



Facultad de Farmacia

Laboratorio de Biotecnología Microbiana

**“ESTUDIO DE LAS VARIABLES OPERACIONALES DE UN
BIOREACTOR EXPERIMENTAL CONTINUO FORMADO POR
RHODOCOCCLUS RHODOCHROUS INMOVILIZADA EN SEPIOLITA, QUE
INFLUENCIAN EN EL PROCESO DE BIODESULFURACION DE GASOIL”**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

Juan Carlos Aguirre Álvarez

Director de Tesis:

Dr. Juan Ricardo Ojeda Herrera

Universidad de Valparaíso

VALPARAISO, 2014

.... *A la memoria de Yolanda Montecinos y Francisco Álvarez....*

AGRADECIMIENTOS

Nada de esto hubiera sido posible sin la ayuda de Dios, que en todo momento se hizo presente y me dio fuerzas para continuar adelante con mis estudios hasta ahora. Agradecer a mis padres, Claudia y Juan Carlos que me han podido brindar la oportunidad de estudiar esta carrera, entregarme ánimo y fuerzas cuando las cosas no se veían bien y también por entregarme valores que me han hecho crecer como persona. Agradecer a mi hermana Lissette por su apoyo, a mis Abuelitos y familia en general, en especial a mi Tío Fernando que siempre me acogió y me brindo apoyo mientras estudiaba.

Por otra parte, agradecer al Laboratorio de Biotecnología Microbiana de la Universidad de Valparaíso por acogerme y hacer realidad éste proyecto, a mi director de tesis Dr. Juan Ojeda, por entregarme apoyo incondicional tanto académicamente como en el ámbito personal. Y al Proyecto FONDECYT 1110724 por permitir la realización de éste trabajo. Al profesor Dr. Alejandro Dinamarca por el conocimiento entregado y por permitir conocer más de la microbiología. Al Dr. Patricio Baeza y a la Dra. Mirza Villarroel por facilitar su equipamiento para realizar las mediciones y por la buena disposición. Agradecer a mis queridos compañeros de laboratorio por todos los buenos ratos y también su ayuda en todo. Gustavo, Lina, Claudia, Alejandro, Carlos, éxito en todos sus proyectos y sus planes de vida y sobre todo muchas gracias a Luis que muchas veces su ayuda fue fundamental para lograr en donde estamos y a Natalia, que más que una compañera, se convirtió mi amiga durante todos estos años de Universidad, te aprecio mucho y éxito en lo que emprendas.

Gracias totales a todos mis amigos de Universidad, los quiero mucho: Oveja, Mauricio, Francisca, Rocío, David, Marcelo y muchos más que se me quedan en el tintero, pero los tengo siempre presente. Un agradecimiento muy especial a mi “segunda familia”: Alejandra, Catalina, Víctor y Carolina por estar ahí cuando lo necesité en todo ámbito, y espero algún día retribuir todo el cariño que me han entregado. Mención especial a Ricardo Guerrero, gracias por la paciencia para poder enseñarme y hacerme volver a creer que esto debía seguir adelante. A los profesores Luis Rojas y Leticia Luna por hacerme crecer como persona y como futuro profesional con sus consejos y retos. Espero estar a la altura de uds. con la humildad y profesionalismo que los caracteriza.

Finalmente agradecer a mis amigos Christian, Moisés, Andrés, Nicolle, Víctor, Sebastian y Javier por su apoyo durante estos años y agradecer a todas las personas que conocí en las prácticas en Cruz Verde y en el Lab. Clínico del Hospital Naval.

Índice

Resumen	V
Abstract	VII
Introducción	1
1.- <i>Generalidades</i>	2
2.- <i>Compuestos Sulfurados y su impacto en la Salud y el Ambiente</i>	5
3.- <i>Legislación</i>	8
4.- <i>Hidrodesulfuración (HDS)</i>	11
5.- <i>Biodesulfuración (BDS)</i>	12
6.- <i>Inmovilización de Bacterias y su utilidad en BDS</i>	16
7.- <i>Avances en el diseño de reactores de BDS</i>	18
Hipótesis y Objetivos	21
1.- Hipótesis	22
2.- Objetivos	23
2.1.- <i>Objetivo General</i>	23
2.2.- <i>Objetivos Específicos</i>	24
Materiales y Métodos	25
I.- MATERIALES	26
1.- <i>Equipos</i>	26
2.- <i>Materiales de Laboratorio</i>	27
3.- <i>Reactivos</i>	28
II.- METODOS.....	29
1.- <i>Obtención y Preparación de los Materiales</i>	29
2.- <i>Ensayos Con Bacterias Inmovilizadas "in situ"</i>	33
3.- <i>Determinación de los productos de BDS</i>	39

Resultados	42
1.- Curva de crecimiento de <i>Rhodococcus Rhodochrous</i>	43
2.- Adsorción de <i>Rhodochrous Rhodococcus</i> sobre Sepiolita.....	44
3.- Evaluación de la actividad metabólica de <i>Rhodococcus Rhodochrous</i> sobre Sepiolita	45
4.- Ensayos de capacidad desulfuradora en DBT	46
4.1 - Influencia del largo de lecho catalítico sobre la Capacidad Desulfuradora	46
4.2.- Influencia del Flujo de Reacción sobre la Capacidad Desulfuradora	47
4.3.- Influencia del Tamaño de Partícula en la Capacidad Desulfuradora	49
5.- Ensayos de capacidad desulfuradora en Gasoil	52
6.- Influencia del oxígeno en la Capacidad Desulfuradora de Gasoil	54
7.- Efecto de la adición de un surfactante en la BDS de Gasoil	55
8.- Reutilización del biocatalizador y su efecto en la BDS.	56
Discusiones	57
1.- Curva de crecimiento de <i>Rhodococcus Rhodochrous</i>	58
2.- Adsorción de <i>Rhodochrous Rhodococcus</i> sobre Sepiolita.....	60
3.- Evaluación de la actividad metabólica de <i>Rhodococcus Rhodochrous</i> sobre Sepiolita	61
4.- Ensayos de capacidad desulfuradora en dibenzotiofeno (DBT)	61
4.1- Influencia del largo de lecho catalítico sobre la capacidad Desulfuradora.....	62
4.2.- Influencia del Flujo de Reacción sobre la Capacidad Desulfuradora	63
4.3- Influencia del Tamaño de Partícula en la Capacidad Desulfuradora	63
5.- Ensayos de capacidad desulfuradora en Gasoil	64
6.- Influencia del oxígeno en la capacidad biodesulfuradora	65
7.- Efecto de la adición de un surfactante.....	66
8.- Reutilización del biocatalizador y su efecto en la BDS.	67
Conclusiones	68
Referencias Bibliográficas	71

Resumen

El aumento del uso de combustibles derivados del petróleo por el proceso de combustión, la liberación de óxidos de azufre a la biosfera, generando daños ambientales, estructurales y provoca serias complicaciones a la salud de la población. En este contexto, la biodesulfuración (BDS), un proceso biocatalítico desarrollado por microorganismos que remueven selectivamente los compuestos azufrados de las fracciones hidrocarbonadas, representa una alternativa complementaria a los procesos establecidos. Entre los procesos de BDS surge la inmovilización bacteriana por adsorción, la cual permite una mayor interacción entre las fases inmiscibles, mejorando la separación de los compuestos de reacción biodesulfurados y por ende, aumentando el costo-beneficio del proceso.

En este trabajo se estudian las variables operacionales de un sistema que opera en condiciones continuas, compuesto de un lecho formado por *Rhodococcus Rhodochrous* adsorbida sobre Sepiolita. Entre las variables estudiadas se encuentran, el largo del lecho biocatalítico, el flujo de alimentación del sustrato sulfurado y el tamaño de las partículas del soporte. Los resultados muestran que utilizando un largo de lecho de 5 cm se obtiene una mayor disponibilidad del oxígeno, mientras que al utilizar sistemas que operan con flujos de sustrato de 27 cm³/h y tamaño de partículas de 3,35 mm – 5,6 mm, se aumenta el tiempo de contacto y superficie de reacción, respectivamente. Tales condiciones permiten obtener una mayor degradación del sustrato sulfurado ($3,96 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{cel}^{-1}$). Las modificaciones al diseño del bioreactor, permitieron aumentar la actividad de BDS de gasoil, mediante un aumento en la incorporación del oxígeno y la utilización de agentes surfactantes.

La recuperación del biocatalizador permite establecer que la utilización de un bioreactor experimental formado por un lecho inmovilizado por bacterias, puede ser proyectado como un proceso innovador y complementario a los procesos convencionales de tratamiento establecidos

Abstract

The increase in the use of oil fuels generated by combustion the release to the biosphere of sulfur oxides that generate environmental and structural damage and produce serious complications to the health of the population. In this context , the biodesulfurization (BDS) developed by a biocatalytic process which selectively removes microorganisms sulfur compounds from hydrocarbon fractions is a complementary alternative to the established processes. The bacterial immobilization process, allow a greater interaction between the immiscible phases, improving the separation of compounds increasing the cost -effectiveness of the process.

In this work, the operating parameters of an Experimental Continuous Bioreactor, using *Rhodococcus Rhodochrous* immobilized on Sepiolite, for BDS of DBT and gasoil, were studied. Among the operation variables analyzed were the catalyst bed length, flow of sulfured substrate and the support particle size. The result showed that use a bed length of 5 cm was obtained a greater oxygen concentration, whereas to use systems operating to substrate flow at 27 cm³/h and particles size at 3,35 mm – 5,6 mm, increases the contact time and the reaction surface, respectively. These conditions allow obtained a greater degradation of sulfured substrates. The improvements in experimental design of bioreactor allow increases the BDS activity in $3,96 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{sulfur}}\text{cel}^{-1}$, through increases of the oxygen concentration and the use of surfactants.

The recovery of the biocatalyst allows suppose that use of experimental bioreactor formed for immobilized bacteria, can be used as an innovative and complementary alternative to conventional treatment processes

Introducción

1.- Generalidades

A nivel mundial, la fuente de energía más utilizada sigue siendo la proveniente de combustibles fósiles y sus subproductos (Gupta y col. 2005), a pesar de que en los últimos años se ha observado una disminución en la producción de energía debido al uso de otras fuentes (Nuclear, Eólica, etc.). Sin embargo, la tendencia mundial de usar los combustibles fósiles como fuente energética, sigue en aumento como se observa en la Figura 1 (International Energy Agency Office, 2011)

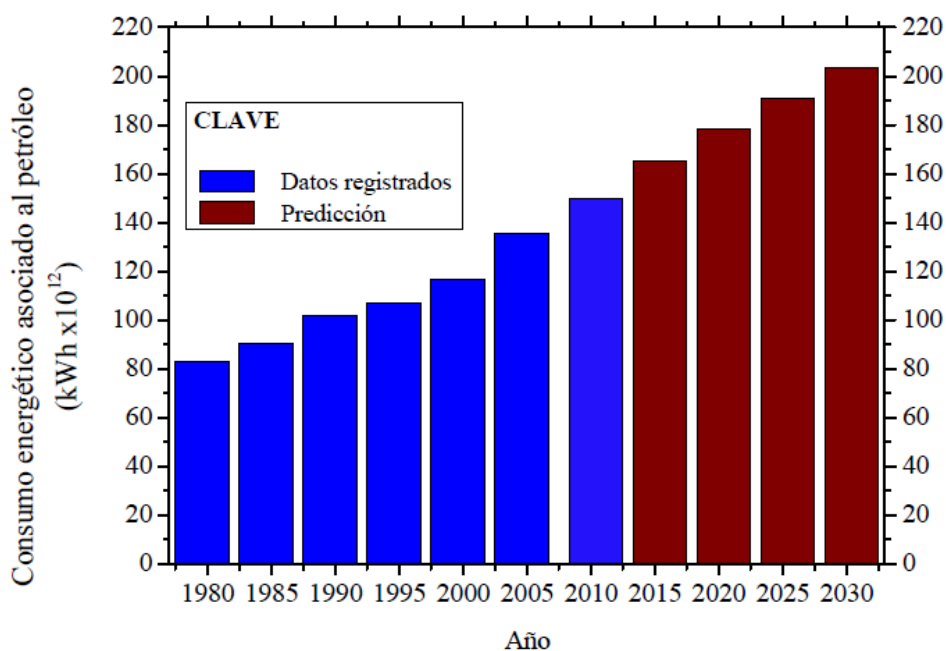


Figura 1 – Evolución y predicción de la demanda de energía procedente del petróleo hasta 2030.

En Chile los datos de consumo de energía provenientes de combustibles fósiles y otras fuentes (Cámara Chilena de la Construcción, 2013), coinciden con la tendencia mundial evidenciada (Figura 2).

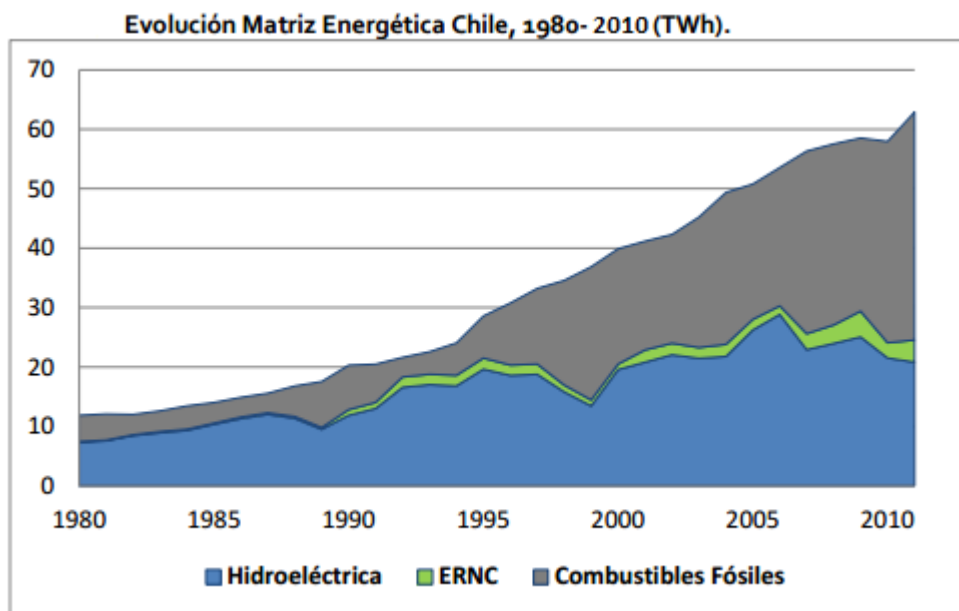


Figura 2 – Consumo de energía en Chile en TWh en 20 años, de acuerdo a distintas fuentes energéticas.

Debido a éstos antecedentes, las industrias petrolíferas se han visto obligadas a explotar capas más profundas de los yacimientos petroleros, obteniendo de esta forma, una mayor cantidad de compuestos sulfurados de alto peso molecular resistentes a los procesos de purificación convencionales (Bhatia y Sharma, 2010).

El contenido de azufre en el crudo varía en los diferentes yacimientos en el rango de 0.03% en peso a valores superiores al 8%, (Rall y col., 1972), llegando en algunos casos a un 30%, (Kropp y Fredorak, 1998).

Por otra parte, el 75% de los compuestos azufrados presentes en la biósfera, corresponden a la emisión de partículas con azufre por la actividad humana y el 90% del azufre presente en la forma de SO_2 es debido a la presencia de este elemento en el derivado de petróleo por combustión (Monticello y Finnerty, 1985)

Los constituyentes más importantes son compuestos orgánicos azufrados, pero también hay azufre inorgánico como azufre elemental, ácido sulfhídrico y piritas, (Tissot y col., 1984). De los más de 200 compuestos orgánicos que han sido identificados en el crudo se incluyen sulfuros, mercaptanos y tiofenos (Figura 3).

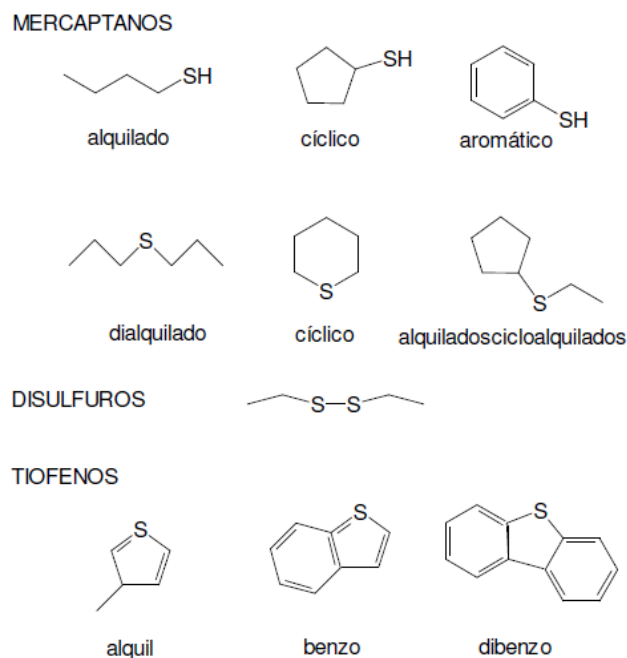


Figura 3 - Estructura química de los compuestos orgánicos azufrados presentes en el crudo.

La distribución y cantidad de tales compuestos orgánicos depende de los distintos yacimientos y de la madurez del petróleo, de forma que los más inmaduros químicamente son ricos en azufre y compuestos azufrados no tiofénicos, mientras que los maduros contienen una importante proporción de benzotiofenos y dibenzotiofenos alquilados, de elevado peso molecular. Debido a la presencia de los derivados benzo y dibenzotiofenos en todos los crudos, estos compuestos representan la mayor parte del azufre contenido en los mismos.

2.- Compuestos Sulfurados y su impacto en la Salud y el Ambiente

La combustión de compuestos en el petróleo, genera óxidos volátiles, siendo el más importante desde el punto de vista ambiental y sanitario el dióxido de azufre (SO_2). Este óxido es un reconocido contaminante atmosférico con una liberación anual estimada a la atmosfera de 2 toneladas de moles desde fuentes móviles e industrias (Soleimani y col., 2007; Doney y col. 2007).

Por otra parte, el SO_2 es un gas incoloro con un olor irritante característico. Este olor es perceptible a diferentes niveles, dependiendo de la sensibilidad individual, pero generalmente se percibe entre 0,3 y 1,4 ppm y es fácilmente notable a 3 ppm

Este gas, puede formar sulfatos que pueden ser transportados por el material particulado respirable (PM_{10}) debido a su alta higroscopicidad, formando ácido sulfúrico y sulfuroso. Estas partículas ácidas forman parte del material particulado fino ($\text{PM}_{2,5}$), los cuales pueden durar en la atmosfera alrededor de 3 a 5 días.

El tamaño del material particulado, favorece que el azufre ingrese al organismo por vía inhalatoria, llegando a las vías inferiores, debido a la capacidad que tiene de adsorberse sobre el material particulado generado. (World Bank Group, 1999). Los problemas que causa esta molécula, se deben a su disolución en los tractos respiratorios, generando ácido sulfuroso (H_2SO_3), el cual desencadena los siguientes eventos adversos (Liu y col., 2009; World Bank Group, 1999):

- Irritación del tracto respiratorio alto y bajo
- Aumento del estrés oxidativo
- Opacamiento de la Córnea
- Irritación Ocular por formación de H_2SO_4 sobre las mucosas húmedas
- Reducción de la función pulmonar

- Aumento incidencia de enfermedades respiratorias en personas susceptibles (Asmáticos, Niños, Ancianos)
- Efectos Clastogénicos y Genotóxicos *in vitro* en linfocitos humanos, induciendo aberraciones cromosomales, intercambios de cromátidas hermanas y micronúcleos (Meng y col., 2004)

Cabe destacar que las personas asmáticas son especialmente sensibles al SO₂ (Nemery, 2001) y pueden reaccionar ante concentraciones tan bajas como 0.2 a 0.5 ppm.

En la Tabla 1 se presentan los efectos sobre la salud por exposición respiratoria al dióxido de azufre.

Límite de Exposición (ppm)	Efectos Sobre La Salud
1-5	Umbral de respuesta respiratoria al ejercicio o respiración profunda en individuos sanos
3-5	Fácilmente detectable. Caída de la función respiratoria en reposo y resistencia a la corriente de aire
5	Aumento resistencia en individuos sanos
6	Irritación inmediata en ojos, nariz y garganta
10	Empeora la irritación en ojos, nariz y garganta
11-15	Umbral de toxicidad por exposición prolongada
+20	Parálisis o muerte después de la exposición prolongada
150	Máxima concentración que puede ser resistida durante algunos minutos por individuos sanos

Tabla 1 – Efectos del SO₂ en la salud humana de acuerdo a la exposición en ppm

En 2012 se realizó un proyecto llamado ESCALA, en donde se observó la relación entre la contaminación del aire y la mortalidad. Este proyecto fue evaluado en distintos países de Latinoamérica tomando como parámetro a los cambios porcentuales de riesgo (CPR), 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} . La mayor parte de los resultados de PM_{10} fueron positivos y estadísticamente significativos, en donde se muestra un aumento del riesgo de mortalidad con el aumento de las concentraciones en el ambiente (Romieu y col., 2012.).

En Santiago el cambio porcentual de riesgo (CPR) fue del 48%, lo que indica que la población puede morir por enfermedades de origen respiratorio, cardíaco y cerebrovascular. Cabe destacar la presencia en el último tiempo de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), en donde se observó mayor riesgo de padecerla en la ciudad de Santiago.

Por otra parte, se estudió el efecto de las concentraciones ambientales de PM_{10} en la mortalidad infantil por causas respiratorias y las infecciones respiratorias bajas. Los resultados de los meta-análisis confirman la asociación positiva y estadísticamente significativa entre PM_{10} y las causas de mortalidad en donde se observa una CPR del 77%. (Romieu y col., 2012.).

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 EPOC (Romieu y col., 2012.).

Estos datos vienen a confirmar lo que se iba visualizando para el año 2010 (DEIS, 2010), en donde la tasa de mortalidad para enfermedades cardiovasculares fue de 27,73 por cada 100.000 habitantes y un 16,20 por cada 100.000 habitantes para las enfermedades respiratorias. Específicamente para la región de Valparaíso, estas tasas corresponden a 30,42 para las enfermedades cardiovasculares y un 9,53 para las enfermedades respiratorias (DEIS, 2010).

Por otra parte, en condiciones húmedas, el SO_2 forma ácido sulfuroso en la atmósfera, generando lluvia ácida o neblinas con bajo pH, lo que causa un deterioro ambiental por acidificación de la superficie terrestre y oceánica, causando un daño en el ecosistema (Doney y col., 2007; Hames y col., 2002).

Desde un punto de vista práctico, los óxidos de azufre generan una disminución en la vida útil de convertidores catalíticos, debido al agotamiento de los catalizadores de metales nobles que permiten el proceso. (Gupta y col. 2005; Stanislaus y col. 2010).

En este sentido, se han establecido comisiones ambientales para regular la emisión de SO_2 , limitando la cantidad de azufre en los combustibles.

3.- Legislación

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 en cuanto al contenido máximo de azufre en los combustibles (Monticello, 2000; Soleimani y col., 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 en el año 2010 las emisiones de dióxido de azufre de este sector industrial alcanzaron un total cercano a las 400 mil toneladas, 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 del combustible a los requerimientos de las nuevas tecnologías vehiculares (Bhatia y Sharma, 2010). 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. (Tabla 2)

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)

Tabla 2 - Límites del azufre en la gasolina en estados Unidos y Europa

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 Diésel Ciudad, reduciendo el contenido de azufre en este combustible de 3000 a 300 ppm, y en julio de 2004, con la comercialización en la Región Metropolitana del Diésel 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 Diésel Grado B, similar al Diésel Ciudad Plus, cuyo contenido de azufre es de solo 50 ppm (ENAP, 2013).

El Decreto Supremo N° 60, del 5 de septiembre de 2011, 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 (Tabla 3).

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

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

Tabla 3 - Límites máximos de azufre permitidos en los combustibles (ENAP, 2013)

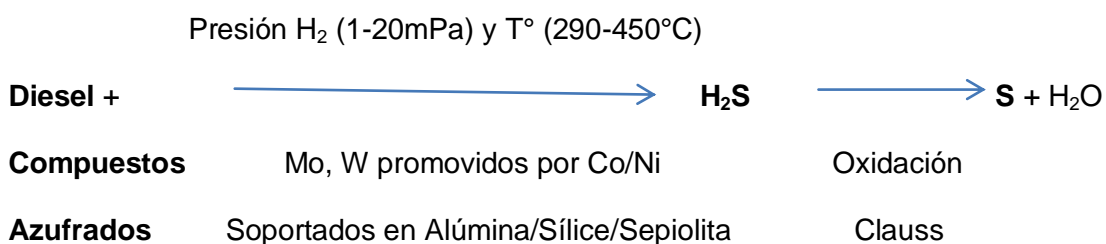
4.- Hidrodesulfuración (HDS)

Con el fin de mejorar la calidad del diésel, en las refinerías se utiliza un proceso denominado de hidrotratamiento, el cual se divide en dos grupos (Ojeda, 2004):

- 1) Hidroconversión: Proceso donde ocurren cambios en la masa y estructura de moléculas orgánicas.
- 2) Purificación: Proceso donde se produce la remoción de heteroátomos de azufre, oxígeno y nitrógeno.

El proceso de purificación que reviste mayor importancia en cuanto al volumen de muestras tratadas, se denomina Hidrodesulfuración (HDS). (Gálvez, 2008). En esta metodología el átomo de azufre del compuesto sulfurado (S^{-2}) es reducido a ácido sulfhídrico (H_2S) mediante la utilización de catalizadores metálicos como Molibdeno o Wolframio promovidos por Cobalto o Níquel, soportados sobre sólidos de alta área superficial (como alúmina, sílice o sepiolita), en condiciones de altas presiones de H_2 y altas temperaturas de reacción (Elsner y col., 2003; Shaver y col., 1996; Soleimani y col., 2007).

Este proceso de HDS se describe a continuación en el siguiente esquema (Elsner y col., 2003; Shaver y col., 1996; Soleimani y col., 2007):



Si bien este proceso es efectivo en fracciones destiladas superiores del petróleo, en estados intermedios y los denominados “fondos de barril” existen una mayor concentración de moléculas sulfuradas que resultan ser muy refractarias a los procesos normales de HDS (Soleimani y col., 2007; Stanislaus y col. 2010; Wang y col., 2006). Esto requiere utilizar altas condiciones de presión y temperatura para lograr una purificación del diésel que esté de acuerdo con los parámetros ambientales establecidos (Fletcher, 2000; PEMEX, 2008). Todo esto genera una disminución en la vida útil del catalizador y en la calidad del combustible. En este sentido, se deben buscar alternativas que puedan generar un mayor costo-beneficio a través de la utilización de nuevos procesos alternativos o complementarios a los establecidos. (Ojeda y col. 2003; Ojeda y col., 2005; Ojeda y col. 2008).

5.- Biodesulfuración (BDS)

La BDS surge como una tecnología innovadora, ya que utiliza microorganismos capaces de remover selectivamente el átomo de azufre de las moléculas organosulfuradas, manteniendo la estructura de esqueleto hidrocarbonado de éstas (Gray y col. 2003; Le Borgne y Quintero, 2003; Setti y col., 1997). Además, esta metodología no requiere condiciones extremas como en el caso de la HDS, sino que utiliza temperatura y presión ambientales, disminuyendo el costo operacional (Mohebbali y Ball, 2008, Monticello, 2000). Asimismo, como los productos de reacción no son tóxicos (Sulfato o Sulfito), no se utilizan técnicas adicionales en su eliminación.

Entre las rutas metabólicas que utilizan las bacterias encontramos las aerobias y las anaerobias, siendo las primeras las más utilizadas. Entre las rutas aerobias para degradar el DBT se distinguen tres tipos de metabolismos (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 ya que no elimina el azufre de la estructura inicial (ver Figura 4). 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 4, 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 5)

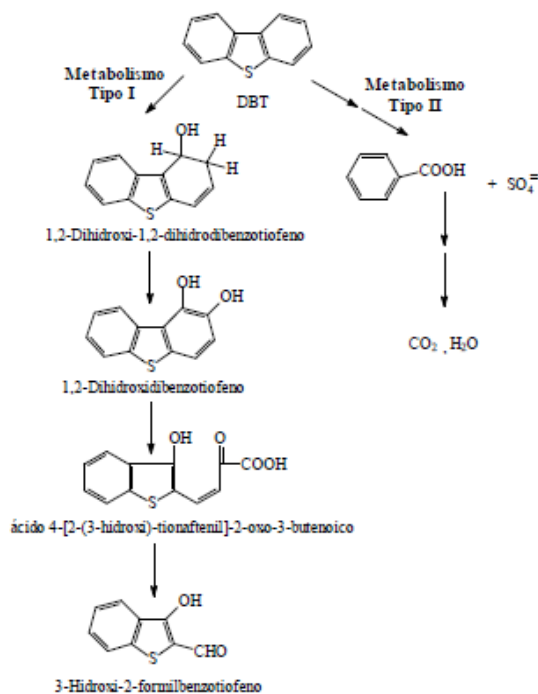


Figura 4 – Esquema de los metabolismos tipo I y II en las rutas anaerobias

El mecanismo propuesto para la BDS (Stanislaus y col. 2010) para *R. Rhodochrous* involucra 4 pasos enzimáticos consecutivos, en donde se requiere un medio aeróbico.

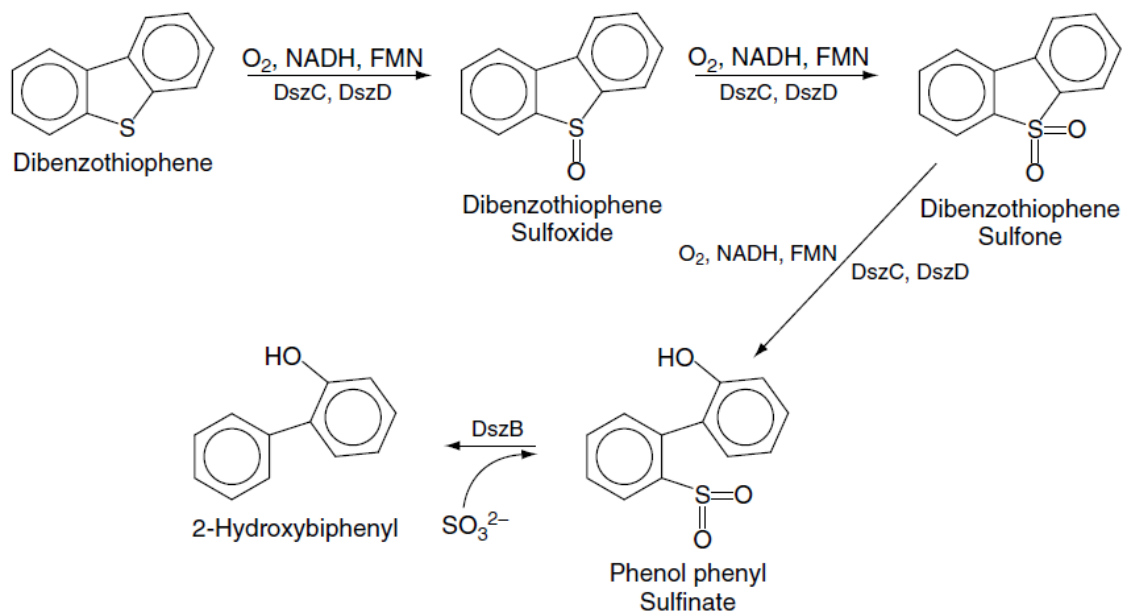


Figura 5 – Esquema de la ruta metabólica de degradación de DBT o Tipo III (4S)

Este mecanismo se plantea que los sulfatos generados son utilizados por la bacteria para sus requerimientos metabólicos. Mientras que el producto 2-HBP será excretado al medio y por su lipofilia vuelven a formar parte de la fase orgánica, manteniendo las propiedades de combustible (Moheballi y Ball, 2008, Monticello, 2000).

Las enzimas implicadas en este proceso son dos monooxigenasas citoplasmáticas (DszA y DszC), una flavin reductasa (DszD) y una desulfurinasa (DszB) (Shavandi et al, 2008).

Si bien en el proceso de BDS un microorganismo degrada de forma óptima los sustratos sulfurados, estos últimos se encuentran en una fase orgánica, mientras que las bacterias están en una fase acuosa (Ibacache, 2008), tal como se esquematiza en la Figura 6. En este sentido, para aumentar la biodisponibilidad de los sustratos sulfurados se deben buscar metodologías que optimicen el proceso de a través de mejoras en la BDS, como la inmovilización de la cepa bacteriana para asegurar una óptima desulfuración.

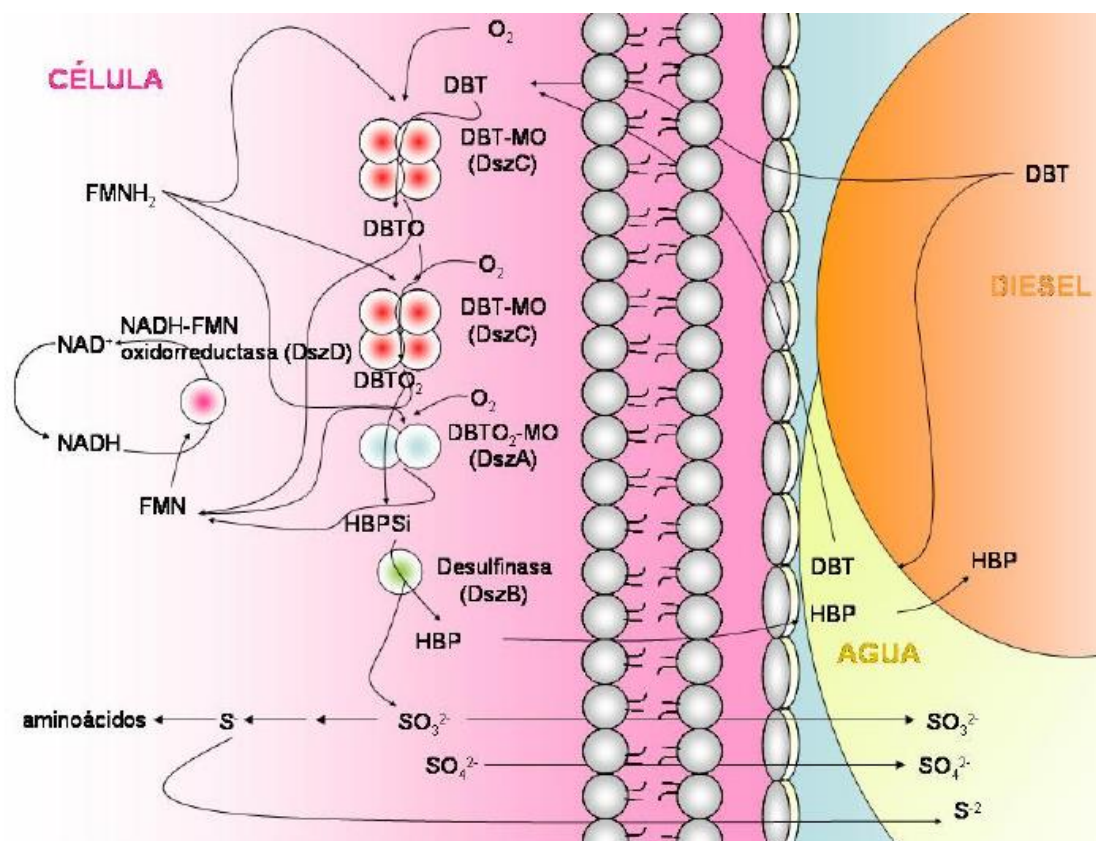


Figura 6 – Interacción de BDS de DBT y *R. Rhodochrous* desde el punto de vista metabólico (Del Aguila, 2010)

6.- Inmovilización de Bacterias y su utilidad en BDS

Una alternativa que se ha desarrollado para aumentar la biodisponibilidad de los sustratos sulfurados es utilizar bacterias inmovilizadas (Gill, 2000; Pakula, 1996). Esta metodología además permite una mayor estabilidad operacional, bajo riesgo de contaminación del medio de reacción, mayor tiempo de vida del biocatalizador, mayor interacción entre las fases inmiscibles y una mayor facilidad de separación de los productos de reacción. (Chang y col. 2000).

Naito y col. (2001) fueron los primeros en utilizar un método de encapsulamiento de bacterias en un material polimérico, en donde la difusión de los sustratos hacia las bacterias y la difusión de los productos hacia éstas ocurren a través de los poros formados en la matriz polimérica. La composición de esta matriz corresponde a alginatos, gelatinas o quitosanos.

Hou y col, (2005) observaron que al utilizar cepas de *Pseudomona Stutzeri* UP-1 encapsuladas en alginato de sodio en la BDS de DBT, aumentaba la sobrevivencia de las bacterias, generando una mayor estabilidad de la reacción. Por otra parte, Li y col. (2005) usando el mismo soporte y usando la cepa *Mycobacterium Goodii* X7B, lograron una disminución de la concentración de azufre de un 69% en una muestra de combustible.

A pesar de las mejoras producidas usando esta metodología, los principales inconvenientes resultan ser los problemas difusionales y el impedimento estérico, que se generan cuando las bacterias están encapsuladas en una matriz polimérica.

La inmovilización biocatalítica por adsorción sobre un material inorgánico elimina los problemas de transferencia de masa y estéricos descritos anteriormente. Los materiales utilizados como soportes deben ser inertes al ataque biológico, insolubles al medio de cultivo y no deben ser tóxicos para el microorganismo, el cual debe conservar su actividad metabólica (Dinamarca y col. 2010; Lee y col., 2004).

La Celita, un silicato tricálcico usado en la industria farmacéutica es uno de los pocos materiales usados en la BDS. Hwan J. en el año 2000, estudió la reacción de BDS de DBT y Gasoil en ciclos de 24 horas, por un proceso Batch, utilizando cepas de *Gordona sp.* y *Nocardia sp.* Impregnadas en este soporte.

Recientemente, Dinamarca y col. (2010) estudiaron el efecto de diversos soportes sobre la adsorción de *Pseudomona Stutzeri* y su influencia en la actividad de BDS sobre gasoil. En este trabajo se utilizaron soportes con distintas propiedades fisicoquímicas y estructurales los cuales fueron Alúmina, Sílice, Sepiolita y Titania. Esta investigación demostró que la adsorción del microorganismo en el soporte está determinada por fuerzas de tipo electrostáticas y físicas, las cuales son dependientes de su naturaleza y del pH del medio. También se demostró que una alta interacción entre la bacteria y el soporte permite una mayor biodisponibilidad de los sustratos orgánicos. Finalmente se concluyó que los sistemas que utilizaron sílice y sepiolita fueron los más activos en las condiciones de reacción evaluadas.

A pesar de los avances realizados en el campo de la BDS, aún existen varios problemas que no han sido solucionados, los que han limitado su aplicación a nivel industrial. Entre ellos se encuentran la separación de los productos de reacción y el catalizador y el aumento de la biodisponibilidad de los sustratos sulfurados (Wayan y col., 2013)

7.- Avances en el diseño de reactores de BDS

Uno de los principales puntos de interés en el desarrollo y optimización de procesos de BDS de petróleo es el diseño de reactores (Lange E., 1999; Monticello D., 2000). La primera planta piloto fue reportada por Energy Biosystems Corp. (EBC), en la que se trabajó con cepas de *Rhodococcus Erythropolis* en un tanque reactor agitador continuo en batch, 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 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 M., 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 L., 1998).

La inmovilización celular en un reactor para la desulfuración del petróleo ofrece un número de ventajas para su aplicación industrial comparado con un proceso tradicional (Setti L., 1997), entre las que se encuentran:

- Una mayor recuperación del biocatalizador
- Un mayor incremento de la separación de las fases aceite/agua en un 90%
- Una fácil separación del sustrato sulfurado desde el biocatalizador
- Un bajo riesgo de contaminación bacteriana
- Una eliminación de una cantidad menor del medio agotado después del tratamiento.

El laboratorio nacional de Argona introdujo un reactor con lecho fluidizado en donde la gasolina fue aireada en otra unidad afuera del reactor. El biocatalizador fue inmovilizado en un lecho hidrofílico y fue fluidizado por gasolina oxigenada. El residuo restante fue conducido a una ciclona solida-líquida. La gasolina tratada podría dejar totalmente la ciclona como producto final o podría ser parcialmente reciclada hacia al reactor (McFarland, 1998).

Naito en el 2001 reportó que se podría atrapar *Rhodococcus Erythropolis* en una resina prepolimérica conocida como ENT-4000. Por este método no solo se mantiene la concentración de la biomasa en el reactor, también se podría incrementar la vida útil del biocatalizador a 900 horas. La máxima vida útil reportada fue entre 150 y 192 horas. La lenta tasa observada por la inmovilización fue atribuida a limitaciones en la difusión. Sin embargo, como no había agua involucrada en el proceso, la separación fue mucho más fácil y no fue reportada alguna injuria celular en las cepas inmovilizadas.

De todas las metodologías que utilizan reactores con bacterias inmovilizadas, el método de adsorción celular sobre soportes inorgánicos es el más sugerido (Setti, 1997). Esta técnica no es limitante sobre el mecanismo de recaptura de los hidrocarburos, y de hecho, las condiciones ideales para la biodegradación de hidrocarburos se recuperan en la interfase entre la fase oleosa y la superficie hidrofílica del soporte. 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 la vía de degradación del DBT. Este agotamiento completo del agua desde el sistema conduce a una disminución de la actividad biocatalítica. El uso de soportes hidrofílicos permite desarrollar un proceso en el cual no se requieran de decantadores bajo el bioreactor, ya que el agua queda atrapada en el soporte, lo que representa una ventaja en términos de costo y tiempo.

En este trabajo se estudió la influencia de las variables operacionales de un sistema que opera en condiciones continuas, compuesto de un lecho formado por *Rhodococcus Rhodochrous* inmovilizada sobre Sepiolita, y su efecto sobre reacciones de BDS de DBT y gasoil. Entre las variables que se estudiarán se encuentran, el largo del lecho biocatalítico, el tamaño de las partículas del soporte y el flujo de alimentación del sustrato sulfurado. Por otra parte, el uso de esta tecnología, permite disminuir la cantidad de azufre en un en una muestra real de Gasoil en un $3,96 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$, lo que se traduce en combustibles que generan una menor cantidad de compuestos sulfurados tóxicos para el medio ambiente y para la salud de la población, especialmente en zonas urbanas de alta densidad poblacional, en donde el uso de diésel como combustible es factor de riesgo para enfermedades cardiacas y respiratorias por estrés oxidativo.

Hipótesis y Objetivos

1.- HIPOTESIS

La determinación de las variables operacionales que controlan el proceso de BDS en un Bioreactor Experimental Continuo (BEC), compuesto por un lecho fijo formado por *Rhodococcus Rhodochrous*, inmovilizada en Sepiolita, permitirá incrementar la biodisponibilidad de las moléculas de azufre, facilitando además la separación y recuperación del soporte y el biocatalizador.

2.- OBJETIVOS

2.1.- Objetivo General

- Estudiar las variables operacionales que afectan el proceso de BDS en un biorreactor experimental continuo, formado por bacterias inmovilizadas en Sepiolita, estableciendo parámetros que permitan obtener una mayor degradación de los sustratos sulfurados.

2.2.- Objetivos Específicos

- Establecer el tiempo de crecimiento bacteriano óptimo de *Rhodococcus Rhodochrous* en un medio de cultivo selectivo para el proceso de BDS.
- Determinar la máxima capacidad de adsorción de *Rhodococcus Rhodochrous* sobre Sepiolita.
- Evaluar la actividad metabólica de *Rhodococcus Rhodochrous* soportada en Sepiolita a través del método del Tetrazolium (TTC).
- Estudiar la influencia del largo del lecho catalítico, flujo de reacción y tamaño de partícula del soporte Sepiolita en la BDS de DBT en un BEC.
- Determinar la actividad catalítica de BDS a una muestra de gasoil prehidratado, utilizando los parámetros óptimos obtenidos.
- Analizar la influencia de la adición de un surfactante al sustrato sulfurado en la capacidad desulfuradora de *R.Rhodochrous* sobre gasoil en un BEC
- Evaluar la recuperación de los biocatalizadores utilizados en reacciones de BDS de gasoil utilizando un BEC.

Materiales y Métodos

I.- MATERIALES

1.- Equipos

- Balanza Analítica Kern ple modelo 420-3N
- Mufia Naber[®], modelo N3 D2804 Lilenthal/Bremen
- Incubador mrc, modelo LE 509
- Shaker incubador N-Biotek, modelo NB-205
- Vortex Velp Científica, modelo V 230
- Autoclave Huxley[®] Speedy, modelo HL – 340
- Mechero Bunsen
- Agitador Shaker Termorregulado Companion[®], modelo SK- 300
- Espectrofotómetro Thermo[®], modelo Génesis 10uv
- Centrífuga con refrigeración Eppendorf[®], modelo 5810R
- Refrigerador Eelctrolux[®], modelo FE I8
- Desionizador de agua Heal Force[®], modelo NW Ultra Pure Water System
- Bomba peristáltica YZ II 15
- Agitador magnético Hotplate Stirrer Pobel
- Cromatógrafo de gases Shimadzu, modelo GC-2010 con detector FID, columna capilar spb-5 y autoinyector AOC-20i
- Prensa Bodenseewerk Perkin-Elmer
- Bomba de aire Aquarium Air Pummp Shark RS-510
- Balón de Nitrógeno Linde.

2.- Materiales de Laboratorio

- Matraces Erlenmeyer Duran Schott (volumen variable)
- Probetas de 10, 50 y 100 mL
- Botellas con tapa Duran Schott[®] de 100, 200, 500 y 1000 mL
- Tubos Falcon[®] de 15 y 50 mL
- Tubos Eppendorf[®]
- Matraz kitasato
- Kit de filtrado al vacío
- Papel Filtro 388
- Pinzas y tijeras desinfectadas
- Puntas para micropipetas desechables
- Micropipetas Labnet[®], modelos p10, p20, p200, p1000 y p5000
- Asa de siembra en loop
- Celdas para espectrofotometría
- Mangueras para Solvente Orgánico Cole-Palmer

3.- Reactivos

- Citrato de Sodio p.a. (Merck®)
- Succinato de Sodio p.a. (Merck®)
- Etanol Absoluto p.a. (Merck®)
- Etanol 70%
- Glicerol p.a. (Merck®)
- CaCl_2 p.a. (Merck®)
- $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®)
- $\text{FeCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®)
- KH_2PO_4 p.a. (Merck®)
- K_2HPO_4 p.a. (Merck®)
- NH_4Cl p.a. (Merck®)
- NaCl p.a. (Merck®)
- ZnCl_2 p.a. (Merck®)
- $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®)
- $\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ p.a. (Merck®)
- CuCl_2 p.a. (Merck®)
- Na_2WO_4 p.a. (Merck®)
- Isooctano p.a. (Merck®)
- Dibenzotiofeno p.a. (Merck®)
- Gasoil 5%
- $\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$ (Sepiolita) Tolsa 120 NF

II.- METODOS

1.- Obtención y Preparación de los Materiales

1.1.- Obtención y cultivo de *R.Rhodochrous*

Obtención de la bacteria desulfuradora

En este trabajo se utilizó la cepa bacteriana *Rhodococcus Rhodochrous* IGT58 (ATCC 53968), la cual se obtuvo comercialmente en el American Type Cell Collection (ATCC). Ésta fue conservada a -20°C con caldo nutritivo cultivado y glicerol al 20%, para luego sembrar en una placa de agar LB (Luria Bertani), bajo la técnica de agotamiento de estrías, para obtener colonias bacterianas puras, que fueron usadas para preparar preinóculos. La placa se dejó crecer por 48 horas a 30°C para luego, ser conservada en un refrigerador a 4°C.

Obtención del preinóculo de *Rhodococcus Rhodochrous*

Una vez observada la aparición de colonias aisladas en el agar LB, se procedió a extraer una de estas colonias bajo condiciones de esterilidad y se vertió en un tubo falcon de 50 mL el cual contenía 20 mL de medio LB (Luria Burtani). Con el asa de loops se deben realizar movimientos circulares con el fin de que el microorganismo se deposite en el fondo del tubo. Posteriormente se llevó el preinóculo a un incubador rotatorio a una velocidad de 200 rpm a una temperatura de 30°C por dos días. Transcurrido este tiempo, el preinóculo se centrifugó a 6500 rpm, a 4°C por 5 minutos, para luego descartar el sobrenadante y completar a 30 mL con NaCl al 0,85% p/v. Finalmente se vorteo el tubo con el fin de dispersar el pellet de microorganismos en la solución. Este procedimiento se repitió tres veces con el objeto de dejar solamente las colonias de *Rhodococcus Rhodochrous* en la solución.

Curva de Crecimiento Bacteriano

Con el fin de obtener parámetros confiables de homogeneidad de crecimiento bacteriano en un tiempo determinado, se mide el tiempo óptimo en que la cepa *Rhodococcus Rhodochrous* demora en alcanzar un estado exponencial y posteriormente un estado estacionario de crecimiento. Esta última etapa es la de mayor importancia para el estudio, ya que en éste la bacteria alcanza la mayor capacidad desulfuradora.

Como medio de cultivo se utilizó un Medio Mínimo A (descrito en la Tabla 4) suplementado con Citrato de Sodio 20% como única fuente de Carbono, Succinato de Sodio 0,3 M como única fuente de energía y DBT 0,0623 M en Isooctano como una única fuente de azufre. En tres matraces Erlenmeyer de 250 mL, se dispensó 99 mL del medio Mínimo A y 1 mL del preinóculo previamente lavado con NaCl 0,85% p/v bajo condiciones de esterilidad. Posteriormente, utilizando un espectrofotómetro UV Thermo[®], modelo Génesis 10uv, se estableció bajo una longitud de onda de 600 nm, la densidad óptica (DO) inicial, vertiendo 1 mL de la suspensión en una cubeta de vidrio. Luego los matraces con el medio de cultivo se llevaron a un incubador rotatorio a 30°C y 200 rpm. Posteriormente, se determinó la DO cada una hora y al llegar a la hora 10 cada dos horas, hasta notar incrementos en la DO que justifiquen el evaluar la lectura en un intervalo menor de tiempo.

Tabla 4 – Composición de Medio Mínimo A

KH₂PO₄	0,5g
K₂HPO₄	4g
NH₄Cl	1g
NaCl	0,01g
CaCl₂	0,02g
MgCl₂ x 6H₂O	0,2g
ZnCl₂	0,005g
MnCl₂ x 4H₂O	0,005g
NaMoO₄ x 2H₂O	0,001g
CuCl₂	0,0005g
Na₂WO₄	0,0005g
FeCl₂ x 4H₂O	0,005g
Agua destilada c.s.p.	1000 mL

1.2.- Crecimiento Bacteriano

Una vez obtenidos los datos de la curva de crecimiento, se procedió a preparar Medio Mínimo A, suplementado con Citrato de Sodio 20%, Succinato de Sodio 0,3 M y DBT 0,0623 M como una única fuente de azufre, más el preinóculo previamente lavado con NaCl al 0,85% p/v, en condiciones de esterilidad. Cabe destacar que todas estas soluciones deben ser autoclavadas antes de su uso, y para el caso de la preparación del medio mínimo A, los metales se deben agregar después de autoclavar a una temperatura fría para evitar la precipitación de éstos, que podría influir negativamente en el crecimiento bacteriano.

Posteriormente se dispensó este volumen en 15 matraces Erlenmeyer de 100 mL en condiciones de esterilidad y se llevó a un incubador rotatorio por 48 horas.

1.3.- Soportes En Estudio

Como soporte para la adsorción de bacterias fue utilizado un silicato magnésico de fórmula $\text{Si}_{12}\text{Mg}_8\text{O}_{30}(\text{OH}_4)(\text{H}_2\text{O})_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$, denominado Sepiolita el cual tiene un área S_{BET} de $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$.

Para obtener los tamaños de partícula considerados en este estudio, inicialmente el soporte fue pastillado en una prensa mecánica Bodenseewerk Perkin-Elmer (rango de 114 y 140 kp/cm^2) y posteriormente tamizado a dos rangos de tamaños de partícula de 0,71 mm – 1,18 mm (rango malla 16-25) y de 3,35 - 5,6 mm (rango de malla 3 ½ - 6). (Figura 7)



Figura 7 – Sepiolita ($\text{Si}_{12}\text{Mg}_8\text{O}_{30}(\text{OH}_4)(\text{H}_2\text{O})_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$), luego de una calcinación previa a 700°C por 12 horas en los dos rangos de tamaño de partícula, 0,71 mm – 1,18 mm (rango malla 16-25) [Izquierda] y 3,35 - 5,6 mm (rango de malla 3 ½ - 6)[Derecha].

Una vez obtenido el rango de tamaño de partícula deseado, el soporte fue calcinado en una mufla a 700°C por 12 horas, para posteriormente incorporarlos al Bioreactor Experimental Continuo (BEC), de 40 cm de altura y 2 cm de diámetro, previamente esterilizado, y finalmente, el BEC y las mangueras se adaptaron junto a una bomba peristáltica para realizar *in situ* el proceso de impregnación.

2.- Ensayos Con Bacterias Inmovilizadas “*in situ*”

2.1.- Ensayo de Adsorción de *R. Rhodochrous* sobre Sepiolita

Para realizar el ensayo de adsorción, se depositaron en tres matraces de 100 mL, un gramo de Sepiolita calcinada del rango de tamaño a estudiar, 700 µL de NaCl al 0,85% p/v y 300 µL de cepa con su respectivo medio de cultivo. Estas cantidades fueron determinadas con el fin de asegurar una DO inicial de 0,800, lo cual permite asegurar la linealidad del ensayo. Los matraces se incubaron bajo agitación constante a 30°C y 100 rpm, midiéndose su densidad óptica a 600 nm cada 24 horas, hasta que el valor de la absorbancia se mantuvo constante. Con este ensayo se determinó el tiempo óptimo de adsorción de *R. Rhodochrous* sobre las partículas de Sepiolita.

2.2.- Adsorción de *R. Rhodochrous* in situ en BEC

Una vez transcurridas las 48 horas de crecimiento, los matraces fueron sacados del incubador, para su posterior lavado con NaCl 0,85% p/v, en donde el contenido fue vertido en tubos falcon, para así poder centrifugar la cepa a 6500 rpm, a 4°C por 5 min. El proceso se repitió tres veces para obtener la cepa concentrada que se dejará adsorbiendo.

Las cepas obtenidas se resuspenden en una solución que contiene Succinato de sodio 0,3 M, Citrato de sodio al 20% p/v, bajo condiciones de esterilidad. Después de resuspendidas las bacterias, se procedió a realizar el proceso de impregnación in situ de las bacterias sobre el el lecho fijo del BEC. Este proceso se realizó sobre soportes con dos rangos de tamaño de partícula diferentes (0,71 mm – 1,18 mm y 3,35 - 5,6 mm), y utilizando 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 de 600 cm³/h (12 rpm). Este procedimiento se realizó bajo campana, durante el tiempo determinado con anterioridad en el ensayo de adsorción, y bajo agitación constante del medio. (Figura 8)



Figura 8 – Proceso de Adsorción in situ de *Rhodococcus Rhodochrous* en un BEC (izquierda), en partículas calcinadas de Sepiolita.

2.3.- Ensayo de actividad Metabólica de *R.Rhodochrous* sobre Sepiolita

Para la determinación de la actividad metabólica de la cepa *R.Rhodochrous* se utilizó una sal de trifenil tetrazolio (TTC) como indicador de esta actividad, la cual reducirá a un compuesto cuantificable por espectroscopia de absorción molecular de color rojo llamado formazán a $\lambda = 490$ nm. (Dinamarca M.A., 2007). Para su determinación una cierta cantidad de *R.Rhodochrous* fue adsorbida sobre sepiolita. Posteriormente, el sólido fue filtrado con las células adheridas e incubado en la oscuridad por un período de 2 horas en una solución al 0.01 %, de TTC, en un medio de cultivo. Luego, se tomó una alícuota de la solución anterior y se diluye en etanol para disolver el formazán generado, el cual se cuantifico mediante la medición de absorbancia (Dinamarca M.A., 2007)

2.4.- Ensayos de Biodesulfuración para DBT y Gasoil

Una vez finalizado el proceso de adsorción *in situ* de las cepas, se procede a lavar el BEC con una solución de NaCl 0,85% p/v, para remover las células que no fueron adsorbidas en el 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 cm³/h (0,5 rpm) y 54 cm³/h (1 rpm).

Una vez que el DBT ha pasado por 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 sulfurado se vuelve a hacer circular por el BEC por flujo laminar, 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.

Los diferentes ensayos realizados y las variables operacionales estudiadas en la reacción de BDS de DBT, se esquematiza en la Tabla 5.

N° ensayo	Flujo de Reacción (cm ³ /h)		Largo Lecho Catalítico (cm)			Rango de tamaño Partícula (mm)	
	27	54	5	10	15	0,71 - 1,18	3,35 - 5,6
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							
10							
11							
12							

Tabla 5 - Esquema de trabajo para los ensayos de BDS en DBT. Se destaca en azul el parámetro a estudiar.

Los ensayos de BDS de gasoil fueron realizados empleando las condiciones experimentales óptimas de actividad en cuanto a tamaño de partícula, largo de lecho catalítico y velocidad de flujo obtenidas en la BDS de DBT (Figura 9).



Figura 9 - Proceso de BDS en un Bioreactor Experimental Continuo.

2.5.- Evaluación de la influencia del oxígeno en la BDS de Gasoil

Con el propósito de estudiar la influencia del oxígeno suministrado 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 en las mismas condiciones utilizadas para el ensayo con gasoil.

Para lo cual el sustrato fue incorporado en un ambiente rico en nitrógeno, el que se suministró directamente al gasoil desde un cilindro de nitrógeno 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 10, se adaptó una tapa al BEC con una entrada lateral, 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 10 - Modificación estructural del BEC para favorecer la oxigenación del lecho catalítico.

2.6.- Efecto de la adición de un surfactante

Con el objeto de aumentar la biodisponibilidad del sustrato sulfurado para las bacterias inmovilizadas, se realizó un ensayo incorporando un surfactante al sistema de reacción. Para ello se evaluó el efecto del surfactante Tween 80 el cual fue incluido mediante una emulsión preparada bajo constante agitación a través de un vórtex con 5 mL del surfactante en 40 mL de gasoil. Esta emulsión fue incorporada al BEC, utilizando las condiciones operacionales más activas. Una vez concluido el ensayo, las muestras fueron centrifugadas en tubos eppendorf a 5000 rpm a 4°C en 3 minutos, para recolectar la fase orgánica donde reside el azufre para su posterior medición.

2.7.- Reutilización del biocatalizador en el proceso de BDS

Para una aplicación industrial de BDS, es importante conocer las veces en que el biocatalizador puede ser reutilizado. Para su determinación la reacción de BDS de gasoil fue realizada utilizando un sistema en las condiciones operacionales más activas. Una vez finalizada la reacción fue ingresado al sistema medio de cultivo con células bacterianas con el propósito de recuperar el biocatalizador. Este procedimiento fue repetido dos veces.

3.- Determinación de los productos de BDS

3.1.- Medición de las muestras

Para la determinación cuantitativa de la capacidad biodesulfuradora, las muestras de DBT fueron analizadas por Cromatografía Gaseosa (GC), en un Cromatógrafo Shimadzu, modelo GC-2010 con detector FID, columna capilar spb-5 y sistema autoinyector AOC-20i-s, ubicado en el Laboratorio de Catálisis del Instituto de Química de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, Campus Curauma. Las condiciones de análisis fueron las siguientes: Flujo: 34 mL/min; Temperatura del inyector: 249°C; Volumen de inyección: 0,5 µL; Temperatura de columna: 160°C; Presión: 243,5 kPa; Flujo H₂:40 mL/min; Flujo aire: 400 mL/min; Temperatura del detector: 250°C.

Las muestras de gasoil, fueron cuantificadas en un analizador de azufre Leco S-144 DR con detector infrarrojo, ubicado en el Laboratorio de Catálisis del Departamento de Química de la Universidad de Santiago. Este equipo consta de un horno cerámico de alta resistencia, un detector infrarrojo. La temperatura de trabajo fue de 1350°C y los datos fueron procesados en un sistema informático con PC externo.

3.2.- Expresión de la actividad de la BDS

La concentración de bacterias presentes en el medio de reacción es proporcional a la turbidez del medio, y por lo tanto, también a la capacidad de dispersar un haz de luz que atraviesa la suspensión, reflejándose en la medición de su absorbancia (Goubin y col., 2006)

La cuantificación de las bacterias se realizó por espectroscopia a una longitud de onda de 600 nm contra un blanco de suero fisiológico. Se midió la absorbancia (DO_{600nm}) de cada suspensión de células diluidas 10 veces con suero fisiológico. Esta medición fue realizada 3 veces y se trabajó con el promedio de éstas. Se consideró un comportamiento lineal entre 0,2 y 0,8 U.A.

La absorbancia se relacionó proporcionalmente con la concentración de bacterias por medio del siguiente factor de conversión:

$$\frac{\text{Cantidad de bacterias}}{\text{Absorbancia obtenida}} = \frac{1,20 \times 10^9}{4,25 DO_{600 \text{ nm}}}$$

Los resultados se expresaron como número de bacterias por volumen de reacción, las cuales fueron 1×10^9 para el estado estacionario de crecimiento

Para cuantificar DBT se realiza el siguiente cálculo para obtener la concentración de DBT en mM detectado, multiplicando el área remanente de DBT obtenida en los ensayos por la concentración de la solución de DBT en mM (62,3), dividido por el área obtenida para el blanco.

Posteriormente se calcula la concentración de DBT consumido, restando la concentración de la solución de DBT (62,3 mM) de la concentración de DBT en mM detectada.

Para obtener los $g_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$, se debe traspasar a gramos y miligramos de DBT de acuerdo al peso molecular de éste (184,25 g/mol), para luego obtener los g_{azufre} consumidos, relacionando el peso molecular del azufre (32 g/mol) y el DBT. Finalmente para obtener los $g_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$, se debe dividir los g_{azufre} consumidos, con la cantidad de soporte con célula obtenida con el valor descrito anteriormente y la masa del soporte seco.

Para cuantificar Gasoil, se debe restar los g_{azufre} obtenidos en la muestra original (blanco), con los g_{azufre} encontrados en los ciclos, para obtener los g_{azufre} consumidos.

Finalmente para obtener la capacidad desulfuradora expresada en $g_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$, se debe dividir los g_{azufre} consumidos, con la cantidad de soporte con célula obtenida con el valor descrito anteriormente y la masa del soporte seco que se quiere evaluar.

Resultados

1.- CURVA DE CRECIMIENTO DE *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS*

En la Figura 11 se observa el aumento de la densidad poblacional, a través del tiempo de la cepa *R.Rhodochrous* en el medio mínimo A en condiciones de temperatura y agitación adecuada para su crecimiento óptimo. En dicha figura se relaciona el número de células por mL de cultivo $\times 10^8$ con el tiempo de crecimiento en horas.

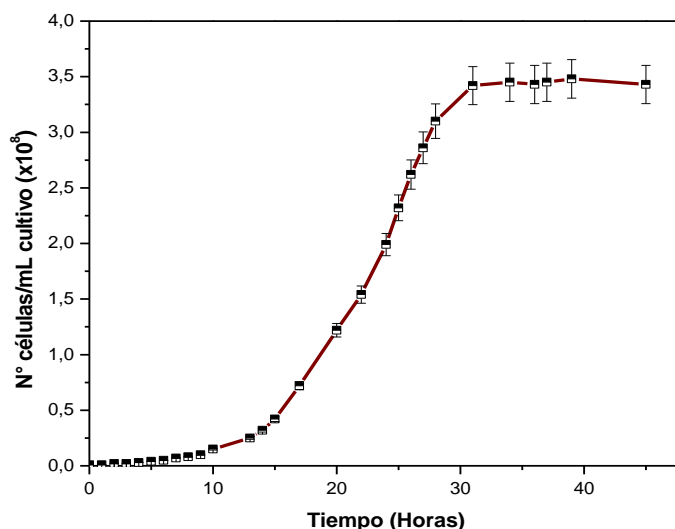


Figura 11 - Curva de Crecimiento para *R.Rhodochrous*, en Medio Mínimo A, incubada a 48 horas, a 30°C y a 200 rpm.

Los resultados obtenidos indican que dentro de las 12 horas transcurrida la incubación de la cepa, ésta permanece en un estado de latencia, en donde el número de células se mantiene constante, no existiendo crecimiento bacteriano. Dentro de las 15 y 27 horas transcurridas, se observa un incremento en el número de células, alcanzando a las 30 horas la etapa estacionaria de crecimiento, tiempo en el cual la célula está metabólicamente activa. En vista de estos resultados el tiempo de crecimiento de las bacterias para ser utilizadas en los ensayos de actividad fue de 30 horas.

2.- ADSORCION DE *RHODOCHROUS RHODOCOCCUS* SOBRE SEPIOLITA

La Figura 12 muestra las curvas de adsorción de la cepa *R.Rhodochrous* sobre sepiolita, utilizando dos rangos de tamaños de partícula (3,5 mm – 5,6 mm y 0,71 mm – 1,18 mm).

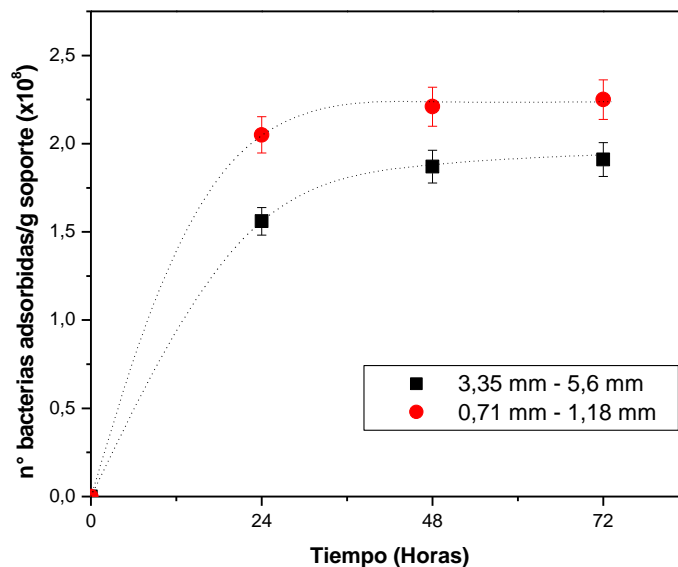


Figura 12 – Capacidad de adsorción de *Rhodococcus Rhodochrous* sobre Sepiolita sobre partículas de tamaño 0,71 mm – 1,18 mm y 3,35 mm – 5,6 mm.

Los resultados muestran que a ambos tamaños de partícula la saturación de la superficie ocurre a un tiempo cercano a las 36 horas. No obstante, al utilizar soportes con un tamaño de partícula de 0,71 mm – 1,18 mm existe una mayor adsorción, alcanzándose un máximo de $2,17 \times 10^8$ 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 de bacterias adsorbidas por gramo de soporte fue de $1,85 \times 10^8$.

3.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA DE *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS* SOBRE SEPIOLITA

La Figura 13 muestra los valores de actividad metabólica de *R.Rhodochrous* sobre sepiolita al tiempo inicial de adsorción y luego de 24 horas.

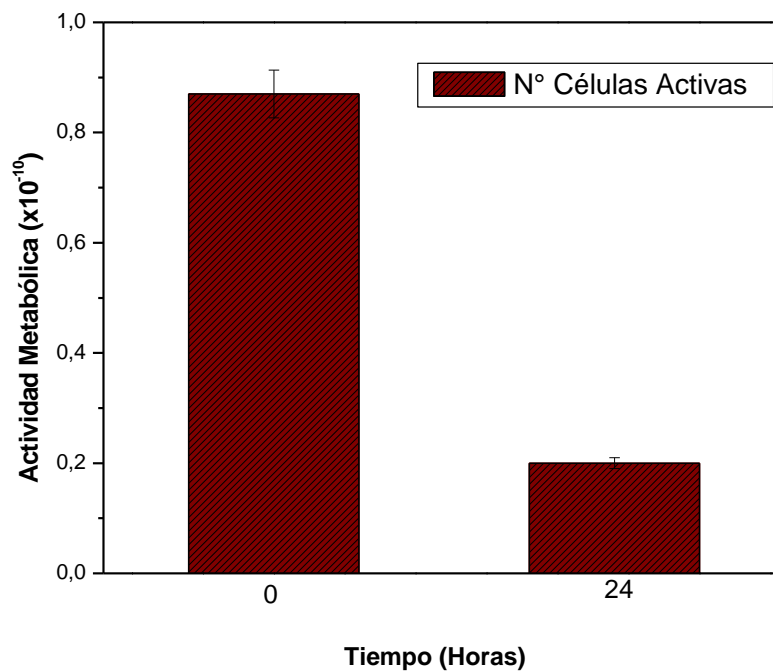


Figura 13: Actividad metabólica de *R.Rhodochrous* sobre Sepiolita luego de la formación de formazán a tiempo cero y a las 24 horas luego del proceso de adsorción.

Los resultados obtenidos muestran que *R. Rhodochrous* se mantiene metabólicamente activa cuando se inmoviliza sobre sepiolita. No obstante, esta actividad disminuye de un valor de $0,87 \times 10^{-10}$ a tiempos iniciales a un valor de $0,20 \times 10^{-10}$ luego de 24 horas de adsorción.

4.- ENSAYOS DE CAPACIDAD DESULFURADORA EN DBT

4.1 - Influencia del largo de lecho catalítico sobre la capacidad biodesulfuradora

La Figura 14 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 $27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y un rango de tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm.

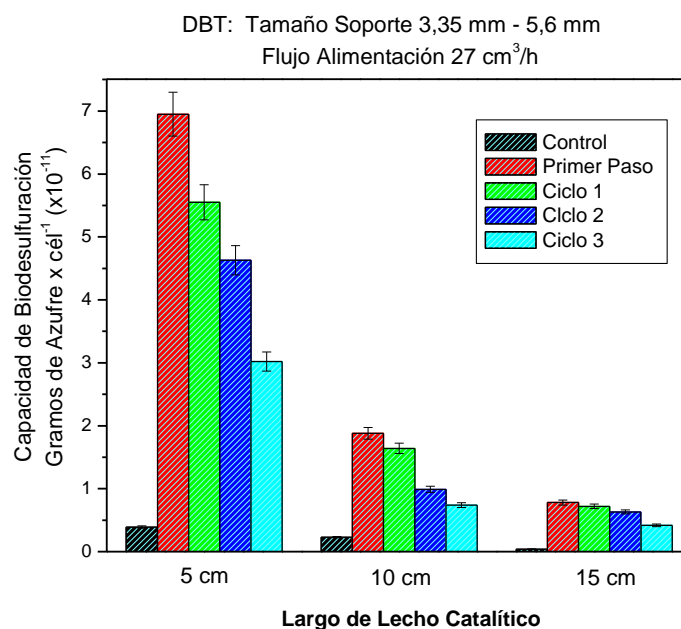


Figura 14 – Capacidad de BDS sobre DBT en función del largo de lecho catalítico, utilizando un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm y un flujo de reacción de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$.

Los valores de capacidad de biodesulfuración muestran inicialmente una disminución en la degradación de DBT a medida que transcurre la reacción, observándose una mayor actividad cuando el sustrato pasa inicialmente por el lecho. Tal comportamiento fue observado en los tres lechos biocatalíticos estudiados.

Cuando se compara la actividad en los sistemas con diferentes largos de lecho se puede apreciar una mayor degradación de DBT a lechos menores. En este sentido el máximo de actividad fue observado en sistemas que utilizaron un largo de 5 cm con un valor de $6,95 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$ a tiempos iniciales, mientras que para un largo de lecho de 15 cm el valor máximo fue de $0,78 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$.

4.2.- Influencia del Flujo de Reacción sobre la Capacidad Desulfuradora

La Figura 15 muestra la influencia del flujo de reacción sobre la capacidad de BDS de DBT, cuando se comparan los sistemas con diferentes largos de lecho catalítico (5, 10 y 15 cm), con un rango de tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm y dos flujos de sustrato $27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y $54 \text{ cm}^3/\text{h}$.

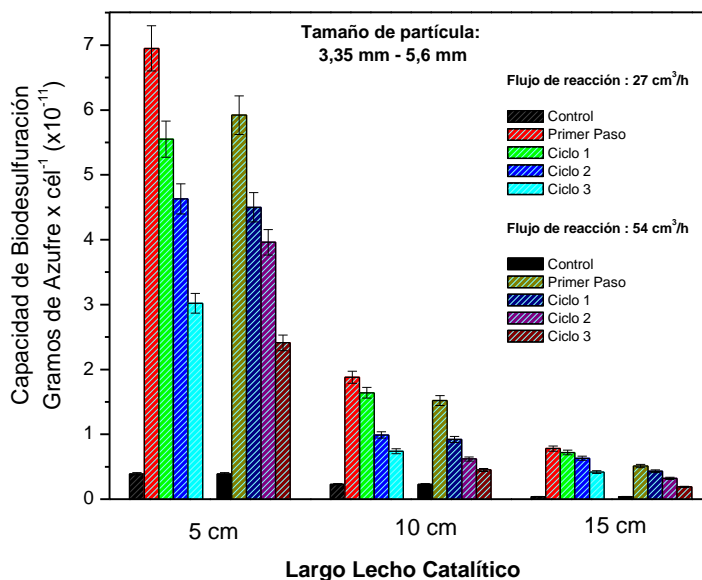


Figura 15 – Capacidad de BDS en función del largo de lecho catalítico, utilizando un sistema con ambos flujos de reacción y tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm.

En general, los resultados obtenidos indican que la utilización de sistemas con flujos de reacción de $27\text{cm}^3/\text{h}$ producen una mayor capacidad de biodesulfuración que los operados con flujos mayores ($54\text{cm}^3/\text{h}$). Esta mayor degradación se maximiza cuando se utilizan largos de lechos de 5 cm, observando un valor de $6,95 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ a tiempos iniciales a un flujo de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y de $5,92 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ a $54 \text{ cm}^3/\text{h}$. La utilización de lechos mayores muestra una similar tendencia pero con valores de actividades más bajas.

En este sentido, para un sistema con un largo de lecho de 15 cm se observó un máximo de actividad de $0,78 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ a flujos de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$, mientras que a flujos mayores el valor disminuye a $0,51 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$.

La comparación de sistemas que utilizaron distinto flujos y un tamaño de partículas menor ($0,71 \text{ mm} - 1,18 \text{ mm}$), muestra que sólo a lechos menores se aprecian diferencias significativas en los valores de actividad (Figura 16). Los máximos observados fueron de $4,29 \times 10^{-13} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ a un flujo de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$, y de $2,88 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ al flujo mayor. En sistemas que utilizaron largos de lechos mayores se puede observar un similar grado de degradación de DBT, en ambas condiciones de flujos.

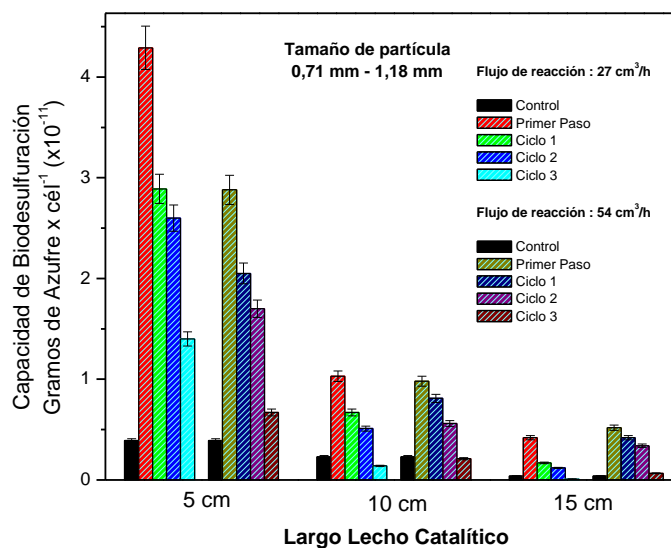


Figura 16 – Capacidad de BDS en función del largo de lecho catalítico, utilizando un sistema con ambos flujos de reacción y rango de tamaño de partícula de 0,71 mm – 1,18 mm.

4.3.- Influencia del Tamaño de Partícula en la Capacidad Desulfuradora

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 de 27 cm³/h y dos rangos de tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm y 0,71 mm – 1,18 mm, se muestran en la Figura 17.

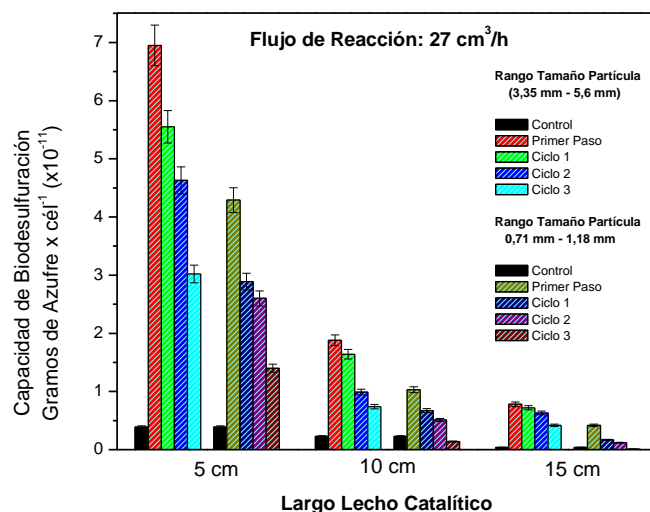


Figura 17 – Comparación de la capacidad de BDS en función del largo de lecho catalítico, en sistemas con ambos tamaños de partícula y un flujo de reacción de 27 cm³/h.

La comparación de resultados descritos en la Figura 17, demuestra que la mayor degradación del DBT se obtiene cuando se usan sistemas con un tamaño de partículas de 3,35 mm – 5,6 mm, independiente del largo de lecho utilizado. Sin embargo, los máximos de actividad se observan a cuando la longitud del lecho es de 5 cm ($6,95 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ a tamaño de partículas de 3,35 mm – 5,6 mm y de $4,29 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ a tamaños de 0,71 mm – 1,18 mm). Esta diferencia también es observada cuando se utilizan lechos de 10 cm donde el valor máximo de actividad a tiempos iniciales fue de $1,88 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ a tamaños menores, mientras que a tamaños de 0,71 mm – 1,18 mm el valor fue de $1,03 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$. No obstante, cuando los sistemas utilizan el lecho de máxima longitud estudiado, se observa una menor influencia del tamaño de partículas sobre la actividad de BDS de DBT.

Cuando ahora se compara la influencia del tamaño de partículas en sistemas que utilizaron un flujo de sustrato de $54 \text{ cm}^3/\text{h}$ (Figura 18), se puede observar que sólo existen diferencias significativas en los sistemas que utilizaron lechos menores. En este sentido, el máximo de actividad observado a un tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm fue de $5,92 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ a tiempo inicial y largo de 5 cm, mientras que en las mismas condiciones pero con un tamaño menor fue de $2,88 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$. En sistemas con largos de lechos mayores se puede observar que la degradación del DBT es independiente del tamaño de partículas utilizado.

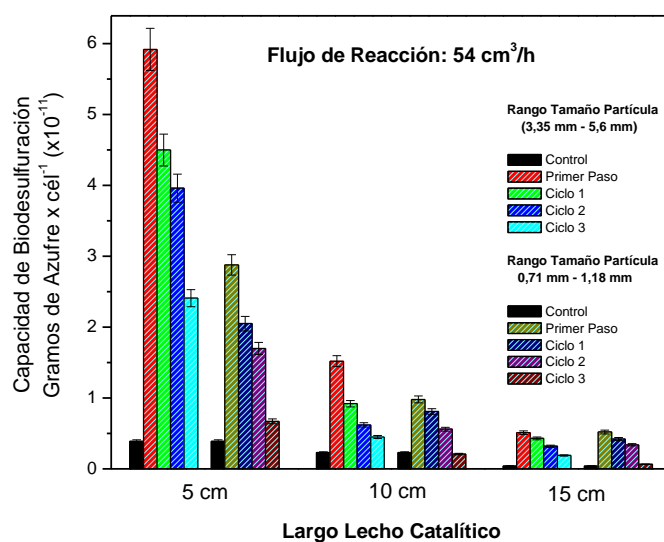


Figura 18 – Comparación de la capacidad de BDS en función del largo de lecho catalítico, en sistemas con ambos tamaños de partícula y un flujo de reacción de $54 \text{ cm}^3/\text{h}$.

5.- ENSAYOS DE CAPACIDAD DESULFURADORA EN GASOIL

Para los ensayos con un gasoil comercial prehidratado, fueron utilizadas las condiciones operacionales que generaron una mayor degradación del DBT, en lo que respecta a flujo de sustrato y tamaño de partículas.

Los resultados de la actividad de BDS de gasoil en sistemas con diferente largo 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, se muestran en la Figura 19.

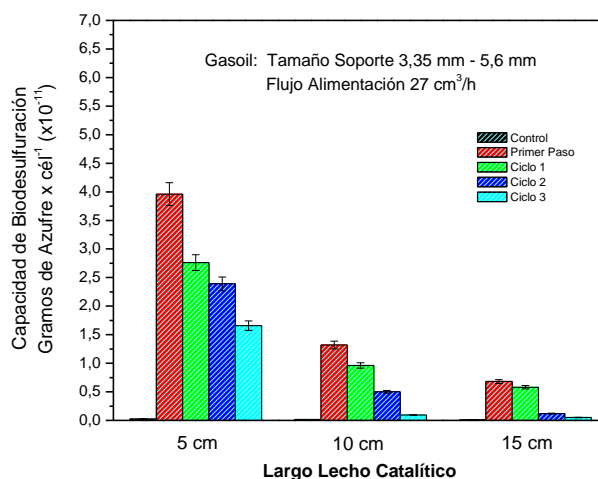


Figura 19 – Capacidad de BDS sobre gasoil en función del largo de lecho catalítico, utilizando un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm y un flujo de reacción de 27 cm³/h.

Los resultados en general indican que la capacidad biodesulfuradora de gasoil, al igual que la observada para DBT, es dependiente del tiempo de reacción y del largo del lecho catalítico. La mayor degradación fue obtenida en sistemas que utilizaron un largo de lecho de 5 cm y a tiempos iniciales de reacción, con un valor máximo de actividad de $3,96 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{ cel}^{-1}$.

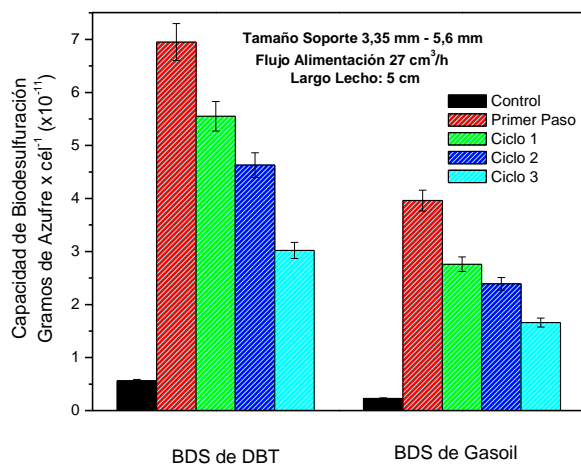


Figura 20 – Capacidad de BDS sobre y Gasoil, utilizando un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm, largo de lecho catalítico de 5 centímetros y flujo de reacción de 27 cm³/h.

Cuando se comparan los máximos de actividad de BDS obtenidos para DBT y gasoil, en las mismas condiciones de operación (Figura 20), se puede apreciar un mayor grado de degradación en todo el tiempo de reacción cuando se utilizan moléculas modelos como sustrato sulfurado. De acuerdo a los resultados descritos en la Figura 20 se puede apreciar que el máximo valor de capacidad de BDS de DBT observado a tiempos iniciales fue de $6,95 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cél}^{-1}$, mientras que para el gasoil fue de $3,96 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cél}^{-1}$.

6.- INFLUENCIA DEL OXÍGENO EN LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA DE GASOIL

Para la determinación de la importancia del oxígeno en la reacción de biodesulfuración en condiciones continuas, se realizó un ensayo en condiciones anaeróbicas, utilizando las condiciones operacionales de máxima actividad y al gasoil como sustrato sulfurado. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 21, en donde se observa una disminución en la degradación de DBT cuando se trabaja en condiciones de baja concentración de oxígeno. La comparación de los máximos de actividad muestran un valor de $6,26 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{cel}^{-1}$ en condiciones aeróbicas mientras que para el sistema operado en condiciones anaeróbicas se observa un valor de $0,55 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}} \text{cel}^{-1}$.

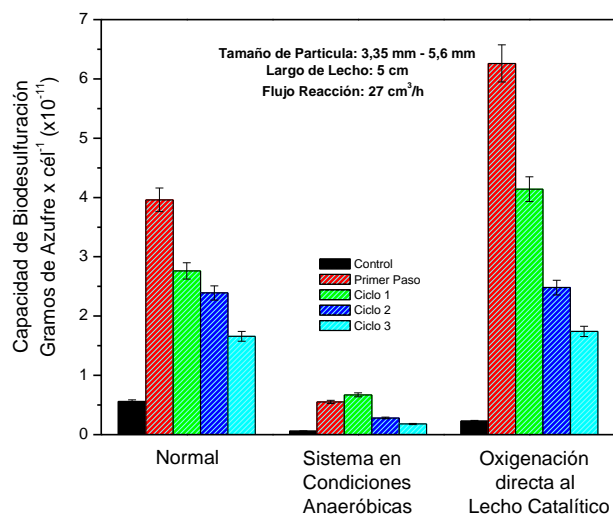


Figura 21 – Capacidad de BDS sobre gasoil utilizando un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm, largo de lecho catalítico de 5 cm, flujo de reacción de 27 cm³/h en condiciones normales, condiciones anaerobias y con oxigenación directa al lecho catalítico

Para aumentar la cantidad de oxígeno disponible en el lecho catalítico, se realizó una modificación operacional al bioreactor. Los resultados de este ensayo se muestran en la Figura 21, en donde se observa que la actividad de BDS de gasoil aumenta en todos los ciclos de reacción, en comparación con un sistema normal. Este aumento en la degradación fue de un 63,26 % al comparar los máximos de actividad operados en ambas condiciones de oxigenación.

7.- EFECTO DE LA ADICION DE UN SURFACTANTE EN LA BDS DE GASOIL

Para evaluar el efecto que tiene la adición de un surfactante al medio de reacción, se realizó un ensayo donde fue agregado Tween 80 a un sistema operado en las condiciones operacionales de máxima actividad. Los resultados mostrados en la Figura 22, muestran que la adición de un surfactante mejora el rendimiento de la biodesulfuración en comparación a un sistema normal, en todos los ciclos de reacción.

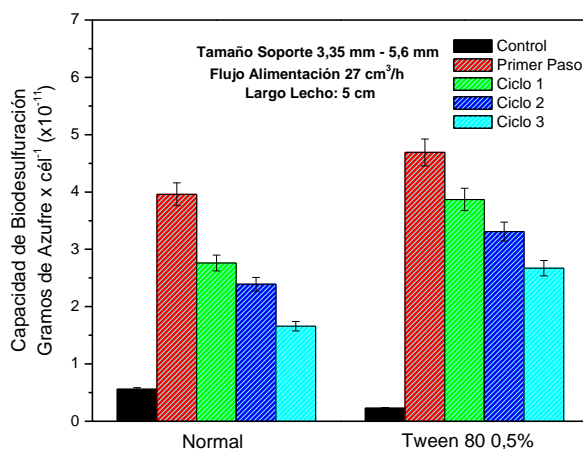


Figura 22 – Capacidad de BDS sobre un emulsionado de gasoil utilizando Tween 80 al 0,5%, comparado con un sistema normal de BDS sobre Gasoil, en un sistema con tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm, largo de lecho catalítico de 5 cm y flujo de reacción de 27 cm³/h

Se observa un incremento en la capacidad biodesulfuradora, desde un valor de $3,96 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$, para un ensayo normal de gasoil a un valor de $4,69 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$, con la adición de un surfactante, al comparar los máximos de actividad.

8.- REUTILIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR Y SU EFECTO EN LA BDS.

La evaluación de la recuperación del biocatalizador fue realizada utilizando las condiciones operacionales de máxima actividad y al gasoil como sustrato sulfurado. Los resultados son mostrados en la Figura 23.

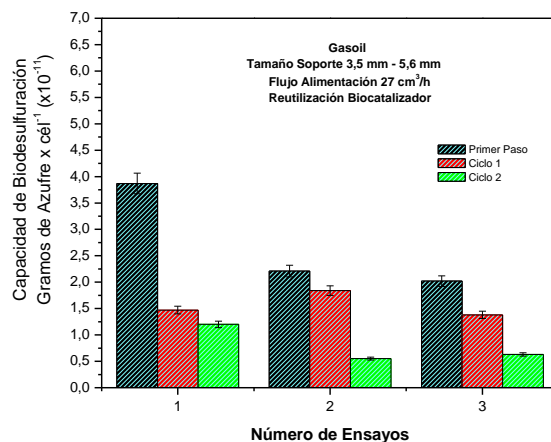


Figura 23 – Capacidad de BDS sobre Gasoil en condiciones continuas de operación, en un sistema con tamaño de partícula de 3,5 mm – 5,6 mm, largo de lecho catalítico de 5 cm y flujo de reacción de 27 cm³/h.

Los resultados muestran inicialmente que el catalizador se recupera luego de la primera y segunda reacción. Sin embargo se puede apreciar que la actividad biocatalítica disminuye luego del proceso de recuperación. Al comparar los máximos de actividad se observa una disminución desde un valor de $3,87 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ en la primera reacción, a un valor de $2,21 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ en la segunda reacción, y finalmente a $2,02 \times 10^{-11} \text{ g}_{\text{azufre}}\text{cel}^{-1}$ en la reacción final.

Discusiones

1.- CURVA DE CRECIMIENTO DE *RHODOCOCCUS RHODOCHROUS*

El medio utilizado para el crecimiento de la cepa *R. Rhodochrous* resulto eficaz para la obtención de la cepa en estudio. Este medio mínimo A, fue suplementado por tres elementos básicos, Citrato como fuente de carbono, Succinato como fuente de energía y Dibenzotiofeno, como fuente de azufre. Los primeros dos elementos descritos anteriormente, brindan a la cepa, las condiciones necesarias para poder potenciar el metabolismo oxidativo y entregar un precursor de las moléculas orgánicas necesarias para la asimilación de los hidrocarburos derivados del petróleo. Por otra parte, la adición de DBT como única fuente de azufre, radica en que este es el compuesto azufrado recalcitrante a la HDS más abundante presente en el petróleo, por lo que se emplea como una molécula modelo, tanto para la utilización en el crecimiento de la cepa, como en los ensayos de BDS. El medio mínimo A, contiene en su composición, la mínima cantidad de nutrientes (micronutrientes) que necesita la bacteria para su existencia. Los metales necesarios en forma de sales, son útiles para el metabolismo, ya que actúan como cofactores en procesos enzimáticos vitales para la bacteria y en este caso, para el proceso de BDS.

Al observar la curva de crecimiento de *R. Rhodochrous* en función del tiempo de incubación mostrada en la Figura 11 (pág. 43), se observa una fase de latencia hasta aproximadamente las 10 horas, en donde si bien no hay variación en el número de células, estas se encuentran activas sintetizando enzimas para su adaptación en el medio de cultivo evaluado.

A partir de las 15 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 de tiempo. Durante esta fase, la población es muy uniforme en cuanto a sus propiedades químicas y fisiológicas, aumentando considerablemente su actividad metabólica. Aproximadamente a las 30 horas, el cultivo alcanza una fase estacionaria, en donde el número total de microorganismos viables permanece constante con respecto a los microorganismos muertos. En esta fase la cepa mantiene su actividad metabólica, pero de forma lenta comparado a la etapa exponencial de crecimiento, desarrollando toda la maquinaria enzimática necesaria para poder crecer en caso de falta de nutrientes. En este sentido, las reacciones de BDS fueron realizadas con células que crecieron hasta el estado estacionario, debido a que en estas condiciones todas las enzimas y cofactores están protegidos por la integridad estructural de la bacteria. Esto evita la interacción con el exterior, en donde éstos pueden sufrir procesos degradativos, generando una pérdida de la capacidad desulfuradora bacteriana. Por otra parte, las células en estado estacionario permiten un fácil sistema de transporte, en donde las sustancias como DBT pueden ingresar y ser utilizadas para obtener nutrientes, o la salida de productos de degradación durante la BDS (Del Águila, 2010).

Si bien, se ha tratado de usar células en un estado exponencial, teniendo como antecedente ventajoso el mantenimiento de una actividad celular, en contraste con células en fase estacionaria, siguen existiendo problemas en cuanto a una menor velocidad de BDS y un menor rendimiento del proceso (Soleimani y col., 2007), así como la posible inhibición del biocatalizador a causa de los productos finales de la reacción (Nekodzuka y col., 1997). Debido a estos problemas y dificultades es que se prefiere trabajar con células en etapa de reposo.

2.- ADSORCION DE *RHODOCHROUS RHODOCOCCUS* SOBRE SEPIOLITA

Los resultados de adsorción de *R. Rhodochrous* sobre sepiolita mostrados en la Figura 12 (pág. 44), indican que este microorganismo se inmoviliza de manera eficaz sobre este soporte, alcanzando una saturación total de su superficie a las 36 horas. A pesar de que estos ensayos fueron realizados en sistemas Batch, se utilizó este tiempo para el proceso de inmovilización in situ en el BEC.

Por otro lado, se puede observar una dependencia de la capacidad de adsorción de *R. Rhodochrous* con el tamaño de la partícula, encontrándose un mayor grado de inmovilización en tamaños menores (0,71 mm - 1,18 mm). Esta diferencia observada se puede deber a la presencia de una mayor cantidad de partículas presentes en el medio, cuando se trabaja con partículas menores, lo que se traduce en una mayor cantidad de sitios disponibles para la adsorción de los microorganismos.

En relación a los mecanismos de adsorción que ocurren durante el proceso de inmovilización de la célula sobre la superficie del soporte, se ha establecido en estudios anteriores que los mecanismos que operan son una combinación de interacciones de tipo electroestáticas e hidrófobas (Dinamarca y col., 2010). Para el caso específico de la adsorción de *R. Rhodochrous* sobre sepiolita, el proceso de impregnación se realizó a un pH del medio en donde las bacterias y los soportes presentan una carga superficial negativa, razón por la cual las interacciones de tipo hidrofóbicas explicarían la inmovilización de estas cepas.

3.- EVALUACION DE LA ACTIVIDAD METABÓLICA DE *RHODOCOCCUS*

***RHODOCHROUS* SOBRE SEPIOLITA**

La evaluación de este parámetro fue realizada con el objeto de determinar si la cepa *R. Rhodochrous* permanece metabólicamente activa cuando se encuentra inmovilizada sobre sepiolita. Los resultados mostrados en la Figura 13 (pág. 45) demuestran que luego de 24 horas de adsorción las bacterias permanecen activas. Esto asegura que en el período de tiempo que duran los ensayos (aprox. 2 horas) esta cepa puede metabolizar en forma eficaz a las moléculas sulfuradas presentes en el gasoil o DBT (Gálvez, 2008).

4.- ENSAYOS DE CAPACIDAD DESULFURADORA EN DIBENZOTIOFENO (DBT)

Como fue establecido en los antecedentes de este trabajo uno de los principales problemas en los procesos de hidrotratamiento, es el contenido de compuestos recalcitrantes presentes en el crudo. Esto conlleva a la utilización de metodologías que producen una baja en la calidad de los combustibles. En este sentido, en los ensayos de nuevas técnicas de desulfuración se hace necesario trabajar con moléculas modelos que tengan un carácter recalcitrante. Es por tal motivo, que en este trabajo se utilizó DBT, el cual es un compuesto que se encuentra en una alta concentración en los crudos que son hidrotratados.

Los resultados de actividad obtenidos en las diferentes evaluaciones de los parámetros operacionales, muestran una disminución en la degradación de DBT y del gasoil con el tiempo de reacción. Tal comportamiento se puede explicar debido 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 (57,1%).

Por otra parte, los productos de reacción que resultan en la degradación de los sustratos sulfurados pueden estar modulando la actividad enzimática relacionada a la capacidad desulfuradora de *R. Rhodochrous*, lo cual se incrementa a medida que estos se acumulan al transcurrir la reacción.

4.1- Influencia del largo de lecho catalítico sobre la capacidad biodesulfuradora

Los resultados descritos en la Figura 14 (pág. 46) muestran que la actividad de BDS de BDT es dependiente del largo del lecho catalítico utilizado. En este sentido, lechos menores generaron la mayor actividad biocatalítica en todos los ciclos de reacción. Las razones de este comportamiento se deberían a la disponibilidad del oxígeno en el BEC, la cual sería mayor en lechos más cortos. La presencia de este compuesto en el medio de reacción es vital para que las bacterias puedan metabolizar a las moléculas sulfuradas. En el caso de lechos largos la menor actividad estaría referida a un déficit en la concentración de oxígeno, disminuyendo por lo tanto la capacidad de biodesulfuración del DBT.

Otra explicación puede estar referida a que en lechos mayores se produciría una mayor concentración de los productos de reacción de BDS, lo que ocasionaría la disminución en la actividad biocatalítica por una toxicidad acumulativa.

4.2.- Influencia del Flujo de Reacción sobre la Capacidad Desulfuradora

Los resultados de la evaluación de la influencia del flujo de sustrato sobre la actividad de BDS de DBT (Figura 15; pág 47), muestra que los sistemas que fueron operados a un flujo de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$, fueron más activos en la degradación del sustrato sulfurado. Esto se debe a un incremento en el tiempo de contacto entre las bacterias adsorbidas y el DBT, permitiendo aumentar el paso del sustrato sulfurado desde la fase orgánica a la superficie del soporte. Tal efecto fue observado en todos los ciclos de reacción y en todo el transcurso de la reacción.

Cuando ahora se comparan los flujos de sustrato en sistemas que utilizaron un tamaño de partículas menores (Figura 16, pág.49) se puede apreciar que sólo en lechos cortos se observan diferencias apreciables. Luego cuando son utilizados lechos mayores que 10 cm la actividad sería constante e independiente de cualquier variable operacional. En este sentido, la combinación de condiciones no favorables para la BDS de DBT (lechos largos y tamaños de partículas pequeños) sería la causa de tal comportamiento.

4.3- Influencia del Tamaño de Partícula en la Capacidad Desulfuradora

El análisis de la influencia del tamaño de la partícula del soporte sobre la actividad de BDS de DBT, descrita en la Figura 17 (pág 50), muestra que en todos los ciclos de reacción y en los diferentes largos de lechos, se observa una mayor actividad (40%) cuando se utilizan rangos de tamaños mayores de partícula ($3,35 \text{ mm} - 5,6 \text{ mm}$). Esto demostraría que para la reacción de BDS en un bioreactor de lecho fijo, se necesitan partículas grandes que dispongan de una mayor superficie para que las bacterias puedan interaccionar con el sustrato sulfurado. Esto supone que la capacidad de adsorción no es un parámetro que condicione la actividad de BDS en sistemas continuos que utilicen bacterias inmovilizadas.

Adicionalmente, la disposición que adoptarían las partículas de tamaño mayor en el bioreactor, generarían una mayor cantidad de espacios intraparticulares en el lecho biocatalítico, lo que produciría una mayor difusión del oxígeno, favoreciendo la metabolización del sustrato sulfurado.

Al determinar la influencia del tamaño de las partículas del soporte utilizando un flujo de sustrato de $54 \text{ cm}^3/\text{h}$ (Figura 18, pág. 51), se observan sólo diferencias apreciables en la actividad al utilizar lechos menores. Las razones de tal comportamiento estarían basadas, al igual que la evaluación de la influencia del flujo de sustrato a tamaños menores de partículas, en una combinación de condiciones no favorables para la BDS, que en este caso serían la utilización de lechos largos y flujos altos.

5.- ENSAYOS DE CAPACIDAD DESULFURADORA EN GASOIL

Para las reacciones de BDS de gasoil se utilizaron los parámetros operacionales que generaron una mayor degradación del DBT, lo cual se basa en el hecho de que este compuesto se encuentra presente en una alta concentración en el gasoil (4700 ppm). Las condiciones seleccionadas fueron la utilización de diferentes largos de lecho catalítico (5, 10 y 15 cm), un flujo de sustrato constante de $27 \text{ cm}^3/\text{h}$ y un rango de tamaño de partícula de 3,35 mm – 5,6 mm.

En general, es posible observar en la Figura 19, (pág. 52) que el bioreactor diseñado por un lecho catalítico compuesto por bacterias inmovilizadas sobre sepiolita, es un sistema eficaz para la degradación de muestras reales de petróleo.

Asimismo, los resultados de actividad de BDS de Gasoil muestran un similar comportamiento al observado en la degradación biocatalítica de DBT, es decir, una dependencia de la actividad con el tiempo de reacción y con el largo del lecho catalítico.

Sin embargo, comparando los resultados obtenidos con DBT, se observa una disminución de la capacidad desulfuradora, en todos los ciclos de reacción y largos de lechos estudiados. Esto es debido principalmente a la compleja composición del gasoil, en donde existe una alta cantidad de compuestos recalcitrantes que el microorganismo debe desulfurar, usando vías alternativas de degradación que pueden ser tóxicas para la célula. (Rojas, 2011).

6.- INFLUENCIA DEL OXÍGENO EN LA CAPACIDAD BIODESULFURADORA

Para determinar la influencia del oxígeno en la reacción de BDS de gasoil utilizando un bioreactor diseñado por un lecho catalítico compuesto por bacterias inmovilizadas sobre sepiolita, se determinó realizar un ensayo en condiciones anaeróbicas. Para lograr este ambiente se reemplazó el oxígeno por nitrógeno en la línea del sustrato sulfurado. Los resultados (Figura 21; pág. 54) muestran que en todos los ciclos estudiados la actividad disminuye cuando existe una condición ambiental sin oxígeno.

Esto se debería a que en un metabolismo aerobio de biodesulfuración el oxígeno actúa como aceptor de electrones, requiriendo la presencia de oxígeno molecular y NADH (Del Águila, 2010). No obstante, a pesar de generar un ambiente libre de oxígeno se observa degradación de gasoil en los sistemas estudiados. Esta actividad puede deberse al oxígeno del agua que queda adsorbida en el soporte hidrofílico en la etapa de inmovilización in situ. Sin embargo, esta concentración de oxígeno remanente no es suficiente para metabolizar la totalidad del sustrato sulfurado.

Una vez comprobada la importancia de la presencia de oxígeno en el lecho biocatalítico, se modificó el diseño original de aireación, mediante la incorporación de una manguera que llevase el oxígeno de manera directa al lecho, y no a través del sustrato sulfurado. Los resultados obtenidos demuestran que existe un aumento en la actividad de BDS cuando aumenta la concentración de oxígeno, ya que evita que este sea una variable limitante externa que afecte al proceso biocatalítico.

7.- EFECTO DE LA ADICION DE UN SURFACTANTE

Uno de los principales problemas que se generan en los procesos de BDS, es la baja biodisponibilidad del sustrato sulfurado hacia las bacterias desulfuradoras. En este sentido, además de aplicar metodologías de inmovilización, se han utilizados compuestos de tipo surfactantes, que mediante la disminución de la tensión superficial del medio de reacción acuoso y la formación de micelas (Rojas, 2011), permiten mejorar la biodisponibilidad del proceso. No obstante, en todos los estudios previos la utilización de surfactantes ha sido aplicada principalmente en sistemas batch, por lo que su uso en sistemas continuos es promisorio (Wangliang y col., 2013)

Para evidenciar este efecto se incorporó al bioreactor el sustrato sulfurado emulsionado con Tween 80 al 0,5% p/v, y se realizaron los ciclos de reacción. Los resultados muestran (Figura 22, pág.55) que la degradación de gasoil se ve incrementada en comparación al sistema normal, lo que permite ratificar la utilización de compuestos tensoactivos en sistemas continuos.

8.- REUTILIZACIÓN DEL BIOCATALIZADOR Y SU EFECTO EN LA BDS.

Para proyectar una posible aplicación industrial utilizando un sistema continuo formado por bacterias inmovilizadas, se debe evaluar cuantitativamente la reutilización del biocatalizador. Tal ensayo fue realizado utilizando las condiciones óptimas operacionales obtenidas y usando gasoil como sustrato sulfurado.

Los resultados descritos en la Figura 23 (pág. 56), demuestran que el biocatalizador se puede recuperar luego de la reacción biocatalítica, mediante un nuevo proceso de inmovilización in situ. No obstante, como puede ser observado en esta figura la recuperación no es completa ya que luego de la segunda impregnación la actividad de BDS de gasoil disminuye en un 57 %, en relación al primer sistema. Tal comportamiento puede ser debido 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.

Asimismo, una posible desintegración del soporte luego de las reacciones e impregnaciones sucesivas, pueden también explicar esta pérdida de actividad.

Conclusiones

- El tiempo que la cepa *R.Rhodochrous* requiere para alcanzar un estado de crecimiento bacteriano estacionario, que permita obtener células activas para la reacción de BDS de DBT y gasoil fue de 30 horas y su mayor adsorción fue observada al rango de tamaño de partícula de (0,71 mm - 1,18 mm).
- *R.Rhodochrous* mantiene su actividad metabólica al ser inmovilizada en Sepiolita por un tiempo superior a 24 horas.
- La actividad BDS sobre DBT y gasoil, se incrementa con la disminución del largo del lecho catalítico, debido a una mayor biodisponibilidad del oxígeno en la reacción.
- A velocidades de flujo de reacción menores, la degradación de DBT y gasoil aumenta, debido a un incremento en el tiempo de contacto entre el sistema biocatalítico y los sustratos sulfurados.
- La utilización de un lecho catalítico con partículas de tamaño 3,35 mm – 5,6 aumenta la actividad de BDS, debido a un aumento de la superficie de exposición entre las bacterias inmovilizadas y el sustrato sulfurado.
- La incorporación del surfactante Tween 80 al medio de reacción de BDS de gasoil, utilizando bacterias inmovilizadas por adsorción en Sepiolita, incrementa la actividad biocatalítica debido a un aumento de la biodisponibilidad del sustrato sulfurado.

- 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.

- El biocatalizador de un sistema continuo formado por un lecho fijo, puede ser recuperado luego de la reacción biocatalítica, mediante un proceso de inmovilización "*in situ*".

- La utilización de un BEC con bacterias inmovilizadas *in situ*, se presenta como una alternativa innovadora y complementaria a los procesos tradicionales HDS, lo que puede ser beneficioso para la protección del medio ambiente y la salud de la población.

Referencias Bibliográficas

1. **Bhatia S. and Sharma D. K.** 2010. Biotransformation of dibenzothiofene, its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain *Pantoea Agglomerans* D23W3. *Biochem Eng J.* 50: 104–109
2. **CCHC**, 2013, Cámara Chilena de la Construcción. <http://www.cchc.cl/minuta/minuta-cecn%C2%B0-28-matriz-energetica-y-generacion-electrica-una-mirada-internacional/>. (página visitada el 08 de diciembre de 2013).
3. **Chang J. H., Chang Y. K., Ryu H. W., Chang H. N.**, 2000. Desulfurization of light gas oil in immobilized – cell systems of *Gordonia* s.p., CYKS1 and *Nocardia* s.p CYKS2. *FEMS Microbiol Lett.* 182: 309 – 312
4. **DEIS**, 2013, Departamento de Estadísticas e Información de Salud. <http://www.deis.cl/defunciones-y-mortalidad-general-y-por-grupos-de-edad/>. (página visitada el 08 de diciembre de 2013)
5. **Del Águila, R.G.** (2010). “Biotransformación de fracciones petrolíferas con *Pseudomonas putida* CECT5279: Optimización del proceso”. Memoria para optar al grado de Doctor en Química”. Universidad de Alcalá. 3-41.
6. **Dinamarca MA.; Ibacache-Quiroga C.; Baeza P.; Galvez S.; Villarroel M.; Olivero P.; Ojeda J.** 2010. Biotransformation of gas oil using inorganic supports biomodified with metabolically active cells immobilized by adsorption. *Bioresource Technology* 101: 2375-2378.
7. **Doney S., Mahowald N. Lima I., Feely R. A., Mackenzie F. T., Lamarque J. F., Rasch P.J.** 2007. Impact of Anthropogenic Atmospheric Nitrogen and Sulfur deposition on ocean acidification and the inorganic carbon system. *PNAS.* 104: 14580-14585.
8. **Elsner M., Menge M., Müller C., Agar D. W.**, 2003. The Claus process: teaching an old dog new tricks. *Catalysis Today.* 79 – 80: 487 – 494
9. **ENAP**, 2013, Empresa Nacional del Petróleo. http://www.enap.cl/pag/106/817/marco_normativo. (página visitada el 08 de Diciembre de 2013)
10. **Fletcher S.** Mayo. 2000. Oil Gas J. Online Story
11. **Gálvez S.** “Estudio de la adsorción de bacterias sobre soportes inorgánicos, y su influencia sobre la actividad de biotransformación de dibenzotiofeno y gasoil” Tesis para optar al grado de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso. 2008
12. **Gill I., Ballesteros A.** 2000. “Bioencapsulation within synthetic polymers (part 1): sol-gel encapsulation biologicals”. *Trends Biotechnol.* 18, 282- 296.
13. **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.
14. **Goubin S., Huaying Z., Jianmin X., Guo C., Wangliang L. And Huizhou L.** 2006. “Biotransformation of hydrodesulfurized diesel oil with *Pseudomonas delafieldii* R-8 from high density culture”. *Biochemical Engineering Journal.* 27, 305- 309.

15. **Gray K., Mrachko G., Squires C.** 2003. "Biodesulfurization of fossil fuels". Current opinion in Microbiology. 6, 229-235.
16. **Gupta N., Roychoudhury P. K., & Deb. J. K.** 2005. Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66: 356-366
17. **Hames R., Rosemberg K. V., Lowe J. D., Barker S. E., Dhondt A. A.** 2002. Adverse Effects Of Acid Rain on the distribution of the Wood Thrush *Hylocichia Mustelina* in North America. *PNAS.* 99: 11.235 – 11.240
18. **Hou Y. Kong Y., Yang J., Zhang J. Shi D., Xin W.** 2005. Biodesulfurization of dibenzothiophene by immobilized cells of *Pseudomonas Stutzeri* UP-1. *Fuel.* 845: 1975 - 1979.
19. **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.
20. **Ibacache C.** 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. 2008
21. **International Energy Agency Office,** 2011, *Key World Energy Statistics.* París:OECD/IEA.
22. **Isea, D., Herrera, L., Cárdenas, C., Prieto, A., Delgado, J., Briceño, B.** 2002. Biodegradación del dibenzotiofeno por bacterias *Pseudomonas* aisladas de campo boscán. Centro de Investigación Facultad de Ingeniería. Universidad de Zulia. 8, 107-115.
23. **Kropp, K.G., Fredorak, P.M.,** 1998. A review of the occurrence, toxicity and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum. *Can. J. Microbiol.,* 44, 605-622.
24. **Lange, E., Pacheco, M.** Advances in Biocatalytic Desulphuration. Petroleum Technology Quarterly (PTQ). Autumn 37-43. 1999.
25. **Le Borgne S., Quintero R.** 2003. "Biotechnological processes for the refining of petroleum". Fuel Processing Technology. 81, 155-169.
26. **Lee J., Han S., Hyeon T.** 2004. "Synthesis of new nanoporous carbon material using nanostructured silica material as templates". *J. Mater. Che.* 14, 478-486.
27. **Li W., Zhang Y, Dong M., Shi Y.** 2005. Biodesulfurization of dibenzothiophene and other organic sulfur compounds by a newly isolated *Microbacterium* strainZDM2. FEMS Microbiology Lett 247: 45 – 50.
28. **Liu L., Poon R., Chen L., Frescura A. M., Montuschi P., Ciabattoni G., Wheeler A., Dales R.** 2009. Acute effects of air pollution on pulmonary function, Airway Inflammation, and oxidative stress in asthmatic children. *Environ Health Perspect* 117: 668-677.

29. **McFarland, B.L., Boron, D.J., Deeever, W., Meyer, J.A., Johnson, A.R., Atlas, R.M.** 1998. Biocatalytic Sulfur Removal from Fuels: Applicability for Producing Low Sulfur Gasoline. *Crit. Rev. Microbiol.* 24, 99-147.
30. **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.
31. **Moheballi G & Ball A. S.** 2008. Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels. *Microbiology* 154: 2169 – 2183.
32. **Monticello, D.** 2000. Biodesulfuration and the upgrading of petroleum destillates. *Curent Opinion in Biotechnology*, 11, 540-546.
33. **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". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 55, 374.
34. **Nemery, B., Hoet, P.H.M. and Nemmar, A.,** 2001. The Meuse Valley fog of 1930: an air pollution disaster. *The Lancet* 357(9257), 704-708.
35. **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
36. **Ojeda J., Escalona N., Baeza P., Escudey-Castro M., Gil-Llambías F. G.** 2003. Synergy between Mo/SiO₂ and Co/SiO₂ beds in HDS: A Remote Control Effect? *Chem Commun.* 13: 1608 – 1609.
37. **Ojeda J.** 2004. "Estudio de nuevos catalizadores para la Hidrodesulfuración e Hidrodesnitrogenación de Gasoil; El papel del Hidrógeno Spillover". Tesis Doctoral en Química. Universidad de Santiago de Chile.
38. **Ojeda J., Escalona N., Fierro J. L. G., López-Agudo A., Gil-Llambías F. G.** 2005. Effect of the preparation of Re/ γ -Al₂SO₃ catalysts on the HDS and HDN of Gasoil. *Appl Catal A: Gen:* 281: 25 – 30.
39. **Ojeda J., Escalona N., Palacios J. M., Yates M., Fierro J., López-Agudo A., Gil-Llambías F. G.** 2008. Promoter effect of CO on the catalytic activity of Re/ γ -Al₂SO₃ catalysts on the HDS and HDN of Gasoil. *Appl Catal A: Gen:* 350: 6 – 15.
40. **Onaka T., Konishi J., Ishii Y. And 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.
41. **Pakula R., Freeman A.** 1996. "A new continuous biofilm bioreactor for immobilized oil degrading filamentous fungi". *Biotechnol. Bioeng.* 49, 20- 25

42. **PEMEX**. 2008. Anuario Estadístico. México.
43. **Rall, H.T., Thompson, C.J., Coleman, H.J., Hopkins, R.L.**, 1972. In: Bulletin 659, Sulfur compounds in crude oil, U.S. Dept. of Interior, Bureau of Mines
44. **Reza, M., Bonakdarpour, B., Towflighi, J., Mehdi, M.** 2004. Design and operational aspects of airlift bioreactors for petroleum biodesulfuration. *Environmental Progress*. 23, 3.
45. **Rojas A.** “Estudio del proceso de biodesulfuración de gasoil, mediante la adición de un biosurfactante a sistemas de bacterias inmovilizadas” Tesis para optar al grado de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso. 2011
46. **Romieu I, Gouveia N, Cifuentes LA, de Leon AP, Junger W, Vera J, Strappa V, Hurtado-Díaz M, Miranda-Soberanis V, Rojas-Bracho L, Carbajal-Arroyo L, Tzintzun-Cervantes G.** 2012. “Multicity study of air pollution and mortality in Latin America (the ESCALA study)” *Res Rep Health Eff Inst*. 2012 Oct;(171):5-86.
47. **Setti L., Lanzarini G., Pifferi P.** 1997. “Whole cell biocatalysis for an oil desulfurization process”. *Fuel Processing Technology*. 52, 145-153.
48. **Shavandi, M., Sadeghizadeh, M., Zomorodipour, A., Khajek, K.** 2008. Biodesulfuration of dibenzothiophene by recombinant *Gordonia alkanivorans* RPI90A. *Bioresource Technology* 100, 475-479.
49. **Shaver A., Boily H., Lebus A. M.** 1996. Modeling the Claus reaction: Preparation of trans-Pt(PPh₃)₂(phthalimido)S(O)₂SR. *Inorg Chem*. 35: 6356 – 6357.
50. **Soleimani, M., Bassi, A., Margaritis, A.** 2007. Biodesulfuration of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnology Advances*. 25,570-596
51. **Stanislaus A. Marafi A., Rana M. S.** 2010. Recent advances in the science and technology of ultra low sulfur diesel (ULSD) production. *Catalysis Today* 153: 1 – 68.
52. **Tissot, B.P., Welte D.H.**, 1984. Petroleum formation and occurrence, 2^o Edición. *Springer-Verlag, Berlin*
53. **Vásquez R., Torres E., Valderrama B., Le Borgne S.** 2002. Will biochemical the catalyst impact the petroleum refining industry? *Energy Fuels* 16, 1239-1250.
54. **World Bank Group** in collaboration with the United Nations Environment Programme, and the United Nations Industrial Development Organization. 1999. Pollution prevention and abatement handbook: toward cleaner production. Washington D.C.: The World Bank
55. **Wang M., Li W., Shi Y., Wang D., Feng H.** 2006. Effects of surfactant on Biodesulfurization by *Corynebacterium sp.* ZD-1 In the presence of organic phase. *J Zhejiang Univ SCIENCE A* 7: 371-375.

56. **Wangliang L., Jiang X. 2013.** Enhancement of bunker oil Biodesulfurization by adding surfactant, *World J Microbiol Biotechnol* 29:103-108.
57. **Wayan I.B, Yamamura K., Sujaya I.N., Antara N.S., Aryanta W.R., Tanaka M., Tomita F., Sone T., Asano K. 2013.** Biodesulfurization of dibenzothiophene and Its derivatives using resting and immobilized cells of *Sphingomonas subartica* T7b. *J Microbiol Biotechnol* 23(4):473-482.
58. **Van Affender, M., Schacht, S., Klein, J. y Trüper, H. G., 1990,** Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium sp.* DO, *Arch. Microbiol.*, 153, 324-328.
59. **Yu, L.Q., Meyer, T.A., Folsom, B.R. 1998.** Oil/water/biocatalyst three phase separation process. US patent No. 5, 772,901.