavin reductasa (DszD) y una desulfurinasa (DszB) (Shavandi, 2008). Los productos finales de esta reacción son el 2-HBP y azufre en forma de sulfitos, los que son utilizados por la bacteria principalmente para la síntesis de proteínas. Por otra parte, los hidroxibifenilos son eliminados hacia el medio y, debido a su lipofilia, vuelven a formar parte de la fase orgánica, permitiendo así que puedan conservarse las características combustible de estas moléculas (Monticello, 2000). En la figura I.3 se muestra el mecanismo enzimático descrito anteriormente, conocido como ruta 4S.

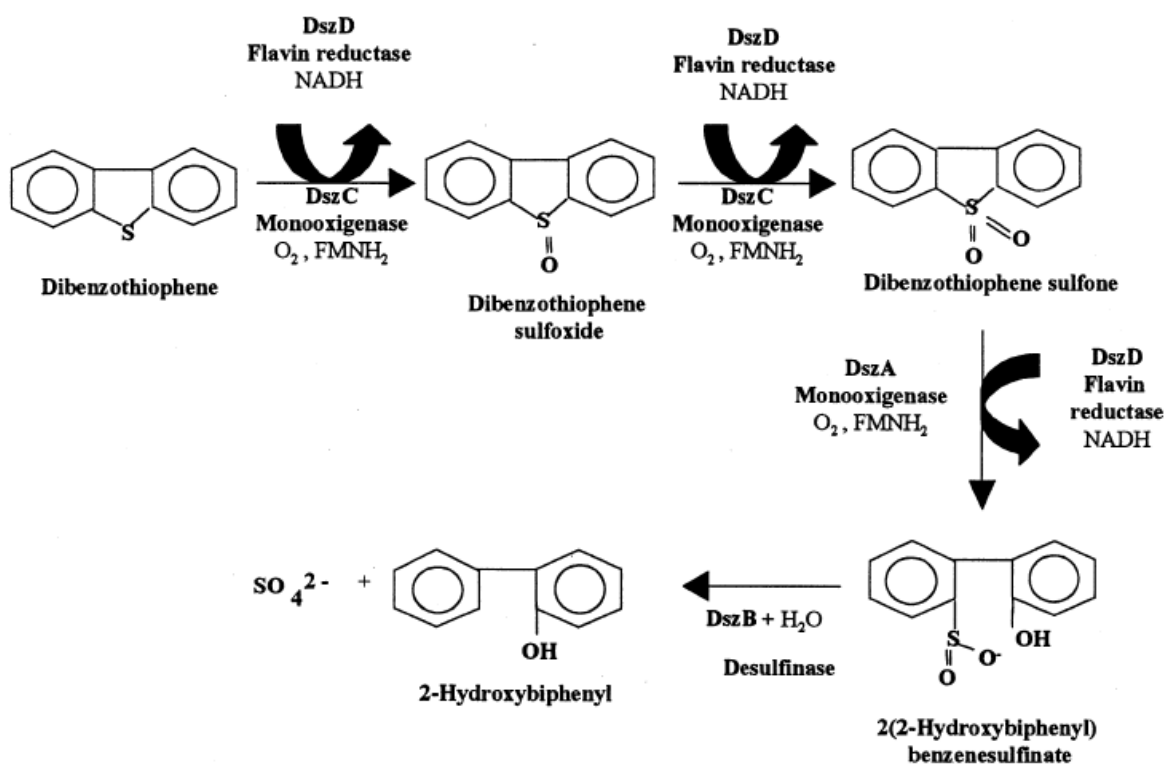


Figura I.3 – Esquema de la ruta metabólica de degradación de DBT

La mayoría de los estudios realizados sobre BDS ha utilizado cepas de *Rhodococcus* como catalizadores biológicos (Kobayashi, 2000; Hirasawa, 2001; Honda,

1998), aunque existen otros microorganismos con igual o mejor selectividad que pueden ser utilizados (Onaka, 2001; Goubin, 2006).

A pesar de la gran capacidad de las bacterias por degradar compuestos sulfurados, el acceso hacia éstos se ve dificultado debido a que tales sustratos se ubican siempre en una fase hidrofóbica, muy diferente a la hidrofílica en la que están contenidas las cepas biodesulfuradoras (Ibacache, 2008). En este sentido, deben buscarse alternativas que permitan aumentar la biodisponibilidad de tales sustratos hacia los microorganismos biodesulfuradores.

I.6.2 - BIODESULFURACIÓN CON BACTERIAS INMOVILIZADAS

En los últimos años, la utilización de bacterias inmovilizadas ha surgido como una nueva alternativa para los procesos de biotransformación de compuestos sulfurados (Gill, 2000). Con esta metodología se logra una mejor estabilidad operacional y una separación más fácil de los productos derivados de la reacción, y además, existen menores riesgos y peligros de contaminación, mayores tiempos de vida de los biocatalizadores y una mejora sustancial en la biodisponibilidad de los sustratos hacia los centros catalíticos.

Uno de los primeros estudios sobre desulfuración de DBT utilizando metodologías de inmovilización fue efectuado por Li y col., quienes utilizaron bacterias del género *Pseudomonas* inmovilizadas sobre alginatos (Li, 2005). Más tarde, estos mismos investigadores comprobaron que cuando se inmovilizaban bacterias del tipo *Mycobacterium goodii* sobre alginato de sodio, se observaba una disminución de hasta un 69% en los niveles de azufre en una muestra de combustible.

Una de las ventajas de la inmovilización biocatalítica por adsorción sobre un material inorgánico, en comparación a la adsorción sobre polímeros, es la disminución de los problemas estéricos y de transferencia de masa, ya que los microorganismos quedan adsorbidos en la superficie del soporte. Sin embargo, estos materiales deben poseer ciertas características, como ser inerte al ataque biológico, insoluble en el medio de cultivo y no tóxico para las bacterias (Lee, 2004).

Uno de los materiales utilizados en BDS es la Celita, un silicato tricálcico utilizado ampliamente en la industria farmacéutica. En el año 2000, Hwan impregnó cepas de *Gordona* sp. y *Nocardia* sp. en Celita, y estudió la reacción de BDS de DBT y Gasoil con ciclos de 24 horas mediante un proceso tipo batch. Los resultados indicaron que para el caso del DBT, utilizando ambas cepas, se produce un aumento en la actividad de BDS en comparación al gasoil, y estas diferencias fueron relacionadas con la mayor concentración de compuestos recalcitrantes que contiene el gasoil. Otro trabajo utilizó Alúmina como soporte, estudiándose además las modificaciones superficiales a este material, utilizando goma arábiga y su influencia en los procesos de BDS por bacterias del género *Pseudomonas*. En este trabajo se encontraron mejoras tanto en la capacidad adsortiva de la Alúmina, como en la capacidad de los microorganismos de metabolizar el DBT (Goubin, 2006).

En los últimos años, investigadores del Laboratorio de Biotecnología de la Universidad de Valparaíso han estudiado la inmovilización de *Pseudomonas stutzeri* sobre diferentes soportes inorgánicos en relación al número de bacterias adsorbidas, a su actividad metabólica y a sus propiedades biodesulfuradoras. Los resultados demostraron que la mayor interacción se producía entre *Pseudomonas stutzeri* sobre sílice y sepiolita, manteniendo su actividad biodesulfuradora una vez adsorbida. Este estudio concluyó que

la modificación de los soportes inorgánicos por procesos de adsorción incrementa la biodisponibilidad de los sustratos sulfurados para las bacterias, mejorando de esta forma la actividad de BDS (Dinamarca, 2010).

I.7 - AVANCES EN EL DISEÑO DE BIOREACTORES PARA BDS

Una de las claves en el desarrollo y optimización en los procesos de biodesulfuración es el diseño de los reactores (Lange, 1999; Monticello, 2000). Las primeras plantas piloto fueron reportadas a fines de los años 90 por Arctic Slope Regional Corp. y Total Raffinage Distribution S.A. (Aburto, 2003), en las que se realizaron ensayos con cepas de *Rhodococcus erythropolis* en un reactor de tanque agitado, controlando las condiciones experimentales de temperatura y pH en el proceso, a 30°C y 6-8, respectivamente. Al final del proceso se obtenía un producto, luego se separaban las fases orgánica y acuosa por centrifugado. La fase oleosa se retiraba y la fase acuosa que contenía el biocatalizador era removida bajo la forma de sulfatos. Para incrementar la eficiencia de la transferencia de masa entre las dos fases y promover la actividad desulfuradora de la cepa, se producía una fina emulsión, la que a escala industrial, no era posible de realizar, debido a que se requerían condiciones exigentes de energía.

Con el diseño de los reactores de tipo Airlift se incrementó el uso de oxígeno, utilizando lechos catalíticos de mayor longitud, lo que simplificaba la separación de las fases del producto obtenido, a diferencia de la emulsión viscosa que se obtenía con el primer diseño, disminuyendo además el daño celular y los gastos operacionales al no utilizar el agitador (Reza, 2004). Sin embargo, el uso de una fina emulsión para incrementar la BDS, hace más difícil el proceso de recuperación del biocatalizador de la fase orgánica (Yu, 1998).

La inmovilización celular en un bioreactor para la desulfuración ofrece varias ventajas para su aplicación industrial en comparación a los procesos tradicionales (Setti, 1997), como la recuperación del biocatalizador, el aumento en la separación de las fases, la separación fácil del sustrato sulfurado desde el biocatalizador y el bajo riesgo de contaminación bacteriana.

En Estados Unidos, el Laboratorio Nacional Argonne diseñó un reactor de lecho fluido, en donde el biocatalizador fue inmovilizado en un lecho hidrofílico y fluidizado con gasolina oxigenada. El residuo restante fue conducido a un ciclón separador de sólidos. La gasolina tratada podría ser retirada de este separador como producto final, o ser parcialmente reciclada hacia al reactor (McFarland, 1998).

Un trabajo reportó que se podía atrapar *Rhodococcus erythropolis* en una resina prepolimérica (Naito, 2001), lo que permitía no solamente mantener la concentración de la biomasa en el reactor, sino que además se incrementaba la vida útil del biocatalizador a 900 horas.

La desulfuración biológica es un proceso que genera grandes volúmenes de producto, pero de bajo valor, y es diferente a la mayoría de los procesos biológicos. La remoción biológica de azufre es un proceso lento y requiere agua, y a escala industrial, el tamaño de los reactores de dos fases que puedan cumplir con los requerimientos para la desulfuración es inimaginable (Vásquez, 2002).

Sin embargo, el método de adsorción celular sobre soportes inorgánicos es el más recomendado (Setti, 1997). La inmovilización también retiene agua alrededor del catalizador, lo que es esencial para la función biocatalítica. Los soportes hidrofílicos pueden competir con el biocatalizador por el agua disponible en el sistema de reacción, especialmente cuando estos compuestos son también reactantes en las vías de

degradación del DBT. Este agotamiento completo del agua desde el sistema, conduce a una menor actividad biocatalítica. El uso de soportes hidrofílicos ha permitido desarrollar un proceso en el cual no se requieran decantadores bajo el bioreactor, ya que el agua queda atrapada en el soporte, lo que representa una ventaja en términos de costo y tiempo.

El presente trabajo tiene como objetivo estudiar la influencia de algunas variables de operación en un Bioreactor Experimental Continuo (BEC), con bacterias del género *Pseudomonas* inmovilizadas sobre un soporte biocatalítico, y su influencia en reacciones de BDS de DBT y de gasoil. Los parámetros que serán estudiados son: tamaño de partícula del soporte utilizado, largo del lecho catalítico y el flujo de reacción de BDS.

II - Hipótesis y Objetivos

II.1 - HIPOTESIS

“La optimización de los parámetros de operación de un Bioreactor Experimental Continuo formado por un lecho fijo compuesto por bacterias inmovilizadas sobre soportes inorgánicos, producirá un aumento en la biodisponibilidad y en la capacidad biodesulfuradora de *Pseudomona stutzeri* sobre sustratos sulfurados”

II.2 - OBJETIVOS

II.2.1 - OBJETIVO GENERAL

Estudiar las variables operacionales de un Bioreactor Experimental Continuo y establecer los parámetros operacionales óptimos para la reacción de Biodesulfuración de DBT y Gasoil.

II.2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Optimizar el crecimiento de *Pseudomonas stutzeri* en un medio de cultivo enriquecido
2. Estudiar la máxima capacidad de adsorción de *Pseudomonas stutzeri* sobre sepiolita
3. Evaluar la influencia del tamaño de partícula del soporte sobre la capacidad biodesulfuradora de *Pseudomonas stutzeri* sobre DBT en un BEC
4. Evaluar la influencia del flujo de reacción sobre la capacidad biodesulfuradora de *Pseudomonas stutzeri* sobre DBT en un BEC
5. Evaluar la influencia del largo del lecho catalítico sobre la capacidad biodesulfuradora de *Pseudomonas stutzeri* sobre DBT en un BEC
6. Establecer los parámetros operacionales óptimos de tamaño de partícula del soporte, flujo de reacción y largo de lecho catalítico para la reacción de Biodesulfuración de un Gasoil comercial en un BEC

III - Materiales y Métodos

III.1 - MATERIALES

III.1.1 - REACTIVOS

En la tabla III.1 se señalan los reactivos y productos químicos que se utilizaron para la preparación de los medios de cultivo, la realización de los ensayos de biodesulfuración, y la preparación y conservación de los microorganismos.

Tabla III.1 – Reactivos

Reactivo	Marca
Citrato de sodio	Winkler
Succinato de sodio	Merck
Cloruro de calcio	Winkler
Cloruro de magnesio hexahidratado	Winkler
Cloruro de hierro (II) tetrahidratado	Winkler
Fosfato monobásico de potasio	Loba Chemie
Fosfato dibásico de potasio	Loba Chemie
Cloruro de amonio	Winkler
Cloruro de sodio	Winkler
Cloruro de zinc	Winkler
Cloruro de manganeso tetrahidratado	Winkler
Molibdato de sodio dihidratado	Winkler
Cloruro de cobre (II)	Winkler

Tabla III.1 – Reactivos (continuación)

Tungstato de sodio	Winkler
Isooctano	Tedia
Dibenzotiofeno (DBT)	Merck
Gasoil comercial	Refinería Con-Con
Glicerol	Merck
Etanol	Vimaroni
Acetona	Tedia
(Sepiolita) $\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$	Tolsa

III.1.2 - MATERIALES DE LABORATORIO

En la tabla III.2 se señalan los materiales de laboratorio utilizados durante el desarrollo de este trabajo.

Tabla III.2 – Materiales de laboratorio

Matraces Erlenmeyer marca Duran Schott de 50 y 250 ml
Probetas de 10, 50 y 100 mL
Botellas con tapa marca Duran Schott de 100, 200, 500 y 1000 mL
Tubos Falcon de 15 y 50 mL
Tubos Eppendorf
Matraz Kitasato
Micropipetas marca Labnet de 10, 20, 50, 20, 1000 y 5000 μL

Tabla III.2 – Materiales de laboratorio (continuación)

Papel filtro
Pinzas y tijeras
Puntas desechables para micropipetas
Asas de siembra bacteriológica
Celdas para espectrofotometría

III.1.3 - EQUIPOS

A continuación, se detallan las características de los equipos utilizados para el cultivo y la evaluación de la actividad biodesulfuradora del microorganismo.

Autoclave - El esterilizador vertical marca Huxley Speedy, modelo HL-340 se utilizó para la esterilización de los materiales y medios de cultivo. Tiene un volumen de 49 litros, y cuenta con regulador de temperatura ajustable desde 121°C a 131°C y regulador de tiempo, ajustable de 0 a 60 minutos.

Incubadores - Para el cultivo y crecimiento de los microorganismos, tanto en medio sólido como líquido, se utilizó un incubador shaker marca Zhicheng, modelo ZHWY-200D. Tiene un rango de temperatura de trabajo de -20 a 60°C y una velocidad de agitación de 30-600 rpm.

Balanza analítica - La balanza analítica marca Kern, modelo ple 420-3N, fue utilizada para pesar los diferentes compuestos utilizados para la preparación de las soluciones de

trabajo, los medios de cultivo y los ensayos de actividad biodesulfuradora. Esta balanza tiene una precisión de $\pm 0,0001$ g.

Centrífuga - Se empleó una centrífuga refrigerada, marca Eppendorf, modelo 5810R. Posee un rotor de alta velocidad modelo FA-34-6-38 para aplicaciones moleculares en tubos de 0,2 mL a 85 mL, y tiene una velocidad máxima de 12000 rpm, y un rango de temperatura de -9 °C a 40 °C. Mantiene la temperatura constante a 4 °C, incluso a la velocidad máxima.

Bomba peristáltica - La bomba peristáltica marca Longer Pump, modelo BT100-2J, adaptada con un cabezal modelo YZ II 15, se utilizó para el procedimiento de impregnación de los microorganismos sobre los soportes que estaban colocados dentro del bioreactor y para los ensayos de actividad biodesulfuradora. Proporciona velocidades de flujo de 0,09 a 90 mL/min.

Espectrofotómetro - Para las lecturas de densidad óptica de los cultivos, se utilizó un Espectrofotómetro UV-VIS Genesys 10, THERMO. Tiene un rango completo de barrido de 190 a 1100 nm con una velocidad de barrido de 200 a 1000 nm/min. Utiliza como sistema óptico un haz único dividido y una lámpara de Xenón, cuya vida útil es normalmente de 5 años.

Cromatógrafo de Gas - Para el análisis de las muestras de dibenzotiofeno, se utilizó un cromatógrafo de gases marca Shimadzu, modelo GC-2010. Trabaja a una presión máxima de 970 kPa y un flujo máximo de 1200 mL/min. Posee un detector de ionización en llama (FID), una columna capilar spb-5 y un sistema autoinyector marca AOC modelo 20i.

Sulfómetro - Para la determinación del porcentaje de azufre en las muestras de gasoil, se utilizó un equipo analizador de azufre marca Leco, modelo SC-144DR, con detector infrarrojo el que trabaja con un software de fácil manejo en entorno Windows®. Posee un rango de detección de 5ppm a 25% de azufre, y una temperatura de trabajo de 1350°C.

Mufla - El horno de mufla marca Naber, modelo D-2804, se utilizó para secar los soportes después de finalizados los ensayos de biodesulfuración, con el propósito de eliminar por completo los restos de materia orgánica de su superficie. Tiene una carcasa de acero inoxidable y un selector manual, para temperaturas regulables hasta 1100°C.

Vortex - El agitador a vibración vórtex marca Velp Científica, modelo D-230, se utilizó para la mezcla de soluciones en tubos falcon mediante movimiento orbital por acción de su cabezal de goma.

Purificador de agua - Para producir agua con una pureza tal que pueda ser utilizada en todas las aplicaciones críticas de laboratorio, se utilizó un equipo purificador de agua marca Heal Force, modelo NW Ultra Pure Water System. La unidad se puede conectar directamente a una fuente de agua potable y están disponibles con opciones para todas las aplicaciones críticas de laboratorio. La velocidad de dosificación es de hasta 0.5 litros/min.

Agitador magnético - Para mantener una mezcla homogénea de la solución bacteriana para adsorber, se utilizó un agitador magnético con calefactor marca Pobel. Cuenta con un panel frontal con regulador electrónico de temperatura desde 5°C hasta 380°C y un regulador de velocidad de entre 60 y 1500 rpm.

III.2 - METODOLOGÍA

III.2.1 - OBTENCIÓN DE LOS MICROORGANISMOS

Para este trabajo se utilizó la cepa *Pseudomonas stutzeri* (ATCC), la cual forma parte de un pool de microorganismos pertenecientes al Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Facultad de Farmacia. Estas cepas se encuentran rotuladas, almacenadas y conservadas en criotubos con glicerol estéril a -20°C.

III.2.2 - CONDICIONES DE CRECIMIENTO Y CULTIVO

Para determinar la viabilidad de las bacterias en los criotubos, se tomó una muestra de éstos para realizar una siembra por agotamiento en estrías en placas Petri con medio nutritivo, las que se incubaron a 30°C por 48 horas.

Una vez que se obtuvieron colonias aisladas en la placa, se tomó con asa estéril una sola de éstas para depositarla en un tubo falcon que contenía aproximadamente 30 mL de medio de crecimiento nutritivo, el que se incubó a 30°C y 200 rpm, por 24 horas. Transcurrido este tiempo, se procedió a centrifugar el contenido del tubo por 5 minutos, a 5000 rpm y 5°C, eliminándose el sobrenadante, lavando el pellet y resuspendiéndolo en una solución de suero fisiológico. Una vez obtenido el pellet de bacterias, éstas se incubaron en matraces Erlenmeyer de 250 mL que contenían medio de cultivo basal enriquecido con succinato y citrato de sodio como fuentes de carbono, y DBT como única fuente de azufre. Estos matraces se incubaron a 30°C y 200 rpm, hasta que las bacterias alcanzaron su fase estacionaria de crecimiento.

III.2.3 - CURVA DE CRECIMIENTO DE *Pseudomona stutzeri*

Para determinar el tiempo en que la bacteria alcanza su fase estacionaria de crecimiento, se realizó una curva de crecimiento. La concentración de la biomasa presente en el medio de crecimiento está relacionada con la medida de absorbancia que ésta presenta, y conociendo este valor, se puede estimar la concentración de las bacterias en el medio de crecimiento mínimo. Para ello, se transfirieron a tres matraces Erlenmeyer aproximadamente 10 mL de Medio con una cantidad determinada de bacterias provenientes de una colonia incubada en placa de agar nutritivo, y se incubaron a 30°C y 200 rpm, midiéndose su Densidad Óptica (DO) en un Espectrofotómetro UV-VIS a una longitud de onda de 600 nm. Estas mediciones se hicieron a tiempo cero (antes de incubar) y posteriormente a intervalos de tiempo regulares.

III.2.4 - SOPORTES EN ESTUDIO

Para el proceso de inmovilización in situ de las bacterias, se utilizó como soporte la Sepiolita, un silicato magnésico hidratado, de aspecto fibroso, área superficial BET de 300 m²g⁻¹ y una probada capacidad de adsorción (Dinamarca, 2010).

Para los ensayos de adsorción se utilizaron soportes con dos rangos de tamaños de partículas, 710 µm – 1,18 mm y 3,35 - 5,6 mm, los que fueron obtenidos después de un proceso inicial de pastillado y un posterior tamizado.

Previo al proceso de adsorción, los soportes fueron calcinados a 700°C por aproximadamente 12 horas. Posteriormente, estos soportes fueron incorporados dentro de un Bioreactor Experimental Continuo (BEC) de vidrio, de 40 cm de altura y 2 cm de diámetro, se conectaron las mangueras, posteriormente fue esterilizado, y finalmente, el

BEC y las mangueras se conectaron a una bomba peristáltica para realizar in situ el proceso de impregnación.



Figura III.1 – Fotografía de las partículas de Sepiolita utilizadas, en tamaños de 710 μ m – 1,18 mm y 3,35 - 5,6 mm.

III.2.5 - ADSORCIÓN DE *Pseudomona stutzeri* SOBRE SEPIOLITA

Para determinar el tiempo en que se produce la máxima capacidad de adsorción de las bacterias sobre el soporte, se procedió a realizar una curva de adsorción. Para ésto, en matraces Erlenmeyer se colocó aproximadamente 1 gramo de soporte, con los dos tamaños en estudio, y aproximadamente 10 mL del medio de crecimiento con una cantidad determinada de bacterias. Este ensayo se realizó por triplicado para cada tamaño de soporte. Posteriormente, en un espectrofotómetro se midió la densidad óptica inicial a 600 nm en cada uno de los matraces, y éste valor correspondió al tiempo cero de nuestra curva. Los matraces se incubaron bajo agitación constante a 30°C y 100 rpm, midiéndose su densidad óptica a 600 nm (Gálvez, 2008) cada 24 horas, hasta que el valor de la absorbancia se mantuvo constante. Con este ensayo se determinó el tiempo de

máxima adsorción de *Pseudomona stutzeri* en los distintos tamaños de partículas de Sepiolita.

III.2.6 - IMPREGNACIÓN IN SITU DE LAS BACTERIAS SOBRE EL SOPORTE

Una vez que las bacterias alcanzaron su fase exponencial de crecimiento, y con el objetivo de obtener un concentrado de bacterias para su posterior adsorción sobre el soporte, el cultivo líquido se centrifugó a 5000 rpm por 5 minutos y 5°C, descartándose después el sobrenadante. El pellet obtenido fue resuspendido en 10 mL de suero fisiológico estéril, y éste concentrado de bacterias se agregó a un frasco que contiene 1 litro del mismo medio líquido utilizado para el crecimiento, sin ninguna fuente de azufre.

Después de resuspendidas las bacterias, se procedió a realizar el proceso de impregnación in situ de las bacterias sobre el lecho fijo en el BEC. Este proceso se realizó sobre soportes con los dos tamaños de partícula (710 μm – 1,18 mm y 3,35 - 5,6 mm), y utilizando tres largos de lecho catalítico (5, 10 y 15 cm). Para la impregnación de las bacterias en el soporte, se adaptó el BEC a una bomba peristáltica Longer Pump modelo DG-1, utilizándose un flujo constante determinado en trabajos anteriores de 600 cm^3/hora . Este procedimiento se realizó bajo campana, durante el tiempo determinado con anterioridad en el ensayo de adsorción, y bajo agitación constante del medio con la ayuda de un agitador magnético, manteniendo de este modo una solución homogénea.

En la Figura III.2 se puede observar el Bioreactor Experimental durante el proceso de impregnación de las bacterias sobre el soporte.



Figura III.2 – Fotografía del Bioreactor Experimental Continuo (BEC).

III.2.7 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE DBT

Una vez inmovilizadas las bacterias en el lecho fijo del BEC, se purgó el sistema con una solución de suero fisiológico para eliminar todas aquellas bacterias libres que no quedaron adheridas al soporte. Luego, los ensayos de BDS se realizaron haciendo circular por el BEC el sustrato sulfurado (DBT), el cual fue incorporado al sistema previamente oxigenado con ayuda de una bomba de aire. Estos ensayos se realizaron con los dos tamaños de partícula, los tres largos de lecho catalítico, y dos diferentes velocidades de flujo de los sustratos ($27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y $54 \text{ cm}^3/\text{h}$).

Una vez que el DBT ha pasado a través el lecho catalítico, se recogen muestras en viales de vidrio al paso inicial de este y posteriormente a los 20 y a los 40 minutos, completándose así un primer ciclo de reacción. Posteriormente, el sustrato ya desulfurado

se vuelve a hacer circular por el BEC, y se vuelven a tomar muestras a los 20 y 40 minutos, completándose así un segundo ciclo de reacción. Finalmente, el proceso se repite hasta completarse un tercer ciclo de reacción.

En la Figura III.3 se observa una fotografía del BEC durante los ensayos de capacidad biodesulfuradora.

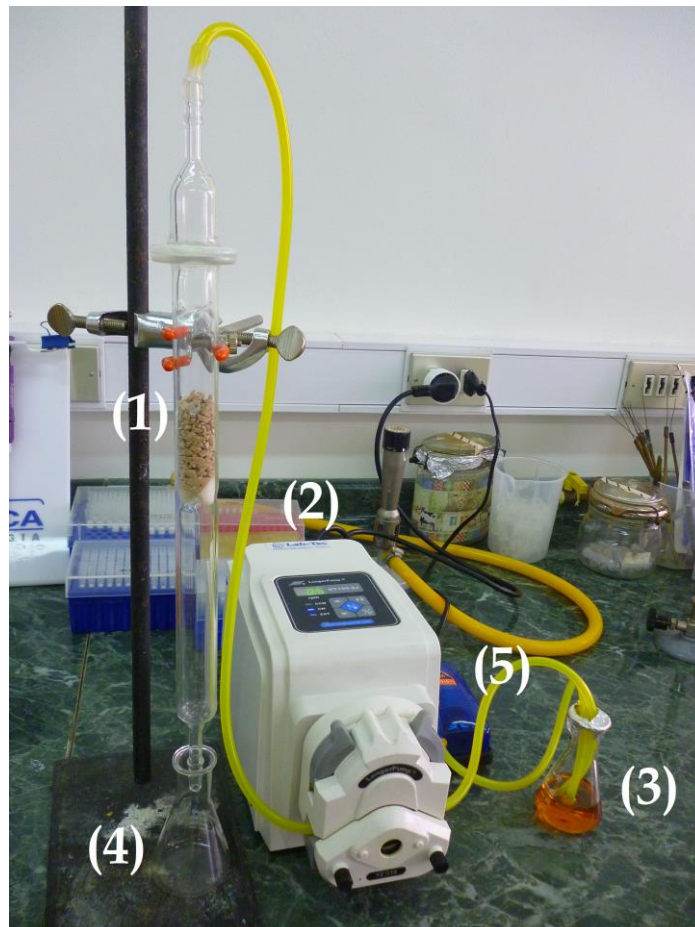


Figura III.3 – (1) BEC, (2) Bomba Peristáltica, (3) Sustrato sulfurado, (4) Recepción de producto, (5) Bomba de aire

III.2.8 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE UN GASOIL COMERCIAL

Una vez finalizados los ensayos con DBT, y empleando las condiciones experimentales óptimas de actividad en cuanto a tamaño de partícula, largo de lecho catalítico y velocidad de flujo, se procedió a realizar ensayos para medir la capacidad de BDS utilizando ahora un gasoil comercial.

III.2.9 - EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL OXÍGENO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA

Con el propósito de estudiar la influencia del oxígeno en las reacciones de BDS, y con el fin de optimizar las condiciones de aireación durante el proceso, se realizó un ensayo en un ambiente anaeróbico y en las mismas condiciones utilizadas para el ensayo con gasoil. Para esto, el sustrato fue incorporado en un ambiente rico en nitrógeno, el que se suministró directamente al gasoil desde un cilindro de nitrógeno, y manteniéndose un flujo constante de 0,1 L/min.

Con el fin de mejorar la capacidad de BDS de las bacterias adsorbidas en el soporte, se realizó una modificación en el sistema de oxigenación en el BEC, con el propósito de suministrar el oxígeno directamente hacia el lecho catalítico, y no en el sustrato. Como se observa en la Figura III.4, se adaptó al BEC una entrada adicional, en la cual se introdujo una manguera de silicona por la que se administró el oxígeno. Las condiciones de trabajo fueron las mismas que se utilizaron en los ensayos con gasoil.

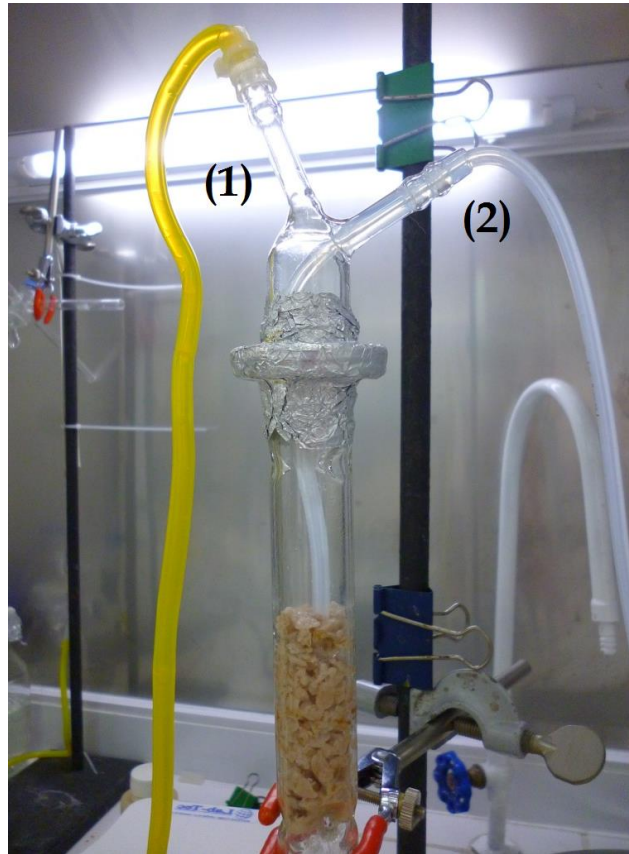


Figura III.4 – Fotografía del Bioreactor Experimental Continuo (BEC) con sistema modificado de oxigenación: (1) entrada del sustrato, (2) entrada lateral de aire.

III.2.10 - EVALUACIÓN DE LA RECUPERACIÓN DEL BIOCATALIZADOR

Con el fin de determinar la eficiencia en el proceso de biodesulfuración en el BEC, y utilizando el mismo soporte en reacciones sucesivas, se realizaron tres ensayos consecutivos en las condiciones óptimas del bioreactor (tamaño de partícula 3,35 mm – 5,6 mm, largo de lecho de 5 cm y flujo de 27 cm³/h) y utilizando gasoil como sustrato sulfurado. Para esto, y después del proceso de impregnación del biocatalizador sobre el soporte, se realizó un primer ensayo, recolectándose muestras al primer paso por el lecho catalítico, y una vez completados dos ciclos de reacción. Finalizado este primer ensayo, se procedió a lavar el sistema con una solución de suero fisiológico para eliminar los

restos de sustrato, y se realizó un proceso de reimpregnación de las bacterias sobre el mismo soporte utilizado en la reacción anterior, realizándose un segundo ensayo, en las mismas condiciones descritas anteriormente. Finalmente, se volvió a lavar el sistema, se reimpregnaron las bacterias sobre el mismo soporte y se realizó un tercer ensayo en las mismas condiciones anteriores.

III.2.11. – EVALUACION DEL EFECTO DE LA ADICIÓN DE UN SURFACTANTE

Con el propósito de aumentar la biodisponibilidad del sustrato sulfurado para las bacterias inmovilizadas, se realizó un ensayo para estudiar la influencia de la adición de un surfactante que actúe como coadyuvante en la desulfuración. Para este ensayo se utilizó como agente tensoactivo el Span 20, a una concentración del 0,5% p/v, el que fue adicionado directamente al gasoil.

III.2.12 - ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS

Para la determinación cuantitativa de la capacidad biodesulfuradora, las muestras de DBT fueron analizadas por Cromatografía Gaseosa en el Instituto de Química de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauma, y las muestras de gasoil, fueron analizadas en un Analizador de azufre en el Laboratorio de Catálisis del Departamento de Química de la Universidad de Santiago

La capacidad biodesulfuradora se expresó como gramos totales de azufre consumido por número de células ($\text{g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$).

IV - Resultados

IV.1 - CRECIMIENTO, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Mediante la técnica de siembra por agotamiento en estrías en placas Petri con medio Agar Nutritivo, incubadas a 30°C y 48 horas (Figura IV.1), fue posible obtener colonias, las que fueron aisladas y conservadas en glicerol estéril a -20°C. Estas cepas conservadas fueron las utilizadas en todos los procedimientos y los ensayos de actividad biocatalítica.

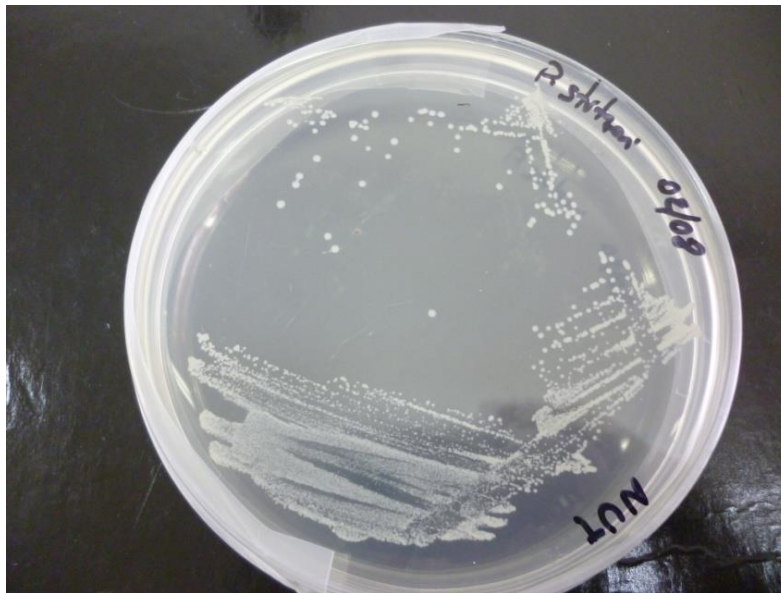


Figura IV.1 – Fotografía de *Pseudomonas stutzeri* crecida en una placa Petri con agar nutritivo.

IV.2 - CURVA DE CRECIMIENTO DE *Pseudomonas stutzeri*

En la Figura IV.2, se observan los matraces con los cultivos a tiempo inicial cero (A) y luego de transcurridas 72 horas de incubación (B). En ellos se evidencia el crecimiento bacteriano, pues se observa el típico enturbiamiento de las soluciones después de incubadas. Con estas soluciones se realizaron las mediciones de Densidad óptica para la confección de la curva de crecimiento de *Pseudomonas stutzeri*.

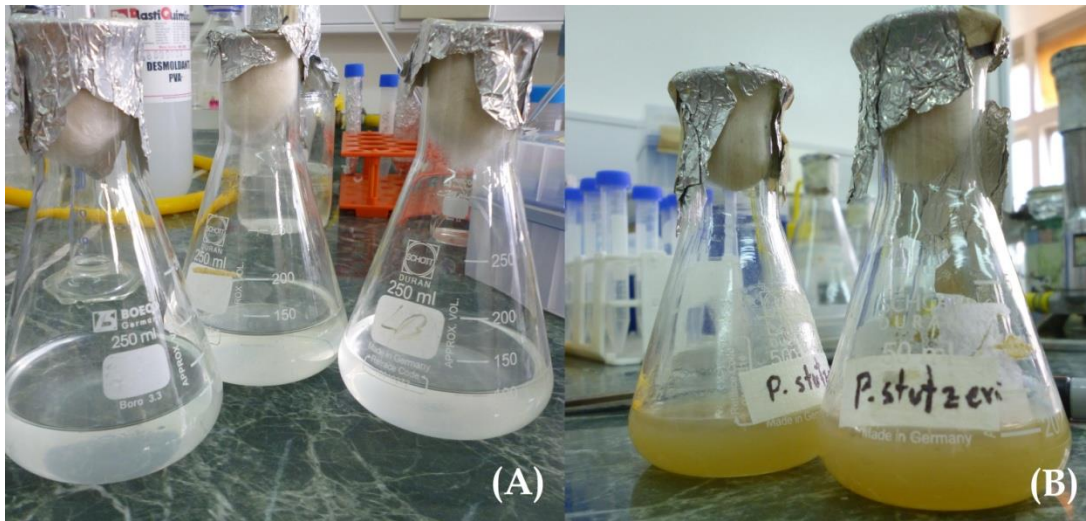


Figura IV.2 – Fotografía de *Pseudomonas stutzeri* crecida en una placa petri con agar nutritivo, a tiempo cero (A) y transcurridas 72 horas de incubación (B).

En la Figura IV.3 se observa el crecimiento bacteriano en función del tiempo de incubación, y los resultados indican que aproximadamente a las 72 horas se alcanza una fase estacionaria de crecimiento, en donde el número de microorganismos viables permanece constante, por lo que disminuye considerablemente la velocidad de crecimiento, produciéndose un equilibrio entre las células que crecen y las que mueren.

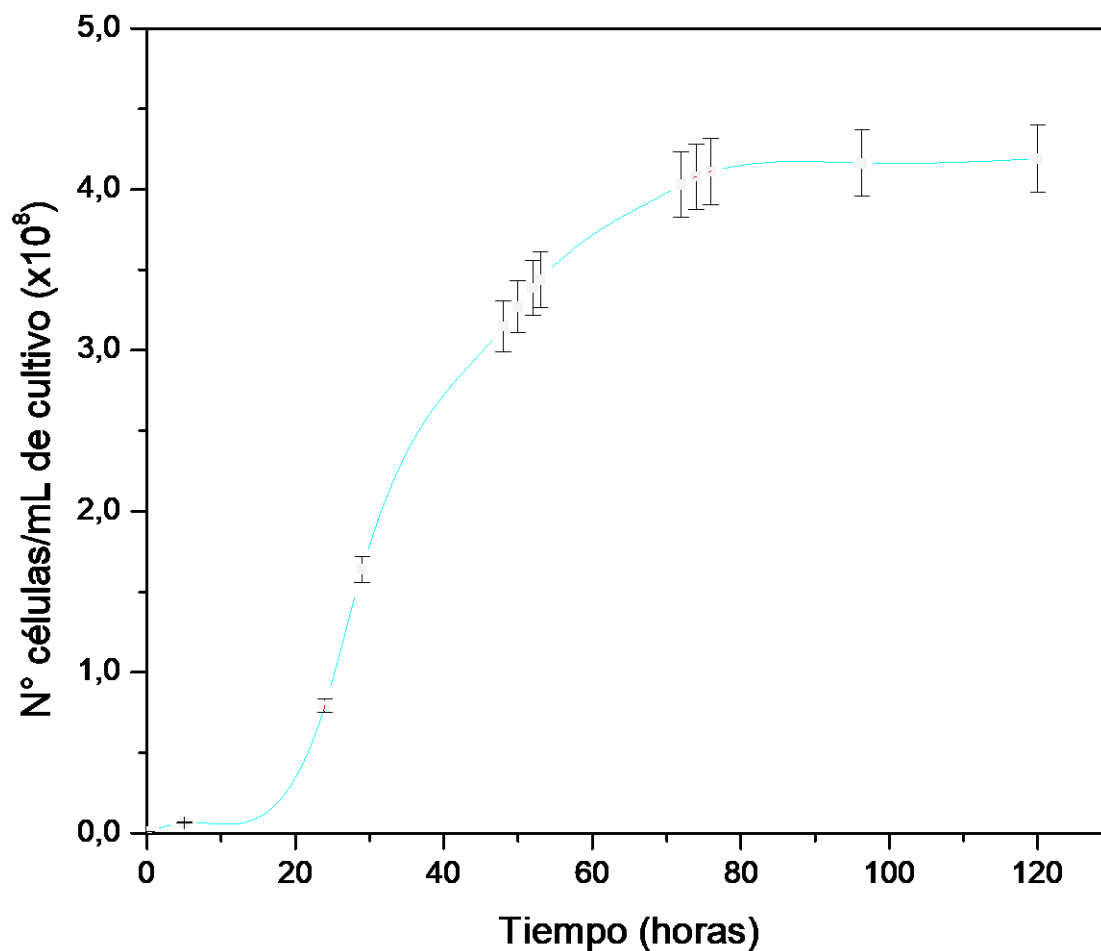


Figura IV.3 – Curva de crecimiento de *Pseudomonas stutzeri*, en medio LB, incubada por 72 horas, a 30°C y 200 rpm.

IV.3 - ADSORCIÓN DE *Pseudomonas stutzeri* SOBRE SEPIOLITA

Los resultados obtenidos en los ensayos de adsorción sobre la sepiolita en sistemas con los dos tamaños de partícula utilizados, se muestran en la Figura IV.4.

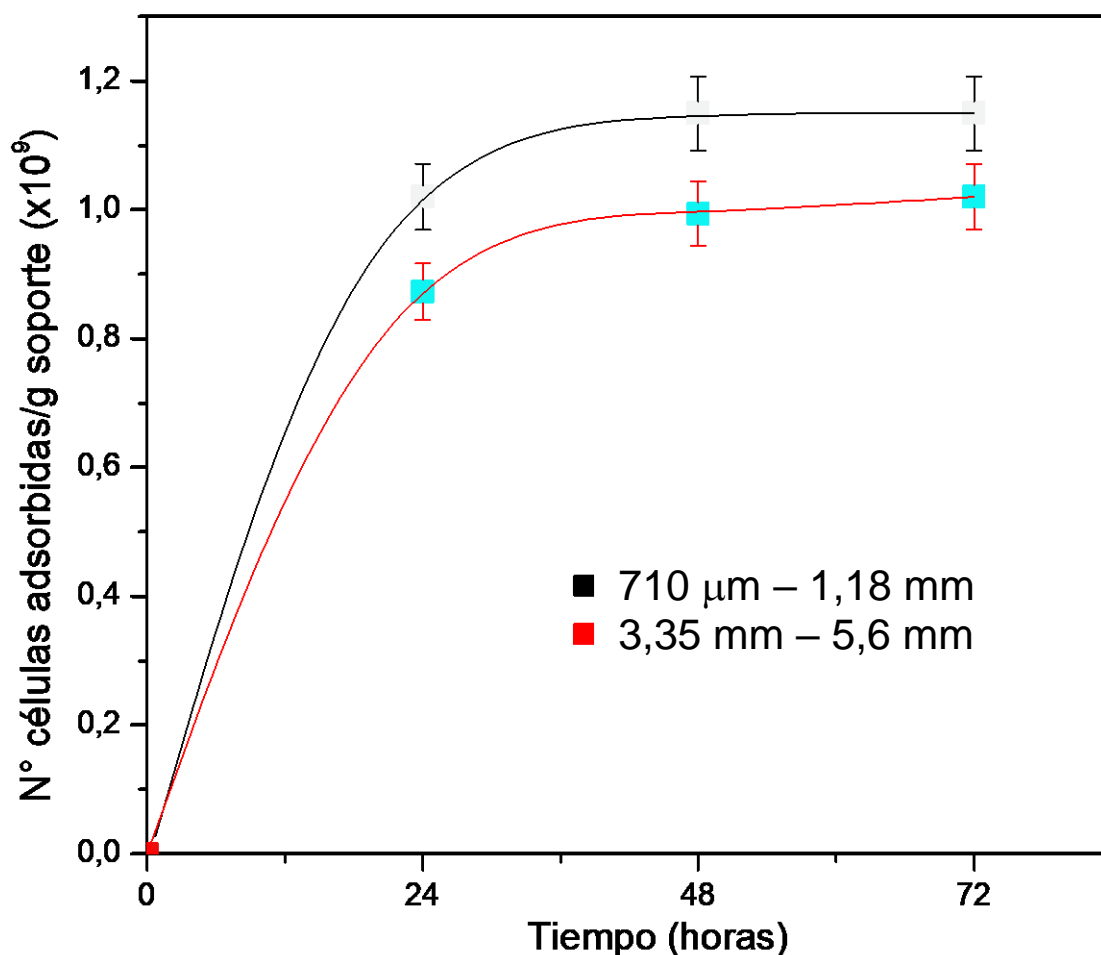


Figura IV.4 – Capacidad de adsorción de *Pseudomona stutzeri* sobre sepiolita sobre partículas de tamaño 710 μm – 1,18 mm y 3,35 mm – 5,6 mm.

Como se puede observar en la figura, al utilizar ambos tamaños de soporte se obtiene una saturación total de su superficie a después de 48 horas de adsorción. No obstante, al utilizar soportes con un tamaño de partícula de 710 μm – 1,18 mm existe una mayor adsorción, alcanzándose un máximo de $1,15 \times 10^9$ bacterias adsorbidas por gramo de soporte, en comparación a las partículas de tamaño de 3,35 mm – 5,6 mm, en donde la máxima cantidad adsorbida fue de $1,02 \times 10^9$ bacterias por gramo de soporte.

IV.4 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE DBT

IV.4.1 - INFLUENCIA DEL LARGO DE LECHO CATALÍTICO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA

La figura IV.5 muestra los resultados de actividad de BDS de DBT realizados en sistemas con diferentes largos de lecho catalítico (5, 10 y 15 cm), con un flujo de sustrato constante de 27 cm³/h y un tamaño de partículas de 3,35 mm – 5,6 mm.

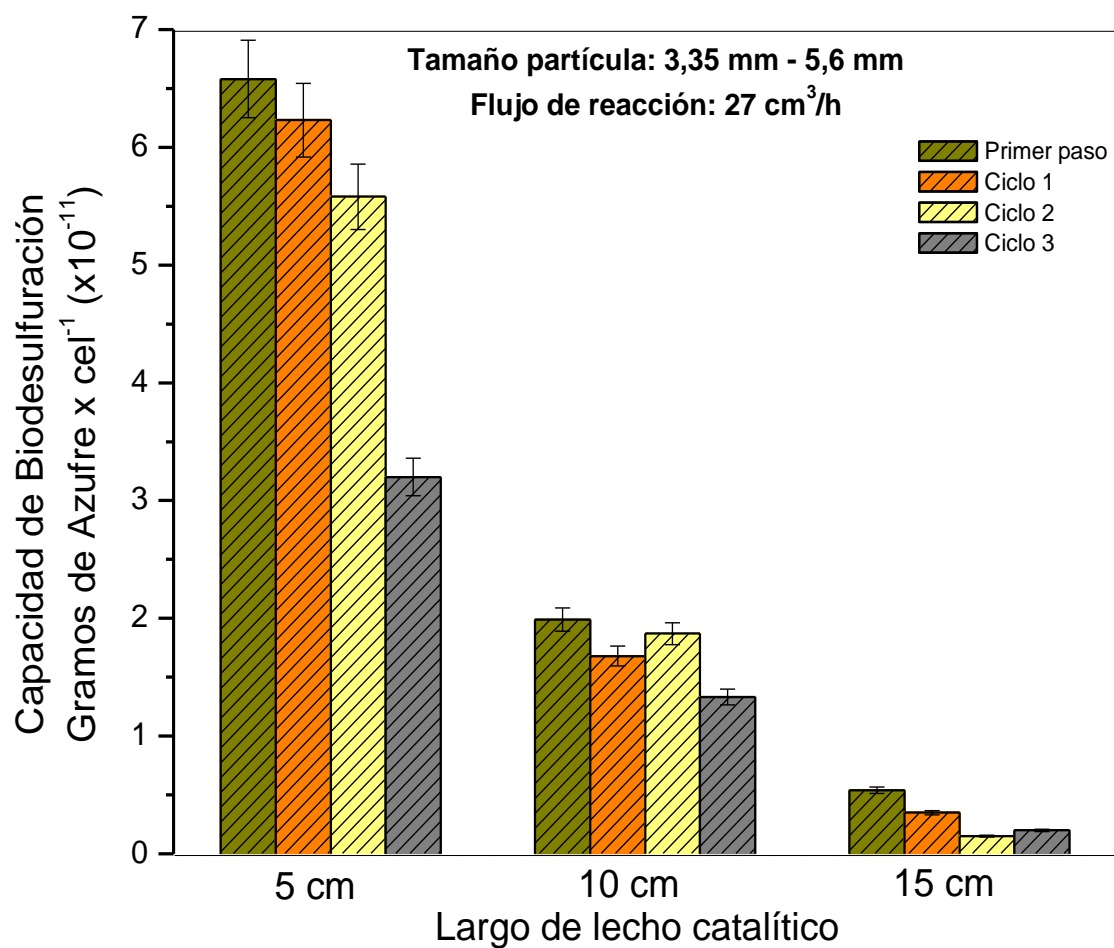


Figura IV.5 – Capacidad de BDS sobre DBT en función del largo de lecho catalítico, utilizando un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm y un flujo de reacción de 27 cm³/h.

Los valores de capacidad de biodesulfuración muestran que independiente del largo de lecho catalítico, se observa una mayor actividad cuando el DBT pasa inicialmente por el lecho, y posteriormente, una disminución de la actividad a medida que transcurren los ciclos de reacción. En este sentido, en un sistema con largo de lecho de 5 cm se observa un máximo de $6,58 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ a tiempos iniciales, mientras que en el ciclo 3 la capacidad de BDS disminuye a valores de $3,20 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$.

La comparación de actividad en los sistemas con diferentes largos de lecho, muestra que en todos los ciclos de reacción existe una mayor degradación de DBT cuando fue utilizado un largo de 5 cm. Mientras que por el contrario, a largos de lechos mayores (10 y 15 cm) se observó una menor actividad.

IV.4.2 - INFLUENCIA DEL FLUJO DE SUSTRATO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA

La influencia del flujo de reacción sobre la capacidad de BDS sobre DBT, cuando se comparan los sistemas con diferentes largos de lecho catalítico (5, 10 y 15 cm), utilizando ambos tamaños de partícula (3,35 mm – 5,6 mm y 710 μm – 1,18 mm) y dos flujos de sustrato ($27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y $54 \text{ cm}^3/\text{h}$) se muestran en las Figuras IV.6 y IV.7.

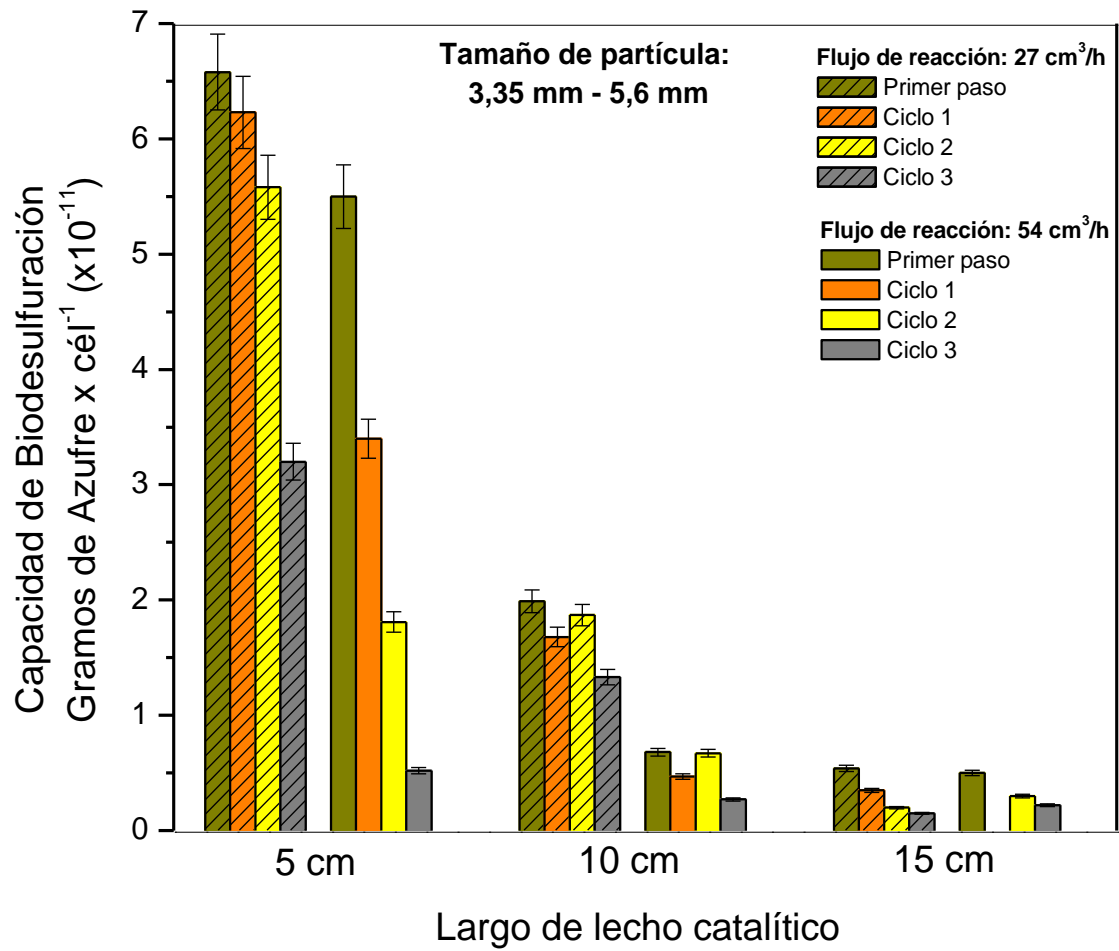


Figura IV.6 – Capacidad de BDS en función del largo de lecho catalítico, utilizando un sistema con ambos flujos de reacción y tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm.

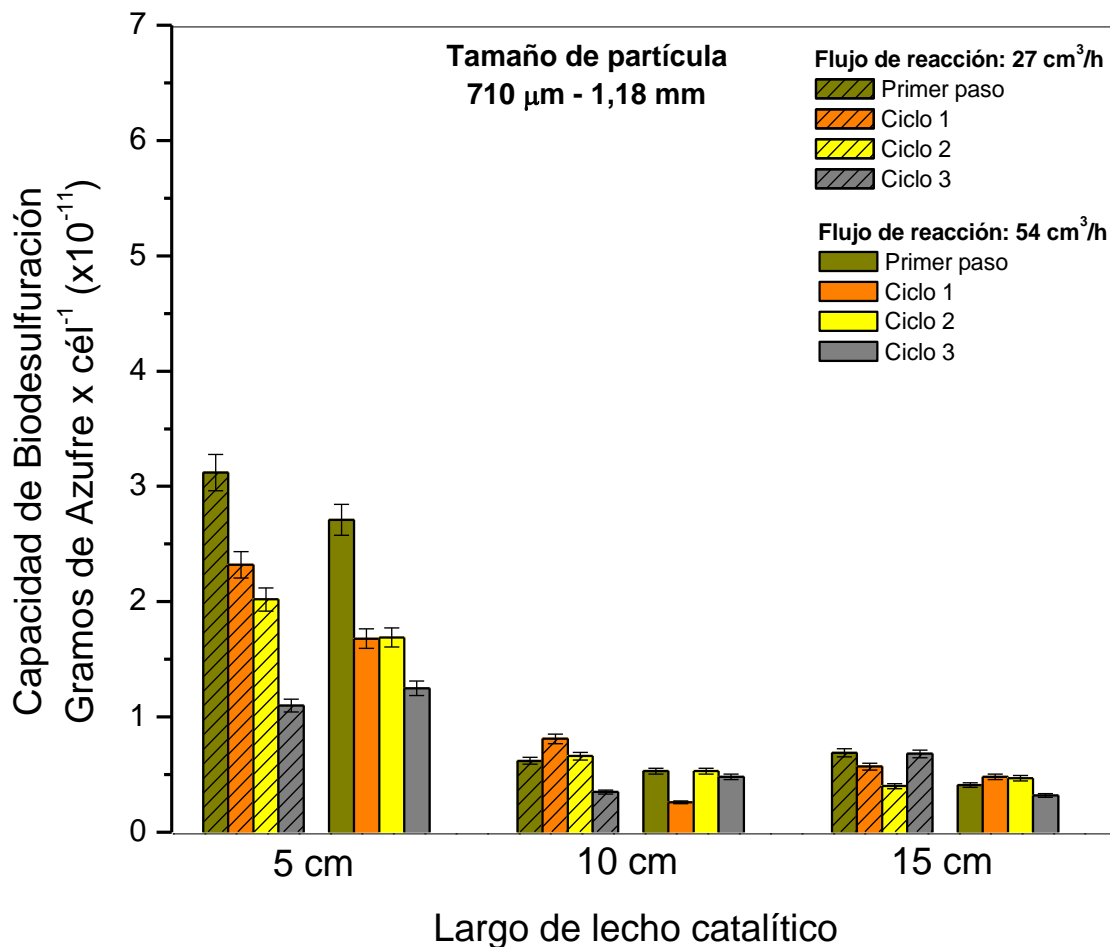


Figura IV.7 – Capacidad de BDS en función del largo de lecho catalítico, utilizando un sistema con ambos flujos de reacción y tamaño de partícula de 710 μm – 1,18 mm.

En general, los resultados de actividad obtenidos indican que la utilización de flujos menores de reacción (27cm³/h) produce una mayor degradación de DBT que en sistemas que utilizaron flujos mayores (54cm³/h). Al observar la Figura IV.6, esta diferencia se hace mayor cuando se utilizó un largo de lecho de 5 cm, donde a tiempos iniciales se observó un valor máximo de actividad de $6,58 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ a un flujo de 27 cm³/h, mientras que a flujos mayores el valor observado fue de $5,50 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$. A largos de lecho intermedios también se observó una diferencia significativa en los valores máximos de actividad ($1,99 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ a 27 cm³/h y $0,68 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ a 54 cm³/h), mientras

que en lechos con longitud de 15 cm la degradación del sustrato sulfurado fue de $0,55 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ a $27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y $0,50 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ a $54 \text{ cm}^3/\text{h}$.

Cuando ahora se determina la influencia del flujo de sustrato en sistemas que utilizaron tamaños de partículas de $710 \mu\text{m} - 1,18 \text{ mm}$ (Figura IV.7), se puede observar que sólo en el sistema que utilizó un largo de 5 cm se aprecian diferencias significativas entre los sistemas con distintos flujos (máximo actividad de $3,12 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ con flujo de $54 \text{ cm}^3/\text{h}$, y máximo de actividad de $2,71 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ con flujo de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$). En sistemas con largos de lechos mayores se puede observar que la degradación del DBT es independiente del flujo del sustrato utilizado.

IV.4.3 - INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTICULA SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA

Las figuras IV.8 y IV.9 muestran los resultados de actividad de BDS de DBT realizados en sistemas con diferentes largos de lecho catalítico (5, 10 y 15 cm), con flujos de sustrato de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y $54 \text{ cm}^3/\text{h}$ y tamaños de partícula de $3,35 \text{ mm} - 5,6 \text{ mm}$ y $710 \mu\text{m} - 1,18 \text{ mm}$.

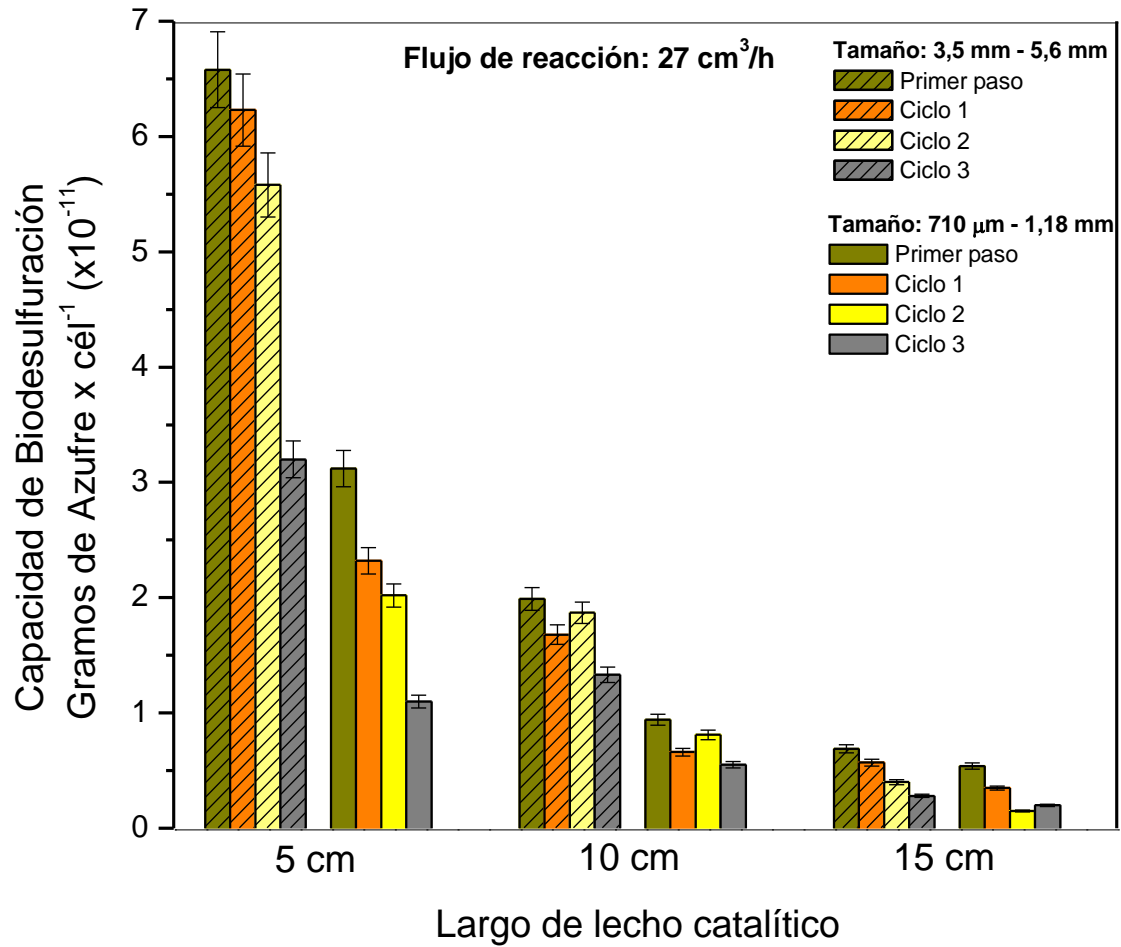


Figura IV.8 – Comparación de la capacidad de BDS en función del largo de lecho catalítico, en sistemas con ambos tamaños de partícula y un flujo de reacción de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$.

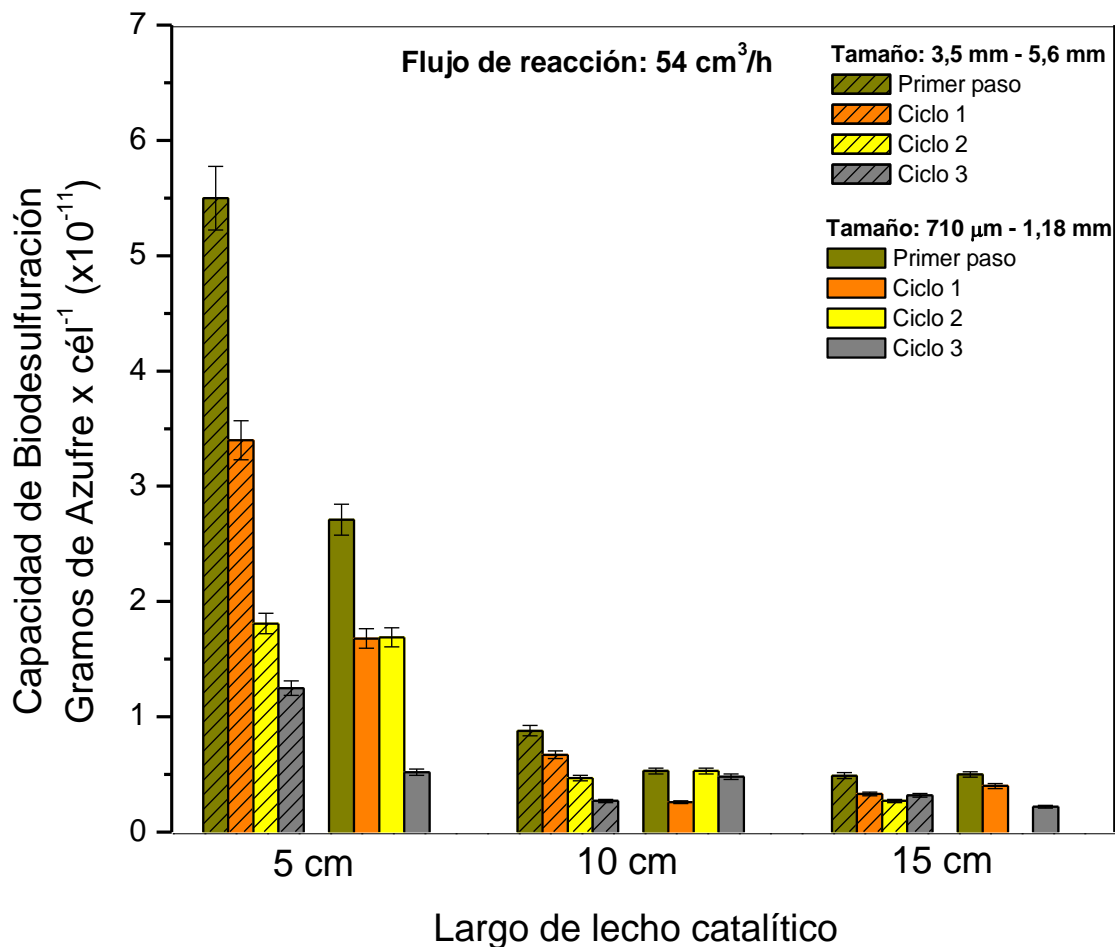


Figura IV.9 – Comparación de la capacidad de BDS en función del largo de lecho catalítico, en sistemas con ambos tamaños de partícula y un flujo de reacción de 54 cm³/h.

Al comparar los resultados en función del tamaño de partícula, se observa que en general al utilizar soportes de tamaño 3,35 mm – 5,6 mm, la actividad biodesulfuradora es mayor que al utilizar soportes de tamaño 710 μm – 1,18 mm. Las mayores diferencias fueron observadas en sistemas que utilizaron largos de lecho de 5 cm y flujo de sustrato de 27 cm³/h (Figura IV.8), donde el máximo de actividad observado a tiempos iniciales fue de $6,58 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{Cel}^{-1}$ para tamaños grandes de soporte, mientras que para partículas de tamaño menor el valor máximo fue de $3,12 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{Cel}^{-1}$. Un comportamiento similar fue observado al trabajar con largos de lecho de 10 centímetros, donde los máximos de actividad fueron de $1,99 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{Cel}^{-1}$ a tamaños mayores y de $0,94 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{Cel}^{-1}$ para

soportes de menor tamaño. Sin embargo, cuando son comparados sistemas con diferentes tamaños de partículas a largos de lecho de 15 cm, se pudo observar que no existen diferencias significativas en los valores de actividad.

La influencia del tamaño de partículas sobre la actividad de BDS de DBT fue también determinada utilizando sistemas con flujos mayores de actividad (Figura IV.9). El análisis de los resultados demuestra que solo a largos de lecho de 5 centímetros fueron observadas diferencias significativas en sistemas con diferentes tamaños de partículas ($5,50 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ a tamaño de partícula mayor, y $2,71 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ con tamaños de soporte menor). Mientras que en sistemas con lechos mayores, los valores de actividad fueron similares entre los sistemas que utilizaron distintos valores de tamaños de partículas.

IV.5 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE UN GASOIL COMERCIAL

Para evaluar la actividad de BDS sobre un gasoil comercial, se utilizaron las condiciones del BEC que generaron una mayor degradación de DBT, las cuales fueron un tamaño de partícula de 3,35 mm - 5,6 mm y un flujo de sustrato de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$.

La Figura IV.10 muestra los resultados de actividad de BDS sobre gasoil, realizados en sistemas con diferentes largos de lecho catalítico (5, 10 y 15 cm), con un flujo de sustrato constante de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y un tamaño de partículas de 3,35 mm – 5,6 mm.

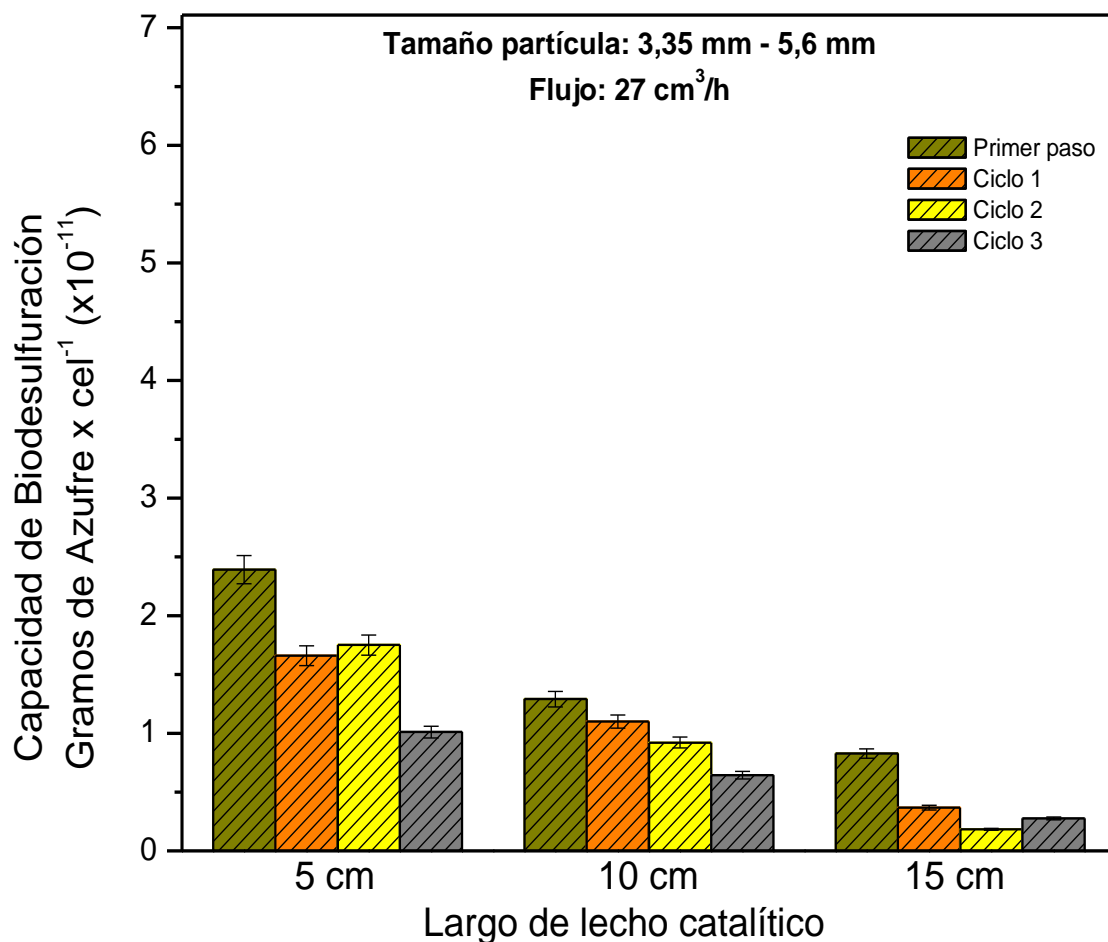


Figura IV.10 – Capacidad de BDS sobre gasoil en función del largo de lecho catalítico, utilizando un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm y un flujo de reacción de 27 cm³/h.

Como se observa en la Figura IV.10, los valores de actividad muestran una similar tendencia a la observada en la degradación del DBT, es decir, una máxima de actividad en las primeras etapas de la reacción y luego una disminución con el avance de los ciclos catalíticos. Asimismo, es posible observar una mayor actividad en el sistema que utiliza un lecho catalítico de 5 cm, con un máximo de actividad cercano a $2,39 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ en el paso inicial del sustrato por el lecho, y un valor de $0,83 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ en el sistema con el lecho más largo.

La comparación de la capacidad BDS de DBT y de gasoil en condiciones similares de operación, se observan en la Figura IV.11.

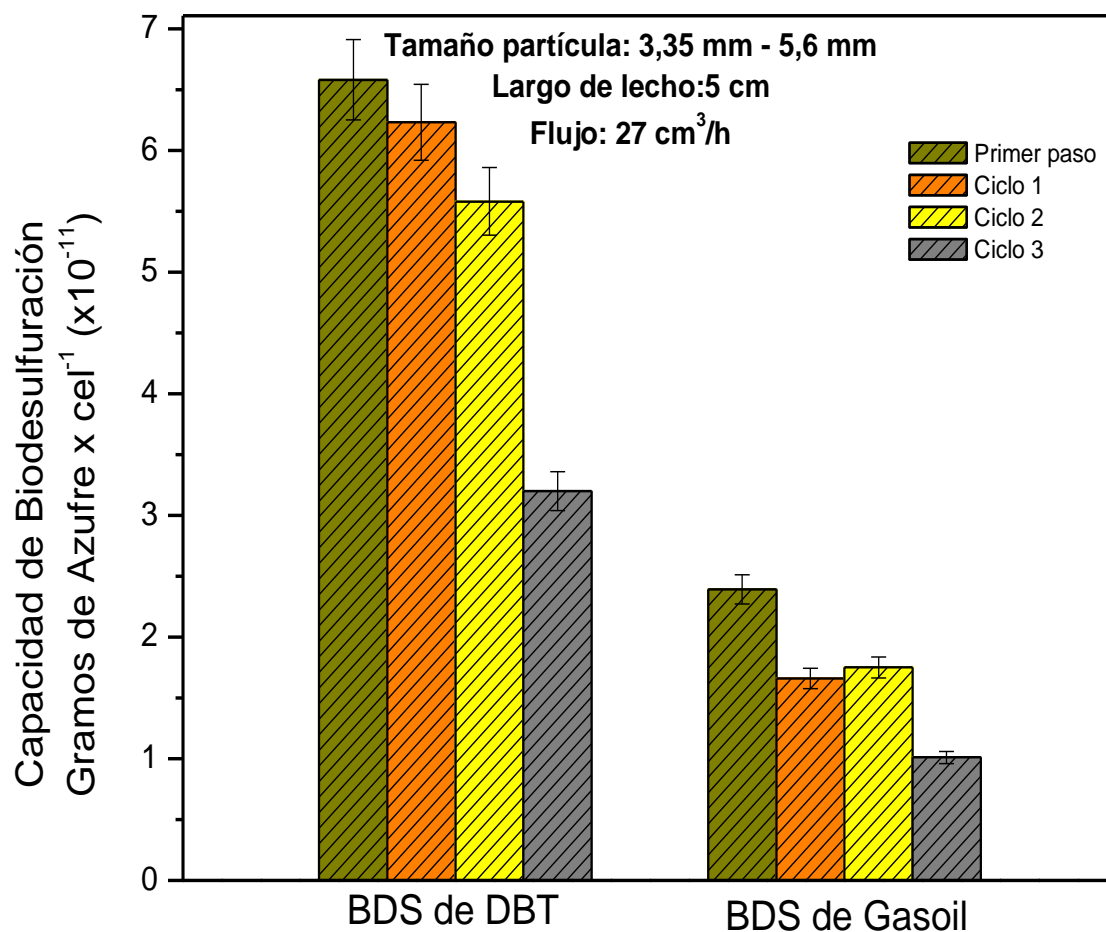


Figura IV.11 – Capacidad de BDS sobre y Gasoil, utilizando un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm, largo de lecho catalítico de 5 centímetros y flujo de reacción de 27 cm³/h.

En la figura anterior es posible apreciar una mayor degradación del DBT en todos los ciclos de reacción y largos de lechos estudiados. El valor máximo de actividad observado al utilizar DBT como sustrato sulfurado fue de $6,58 \times 10^{-13}$ g_{azufre}cel⁻¹, mientras que la actividad máxima al utilizar gasoil fue sólo de $2,39 \times 10^{-13}$ g_{azufre}cel⁻¹.

IV.6 - EVALUACIÓN DE LA INFLUENCIA DEL OXÍGENO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA

Los resultados de la capacidad de biodesulfuración en reacciones de BDS de gasoil en condiciones anaeróbicas, se muestran en la Figura IV.12.

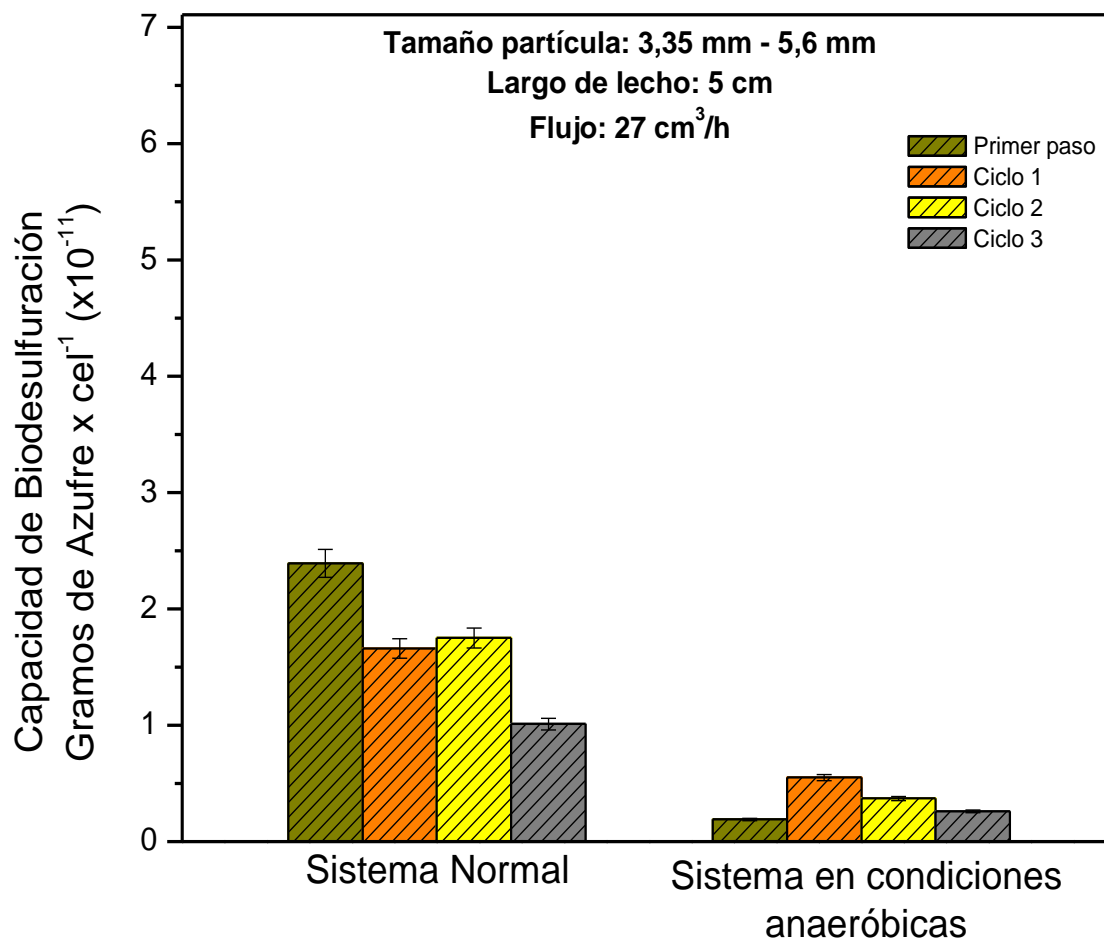


Figura IV.12 – Capacidad de BDS Gasoil en condiciones normales y en condiciones anaeróbicas, utilizando sistemas con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm, largo de lecho catalítico de 5 centímetros y flujo de reacción de 27 cm³/h.

Los resultados obtenidos muestran que al operar en un sistema que trabaja en condiciones de ausencia de oxígeno, la capacidad BDS disminuye en todos los ciclos de reacción. Como se observa en la figura, la máxima degradación de DBT en condiciones normales se alcanzó a tiempos iniciales, la cual obtuvo un valor de $2,39 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$,

mientras que en condiciones anaeróbicas, su mayor degradación fue de $0,55 \times 10^{-13}$ $\text{g}_{\text{azufre}} \text{cel}^{-1}$ después del primer ciclo de reacción

Una vez comprobada la influencia e importancia del oxígeno en las reacciones de BDS, se realizaron ensayos utilizando un sistema modificado con oxigenación directa al lecho catalítico. La Figura IV.13 muestra la comparación de los resultados de actividad entre un sistema con aireación normal y un sistema optimizado.

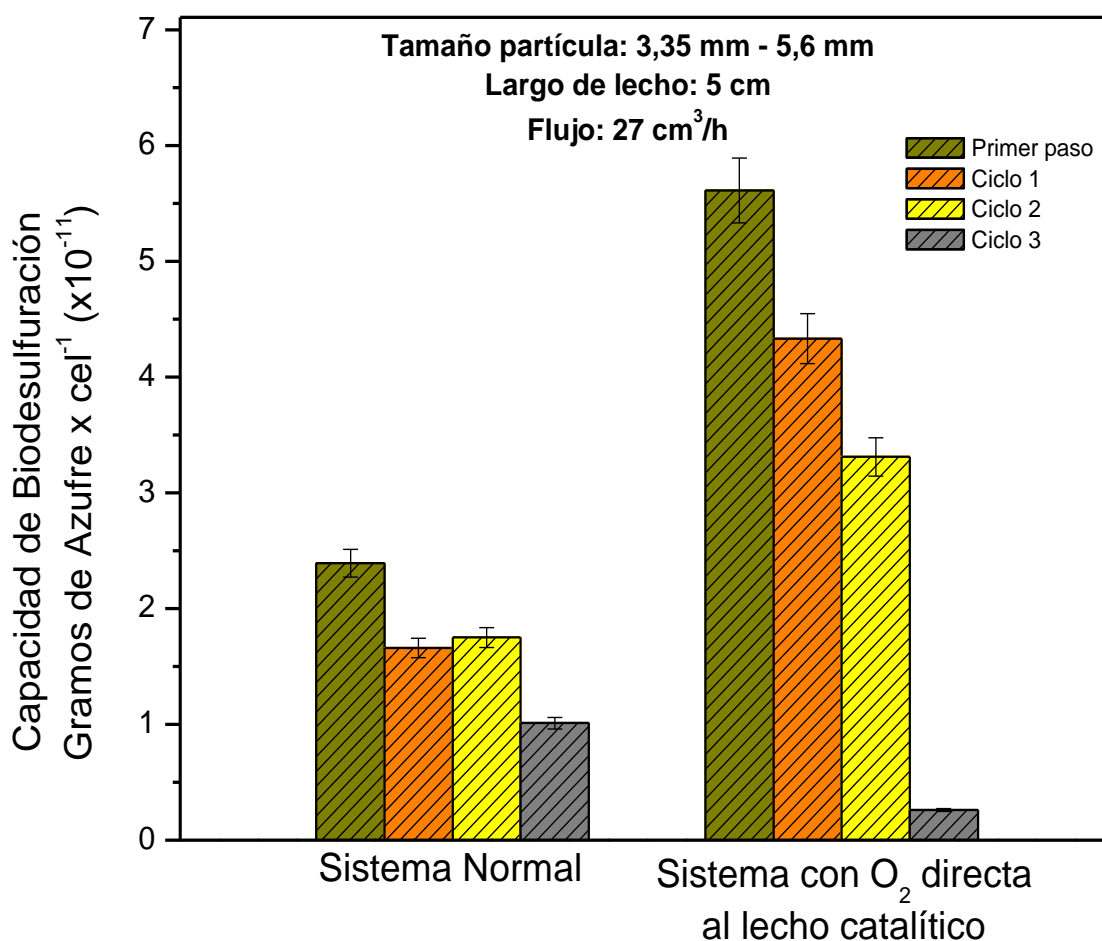


Figura IV.13 – Capacidad de BDS sobre gasoil utilizando un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm, largo de lecho catalítico de 5 cm, flujo de reacción de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y con oxigenación directa al lecho catalítico.

Los valores obtenidos de actividad de BDS de gasoil muestran un aumento considerable en la degradación del sustrato sulfurado en comparación a un sistema

normal. El máximo de actividad obtenido a largos de lecho de 5 cm y tiempos iniciales se incrementa desde un valor de $2,39 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ hasta un valor de $5,61 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ cuando se suministra directamente el oxígeno hacia al sistema. Este aumento en la actividad también fue observado en los demás ciclos de la reacción.

IV.7 - EVALUACION DE LA RECUPERACION DEL BIOCATALIZADOR

La evaluación de la recuperación del biocatalizador fue realizada utilizando gasoil como sustrato sulfurado y considerando las condiciones de trabajo que generaron una mayor degradación de DBT. Los resultados se muestran en la Figura IV.14.

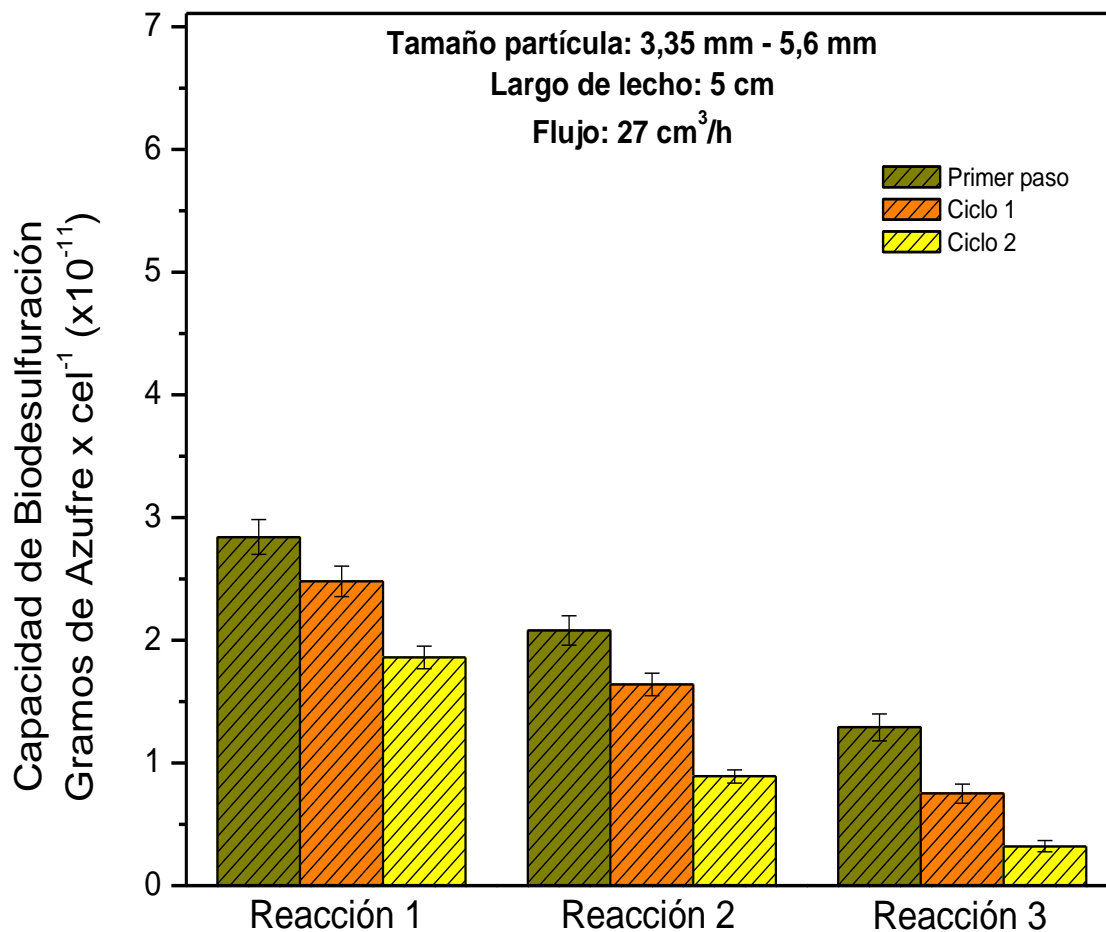


Figura IV.14 – Capacidad de BDS sobre gasoil en reacciones sucesivas, utilizando un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm, largo de lecho catalítico de 5 cm, flujo de reacción de 27 cm³/h.

Los resultados muestran una disminución en la degradación de gasoil cuando el biocatalizador fue recuperado. Al comparar los valores máximos de actividad, se puede observar que la capacidad de biodesulfuración disminuyó desde un valor de $2,84 \times 10^{-13}$ g_{azufre}cel⁻¹ en la primera reacción, a un valor de $2,08 \times 10^{-13}$ g_{azufre}cel⁻¹ en la segunda reacción, y finalmente a $1,29 \times 10^{-13}$ g_{azufre}cel⁻¹ en la reacción final. Este comportamiento se pudo observar en todos los ciclos de reacción.

IV.8 – EFECTO DE LA ADICIÓN DE UN SURFACTANTE

En la Figura IV.15 se muestra la comparación de los valores de actividad de BDS de gasoil entre un sistema normal y un sistema modificado que utiliza como surfactante Span 20.

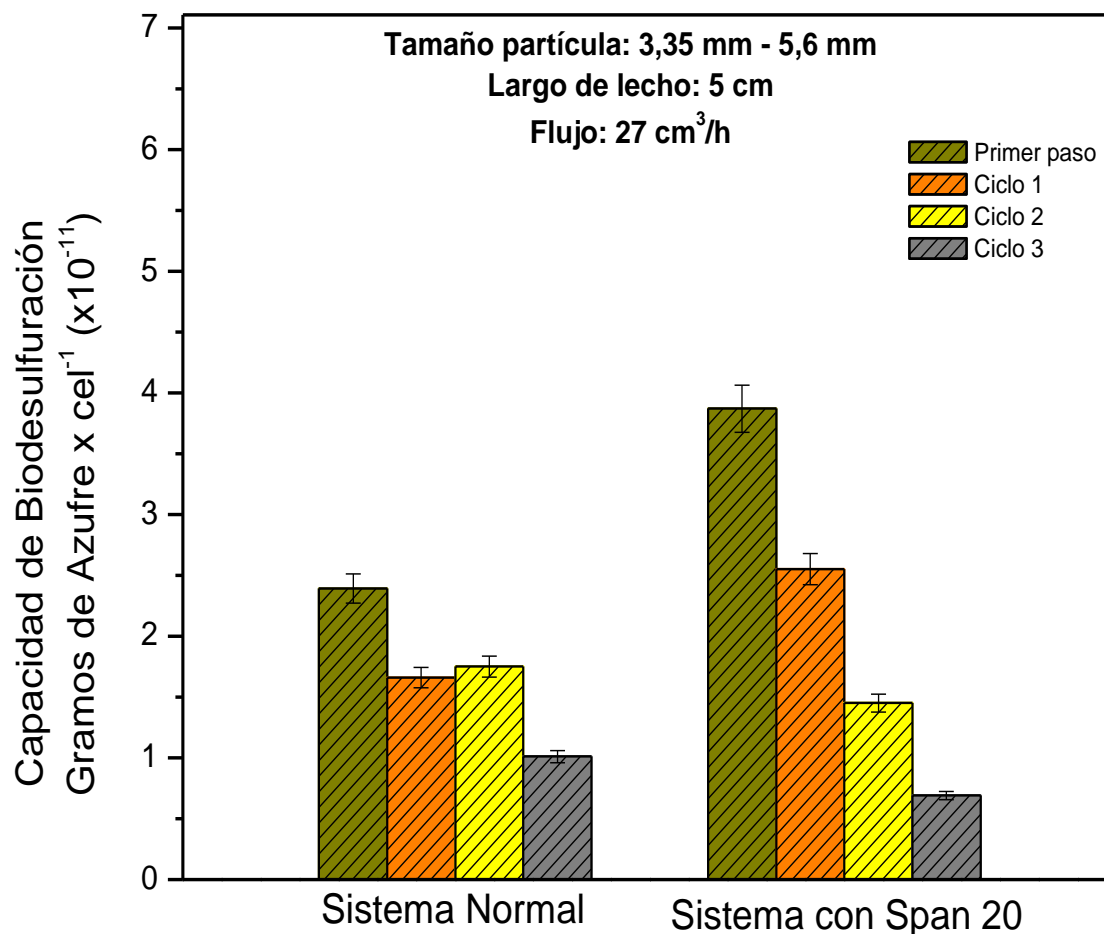


Figura IV.15 – Capacidad de BDS sobre gasoil utilizando un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm, largo de lecho catalítico de 5 cm, flujo de reacción de 27 cm³/h y con la adición de Span 20.

Al observar la figura anterior, se puede apreciar que la adición de un surfactante mejora el rendimiento en la actividad de biodesulfuración en comparación a un sistema normal, principalmente en el primer paso y en el ciclo 1 de la reacción. Los máximos obtenidos en estas condiciones muestran un aumento en la actividad desde un valor de

$2,39 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{cel}^{-1}$, a un valor de $3,87 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{cel}^{-1}$ en presencia de surfactante. En los demás ciclos de reacción se observa un menor efecto del agente tensoactivo sobre la actividad, generando inclusive una disminución de la actividad en ciclos mayores.

V - Discusión

V.1 - CRECIMIENTO, AISLAMIENTO Y CONSERVACIÓN DE LAS CEPAS

Para el crecimiento de las bacterias, el medio de cultivo fue enriquecido con DBT como única fuente de carbono y energía, el que además puede ser utilizado como fuente de azufre. En este sentido, el mecanismo de degradación de las bacterias está dado por mecanismos adaptativos específicos que considera la presencia de genes, enzimas y las rutas metabólicas para la asimilación de este tipo de hidrocarburos.

Para optimizar el crecimiento, el medio de cultivo fue suplementado con succinato y citrato como fuentes de energía y carbono, respectivamente. Esto permite la potenciación en el metabolismo oxidativo para la obtención de energía y un precursor de las moléculas orgánicas necesarias para la asimilación de los hidrocarburos derivados del petróleo.

Para el crecimiento en placa, se probó inicialmente con dos medios distintos, agar LB y agar nutritivo, y se observó un mejor desarrollo de las colonias en este último, por lo cual fue elegido como componente del medio de cultivo. Una vez obtenidas colonias puras, y con el propósito de evitar su contaminación en el proceso de conservación a largo plazo, estas se congelaron en suspensión en un líquido con glicerol, el que actúa como agente crioprotector, evitando que se produzcan cambios genotípicos.

V.2 - CURVA DE CRECIMIENTO DE *Pseudomona stutzeri*

Como se observa en la Figura IV.3, en donde se representa el crecimiento de *Pseudomona stutzeri* en función del tiempo de incubación, se observa una fase de latencia hasta aproximadamente las 20 horas. En este período no existe un incremento neto de masa, ya que las células se encuentran reorganizando su material genético y

sintetizando nuevos componentes, principalmente enzimas. A partir de las 20 horas de incubación, se observa una fase de crecimiento exponencial o logarítmica, en donde la velocidad de crecimiento es constante, es decir, los microorganismos se dividen y su número se duplica a intervalos regulares. Aproximadamente a las 72 horas, el cultivo alcanza una fase estacionaria o de reposo, en donde el número total de microorganismos viables permanece constante. Durante esta fase, la población es muy uniforme en cuanto a sus propiedades químicas y fisiológicas, no tienen la posibilidad de duplicarse, pero mantienen las herramientas metabólicas para llevar a cabo la eliminación del azufre presente en la molécula de DBT (Calzada, 2010).

En este trabajo se consideró llevar a cabo el proceso de BDS utilizando células en estado de reposo, debido a que en estas condiciones, las bacterias actúan como simples contenedores y protectores de enzimas y cofactores. Además, los microorganismos se encuentran protegidos por la membrana celular, evitando así su degradación por contacto por el ambiente extracelular y facilitando el transporte hacia el interior y el exterior de la célula de sustancias como el DBT (Del Águila, 2010).

Algunos autores han reportado las ventajas del proceso de biodesulfuración utilizando células en etapas de crecimiento, sobre todo por poder mantener la actividad celular. No obstante, se presentan inconvenientes como la menor velocidad del proceso y los bajos rendimientos obtenidos (Soleimani, 2007). Asimismo, puede ocurrir la inhibición del biocatalizador a causa de los productos finales de la reacción (Nekodzuka, 1997), por lo que se prefiere trabajar con células en etapa de reposo.

V.3 - ADSORCION DE *Pseudomona stutzeri* SOBRE SEPIOLITA

En general, al analizar los resultados de adsorción de *Pseudomona stutzeri* sobre sepiolita mostrados en la Figura IV.4, se puede observar que las bacterias tienen una alta capacidad de adsorción sobre el soporte, y que además presentan distintos grados de adsorción en función del tamaño de partícula (Dinamarca, 2010). Los valores de adsorción obtenidos en estos ensayos muestran que al utilizar un menor tamaño de partícula (710 μm - 1,18 mm) existe una mayor adsorción de las bacterias en todo el periodo ensayado. En este sentido, al utilizar tamaños de partículas menores, existe una mayor superficie de exposición, lo que se traduce en una mayor cantidad de sitios disponibles para la adsorción de los microorganismos.

No obstante, un mayor número de células adsorbidas en el soporte, no necesariamente se relaciona con una mayor metabolización del sustrato, y la menor actividad puede deberse a un mayor grado de desorción de las bacterias en los soportes de tamaño menor, debido quizá a una menor interacción entre las células y la superficie del soporte.

Al analizar la adsorción desde el punto de vista electrostático, observamos que en las condiciones de trabajo utilizadas (pH= 5,3), las bacterias y los soportes presentan una carga superficial negativa. En este sentido, si la interacción dependiese solamente de interacciones de tipo electrostáticas la adsorción se vería impedida. Sin embargo diversos estudios han demostrado que la adhesión de algunas bacterias en superficies minerales depende además de interacciones de tipo hidrófobas (Abu-Ashour, 2000; Sanjai, 2007; De Kerchove, 2005), lo que explicaría la adsorción observada en el sistema *Pseudomona stutzeri*/sepiolita.

V.4 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE DBT

Los resultados de actividad obtenidos en todos los sistemas biocatalíticos utilizados, mostraron que independiente de la variable operacional ensayada, se producía una disminución en la capacidad de degradación por las bacterias inmovilizadas.

Las razones de tal comportamiento pueden deberse a una disminución en la actividad metabólica de los microorganismos adsorbidos en el lecho del BEC, lo cual fue establecido en trabajos previos (Dinamarca, 2010). Asimismo, el agotamiento del sustrato sulfurado debido a su degradación por parte de las bacterias ocasionaría una disminución en la capacidad de biodesulfuración.

Por otro lado, dentro de las células se llevan a cabo una gran cantidad de procesos metabólicos, relacionados y regulados entre sí por diferentes mecanismos de control, y entre estos se encuentra la inhibición por producto final. La disminución en la capacidad BDS de *Pseudomonas stutzeri* puede ser explicada en parte por este tipo de fenómeno, en donde las enzimas que participan en esta reacción son inhibidas en forma competitiva por los productos de las reacciones que catalizan. Esta inhibición ocurre en las etapas finales de la reacción cuando hay una gran cantidad de producto y una baja concentración de sustrato, y generalmente en estos casos el producto final actúa inhibiendo a las enzimas que intervienen en los primeros pasos.

V.4.1 - INFLUENCIA DEL LARGO DEL LECHO CATALÍTICO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA

La influencia del largo del lecho catalítico sobre la actividad de BDS de DBT descrita en las Figura IV.5, demostró que cuando se utilizan sistemas con lechos catalíticos de menor longitud existe una mayor degradación del sustrato sulfurado. Las razones de tal comportamiento se atribuirían a una directa relación entre la cantidad de oxígeno disponible en el sistema biocatalítico y el largo del lecho del BEC. Esto explicaría que a lechos cortos la actividad de BDS se incrementa debido a una mayor concentración del oxígeno presente en el medio de reacción, el cual es necesario para que las bacterias metabolicen las moléculas sulfuradas. En el caso contrario, un largo mayor de lecho provocaría un déficit en la concentración de oxígeno, disminuyendo por lo tanto la capacidad de los microorganismos para metabolizar compuestos orgánicos sulfurados.

V.4.2 - INFLUENCIA DEL FLUJO DE SUSTRATO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA

Los resultados descritos en las Figuras IV.6 y IV.7, mostraron una mayor actividad de BDS de DBT en sistemas cuyo flujo de sustrato fue de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$, en todos los ciclos de reacción ensayados y en los diferentes largos de lecho estudiados. Esta mayor capacidad de metabolización de DBT en comparación a los sistemas con flujos mayores, puede ser explicada en base al tiempo de contacto entre el sustrato sulfurado y el biocatalizador. En este sentido, una disminución en el flujo del sustrato ocasiona un aumento en el tiempo de contacto, como puede ser apreciado en las figuras. Esto permitiría al sistema biocatalítico disponer de un mayor tiempo para que ocurra el traspaso de las moléculas sulfuradas,

desde la fase orgánica hacia la fase acuosa, donde las bacterias puedan realizar la degradación final del sustrato.

V.4.3 - INFLUENCIA DEL TAMAÑO DE PARTÍCULA SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA

Como se puede observar en la Figuras IV.8 y IV.9, los sistemas que utilizaron un tamaño de partícula mayor fueron más activos en la degradación de DBT, en todos los ciclos de reacción ensayados y en los diferentes largos de lecho estudiados.

Si bien es cierto en los ensayos de adsorción se observó una mayor capacidad de inmovilización en tamaños de partículas menores, los resultados de actividad demostraron que para un sistema continuo formado por un lecho fijo, se requieren partículas de mayor tamaño para obtener una capacidad biodesulfuradora óptima.

Además, por la disposición y el ordenamiento que adoptan las partículas de tamaño mayor en el BEC, se generan mayores espacios intraparticulares en el lecho biocatalítico, lo que genera una mayor difusión del oxígeno, favoreciendo la metabolización del sustrato sulfurado.

Cuando se determinó la influencia de los tamaños de partículas en los sistemas estudiados, se pudo apreciar diferencias significativas cuando se utilizaron flujos bajos del sustrato (Figura IV.8) en los distintos ciclos de reacción y largos de lecho estudiados. No obstante, cuando la comparación se realiza en sistemas con flujos más altos (Figura IV.9), se observa que sólo existen diferencias apreciables a largos de lechos menores. Esto se debería a una combinación de condiciones que no favorecen la actividad de BDS de DBT, las cuales serían la utilización de flujos altos y largos de lechos mayores. En este sentido,

la actividad sería constante e independiente de cualquier variable operacional. Esta explicación también puede ser aplicada cuando se determina la influencia del flujo de sustrato en sistemas con tamaños menores de partículas, donde la combinación de condiciones sería la utilización de partículas menores y largos de lechos mayores.

V.5 - ENSAYOS DE CAPACIDAD BIODESULFURADORA SOBRE UN GASOIL COMERCIAL

La utilización de muestras reales de combustibles derivados del petróleo en los ensayos de BDS, permite establecer las condiciones óptimas de operación que pueden ser proyectadas para una posible aplicación industrial. En este sentido, para los ensayos con gasoil fueron utilizadas las condiciones óptimas obtenidas en los ensayos con DBT.

Los resultados observados en la Figura IV.10 muestran de manera general un similar comportamiento al obtenido con DBT, es decir, una disminución en la capacidad de BDS a medida que avanzan los ciclos de la reacción y una mayor degradación a lechos menores. Esto permite establecer que el sistema biocatalítico continuo, compuesto por un lecho fijo formado por un soporte inorgánico, es eficaz en la degradación de muestras reales de combustibles.

Sin embargo, la comparación de los valores de actividad obtenidos en la degradación de DBT y los obtenidos con gasoil, demuestra un mayor grado de metabolización cuando se utilizan moléculas modelo. Estas diferencias se deberían a que el gasoil está compuesto por una mezcla de compuestos sulfurados, entre los cuales existen algunos que son refractarios a las reacciones de desulfuración.

V.6 - EVALUACION DE LA INFLUENCIA DEL OXIGENO SOBRE LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA

Los resultados de actividad de BDS obtenidos en las evaluaciones de los parámetros operacionales, han demostrado la importancia del oxígeno para el metabolismo de las bacterias biodesulfuradoras.

En este sentido, para determinar la importancia de la presencia del oxígeno en un reactor de lecho fijo, se realizó un ensayo en condiciones anaeróbicas, ingresando nitrógeno al sistema biocatalítico utilizado en la BDS de gasoil. Los resultados descritos en la Figura IV.12 demuestran que una disminución en la concentración de oxígeno ocasiona una menor metabolización de los sustratos sulfurados en comparación a un sistema con aireación normal. Esto se debería a que en el metabolismo aerobio de biodesulfuración el oxígeno actúa como aceptor de electrones, requiriéndose la presencia de oxígeno molecular y NADH (Del Águila, 2010).

Si bien es cierto en los ensayos experimentales se generó un medio anaeróbico de reacción, los valores de actividad obtenidos (Figura IV.12) demuestran que incluso en estas condiciones existió degradación. Esto se puede atribuir al oxígeno proveniente del agua queda adsorbido en el soporte hidrofílico en la etapa de impregnación in situ, el cual queda disponible para que las bacterias lo utilicen para su metabolismo.

En vista de la importancia de la presencia del oxígeno en el lecho biocatalítico se realizó una modificación en la alimentación de este compuesto al BEC. Para lo cual se diseñó un sistema de aireación directa al lecho mediante una manguera anexa (Figura III.3). Los resultados descritos en la Figura IV.13 demuestran que la actividad de BDS se incrementa al proporcionar una aireación directa al lecho, ya que evita que la cantidad de oxígeno sea una variable limitante externa que afecte al proceso biocatalítico

V.7 – EVALUACIÓN DE RECUPERACION DEL BIOCATALIZADOR

Una de las principales limitantes en reacciones de biodesulfuración es la recuperación de los biocatalizadores. En este sentido, en este trabajo se diseñó un ensayo para evaluar si en un sistema continuo compuesto por un lecho fijo, se podría recuperar la actividad de las bacterias inmovilizadas luego de la reacción catalítica. Tal ensayo fue realizado utilizando las condiciones óptimas operacionales obtenidas y usando gasoil como sustrato sulfurado.

Los resultados mostrados en la Figura IV.14 indican que luego de la reacción es posible recuperar el biocatalizador, mediante una nueva impregnación in situ. Este procedimiento sin embargo, no logra recuperar la actividad metabólica inicial de las bacterias, ya que después de la segunda y tercera impregnación los valores máximos de actividad disminuyeron en un 27% y en un 55%, respectivamente. Esto podría deberse a la permanencia en el lecho catalítico de bacterias no activas luego de la nueva impregnación, las que disminuye los sitios de adsorción disponibles en el soporte, disminuyendo por ende la cantidad de bacterias activas en el lecho recuperado.

Sin embargo, esta disminución en la actividad también puede deberse a una pérdida de la integridad soporte por el desgaste producido por el paso de la solución con bacterias al momento de la impregnación. Este desgaste del soporte, y la variación en la forma de las partículas, provoca que la adsorción de las bacterias también se vea alterada. Además, la pérdida en la estructura de la partícula ocasiona una deficiencia en la difusión del oxígeno a través del lecho catalítico, disminuyendo de esta manera la acción del biocatalizador.

V.8 – EFECTO DE LA ADICIÓN DE UN SURFACTANTE

La utilización de surfactantes químicos está muy extendido en procesos de bioremediación, y extensamente verificado y reportado en bibliografía. En biodesulfuración, sólo hay un estudio en el cual se utilizó un surfactante para procesos de BDS con *Rhodococcus erythropolis* (Feng, 2006), demostrando que la presencia de un agente tensoactivo en el medio de reacción aumenta la actividad. Estos compuestos mejoran los problemas de transferencia del sustrato desde la fase orgánica hasta el interior de la célula. Del mismo modo, los surfactantes aumentan la biodisponibilidad de los sustratos sulfurados por formación de micelas, mejorando el contacto con el microorganismo.

Los resultados de los ensayos realizados a sistemas en condiciones de operación óptimas, los cuales utilizaron gasoil como sustrato sulfurado, demuestran que la incorporación de un surfactante al medio de reacción aumenta la actividad de BDS. Esto supone que la incorporación de un agente tensoactivo puede mejorar la biodisponibilidad de las bacterias en un sistema continuo compuesto por un lecho fijo, lo cual sólo había sido estudiado en sistemas batch.

VII- Conclusiones

1. La utilización de Sepiolita como soporte permite asegurar la inmovilización de *Pseudomona Stutzeri*, cuya adsorción está determinada por el tamaño de las partículas.
2. La capacidad biodesulfuradora de *Pseudomona stutzeri* se incrementa a medida que disminuye el largo del lecho catalítico en el BEC, la cual está limitada por la biodisponibilidad del oxígeno en la reacción.
3. Cuando se utilizan velocidades de flujo de reacción menores, la degradación de los sustratos sulfurados aumenta, debido a un incremento en el tiempo de contacto entre el sistema biocatalítico y los sustratos, lo que favorece la actividad biodesulfuradora en el BEC.
4. La utilización de un lecho catalítico con partículas de soporte de tamaño mayor, incrementa la actividad biodesulfuradora en el BEC, debido a un aumento en la superficie de exposición entre las bacterias inmovilizadas y el sustrato sulfurado, y a una mayor difusión del oxígeno a través de los espacios intraparticulares en el lecho.
5. El aporte directo de oxígeno hacia el BEC es un factor fundamental en la degradación de compuestos sulfurados derivados del petróleo, y una mejora en la distribución del oxígeno hacia el sitio catalítico es la clave para la optimización del proceso de biodesulfuración.
6. La adición de surfactantes mejora la capacidad biodesulfuradora en el BEC, ya que mejoran la biodisponibilidad entre el sustrato sulfurado y el biocatalizador.
7. La utilización de un BEC con bacterias inmovilizadas in situ, se presenta como una alternativa innovadora y complementaria a los procesos tradicionales de HDS, lo que resultar beneficioso tanto para la protección del medio ambiente como para la salud de las personas.

VIII - Referencias

1. **Abu-Ashour, J., Lee, H.** (2000). "Transport of bacteria on sloping soil surfaces by runoff". *Environmental Toxicology*. 15:149-153.
2. **Aburto, J., Rojas-Avelizapa, N.G., Quintero-Ramírez, R.** "La biotecnología actual y su impacto en la industria de la refinación del petróleo". *Biotecnología Aplicada*. 20: 57-65.
3. **Alcántar, F., Cruz, M.J.** (2011). "Análisis de la distribución de azufre en productos, emisiones de SO_x y la recuperación del mismo en el sistema nacional de refinación". *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*. 27: 153-163.
4. **Alcon, A., Martín A.B., Santos, V.E., Gómez, E., García-Ochoa, F.** (2008). "Kinetic model for DBT desulphurization by resting whole cells of *Pseudomonas putida* CECT5279". *Biochemical Engineering Journal*. 39: 486-495.
5. **Alkan M., Demirbas Ö., Dogan M.** (2007). "Adsorption kinetics and thermodynamics of an anionic dye onto sepiolite". *Microporous and Mesoporous Materials*. 101: 388-396.
6. **Alkan M., Tekin G., Namli H.** (2005). "FTIR and zeta potential measurements of sepiolite treated with organosilanes". *Microporous and Mesoporous Materials*. 84, 75-83.
7. **Babich, I. V., Moulijn, J.A.** (2003). "Science and technology of novel processes for deep desulfurization of oil refinery streams: a review". *Fuel*. 82: 607-631.
8. **Bates, T. S., Lamb, B.K., Guenther, A., Stoiber, R.E., Dignon, J.** (1992). "Sulfur Emissions to the Atmosphere from Natural Sources". *Journal for Atmospheric Chemistry*. 14:315-337.
9. **Bhatia, S., Sharma, D.K.** (2006). "Emerging role of biodesulfurization of heavier crude oils and integration of biorefining with petroleum refineries in the future". *Petroleum Science and Technology*. 24: 1125-1159.
10. **Calzada, J.** (2010). "Desulfuración de dibenzotiofeno con *Pseudomonas putida* CECT5279: Formas de operación". Memoria para optar al grado de Doctor. Universidad Complutense de Madrid. 1-43.

11. **Caro, A., Boltes, K., Letón, P., García-Calvo, E.** (2007). "Dibenzothiophene biodesulfurization in resting cell conditions by aerobic bacteria". *Biochemical Engineering Journal*. 35: 191-197.
12. **Castillo, F., Roldán, M.D., Blasco, P., Huertas, M.J., Caballero, F.J., Moreno-Vivian, C., Martínez-Luque, M.** (2007). "Biotecnología ambiental". Madrid. Tébar, D.L.
13. **CEMDA.** (2013). "Recomendaciones de política pública para mejorar la calidad del aire en México. Una visión compartida". Centro Mexicano de Derecho Ambiental A.C. México, D.F.
14. **DEIS.** Departamento de Estadísticas en Información de Salud. <http://www.deis.cl> (página visitada el 23 de noviembre de 2013).
15. **De Kerchove, A. J., Elimelech, M.** (2005). "Relevance of Electrokinetic Theory for "Soft" Particles to Bacterial Cells: Implications for Bacterial Adhesion". *Langmuir*. 21: 6462-6472.
16. **Del Águila, R.G.** (2010). "Biodesulfuración de fracciones petrolíferas con *Pseudomonas putida* CECT5279: Optimización del proceso". Memoria para optar al grado de Doctor en Química". Universidad de Alcalá. 3-41.
17. **Dinamarca, M.A., Cereceda-Balic, F., Fadic X., Seeger M.** (2007). "Analysis of s-triazine-degrading microbial communities in soils using most-probable-number and tetrazolium-salt detection". *International Microbiology*. 10: 209-215.
18. **Dinamarca, M.A., Ibacache-Quiroga, C., Baeza, P., Galvez, S., Villarroel, M., Olivero, P.; Ojeda, J.** (2010). "Biodesulfurization of gas oil using inorganic supports biomodified with metabolically active cells immobilized by adsorption". *Bioresource Technology*. 101: 2375-2378.
19. **ENAP.** Empresa Nacional del Petróleo. <http://www.enap.cl> (página visitada el 13 de octubre de 2013).
20. **Espinoza, G.** (2011). "Evaluación de la actividad antibacteriana de extractos tensoactivos obtenidos biotecnológicamente". Tesis para optar al grado de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso. 95-96.

21. **Foght, J.M., Westlake, W.S.** (1990). "Expression of dibenzothiophene degradative genes in two *Pseudomonas species*". Canadian Journal of Microbiology. 36(10): 718-724.
22. **Galán, B., Díaz, E., Fernandez, A., Prieto, M.A., García, J.L., García-Calvo, E.** (2001). "Method for desulfurization of dibenzothiophene using a recombinant *Pseudomonas putida* strains as biocatalyst". International Patent WO 01/70996 A1.
23. **Gálvez, S.** (2008). "Estudio de la adsorción de bacterias sobre soportes inorgánicos, y su influencia sobre la actividad de biodesulfuración de dibenzotiofeno y gasoil". Tesis para optar al grado de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso. 8-18.
24. **Gill I., Ballesteros A.** (2000). "Bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): sol-gel encapsulation biologicals". Trends in Biotechnology. 18(7): 282- 296.
25. **Gómez, E. Santos, V.E., Alcón, A., Martían, A., B., García-Ochoa, F.** (2006). "Oxygen-Uptake and Mass Transfer Rates on the Growth of *Pseudomonas putida* CECT5279: Influence on Biodesulfurization (BDS) Capability". Energy Fuels. 20: 1565-1571.
26. **Gong, H., Linn, S.W., Terrell, S.** (2001). "Anti-Inflammatory and lung function effects of Montelukast in asthmatic volunteer exposed to Sulfur Dioxide" American college of physicians. 119: 402-408.
27. **Goubin S., Huaying Z., Jianmin X., Guo C., Wangliang L. And Huizhou L.** (2006). "Biodesulfurization of hydrodesulfurized diesel oil with *Pseudomonas delafieldii* R-8 from high density culture". Biochemical Engineering Journal. 27: 305-309.
28. **Gray K., Mrachko G., Squires C.** (2003). "Biodesulfurization of fossil fuels". Current opinion in Microbiology. 6: 229-235.
29. **Gupta, N., Roychoudhury, P. K., Deb, J.K.** (2005). "Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges". Applied Microbiology and Biotechnology. 66: 356-366.
30. **Henry, J.G., Heinke, G.W.** (1999). "Ingeniería Ambiental". México. Prentice Hall.

31. **Hirasawa, K., Ishii, Y., Kobayashi, M., Koizumi, K., Maruhashi, K.** (2001). "Improvement of desulfurization activity in *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 by genetic engineering". *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 65: 239-246.
32. **Honda, H., Sugiyama, H., Saito, I., Kobayashi, T.** (1998). "High cell density culture of *Rhodococcus rhodochrous* by pH-stat feeding and dibenzothiophene degradation". *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 85: 334- 338.
33. **Hwan, J., Keun, Y., Wook, H., Nam, H.** (2000). "Desulfurization of light gas oil in immobilized-cell system of *Gordona sp.* CYKS1 and *Nocardia sp.* CYKS2". *FEMS Microbiology letters*. 182: 309- 312.
34. **Ibacache, C.** (2008). "Aplicaciones biotecnológicas de los biosurfactantes: Evaluación de la utilización de biosurfactantes sobre desulfuración biocatalítica". Tesis para optar al grado de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso. 8-40.
35. **Lev-On, M., Cox, R. (ed).** "Azufre en el Combustible: Estrategias y opciones para el uso de combustibles y vehículos limpios". IPIECA. (2007). 16 pp.
36. **Isea, D., Herrera, L., Cárdenas, C., Prieto, A., Delgado, J., Briceño, B.** (2002). "Biodegradación del dibenzotiofeno por bacterias *Pseudomonas* aisladas de campo boscón. Universidad de Zulia. 8: 107-115.
37. **Kilbane II., J.J., Jackowski, K.** (1992). "Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8". *Biotechnology and Bioengineering*. 40(9): 1107-1114
38. **Kobayashi M., Onaka T., Ishii Y., Konishi J., Takaki M., Okada H., Ohta Y., Koizumi., Suzuki M.** (2000). "Desulfurization of alkylated forms of both dibenzothiophene and benzothiophene by a single bacterial strain". *FEMS microbiology Letters*. 187: 123-126.
39. **Kodama K., Umehara K., Shimizu K., Nakatanni S., Minoda Y., Yamada K.** (1973) "Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway". *Agricultural and Biological Chemistry*. 37: 45-50.

40. **Kodama K.** (1977). "Induction of dibenzothiophene oxidation by *Pseudomonas jianii*". *Agricultural and Biological Chemistry*. 41(7): 1193-1196.
41. **Kropp, K.G. Fredorak, P.M.** (1998). "A review of the occurrence, toxicity and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum". *Canadian Journal of Microbiology*. 44(7): 605-622.
42. **Labana, S., Pandey, G., Jain, R.K.** (2005). "Desulphurization of dibenzothiophene and diesel oils by bacteria". *Letters in Applied Microbiology*. 40: 159-163.
43. **Le Borge S., Quintero R.** (2003). "Biotechnological processes for the refining of petroleum". *Fuel Processing Technology*. 81: 155-169.
44. **Lee J., Han S., Hyeon T.** (2004). "Synthesis of new nanoporous carbon material using nanostructured silica material as templates". *Journal of Materials Chemistry*. 14: 478-486.
45. **Li, F., Feng, J., Meng, L., Zheng, Y., Luo, L., Ma, C.** (2005). "Microbial Desulfurization of Gasoline in a *Mycobacterium goodii* X7B Immobilized-Cell System". *Applied and Environmental Microbiology*. 71(1): 276-281.
46. **Li. W., Wang, M.D., Chen, H., Chen, J.M., Shi, Y.** (2006). "Biodesulfurization of dibenzothiophene by growing cells of *Gordonia sp.* in batch cultures". *Biotechnology letters*. 28:1175-1179.
47. **Ma, C., Feng, J.H., eng, Y.Y., Cai, X.F., Sun, B.P., Zhang, Z., Blankespoor, H.B., Xu, P.** (2006). "Methods for the preparation of a biodesulfurization biocatalyst using *Rhodococcus sp.*". *Chemosphere*. 65: 165-169.
48. **Maghsoudi, S., Kheiriloom, A., Vossoughi, M., Tanaka, E., Katoh Si.** (2000). "Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium sp.* strain P32C1". *Biochemical Engineering Journal*. 5: 11-16.
49. **McFarland, B.L., Boron, D.J., Deever, W., Meyer, J.A., Johnson, A.R., Atlas, R.M.** (1998). "Biocatalytic Sulfur Removal from Fuels: Applicability for Producing Low Sulfur Gasoline". *Critical Reviews in Microbiology*. 24(2): 99-147.

50. **Meng, Z.Q., Qin, G.H., Zhang, B., Bai, J.L.** (2004). "DNA damaging effects of sulfure dioxide derivates in cells from various organs in mice". *Mutagenesis*. 19: 465-468.
51. **Meng, Z.Q., Zhang, B.** (2003). "Oxidative damage of sulfur dioxide inhalation on brains and livers on mice". *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 13(1): 1-8.
52. **Monticello, D.J., Finnerty, W.R.** (1985). "Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species". *Applied and Environmental Microbiology*. 49(4): 756-760.
53. **Monticello, D.** (2000). "Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates". *Current Opinion in Biotechnology*. 11: 540-546.
54. **Naito, M., Kawamoto, T., Fujino, K., Kobayashi, M., Maruhashi, K., Tanaka, A.** (2001). "Long-term repeated biodesulfurization by immobilized *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 cells". *Applied Microbiology and Biotechnology*. 55: 374.
55. **Nekodzuka, S., Toshiaki, N., Nakallma-Kambe, T., Nobura, N., Lu, J., Nakahara, Y.** (1997). "Specific desulfurization of dibenzothiophene by *Mycobacterium sp* strain G3". *Biocatalysis and Biotransformation*. 15: 17-27
56. **Onaka, T., Konishi, J., Ishii, Y., Maruhashi, K.** (2001). "Desulfurization characteristic of thermophilic *Paenibacillus sp.* Strain A 11-2 against asymmetrically alkylated dibenzothiophenes". *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 92: 193- 196.
57. **Pakula, R., Freeman, A.** (1996). "A new continuous biofilm bioreactor for immobilized oil degrading filamentous fungi". *Biotechnology and Bioengineering*. 49: 20- 25.
58. **Reza, M., Bonakdarpour, B., Mehdi, M.** (2004). "Design and operational aspects of airlift bioreactors for petroleum biodesulfurization". *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 23: 206-214.
59. **Sanjai, J., Chorover, J.** (2007). "ATR-FTIR study of lipopolysaccharides at mineral surface". *Colloids and Surfaces B: Bionterfaces*. 62: 188-198.

60. **Setti, L., Lanzarini, G., Pifferi, P.** (1997). "Whole cell biocatalysis for an oil desulfurization process". *Fuel Processing Technology*. 52: 145-153.
61. **Shavandi, M., Sadeghizadeh, M., Zomorodipour, A., Khajek, K.** (2008). "Biodesulfurization of dibenzothiophene by recombinant *Gordonia alkanivorans* RIPI90A". *Bioresource Technology* 100: 475-479.
62. **Soleimani, M., Bassi, A., Margaritis, A.** (2007). "Biodesulfuration of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels". *Biotechnology Advances*. 25: 570-596.
63. **Van Hamme, J. D., Singh, A., Ward, O.P.** (2003). "Recent advances in petroleum microbiology". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4): 503-549.
64. **Vásquez, R., Torres, E., Valderrama, B., Le Borgne, S.** (2002). "Will biochemical the catalyst impact the petroleum refining industry?". *Energy Fuels*. 16: 1239-1250.
65. **Van Affender, M. Schacht, S. Klein, J., Trüper, H.G.** (1990). "Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium sp.* DO". *Archives of Microbiology*. 153: 324-328.
66. **Wang, M. D., Li, W., Shi, Y. Wang, D.H., Feng, H.** (2006). "Effects of surfactant on biodesulfurization by *Corynebacterium sp.* ZD-1 in the presence of organic phase". *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*. 7 (II): 37-375.
67. **Yu, L.Q., Meyer, T.A., Folsom, B.R.** (1998). "Oil/water/biocatalyst three phase separation process". US patent No. 5: 772,901.