



**Facultad de Farmacia**  
**Laboratorio de Biotecnología Microbiana**

**“ESTUDIO DEL PROCESO DE BIODESULFURACIÓN DE  
GASOIL, MEDIANTE LA ADICIÓN DE UN BIOSURFACTANTE  
A SISTEMAS DE BACTERIAS INMOVILIZADAS”**

**Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico**

**Andrés Eduardo Rojas González**

**Director de Tesis: Dr. Juan Ricardo Ojeda Herrera**  
**Co-Director de Tesis: Dr. Alejandro Dinamarca Tapia**

**VALPARAÍSO, 2011**



## **Tabla de Contenidos**

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>IV</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>VI</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>VIII</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>16</b>
1.- HIPÓTESIS.....	17
2.- OBJETIVOS.....	18
2. 1.- Objetivo General.....	18
2. 2.- Objetivos Específicos.....	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>20</b>
I.- MATERIALES.....	21
1.- Equipos.....	21
2.- Materiales de Laboratorio.....	22
3.- Reactivos.....	23
II.- MÉTODOS.....	25
1.- Obtención y Preparación de los materiales.....	25
1. 1.- Obtención y cultivo de los microorganismos biodesulfuradores.....	25
1. 2.- Obtención de los surfactantes.....	27
1. 3.- Obtención y preparación de los soportes.....	28
1. 4.- Preparación de los sustratos.....	28
2.- Determinación de la concentración óptima de surfactantes.....	29
3.- Ensayos con bacterias inmovilizadas.....	29
3. 1.- Adsorción de las bacterias sobre los soportes en estudio.....	29
3. 2.- Cuantificación de la adsorción de las bacterias.....	30
3. 3.- Ensayos biocatalíticos de sistemas inmovilizados.....	30
4.- Determinación de los productos de la biodesulfuración.....	31
4. 1.- Separación de la fase orgánica y acuosa.....	31
4. 2.- Medición de las muestras.....	32

<b>RESULTADOS.....</b>	<b>33</b>
1.- Determinación de la concentración óptima de surfactantes.....	34
1. 1.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS del DBT.....	34
1. 2.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS del 4,6-DMDBT.....	36
1. 3.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS de gasoil.....	38
2.- Ensayos con bacterias inmovilizadas.....	40
2. 1.- Adsorción de las bacterias sobre los soportes en estudio.....	40
2. 2.- Ensayos biocatalíticos de sistemas inmovilizados.....	41
2. 2. 1.- Actividad biodesulfuradora del DBT.....	41
2. 2. 2.- Actividad biodesulfuradora del 4,6-DMDBT.....	48
2. 2. 3.- Actividad biodesulfuradora del gasoil.....	54
<b>DISCUSIONES.....</b>	<b>60</b>
1.- Determinación de la concentración óptima de surfactantes.....	61
1. 1.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS del DBT.....	61
1. 2.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS del 4,6-DMDBT.....	62
1. 3.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS del gasoil.....	63
2.- Ensayos con bacterias inmovilizadas.....	65
2. 1.- Adsorción de las bacterias sobre los soportes en estudio.....	65
2. 2.- Ensayos biocatalíticos de sistemas inmovilizados.....	66
2. 2. 1.- Actividad biodesulfuradora del DBT.....	66
2. 2. 2.- Actividad biodesulfuradora del 4,6-DMDBT.....	67
2. 2. 3.- Actividad biodesulfuradora del gasoil.....	68
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>69</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>72</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>78</b>
ANEXO 1: Composición del gasoil.....	79
ANEXO 2: Cuantificación de la concentración de bacterias en el medio.....	80

## **Agradecimientos**

Quisiera agradecer en primer lugar a mi familia, la que siempre me apoyó en todo sentido para lograr mi propósito.

También quiero agradecer a mi director de tesis, el Dr. Juan Ojeda por toda su preocupación y dedicación que le dedicó a este trabajo. Y al profesor Patricio Baeza por su buena voluntad y disposición, al facilitarnos el uso del cromatógrafo.

Y finalmente, agradecer a todos mis amigos y compañeros que me apoyaron, directa o indirectamente, a ya sea agitando embudos de decantación, o dándome apoyo moral cuando las cosas no resultaban y se estancaban.

Por su preocupación y apoyo.

Muchas Gracias.

**Resumen**

La biodesulfuración (BDS) es una tecnología que utiliza microorganismos para remover selectivamente el átomo de azufre desde las moléculas sulfuradas contenidas en el petróleo, sin alterar su esqueleto hidrocarbonado. Sin embargo, la principal limitante de este proceso está referida a la baja biodisponibilidad que presentan los sustratos organosulfurados para los microorganismos. En este contexto, han sido reportadas como mejoras tecnológicas la utilización de surfactantes en el medio de BDS, y la inmovilización bacteriana por adsorción sobre diferentes soportes inorgánicos. En esta investigación se estudió el efecto del sorbitán monooleato de polietilenglicol (Tween 80) y de un biosurfactante, en sistemas de bacterias adsorbidas sobre sílice, sepiolita y alúmina. Los resultados demostraron que la adición de los surfactantes al medio de reacción de BDS del dibenzotiofeno (DBT) y de gasoil, produjo un aumento en los valores de la actividad de BDS, mientras que para el caso del 4,6-dimetildibenzotiofeno (4,6-DMDBT) no fue observado ningún incremento. Los mecanismos propuestos de mejora de la actividad de BDS en sistemas inmovilizados, están referidos a la emulsificación de los sustratos sulfurados, lo cual facilita la interacción con las bacterias, o a una disminución de la tensión superficial del agua, lo que ocasiona una mayor movilidad de las partículas del sólido en el medio de reacción. De acuerdo a los resultados obtenidos es posible demostrar que la combinación de materiales adsorbentes y surfactantes adicionados al medio biocatalítico, representa una mejora en los procesos de biotratamiento de contaminantes del petróleo.



***Abstract***

---

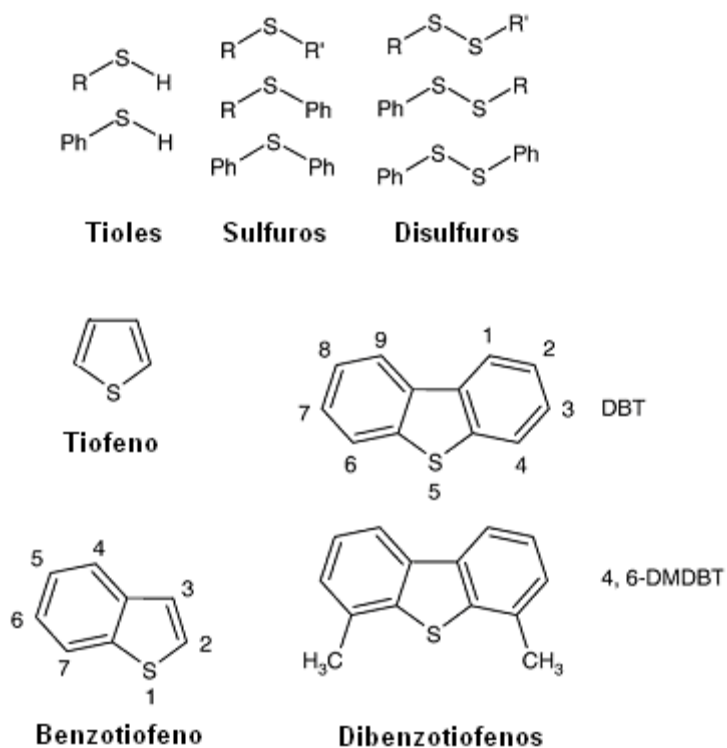
Biodesulfurization (BDS) is a technology that uses microorganisms to remove selectively the sulfur atom from molecules contained in petroleum, without altering their hydrocarbon skeleton. However, the main limitation is referred to the low bioavailability presented by organosulfur substrates for microorganisms. In this context, have been reported as technological improvements the use of surfactants in the medium of BDS, and the bacterial immobilization by adsorption on different inorganic supports. In this research we studied the effect of a biosurfactant and polyethylene glycol sorbitan monooleate (Tween 80), in bacterial systems adsorbed on silica, sepiolite and alumina. The results showed that the addition of surfactants to the reaction medium of BDS of dibenzothiophene (DBT) and gasoil, produced an improvement in the values of the BDS activity, whereas in the case of 4,6-dimethyldibenzothiophene (4,6-DMDBT) it was not observed any increase. The proposed mechanisms for improvement of the activity of BDS in immobilized systems are related to the emulsification of sulfur substrates, which facilitates interaction with bacteria, or to a decrease in the surface tension of water, resulting in a greater mobility of solid particles in the reaction medium. According to the obtained results, it can be shown that the combination of absorbent materials and surfactants added to the biocatalytic medium represents an improvement in the processes of biotreatment of oil pollutants.

## ***Introducción***

---

A nivel mundial, cerca de un 85% de la energía utilizada se origina a partir de los combustibles fósiles. De este consumo, un 40% de la energía proviene desde los aceites del petróleo, seguido por un 24% desde el carbón, y un 22% desde el gas natural [Gupta y col., 2005]. Este alto consumo ha llevado a la explotación de capas cada vez más profundas de los yacimientos petrolíferos, encontrando una mayor cantidad de compuestos sulfurados de alta masa molecular, y más resistentes a los procesos de purificación convencionales, lo cual resulta en un incremento del contenido de azufre en los productos terminados del petróleo [Bhatia y Sharma, 2010].

Actualmente el contenido de azufre en el crudo puede variar entre 0,03% p/p y 7,89% p/p (300 ppm a 78.900 ppm) [Mohebbali y Ball, 2008]. Dentro de las moléculas sulfuradas presentes en el petróleo del tipo orgánico (organosulfurados) podemos encontrar compuestos aromáticos o saturados, en forma de tioles, sulfuros y heterociclos (figura 1). Mientras que en las fracciones destiladas intermedias del diesel se encuentran principalmente heterociclos aromáticos sulfurados como el tiofeno, benzotiofeno o dibenzotiofeno, y sus derivados alquilados (figura 1) [Stanislaus y col., 2010; Wang y col., 2006]. Tales compuestos son de gran interés debido a su mayor resistencia a los procesos de desulfuración tradicionales.



**Figura 1:** Estructura de los compuestos organosulfurados comúnmente encontrados en el petróleo [Modificado de Soleimani y col. (2007)].

La combustión de las moléculas sulfuradas presentes en los derivados del petróleo genera óxidos volátiles, como el dióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ). Este compuesto es considerado como uno de los principales contaminantes atmosféricos [Soleimani y col., 2007], estimando una liberación anual a la atmósfera de aproximadamente 2 toneladas de moles de  $\text{SO}_2$ , principalmente desde fuentes móviles e industrias [Doney y col., 2007].

El SO<sub>2</sub> adsorbido sobre el material particulado, que también es generado por la combustión en vehículos, puede ser respirado y llegar muy profundo en el tracto respiratorio [World Bank Group, 1999]. Una vez dentro se disuelve y produce ácido sulfuroso (H<sub>2</sub>SO<sub>3</sub>), el cual puede producir irritación de garganta y de las vías respiratorias. Una exposición al SO<sub>2</sub> ambiental se ha asociado a un aumento del estrés oxidativo, a una reducción de la función pulmonar, y a un aumento de la incidencia de enfermedades respiratorias, especialmente en personas susceptibles, como asmáticos, niños y ancianos [Liu y col., 2009; World Bank Group, 1999]. Estudios *in vitro* en linfocitos humanos han demostrado que el ácido sulfuroso y sus derivados (sulfito y bisulfito) poseen efectos clastogénicos y genotóxicos, pudiendo inducir aberraciones cromosomales, intercambio de cromátidas hermanas y micronúcleos [Meng y col., 2004].

Asimismo, el SO<sub>2</sub> puede formar ácido sulfuroso en la atmósfera al disolverse con la humedad ambiental, pudiendo generar lluvia ácida o neblinas con bajo pH [World Bank Group, 1999], tal situación puede acelerar la corrosión de construcciones y edificaciones, y también producir la acidificación de la superficie terrestre y oceánica, afectando negativamente la flora y fauna del sector [Doney y col., 2007; Hames y col., 2002].

Además, los óxidos de azufre pueden envenenar los convertidores catalíticos de vehículos, reduciendo su capacidad de disminuir las emisiones de contaminantes atmosféricos, tales como óxidos de nitrógeno, monóxido de carbono y compuestos orgánicos volátiles [Gupta y col., 2005; Stanislaus y col., 2010]. Por otro lado, se ha demostrado que la utilización de combustibles con un bajo contenido de azufre reduce la corrosión, y disminuye la acidificación del líquido lubricante del motor, lo cual aumenta su vida útil [Monticello, 2000; Stanislaus y col., 2010].

Muchos países han reconocido los problemas relacionados con el  $\text{SO}_2$  y han decidido reducir sus emisiones, de acuerdo a las regulaciones legales de protección ambiental vigentes [Fletcher, 2000; PEMEX, 2008], limitando cada vez más el contenido de azufre permitido en los combustibles. En nuestro país, en el año 2007 se empezó a exigir una concentración máxima de 350 ppm de azufre en el diesel, reduciendo hasta 50 ppm el valor permitido a partir del año 2010 [Monticello, 2000; Stanislaus y col., 2010].

### **La Hidrodesulfuración:**

En la actualidad, los procesos más utilizados en el mejoramiento de la calidad del diesel, son los de hidrotratamiento, al que se someten los gasóleos primarios, gasóleos de vacío, productos de desintegración, y los obtenidos en las plantas de hidrodesintegración [Ojeda, 2004]. Estos procesos se dividen en dos grandes grupos: i) los de hidroconversión, en los que se producen cambios en la masa y en la estructura de las moléculas orgánicas, y ii) los procesos de purificación donde se remueven heteroátomos como azufre, nitrógeno, y oxígeno, de las moléculas orgánicas que los contienen. El más importante de los procesos de purificación es la hidrodesulfuración (HDS) desde el punto de vista del volumen de los productos tratados [Gálvez, 2008]. En esta metodología, el átomo de azufre del compuesto sulfurado es reducido a sulfuro de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{S}$ ) mediante la utilización de catalizadores, (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 temperaturas y presiones de hidrógeno ( $\text{H}_2$ ) [Soleimani y col., 2007]. Posteriormente, el  $\text{H}_2\text{S}$  generado en la reacción puede ser oxidado a azufre elemental y agua mediante el proceso denominado Claus [Elsner y col., 2003; Shaver y col., 1996].

La HDS es muy efectiva para remover el azufre desde compuestos inorgánicos y algunos orgánicos simples, presentes en las fracciones destiladas superiores del petróleo, tales como los tioles, sulfuros y disulfuros (figura 1) [Soleimani y col., 2007]. Sin embargo, en los destilados intermedios y en los denominados “fondos de barril”, se encuentra una gran cantidad de compuestos organosulfurados aromáticos, como benzotiofenos y dibenzotiofenos (DBT), o con grupos alifáticos cercanos al átomo de azufre, como el 4-metil dibenzotiofeno o el 4,6-dimetil dibenzotiofeno (4,6-DMDBT). Tales moléculas presentes en el petróleo son refractarias al proceso de degradación debido a su alta estabilidad y complejidad [Stanislaus y col., 2010; Wang y col., 2006].

En este contexto, las condiciones de reacción empleadas en la HDS dependen del nivel de desulfuración requerido y de la reactividad de los compuestos a hidrodeshulfurar. Actualmente las refinerías mundiales utilizan en este proceso temperaturas que varían entre 290 y 450 °C, y presiones de H<sub>2</sub> entre 1 y 20 MPa. [Wang y col., 2006]. Sin embargo, debido a la mayor concentración de compuestos refractarios en el petróleo, y sumado al aumento de las regulaciones legales de protección ambiental [Fletcher, 2000; PEMEX, 2008], se ha llevado a la generación de un nuevo tipo de hidrotreatmento denominado “hidrodeshulfuración profunda” [Mohebbali y Ball, 2008; Ojeda, 2004]. Este proceso utiliza temperaturas y presiones de trabajo mucho mayores que los procesos convencionales, lo cual no sólo encarece el proceso catalítico, si no que además disminuye la vida útil del catalizador y la calidad de los combustibles en lo que se refiere a su índice de octanaje [Mohebbali y Ball, 2008].

Lo anterior ha llevado a la necesidad de investigar tecnologías nuevas o alternativas, que permitan encontrar sistemas catalíticos más activos, para aumentar así la eficacia de



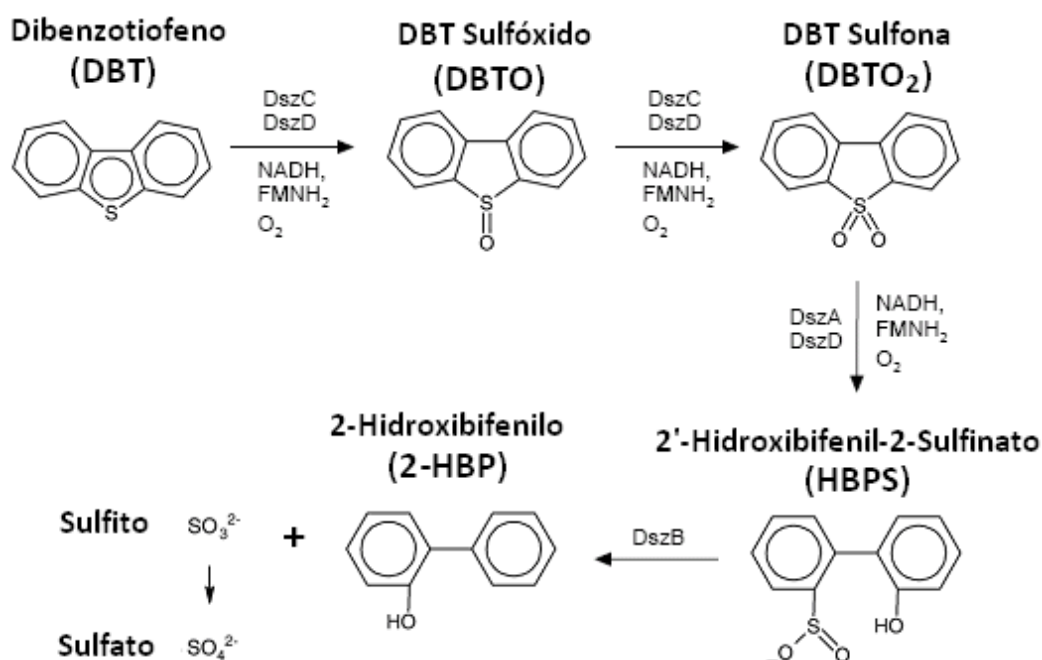
los procesos de desulfuración catalítica, y disminuir los gastos energéticos asociados al proceso [Ojeda y col., 2003; Ojeda y col., 2005; Ojeda y col., 2008].

### **La Biodesulfuración:**

La utilización de microorganismos que sean capaces de remover selectivamente el átomo de azufre desde moléculas organosulfuradas sin alterar el esqueleto hidrocarbonado, resulta una tecnología innovadora con un amplio campo de aplicación [Gray y col., 2003; Le Borgne y Quintero, 2003; Setti y col., 1997]. Este proceso es denominado desulfuración biocatalítica, o biodesulfuración (BDS), y a diferencia de la HDS, esta metodología utiliza condiciones de temperaturas cercanas a la ambiental y presión atmosférica, lo cual disminuye los gastos energéticos del proceso [Mohebali y Ball, 2008; Monticello, 2000]. Además como los productos de reacción no son tóxicos (azufre en forma de sulfito, o sulfato), no se necesitan técnicas adicionales para su eliminación, al contrario de la HDS.

Previo a la aplicación industrial de la BDS del petróleo, se han realizado múltiples ensayos con moléculas modelo, como el DBT y el 4,6-DMDBT, que han permitido estudiar las rutas metabólicas, y predecir el comportamiento del proceso con muestras reales y complejas [Bhatia y Sharma, 2010; Wang y col., 2006]. En este contexto, Kodama y col. (1973) fueron los primeros investigadores que propusieron un mecanismo de BDS aeróbica utilizando al DBT como molécula modelo. Sin embargo, el primer trabajo que reportó la degradación selectiva de compuestos orgánicos sulfurados, realizados por cepas provenientes de *Rhodococcus erythropolis*, fue efectuado por Kilbane (1992). Por otro lado, Marcelis (2002) propuso un mecanismo de degradación de sulfuros para la desulfurización de DBT, utilizando *Rhodococcus erythropolis* como bacteria

biodesulfuradora. Este mecanismo involucra cuatro pasos enzimáticos consecutivos, designado como mecanismo 4S (figura 2). El primer paso postula inicialmente una oxidación del DBT a un sulfóxido (DBTO), luego una segunda oxidación hasta una sulfona (DBTO<sub>2</sub>), posteriormente la transformación a un sulfinato (HBPS), y finalmente ocurre una hidrólisis que genera como productos finales el 2-Hidroxibifenilo (2-HBP) y sulfito (SO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), el cual posteriormente es oxidado a sulfato (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>) [Stanislaus y col., 2010]. Los sulfatos generados son utilizados por la bacteria para sus requerimientos metabólicos, y los hidroxibifenilos son excretados hacia el medio y, debido a su lipofilia, vuelven a formar parte de la fase orgánica (combustibles fósiles), conservando las características combustibles de ésta, sin alterar su capacidad calorífica [Mohebali y Ball, 2008; Monticello, 2000].



**Figura 2.** Ruta metabólica 4S (Sulfóxido, Sulfona, Sulfinato, Sulfato) de metabolización enzimática del Dibenztiofeno (DBT) [Modificado de Ibacache (2008)].

Desde el punto de vista enzimático, el mecanismo 4S es una ruta metabólica específica que involucra a 4 enzimas. La primera es una monooxigenasa denominada DszC, que cataliza la oxidación del DBT a DBTO<sub>2</sub> en dos etapas consecutivas, pasando por el intermediario DBTO; posteriormente otra monooxigenasa (DszA), abre el anillo generando el HBPS. Estos tres pasos enzimáticos necesitan de Oxígeno (O<sub>2</sub>) y de FMNH<sub>2</sub> (flavín mononucleótido reducido), éste último es generado por la acción de DszD, una flavin reductasa, que consume el NADH (nicotinamida adenina dinucleótida) generado a partir del metabolismo celular. Finalmente la enzima DszB, una desulfurinasa, realiza la desulfuración del HBPS para generar el 2-HBP y sulfito. Posteriormente éste último es oxidado a sulfato por la bacteria (figura 2) [Moheballi y Ball, 2008; Soleimani y col., 2007]. Las enzimas DszA, DszB y DszC son hidrosolubles y probablemente se encuentren en el citoplasma, sin embargo se piensa que la BDS ocurre en asociación con la membrana celular, donde sustratos extracelulares y cofactores intracelulares son accesibles [Moheballi y Ball, 2008].

### **Los Surfactantes y Biosurfactantes:**

A pesar de las diversas investigaciones que se han realizado en el área de la BDS, ésta aún presenta dificultades que no han sido solucionadas. Entre estas se encuentran los costos de la biocatálisis, el diseño del reactor, la separación de las fases acuosa y orgánica, la estabilidad y el tiempo de vida del biocatalizador [Bhatia y Sharma, 2010; Caro y col., 2007; Gupta y col., 2005; Naito y col., 2001]. Sin embargo, se considera que la principal limitante de este proceso es la baja biodisponibilidad que presentan los sustratos organosulfurados (ubicados en la fase hidrofóbica), hacia las bacterias

biodesulfuradoras (ubicadas en la fase hidrofílica) [Barkay y col., 1999]. Por esta razón, algunas bacterias producen moléculas con características tensoactivas y/o emulsificantes (biosurfactantes), las cuales pueden ser expresadas en la superficie celular o ser excretadas al medio, para facilitar la interacción, o aumentar la solubilidad de los sustratos orgánicos [Gautman y Tyagi, 2006; Ibacache, 2008].

Los surfactantes, en general, son moléculas anfipáticas con un extremo hidrofílico y otro hidrofóbico (generalmente hidrocarbonado), lo que permite que se ubiquen preferentemente en la interfase de fluidos con diferentes grados de polaridad, como las interfases aire/agua o aceite/agua. Estas propiedades permiten a los surfactantes reducir la tensión superficial e interfacial, respectivamente [Desai y Banat, 1997; Sadouk y col., 2008], y también formar emulsiones o microemulsiones, por sobre la concentración micelar crítica (CMC) (concentración por sobre la cual, las moléculas del surfactante comienzan a formar agregados, llamados micelas [Han y col, 2001]), en donde aumenta la solubilización relativa de la fase dispersa en la fase dispersante [Desai y Banat, 1997].

Últimamente han surgido algunas investigaciones que estudian el efecto de la adición de diversos surfactantes de origen sintético sobre la BDS del DBT [Caro y col., 2007; Feng y col., 2006; Han y col., 2001; Hou y col., 2005; Wang y col., 2006]. Si bien muchos surfactantes pueden aumentar la solubilidad del DBT en la fase acuosa, varios han demostrado tener efectos negativos en el crecimiento bacteriano y en la actividad biodesulfuradora debido a su toxicidad para los microorganismos [Wang y col., 2006]. En este contexto, Feng y col. (2006) estudiaron el efecto del sorbitán monooleato de polietilenglicol (Tween 80) en el crecimiento de *Rhodococcus erythropolis*, y encontraron que cuando el 2-HBP se acumulaba hasta cerca de 0,2 mM en los ensayos controles, se

inhibía completamente el crecimiento celular y la desulfuración, sin incrementar más la producción de 2-HBP. Con la adición de Tween 80 al 0,4 %, la concentración que inhibía el crecimiento bacteriano se elevó hasta cerca de 0,4 mM de 2-HBP. Esto se explica por la solución micelar producida por Tween 80, que reduce la concentración del 2-HBP cerca de la célula, disminuyendo su efecto inhibitorio y produciendo un aumento de la actividad desulfuradora, así como también de la biomasa y de la producción de 2-HBP. El mismo estudio encontró que por sobre la CMC de Tween 80, cercana al 0,35 %, se alcanzó la máxima actividad desulfuradora, un 35% mayor a la encontrada sin Tween 80. Sin embargo, otras investigaciones en el mismo campo utilizando el surfactante Tween 80, han demostrado ser relativamente inocuo para las bacterias [Feng y col., 2006; Wang y col., 2006], lo cual demostraría que este efecto debe ser estudiado con mayor profundidad.

Si bien existe una amplia gama de surfactantes sintéticos que podrían ser aplicados en reacciones de BDS de gasoil, el uso de surfactantes de origen biológico, conocidos como biosurfactantes (BS), representaría numerosas ventajas comparativas. Entre estas se pueden mencionar que poseen, por ejemplo: (i) una fácil biodegradación, (ii) buena biocompatibilidad, (iii) baja toxicidad, (iv) una alta especificidad, incluso a temperaturas, pH o salinidades extremas, (v) la posibilidad de producirlos mediante materias primas renovables, y (vi) un amplio campo de utilización, como en la biorremediación, detoxificación y otros eventos ambientales, en la recuperación del petróleo crudo, para el cuidado de la salud y en procesos industriales de alimentos. Sin embargo su principal desventaja es su alto costo de obtención debido a su bajo rendimiento de producción [Desai y Banat, 1997; Gautman y Tyagi, 2006; Sadouk y col., 2008].

Trabajos realizados en el laboratorio de biotecnología microbiana de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso [Ibacache, 2008], permitieron aislar desde muestras de agua de mar, tomadas en pozas intermareales de Montemar y desde la zona de rompiente de la Playa Negra de Con Con, treinta y tres cepas de bacterias capaces de utilizar hidrocarburos derivados del petróleo como fuente de energía, carbono y azufre. Bajo condiciones de crecimiento en medio de cultivo marino complejo inducido con hidrocarburos derivados del petróleo, fue posible seleccionar seis cepas productoras de biosurfactantes, capaces de disminuir la tensión superficial del agua ultrapura [Ibacache, 2008]. Con estos antecedentes, se evaluó la influencia de estos compuestos en reacciones de BDS de gasoil catalizadas por la bacteria *Pseudomonas stutzeri* no inmovilizada. Los resultados demostraron que dos tipos de biosurfactantes, provenientes de las cepas MM1A2H y MM2B4I, incrementaron la actividad de desulfuración biocatalítica en un 29% y 19%, respectivamente. El aumento de la actividad de BDS de gasoil se relacionó con la capacidad de emulsificación de los biosurfactantes sobre el sustrato sulfurado y con la cantidad de surfactante agregado a la reacción.

### **La inmovilización de bacterias:**

La utilización de bacterias inmovilizadas surge como una alternativa en los procesos de biotransformación [Gill y Ballesteros 2000; Pakula y Freeman, 1996]. Mediante esta metodología se puede obtener mayor estabilidad operacional, bajo riesgo de contaminación del medio de reacción, mayor tiempo de vida del biocatalizador, mayor interacción entre las fases inmiscibles, mayor facilidad de separación de los productos de

reacción biodesulfurados, y una mejora en la biodisponibilidad de los sustratos sulfurados [Chang y col., 2000; Gill y Ballesteros, 2000; Pakula y Freeman, 1996].

Una de las primeras aplicaciones en la BDS que se realizaron en este campo fue la utilización de un método de encapsulamiento de bacterias en un material polimérico [Naito y col., 2001]. En este sistema, la difusión de los sustratos hacia las bacterias y la difusión de los productos desde las mismas, ocurre a través de los poros formados en la matriz polimérica. La mayoría de los materiales utilizados son polímeros tales como, alginatos, gelatinas o quitosanos. Sin embargo, una de las desventajas de esta metodología son los problemas de tipo difusionales y estéricos, especialmente cuando se utilizan sustratos de gran tamaño molecular [Naito y col., 2001]. Hou y col., (2005) estudiaron la biodesulfuración de DBT utilizando bacterias encapsuladas del género *Pseudomonas stutzeri* UP-1, aisladas desde suelos contaminados y aguas residuales. En esta investigación se encontró que el alginato de sodio es un material muy apropiado para ser utilizado como inmovilizante. Además, se observó una mayor estabilidad y un mayor tiempo de vida en las bacterias, cuando éstas se inmovilizan. En el año 2005, Li y col. estudiaron la desulfurización microbiana de gasolina por *Mycobacterium goodii* X7B, utilizando un sistema de encapsulación de bacterias en alginato de sodio. En este trabajo se observó una disminución en la concentración de azufre en la muestra combustible en un valor cercano al 69 %.

Por otro lado, la inmovilización biocatalítica por adsorción sobre un material inorgánico presenta ventajas en comparación a los métodos de encapsulamiento. Los problemas de transferencia de masa y estéricos son eliminados cuando las bacterias son soportadas [Dinamarca y col., 2010]. Los materiales inorgánicos utilizados como

biosoportes deben tener ciertas características, tales como el ser inertes al ataque biológico, insolubles en el medio de cultivo y no ser tóxicos para las células microbianas, las cuales deben conservar su actividad metabólica. [Dinamarca y col., 2010; Lee y col., 2004].

Recientemente el grupo de trabajo perteneciente al laboratorio de biotecnología microbiana de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Valparaíso [Dinamarca y col., 2010], estudiaron el efecto de distintos soportes sobre la adsorción de *Pseudomona stutzeri* y su influencia en la actividad de BDS de gasoil. En este trabajo se utilizaron cuatro soportes con propiedades estructurales y fisicoquímicas distintas: alúmina, sílice, sepiolita y titanía. Los resultados demostraron que la adsorción de *P. stutzeri* sobre la superficie de los sólidos está determinada por fuerzas de tipo electrostáticas y físicas, las cuales son dependientes de la naturaleza del soporte y del pH de trabajo. Además se encontró en todos los sistemas estudiados una directa relación entre el grado de adsorción de *P. stutzeri* y la actividad de BDS de gasoil, demostrando que una alta interacción entre la bacteria y el soporte permite una mayor biodisponibilidad de los sustratos orgánicos. La comparación de los diferentes soportes utilizados determinó que los sistemas que utilizaron sílice y sepiolita fueron los más activos, en las condiciones de reacción ensayadas.

A pesar de los grandes avances que se han realizado en las últimas décadas en los procesos de BDS de gasoil, principalmente referidos al descubrimiento de nuevas cepas desulfuradoras, al estudio de las rutas metabólicas, y al aumento de la biodisponibilidad de las moléculas sulfuradas, esta metodología aún debe ser mejorada para ser considerada como una real aplicación, complementaria a los procesos de hidrotreatmento



convencionales actualmente utilizados. En este sentido, la combinación de los procesos que han sido anteriormente informados como mejoras en las metodologías biotecnológicas de BDS de gasoil, surge como una alternativa viable para lograr este propósito.

Este trabajo tiene como finalidad estudiar la influencia de un biosurfactante sobre la actividad de BDS de gasoil, utilizando un sistema biocatalítico inmovilizado mediante un proceso de adsorción sobre diferentes soportes inorgánicos.

## **Hipótesis y Objetivos**

## **1.- HIPÓTESIS:**

La incorporación de surfactantes al medio de reacción biocatalítico, utilizando células inmovilizadas por adsorción sobre soportes inorgánicos, aumentaría la biodisponibilidad de los sustratos órganosulfurados, mejorando el proceso de biodesulfuración de gasoil.

## **2.- OBJETIVOS:**

### **2. 1.- Objetivo General:**

Estudiar el proceso de la desulfuración biocatalítica mediante la inmovilización por adsorción de bacterias con actividad biodesulfuradora, y la incorporación de moléculas surfactantes al medio de reacción.

## **2. 2.- Objetivos Específicos:**

- Determinar la concentración óptima de cada surfactante, que permita obtener la máxima actividad de BDS del DBT, 4,6-DMDBT y de gasoil, en sistemas de bacterias libres.
- Evaluar la actividad catalítica de BDS del DBT, en un sistema inmovilizado por adsorción de bacterias con y sin la adición de surfactantes.
- Evaluar la actividad catalítica de BDS del 4,6-DMDBT, en un sistema inmovilizado por adsorción de bacterias con y sin la adición de surfactantes.
- Evaluar la actividad catalítica de BDS de un gasoil hidrodesulfurado, en un sistema inmovilizado por adsorción de bacterias con y sin la adición de surfactantes.
- Comparar el efecto obtenido con el biosurfactante sobre la actividad de BDS del DBT, 4,6-DMDBT y de gasoil, con el obtenido por un surfactante sintético comercial.

## ***Materiales y Métodos***

## **I.- MATERIALES**

### **1.- Equipos:**

- Autoclave Huxley® Speedy, modelo HL – 340.
- Balanza Analítica Mettler®, modelo AE 163.
- Centrifuga con refrigeración Eppendorf® modelo 5810R.
- Cromatógrafo de gases Shimadzu®, modelo GC-2010 con detector FID, columna capilar SPB-5
- Desionizador de agua Heal Force®, modelo NW Ultra Pure Water System.
- Espectrofotómetro Thermo®, modelo Génesis 10uv.
- Estufa de incubación Binder®, modelo ED 53 N° 03-55859.
- Freezer Whirpool®, modelo WVG29.
- Horno de inducción Lecco®, modelo S-144DR con detector Infrarrojo.
- Incubadora con agitación Zhicheng® modelo zhwy-200d.
- Mechero Bunsen Fisher®.
- Microscopio Olympus®, modelo CX21.
- Mufla Naber®, modelo N3 D2804 Lilenthal/Bremen.
- Refrigerador Fensa Progress 3705 XF Eurosystem®.
- Vórtex Cientec® Maxi Mix II, tipo 37600 mixer.

## **2.- Materiales de Laboratorio:**

- Asa de siembra en Loop.
- Botellas con tapa Duran Schott® de 100, 200, 500 y 1000 mL.
- Cápsulas de porcelana.
- Celdas para espectrofotometría.
- Criotubos.
- Embudo de Büchner y Matraz Kitazato.
- Embudos de decantación Duran Schott® de 100 mL.
- Matraces Erlenmeyer Duran Schott® de 25, 50, 250 y 500 mL de capacidad.
- Micropipetas BioPette®, modelos p10, p20, p200, p1000 y p5000.
- Mortero de porcelana con Pistilo.
- Papel de filtro Macherey-Nagel® MN 617 Ø125mm №4.
- Placas de Petri desechables Greiner Bio-One®.
- Portaobjetos.
- Probetas Graduadas de 25, 100 y 1000 mL de capacidad.
- Puntas para micropipetas desechables (p10, p200, p1000, p5000).
- Soporte universal con pinzas y aros metálicos.
- Tamiz U.S.A. Standard Test Sieve. ASTM E11 Specification. №10, №16 y fondo.
- Tubos de ensayo Duran Schott®.
- Tubos Eppendorf® 1,5 mL y 2,0 mL.
- Tubos Falcon® de 10 y 50 mL.
- Vasos Precipitados Duran Schott® de 25, 50, 100 y 500 mL. vidrio y plásticos.



### 3.- Reactivos

- 4,6-dimetildibenzotiofeno (4,6-DMDBT), Acros Organics®.
- Aceite de inmersión, Fluka®.
- Acetato de etilo (C<sub>4</sub>H<sub>8</sub>O<sub>2</sub>) Merck®.
- Agar Nutritivo, Oxoid®.
- Alúmina (Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) D10-10 BASF, (área BET: 140 m<sup>2</sup> g<sup>-1</sup>).
- BD Bacto™ Triptona.
- Biosurfactante.
- Caldo LB, MO BIO Laboratories®.
- Citrato de sodio dihidratado (Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> x 2H<sub>2</sub>O), Merck®.
- Cloruro de amonio (NH<sub>4</sub>Cl), Merck®.
- Cloruro de calcio (CaCl<sub>2</sub>), Merck®.
- Cloruro de cobre II (CuCl<sub>2</sub>), Merck®.
- Cloruro de hierro II tetrahidratado (FeCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O), Merck®.
- Cloruro de magnesio hexahidratado (MgCl<sub>2</sub> x 6H<sub>2</sub>O), Merck®.
- Cloruro de manganeso II tetrahidratado (MnCl<sub>2</sub> x 4H<sub>2</sub>O), Merck®.
- Cloruro de sodio (NaCl), Merck®.
- Cloruro de zinc (ZnCl<sub>2</sub>), Merck®.
- Dibenzotiofeno (DBT), Merck®.
- Etanol Absoluto, Merck®.
- Extracto de levadura, Winkler®.
- Fosfato diácido de potasio (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), Merck®.
- Fosfato monoácido de potasio (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>), Merck®.
- Gasoil prehidrotratado (0,35% p/p de azufre) (Refinería Con-Con, ENAP, Chile).

- Glicerol, Merck®.
- Isooctano ( $C_8H_{18}$ ) Merck®.
- Lugol, cristal violeta y safranina para tinción Gram, Merck®.
- Molibdato de sodio ( $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$ ), Merck®.
- n-Hexadecano ( $C_{16}H_{34}$ ), Merck®.
- Polyoxyethylenesorbitan monooleate (Tween 80) Sigma®.
- Sepiolita ( $Si_{12}O_{30}Mg_8(OH)_4(H_2O)_4 \times 8H_2O$ ) 120 NF Tolsa (área BET:  $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ).
- Sílice ( $SiO_2$ ) D11-10 BASF (área BET:  $80 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ).
- Succinato de sodio hexahidratado ( $Na_2C_4H_4O_4 \times 6H_2O$ ), Merck®.
- Tungstato de sodio ( $Na_2WO_4$ ), Merck®.

## II. MÉTODOS

### 1.- Obtención y Preparación de los materiales

#### 1. 1.- Obtención y cultivo de los microorganismos biodesulfuradores

##### Obtención de la bacteria biodesulfuradora

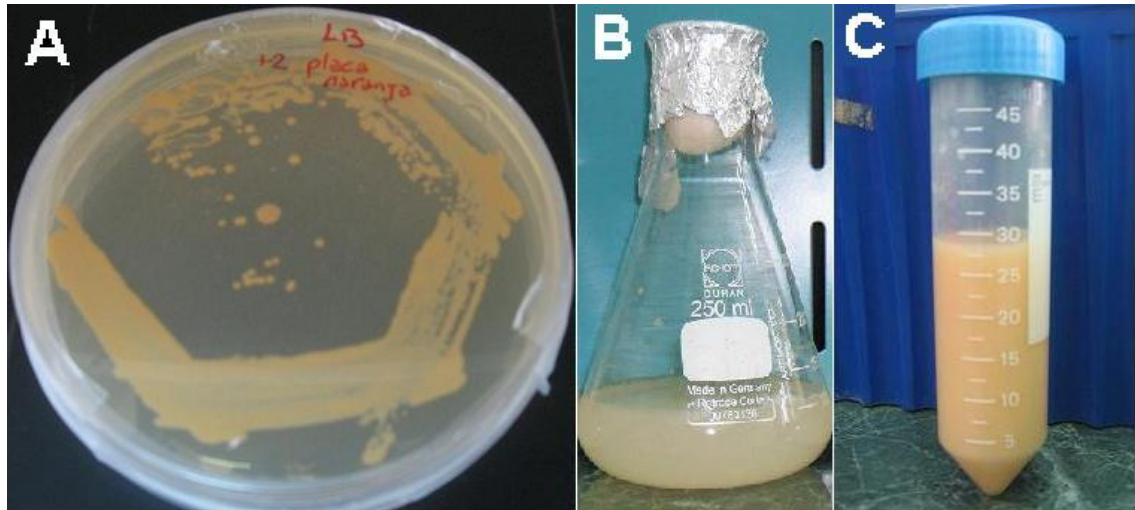
Se trabajó con la cepa bacteriana *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (ATCC 53968), la cual fue obtenida comercialmente en American Type Cell Collection (ATCC). Ésta fue conservada a -20 °C en un glicerol (caldo nutritivo cultivado con glicerol al 20%), a partir del cual se sembró una placa de agar Luria Bertani (LB) por la técnica de agotamiento por estrías. Una vez crecido el cultivo en placa, se guardó en un refrigerador a 4 °C para su conservación (figura 3-A).

##### Crecimiento y Cultivo Bacteriano

La cepa bacteriana fue crecida en 100 mL de un Medio Mínimo A [Maghsoudi y col., 2000] (tabla 1), suplementado con Citrato de sodio 2 g L<sup>-1</sup> y Succinato de sodio 0,03 M como fuente de carbono y de energía, y con DBT 0,0623 mM como única fuente de azufre disponible (figura 3-B). Estos medios de cultivo fueron sembrados a partir de un preinóculo de 10 mL de igual composición, sembrado a su vez desde de las colonias de la placa de agar LB perfectamente aisladas. Los cultivos fueron dejados crecer por tres días en un agitador rotatorio a 200 r.p.m. y a 30 °C para que los microorganismos se desarrollaran hasta su fase exponencial de crecimiento [Gálvez, 2008].

**Tabla 1:** Composición del Medio Mínimo A

Sal	Concentración (g L <sup>-1</sup> )
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	4
NH <sub>4</sub> Cl	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5
CaCl <sub>2</sub>	0,265
MgCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	0,02
NaCl	0,01
FeCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,005
MnCl <sub>2</sub> x 4H <sub>2</sub> O	0,005
ZnCl <sub>2</sub>	0,005
CuCl <sub>2</sub>	0,0005
Na <sub>2</sub> WO <sub>4</sub>	0,0005
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	0,0001
Agua destilada estéril	c.s.p. 1 L



**Figura 3:** **A:** Placa de agar LB sembrada a partir de un glicerol de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. **B:** Medio de 100 mL cultivado con la bacteria *R. rhodochrous* IGTS8. **C:** Pool de bacterias obtenido tras la centrifugación de 9 medios de cultivo.

Una vez obtenidos los cultivos, éstos fueron centrifugados en tubos falcon de 50 mL a 4000 r.p.m. y a 15 °C por 13 minutos, posteriormente se descartaron los sobrenadantes, y las células precipitadas fueron resuspendidas con 1 mL de suero fisiológico estéril (0,9 % NaCl), obteniendo el pool de células con el cual se prepararon los sistemas de BDS (figura 3-C).

## **1. 2.- Obtención de los surfactantes:**

### Surfactante sintético comercial

El surfactante sintético utilizado fue el sorbitán monooleato de polietilenglicol (Tween 80), adquirido comercialmente, el cual tiene una densidad entre 1,06 y 1,09 g mL<sup>-1</sup>, un valor de balance hidrofílico - lipofílico (BHL) de 15, y un valor de la CMC entre 0,30 y 0,35 %p/v en el medio de reacción [Feng y col., 2006].

### Surfactante de origen biológico (biosurfactante)

El biosurfactante utilizado fue obtenido mediante la liofilización del cultivo de la cepa bacteriana de origen marino MM1A2H, identificada como *Cobetia marina* [Ibacache, 2008], la cual fue aislada desde muestras de agua de mar de Montemar y Con Con. Este biosurfactante es una mezcla de moléculas con propiedades tensoactivas, que presenta una CMC de 0,40 %p/v y un BHL entre 8 y 9.

### 1. 3.- Obtención y preparación de los soportes:

Se utilizaron tres soportes inorgánicos adquiridos comercialmente y con probada capacidad de adsorción de bacterias biodesulfuradoras [Dinamarca y col., 2010]. Estos fueron:

- Sílice (Si) ( $\text{SiO}_2$ ) D11-10 BASF (área BET:  $80 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ).
- Alúmina (Al) ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) D10-10 BASF, (área BET:  $140 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ).
- Sepiolita (Sep) ( $\text{Si}_{12}\text{O}_{30}\text{Mg}_8(\text{OH})_4(\text{H}_2\text{O})_4 \times 8\text{H}_2\text{O}$ ) 120 NF Tolsa (área BET:  $300 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$ ).

Previo al proceso de adsorción, y con el objeto de maximizar la inmovilización bacteriana, los soportes fueron llevados a un rango de tamaño de partícula entre 1,18 y 2,00 mm de diámetro (10 y 16 mallas). Posteriormente fueron calcinados a  $400 \text{ }^\circ\text{C}$  por 24 horas para eliminar impurezas volátiles superficiales, y finalmente fueron esterilizados en autoclave a una temperatura de  $120 \text{ }^\circ\text{C}$ , y a 1 atm (101 kPa) de presión, por un período de 20 minutos.

### 1. 4.- Preparación de los sustratos:

Las soluciones de los sustratos organosulfurados utilizados en este trabajo fueron:

- DBT: Se utilizó a una concentración de 0,0623 M en n-hexadecano.
- 4,6-DMDBT: Se utilizó a una concentración de 0,0249 M en isooctano.
- Gasoil: Se utilizó un gasoil pre-hidrotratado con una concentración de azufre del 0,35% sin diluir. La composición relativa de los hidrocarburos sulfurados presentes en el gasoil utilizado se indica en el Anexo 1.

## **2.- Determinación de la concentración óptima de surfactantes**

Con el fin de mejorar la biodisponibilidad de las moléculas organosulfurados, se determinó para cada sustrato (DBT, 4,6-DMDBT o gasoil), la concentración de cada surfactante (Tween 80 o biosurfactante) a la cual se obtenía la mayor actividad biodesulfuradora.

Estos ensayos se llevaron a cabo en 10 mL de medio mínimo A sin suplementar, con una concentración de bacterias determinada por espectrofotometría a una longitud de onda ( $\lambda$ ) de 600 nm, contra un blanco de suero fisiológico (Anexo 2). Posteriormente fueron agregados a estos sistemas distintas concentraciones de cada surfactante (entre 0,0 y 0,6% v/v), más 1 mL del sustrato organosulfurado a biodesulfurar. Los sistemas fueron dejados en agitación a 200 r.p.m. y a 30 °C por 24 horas de reacción.

## **3.- Ensayos con bacterias inmovilizadas**

### **3. 1.- Adsorción de las bacterias sobre los soportes en estudio:**

La adsorción de las bacterias se realizó por un proceso de impregnación simple, donde cada sistema estaba compuesto por 1,0 g de soporte estéril (Al, Si o Sep) en 10 mL de suero fisiológico estéril, más una cantidad determinada de bacterias por espectrofotometría (Anexo 2). Los sistemas fueron dejados durante 24 horas a 30 °C y a 100 r.p.m., para evitar la degradación del soporte producto de una alta agitación.

### **3. 2.- Cuantificación de la adsorción de las bacterias**

La cuantificación de la cantidad de bacterias presentes en el sistema de adsorción fue realizada en dos instancias: (i) al inicio del proceso, antes de agregar el soporte, y (ii) transcurridas las 24 horas de adsorción. Las determinaciones fueron realizadas por espectrofotometría, a una  $\lambda = 600$  nm contra un blanco de suero fisiológico (Anexo 2).

Previo a la segunda cuantificación, cada muestra fue filtrada al vacío, con el fin de separar a las bacterias en suspensión de los restos del soporte degradado por la agitación, que pudieran interferir en la medición.

La cantidad de microorganismos adsorbidos sobre los soportes estudiados fue determinada mediante la diferencia entre la concentración inicial de bacterias presentes en cada sistema, y la concentración de bacterias detectadas en el sobrenadante una vez transcurrido el proceso de adsorción.

### **3. 3.- Ensayos biocatalíticos de sistemas inmovilizados**

Los ensayos de BDS con sistemas de bacterias inmovilizadas por adsorción, se realizaron en sistemas compuestos por 1,0 g de soporte adsorbido por *R. rhodochrous* IGTS8, más 10 mL del medio mínimo A sin suplementar, con o sin la incorporación de surfactantes (Tween 80 o biosurfactante) a la mejor concentración determinada para cada sustrato. Posteriormente se añadió 1 mL del sustrato a biodesulfurar correspondiente (DBT, 4,6-DMDBT o gasoil) obteniendo una razón sustrato/volumen de reacción de 1:10. Las reacciones se llevaron a cabo por 24 horas en un agitador rotatorio a 100 r.p.m. y a una temperatura de 30° C.



Para contrarrestar el efecto de la menor velocidad, también se realizaron ensayos de BDS para cada sustrato con sistemas de bacterias libres, a la mejor concentración del surfactante determinada. Estos sistemas se dejaron en las mismas condiciones que los anteriores (a 100 r.p.m. y a 30 °C por 24 horas).

## **4.- Determinación de los productos de la biodesulfuración**

### **4. 1.- Separación de la fase orgánica y acuosa:**

#### Separación de fases para DBT y 4,6-DMDBT:

En el caso de los ensayos de BDS del DBT y del 4,6-DMDBT, una vez transcurrido el tiempo de reacción, el medio fue centrifugado a 4.000 r.p.m. por 13 minutos para separarlo de las bacterias libres que quedarán en suspensión. El sobrenadante obtenido fue vertido a un embudo de decantación, donde el sustrato sulfurado fue extraído con un volumen equivalente de acetato de etilo. Para ello, los embudos de decantación fueron agitados vigorosamente por 15 minutos, y luego dejados en reposo para separar las fases por un tiempo mínimo de 15 minutos. Posteriormente, la fase acuosa fue descartada y la fase orgánica recolectada en matraces de 50 mL para su análisis cromatográfico.

#### Separación de fases para gasoil:

Para el caso de los ensayos de BDS de gasoil, la separación de fases fue realizada mediante la centrifugación de los medios a 11.000 r.p.m. por 20 minutos, rompiendo de esta manera la emulsión y separando los compuestos hidrocarbonados de la fase acuosa. Posteriormente, la fase orgánica fue recuperada y almacenada en tubos eppendorf, protegidos de la luz y a temperatura ambiente, hasta su medición.

#### **4. 2.- Medición de las muestras**

##### Medición de las muestras de DBT y 4,6-DMDBT:

En el caso de las reacciones de BDS del DBT y del 4,6-DMDBT, la medición de la concentración de cada especie fue realizada utilizando un cromatógrafo de gases Shimadzu®, modelo GC-2010 con detector FID y columna capilar SPB-5. La señal del equipo es proporcional a la concentración del analito en la muestra, por lo que el área cromatográfica obtenida de cada medición fue transformada a concentración remanente del sustrato, por medio de un factor de conversión obtenido al medir un patrón del sustrato. La actividad biocatalítica de BDS fue expresada como concentración del sustrato sulfurado consumido (DBT o 4,6-DMDBT) en mM, normalizada por el número de bacterias presentes en el sistema, y por hora de reacción.

##### Medición de las muestras de gasoil:

Para las reacciones de BDS de gasoil, la concentración de azufre total remanente, fue determinada en un equipo Leco S-144DR con detector infrarrojo, el cual expresa la concentración de azufre total remanente de la muestra en porcentaje en peso (% p/p). La actividad biocatalítica fue expresada como concentración mM del azufre total consumido, normalizada por el número de bacterias presentes en el sistema, y por hora de reacción.

## ***Resultados***

---

## **1.- Determinación de la concentración óptima de surfactantes**

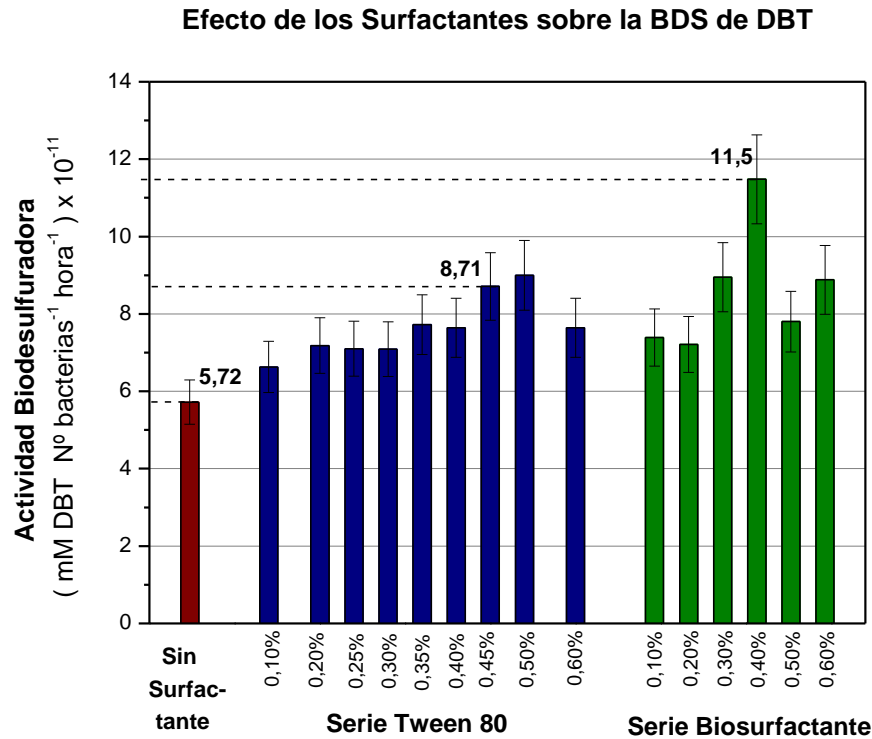
### **1.1.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS del DBT**

En la figura 4 se muestra el efecto de la concentración de Tween 80 y del biosurfactante en sistemas bacterias libres, sobre la actividad de BDS del DBT, expresada como la concentración de DBT consumido en mM, por número de bacterias, y por hora de reacción. La variación de los valores de la actividad de BDS del DBT, expresada en porcentaje, respecto al sistema sin surfactantes, obtenidos de la figura 4, se muestran en la tabla 2.

Los resultados muestran que la adición de ambos surfactantes al sistema biocatalítico, produjo un aumento en la actividad de BDS del DBT, alcanzando su máximo valor a concentraciones cercanas a la CMC de cada surfactante. Posteriormente, a mayores concentraciones se observa una disminución de los valores de actividad. Además se puede apreciar que el efecto del biosurfactante sobre la BDS del DBT fue mayor que el obtenido con Tween 80.

La tabla 2 muestra que el mayor aumento de la BDS del DBT, obtenido con el biosurfactante fue de un 101% por sobre la actividad del control sin surfactantes, a una concentración del 0,40%. Mientras que con Tween 80 sólo se obtuvo un aumento del 57%, a una concentración del 0,50%.

Del análisis de los resultados se determinó que la mejor concentración de los surfactantes los ensayos de BDS del DBT fue de un 0,45 %p/v para Tween 80, mientras que para el caso del biosurfactante fue de un 0,40 %p/v.



**Figura 4:** Efecto de la adición de los surfactantes Tween 80 (en color azul) y biosurfactante (en color verde), en relación al control sin surfactantes (en color rojo), sobre la BDS del DBT en sistemas biocatalíticos no inmovilizados. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 2:** Variación de la actividad de BDS del DBT, en porcentaje respecto al control sin la adición de surfactantes, en función de las concentraciones de Tween 80 y del biosurfactante, expresadas en %p/v.

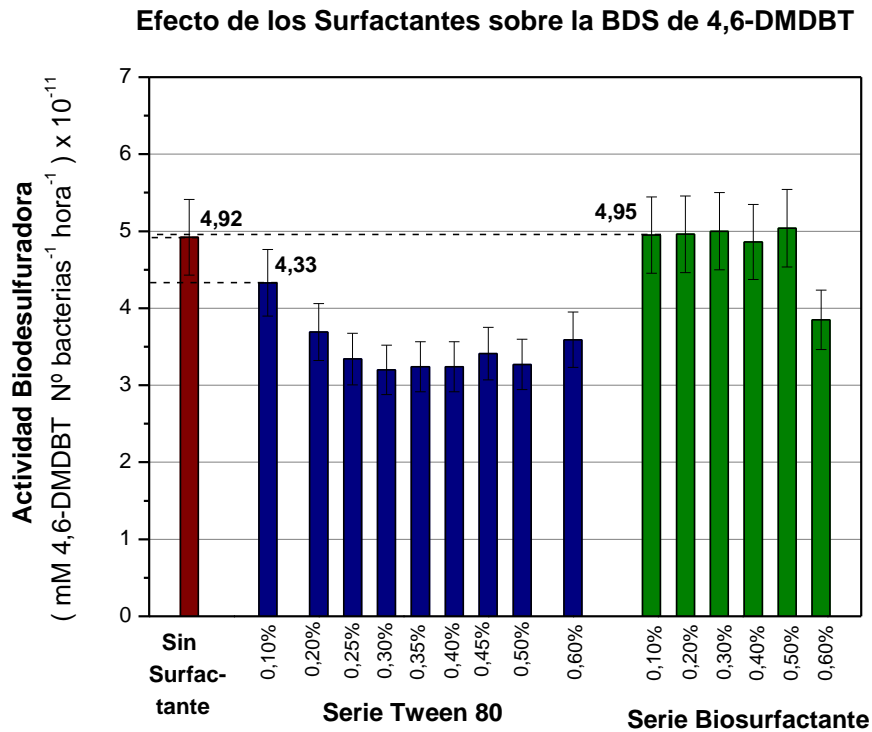
Tween 80 (% p/v)	Variación de la actividad de BDS de DBT (%)	Biosurfactante (% p/v)	Variación de la actividad de BDS de DBT (%)
0,10	+ 16	0,10	+ 29
0,20	+ 26	0,20	+ 26
0,25	+ 24	0,30	+ 56
0,30	+ 24	<b>0,40</b>	<b>+ 101</b>
0,35	+ 35	0,50	+ 36
0,40	+ 34	0,60	+ 55
<b>0,45</b>	<b>+ 52</b>		
0,50	+ 57		
0,60	+ 34		

## 1. 2.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS del 4,6-DMDBT

La figura 5 muestra el efecto de la concentración de Tween 80, y del biosurfactante, sobre la actividad de BDS del 4,6-DMDBT por *R. rhodochrous*, expresada en términos de concentración de 4,6-DMDBT consumido en mM, por número de bacterias, y por hora de reacción. En la tabla 3 se muestra la variación de los valores de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT, expresada en porcentaje, respecto al sistema sin surfactantes, obtenidos de la figura 5.

Los resultados muestran que la adición de Tween 80 al sistema biocatalítico redujo la actividad de BDS del 4,6-DMDBT, respecto al control, en todo el rango de concentraciones estudiadas. Esta reducción de la actividad fue mayor a concentraciones cercanas a su CMC (alrededor de un 35% menor, según la tabla 3). Por otro lado, la incorporación del biosurfactante no produjo efecto alguno sobre la actividad bacteriana, salvo una disminución de la actividad en un 21% a una concentración del 0,60% de este tensoactivo.

Si bien no fue encontrada una concentración adecuada de los surfactantes para la BDS del 4,6-DMDBT, se decidió trabajar de todas formas con la concentración más cercana al valor del blanco (sin surfactantes), la cual en ambos casos corresponde a un 0,10%.



**Figura 5:** Efecto de la adición de los surfactantes Tween 80 (en color azul) y biosurfactante (en color verde), en relación al control sin surfactantes (en color rojo), sobre la BDS del 4,6-DMDBT en sistemas biocatalíticos no inmovilizados. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 3:** Variación de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT, en porcentaje respecto al control sin la adición de surfactantes, en función de las concentraciones de Tween 80 y del biosurfactante, expresadas en %p/v.

Tween 80 (%p/v)	Variación de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT (%)	Biosurfactante (%p/v)	Variación de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT (%)
<b>0,10</b>	<b>- 12</b>	<b>0,10</b>	<b>+ 1</b>
0,20	- 25	0,20	+ 1
0,25	- 38	0,30	+ 2
0,30	- 35	0,40	- 1
0,35	- 34	0,50	+ 3
0,40	- 35	0,60	- 21
0,45	- 31		
0,50	- 34		
0,60	- 27		

### 1. 3.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS de gasoil

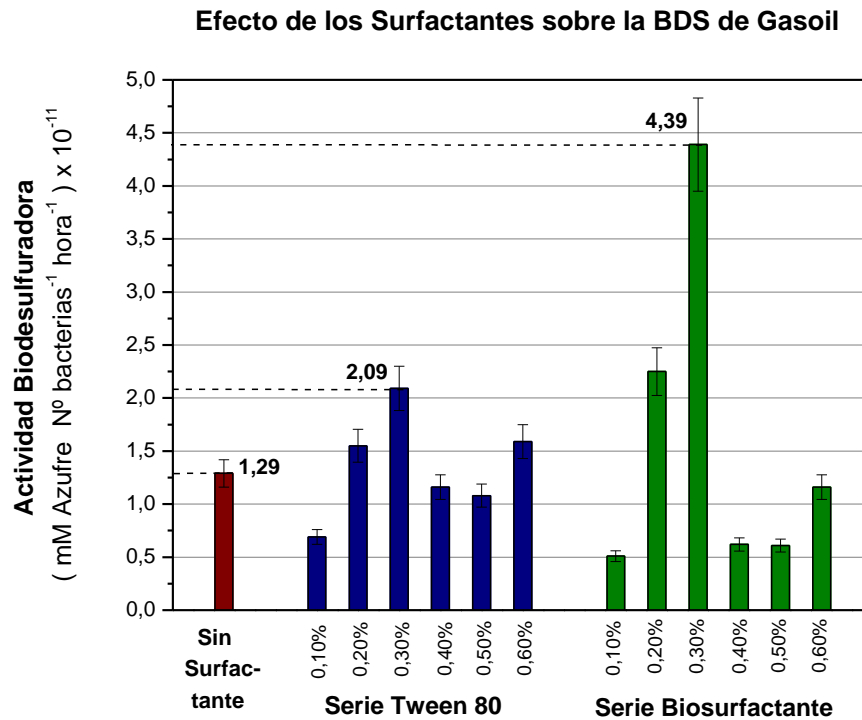
En la figura 6 se muestra el efecto de la concentración de Tween 80 y del biosurfactante, sobre la actividad de BDS de gasoil, utilizando bacterias libres, y expresada como concentración de azufre total consumido en mM, por número de bacterias, y por hora de reacción. En la tabla 4 se muestra la variación de los valores de la actividad de BDS del gasoil, expresada en porcentaje, respecto al sistema sin surfactantes, obtenidos en la figura 6.

Los resultados muestran que, de manera similar a los obtenidos con DBT, hubo un aumento de la actividad de BDS dependiente de la concentración de los surfactantes adicionados al sistema, hasta alcanzar un máximo de actividad determinado en un 0,30% para ambos compuestos. Posteriormente, a concentraciones mayores de los tensoactivos se produjo una disminución de la actividad de BDS. También se puede observar que el efecto del biosurfactante sobre la BDS de gasoil fue mayor que el obtenido con Tween 80.

La tabla 4 indica que los máximos incrementos de la actividad de BDS de gasoil, se obtuvieron a un 0,30% con ambos tensoactivos, los cuales fueron de un 62% utilizando Tween 80, y de un 240% con el biosurfactante.

De los resultados obtenidos se determinó que la mejor concentración para los ensayos de BDS de gasoil, tanto de Tween 80, como del biosurfactante, fue de un 0,30%.





**Figura 6:** Efecto de la adición de los surfactantes Tween 80 (en color azul) y biosurfactante (en color verde), en relación al control sin surfactantes (en color rojo), sobre la BDS de gasoil en sistemas biocatalíticos no inmovilizados. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 4:** Variación de la actividad de BDS del gasoil, en porcentaje respecto al control sin la adición de surfactantes, en función de las concentraciones de Tween 80 y del biosurfactante, expresadas en %p/v.

Tween 80 (%p/v)	Variación de la actividad de BDS del gasoil (%)	Biosurfactante (%p/v)	Variación de la actividad de BDS del gasoil (%)
0,10	- 47	0,10	- 61
0,20	+ 20	0,20	+ 74
<b>0,30</b>	<b>+ 62</b>	<b>0,30</b>	<b>+ 240</b>
0,40	- 11	0,40	- 52
0,50	- 16	0,50	- 53
0,60	+ 23	0,60	- 11

## 2.- Ensayos con bacterias inmovilizadas

### 2. 1.- Adsorción de las bacterias sobre los soportes en estudio

La tabla 5 muestra los distintos valores de adsorción de *R. rhodochrous* sobre los soportes sílice, sepiolita, y alúmina, expresados como número de bacterias adsorbidas, por gramo del sólido, y por hora de reacción. De los tres soportes en estudio, la mayor capacidad de adsorción fue observada sobre sepiolita, mientras que la menor fue sobre sílice. Alúmina tuvo un comportamiento intermedio entre los demás soportes.

Por otro lado, también se estudió el porcentaje de adsorción que presentó cada soporte, respecto de la cantidad inicial de bacterias adicionadas al medio de adsorción. En la tabla 5 también se puede apreciar que nuevamente fue sepiolita quien adsorbió un mayor porcentaje de bacterias desde el medio, mientras que sílice lo hizo en un menor porcentaje. Alúmina tuvo un comportamiento intermedio.

**Tabla 5:** Capacidad y porcentaje de adsorción de *R. rhodochrous* sobre los tres soportes estudiados.

<b>Soporte</b>	<b>Número de sistemas estudiados</b>	<b>Capacidad de Adsorción</b> (Nº bact. g <sup>-1</sup> <sub>soporte</sub> H <sup>-1</sup> )	<b>Porcentaje de bacterias adsorbidas</b>
Sílice	n = 11	2,72x10 <sup>8</sup> ± 4,10x10 <sup>7</sup>	35,77 ± 4,72 %
Sepiolita	n = 12	3,36x10 <sup>8</sup> ± 6,41x10 <sup>7</sup>	44,68 ± 8,03 %
Alúmina	n = 13	3,06x10 <sup>8</sup> ± 4,01x10 <sup>7</sup>	40,02 ± 5,15 %

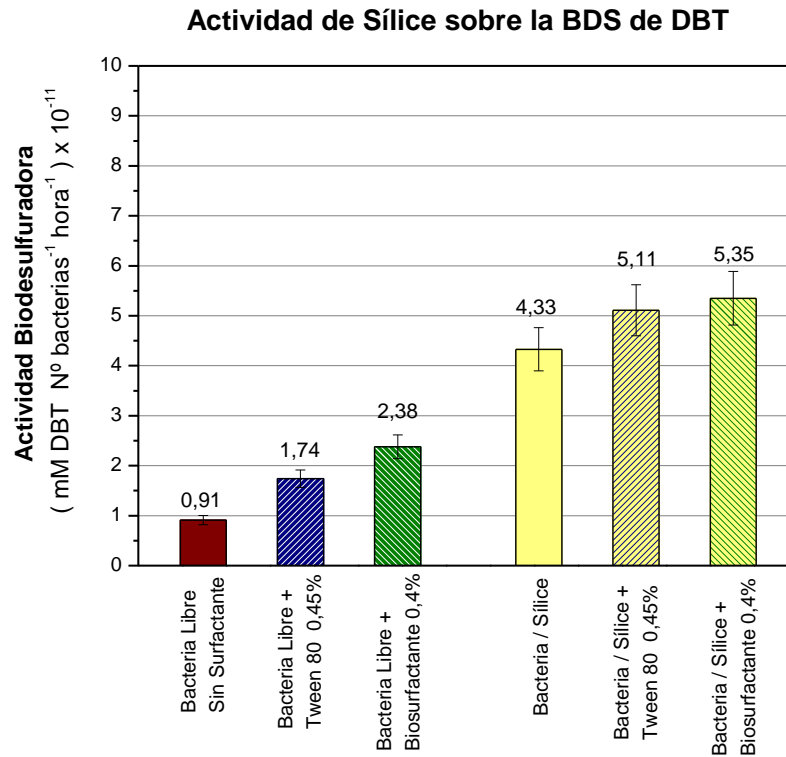
## **2. 2.- Ensayos biocatalíticos de sistemas inmovilizados**

### **2. 2. 1.- Actividad biodesulfuradora del DBT**

En la figura 7 se muestra el efecto de la adición de surfactantes sobre la actividad de BDS del DBT en sistemas de bacterias inmovilizadas sobre sílice. Se muestra además de manera comparativa los valores de actividad de bacterias libres sin surfactantes, de bacterias con surfactantes y de bacterias inmovilizadas. La variación de los valores de la actividad de BDS del DBT de los sistemas inmovilizados sobre sílice, con y sin surfactantes, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, obtenidos de la figura 7, se muestran en la tabla 6.

En dicha tabla se muestra que la incorporación de surfactantes al medio de reacción con bacterias libres, aumentó la actividad de BDS del DBT en un 92% con Tween 80, y en un 162% con el biosurfactante. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la elección de la mejor concentración de surfactantes.

También, se puede apreciar que la inmovilización de los microorganismos mejoró notablemente la biodisponibilidad de los sustratos sulfurados, aumentando la actividad biocatalítica en un 376%. En el caso de la adición de los surfactantes al sistema biocatalítico inmovilizado, se observa un incremento en la actividad de BDS, de un 462% con Tween 80, y de un 489% con el biosurfactante, respecto al sistema de bacterias libres sin la adición de surfactantes (tabla 6).



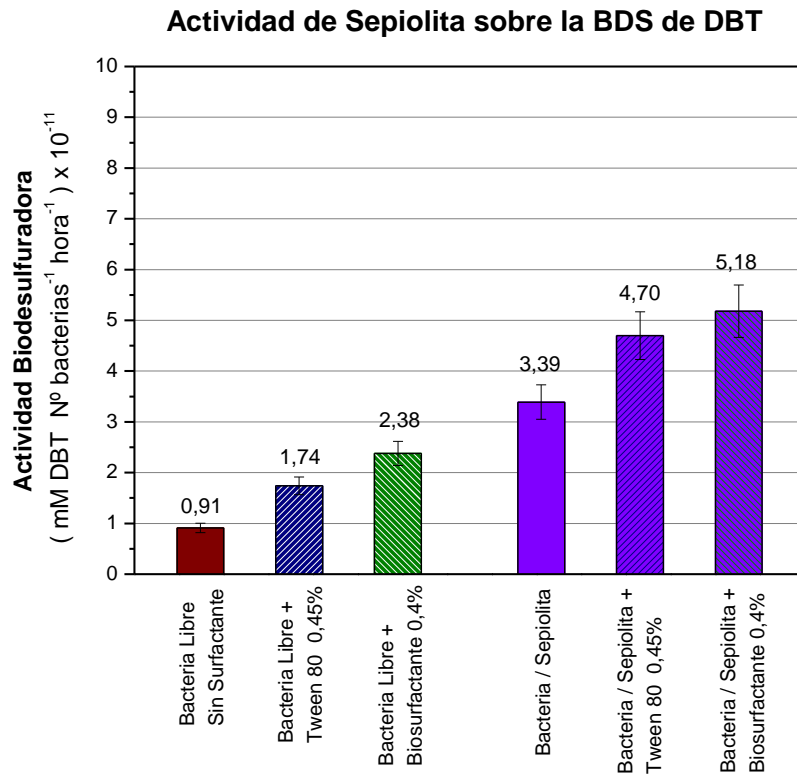
**Figura 7:** Actividad biocatalítica de DBT por *R. rhodochrous* inmovilizada sobre sílice, con o sin la adición de surfactantes, en relación a sistemas de bacterias libres. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 6:** Variación de los valores de la actividad de BDS del DBT, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre sílice con y sin surfactantes.

Sistema	Variación de la actividad de BDS del DBT (%)
B. libres + Tween 80 (0,45%)	+ 92
B. libres + Biosurfactante (0,40%)	+ 162
Bacteria / Sílice	+ 376
Bacteria / Sílice + Tween 80 (0,45%)	+ 462
Bacteria / Sílice + Biosurfactante (0,40%)	+ 489

El efecto de la adición de surfactantes sobre la actividad de BDS del DBT en sistemas de bacterias inmovilizadas sobre sepiolita se puede apreciar en la figura 8. La variación de los valores de la actividad de BDS del DBT de los sistemas inmovilizados sobre sepiolita, con y sin surfactantes, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, obtenidos de la figura 8, se muestran en la tabla 7.

En la figura 8 se observa un comportamiento similar al encontrado en los sistemas que utilizaron sílice como soporte, es decir, que la adsorción bacteriana produjo un aumento de la actividad biocatalítica de un 272%, en relación al obtenido en sistemas de bacterias libres. Asimismo, la adición de surfactantes a estos sistemas inmovilizados sobre sepiolita, mejoró la biodisponibilidad del DBT para las bacterias, aumentando la actividad biodesulfuradora en un 417% con Tween 80, y en un 470% con el biosurfactante, respecto al valor obtenido con el sistema de bacterias libres (tabla 7).

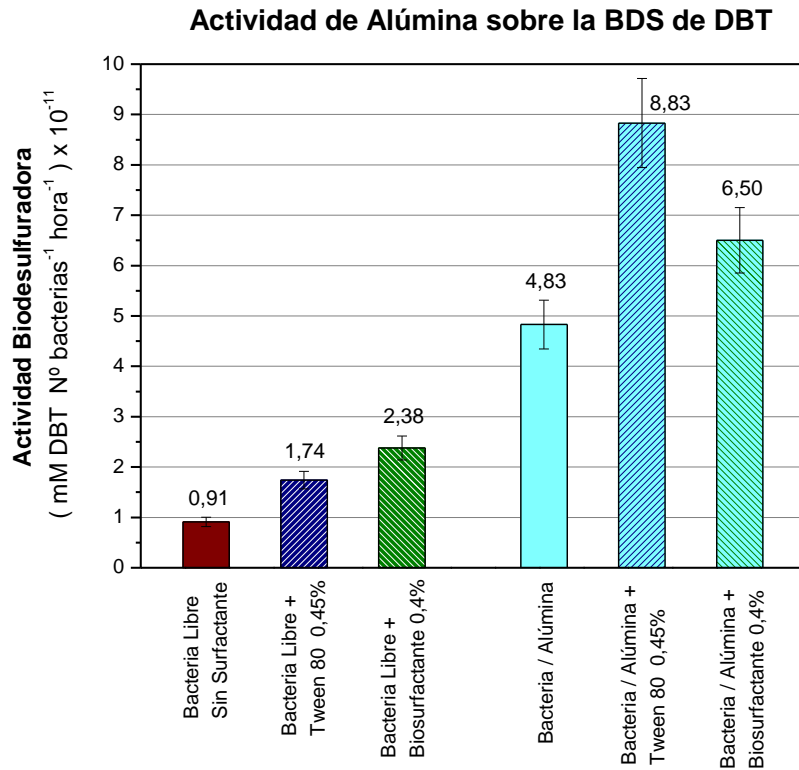


**Figura 8:** Actividad biocatalítica de DBT por *R. rhodochrous* inmovilizada sobre sepiolita, con o sin la adición de surfactantes, en relación a sistemas de bacterias libres. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 7:** Variación de los valores de la actividad de BDS del DBT, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre sepiolita con y sin surfactantes.

Sistema	Variación de la actividad de BDS del DBT (%)
B. libres + Tween 80 (0,45%)	+ 92
B. libres + Biosurfactante (0,40%)	+ 162
Bacteria / Sepiolita	+ 272
Bacteria / Sepiolita + Tween 80 (0,45%)	+ 417
Bacteria / Sepiolita + Biosurfactante (0,40%)	+ 470

En la figura 9 se puede apreciar el efecto de la adsorción bacteriana sobre alúmina, en la BDS del DBT. La tabla 8 muestra la variación de los valores de la actividad de BDS del DBT de los sistemas inmovilizados sobre alúmina, con y sin surfactantes, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, obtenidos de la figura 9. Dicha figura muestra que la inmovilización de *R. rhodochrous* produjo un incremento de un 431% en la actividad biodesulfuradora, en comparación al sistema no inmovilizado. Por otro lado se observa que en los sistemas libres, fue el biosurfactante quien produjo un mayor aumento en la actividad, mientras que en los sistemas inmovilizados sobre alúmina, fue Tween 80 quien produjo el mayor incremento de la actividad (de un 871%). Por su parte, el biosurfactante aumentó la actividad en un 614%, respecto al sistema de bacterias libres (tabla 8).



**Figura 9:** Actividad biocatalítica de DBT por *R. rhodochrous* inmovilizada sobre alúmina, con o sin la adición de surfactantes, en relación a sistemas de bacterias libres. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 8:** Variación de los valores de la actividad de BDS del DBT, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre alúmina con y sin surfactantes.

Sistema	Variación de la actividad de BDS del DBT (%)
B. libres + Tween 80 (0,45%)	+ 92
B. libres + Biosurfactante (0,40%)	+ 162
Bacteria / Alúmina	+ 431
Bacteria / Alúmina + Tween 80 (0,45%)	+ 871
Bacteria / Alúmina + Biosurfactante (0,40%)	+ 614



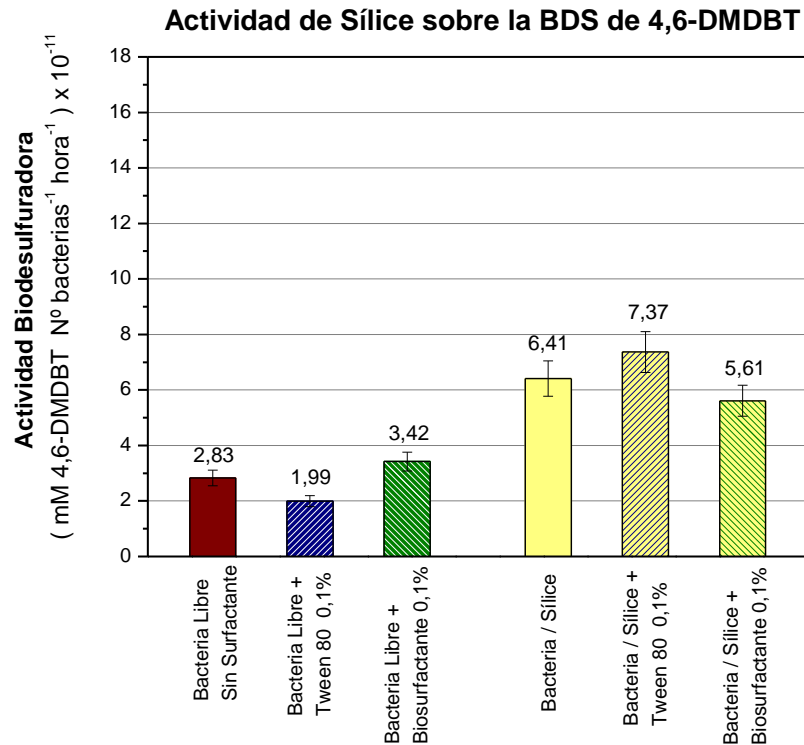
Al comparar el efecto de los soportes sobre la actividad de BDS del DBT (figuras 7, 8 y 9, y tablas 6, 7, y 8), se puede apreciar que se obtuvieron los mayores incrementos con la inmovilización sobre alúmina y sílice (431% y 376% respectivamente) mientras que sobre sepiolita se obtuvo el menor efecto (un aumento del 272%). En el caso del efecto de los surfactantes sobre los sistemas biocatalíticos inmovilizados, se observa que utilizando alúmina como soporte se obtuvo el mayor incremento de la actividad biocatalítica, especialmente con Tween80. Esto indicaría que al combinar la utilización de surfactantes en el medio de reacción, con la inmovilización de bacterias sobre alúmina, se maximiza la biodisponibilidad de los sustratos sulfurados hacia las bacterias.

### 2. 2. 2.- Actividad biodesulfuradora del 4,6-DMDBT

El efecto de la adición de surfactantes sobre la actividad de BDS del 4,6-DMDBT en sistemas inmovilizados de *R. rhodochrous* sobre sílice se muestra en la figura 10. Se muestran además, de manera comparativa, los valores de actividad de bacterias libres sin surfactantes, con surfactantes, y de bacterias inmovilizadas. La variación de los valores de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT de los sistemas inmovilizados sobre sílice, con y sin surfactantes, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, obtenidos de la figura 10, se muestra en la tabla 9.

Esta tabla muestra que la adsorción bacteriana sobre sílice produjo un aumento en la actividad biocatalítica de un 126%. También se puede apreciar que la incorporación de surfactantes a sistemas de bacterias libres, sólo mejoró la actividad levemente en el caso del biosurfactante en un 21%, mientras que con Tween 80 se produjo una reducción de la actividad en un 30%, respecto al control. Estos resultados concuerdan con los encontrados en la elección de la mejor concentración de surfactantes para el 4,6-DMDBT.

Por otro lado, de manera contraria, la adición de Tween 80 a los sistemas de bacterias inmovilizadas sobre sílice, respecto al sistema de bacterias libres sin la adición de surfactantes, aumentó la actividad de BDS del 4,6-DMDBT en un 160%, mientras que con la adición del biosurfactante, ésta disminuyó hasta un 98% (tabla 9).



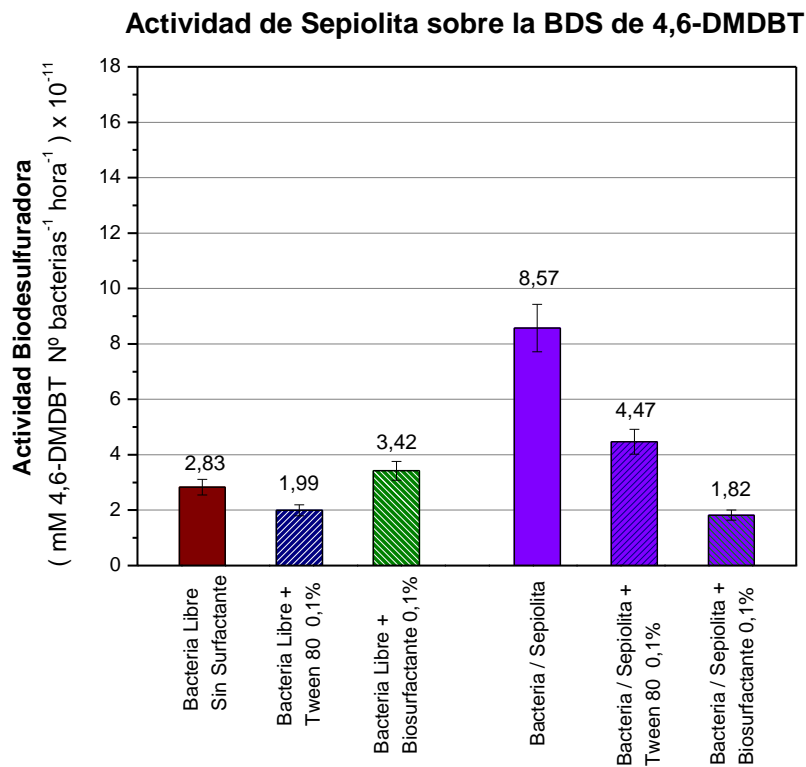
**Figura 10:** Actividad biocatalítica de 4,6-DMDBT por *R. rhodochrous* inmovilizada sobre sílice, con o sin la adición de surfactantes, en relación a sistemas de bacterias libres. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 9:** Variación de los valores de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre sílice con y sin surfactantes.

Sistema	Variación de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT (%)
B. libres + Tween 80 (0,45%)	- 30
B. libres + Biosurfactante (0,40%)	+ 21
Bacteria / Sílice	+ 126
Bacteria / Sílice + Tween 80 (0,45%)	+ 160
Bacteria / Sílice + Biosurfactante (0,40%)	+ 98

En la figura 11 se puede apreciar el efecto de la adición de surfactantes sobre la actividad de BDS del 4,6-DMDBT en sistemas inmobilizados sobre sepiolita. La tabla 10 muestra la variación de los valores de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmobilizados sobre sepiolita con y sin surfactantes.

Los resultados muestran que la adsorción de bacterias sobre este soporte produjo un aumento en los valores de la actividad biocatalítica en un 203%. No obstante, la adición de ambos surfactantes a los sistemas adsorbidos sobre sepiolita causó una disminución de la actividad de BDS, a un 58% con Tween 80, y a un -36% con el biosurfactante, respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes (tabla 10).

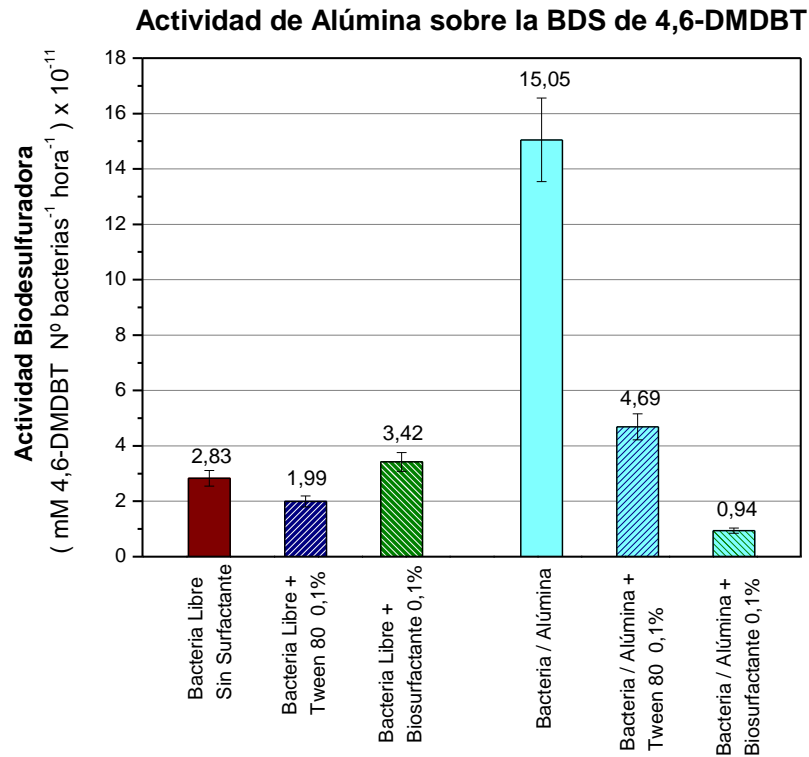


**Figura 11:** Actividad biocatalítica de 4,6-DMDBT por *R. rhodochrous* inmobilizada sobre sepiolita, con o sin la adición de surfactantes, en relación a sistemas de bacterias libres. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 10:** Variación de los valores de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre sepiolita con y sin surfactantes.

Sistema	Variación de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT (%)
B. libres + Tween 80 (0,45%)	- 30
B. libres + Biosurfactante (0,40%)	+ 21
Bacteria / Sepiolita	+ 203
Bacteria / Sepiolita + Tween 80 (0,45%)	+ 58
Bacteria / Sepiolita + Biosurfactante (0,40%)	- 36

El efecto de la adición de surfactantes sobre la actividad de BDS del 4,6-DMDBT en sistemas inmovilizados sobre alúmina se aprecia en la figura 12. La variación de los valores de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre alúmina con y sin surfactantes, se muestra en la tabla 11. En la figura 12 es posible observar un comportamiento similar al obtenido en los sistemas que utilizaron sepiolita como soporte. Se produjo un incremento de la actividad de un 431% al utilizar sistemas adsorbidos sobre alúmina, mientras que la adición de los surfactantes al medio de reacción causó una disminución de la actividad biocatalítica a un 65% con Tween 80, y a un - 67% con el biosurfactante, respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes (tabla 11).



**Figura 12:** Actividad biocatalítica de 4,6-DMDBT por *R. rhodochrous* inmovilizada sobre alúmina, con o sin la adición de surfactantes, en relación a sistemas de bacterias libres. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 11:** Variación de los valores de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre alúmina con y sin surfactantes.

Sistema	Variación de la actividad de BDS del 4,6-DMDBT (%)
B. libres + Tween 80 (0,45%)	- 30
B. libres + Biosurfactante (0,40%)	+ 21
Bacteria / Alúmina	+ 431
Bacteria / Alúmina + Tween 80 (0,45%)	+ 65
Bacteria / Alúmina + Biosurfactante (0,40%)	- 67

La comparación de los resultados de los tres soportes utilizados en la degradación de 4,6-DMDBT (figuras 10, 11 y 12, y tablas 9, 10, y 11), muestra que sobre alúmina se produjo el mayor incremento la de actividad de BDS, de un 431%, lo cual es concordante con lo observado en el caso de DBT. Mientras que con la adición de los surfactantes fue posible determinar que sólo cuando se adicionó Tween 80 a los sistemas inmovilizados sobre sílice, se obtuvo un efecto positivo en la actividad biocatalítica hasta un 160% la actividad del control de bacterias libres sin la adición de surfactantes.

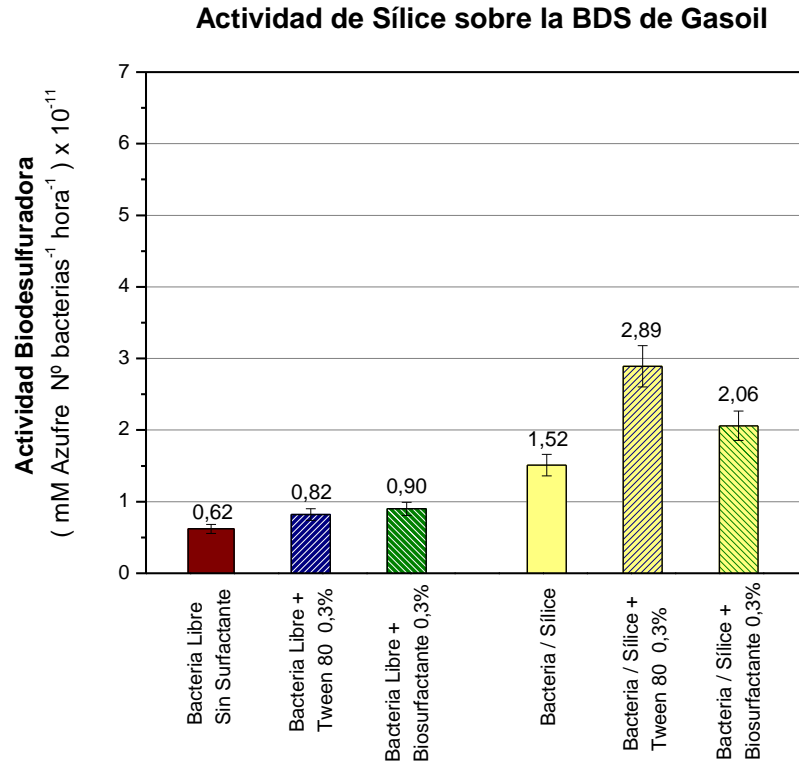
### 2. 2. 3.- Actividad biodesulfuradora del gasoil

El efecto de la adición de surfactantes sobre la actividad de BDS de gasoil, en sistemas inmovilizados sobre sílice, se muestra en la figura 13. Se muestran además de manera comparativa los valores de actividad de bacterias libres sin surfactantes, con surfactantes y de bacterias inmovilizadas. En la tabla 12 se muestra la variación de los valores de la actividad de BDS de gasoil, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre sílice con y sin surfactantes.

En dicha tabla se observa un incremento de la actividad de BDS de gasoil en los sistemas de bacterias libres, de un 32% con Tween 80, y de un 43% con el biosurfactante. Tales resultados concuerdan con los encontrados en la elección de la mejor concentración de surfactantes para la BDS de gasoil.

También es posible observar que la inmovilización de *R. rhodochrous* sobre sílice produjo un incremento de un 141% de la actividad de BDS de gasoil, y que además, la adición de los surfactantes a este sistema produjo un aumento de la actividad bacteriana hasta un 363% con Tween 80, y un 229% con el biosurfactante, por sobre la actividad del control sin surfactantes, al mejorar el contacto entre las células y el gasoil, aumentando la degradación de las moléculas sulfuradas.





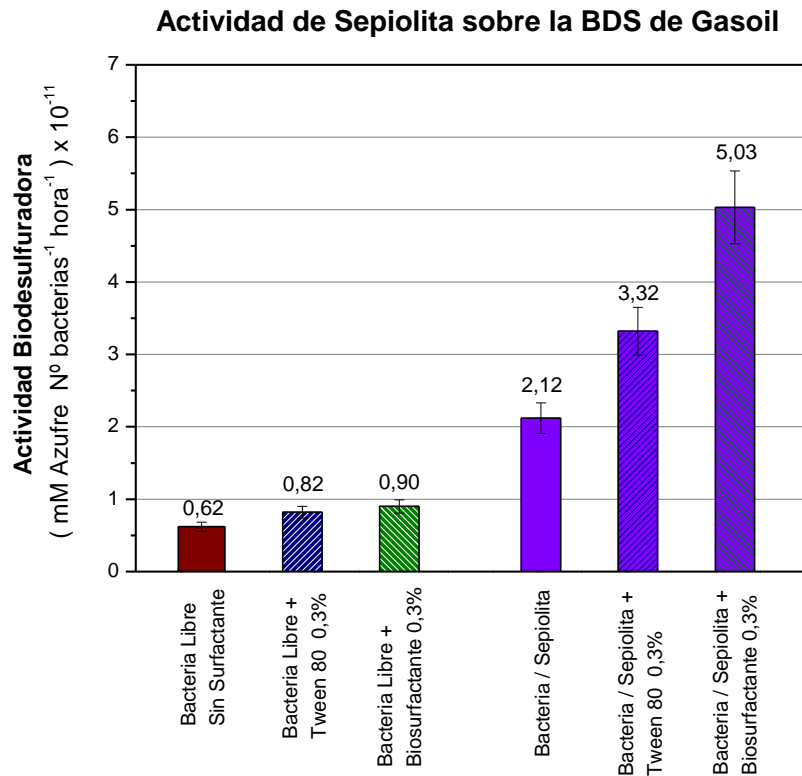
**Figura 13:** Actividad biocatalítica de gasoil por *R. rhodochrous* inmovilizada sobre sílice, con o sin la adición de surfactantes, en relación a sistemas de bacterias libres. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 12:** Variación de los valores de la actividad de BDS de gasoil, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre sílice con y sin surfactantes.

Sistema	Variación de la actividad de BDS del gasoil (%)
B. libres + Tween 80 (0,45%)	+ 32
B. libres + Biosurfactante (0,40%)	+ 43
Bacteria / Sílice	+ 141
Bacteria / Sílice + Tween 80 (0,45%)	+ 363
Bacteria / Sílice + Biosurfactante (0,40%)	+ 229

La figura 14 muestra el efecto de la adición de surfactantes sobre la actividad de BDS de gasoil, en sistemas inmovilizados sobre sepiolita. La variación de los valores de la actividad de BDS de gasoil, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre sepiolita con y sin surfactantes, se muestra en la tabla 13.

Un aumento en la actividad biocatalítica de un 240% fue observado cuando las bacterias fueron inmovilizadas sobre este soporte. Por otro lado, la adición de surfactantes a los sistemas inmovilizados produjo una mejora en la biodisponibilidad de los sustratos sulfurados del gasoil hacia las bacterias, aumentando la actividad en un 431% con Tween 80, y en un 704% con el biosurfactante, por sobre la actividad del control sin surfactantes (tabla 13).



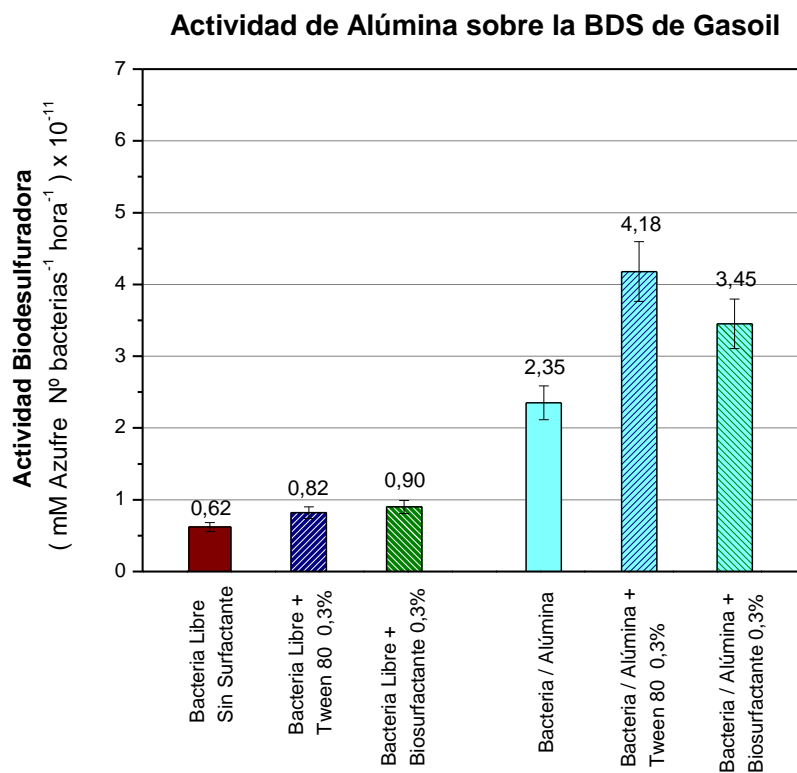
**Figura 14:** Actividad biocatalítica de gasoil por *R. rhodochrous* inmovilizada sobre sepiolita, con o sin la adición de surfactantes, en relación a sistemas de bacterias libres. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 13:** Variación de los valores de la actividad de BDS de gasoil, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre sepiolita con y sin surfactantes.

Sistema	Variación de la actividad de BDS del gasoil (%)
B. libres + Tween 80 (0,45%)	+ 32
B. libres + Biosurfactante (0,40%)	+ 43
Bacteria / Sepiolita	+ 240
Bacteria / Sepiolita + Tween 80 (0,45%)	+ 431
Bacteria / Sepiolita + Biosurfactante (0,40%)	+ 704

El efecto de la adición de surfactantes sobre la actividad de BDS de gasoil, en sistemas inmovilizados sobre alúmina, se muestra en la figura 15. La tabla 14 muestra la variación de los valores de la actividad de BDS de gasoil, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre alúmina con y sin surfactantes.

En dicha imagen se puede apreciar que el incremento en la actividad por la inmovilización bacteriana fue de un 276%, el cual se ve mejorado aun más por la adición de surfactantes al medio de reacción en un 569% con Tween 80, y en un 453% con el biosurfactante, por sobre la actividad del control sin surfactantes (tabla 14).



**Figura 15:** Actividad biocatalítica de gasoil por *R. rhodochrous* inmovilizada sobre alúmina, con o sin la adición de surfactantes, en relación a sistemas de bacterias libres. Resultados con un 10% de error.

**Tabla 14:** Variación de los valores de la actividad de BDS de gasoil, en porcentaje respecto al sistema control de bacterias libres sin la adición de surfactantes, de los sistemas inmovilizados sobre alúmina con y sin surfactantes.

Sistema	Variación de la actividad de BDS del gasoil (%)
B. libres + Tween 80 (0,45%)	+ 32
B. libres + Biosurfactante (0,40%)	+ 43
Bacteria / Alúmina	+ 276
Bacteria / Alúmina + Tween 80 (0,45%)	+ 569
Bacteria / Alúmina + Biosurfactante (0,40%)	+ 453

Finalmente, la comparación del efecto del soporte sobre la adición de surfactantes en los sistemas inmovilizados (figuras 13, 14 y 15, y tablas 12, 13 y 14), permite observar que el mayor incremento en la actividad de BDS de gasoil, producto de la inmovilización bacteriana, ocurrió con alúmina y sepiolita (276% y 240%, respectivamente), y en menor grado con sílice (un 141% de incremento). Mientras que las mayores actividades de BDS se consiguieron cuando se utilizó Tween 80 para el caso de alúmina y sílice, y el biosurfactante para el caso de sepiolita.

## ***Discusiones***

---

## **1.- Determinación de la concentración óptima de surfactantes**

### **1. 1.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS del DBT**

La adición de los surfactantes al medio de reacción de BDS del DBT con bacterias no inmovilizadas, produjo en ambos casos, un aumento en los valores de la actividad desulfuradora, en comparación con el blanco (sin la adición de surfactantes). El mayor incremento fue obtenido cuando se trabajó con una concentración de surfactantes cercana o superior a la CMC.

Este comportamiento se pudo deber a que los surfactantes en bajas concentraciones disminuyen la tensión interfacial, mejorando el acceso hacia los sustratos orgánicos. Al trabajar con concentraciones iguales o mayores que la CMC, la formación de micelas aumenta significativamente la solubilidad relativa de la fase orgánica en la acuosa, facilitando aun más la biodisponibilidad de los sustratos organosulfurados para las bacterias. Sin embargo, la adición de mayores concentraciones de los surfactantes puede crear micelas sobrecargadas de moléculas tensoactivas, las que podrían interferir en la óptima interacción bacteria – fase orgánica, debido a posibles repulsiones ocasionadas entre las mismas micelas, produciendo un leve efecto negativo en la actividad de BDS del DBT [Ibacache, 2008].

Al comparar el efecto de ambos surfactantes sobre la actividad de BDS del DBT, se pudo observar un mayor aumento de la actividad biocatalítica con el biosurfactante, en comparación a Tween 80. Esto podría ser debido a diferencias en la naturaleza de ambos surfactantes, principalmente relacionados con su balance hidrófilo-lipófilo (BHL). En este sentido, Tween 80 es considerado un agente emulsificante O/W con un índice de BHL de

15, mientras que el biosurfactante utilizado en este ensayo tiene un valor de BHL menor a 9, siendo considerado más bien como un agente emulsificante W/O. Si bien es cierto, debido a lo anterior se debería haber esperado un mayor efecto de Tween 80, es importante destacar que debido a la proporción de fase acuosa/fase orgánica utilizada en el medio de reacción (1:10), ambos surfactantes formaron una emulsión O/W. En este sentido, las diferencias entre los surfactantes pueden deberse a una mayor estabilidad de la emulsión formada por el biosurfactante, lo que permitió una mayor interacción de las bacterias con DBT, aumentando su degradación. Por otro lado, no es posible descartar un efecto inhibitorio en el crecimiento de las bacterias cuando están en presencia de Tween 80, observado por Wang y col, (2006).

### **1. 2.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS del 4,6-DMDBT**

La adición de Tween 80 a los sistemas de bacterias libres produjo un efecto negativo en la actividad biodesulfuradora de 4,6-DMDBT, el cual fue máximo a una concentración igual a su CMC. Por otro lado, la adición del biosurfactante no produjo un aumento en la actividad bacteriana, manteniendo un valor cercano al del sistema sin surfactantes.

El comportamiento observado en ambos casos, pudo deberse al gran tamaño y baja solubilidad acuosa que presenta el 4,6-DMDBT. En el caso del biosurfactante, esto pudo impedir la eficiente formación de micelas al ubicar a este sustrato alejado de la interfase. No obstante, su degradación fue similar a la encontrada en el sistema sin surfactantes, lo cual pudo deberse a un efecto de agitación del medio, lo que favorecería mecánicamente el contacto con las bacterias y este sustrato. No se puede descartar, sin embargo, la



generación de moléculas biosurfactantes por parte de las mismas bacterias que puedan ser capaces de solubilizar a los sustratos sulfurados.

En el caso del Tween 80, la disminución de la actividad bacteriana se pudo deber por una acumulación de este compuesto en la interfase, por su baja utilización en la formación de las emulsiones, lo que ocasionó una mayor interferencia en la actividad bacteriana.

Por otro lado, la menor actividad biocatalítica encontrada, en relación a la obtenida en el caso del DBT, fue debida a la menor biodisponibilidad del 4,6-DMDBT, producto de su baja solubilidad acuosa, y al impedimento estérico de sus sustituciones que dificultan el acceso de las enzimas al átomo de azufre de la molécula.

A pesar de que el empleo de ninguno de los dos surfactantes produjo un aumento de la actividad bacteriana, se decidió de todas formas evaluar sus efectos en la BDS del 4,6-DMDBT para sistemas inmovilizados, escogiendo la concentración a la que se produjo el menor efecto negativo para Tween 80 (un 0,1%), y la concentración más baja del biosurfactante (0,1 %), en función de prevenir posibles efectos adversos, como ocurrieron con el Tween 80.

### **1. 3.- Mejor concentración de surfactantes para la BDS del gasoil**

Cuando los dos surfactantes fueron adicionados a los ensayos de BDS de gasoil con bacterias libres, produjeron un aumento de la actividad desulfuradora, en comparación al control. Los mayores incrementos fueron observados cuando se trabajó a una concentración del 0,3%, tanto de Tween 80, como del biosurfactante, la cual es inferior a la CMC de ambos tensoactivos. Esto pudo ser causado por la gran variedad de

compuestos presentes en el gasoil, los que pudieron actuar como co-surfactantes, favoreciendo la aparición de micelas a menores concentraciones.

El análisis de los resultados permite observar que el mayor efecto sobre la actividad de BDS de gasoil fue obtenido cuando se utilizó el biosurfactante, mientras que un menor efecto fue visualizado cuando fue usado Tween 80. Tal comportamiento fue similar al observado cuando se trabajó con DBT.

Al revisar la composición del gasoil utilizado en este trabajo (Anexo 1), es posible determinar que está formado por una gran variedad de moléculas hidrofóbicas sulfuradas, con un alto contenido de DBT, mayor al de 4,6-DMDBT. En este sentido, la mayor actividad encontrada con el biosurfactante pudo estar referida a los mismos efectos establecidos para DBT, es decir, una mayor estabilización de la micela, lo que produce una mayor degradación.

Por otro lado una alta concentración de surfactantes, junto con el gran número de moléculas presentes en el gasoil, pudo haber interferido en la interacción bacteria – sustratos sulfurados, debido a una acumulación excesiva de estas sustancias en la interfase.

La actividad biocatalítica para el gasoil fue mucho menor a la obtenida con los sustratos modelo (DBT y 4,6-DMDBT), debido a que el gasoil utilizado ya había sufrido una hidrodesulfuración previa, causando que, probablemente, el contenido de azufre remanente corresponda a moléculas recalcitrantes de muy variada composición y complejidad, en su mayoría resistentes a la desulfuración bacteriana.

## **2.- Ensayos con bacterias inmovilizadas**

### **2. 1.- Adsorción de las bacterias sobre los soportes en estudio**

Referente a la inmovilización de *Rhodococcus rhodochrous*, se observó que sepiolita fue el soporte que presentó mayor capacidad de adsorción, seguido de alúmina, y luego por sílice. Los resultados obtenidos se asemejan a los informados en un trabajo realizado en el laboratorio de biotecnología microbiana de la Facultad de Farmacia, de la Universidad de Valparaíso [Dinamarca y col., 2010]. En tal investigación, se encontró de manera similar, una mayor adsorción de bacterias sobre sepiolita, sin embargo los resultados fueron diferentes en el caso de sílice y alúmina. Las diferencias encontradas entre ambos trabajos están referidas a la distinta naturaleza de las bacterias biodesulfurizadoras utilizadas. Dinamarca y col. (2010) utilizaron *Pseudomonas stutzeri*, la cual es una bacteria Gram-negativa que presenta una membrana lipídica externa con múltiples proteínas, lipoproteínas y lipopolisacáridos [Kertesz, 2000], que influyen en la interacción bacteria – soporte. Por otro lado *R. rhodochrous* es una bacteria Gram-positiva/variable, con una gruesa pared de peptidoglicano externa y con ácidos teicoicos presentes [Kertesz, 2000]. Esta distinta composición externa de ambas cepas bacterianas, puede ocasionar algunas diferencias en la interacción con el soporte. No obstante, no se descarta que ambos microorganismos se adsorban utilizando interacciones de tipo electroestáticas y físicas [Dinamarca y col., 2010].

## **2. 2.- Ensayos biocatalíticos de sistemas inmovilizados**

### **2. 2. 1.- Actividad biodesulfuradora del DBT**

El análisis de los resultados de la actividad de BDS del DBT muestra, en primer lugar, que la inmovilización de *R. rhodochrous* sobre los tres soportes estudiados, produjo un aumento de la actividad biocatalítica. Esta actividad fue mayor que la observada en los sistemas de bacterias libres y en los sistemas de bacterias libres con surfactantes. Esto demuestra que la presencia de un material sólido en el cual el microorganismo se pueda adherir, representa una mejora tecnológica para incrementar la biodisponibilidad de los sustratos sulfurados hacia las bacterias.

La comparación de los tres soportes muestra que sobre alúmina se obtiene una mayor actividad de *R. rhodochrous*, la cual se puede favorecer por la alta densidad de sitios ácidos brönsted que posee este soporte, en relación a los otros estudiados, los cuales permitirían una mayor interacción con las bacterias.

Cuando son analizados los valores de actividad de BDS del DBT que resultan al adicionar los surfactantes a sistemas inmovilizados, fue observado un aumento en la actividad para los tres soportes estudiados. Esto demuestra que la adición de especies tensoactivas a sistemas inmovilizados mejoran los valores de biodisponibilidad. Este mecanismo puede deberse a la formación de micelas, lo cual facilita la interacción con las bacterias, y/o a una disminución de la tensión interfacial del sistema, lo que ocasiona una mayor movilidad de las partículas del sólido en el medio de reacción.

La comparación de los valores de actividad BDS del DBT en los sistemas inmovilizados con surfactantes, muestran un mayor efecto cuando es utilizado alúmina en

mayor grado, y posteriormente sepiolita. Este podría deberse a una mayor interacción encontrada entre las bacterias y estos soportes.

Cuando se compara el efecto de la utilización de los surfactantes, se puede ver que sobre sílice y sepiolita existe una mayor actividad cuando se utiliza el biosurfactante, mientras que sobre alúmina es mayor para el caso de Tween 80. Esto puede significar que el mecanismo preferentemente utilizado por los sistemas biosurfactante/Si y biosurfactante/Sep son de tipo formación de micelas, mientras que el mecanismo Tween 80/Al está referido más bien a una disminución de la tensión interfacial del sistema.

Por otro lado, no se descarta la inhibición de crecimiento de bacterias por parte de Tween 80, no obstante, al estar las bacterias inmovilizadas, ocurriría en menor grado.

### **2. 2. 2.- Actividad biodesulfuradora del 4,6-DMDBT**

Los resultados mostraron que la inmovilización bacteriana mejoró considerablemente la biodisponibilidad del 4,6-DMDBT, reflejándose en un gran aumento de la actividad bacteriana, probablemente porque las partículas de soporte recubiertas de bacterias tuvieron un mayor acceso a las moléculas sulfuradas de la fase orgánica.

Al igual que para la degradación de DBT, en el caso de 4,6-DMDBT se observa que sobre alúmina se obtiene la mayor actividad cuando las bacterias son inmovilizadas. Tal efecto es debido a la alta estabilidad e interacción que ocurre entre *R. rhodochrous* y la superficie de este soporte.

La adición de surfactantes a los sistemas inmovilizados, produjo en la mayoría de los casos una disminución en los valores de actividad de BDS del 4,6-DMDBT. Esto puede

explicarse por la acumulación de las especies tensoactivas en la interfase, las cuales no pueden solubilizar al sustrato sulfurado, y que además dificultarían el acceso de las bacterias inmovilizadas. La mayor disminución ocasionada con el biosurfactante, puede estar referida a que el mecanismo de acción se ve desfavorecido al no poder emulsionar al 4,6-DMDBT, debido a su baja concentración.

### **2. 2. 3.- Actividad biodesulfuradora del Gasoil**

Los resultados muestran que la inmovilización bacteriana mejoró la BDS de gasoil, respecto al control, y que además la adición de surfactantes aumentó en gran medida la actividad biocatalítica.

En el caso de los sistemas inmovilizados se puede observar que el mayor aumento de la actividad fue observado cuando fue utilizada alúmina como material adsorbente. Tal resultado concuerda con la mayor concentración de DBT encontrada en el gasoil lo que favorece la mayor interacción encontrada en este soporte.

La adición de surfactantes a los sistemas de bacterias inmovilizadas, muestra que al igual que en el caso de DBT, el biosurfactante tiene un mayor efecto sobre soportes como sepiolita, mientras que Tween 80 lo tiene sobre alúmina. Tales resultados confirman los distintos mecanismos que utilizan ambos surfactantes para aumentar la biodisponibilidad de las moléculas sulfuradas.

Los resultados obtenidos sobre gasoil demuestran que es posible mejorar la actividad de BDS mediante la utilización de una combinación de materiales adsorbentes y surfactantes adicionados al medio biocatalítico.

## ***Conclusiones***

---

1. La adición de Tween 80 y del biosurfactante al medio de la BDS del DBT y gasoil, aumenta los valores de la actividad de BDS, cuyo mayor efecto fue obtenido al trabajar con concentraciones cercanas a la CMC.
2. El efecto del biosurfactante sobre la BDS de los tres sustratos sulfurados, es mayor al efecto de Tween 80, producto de su estructura más lipofílica que permite estabilizar de mejor forma las micelas.
3. La inmovilización de bacterias por adsorción produce un aumento de la actividad de BDS para todos los sustratos estudiados, representando una mejora tecnológica capaz de incrementar la biodisponibilidad de las moléculas sulfuradas hacia las bacterias.
4. La incorporación de Tween 80 y del biosurfactante al medio de BDS del DBT y de gasoil, utilizando bacterias inmovilizadas por adsorción sobre distintos soportes inorgánicos, aumenta la actividad biocatalítica debido a un aumento de la biodisponibilidad de estos sustratos.
5. Es posible incrementar la actividad de BDS del gasoil mediante la adición de surfactantes al medio de reacción biocatalítico con sistemas de bacterias inmovilizadas por adsorción sobre soportes inorgánicos, lo cual representa una mejora en los procesos de biotratamiento de contaminantes del petróleo.



## **Referencias Bibliográficas**

- **Barkay** T, Navon-Venezia S, Ron EZ, Rosenberg E. (1999) Enhancement of solubilization and biodegradation of polyaromatic hydrocarbons by the bioemulsifier alasan. *Appl Environ Microbiol.* 65: 2697-2702.
- **Bhatia S y Sharma** D.K. (2010) Biodesulfurization of dibenzothiophene, its alkylated derivatives and crude oil by a newly isolated strain *Pantoea agglomerans* D23W3. *Biochem Eng J.* 50: 104-109.
- **Caro** A, Letón P, García-Calvo E, Setti L (2007) Enhancement of dibenzothiophene biodesulfurization using  $\beta$ -cyclodextrins in oil-to-water media. *Fuel* 86: 2632-2636.
- **Chang** J.H, Chang Y.K, Ryu H.W, Chang H.N. (2000) Desulfurization of light gas oil in immobilized-cell systems of *Gordona* sp. CYKS1 and *Nocardia* sp. CYKS2. *FEMS Microbiol Lett.* 182: 309-312.
- **Desai** JD y **Banat** IM. (1997) Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev.* 61: 47-64.
- **Dinamarca** MA, Ibacache-Quiroga C, Baeza P, Galvez S, Villarroel M, Olivero P, Ojeda J. (2010) Biodesulfurization of gas oil using inorganic supports biomodified with metabolic active cells immobilized by adsorption. *Bioresour Technol.* 101: 2375-2378.
- **Doney** S, Mahowald N, Lima I, Feely RA, Mackenzie FT, Lamarque JF, Rasch PJ. (2007) Impact of anthropogenic atmospheric nitrogen and sulfur deposition on ocean acidification and the inorganic carbon system. *PNAS.* 104: 14580-14585.
- **Elsner** M, Menge M, Müller C, Agar DW. (2003) The Claus process: teaching an old dog new tricks. *Catalysis Today* 79–80: 487–494.
- **Feng** J, Zeng Y, Ma C, Cai X, Zhang Q, Tong M, Yu B, Xu P. (2006) The surfactant tween 80 enhances biodesulfurization. *Appl Environ Microbiol* 72: 7390-7393.
- **Fletcher** S. Mayo (2000) Oil Gas J. Online Story.

- **Gálvez D. S.** Estudio de la adsorción de bacterias sobre soportes inorgánicos, y su influencia sobre la actividad de biodesulfuración de dibenzotiofeno y gasoil. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso. 2008.
- **Gautman KK y Tyagi VK.** (2006) Microbial Surfactants: A Review. *J. Oleo Sci.* 55: 155-166.
- **Gill I y Ballesteros A.** (2000) Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Trends Biotechnol.* 18: 282-296.
- **Goubin S, Huaiying Z, Jianmin X, Guo C, Wangliang L, Huizhou L.** (2006) Biodesulfurization of hydrodesulfurized diesel oil with *Pseudomonas delafieldii* R-8 from high density culture. *Biochem Eng J.* 27: 305-309.
- **Gray K, Mrachko G, Squires C.** (2003) Biodesulfurization of fossil fuels. *Current opinion in Microbiology.* 6: 229-235.
- **Gupta N., Roychoudhury, P. K. & Deb, J. K.** (2005). Biotechnology of desulfurization of diesel: prospects and challenges. *Appl Microbiol Biotechnol.* 66: 356-366.
- **Hames R, Rosenberg KV, Lowe JD, Barker SE, Dhondt AA.** (2002) Adverse effects of acid rain on the distribution of the Wood Thrush *Hylocichla mustelina* in North America. *PNAS.* 99: 11235-11240.
- **Han J.W, Park H.S, Kim B.H, Shin P.G, Park S.K, Lim J.C.** (2001) Potential use of nonionic surfactants in the Biodesulfurization of Bunker-C Oil. *Energy & Fuels* 15: 189-196.
- **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.* 84: 1975-1979.
- **Ibacache C.** Aplicaciones biotecnológicas de los biosurfactantes: Evaluación de la utilización de biosurfactantes sobre desulfuración biocatalítica. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso. 2008.

- **Kilbane J.** (1992) Mutant Microorganisms useful for cleavage of organic C-S Bonds. *U. S. patent*. N° 5,104,801.
- **Kodama K, Umehara K, Shimizu K, Nakatanni S, Minoda Y, Yamada K.** (1973) Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agric Biol Chem.* 37: 45-50.
- **Kertesz M. A.** (2000). Riding the sulfur cycle - metabolism of sulfonates and sulfate esters in gram-negative bacteria. *FEMS Microbiol Rev.* 24: 135–175.
- **Le Borgne S y Quintero R.** (2003) Biotechnological processes for the refining of petroleum. *Fuel Process Technol* 81: 155–169.
- **Lee J, Han S, Hyeon T.** (2004) Synthesis of new nanoporous carbon material using nanostructured silica material as templates. *J. Mater Chem.* 14: 478-486.
- **Li W, Zhang Y, Dong M, Shi Y.** (2005) Biodesulfurization of dibenzothiophene and other organic sulfur compounds by a newly isolated Microbacterium strain ZDM2. *FEMS Microbiol Lett* 247: 45-50.
- **Liu L, Poon R, Chen L, Frescura AM, Montuschi P, Ciabattini 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.
- **Macedo M y Vola M.** Principales grupos de bacilos Gram positivos aerobios. En: Temas de Bacteriología y Virología Médica. Departamento de Bacteriología y Virología. Facultad de Medicina. Universidad de la República. Oficina del Libro. 3ª Edición, 2008, p 339.
- **Maghsoudi S, Kheirloom A, Vossoughi M, Tanaka E, Katoh S,** (2000). Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium sp.* strain P32C1. *Biochem. Eng. J.* 5: 11-16.
- **Marcelis C.** Anaerobic biodesulfurization of thiophenes. Tesis para doctorado en investigación. Universidad de Wageningen. Wageningen, Netherlands. 2002.

- **Meng Z**, Qin GH, Zhang B, Bai JL. (2004) DNA damaging effects of sulfur dioxide derivatives in cells from various organs of mice. *Mutagenesis* 19: 465-468.
- **Moheballi G y Ball AS**. (2008) Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels. *Microbiology* 154: 2169–2183.
- **Monticello D**. (2000) Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr Opin Biotechnol.* 11: 540-546.
- **Monticello D.J**. (2000) Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr Opin Biotechnol.* 11: 540-546.
- **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: 374-378.
- **Ojeda J**, Escalona N, Baeza P, Escudey-Castro M, Gil-Llambías FG. (2003) Synergy between Mo/SiO<sub>2</sub> and Co/SiO<sub>2</sub> beds in HDS: A remote control effect?. *Chem Commun* 13: 1608-1609.
- **Ojeda J**, Escalona N, Fierro JLG, López-Agudo A, Gil-Llambías FJ. (2005) Effect of the preparation of Re/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts on the HDS and HDN of gasoil. *Appl Catal A: Gen.* 281: 25-30.
- **Ojeda J**, Escalona N, Palacios JM, Yates M, Fierro J López-Agudo A, Gil-Llambías FJ. (2008) Promoter effect of Co on the catalytic activity of Re/ $\gamma$ -Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalyst for the HDS and HDN of gasoil. *Appl. Catal. A: Gen.* 350: 6-15.
- **Ojeda J**. “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. 2004.
- **Pakula R y Freeman A**. (1996) A new continuous biofilm bioreactor for immobilized oil-degrading filamentous fungi. *Biotechnol Bioeng.* 49: 20-25.
- **PEMEX** (2008) Anuario Estadístico. México.

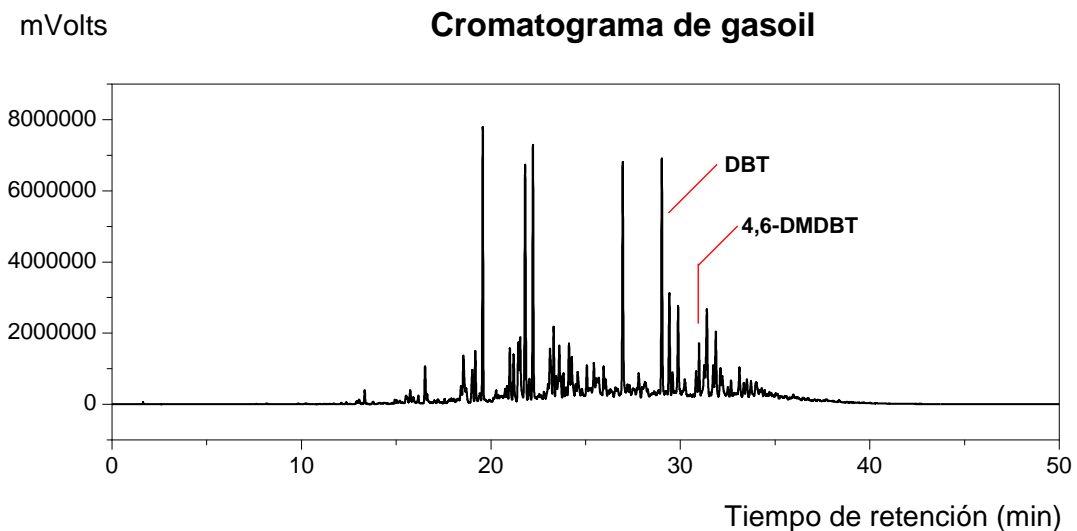
- **Sadouk** Z, Hacene H, Tazerouti A. (2008) Biosurfactants Production from Low Cost Substrate and Degradation of Diesel Oil by a *Rhodococcus* Strain. *Rev. IFP* 63: 747-753.
- **Setti** L, Lanzarini G, Pifferi P. (1997) Whole cell biocatalysis for an oil desulfurization process. *Fuel Process Technol* 52: 145–153.
- **Shaver** A, Boily H, Lebuis AM. (1996) Modeling the Claus Reaction: Preparation of trans-Pt(PPh<sub>3</sub>)<sub>2</sub>(phthalimido)S(O)<sub>2</sub>SR. *Inorg Chem.* 35: 6356-6357.
- **Soleimani** M, Bassi A, Margaritis A. (2007) Biodesulfurization of refractory organic sulfur compounds in fossil fuels. *Biotechnol Adv.* 25: 570-596.
- **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.
- **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.
- **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. Washigton, D. C: The World Bank.

## **Anexos**

## ANEXO 1: Composición del gasoil

La figura 16 muestra el cromatograma de una muestra del gasoil utilizado con una concentración del 0,35 %p/p de azufre remanente, luego de un proceso de hidrodesulfuración. Se muestra la señal del equipo en función del tiempo necesario para que cada analito alcance el detector (tiempo de retención), una vez que la muestra fue inyectada.

Dentro de la gran variedad de sustancias sulfuradas que componen el gasoil (figura 16), se indican los peaks correspondientes al DBT, en gran cantidad, y al 4,6-DMDBT, en menor proporción. Lo cual podría explicar por que el comportamiento de la BDS de este gasoil fuese más similar al del DBT.



**Figura 16:** Cromatograma del gasoil utilizado (0,35 %p/p de azufre) realizado en un cromatógrafo gaseoso con un PFPD (Pulsed Flame Photometric Detector) marca VARIANT®, y equipado con una columna SPB-1 sulfur.



## **ANEXO 2: Cuantificación de la concentración de bacterias en el medio**

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 bacterias se realizó por espectrofotometría a una longitud de onda de 600 nm contra un blanco de suero fisiológico. Se midió la absorbancia ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) de cada suspensión de células diluidas 10 veces con suero fisiológico. Esta medición fue realizada tres 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:

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

Los resultados se expresaron como número de bacterias por volumen de reacción.

### Cuantificación de la Adsorción de bacterias

En los sistemas de adsorción, la disminución de la concentración de bacterias en el medio refleja la cantidad que se adhirió sobre el soporte. La adsorción fue determinada mediante la cuantificación de las bacterias en el medio en dos instancias: (i) al inicio, previa la adición del soporte al sistema, y (ii) una vez finalizado el proceso luego de 24 horas.

La primera cuantificación de bacterias fue realizada del mismo modo descrito anteriormente. Sin embargo antes de poder realizar la segunda determinación, se debió filtrar las muestras por vacío para separar de las bacterias en suspensión, de los restos de soporte generados por la agitación. La filtración fue realizada en un Matraz Kitasato con un papel filtro del N° 4 (figura 17). Cada alícuota filtrada, fue diluida 5 veces con suero fisiológico, y se midió su absorbancia a 600 nm contra un blanco de suero fisiológico. Cada medición se realizó tres veces y se trabajó con el promedio de éstas. El tratamiento matemático de los resultados fue el mismo.

La cantidad de bacterias adsorbidas sobre los soportes estudiados se determinó como la diferencia entre la concentración de bacterias inicial y final en el medio, y fue expresada como número de bacterias por volumen de reacción.



**Figura 17:** Sistema de filtrado al vacío de las muestras post-adsorción