



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**DESULFURACION POR *Geobacillus thermoglucosidasius*
DEL CATALIZADOR MoS_2 AGOTADO**

Tesis que presenta:

I. B. TERESA NOEMI TORRES PÉREZ

Para obtener el grado académico de:

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Director de tesis:

Dra. MARTHA EMILIA POISOT VAZQUEZ

Co-director de tesis:

Dra. SANDRA TRINIDAD DEL MORAL VENTURA

SAN JUAN BAUTISTA TUXTEPEC, OAXACA, MÉXICO, 2017



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2016/035
ASUNTO	Jurado asignado para examen de grado MCQ

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 07 de Septiembre de 2016

C. TERESA NOEMÍ TORRES PÉREZ
ESTUDIANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Por este medio le informo que el jurado de su examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas estará integrado por los siguientes investigadores.

Dra. María de Jesús García Gómez	UNPA	Presidente
Dra. Alida Cruz Pérez	UJAT	Vocal
Dra. Jacqueline Capataz Tafur	UNPA	Secretario
Dra. María de Jesús Santa Gutiérrez Ponce	UNPA	1er Suplente
Dra. Berenice González Santiago	UAMI	2º Suplente

Esperando contar con su visto bueno, le envío saludos cordiales.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji jú



Dr. MARIO VALERA ZARAGOZA
Jefe de la División de Estudios
de Posgrado
DIVISION DE
ESTUDIOS DE
POSGRADO

C. c. p. Dra. Martha E. Poisot Vázquez – Asesor de tesis.
C. c. p. L. P. Yesenia Barrientos Arenal – Jefa de Servicios Escolares.
C. c. p. Archivo.



M. en C. Héctor López Arjona
Vice-rector Académico
Vo. Bo. VICE-RECTORIA
ACADEMICA

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230



UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

OFICIO	DEP/2016/184
ASUNTO	Autorización de impresión de tesis MCQ

San Juan Bautista Tuxtepec, Oaxaca, México a 13 de Diciembre de 2016

L. P. YESENIA BARRIENTOS ARENAL
JEFA DE SERVICIOS ESCOLARES
UNIVERSIDAD DEL PAPALOAPAN

Sirva la presente para informarle que el jurado del examen para obtener el grado de Maestra en Ciencias Químicas de la C. Teresa Noemí Torres Pérez, matrícula 13130005, ha autorizado la impresión del manuscrito que lleva por título "**Desulfuración por *Geobacillus thermoglucosidasius* del catalizador MoS_2 agotado**" para su posterior presentación y defensa por parte del sustentante.

Sin otro asunto en particular, me despido quedando atento ante cualquier duda y deseándole suerte en todas sus actividades.

Atentamente

terra uberrima, mens aperta
Bou Lo-tama, chi ji ju



Dr. MARIO VALERA ZARAGOZA
Jefe de la División de Estudios de Posgrado

C.c.p. Teresa Noemí Torres Pérez
C.c.p. Archivo.

CAMPUS TUXTEPEC
C. Circuito central No. 200, Col. Parque Industrial.
C.P. 38301, Tuxtepec, Oax.
Tel. 01(287)8759240

www.unpa.edu.mx

CAMPUS LOMA BONITA
Av. Ferrocarril S/N, Ciudad universitaria.
C.P. 68400, Loma Bonita, Oax.
Tel. 01(281)8729230

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad del Papaloapan y al CoNaCyT por los recursos brindados para la realización de este trabajo de tesis; y a la Dra. Rosamaría Oliart-Ros por su colaboración al brindarnos la cepa de *Geobacillus thermoglucosidasius*.

A la Dra. Martha, mi directora de tesis, por todo su infinito apoyo y paciencia en este tiempo y por presentarme este maravilloso proyecto.

A la Dra. Sandra, mi co-directora de tesis, por su amable orientación y ayuda siempre que la necesité.

A mis revisoras: Dra. María de Jesús García, Dra. Alida, Dra. Berenice, por las correcciones y el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo y especialmente a la Dra. Jacqueline y Dra. María de Jesús Santa por el tiempo extra que dedicaron en apoyarme con las gráficas.

A mis compañeros y amigos que de una u otra forma me apoyaron a lo largo de este proyecto: Graciela, Sarahí, Xochilt, Cristobal y Juan José.

A mi familia: mis padres Rosa Elena y José Luis que siempre me han apoyado en todo y han cuidado de Emily, quien es mi inspiración para ser mejor cada día; y a Luisa, mi hermana y amiga que siempre me ha motivado a seguir adelante.

Por último, pero en primer lugar le doy gracias a Dios por permitirme llegar hasta este día y por darme todo lo que tengo.

Contenido

INTRODUCCIÓN.....	4
REFERENCIAS.....	5
1. ANTECEDENTES	6
1.1 PROCESOS DE DESULFURACIÓN DE FRACCIONES DEL PETRÓLEO	6
1.1.1 Hidrodesulfuración (HDS).....	6
1.1.2 Desulfuración oxidativa (ODS por sus siglas en inglés)	8
1.1.3 Biodesulfuración (BDS).....	9
1.1.4 Procesos de biodesulfuración	14
1.2 CATALIZADORES DESACTIVADOS	17
REFERENCIAS.....	18
2. JUSTIFICACIÓN.....	22
3. HIPÓTESIS.....	22
4. OBJETIVOS.....	23
4.1 OBJETIVO GENERAL	23
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. METODOLOGÍA.....	23
5.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE GT.....	23
5.2 REACTIVACIÓN DE LA CEPA DE GT	23
5.3 CRECIMIENTO DE GT CON 3 FUENTES DE AZUFRE EN MEDIO SALINO.	24
5.4 DESULFURACIÓN DE DBT POR MEDIO DE GT EN MEDIO SALINO Y MEDIO LB.....	24
5.5 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE GT CON EL CATALIZADOR AGOTADO	25
5.6 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE GT CON DBT Y DBT MÁS CATALIZADOR AGOTADO.	26
5.7 DESULFURACIÓN DEL CATALIZADOR AGOTADO MoS ₂ POR GT.	26
5.8 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL MÉTODO DE PESO SECO.....	28
5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
REFERENCIAS.....	29
6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	30
6.1 CRECIMIENTO DE GT CON 3 FUENTES DE AZUFRE EN MEDIO SALINO.	30
6.2 DESULFURACIÓN DE DBT POR MEDIO DE GT EN MEDIO SALINO Y MEDIO LB.....	31
6.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE GT CON EL CATALIZADOR AGOTADO.	33
6.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE GT CON DBT Y DBT MÁS CATALIZADOR AGOTADO.	35
6.5 DESULFURACIÓN DEL CATALIZADOR AGOTADO MoS ₂ POR GT.	36

6.5.1 Crecimiento de GT en la BDS del DBT	36
6.5.2 Determinación de biomasa por el método de peso seco.....	36
6.5.3 BDS del DBT por GT.....	39
6.6 CARACTERIZACIÓN DEL CATALIZADOR AGOTADO MoS ₂	39
6.6.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés)	39
6.6.2 Fisorción de nitrógeno.	42
6.6.3 Infrarrojo por transformada de Fourier.	45
6.7 REFERENCIAS.....	50
7. CONCLUSIONES	51
ANEXOS.....	52

INTRODUCCIÓN

Uno de los procesos que ha venido cobrando mayor importancia dentro de los complejos industriales es el proceso de desulfuración, el cual consiste en reducir la cantidad de azufre (una impureza contaminante) que se encuentra en el petróleo desde su formación en el subsuelo. Este azufre se encuentra como compuestos organosulfurados combinados con otros compuestos químicos, que si no se eliminan, al estar presentes en la combustión de los automóviles o motores a gasolina o diésel causarían corrosión en los motores o envenenamiento del convertidor catalítico del mismo y al mismo tiempo contaminarían el ambiente; ya que los óxidos de azufre son la fuente principal de la lluvia ácida [1].

Con el afán de controlar estas emisiones y minimizar sus efectos negativos se han implantado en todo el mundo regulaciones muy estrictas en cuanto al contenido de azufre en combustibles derivados del petróleo. En el 2008, a través de la NOM-086-SEMARNAT-SENER-SCFI-2005 se estableció en México un promedio de 30 ppm y un límite de 80 ppm para la concentración de azufre en las gasolinas y un límite de 15 ppm para el diésel [2].

Entre los procesos para minimizar el contenido de azufre se encuentran la hidrodesulfuración (HDS) y la biodesulfuración (BDS).

El proceso de HDS se considera parte de los procesos de purificación durante el refinado del crudo. Esta operación se lleva a cabo a presión alta de hidrógeno y temperatura de media a alta empleando un catalizador de disulfuro de molibdeno con el fin de promover la reacción del hidrógeno con las impurezas organosulfuradas de la carga [1].

En cuanto al proceso de BDS, es aquel en el que se emplean microorganismos como biocatalizadores para eliminar el azufre de los combustibles fósiles [3]. Con este proceso se puede obtener la máxima rentabilidad utilizándolo de forma complementaria a un tratamiento previo de HDS, en el cual se alcanzarían niveles de azufre en torno a 50 ppm y posteriormente por BDS se podrían alcanzar niveles menores a 10 ppm [4].

El proceso de BDS es una tecnología emergente de menor requerimiento energético que la HDS, bajo condiciones de presión y temperatura mucho más suaves. Por otro lado, la producción bacteriana es relativamente sencilla y económica significando el abaratamiento de

costos de operación y disminución en la complejidad de las instalaciones. Una de las principales desventajas de este proceso, es el alto grado de especificidad de las enzimas encargadas del metabolismo de los compuestos organosulfurados. Asimismo, es necesario usar fase acuosa, la cual es imprescindible para la supervivencia del biocatalizador. Sin embargo, esto trae consigo problemas de transferencia de masa de los compuestos a degradar, implicando una etapa de separación de fases al final del proceso [5].

Durante los procesos de HDS y craqueo catalítico se utilizan catalizadores que se degradan debido al depósito de azufre e hidrocarburos además de la adhesión de metales como hierro, níquel, cobre y vanadio, contenidos en los crudos. Estos materiales se adhieren a la superficie del catalizador inhibiendo su función y por lo tanto estos pierden su eficiencia. En consecuencia, los catalizadores agotados son desechados sin ningún tratamiento posterior convirtiéndose en desechos sólidos peligrosos de acuerdo a la norma oficial mexicana NOM-053-ECOL-1993 y al código de clasificación de características que contienen los residuos peligrosos y que significan: corrosivo, reactivo, explosivo, tóxico, inflamable y biológico infeccioso (CRETIB)[6].

Este trabajo se enfoca en aplicar la BDS al catalizador agotado proveniente del proceso de HDS buscando la remoción del azufre depositado sobre el área superficial; lo que disminuiría costos de la HDS al poder reutilizar el catalizador y al mismo tiempo reduciría la contaminación ambiental que se produce con el desecho de los catalizadores agotados.

REFERENCIAS

- [1] A.J. León, M.K. Ortega. “Estudio del proceso de desulfuración de petróleo y su aplicación en los crudos pesados y extrapesados”, tesis de licenciatura, Universidad de Oriente, Venezuela, 2013.
- [2] J.J Kilbane. Curr. Op. in Biotechnol. 17 (2006) 1-10.
- [3] Norma Oficial Mexicana Nom-086-Semarnat-Sener-Scfi-2005. Disponible en: [//biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2292.pdf](http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documentos/Ciga/libros2009/DO2292.pdf)
- [4] D.J. Monticello, W.R. Finnerty. Appl. Environ. Microbiol. 49 (1985) 750-760.
- [5] R.A Del Águila, “Biodesulfuración de fracciones petrolíferas con *Pseudomonas putida* cect5279: optimización del proceso”, tesis de doctorado, Universidad de Alcalá, España 2010.
- [6] Morales-Ramírez y otros. ACI: 1(2) (2010) 15-24

1. ANTECEDENTES

1.1 PROCESOS DE DESULFURACIÓN DE FRACCIONES DEL PETRÓLEO

1.1.1 Hidrodesulfuración (HDS)

El hidrotratamiento se utiliza para eliminar alrededor del 90% de los contaminantes, como nitrógeno, azufre, metales e hidrocarburos insaturados (olefinas), de las fracciones de petróleo líquidas. En este proceso se utiliza el hidrógeno y un catalizador para enriquecer el contenido de hidrógeno de la carga de las olefinas. Normalmente se realiza antes de llevar a cabo otras transformaciones (como la reforma catalítica), para que el catalizador no se contamine con la carga de material no tratado.

La HDS es el proceso que elimina únicamente los compuestos organosulfurados de las fracciones del petróleo elegidas y satura cualquier tipo de olefinas, reduciendo los compuestos aromáticos así como las características que van a favorecer la formación de gomas [1].

En la HDS, la carga se desairea, se mezcla con hidrógeno, se precalienta y se hace pasar a alta presión por un reactor catalítico de lecho fijo. La mayoría de estas reacciones con tratamiento de hidrógeno se llevan a cabo por debajo de los 425 °C para minimizar el craqueo, así que la alimentación del reactor se calienta entre 260 y 425 °C. La presión varía entre 5 y 10 MPa, dependiendo del rendimiento requerido. El hidrógeno se separa, se recicla y el producto se estabiliza en una columna de destilación primaria donde se eliminan los residuos ligeros [2]. El proceso de HDS se esquematiza en la figura 2.1.

Los compuestos de azufre contenidos en la fracción tratada se convierten en ácido sulfhídrico (H_2S) en el reactor de fase primaria por medio de un catalizador de disulfuro de molibdeno o de tungsteno (MoS_2 o WS_2) promovidos con níquel o cobalto, o bien se han utilizado catalizadores trimetálicos de molibdeno, tungsteno y alguno de los metales promotores, entre ellos los disulfuros de $Co(Ni)MoW$ soportados en alúmina [3]. También se usan óxidos de W, Nb y Ti en base de alúmina o sílice en función del proceso de HDS que se utilice [4].

El ácido sulfhídrico y el amoníaco residuales se eliminan por arrastre con vapor, mediante un separador combinado de alta y baja presión o bien por medio de un lavado con aminas que

Por otro lado, también se hace necesario utilizar tecnologías alternativas o complementarias como pueden ser los procesos de desulfuración oxidativa en presencia de H_2O_2 , terc-butil hidroperóxido (TBHP), perácidos y ozono [7], lavados cáusticos y procesos de biodesulfuración [2].

1.1.2 Desulfuración oxidativa (ODS por sus siglas en inglés)

El proceso de ODS es una alternativa para producir diésel de bajo contenido de azufre, menos del 0.0015%. Se lleva a cabo en mezclas de fase líquido-líquido, líquido-sólido o en sistema trifásico, utiliza diversos oxidantes y catalizadores. Se ha demostrado que los compuestos organosulfurados pueden ser transformados a sulfóxidos y posteriormente a sulfonas (figura 2.2), las cuales se pueden eliminar por medio de extracción/adsorción debido a su alta reactividad a la oxidación [8].

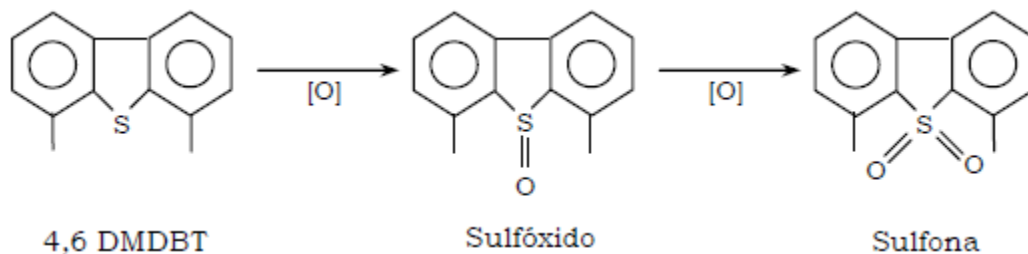


Figura 1.2. Esquema de la reacciones organoazufre en desulfuración oxidativa [8].

En la figura 2.3 se muestra una molécula organoazufre modelo 4,6 dimetildibenzotiofeno (4,6 DMDBT) en un solvente matriz (n-hexadecano) representando los hidrocarburos contenidos en el diésel (fase no polar). En esta fase se supone que la reacción de oxidación no se puede llevar a cabo, por esta razón es necesario utilizar un solvente extractor (gama butirrolactona) para que exista una transferencia de la molécula modelo a la fase polar (los hidrocarburos permanecen en la fase no polar). Una vez que el 4,6 DMDBT se encuentra en la fase polar se adiciona un agente oxidante, peróxido de hidrógeno y el catalizador (uno de los utilizados es el MoS_2), llevándose a cabo la reacción de oxidación del 4,6 DMDBT formando sulfóxidos y posteriormente sulfonas. Simultáneamente sucede una reacción secundaria donde el peróxido de hidrógeno se descompone formando agua y oxígeno [8].

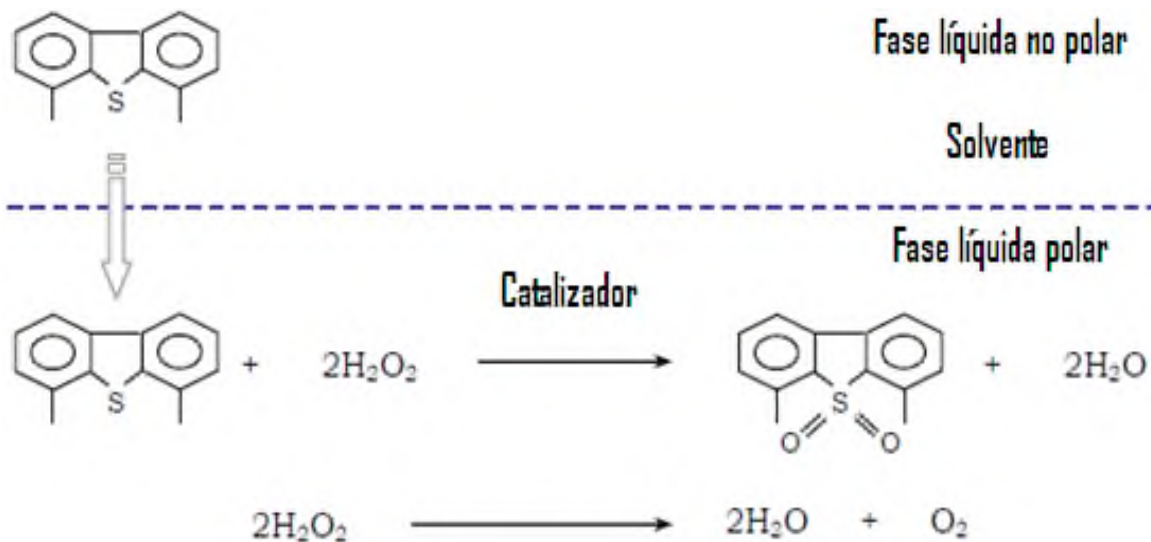


Figura 1.3. Esquema de la desulfuración oxidativa [8].

1.1.3 Biodesulfuración (BDS)

El proceso de BDS del petróleo y fracciones petrolíferas comenzó a utilizarse a mediados de los años 50 del siglo pasado [9] aunque sin demasiado éxito. Sin embargo, a finales de los años 70 diversas organizaciones, como el Departamento de Energía de Estados Unidos, comenzaron a promover trabajos en esta área obteniendo así importantes avances [10]. A lo largo de los años 80 se identificaron bacterias con la capacidad de liberar azufre procedente de las moléculas organosulfuradas de dibenzotiofeno (DBT) sin afectar a la cadena carbonada. A lo largo de la década de los años 90 gracias al estudio de la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 se lograron avances importantes. Esta bacteria posee la capacidad de metabolizar el azufre de forma selectiva, eliminándolo en forma de sulfato. El DBT lo transforma en 2-hidroxibifenilo (HBP) [11], de este modo el valor energético y las propiedades del combustible no resultan afectadas.

Los procesos de BDS pueden clasificarse de acuerdo al tipo de metabolismo que llevan a cabo los microorganismos diferenciando metabolismo anaerobio (reductivo), aerobio (oxidativo) y aerobio facultativo (mixto), en función de la presencia o ausencia de oxígeno ya que este actúa como aceptor de electrones en el proceso [12]. Otra clasificación de estos procesos queda en función del mecanismo de degradación de la molécula de DBT, en la cual se pueden diferenciar dos mecanismos [2]:

- Degradación de DBT con ruptura de enlace C-C, donde se encuentran los mecanismos destructivos y semidestructivos.

- Degradación de DBT con ruptura de enlace C-S, donde se engloban los mecanismos no destructivos.

1.1.3.1 Degradación de DBT con ruptura de enlace C-C

-Biodesulfuración anaerobia

Algunas bacterias poseen la capacidad de eliminar azufre de compuestos orgánicos en ausencia de oxígeno (desulfuración reductiva), sin embargo los niveles de reducción de azufre no son importantes [13].

La bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* M6, es capaz de degradar el 96% de benzotiofeno (BT) y el 42% de DBT, de modo que convierte el DBT y BT, en bifenilo y ácido sulfhídrico [14].

Algunos microorganismos anaerobios como *Desulfomicrobium scambium* y *Desulfovibrio longreachii* muestran actividad catalítica de desulfuración de DBT de sólo el 10%, aunque se han registrado metabolitos que no han podido ser identificados indicando así que la ruta de degradación seguida es distinta a la ruta habitual de este tipo de bacterias [15].

La principal desventaja de esta técnica es el mantenimiento de los procesos de BDS anaeróbica pues son extremadamente complejos. Además, la actividad de la mayoría de las cepas que han sido reportadas muestra poca afinidad por DBT [16,17].

-Biodesulfuración aerobia

Los primeros estudios sobre procesos de BDS aerobia destacaron la habilidad de las bacterias para consumir compuestos tiofénicos como fuente de energía [2]. Algunas bacterias pueden utilizar DBT como fuente de carbono a través de una ruta que implica varias etapas oxidativas [18, 19, 9]. El fundamento de este proceso es la ruptura del enlace de uno de los anillos aromáticos mientras que el azufre no resulta liberado de la molécula. Este tipo de desulfuración es considerado un proceso destructivo. A esta ruta de destrucción oxidativa debido a la acción de un mecanismo enzimático sobre los átomos de carbono del anillo aromático se le conoce como ruta de Kodama [12] y consta de tres etapas: hidroxilación, ruptura del anillo aromático e hidrólisis. Por medio de esta ruta el azufre es eliminado como 3-hidroxi-2-formilbenzotiofeno, HFBT. A este tipo de biocatalizadores se les considera como semidestructivos [2]. El esquema de dicha ruta se muestra en la figura 2.4. El grupo de Monticello demostró que la ruta de Kodama

para la degradación de DBT se asocia con un plásmido presente en al menos dos especies de *Pseudomonas*: *P. alcaligenes* y *P. putida* [9].

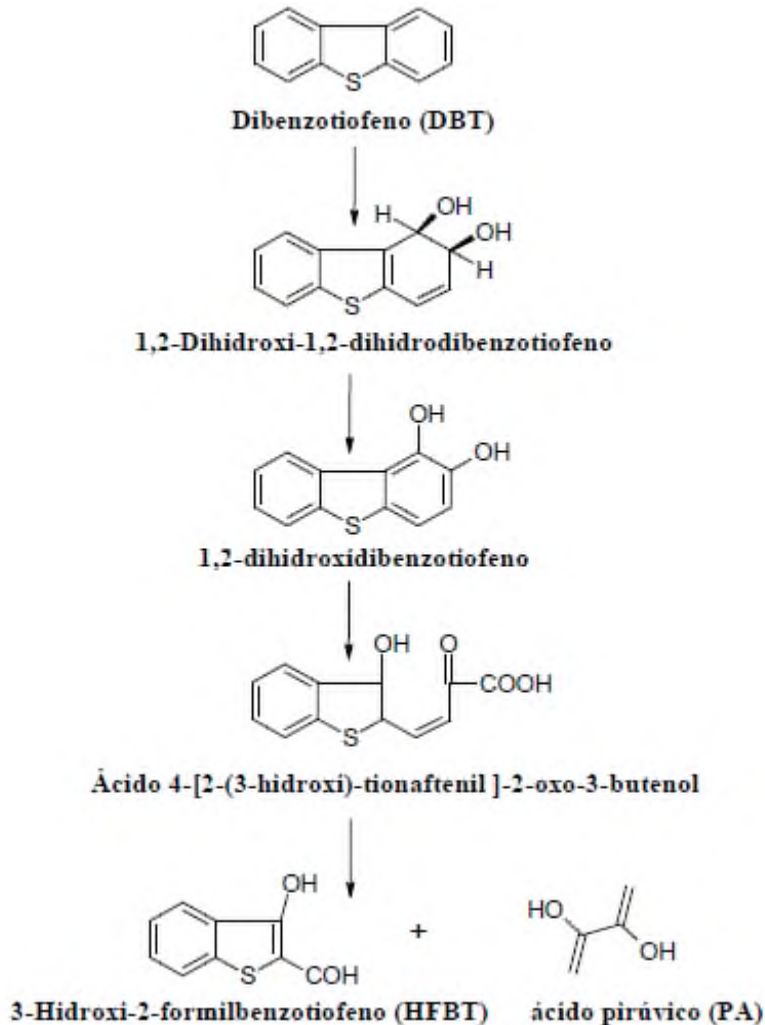


Figura 1.4. Ruta de Kodama de la BDS aerobia [2].

La bacteria *Brevibacterium D.O.* [20] puede consumir DBT como fuente de carbono, azufre y energía durante su crecimiento. La ruta de degradación de DBT es distinta a la ruta de Kodama, y parcialmente similar a la ruta 4S (Apartado 2.1.3.2). A través de esta última, el DBT es transformado en dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO) y posteriormente a dibenzotiofeno sulfona (DBTO₂). En la última etapa de la ruta (figura 2.5) el DBTO₂ es convertido en benzoato y finalmente mineralizado a agua y dióxido de carbono. Estos se consideran biocatalizadores destructivos [2]. Por su parte, la bacteria *Anthrobacter K3b* (también llamada DBTS2), puede transformar DBTO₂ pero no DBT a sulfato y benzoato [21] haciendo uso de la misma ruta que *Brevibacterium D.O.*,

en la cual la desulfuración lleva asociada una ruptura del anillo aromático [22, 23]. Por otro lado, se han aplicado hongos sobre DBT y estudiado su degradación. *Cunninghamella elegans* muestra la habilidad de metabolizar DBT a DBTO, y finalmente a DBTO₂, su ruta se detiene en ese punto [24].

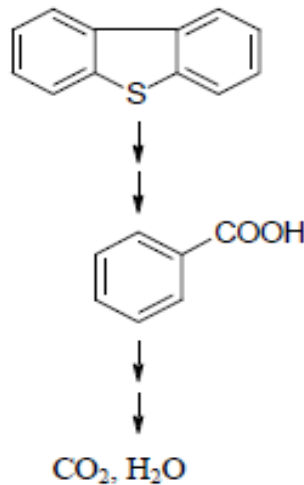


Figura 1.5. Degradación típica de DBT por biocatalizadores destructivos [2].

1.1.3.2 Desulfuración de DBT con ruptura de enlace C-S

La ruta metabólica específica para la desulfuración de DBT consta de cuatro pasos en serie, catalizados por las enzimas DszA, DszB, DszC y DszD para obtener un producto final libre de azufre, el 2-hidroxibifenilo (HBP) [24]. En la figura 2.6 se muestra este mecanismo enzimático, conocido como ruta 4S. Se conoce una amplia variedad de microorganismos capaces de eliminar selectivamente DBT o sus derivados a través de esta ruta. A través del uso de técnicas de screening, Kilbane y col. aislaron la bacteria *Rhodococcus erythropolis* IGST8 (también conocida como *R. rhodochrous*) y *Bacillus sphaericus* IGTS9, siendo la primera la más estudiada por su capacidad desulfurante [25]. Entre los microorganismos capaces de llevar ODS están *Agrobacterium* MC501 [26], *Mycobacterium* G3 [27], *Gordona* CYKS1 [28], *Klebsiella* [29], *Xanthomonas* [26], *Nocardia globelula* [30], y bacterias termófilas como *Paenibacillus* [31]. El uso de bacterias termófilas es interesante ya que mejora los rendimientos de desulfuración y la temperatura a la cual se desarrolla el proceso es próxima a la utilizada en los procesos de HDS [2].

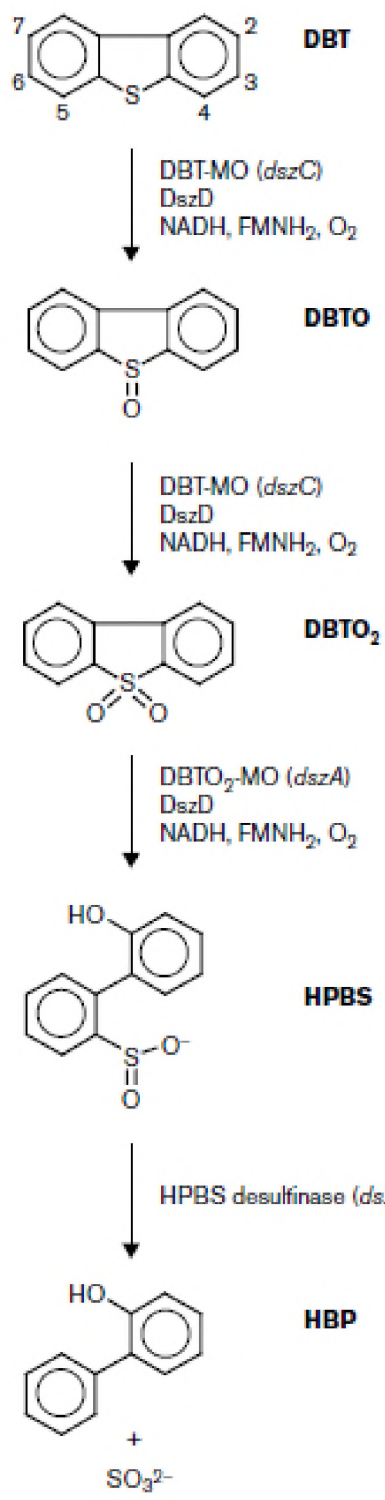


Figura 1.6. Ruta 4S de la BDS de DBT [2].

1.1.4 Procesos de biodesulfuración

1.1.4.1 Biocatalizadores

Los biocatalizadores pueden referirse tanto a enzimas aisladas o extractos celulares como a células enteras, en las que se mantiene intacta su estructura. También se pueden clasificar en función de la disposición en el reactor como biocatalizadores libres los cuales se van a encontrar mezclados con el sustrato formando una suspensión homogénea, o como biocatalizadores inmovilizados los cuales quedan fijos a la superficie de un soporte insoluble [2].

El principal objetivo de la investigación en procesos de biodesulfuración es el desarrollo de un proceso comercial para tratar el petróleo. Por tanto, se ha estimado que la actividad del biocatalizador necesaria para su éxito comercial debe ser de 1.2 a 3 μM DBT convertido/ g biocatalizador/h [32,33].

1.1.4.2 Formas de operación

Los procesos de BDS en condiciones aerobias pueden llevarse a cabo mediante tres formas de operación: sistemas con células en crecimiento, sistemas libres de células y sistemas de células en reposo [2].

- Sistemas de células en crecimiento

En este sistema, el microorganismo utiliza como única fuente de azufre el compuesto que es susceptible de ser desulfurado. De modo que la velocidad de crecimiento de las células dependerá de su capacidad de extracción del azufre del DBT permaneciendo las enzimas desulfurantes con una actividad constante. El crecimiento se lleva a cabo en tanque agitado [30, 31, 34-49]. El proceso se puede realizar tanto en fase acuosa (el DBT está en suspensión) o bien en un medio bifásico (mezcla agua/petróleo) con el DBT disuelto en la fase orgánica. En algunos trabajos se ha empleado un disolvente orgánico modelo como el dodecano [2].

Caro y colaboradores estudiaron la influencia de la proporción de fase orgánica sobre *P. putida* CECT5279, con hexadecano, DBT y MgSO_4 como fuente de azufre. Hasta 50 % v/v de hexadecano, el crecimiento no se ve afectado significativamente al utilizar MgSO_4 , pero se

observó un efecto negativo al utilizar DBT, la producción de biomasa y el rendimiento de desulfuración bajo debido a la limitada transferencia de DBT de fase acuosa a fase orgánica [48].

- Sistemas libres de células

Los experimentos de BDS que utilizan sistemas libres de células son muy escasos, pero han conseguido demostrar que es posible llevar a cabo la desulfuración de DBT utilizando extractos celulares [50,51]. Dada la complejidad de este proceso pareciera inviable desarrollarlo a escala industrial siendo una opción el uso de células enteras [52]. Sin embargo, el uso de sistemas libres de células presenta la ventaja de requerir cantidades mínimas de agua o aún funcionar en sistemas anhidros como las que se encuentran en fases orgánicas, por esta razón presentan mínimos problemas de transferencia de materia pero las enzimas son muy sensibles y se desactivan rápidamente, especialmente en contacto con disolventes orgánicos [2].

-Sistemas con células en reposo

Los sistemas de células en reposo o "resting cell" son los más estudiados [31, 39, 49,50, 53-65]. Las células crecen en medio de cultivo induciendo la síntesis de enzimas de desulfuración, el crecimiento se detiene en un punto elegido y por centrifugación se separan las células. Se conservan intactos los sistemas enzimáticos celulares mientras que las células crecidas se conservan en estado de latencia y pueden ser reactivadas si se aportan los nutrientes adecuados [2]. Se trabaja en sistemas de fases inmiscibles: una fase acuosa, para mantener la viabilidad del microorganismo y su actividad, y una fase orgánica que disuelve al compuesto organosulfurado. Generalmente, se usan condiciones acuosas o fracciones orgánicas no superiores al 25% debido a que la solubilidad de DBT en agua es del orden de 0.005 mM y por tanto la biodisponibilidad de este compuesto al microorganismo es muy baja. Luo y colaboradores han reportado que la conversión de DBT depende de manera directa de la fracción orgánica utilizada en el ensayo [66]. La biodisponibilidad de estos compuestos orgánicos e hidrófobos es un parámetro físico-químico crítico en el rendimiento de degradación obtenido [67].

La reacción de oxidación se realiza en el citoplasma celular, por lo tanto DBT debe ser transportado de la fase orgánica a la célula. Esta es la mayor limitante en los procesos bifásicos de BDS [68, 69]. Este proceso de transporte queda descrito como una secuencia de etapas. En la primera, el DBT, en fase orgánica, se transfiere a la fase acuosa donde alcanza el interior celular

y entra en contacto con las enzimas implicadas en la ruta 4S, convirtiéndose en HBP. Posteriormente, esta molécula sale del interior celular y se transfiere a la fase orgánica [32].

La bacteria *R. erythropolis* IGTS8 mostró capacidad desulfurante baja al utilizar proporciones superiores al 50% v/v de fase orgánica y a partir de 75% v/v no se registró conversión [68]. Por otra parte, también se han llevado a cabo estudios de los efectos de inhibición en el proceso de biodesulfuración en resting cell utilizando un medio acuoso. En el caso de *P. putida* CECT5279 no presenta disminución del rendimiento de desulfuración al aumentar la concentración de HBP [48].

1.1.4.4 Nuestro sistema de estudio

En el 2010 se aislaron e identificaron 19 cepas de bacterias provenientes de aguas termales de México. Entre sus aplicaciones se encontró la BDS ya que pueden crecer en DBT produciendo 2-hidroxibifenilo. Los experimentos de BDS fueron llevados a cabo en un volumen de 5 mL de medio salino con DBT en una relación de 0.05% v/v a pH 7, 55 °C, 150 rpm por 12 días [74]. De las 19 cepas reportadas, ver tabla 1, se seleccionó *Geobacillus thermoglucosidasius* (GT) debido a que presentó alta degradación de DBT y al mismo tiempo el mayor porcentaje de actividad emulsificante, parámetro importante para llevar a cabo la BDS. Por lo cual, en el presente trabajo se utilizará esta cepa para probar su capacidad de llevar a cabo la desulfuración de la superficie del catalizador agotado por uso continuo en el proceso HDS de una refinería.

Tabla 1.1. DBT convertido a 2-HBP por bacterias termófilas [74].

Cepa	Coincidencia	Actividad emulsificante (%)	Degradación de DBT a 2-HBP (mg/L)
CCR1	<i>Geobacillus debilis</i>	5	2.8
CCR2	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	7.5	2.7
CCR3	<i>Anoxybacillus kamchatkensis</i>	1.8	2.9
CCR4	<i>Anoxybacillus rupiensis</i>	5	0.7
CCR7	<i>Geobacillus toebii</i>	5	1.8
CCR10	<i>Geobacillus subterraneus</i>	0	1.9
CCR11	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	3.7	2.1

1.2 CATALIZADORES DESACTIVADOS

Una de las soluciones para disponer de manera segura los catalizadores agotados, ver figura 2.7, es la eliminación de carbón con aire o una mezcla de nitrógeno-aire a condiciones controladas [75]. Sin embargo, las impurezas metálicas permanecen sobre el catalizador como una barrera de difusión, por lo que los metales solamente pueden eliminarse mediante tratamientos que se usan en los procesos extractivos, tales como la hidro-metalurgia y la piro-metalurgia [76].

La desactivación del catalizador es una subdisciplina importante en la ciencia de la catálisis. Hay tres caminos principales que llevan a la desactivación de los catalizadores en el reformado de gas natural: envenenamiento por compuestos de azufre, sinterizado del soporte y fase activa, y formación de carbón [77].



Figura 1.7. Catalizador de HDS, MoS_2 soportado en alúmina, agotado.

Los metales de transición forman compuestos de coordinación muy estables con moléculas conteniendo azufre, como son: ácido sulfhídrico, sulfuro de carbono, metanotiol, etanotiol, dimetil sulfuro, tiofeno, sulfuro de cobalto [78, 79]. Si bien todos los procesos industriales cuentan con equipo de tratamiento para eliminar estos componentes, aún concentraciones de partes por millón pueden acortar drásticamente la vida útil de los catalizadores significando elevación de los costos de HDS. [80].

Los catalizadores desactivados o agotados pueden someterse a tratamientos de reciclado. Estas tecnologías deben clasificarse de acuerdo al agente causante de la remoción del metal de interés, en químicos y biológicos [81]. Una de estas tecnologías recupera los metales de

catalizadores HDS agotados usando sulfuro de carbono, etanol, benceno e hidróxido de sodio [82]. Sin embargo, el costo de operación contra el porcentaje de metal recuperado señala nula viabilidad de este método. En cuanto a los tratamientos biológicos, todas las interacciones entre los microorganismos y los metales u otros elementos como C, N, S y P son parte fundamental de los ciclos biogeoquímicos. Los mecanismos que los microorganismos usan para extraer los metales contaminantes son: biosorción, bioacumulación, biomineralización, biotransformación y quimisorción [81]. También se conocen resultados de lixiviación de metales de los catalizadores desactivados por algunos microorganismos [83-87] pero no se ha encontrado en la literatura información sobre la reactivación de catalizadores por medio de microorganismos y en esto se enfoca el presente trabajo.

REFERENCIAS

- [1] J.C. Speight. The desulfurization of heavy oils and residua. Heinz Hienemann, ed. Marcel Dekker, N.K (1981).
- [2] R.A Del Águila, "Biodesulfuración de fracciones petrolíferas con *Pseudomonas putida* cect5279: optimización del proceso", tesis, Universidad de Alcalá, España (2010).
- [3] H. Topsøe, B.S. Clausen, F.E. Massoth, (J.R. Anderson, M. Boudart, Eds.) in "Catalysts: Science and Technology", Springer, Berlin, Vol. 11, 1996, p. 111, 191.
- [4] S.T. Oyama. Journal of. Cataysis., 216 (2003) 343-352.
- [5] J.R. Gary, G.E. Handweck. Introduction to petroleum refining. Marcel Dekker, N.K (1994).
- [6] T. Kabe, Y. Aoyama, D. Wang, A. Ishihara, W. Quian, M. Hosoya, Q. Zhang. Appl. Catal. A-Gen., 209 (2001) 237-247.
- [7] V. Dumont, L. Oliviero, F. Maugé, M. Houalla. Catalysis Today, 130 (2007) 195-198.
- [8] B. Gil López, M. Ugalde Alcantara, J. F. González Rodríguez, "Desulfuración oxidativa de azufrados de diesel", tesis de licenciatura, Universidad Autónoma Metropolitana, México (2006).
- [9] C.E. ZoBell. Process for removing sulfur from petroleum hydrocarbons and apparatus. U.S. patent, 2641564 (1953).
- [10] M.K. Lee, J.D. Senius, M.J. Grossman. Appl. Environ. Microbiol., 61 (1995) 4362-4366.
- [11] J.J. Kilbane. Mutant microorganism useful for cleavage of organic C-S bonds. U.S. Patent 5104801 (1992).
- [12] B.L. Mc Farland, D.J. Boron, W. Deever, J.A. Meyer, A.R. Johnson, R.M. Atlas. Crit. Rev. in Microbiol., 24(2) (1998) 99-147.
- [13] T. Ohshiro, Y. Izumi. Biosci. Biotechnol. Biochem. 63 (1) (1999) 1-9.
- [14] M.Solemaini, A. Bassi, A. Margaritis. Biotech. Advances, 25 (2007) 570-596.
- [15] K.O. Yamada, M. Morimoto, Y. Tani. J.Biosci. Bioeng. 91 (2001) 91-93.
- [16] S.M. Armstrong, B.M Sankey, G. Voordouw. Biotechnolo. Lett. 17 (1995) 1133-1136.
- [17] H.M. Lizama, L.A. Wilkins, T.C. Scott. Biotechnol. Lett. 17 (1995) 113-116.

- [18] K. Kodama, S. Nakatami, K. Umehara, K. Shimizu, Y. Minoda, K. Yamada. *Agric. Biol. Chem.* 34 (1970) 1320-1324.
- [19] K. Kodama, K. Umehara, K. Shimizu, S. Nakatami, Y. Minoda, K. Yamada. *Agric. Biol. Chem.* 37 (1973) 45-50.
- [20] M. Afferder, S. Schacht, J. Klein, H.G. Trüper. *Arch. Microbiol.* 153 (1990) 324-328.
- [21] H. Sato, D.P. Clark. *Microbios.* 83 (1995) 145-159.
- [22] T. Nojiri, K. Suzuki, Y. Izumi. *J. Gen. Appl. Microbiol.* (2001) 279-305.
- [23] M.D. Dahlberg, R.L. Rohrer, D.J. Fauth, R. Sprecher, G.J. Olson. *Fuel.* 72 (1993) 1645-1649.
- [24] D. Schlenk, R.J. Bevers, A.M. Vertino, C.E. Cerniglia. *Xenobiotica.* 24 (1994) 1077-1083.
- [25] J.J. Kilbane. *Resources. Conservation and Recycling.* 3 (1990) 69-79.
- [26] M. Constatu, J. Giralt, A. Bordons. *World J. Microbiol Biotechnol.* 10 (1996) 510-516.
- [27] S. Nekodzuka, N. Toshiaki, T. Nakajima-Kambe, N. Nobura, J. Lu, Y. Nakamura. *Biocatalysis Biotransformation.* 15 (1997) 21-27.
- [28] S.C. Gilbert, J. Morton, S. Buchanan, C. Oldfield, A. McRoberts. *Microbiology,* 144 (1998) 2545-2553.
- [29] M.W. Dudley, J.W. Frost. *Bioorg., Med. Chem.* 2 (1994) 681-690.
- [30] P. Wang, S. Krawiec. *Arch. Microbiol.* 161 (1994) 266-271.
- [31] J. Konishi, Y. Ishii, T. Onaka, K. Okumura, M. Suzuki. *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 3164-3169.
- [32] D.J. Monticello. *Curr. Opin. Biotechnol.* 11 (2000) 540-546.
- [33] H. Okada, N. Nomura, T. Nakahara, K. Sayito, H. Uchiyama, K. Maruhashi. *J. Biosci. Bioeng.* 100 (2003) 489-497.
- [34] P. Wang, A.E. Humphrey, S. Krawiec. *Appl. Environ. Microbiol.,* 62(8) (1996) 3066-3068.
- [35] L. Setti, G. Lanzarini, P.G. Pifferi. *Fuel Process Technol.* 40 (1994) 311-317.
- [36] L. Setti, G. Lanzarini, P.G. Pifferi. *Fuel Process Technol.* 52, (1997) 145-153.
- [37] L. Setti, P. Farinelli, S. Di Martino, S. Frassinetti, G. Lanzarini, P.G. Pifferi. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52 (1999) 111-117.
- [38] T. Omori, L. Monna, Y. Saiki, T. Kodama. *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 911-915.
- [39] M. Konishi, M. Kishimoto, N. Tamesui, T. Omasa, S. Shioya, H. Ohtake. *J. Of Biosci. And Bioeng.* 99(3) (2005) 259-263.
- [40] H. Honda, H. Sugiyama, I. Saito, T. Kobayashi. *J. Ferment. Bioeng.* 85(3) (1998) 334-338.
- [41] S.K. Rhee, J.H. Chang, Y.K. Chang, H.N. Chang. *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1998) 2337-2331.
- [42] H. Yan, M. Kishimoto, T. Omasa, Y. Katakura, K. Suga, K. Okumura, O. Yoshikawa. *J. Biosci. Bioeng.* 89(4) (2000) 361-366.
- [43] M.J. Grossman, M.K. Lee, R.C. Prince, V. Minak-Bernero, G.N. George, I.J. Pickering. *Appl. Environ. Microbiol.* 67(4) (2001) 1949-1952.
- [44] B.M. Schilling, L.M. Alvares, D.I.C. Wang, C.L. Cooney. *Biotechnol. Prog.* 18 (2002) 1207-1213.
- [45] S. Guchhait, D. Biswas, P. Bhattacharya, R. Chowdhury. *Chem. Eng. J.* 112 (2005) 145-151.
- [46] S. Guchhait, D. Biswas, P. Bhattacharya, R. Chowdhury. *Catal.Today,* 112(1-3) (2005) 145-151.
- [47] H. Chen, W-J. Zhang, J-M. Chen, Y-B. Cai, W. Li. *Bioresource Technol.* 99 (2007) 3630-3634.
- [48] A. Caro, K. Boltes, P. Leton, E. García-Calvo. *Chemosphere,* 73(5) (2008) 663-669.
- [49] J. R. Gallagher, E. S. Olson, D.C. Stemly. *FEMS Microbiol. Lett.* 107 (1993) 31-36.
- [50] T. Ohshiro, Y. Hine, Y. Izumi. *FEMS Microbiol. Lett.* 118 (1994) 341-344.

- [51] M. Kobayashi, T. Onaka, Y. Ishii, J. Konishi, M. Takaki, H. Okada, Y. Ohta, K. Koizumi, M. Suzuki. *FEMS Microbiology Letters*. 187 (2000) 123-126.
- [52] S. Le Borgne, R. Quintero. *Fuel Process Technol.*, 81 (2003) 155-169.
- [53] T. Ohshiro, T. Hirata, I. Hashimoto, Y. Izumi. *J. Ferment. Bioeng.*, 82(6) (1996) 610-612.
- [54] T. Ohshiro, K. Suzuki, Y. Izumi. *Ferment. Bioeng.* 81(2) (1999) 121-124.
- [55] C. Oldfield, O. Pogrebinsky, J. Simmonds, E.S. Olson, C.F. Kulpa. *Microbiol.* 143 (1997) 2961-2973.
- [56] S. Maghsoudi, A. Kheirloom, M. Vossoughi, E. Tanaka, S. Katoh. *Biochem. Eng. J.* 5 (2000) 11-16.
- [57] S. Maghsoudi, A. Kheirloom, M. Vossoughi, E. Tanaka, S. Katoh. *Biochem. Eng. J.* 8 (2001) 151-156.
- [58] G. Castorema, C. Suárez, I. Valdez, G. Amador, L. Fernández, S. Le Borge. *FEMS Microbiol. Lett.* 10640 (2002) 1-5.
- [59] S. Abbad-Andaloussi, C. Lagnel, M. Warzywoda, F. Monot. *Enz. Microbiol. Technol.* 32(3-4) (2003) 446-454.
- [60] J. Yang, I.W. Marison. *Biochem. Eng. J.* 27 (2005) 77-82.
- [61] M. Konishi, M. Kishimoto, N. Tamesui, T. Omasa, S. Shioya, H. Ohtake. *Biochem. Eng. J.*, 24 (2005) 49-54.
- [62] X. Jia, J. Wen, Z. Sun, Q. Caiyin, S. Xie. *Chem. Eng. Sci.* 61(6) (2006) 1987- 2000.
- [63] M. Rasthtchi, G.H. Mohebbali, M. Akbarnejad, J. Towfighi, B. Rasekh, A. Keytash. *Biochem. Eng. J.* 29(3) (2006) 169-173.
- [64] A. Alcon, A.B. Martin, V.E. Santos, E. Gomez, F. Garcia-Ochoa. *Biochem. Eng. J.* 39(3) (2008) 486-495.
- [65] M. Shavandin, M. Sadeghizadeh, A. Zomorodipour, K. Khajeh. *Bioresource Technology*. 100 (2008) 475-479.
- [66] M.F. Luo, J.M. Xing, Z.X. Gou, S. Li, H.Z. Liu, J.Y. Chen. *Biochem. Eng. J.* 13(1) (2002) 1-6.
- [67] P.F. Churchill, R.J. Dudley, S.A. Churchill. *Waste management*. 15(5-6) (1996) 371-377.
- [68] A. Caro, K. Boltes, P. Leton, E. García-Calvo. *Biochem. Eng. J.* 35(2) (2007) 191-197.
- [69] C.L.M. Marcelis, M. van Leeuwen, H.G. Polderman, A.J.H. Janssen, G. Lettinga. *Biochem. Eng. J.* 16 (2003) 253-264.
- [70] M.A. Pacheco, E.A. Lange, P.T. Pienkos, L.Q. Yu, M.P. Rouse, Q. Lin, L.K. Linguist. *National Petrochemical and Refiners Association, Annual Meeting, March 21-23 (1999); San Antonio, Texas.*
- [71] F. Li, J. Feng, L. Meng, Y. Zheng, L. Luo, C. Ma. *Applied and Environ. Microl.* 71(1) (2005) 276-281.
- [72] E.N. Kaufmann, J.B. Harkins, M. Rodriguez Jr, C. Tsouris, P.T. Selvaraj, S. Murphy. *Fuel Process Technol.* 52 (1997) 127-134.
- [73] S. Oda, H. Ohta. *J. Biosci. Bioeng.* 94(5) (2002) 474-477.
- [74] D. L. Pinzón-Martínez, C. Rodríguez-Gómez, D. Miñana-Galbis, J. A. Carrillo- Chávez, G. Valerio-Alfaro, R. Oliart-Ros. *Environmental Technology*, 31: 8 (2010) 957-966.
- [75] S. Hildebrant, O. Koseuglo. *Regeneration, Reactivation and Reworking of Spent Catalysts, 205° Cong. Nat., Am. Chem. Soc., Denver, USA, 40-44 (1993).*
- [76] Y. Chen, Q. Feng. *Minerals Engineering*. 19(1) (2006) 94-97.

- [77] C. Bartholomew, W. Sorensen, J. Catal. 81 (1983) 131.
- [78] O.A. Ferretti, I.H. Farina. Procesos. 91 (1982) 13.
- [79] I. Alstrup, J. Rostrup-Nielsen, S. Roen. App. Catal. 119 (1989) 97.
- [80] M.A. Ocsachoque, "Desarrollo de catalizadores metálicos soportados para la obtención de gas de síntesis", tesis de doctorado, Universidad Nacional de la plata, Argentina (2012).
- [81] W. T. Rodríguez Luna, "Estudio de la remoción vía microbiana de Ni y V presentes en catalizadores gastados", tesis de posgrado, Instituto Politécnico Nacional, México (2009).
- [82] L. M. Torres, B. I. Kharisov, V. N. Elizondo. Ciencia UANL. IV 2 (2001) 198-204.
- [83] D. Mishra, D.J. Kim, D.E. Ralph, J.G. Ahn, Y.H. Rhee. Hydrometallurgy 88 (2007) 202-209.
- [84] D. Pradhan, D. Mishra, D.J. Kim, G. Roy Chaudhury, Seoung W. Lee. Hydrometallurgy 99 (2009) 157-162.
- [85] R.M. Gholami, S.M. Borghei, S. M. Mousavi. Hydrometallurgy 106 (2011) 26-31.
- [86] F. Amiri, S. Yaghmaei, S.M. Mousavi, S. Sheibani. Hydrometallurgy 109 (2011) 65-71.
- [87] F. Amiria, S.M. Mousavic, S. Yaghmaeia, M. Baratib. Biochemical Engineering Journal 67 (2012) 208-217.

2. JUSTIFICACIÓN

La industria petrolera genera grandes cantidades de desechos, provenientes de los procesos catalíticos involucrados en la refinación del petróleo. Durante los procesos de refinación, los catalizadores se van saturando de compuestos y iones metálicos reduciendo así su eficiencia. En algunos casos, los catalizadores agotados son tratados químicamente para disminuir la cantidad de sustancias adheridas a su superficie y asegurar su posterior disposición.

El peligro que representan los catalizadores agotados para la salud radica en su alto contenido de metales, los cuales pueden ser altamente tóxicos para los seres vivos. Si éstos no son dispuestos o tratados de manera adecuada se corre el riesgo de que los metales se dispersen y contaminen cualquier ecosistema.

Se han llevado a cabo numerosos estudios sobre la desulfuración de los hidrocarburos por medios químicos y biológicos, así también para la remoción de metales de los catalizadores desactivados, pero en cuanto a la regeneración de los catalizadores agotados existe muy poca información y mucho menos sobre la utilización de bacterias para reactivar catalizadores agotados. Por lo mencionado anteriormente, este proyecto de investigación permitirá abundar en el estudio de la actividad biodesulfurante de la bacteria *Geobacillus thermoglucosidasius* (GT) sobre el catalizador agotado MoS_2 procurando dar valor agregado a dicho desecho de las refinerías.

3. HIPÓTESIS

Al ser GT un microorganismo capaz de realizar la BDS del DBT, podría eliminar el azufre acumulado en la superficie del catalizador MoS_2 agotado.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la desulfuración del catalizador agotado MoS₂ por GT.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la BDS del DBT por GT.
- Establecer las condiciones para la BDS del catalizador agotado.
- Obtener la cinética de crecimiento de GT en la BDS del catalizador agotado.
- Caracterizar el catalizador agotado en cuanto a su contenido de azufre y área superficial, antes y después del proceso de BDS.

5. METODOLOGÍA

En esta sección del presente texto se explica cómo se planteó la estrategia experimental para obtener datos de manera sistemática, analizarlos y poder contrastarlos con la hipótesis planteada para llegar a la conclusión correspondiente. Se planeó trabajar en 3 partes esta tesis: primero la desulfuración del dibenzotiofeno (DBT), segundo establecer y llevar a cabo la metodología para la biodesulfuración del catalizador desactivado y la tercera parte se enfocó en la caracterización del catalizador desactivado.

5.1 OBTENCIÓN DE LA CEPA DE GT

La cepa de GT fue proporcionada por la Dra. Rosamaría Oliart Ros, de la Unidad de Investigación y Desarrollo en Alimentos (UNIDA), Instituto Tecnológico de Veracruz, Veracruz. Esta cepa fue aislada de “El Carrizal” un lugar de aguas termales ricas en azufre que se encuentra en 19° 19' 00'' latitud norte, 96° 38' 40'' longitud oeste, a 250 metros sobre el nivel medio del mar, junto al río Pescados-La Antigua[1].

5.2 REACTIVACIÓN DE LA CEPA DE GT

Se tomaron 100 µL de la cepa contenida en medio líquido Luria Bertani (LB; anexo A [1]) e inocularon en 6 tubos de ensayo con 2 mL de medio LB cada uno, los cuales se incubaron a 55°C

y 150 rpm por 24 h. Después de las 24 horas de crecimiento la biomasa se mezcló en glicerol al 80% (1:1 v/v) y se almacenó en congelación.

Se utilizó una incubadora con agitación marca New Brunswick Scientific de la serie Excella E24, y la esterilización de los medios de cultivo y materiales de la experimentación se realizó a 121° por 15 minutos en una autoclave vertical, marca Geo-Lab.

5.3 CRECIMIENTO DE GT CON 3 FUENTES DE AZUFRE EN MEDIO SALINO.

Se preparó un medio de sales cuya composición se señala en el anexo B. En un volumen de este medio se agregó un inoculó de 10% del volumen total y 0.05% de volumen de la fuente de azufre (500 ppm) disuelta en N, N-dimetilformamida. Se incubó a 55°C y 150 rpm para determinar su cinética de crecimiento cada 24 h por 12 días. El crecimiento celular fue medido mediante el monitoreo de la densidad óptica a 600 nm para lo cual se utilizó un espectrofotómetro UV/VIS Cole-Parmer, modelo EW-83059-10 [1]. Las fuentes de azufre ensayadas son: dibenzotiofeno (DBT), tiofeno (TF) y tiourea (TU).

5.4 DESULFURACIÓN DE DBT POR MEDIO DE GT EN MEDIO SALINO Y MEDIO LB.

De las muestras de GT en congelación se inoculó en medio LB y se incubó por 24 h (55°C, 150 rpm). Pasadas las 24 h se inocularon dos medios: LB con TF y LB con TU, se dejaron en incubación 24 h (55°C, 150 rpm). De cada medio anterior se inocularon dos medios nuevos, de sales con DBT y LB con DBT y se dejaron en incubación por 40 h (55°C, 150 rpm). El crecimiento celular fue medido mediante el monitoreo de la densidad óptica (600 nm) cada 4 h. El inoculo de GT para estos ensayos fue del 10 % del volumen de medio de cultivo. El TF, TU y DBT se utilizaron al 5% del volumen de medio de cultivo con una concentración de 500 ppm. Cada ensayo se realizó por duplicado y con un control de crecimiento, el cual era un medio con las mismas condiciones de cultivo pero que no contenía DBT.

Al finalizar los 4 experimentos, mediante centrifugación, se separó la biomasa y los sobrenadantes. La biomasa de los experimentos en medio LB se resuspendió en una mezcla de solución salina y glicerol (50% v/v) para su conservación y uso posterior. Los sobrenadantes se analizaron por cromatografía de gases para cuantificar la disminución de la concentración de DBT.

Para llevar a cabo la centrifugación de los medios de cultivo se utilizó una centrífuga refrigerada programable de la marca Thermo scientific modelo Megafuge 16R.

El análisis de los sobrenadantes se realizó en un cromatógrafo de gases 7890A de Agilent Technologies acoplado a un detector de ionización de flama (FID) y equipado con muestreador automático. Se utilizó una columna capilar HP-5 (Agilent Tech) de 30 m de longitud, 0.320 mm de diámetro, un espesor de película de 0.25 μm y límites de temperatura de -60° hasta 325° . El flujo del gas acarreador N_2 es de 3 mL/min y el volumen de inyección para cada muestra es de 1 μL con Split 10:1. La temperatura para el inyector y el detector fue la misma 300°C . El programa de temperatura para el horno fue el siguiente: 150°C por 1 min, $4^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 170°C , $20^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 240°C y $30^\circ\text{C}/\text{min}$ hasta 300°C por 1 min. El tiempo de retención del DBT es de 7.088 min. Todas las muestras se analizaron por triplicado. Las curvas de calibración se encuentran en el anexo C.

5.5 CINÉTICAS DE CRECIMIENTO DE GT CON EL CATALIZADOR AGOTADO

De la biomasa recuperada de la BDS, se inóculo (10% v/v) en medio LB que contenía catalizador agotado (0.1 g), quedando dos tratamientos: biomasa recuperada cuyo inóculo inicial fue TF y TU respectivamente. Cada ensayo se realizó por triplicado y con un control de crecimiento, el cual era un medio con las mismas condiciones de cultivo pero que no contenía catalizador agotado.

La cinética tuvo una duración de 30 h (55° , 150 rpm) y el crecimiento celular fue medido mediante el monitoreo de la DO (600 nm). Después de este tiempo, se recuperó la biomasa mediante centrifugación y se conservó en una mezcla de suero salino y glicerol (50% v/v) para su segundo uso.

Se realizó una segunda cinética de crecimiento de GT con el catalizador agotado, utilizando la biomasa recuperada de la primera cinética, se utilizaron las mismas condiciones que en la anterior.

5.6 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE GT CON DBT Y DBT MÁS CATALIZADOR AGOTADO.

De las muestras de GT en congelación se inoculó en medio LB y se incubó por 24 h (55°C, 150 rpm). Pasadas las 24 h se inocularon dos medios: LB con TF y LB con TU, se dejaron en incubación 24 h (55°C, 150 rpm). De cada medio anterior se inocularon dos medios LB, uno con DBT y otro con DBT y partículas del catalizador (0.1 g); se dejaron en incubación por 50 h (55°C, 150 rpm). El crecimiento celular fue medido mediante el monitoreo de la densidad óptica (600 nm) cada 24 h. El inóculo de GT para estos ensayos fue del 10 % del volumen de medio de cultivo. El TF, TU y DBT se utilizaron al 5% del volumen de medio de cultivo con una concentración de 500 ppm. Cada ensayo se realizó por triplicado y con un control de crecimiento, el cual era un medio con las mismas condiciones de cultivo pero que no contenía DBT ni partículas de catalizador agotado.

Al finalizar los 4 experimentos, mediante centrifugación, se separó la biomasa y los sobrenadantes. Los sobrenadantes se analizaron por cromatografía de gases para cuantificar la disminución de la concentración de DBT.

5.7 DESULFURACIÓN DEL CATALIZADOR AGOTADO MoS₂ POR GT.

De las muestras de GT en congelación se inoculó en medio LB y se incubó por 24 h (55°C, 150 rpm). Pasadas las 24 h se inocularon dos medios: LB con TF y LB con TU. De cada medio anterior se inocularon 4 medios nuevos que contenían DBT y partículas del catalizador agotado (0.1 g), variando el tamaño (10 y 20 %) y el tiempo de incubación del inóculo (12 y 24 h); se dejaron en incubación por 48 h (55°C, 150 rpm). El crecimiento celular fue medido mediante el monitoreo de la densidad óptica (600 nm) cada 12 h.

El TF, TU y DBT se utilizaron al 5% del volumen de medio de cultivo con una concentración de 500 ppm. Para cada ensayo se hicieron 10 repeticiones y su control de crecimiento, el cual era un medio con las mismas condiciones de cultivo pero que no contenía DBT ni catalizador.

Al finalizar los 8 experimentos, mediante centrifugación, se separó la biomasa y el sobrenadante; este último se analizó por cromatografía de gases para cuantificar la disminución de la concentración de DBT. La curva patrón utilizada se muestra en el anexo D.

Las partículas del catalizador agotado se secaron a 100 °C por 24 h para eliminar el exceso de agua y posteriormente se caracterizaron a través de los siguientes técnicas: microscopía electrónica de barrido (SEM), espectroscopia de infrarrojo (IR) y fisorción de nitrógeno (método BET). La tabla 5.1 señala el número de muestras obtenidas de estos experimentos y como cambia el inóculo en cada uno de ellos. La figura 5.1 muestra con más detalle la metodología utilizada para la desulfuración del catalizador agotado.

Tabla 5.1. Nomenclatura de las muestras resultantes

Muestra	Fuente de azufre para el inóculo	Tiempo de crecimiento del inóculo (h)	Volumen de inóculo (mL)
TF 12-6	Tiofeno	12	6
TF 24-6	Tiofeno	24	6
TF 12-12	Tiofeno	12	12
TF 24-12	Tiofeno	24	12
TU 12-6	Tiourea	12	6
TU 24-6	Tiourea	24	6
TU 12-12	Tiourea	12	12
TU 24-12	Tiourea	24	12

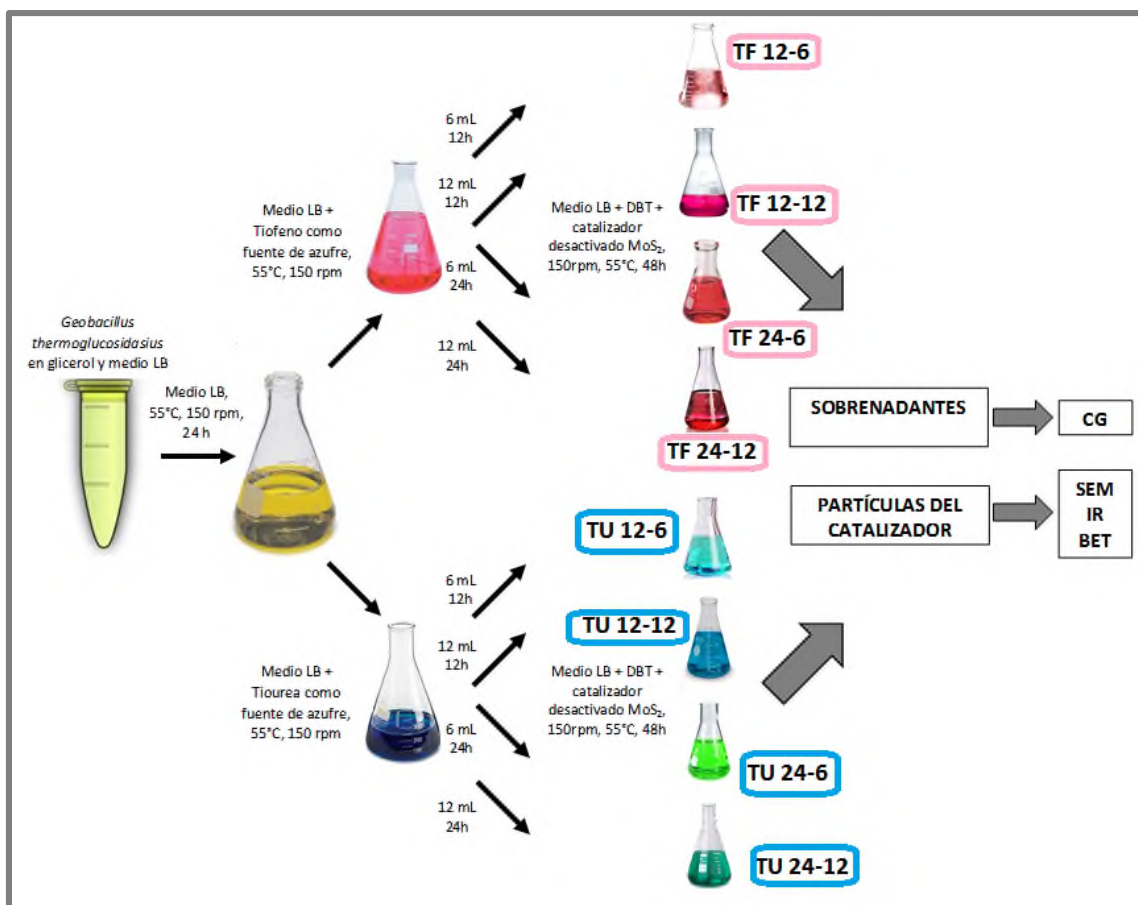


Figura 5.1. Metodología para la desulfuración del catalizador agotado MoS_2 .

5.8 DETERMINACIÓN DE BIOMASA POR EL MÉTODO DE PESO SECO

Esta determinación se realizó para obtener el tamaño de inóculo en mg/mL del que resultase el mejor tratamiento de BDS del catalizador agotado, ya que no existe información al respecto.

Se tomaron muestras de la solución que se inoculó en los 8 tratamientos descritos en el apartado 5.5 y se colocaron en tubos de ensayo previamente pesados. Las muestras fueron centrifugadas a 5500 rpm a 4°C por 15 minutos. Se eliminó el sobrenadante y los tubos se mantuvieron en el horno de secado a 105 °C hasta peso constante y se registraron los valores. Se calculó el peso seco con la siguiente fórmula:

$$\text{peso seco} = \frac{(\text{peso tubo} + \text{muestra seca}) - (\text{peso inicial tubo})}{\text{volumen de muestra}}$$

5.9 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA), de uno o dos factores (dependiendo del ensayo realizado) para los datos obtenidos en cada cinética de crecimiento de GT con el fin de evidenciar si hay o no diferencia significativa entre los dos tipos de inóculo utilizados: TF y TU. Para el análisis de los datos se utilizó el software Microsoft Excel 2013. En todos los casos se utilizó un valor para alfa de 0.05.

REFERENCIAS

- [1] D. L. Pinzón-Martínez, C. Rodríguez-Gómez, D. Miñana-Galbis, J. A. Carrillo-Chávez, G. Valerio-Alfaro, R. Oliart-Ros. *Environmental Technology*, 31: 8 (2010) 957-966.
- [2] G. Tortora, B. Funke, C. Case “Introducción a la microbiología”, novena edición, editorial Médica Panamericana, Buenos Aires (2007).

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1 CRECIMIENTO DE GT CON 3 FUENTES DE AZUFRE EN MEDIO SALINO.

Para este ensayo se siguió la metodología utilizada por Pinzón y colaboradores [1], se utilizaron las mismas condiciones para evaluar el crecimiento en otras dos fuentes de azufre aparte del DBT, las cuales fueron TF y TU. Se fijó el volumen de inóculo (10 %) de GT ya que no estaba reportado en la metodología.

Según lo reportado, la BDS del DBT se llevaba a cabo durante 12 días, pero en este ensayo no hubo crecimiento de GT en DBT y por lo tanto no se realizó la BDS.

Para TF y TU el máximo crecimiento de GT se alcanzó a las 24 h y posteriormente el microorganismo entró en las fases de latencia y muerte celular, por lo cual se decidió parar el cultivo en el día 6.

Debido al nulo crecimiento de GT en DBT, en la figura 6.1 se muestra la cinética de crecimiento por 6 días de GT con TF y TU. De acuerdo al análisis estadístico (Anexo E), no existe diferencia significativa en el crecimiento de GT cuando se utilizan estas dos fuentes de azufre.

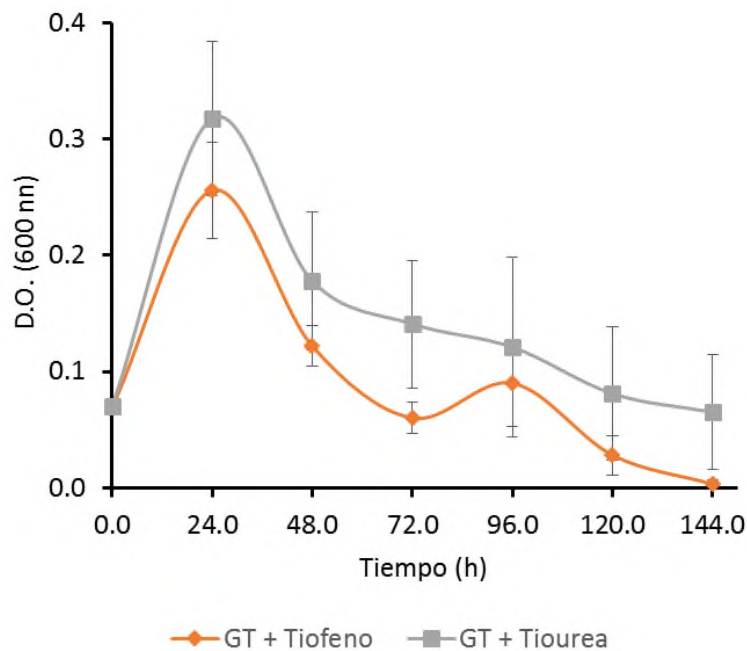


Figura 6.1 Cinéticas de crecimiento (6 días) de GT en medio salino con 3 fuentes de azufre.

6.2 DESULFURACIÓN DE DBT POR MEDIO DE GT EN MEDIO SALINO Y MEDIO LB.

Debido a los resultados anteriores, se planteó una nueva metodología para la BDS del DBT: la utilización de un preinóculo que creció 24 h antes en un medio con una fuente de azufre (TF o TU) para la adaptación del microorganismo.

En la figura 6.2 (a y b) se observa la cinética de crecimiento de GT en medio salino más DBT con preinóculo crecido en TF y TU respectivamente. Se puede apreciar que el uso de un preinóculo benefició el crecimiento de GT cuando se puso en contacto con el DBT, ya que hubo crecimiento de 0.8 U de DO (600 nm) y en el ensayo anterior no. Sin embargo al realizarse el análisis de los sobrenadantes mediante cromatografía de gases se descubrió que no se llevó a cabo la BDS del DBT (tabla 6.1). Con base al análisis estadístico se puede afirmar que no hay un mejor tratamiento para el crecimiento de GT con DBT en el medio salino (Anexo F).

Con base en la nula degradación del DBT por GT en medio salina, se decidió utilizar el medio LB para la BDS del DBT, ya que al ser un medio de cultivo más nutritivo, se esperaba obtener un mayor crecimiento de GT y por lo tanto que se llevara a cabo la degradación del DBT. En la figura 6.2 (c y d) se observa la cinética de crecimiento de GT en medio LB más DBT con preinóculo crecido en TF y TU respectivamente. Es notoria la diferencia en el crecimiento de GT al usar este medio de cultivo ya que el mejor crecimiento alcanzó 2 U de DO (600 nm), más del doble de crecimiento de GT en medio salino. El análisis estadístico muestra que si hay una diferencia significativa en el crecimiento de GT cuando se usan dos medios de cultivo diferentes (Anexo G).

En la figura también se observa que GT alcanzó un valor mayor de DO (600 nm) cuando se utilizó el preinóculo crecido en TF. En contraste se obtuvo un mayor porcentaje de BDS del DBT cuando se utilizó el preinóculo crecido en TU (tabla 6.1). El análisis estadístico muestra que no hay un mejor tratamiento para el crecimiento de GT con DBT en medio LB (Anexo H); por lo anterior no podemos establecer una relación directamente proporcional entre el crecimiento de GT y la degradación del DBT pero podemos afirmar que GT realizó la BDS del DBT.

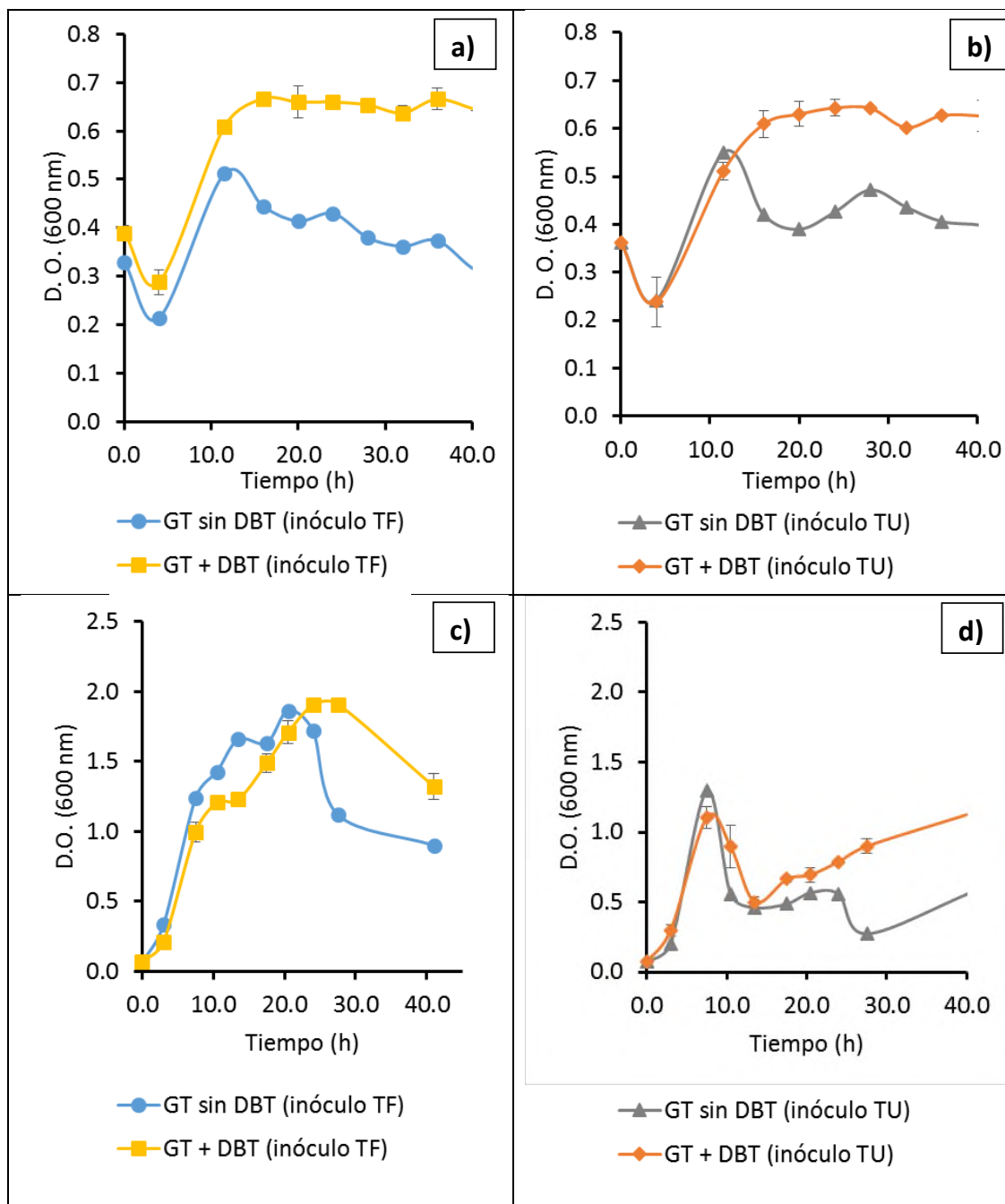


Figura 6.2 Crecimiento de GT, medio salino (a, b) y medio LB (c, d) con preinóculo TF (a, c) y TU (b, d).

Tabla 6.1. Resultados de BDS del DBT

Muestras	% BDS
GT + DBT/sales (preinóculo TF)	0
GT + DBT/sales (preinóculo TU)	0
GT + DBT/LB (preinóculo TF)	47.84
GT + DBT/LB (preinóculo TU)	53.08

6.3 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE GT CON EL CATALIZADOR AGOTADO.

Una vez logrado que GT realizara la BDS del DBT, se recuperó la biomasa y se procedió a ponerla en contacto con el catalizador agotado. Esto se realizó con la finalidad de observar el crecimiento de GT, ya que no hay antecedentes que reporten esta situación, no se conocía la capacidad del microorganismo de sobrevivir al contacto con el catalizador agotado.

En la figura 6.3 (a y b) se observa el crecimiento de GT en la primer cinética con el catalizador, de lo cual se puede afirmar que GT puede sobrevivir al contacto con el catalizador agotado.

Se realizó una segunda cinética de GT con el catalizador, que se muestra en la figura 6.3 (c y d), el propósito fue determinar si la biomasa se podía reutilizar después de estar en contacto con el catalizador. Se puede observar que el crecimiento de la biomasa fue tres veces menor al del crecimiento en la primera cinética para cada uno de los tratamientos, y de acuerdo al análisis estadístico si hay diferencia significativa en el crecimiento de GT entre el primer y segundo contacto con el catalizador agotado; por lo antes mencionado no se reutilizó la biomasa de GT para la BDS del catalizador agotado en los ensayos posteriores (Anexo I).

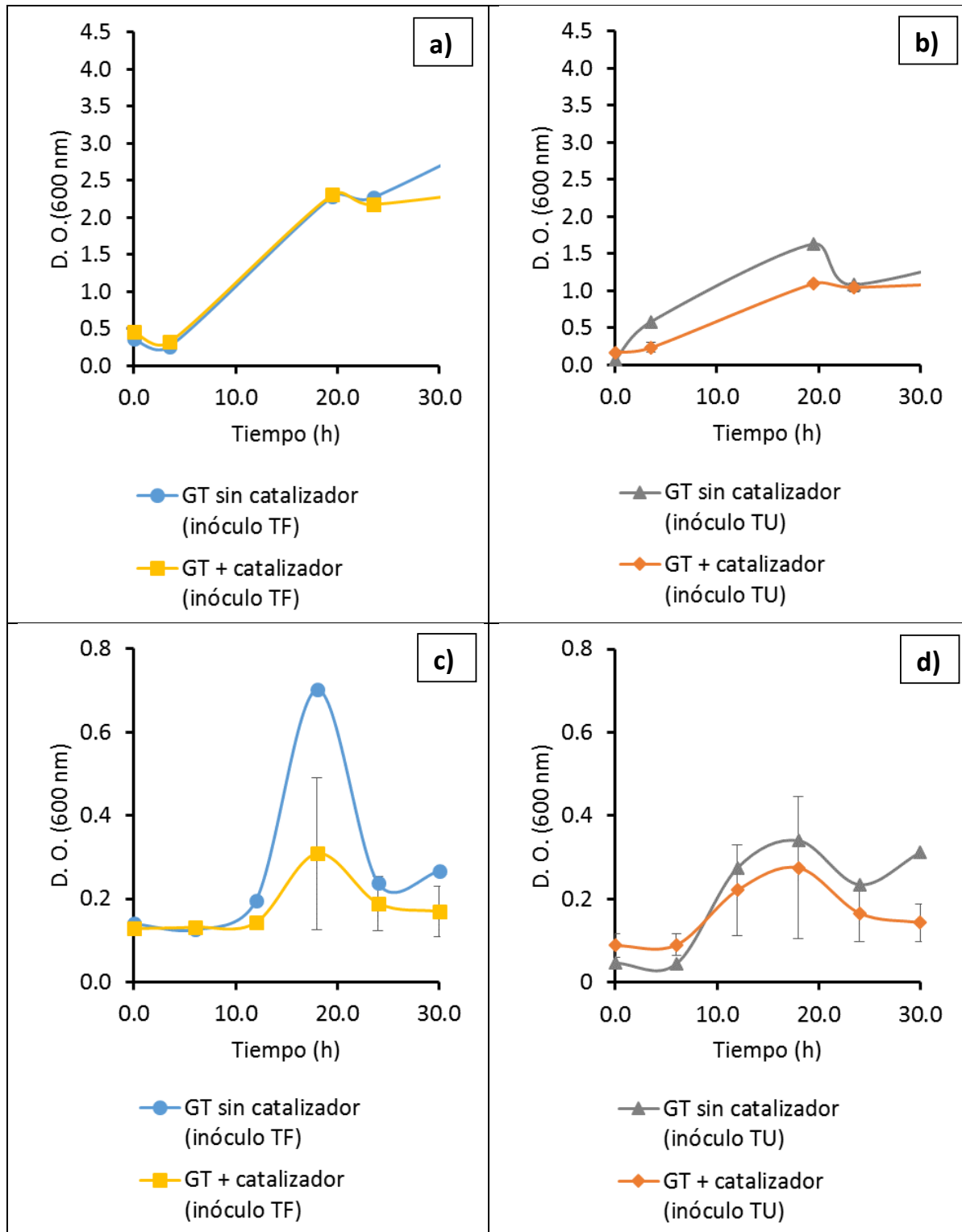


Figura 6.3 Crecimiento de GT con catalizador agotado: primer cinética (a, b) y segunda cinética (c, d) con preinóculo TF (a, c) y TU (b, d).

6.4 CINÉTICA DE CRECIMIENTO DE GT CON DBT Y DBT MÁS CATALIZADOR AGOTADO.

Se realizó una cinética de crecimiento de GT, en la cual se puso en dos medios diferentes: uno que contenía DBT y otro con DBT y partículas del catalizador agotado.

Este experimento se llevó a cabo para determinar si GT era capaz de crecer en medio LB cuando estaba en contacto al mismo tiempo con DBT y con las partículas de catalizador agotado, ya que anteriormente se puso en contacto por separado. En la figura 6.4 se muestra el crecimiento de GT, podemos observar un comportamiento similar entre las dos gráficas y entre el crecimiento cuando solo se añadió DBT y cuando se añadieron DBT y partículas del catalizador.

Los resultados del análisis estadístico nos dicen que no hay diferencia significativa en el crecimiento de GT cuando se utiliza DBT o DBT y partículas del catalizador (Anexo J).

Debido a lo anteriormente mencionado, se decidió utilizar el DBT junto con las partículas del catalizador.

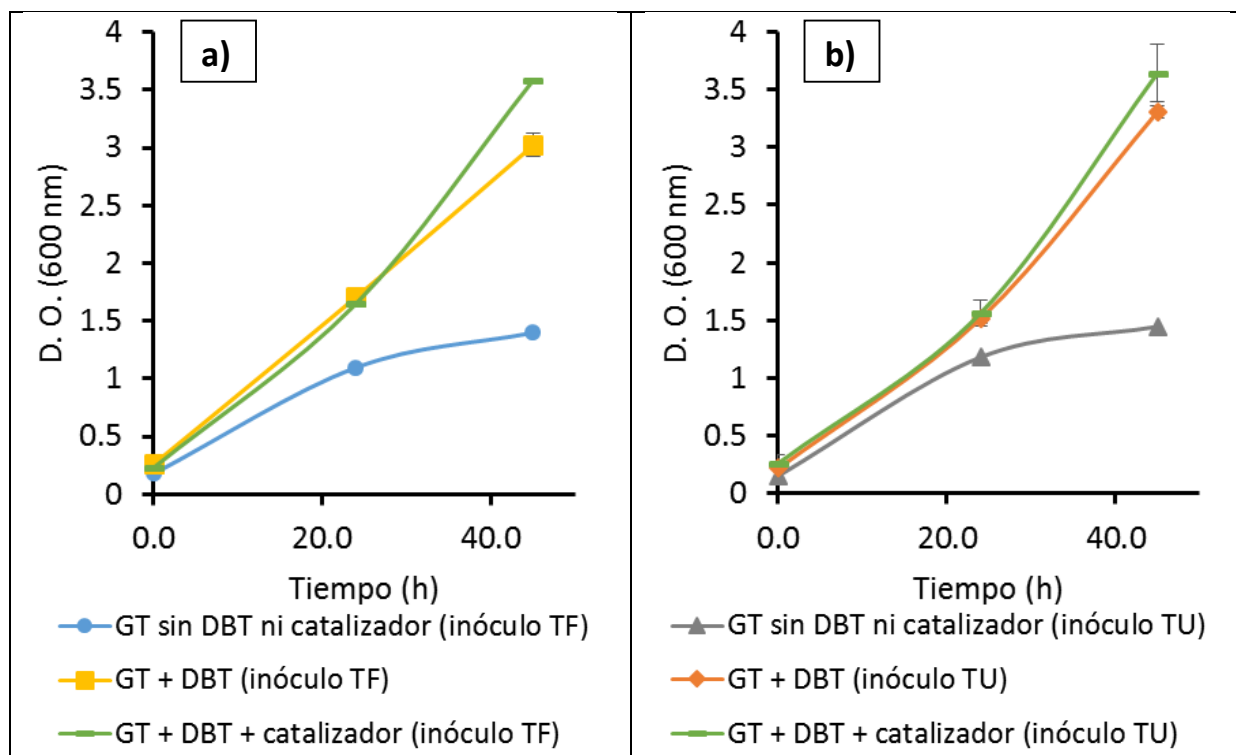


Figura 6.4 Crecimiento de GT cuando se usa DBT y DBT más catalizador: preinóculo TF (a) y preinóculo Tiourea (b).

6.5 DESULFURACIÓN DEL CATALIZADOR AGOTADO MoS₂ POR GT.

6.5.1 Crecimiento de GT en la BDS del DBT

Con base en los ensayos anteriores se estableció la metodología para la desulfuración del catalizador agotado MoS₂ por GT: se decidió probar con dos volúmenes de inóculo (10 y 20 %), dos tiempos de incubación del inóculo (12 y 24 h) y dos preinóculos (TF y TU). Resultando en 4 tratamientos para cada tipo de inóculo.

En las figuras 6.5 y 6.6 se muestran las gráficas de crecimiento de GT para los dos preinóculos, TF y TU respectivamente.

Los análisis estadísticos para esta sección (Anexo K) muestran que no hay diferencia significativa en el crecimiento de GT en alguno de los tratamientos.

6.5.2 Determinación de biomasa por el método de peso seco

En la tabla 6.2 se muestran los valores de biomasa que se utilizaron para iniciar cada uno de los 8 tratamientos para la desulfuración del catalizador agotado. Para los tratamientos cuyo volumen era el mismo, hubo más biomasa en el inóculo al crecer por 24 horas.

Esta determinación se realizó para poder conocer el tamaño de inóculo en g/mL, en caso de que se determine que GT es capaz de realizar la BDS del catalizador agotado MoS₂, ya que no hay antecedentes de esta información.

Tabla 6.2 Resultados de peso seco.

Tratamiento	Peso seco (g/mL)
TF 12-6	3.333E-05
TF 24-6	3.667E-04
TF 12-12	1.750E-04
TF 24-12	3.500E-04
TU 12-6	7.333E-04
TU 24-6	8.167E-04
TU 12-12	4.000E-04
TU 24-12	6.000E-04

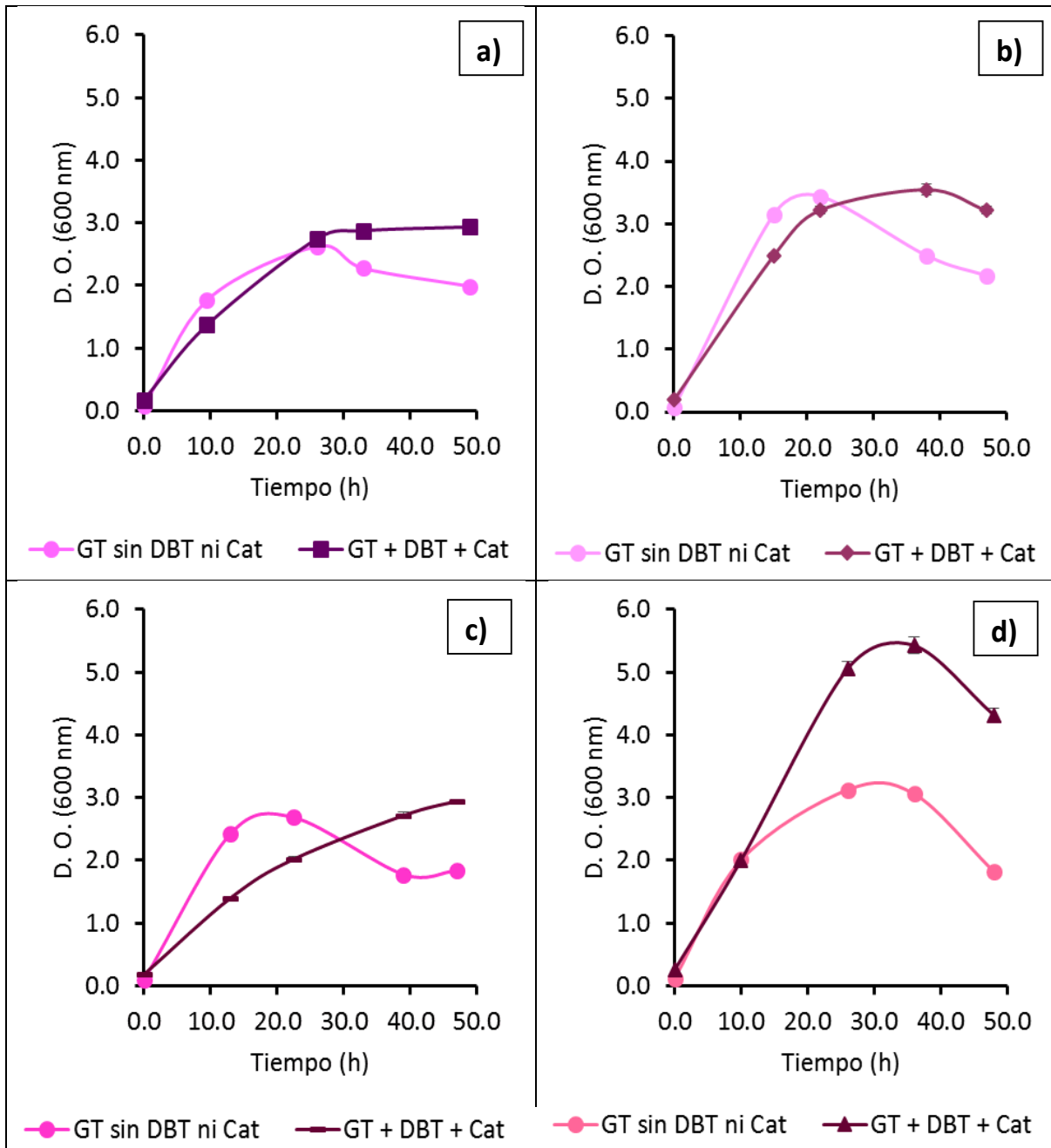


Figura 6.5 Crecimiento de GT cuando se usa preinóculo TF: a) 12-6, b) 24-6, c) 12-12 y d) 24-12.

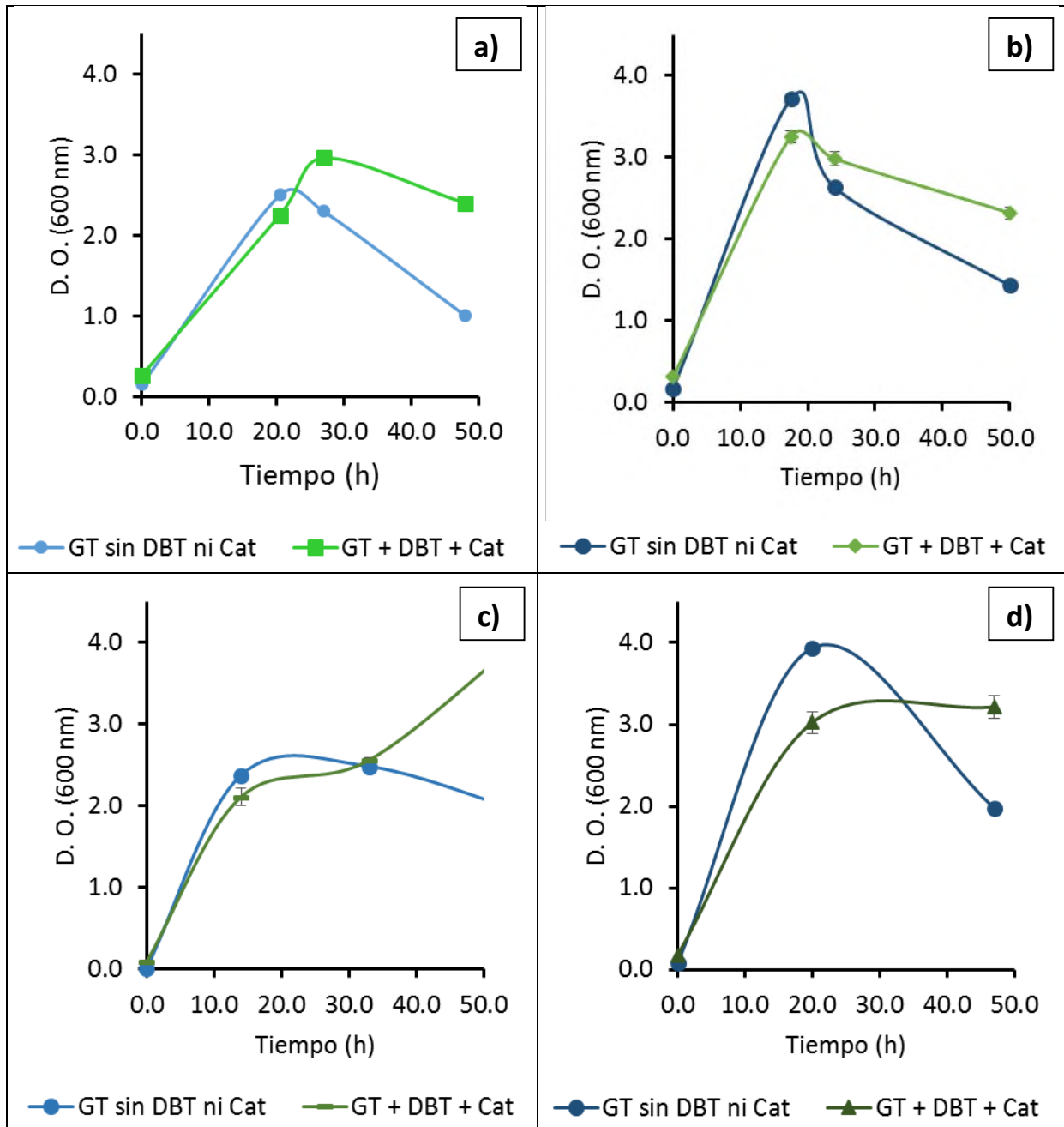


Figura 6.6 Crecimiento de GT cuando se usa preinóculo TU: a) 12-6, b) 24-6, c) 12-12 y d) 24-12.

6.5.3 BDS del DBT por GT

Los sobrenadantes de los 8 tratamientos de BDS se analizaron mediante cromatografía de gases y los resultados para cada tratamiento se muestran en porcentaje total de BDS y en mg/L (tabla 6.3), esto con el fin de poder comparar nuestros resultados con los reportados por Pinzón y colaboradores [1] quienes obtuvieron 2.7 mg/L de degradación del DBT utilizando GT (tabla 1.1). En los tratamientos en los que se llevó a cabo la BDS del DBT, los valores obtenidos en el presente trabajo son mayores que los reportados, obteniéndose que el mejor tratamiento para la BDS del DBT fue el de TU 12-6. Para los tratamientos de TF se observa que GT no realizó la BDS del DBT cuando el inóculo estuvo 24 h en incubación.

Tabla 6.3. Resultados de BDS del DBT

Muestras	% BDS	Degradación del DBT (mg/L)
TF 12-6	2.94	15.18
TF 24-6	0	0
TF 12-12	3.62	18.7
TF 24-12	0	0
TU 12-6	4.96	25.62
TU 24-6	2.09	10.79
TU 12-12	2.01	10.39
TU 24-12	2.35	12.13

6.6 CARACTERIZACIÓN DEL CATALIZADOR AGOTADO MoS₂.

A continuación se muestran los resultados de la caracterización del catalizador agotado MoS₂, comparando el catalizador sin tratamiento con cada uno de los catalizadores sometidos a los 8 diferentes tratamientos de BDS.

6.6.1 Microscopia electrónica de barrido (SEM por sus siglas en inglés).

Las muestras se analizaron en un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-7600F perteneciente al Centro de Investigación en Micro y Nanotecnología (MICRONA), de la Universidad Veracruzana. Se realizó un análisis SEM/EDS del catalizador agotado sin tratamiento y del catalizador agotado después de los tratamientos de BDS y los resultados obtenidos en cuanto al contenido de azufre (% atómico) para cada uno de los puntos analizados se muestran en la tabla

6.4. Los resultados del análisis EDS (anexo L) muestran que el catalizador contiene: C, O, Ni, Al, S y Mo. El tratamiento con el que se obtuvo mayor porcentaje de degradación de azufre atómico fue el de TU 24-12 con un valor de 19.91%. Para los tratamientos de TF, no hubo degradación de S cuando el inóculo estuvo 12 h en incubación, esto puede estar relacionado a que hay más elementos presentes en el catalizador y los microorganismos prefirieron consumirlos.

En 2015 Tavera García realizó el de un catalizador gastado NiMoP mediante un sistema de extracción Soxhlet usando una mezcla de xilenos para remover el coque de la superficie del catalizador, obteniendo una reducción del 20% [2]; en el mismo año Morales Coutiño reporta un 37% de reducción del coque depositado sobre un catalizador gastado NiMoP, utilizando el mismo método de extracción [3].

Tabla 6.4 Contenido de azufre en el catalizador agotado.

Muestras	%S (atómico)	% Degradación S
Sin BDS	70.07	---
TF 12-6	71.75	0.00
TF 24-6	65.98	5.84
TF 12-12	70.45	0.00
TF 24-12	69.53	0.78
TU 12-6	61.03	12.90
TU 24-6	67.23	4.06
TU 12-12	60.49	13.68
TU 24-12	56.12	19.91

A continuación se muestran las micrografías obtenidas del catalizador agotado. La figura 6.7 muestra la morfología del catalizador agotado sin ningún tratamiento, las figura 6.8 y 6.9 resumen las micrografías del catalizador después de los tratamiento de BDS cuyo inoculo inicial fue TF y TU respectivamente. En todas las imágenes se distingue una estructura amorfa en las partículas y no se observan cambios en la morfología después de realizarse la BDS.

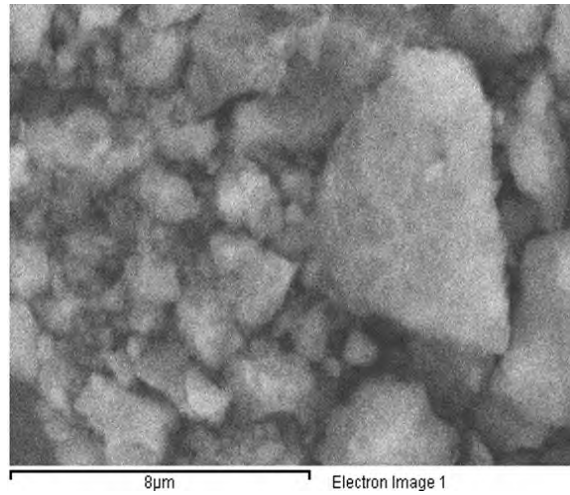


Figura 6.7. Micrografía del catalizador MoS₂ sin tratamiento.

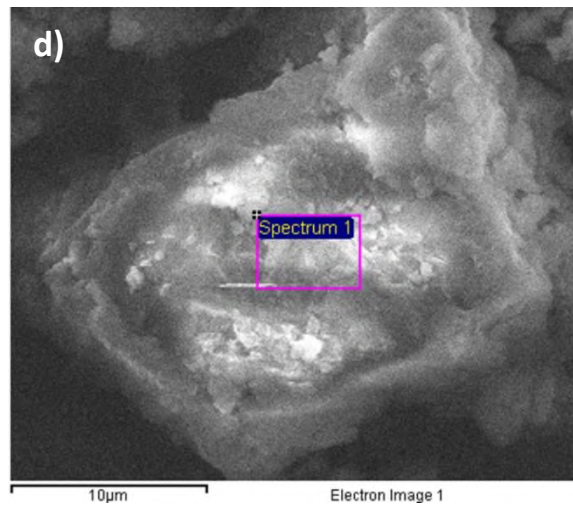
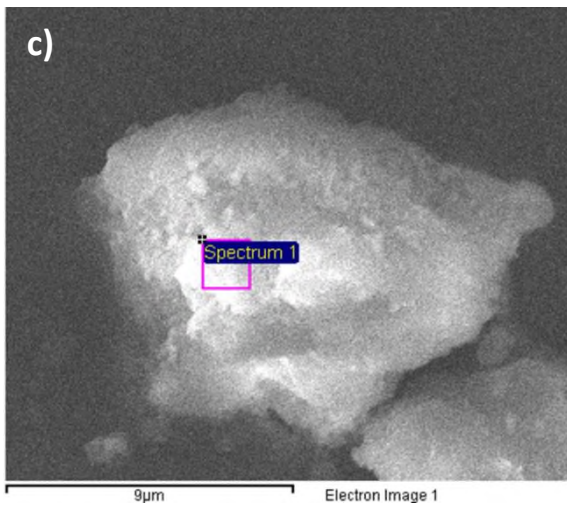
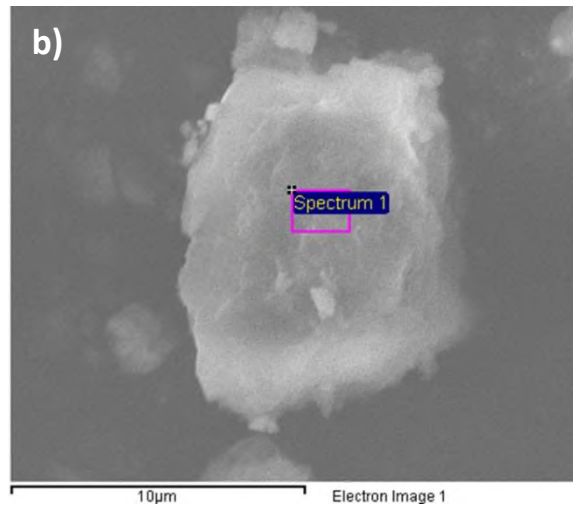
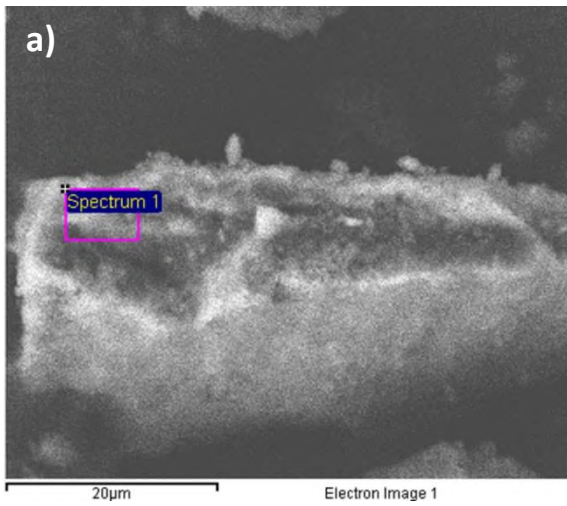


Figura 6.8 Micrografías del catalizador después de los tratamientos de BDS con preinóculo TF: a) 12-6, b) 24-6, c) 12-12 y d) 24-12.

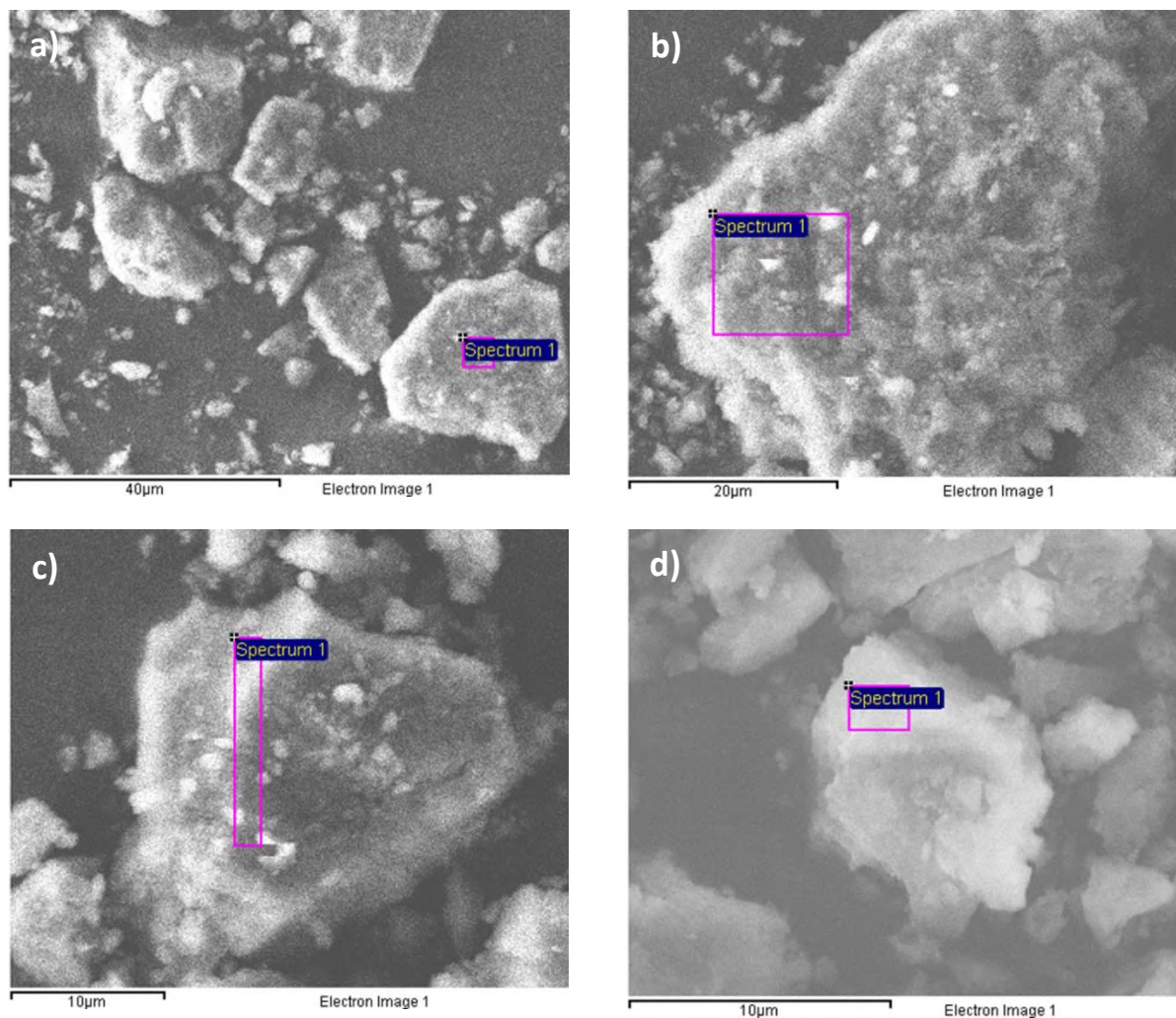


Figura 6.9 Micrografías del catalizador después de los tratamientos de BDS con preinóculo TU: a) 12-6, b) 24-6, c) 12-12 y d) 24-12.

6.6.2 Fisisorción de nitrógeno.

Las muestras se analizaron mediante un sortómetro de la marca BELSORP-MAX-LP perteneciente al Laboratorio Nacional de Nano y Biomateriales (LANNBIO), del CINVESTAV Mérida. Las isothermas de adsorción-desorción de N_2 se muestran en la figuras 6.10 y 6.11, la primera corresponde al catalizador sin tratamiento y la segunda muestra solo algunas isothermas del catalizador después de la BDS debido a que las isothermas son similares en todos los casos, siendo del tipo IV de acuerdo a la clasificación propuesta por Brunauer, Emmett y Teller (B.E.T) y la IUPAC. Isothermas de adsorción-desorción de este tipo son comunes para materiales que contienen mesoporos (diámetro de poro 2- 50 nm). Se observó que el fenómeno de histéresis existió entre

las isothermas de adsorción y desorción en un dominio de presión relativa entre 0.5 a 0.95 aproximadamente. Todos los catalizadores analizados presentaron una histéresis del tipo H1, la cual según la clasificación propuesta por de Boer corresponde a poros con una forma cilíndrica y sección transversal constante. Con la información anterior se puede asegurar que GT no puede afectar en estas características estructurales del catalizador ya que el tamaño de la bacteria se encuentra en la orden de micrómetros[4].

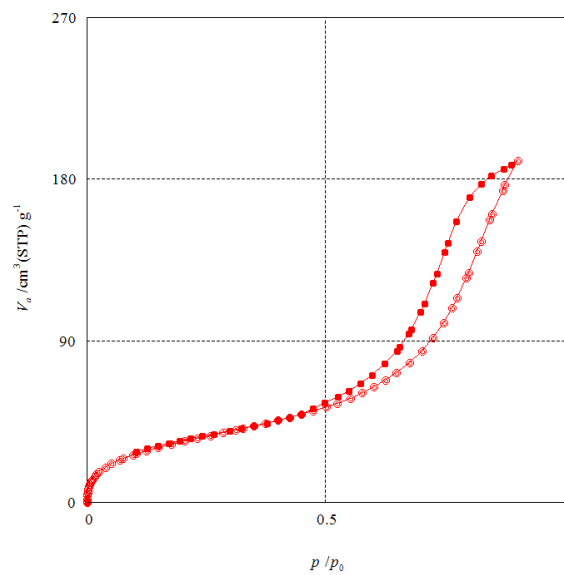


Figura 6.10. Isotherma de adsorción-desorción del catalizador agotado sin tratamiento

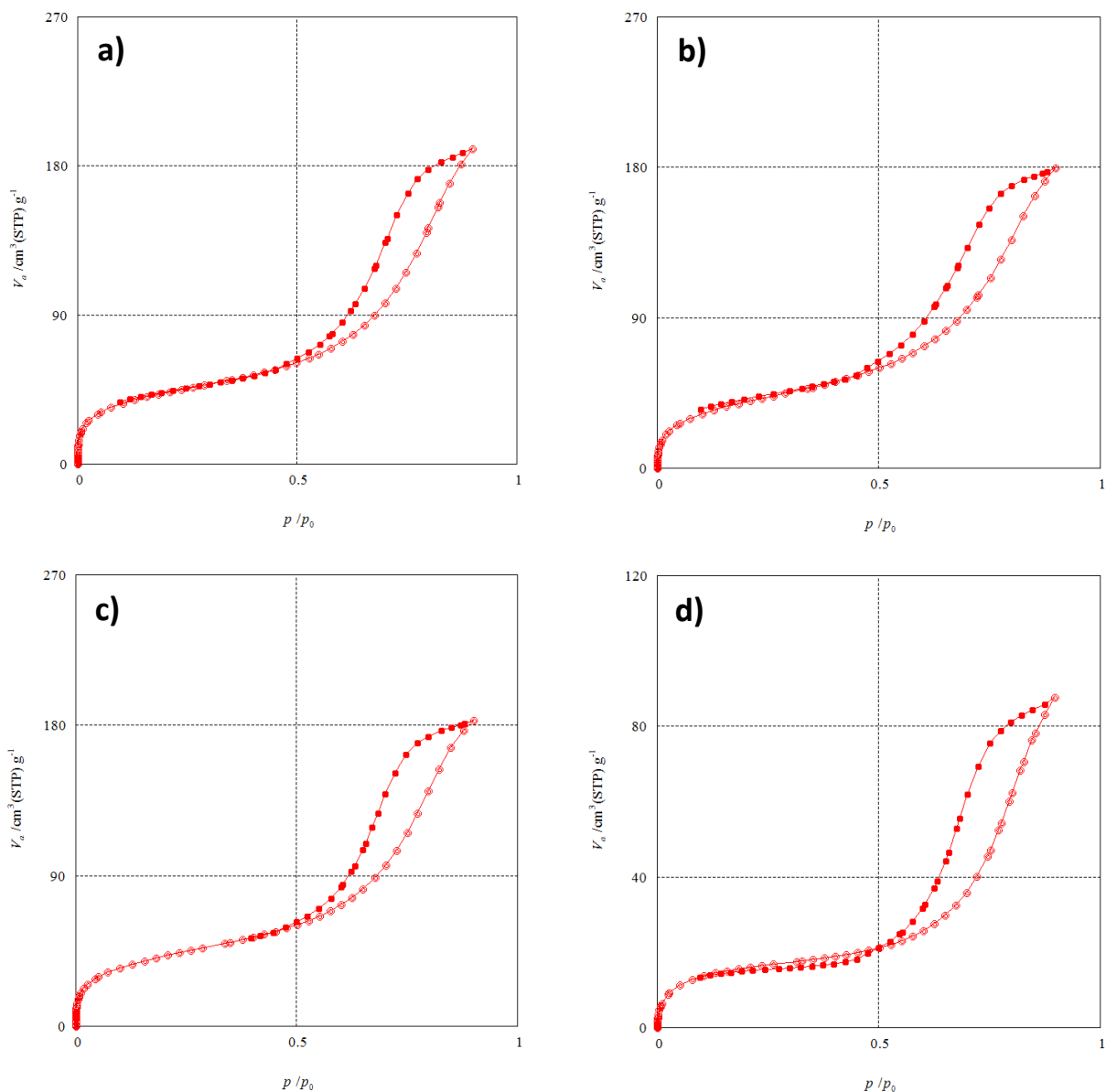


Figura 6.11. Isothermas de adsorción y desorción del catalizador agotado, tratamientos: a) TF 24-12, b) TU 12-6, c) TU 24-6, d) TU 12-12.

En la tabla 6.5 se presentan las propiedades texturales del catalizador agotado antes y después de la BDS. Cuando se observa una disminución en los diámetros de poro con respecto al catalizador sin tratamiento, se observa un aumento en la capacidad de adsorción, viéndose expresado en un aumento en el área superficial con un porcentaje entre 16 y 22%. El tratamiento con mayor porcentaje de aumento de área superficial fue TF 24-12 con un área de $151.16 \text{ m}^2/\text{g}$.

Tabla 6.5. Características texturales del catalizador agotado.

Tratamiento	Área superficial (m²/g)	%Aumento de área superficial	Diámetro de poro (nm)
Catalizador sin BDS	123.69		9.52
TF 12-6	---	---	---
TF 24-6	144.50	16.82	8.00
TF 12-12	150.00	21.27	7.69
TF 24-12	151.16	22.20	7.79
TU 12-6	146.15	18.15	7.60
TU 24-6	146.00	18.03	7.75
TU 12-12	56.591	0	9.58
TU 24-12	111.00	0	8.43

En 2013, Del Toro y colaboradores desarrollaron catalizadores Ni (Co)-Mo soportados en alúmina para la hidrodechloración de bifenilos policlorados obteniendo catalizadores con áreas superficiales de 142 y 144 m²/g para NiMo y CoMo respectivamente. Con estas áreas se obtuvieron porcentajes de remoción de cloro de 84% para los catalizadores NiMo y 62% para los catalizadores CoMo [5].

En 2016, Chiranjeevi y colaboradores afirman que después de la remoción del coque en un catalizador gastado proveniente de una planta de HDS obtuvieron un área superficial de 200 m²/g, que al compararlo con un catalizador fresco con área superficial de 211 m²/g les resulta en un 95% de recuperación del área superficial del catalizador. En cuanto al método utilizado sólo mencionan quemado de coque [6].

Los valores del área superficial que se reportan en la tabla 6.5 son similares a los reportados por Del Toro y menores en comparación a los reportados por Chiranjeevi. Cabe mencionar que los métodos reportados son químicos y que aún no hay referencias al uso de microorganismos en la limpieza del área superficial de un catalizador agotado.

6.6.3 Infrarrojo por transformada de Fourier.

Los espectros de infrarrojo fueron colectados en un espectrofotómetro de Infrarrojo con transformada de Fourier e Interferómetro DYNASCAN SPECTRUM 100 Perkin-Elmer en modo ATR o reflectancia total atenuada. Condiciones de medición: número de onda= 500–4000 cm⁻¹, 16 barridos, 0.5 cm⁻¹ incremento. A partir de los espectros de infrarrojo es posible identificar los grupos funcionales presentes en los catalizadores. En la figura 6.12 se muestra el espectro IR del

catalizador agotado, la señal de 3600 a 3000 cm^{-1} corresponde al enlace O-H, lo que indica presencia de humedad en las muestras por contacto con el aire, en la región de 2900-2800 cm^{-1} se observan señales que son originadas por bandas de enlace C-H de compuestos alifáticos y las señales que aparecen en la región de 1600-1460 cm^{-1} son una de las señales más importantes de los compuestos aromáticos las cuales se originan debido al enlace C=C. La presencia de bandas de vibración de compuestos aromáticos se debe a que son los principales responsables de la desactivación del catalizador agotado [3].

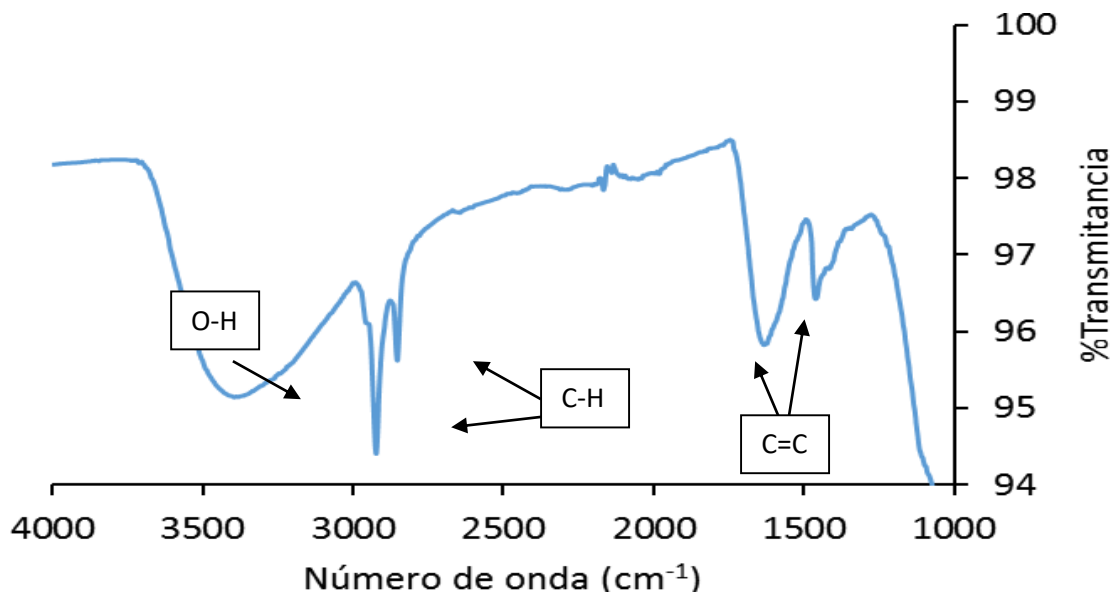


Figura 6.12. Espectro IR del catalizador agotado sin tratamiento.

Las cinco señales, marcadas en la figura 6.12, están presentes en los espectros IR de todos los catalizadores analizados como se muestra en la figura 6.13. Sin embargo, también podemos observar la presencia de señales en 1700 cm^{-1} que corresponde al enlace C=O, y dos más en 1400 y 1200 cm^{-1} que corresponden al enlace C-O de los fenoles; estas señales son originadas por la presencia del DBT en el catalizador debido a que en todos los tratamientos de BDS se añadió este compuesto para activar las enzimas de los microorganismos. En la figura 6.14 se muestra el espectro IR del DBT en el que podemos corroborar las señales.

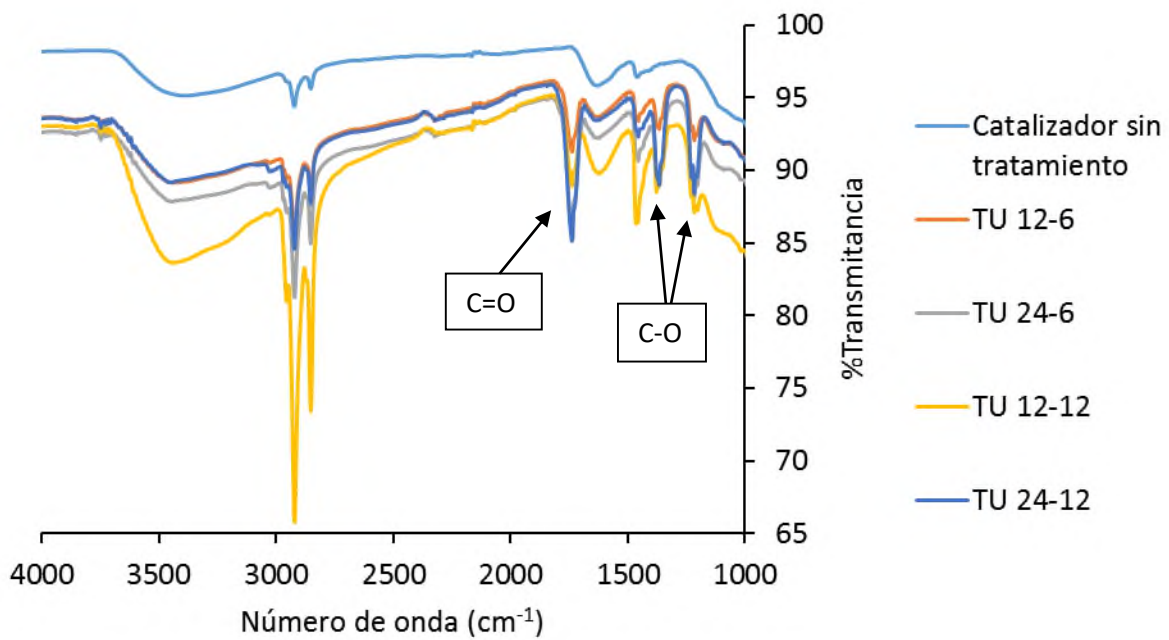
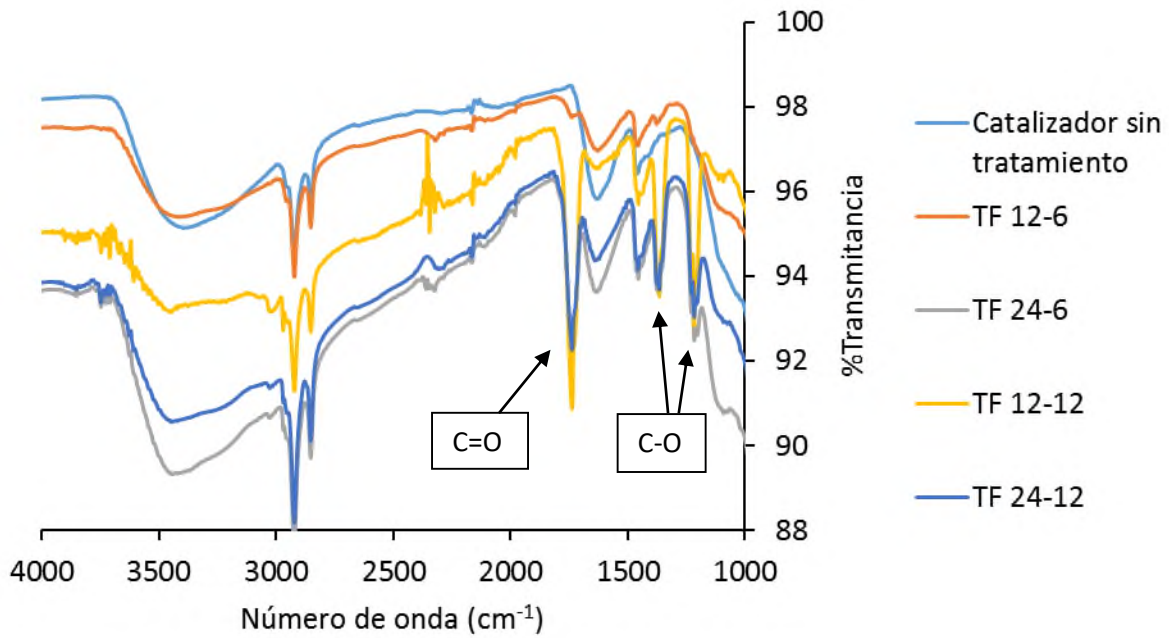


Figura 6.13. Espectro IR del catalizador agotado antes y después de los 8 tratamientos de BDS.

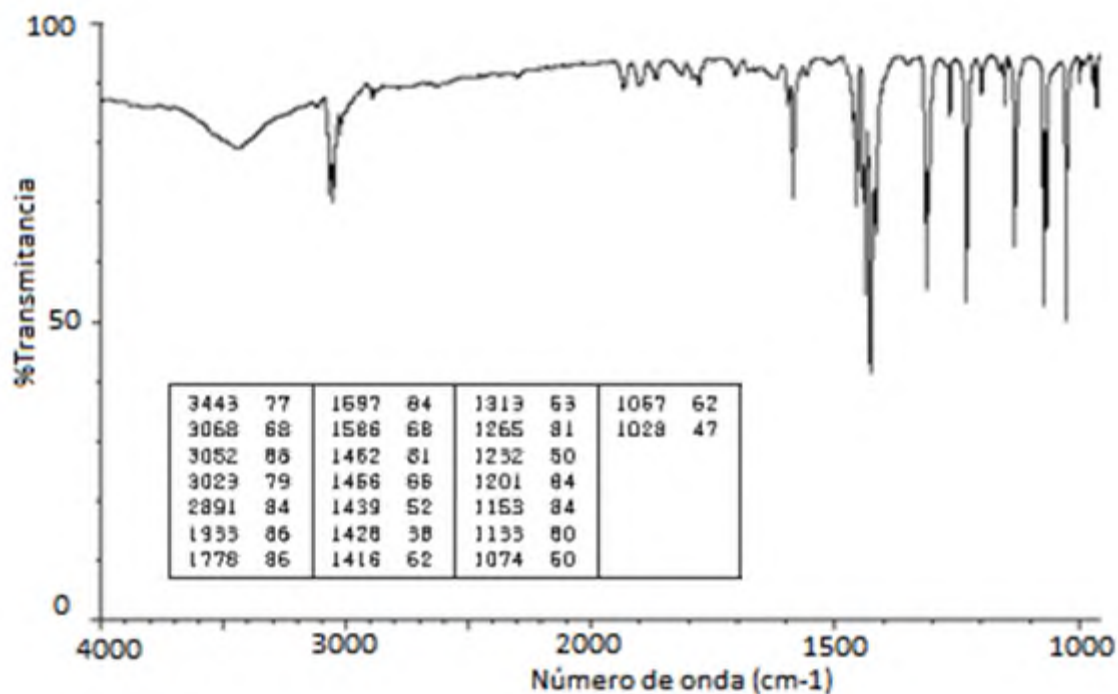


Figura 6.14. Espectro IR del DBT [7].

Morales Coutiño presenta los espectros IR del catalizador agotado antes y después del lavado con agentes oxidantes para la remoción del coque, donde se observa la desaparición de las bandas de vibración de la región 2950 a 2800 cm^{-1} (figura 6.15-b) presentes en el catalizador de referencia (figura 6.15-a), las cuales corresponden a bandas de enlaces C-H de compuestos alifáticos por lo cual ellos concluyen que han removido el coque de la superficie del catalizador [3].

Para nuestro sistema de BDS, mediante los espectros IR solo se pudo observar el aumento en la intensidad de las bandas después de los tratamientos.

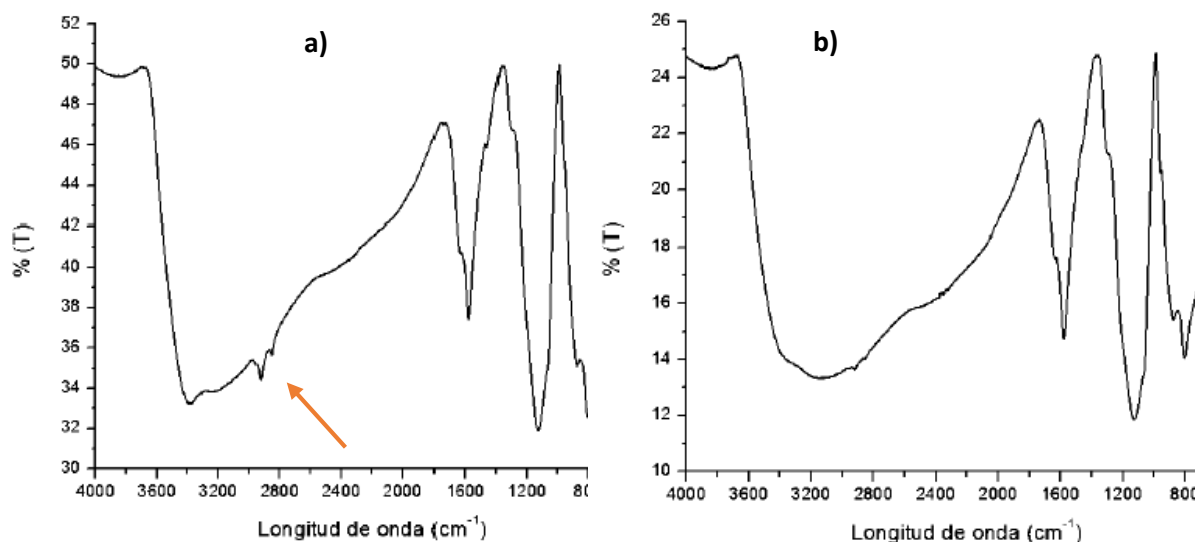


Figura 6.15. Espectros IR: a) catalizador de referencia y b) catalizador después del tratamiento químico.

A continuación se muestra una tabla comparativa en la que se resumen los resultados en cuanto a la degradación de azufre por GT en cada uno de los tratamientos de BDS.

Tabla 6.6. Comparación de resultados de la BDS

Tratamiento	%BDS del DBT	%Degradación S	
		(atómico)	superficial
TF 12-6	2.94	0.00	---
TF 24-6	0	5.84	16.82
TF 12-12	3.62	0.00	21.27
TF 24-12	0	0.78	22.20
TU 12-6	4.96	12.90	18.15
TU 24-6	2.09	4.06	18.03
TU 12-12	2.01	13.68	0
TU 24-12	2.35	19.91	0

Se observa que solo hubo dos tratamientos que realizaron los tres procesos: la BDS del DBT, la degradación del S atómico contenido y el aumento del área superficial del catalizador; estos tratamientos fueron los de preinóculo crecido en TU con volumen de 6 mL (señalados en amarillo), de estos dos tratamientos se destaca el que ha crecido por 12 horas. Mientras que los tratamientos crecidos en TU con volumen de 12 mL (señalados en gris) obtuvieron los porcentajes más altos en degradación de azufre atómico pero no presentaron aumento en el área superficial, es decir, se debe preguntar que sucede con el azufre que se ha degradado. Con estos resultados,

se puede vislumbrar un equilibrio delicado entre el tiempo de crecimiento del inóculo, la cantidad utilizada y el resultado de superficie expuesta al final del tratamiento del catalizador agotado, parece que a menor tiempo de crecimiento y menor cantidad de inóculo los tres procesos arriba indicados son favorecidos.

Sin embargo, también se observa que los tratamientos crecidos en TF con volumen de 12 mL (señalados en oliva) obtuvieron un mayor porcentaje en el aumento de área superficial con bajos porcentajes de degradación de azufre atómico, aunque también se observa que a 24 horas de crecimiento no ha convertido el DBT con 6 ni con 12 mL de inóculo.

Es muy importante continuar estudiando estas reacciones para poder encontrar las mejores condiciones de limpieza del área superficial del catalizador agotado antes de aplicar el microorganismo. Podría intentarse un breve ataque de la superficie del catalizador por solución diluida de algún ácido, luego llevar a neutralidad y aplicar el microorganismo, de esa manera se podría acoplar un tratamiento químico de bajo impacto ambiental seguido del tratamiento por BDS.

REFERENCIAS

- [1] D. L. Pinzón-Martínez, C. Rodríguez-Gómez, D. Miñana-Galbis, J. A. Carrillo-Chávez, G. Valerio-Alfaro, R. Oliart-Ros. *Environmental Technology*, 31: 8 (2010) 957-966.
- [2] J. E. Tavera, "Efecto de la reactivación *in situ* de un catalizador gastado NiMoP en la formación de sulfuros metálicos", tesis de licenciatura, Instituto Politécnico Nacional, México (2015).
- [3] E. Coutiño, "Hidrodesulfuración de gasóleo ligero primario con un catalizador comercial reactivado", tesis de licenciatura, Instituto Politécnico Nacional, México (2015).
- [4] A. G. Valladares, J. Dreyer, P. K. Göpel, N. Koschke, D. Frank, H. Märkl, R. Müller. *Appl Microbiol Biotechnol*, 83 (2009) 521–527.
- [5] R. Del Toro, B. Gutiérrez, Y. Díaz, I. González, P. J. Betancourt, J. L. Brito. *Catálisis 2* (2013) 14-25.
- [6] T. Chiranjeevi, R. Pragya, S. Gupta, D. T. Gokak, S. Bhargava. *Procedia Environmental Sciences* 35 (2016) 610 – 617.
- [7] Spectral Database for Organic Compounds SDBS. Disponible en: http://sdb.sdb.aist.go.jp/sdb/cgi-bin/direct_frame_top.cgi

7. CONCLUSIONES

La presente tesis tuvo como objetivo comprobar si GT era capaz de realizar la BDS del catalizador agotado MoS₂.

Para comprobar esto, primero se verificó que GT realizara la BDS del DBT, encontrándose que las mejores condiciones son utilizando medio LB y un preinóculo crecido 24 h antes en una fuente de azufre (TF o TU).

Posteriormente se procedió a establecer una metodología para la BDS del catalizador agotado MoS₂, ya que no hay nada reportado sobre el tema, se decidió probar con 8 tratamientos en los cuales se ponían en contacto GT, DBT y el catalizador agotado, variando solamente el volumen y tiempo de incubación del inóculo de GT.

Una vez realizados los tratamientos, el catalizador agotado MoS₂ se caracterizó mediante SEM, IR y BET; los resultados de estos análisis muestran que GT si es capaz de realizar la limpieza de la superficie del catalizador degradando el azufre acumulado en la superficie, aunque no se conoce el mecanismo que GT utiliza para lograr lo anterior.

Con base en los resultados se pudo comprobar la hipótesis del presente trabajo.

ANEXOS

ANEXO A

Medio Luria Bertani empleado.

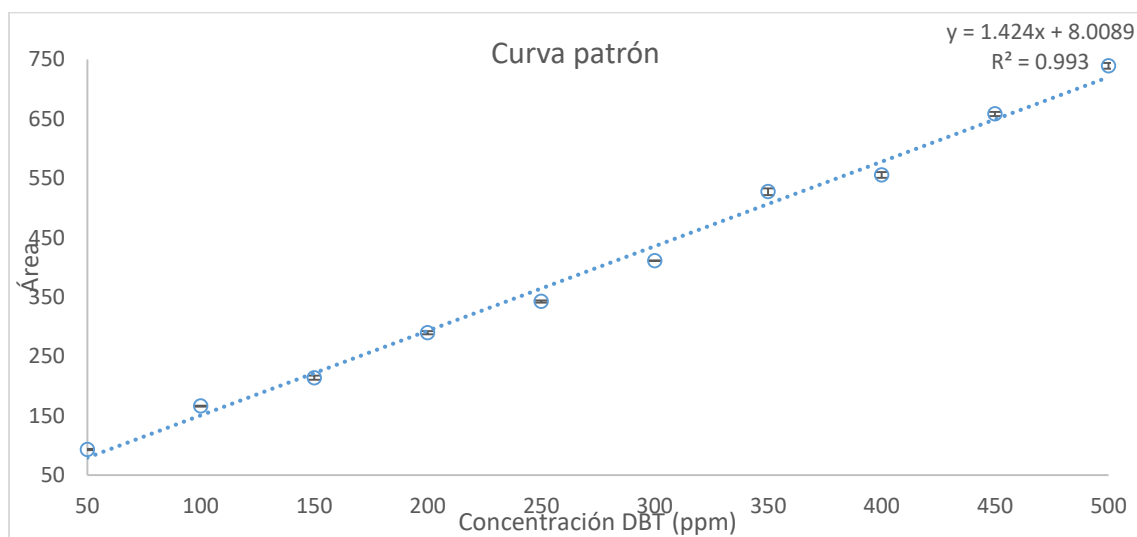
Componentes	g/L
Triptona	10
Extracto de levadura	5
NaCl	5
pH final	7.0 ±0.2

ANEXO B

Composición del medio salino

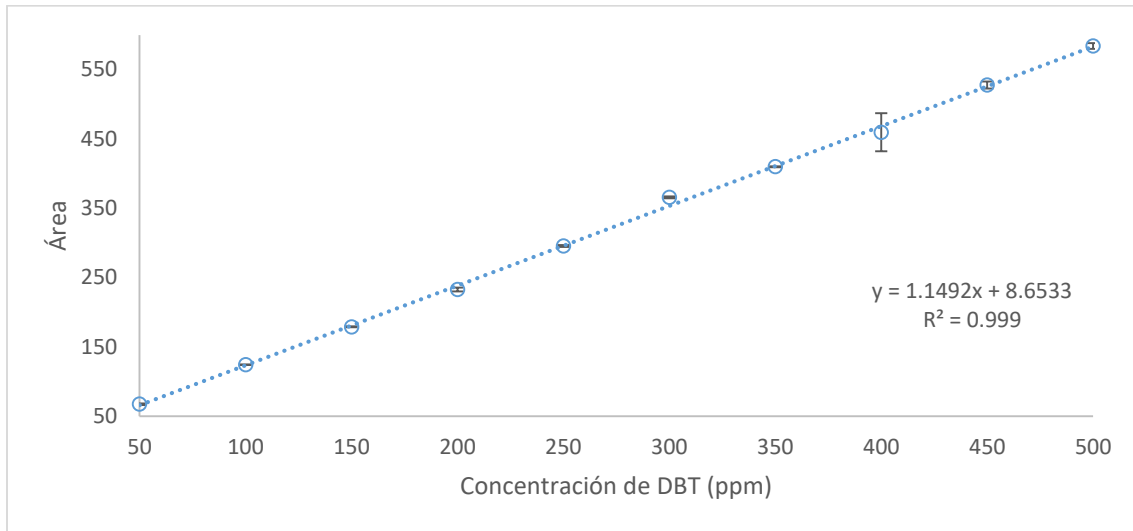
Componentes	g/L
Extracto de levadura	0.25
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.001
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.001
MgSO ₄	0.2
(NH ₄) ₂ SO ₄	2
K ₂ HPO ₄	4
NaH ₂ PO ₄	4
pH final	7

ANEXO C



Curva de calibración del DBT

ANEXO D



Curva de calibración del DBT

ANEXO E

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Entre TF y TU	0.009	1	0.009	1.155	0.304	4.747
Dentro de los grupos	0.089	12	0.007			

ANEXO F

ANÁLISIS DE VARIANZA

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad	Valor crítico para F
Tipo de inóculo	5.633E-05	1	5.633E-05	0.005	0.943	4.062
Con o sin DBT	4.489E-01	1	4.489E-01	41.345	0.000	4.062
Interacción	1.613E-02	1	1.613E-02	1.486	0.229	4.062
Dentro del grupo	4.777E-01	44	1.086E-02			

ANEXO G

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre medios de cultivo	1.566	1	1.566	10.449	0.002	4.073
Dentro de los grupos	6.293	42	0.150			

ANEXO H

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tipo de inóculo	3.559	1	3.559	14.307	0.001	4.113
Con o sin DBT	0.110	1	0.110	0.441	0.511	4.113
Interacción	0.094	1	0.094	0.377	0.543	4.113
Dentro del grupo	8.954	36	0.249			

ANEXO I

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
1er y 2do uso	5.369	1	5.369	14.095	0.001	4.351
Dentro de los grupos	7.618	20	0.381			

ANEXO J

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Tipo de inóculo	0.162	1	0.162	0.105	0.751	4.747
Con DBT y DBT+Cat	2.049	2	1.024	0.665	0.532	3.885
Interacción	0.234	2	0.117	0.076	0.927	3.885
Dentro del grupo	18.470	12	1.539			

ANEXO K

ANÁLISIS DE VARIANZA

<i>Origen de las variaciones</i>	<i>Suma de cuadrados</i>	<i>Grados de libertad</i>	<i>Promedio de los cuadrados</i>	<i>F</i>	<i>Probabilidad</i>	<i>Valor crítico para F</i>
Entre tratamientos	8.381	7	1.197	0.527	0.806	2.373
Dentro de los grupos	61.359	27	2.273			

ANEXO L

Análisis EDS del catalizador agotado sin tratamiento.

Processing option: All elements analysed (Normalised)

Spectrum	In stats.	C	O	Al	S	Ni	Mo	Total
Spectrum 1	Yes	23.30	44.31	19.74	3.10	3.24	6.31	100.00
Spectrum 2	Yes	21.66	40.52	22.72	4.16	3.98	6.95	100.00
Spectrum 3	Yes	20.05	44.41	21.27	4.27	3.39	6.61	100.00
Mean		21.67	43.08	21.25	3.84	3.54	6.62	100.00
Std. deviation		1.63	2.22	1.49	0.64	0.39	0.32	
Max.		23.30	44.41	22.72	4.27	3.98	6.95	
Min.		20.05	40.52	19.74	3.10	3.24	6.31	

All results in weight%