

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
UNIDAD PROFESIONAL INTERDISCIPLINARIA DE BIOTECNOLOGÍA

TÍTULO DEL TRABAJO:
**ESTUDIO DE UN BIORREACTOR DE MEMBRANA PARA LA
BIODESNITROGENACIÓN DE GASÓLEO.**

INFORME TÉCNICO DE LA OPCIÓN CURRICULAR EN LA MODALIDAD DE:
PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
INGENIERO BIOTECNÓLOGO

PRESENTA:
JOSÉ RICARDO HERNÁNDEZ AYALA

DIRECTOR INTERNO: Dr. EDGAR SALGADO MANJARREZ

DIRECTOR EXTERNO: Dra. MARCIA GUADALUPE MORALES IBARRIA

México, D. F. MAYO del 2006

Índice	Pág.
1. Resumen.....	2
2. Introducción.....	3
3. Antecedentes.....	6
3.1. Proceso de Refinación.....	6
3.2. Biotecnología en la industria del petróleo.....	7
3.2.1. Biorrefinación.....	8
3.2.2. Biopetroquímica.....	9
3.3. Biodesnitrificación (BDN).....	9
3.4. Características de las poblaciones microbianas.....	13
3.5. Los Biorreactores en la industria petrolera.....	14
4. Justificación.....	18
5. Objetivos.....	19
6. Metodología.....	20
6.1. Gasóleo.....	21
6.2. Microorganismos.....	22
6.3. Medio mineral.....	22
6.4. Propagación de microorganismos.....	22
6.5. Caracterización del reactor de membrana.....	23
6.6. Caracterización del reactor de lecho empacado	25
7. Técnicas analíticas.....	27
7.1. Cuantificación de nitrógeno (carbazol).....	27
7.2. Cuantificación de nitrógeno total.....	27
7.3. Hidrocarburos.....	27
7.4. Biomasa.....	27
8. Definiciones.....	29
9. Resultados y Discusión.....	31
9.1. Reactor de membrana.....	31
9.2. Reactor con biomasa inmovilizada.....	44
9.3. Sistema de propagación.....	50
10. Conclusiones.....	52
11. Recomendaciones.....	54
12. Referencias.....	56

1. Resumen

En este trabajo se aborda la remoción biológica de nitrógeno en una de las corrientes intermedias de destilados del petróleo, el gasóleo. La importancia de la remoción de los compuestos nitrogenados de los combustibles radica en que el nitrógeno junto con el azufre se liberan a la atmósfera en forma de óxidos de nitrógeno y azufre, durante la combustión de la gasolina y diesel, generando el problema de lluvia ácida. Con el fin de disminuir este problema ambiental, legislaciones cada vez más estrictas regulan el contenido de azufre en dichos combustibles, lo cual ha forzado a buscar nuevas tecnologías o mejorar las existentes con el fin de cumplir con tales estándares. Dentro de la industria de la refinación del petróleo, se ha demostrado que los compuestos nitrogenados inhiben a los catalizadores usados en el proceso de hidrodesulfuración, disminuyendo con esto su eficiencia y su vida media.

En específico en este trabajo se estudia la remoción del carbazol con una cepa de *Pseudomonas* sp. en dos sistemas en continuo: a) Un reactor de mezcla completa con una membrana integrada y b) Un reactor con biomasa inmovilizada.

El primero es un reactor de membrana donde el catalizador se encuentra en contacto directo con el gasóleo en una mezcla total, el volumen del sistema fue de 200 mL. En este arreglo se probaron dos membranas una de polietileno de alta densidad (HDPE) y otra de teflón (PTFE), el uso de estas membranas es para la recuperación del producto libre de agua. Globalmente en estos sistemas se observó una eficiencia de eliminación del carbazol entre el 70 y 100 % para cargas que fueron desde 26 hasta 96 mg/L día de carbazol presente en la alimentación de gasóleo y tiempos de residencia entre 6.25 y 1.74 días. El tiempo que estuvo operando el reactor fue de 4 meses, tiempo en el cual se mantuvo la actividad de la biomasa.

El segundo sistema utilizado fue un reactor de biomasa inmovilizada en fibra de nylon y sumergida en una fase acuosa, el gasóleo pasa a través de este lecho por medio de una recirculación continua y la recuperación del producto se obtiene por desbordamiento de la corriente tratada.. En este caso, el volumen de operación fue de 370 mL. Este biorreactor se mantuvo en operación por 8 meses, tiempo en el cual la actividad se mantuvo constante y la eficiencia de eliminación de carbazol estuvo entre 60 y 100 % para cargas entre 55.25 y 17.68 mg/L día de carbazol en la corriente alimentada de gasóleo con tiempos de residencia entre 2.96 y 9.25 días.

2. Introducción

La industria del petróleo es uno de los principales motores que mueven la economía mundial desde principios de siglo. La importancia del petróleo es tal que su demanda se ha incrementado exponencialmente con el crecimiento de la población. La producción de petróleo a nivel mundial se estima alrededor de 20 mil millones de barriles por año, lo cual representa una fuente importante de ingresos monetarios especialmente para los principales productores de petróleo. Esta industria presenta grandes retos tanto en la producción como en el procesamiento de tales cantidades de crudo, para la obtención de la amplia gama de derivados requeridos en la actualidad. Entre los retos más importantes están la obtención y procesamiento de crudos cada vez más pesados y el cumplimiento de las especificaciones para azufre en los combustibles, requeridos por las recientes normatividades ambientales.

A pesar de las limitaciones o problemas encontrados en la industria petrolera se han observado avances significativos en uno de los procesos más importantes: la refinación.

Entre los productos de mayor demanda a nivel industrial están los combustibles fósiles, como la gasolina. Sin embargo, así como se incrementa la necesidad de este combustible, también aumenta la complejidad en los procesos de refinación para obtenerla ya que cada vez se deben procesar mayores cantidades de crudos pesados. Tal es el caso de países como México, la producción total de crudo no ha empezado a disminuir, si no al contrario se ha incrementado en las últimas décadas, aunque en algunas regiones y campos ya está en franco decline. Tales son los casos de la Región Marina Suroeste y la Región Sur, cuyas producciones están disminuyendo desde 1997(PEMEX, 2005).

La calidad del crudo extraído se ha venido deteriorando en los últimos años, debido a las altas concentraciones de asfaltenos, azufre, nitrógeno y metales que contiene el crudo, además de cenizas y residuos de carbón (PEMEX, 2005).

Tabla 1. Comparación del Petróleo Crudo Maya con el Petróleo Pesado Estándar

Propiedades	Maya pesado	Petróleo pesado estándar
Análisis elemental	(% peso)	(% peso)
Carbono	84.7	86.68
Hidrógeno	10.4	11.3
Nitrógeno	0.4	0.35
Sulfuros	3.8	1.0
Contenido de cenizas	0.05	0.043
Contenido de asfáltenos	15	4.69
Viscosidad (SSF 50 °C)	376	112
Grado API	11.5	14.7

Este deterioro de la calidad en la producción también ha influido en la composición de la mezcla mexicana de exportación. Como el crudo pesado se cotiza por debajo del crudo ligero en los mercados es necesario encontrar procesos alternos o complementarios a los ya conocidos para el tratamiento del crudo pesado para aumentar su calidad.

El petróleo representa cerca de 10 % del valor de las exportaciones y un porcentaje muy alto de los ingresos presupuestarios del gobierno federal (15%), y constituye cerca del 84% de la energía de uso final. (Secretaría de Energía, 2000).

Dado el compromiso asumido por los países industrializados en la cumbre de Kioto, y el condicionamiento del senado norteamericano, así como la creciente responsabilidad en las emisiones de gases invernadero por parte de países en vías de desarrollo (entre ellos México), existe la posibilidad de que en algún momento nuestro país tenga que asumir algún tipo de compromiso respecto al cambio climático.

En México, la industria petrolera en su conjunto ha tenido impacto negativo en materia ambiental. Por la amplia gama de productos derivados del petróleo, no ha sido posible evaluar cuantitativamente la contaminación involucrada a lo largo de las diferentes etapas de obtención y procesamiento que van desde la fase de explotación hasta la obtención de los petroquímicos.

La preocupación por los efectos climáticos ocasionados por la emisión de contaminantes a la atmósfera ha hecho necesaria la producción de combustibles más limpios, como una medida para contrarrestar dichos efectos. Estos combustibles deben seguir una normatividad específica para cada país o región, siendo el contenido de azufre uno de los principales compuestos regulados. La legislación ambiental vigente en nuestro país, la norma NOM-086-ECOL-1994, establece concentraciones máximas permisibles para el contenido de azufre de 500 ppm en diesel, 1000 ppm en gasolina y 3000 ppm en turbosina. Dado que la reducción del contenido de azufre en los combustibles es una medida a adoptarse a nivel mundial, se está trabajando sobre un anteproyecto para la modificación de la norma mexicana para actualizar dichos límites máximos. De ser aprobada la propuesta de actualización, se esperaría que para el año en curso se produjera gasolina con 30 ppm de azufre promedio (80 ppm de azufre máximo). Para el caso de diesel, se tendría que estar produciendo con 300 ppm de azufre máximo para el 2006 y con 15 ppm de azufre para el 2008 (SEMARNAT-SENER, 2003).

A pesar de que se hizo obligatoria durante el año pasado la producción de combustibles con 50 ppm de azufre, y de 10 ppm de azufre en gasolina para el 2009, en 25 países europeos, varios de ellos empezaron a introducir combustibles con 50 ppm de azufre, e incluso hasta con 10 ppm de azufre, desde el 2001. Para el 2002, Finlandia, Alemania, Suecia y el Reino Unido ya habían cambiado sus procesos de refinación para producir este tipo de combustibles. En el mismo año, Holanda y Luxemburgo empezaron a vender gasolina con 50 ppm de azufre, mientras que Irlanda y Austria vendían gasolina con 10 ppm de azufre; Suecia era el único país vendiendo diesel libre de azufre (< 10 ppm). Para el 2003, el mercado de Alemania había alcanzado el 100% en la comercialización de gasolina y diesel con 10 ppm de azufre. Estos logros se dieron gracias a la aplicación de una política de incentivos fiscales en dicha región. En el 2004 se estimó que todos los miembros de la Unión Europea estarían en vías de cumplir con los requerimientos de bajo contenido de azufre para el 2005 (Dixon-Decleve, 2004).

La Agencia de Protección Ambiental en Estados Unidos (US EPA) estableció, a inicios del 2000, regulaciones más estrictas para reducir el contenido de azufre en gasolina de 350 ppm peso a 30 ppm peso y en diesel de 500 ppm peso a 15 ppm peso, para entrar en vigencia en el 2006 (Song, 2003).

Como podemos ver la disminución de la calidad del crudo y las reformas a las leyes ambientales, que cada vez se hacen más estrictas, hace que la industria del

petróleo esté en constante búsqueda de nuevas tecnologías alternas para el tratamiento del crudo, ya que se quiere reducir los niveles de azufre y nitrógeno en los combustibles, que se exigen sean más bajos. Por eso el estudio de catalizadores biológicos para la remoción de nitrógeno en los procesos posteriores a la destilación fraccionada, para obtener productos de mayor calidad, con una contaminación mínima por los procesos involucrados en la industria petrolera y su posible incorporación a los procesos existentes.

3. Antecedentes

3.1. Proceso de refinación.

El procesamiento de crudo pesado ha presentado un gran reto para la industria petrolera, principalmente en los tiempos actuales, debido a que se deben cumplir con regulaciones ambientales más estrictas. La obtención de productos de uso común para las actividades cotidianas, como los mostrados en la Tabla 2, se logra mediante la refinación del crudo. Estos procesos involucran varias operaciones térmicas y catalíticas para convertir las fracciones pesadas a moléculas de menor peso molecular.

Tabla 2. Fracciones de crudo obtenidas en el proceso de refinación y sus temperaturas de ebullición.

Fracción	T (°C)	Uso
Gasolina Ligera	32 - 104	Gasolina
Nafta	82 - 204	Se reformula para gasolina
Keroseno	165 - 282	Se reformula para gasolina
Gasóleo ligero (GOL)	215 - 337	Diesel
Gasóleo pesado (GOP)	320 - 426	Corriente para craqueo
Gasóleo de vacío	398 - 565	catalítico o hidro craqueo
Residuos	565 +	Asfalto o corriente para hidro craqueo

La destilación es el proceso primario de refinación donde se vaporizan las fracciones más ligeras (butano, gasolina, keroseno) con un alto grado de pureza, separándose de las fracciones más pesadas como los gasóleos. Las corrientes intermedias y de fondo de la destilación primaria pasan al "craqueo". En este proceso se fraccionan las moléculas más pesadas en otras más ligeras aplicando calor, vacío o por vía catalítica (Gray, 1994).

El craqueo catalítico involucra la utilización de un catalizador en forma de polvo fino. El hidro craqueo utiliza la adición de hidrógeno para producir compuestos con razones

de H/C menores, como la gasolina. El craqueo térmico utiliza temperaturas entre 400 – 500°C y presiones entre 6 y 70 atm (Gray, 1994).

Las primeras reacciones de conversión de los residuos atmosféricos o de vacío a productos destilables se realizan en el mejoramiento primario, el cual involucra los tratamientos térmicos de reducción de viscosidad (visbraking) y el craqueo catalítico (FCC). Posteriormente se lleva a cabo el hidrotratamiento, donde se incluyen las operaciones de hidrodesulfuración (HDS), hidrodesnitrogenación (HDN) e hidrodesmetalización (HDM). Este proceso se lleva a cabo a condiciones de operación de presión y temperatura altas, 340 - 425 °C y 20 – 70 kg/cm², respectivamente (Gray, 1994).

El hidrotratamiento tiene la finalidad de eliminar compuestos azufrados y nitrogenados, así como algunos metales de los destilados para su procesamiento posterior, a fin de cumplir con las especificaciones de calidad de un producto o para utilizarlas como corriente de alimentación en otra etapa de la refinación. De las operaciones involucradas, la HDN es el proceso más difícil de realizar: los compuestos nitrogenados que migran a los destilados no se transforman fácilmente (Bressler y Gray, 2002). El tratamiento de los heterocíclicos nitrogenados a amonio e hidrocarburos consume más hidrógeno por mol del heteroátomo que la desulfuración, y por ello es la reacción más cara comercialmente. La tecnología actual para la remoción del nitrógeno se basa principalmente en HDN con catalizadores Ni/Mo sobre γ -alúmina (Bressler y Gray, 2002).

Estos procesos de refinación del petróleo se han hecho cada vez más difíciles debido a la presencia de compuestos difíciles de remover mediante los métodos tradicionales que usa esta industria, por ello surge la necesidad de buscar alternativas, que complementen estos procesos, tal es el caso de la biotecnología.

3.2. Biotecnología en la industria del petróleo

La biotecnología se ha consolidado en los últimos años como el conjunto de tecnologías encaminadas a la producción de bienes y servicios mediante la utilización de sistemas biológicos o sus productos.

Las principales fuerzas que impulsan actualmente la industria petrolera en el mundo son: la creciente demanda de combustibles; la necesidad de procesar crudo pesado; el desarrollo de productos con mayor valor agregado; el daño económico y en

infraestructura causado por la corrosión; la búsqueda de un mayor nivel de rentabilidad; el cumplimiento de una reglamentación cada vez más exigente, y la necesidad de producir combustibles más limpios.

Recientemente, la industria petrolera se ha interesado en los procesos biotecnológicos no sólo para tratar los efluentes y sitios contaminados que genera, sino como una serie de tecnologías alternativas en las áreas de exploración, producción, refinación y petroquímica.

En el área de explotación de petróleo el uso de tecnologías que involucran compuestos químicos, polímeros o microorganismos ha encontrado nichos económicos que crecen conforme la tecnología avanza (Moritis, 1999). Los procesos biológicos de recuperación mejorada involucran el uso de microorganismos nativos de los yacimientos con características especiales para producir metabolitos específicos, que favorecen la liberación del petróleo del yacimiento. Los mecanismos a través de los cuales tiene lugar la liberación y recuperación son demasiado complejos y se involucran múltiples procesos bioquímicos.

A continuación se presentan algunas de las áreas potenciales donde la biotecnología podría o tiene un impacto en la aplicación en la industria del petróleo.

3.2.1. Biorrefinación

La biorrefinación tiene como objetivo la transformación del petróleo y del gas natural por medio de biotecnologías para darles un valor agregado que permita un desarrollo sostenido, sustentable y respetuoso del medio ambiente. La biorrefinación se encarga de cubrir diversas necesidades que la refinación tradicional no puede llevar a cabo, debido a los altos costos de inversión y operación.

Los compuestos organoazufrados, nitrogenados y los metales representan los constituyentes del petróleo que contribuyen mayormente a la contaminación ambiental. En consecuencia, diversas investigaciones que utilizan biotecnologías se han dirigido a la reducción del contenido de estos compuestos en los combustibles. De esta forma, se han identificado varias cepas que eliminan selectivamente los átomos de azufre (Ohshiro, 1999) y nitrógeno (Kilbane, 2000) en un 73 y 68%, respectivamente. También se ha patentado un proceso para eliminar los metales presentes en combustibles (vanadio y níquel) por medio de biocatálisis (Xu, 1998). Por otro lado en la industria petrolera, la

valoración de los residuos de destilación y de crudo pesado presenta un gran problema debido a la presencia de asfaltenos.

3.2.2. Biopetroquímica

La biopetroquímica tiene como objetivo la transformación de gas natural (GLP), destilados y aceites residuales de refinería por medio de biotecnologías limpias. Los procesos biológicos permiten la obtención de unidades estructurales y bajos requerimientos energéticos.

El petróleo es fuente de energía y de unidades estructurales para la elaboración de materiales (petroquímicos) de mayor valor agregado. Recientemente se ha planteado la relevancia del petróleo como fuente de petroquímicos, en lugar de fuente de energía (Monticello, 2000). Ejemplo de ello es la producción de agentes emulsificantes a partir de los productos de degradación de la biodesulfuración de combustibles fósiles (Lange, 1999); la producción mediante biocatalizadores (lipasas) de monómeros acrílicos, que son unidades estructurales muy versátiles (Athawale, 2000). De igual manera, se han identificado biocatalizadores que permiten reacciones de oxidación, hidroxilación, epoxidación, alquilación y polimerización. La biocorrosión es uno de los principales problemas durante la producción de petróleo y gas. Es causada por el deterioro y degradación de materiales en las instalaciones y líneas de producción.

3.3. Biodesnitrogenación (BDN)

Debido a su origen biológico, el petróleo preserva no solamente el carbono y el hidrógeno de la biomasa original en forma de los hidrocarburos, sino también otros elementos, como el azufre y el nitrógeno e inclusive una variedad de metales de transición, como hierro, vanadio, níquel, etc.

El azufre y el nitrógeno se encuentran incorporados como heteroátomos en una variedad de compuestos, pudiendo representar alrededor del 5% de la masa en algunos depósitos. Al quemarse como combustible, el azufre contenido en el diesel se convierte en óxidos de azufre que se liberan a la atmósfera. En presencia de agua, los óxidos gaseosos se convierten en ácidos, que se disuelven y se precipitan junto con el agua de lluvia. Este proceso se conoce como lluvia ácida y es frecuente en las ciudades con gran carga vehicular.

Por otra parte las normas que cada vez se hacen más estrictas, ha ocasionado que se hagan esfuerzos para disminuir la cantidad de compuestos que producen la lluvia ácida. La implementación de estas normas requirió que se desarrollaran una serie de métodos para la depuración del azufre en las fracciones dedicadas a combustibles. El más común de estos métodos es la hidrodeshulfuración catalítica, que consiste en la conversión del azufre orgánico en sulfuro de hidrógeno usando altas temperaturas y presiones de hidrógeno molecular.

El elevado costo de la hidrodeshulfuración catalítica, debido principalmente al alto consumo de hidrógeno y al envenenamiento de los catalizadores por metales pesados, aunado a una limitación intrínseca de reducir los niveles de azufre por debajo de 500 ppm, muy por arriba de las 15 ppm requeridas por la norma, ha ocasionado que se busquen nuevas alternativas.

El azufre es un elemento esencial para la vida. Aunque el azufre inorgánico es la fuente predilecta de azufre para la mayor parte de los microorganismos, en su ausencia, una variedad de compuestos organoazufrados pueden ser metabolizados para proveer el indispensable elemento. Este hecho es el principio básico de uno de las más interesantes aplicaciones de la microbiología en la industria del petróleo, la biodesulfuración.

Por otro lado, los compuestos nitrogenados se han identificado como una fuente de inhibición de los procesos de hidrotreatmento, tanto para la eliminación de azufrados como para la remoción de nitrogenados (Laredo et al., 2004). Particularmente el carbazol que es un inhibidor potente de la desulfuración debido a que reacciona con el sitio ácido de los catalizadores en la hidrodeshulfuración (HDS), reduciendo el número de sitios activos para la eliminación del azufre (Riddle et al., 2003)

Mediante el uso de la cromatografía de gases se han logrado identificar los tipos de compuestos nitrogenados que existen mayormente en corrientes de gasóleo y éstos son: carbazol, indol y derivados de indoles. La proporción en que se encuentran estos compuestos son 1/.75/2.5, quinolinas/indoles/carbazoles, respectivamente (Laredo et al., 2002).

En el caso de remoción de compuestos organoazufrados existen varios cultivos bacterianos con la habilidad de remover selectivamente el azufre de compuestos como el dibenzotiofeno, los cuales han sido descritos al igual que sus rutas bioquímicas en diferentes fuentes bibliográficas. Se ha demostrado incluso la remoción selectiva del

azufre de corrientes de petróleo o sus derivados manteniendo el valor calórico de los mismos mediante la biodesulfuración. Sin embargo la información sobre rutas biológicas similares para la remoción selectiva de enlaces carbono-nitrógeno es escasa. A pesar de ello, esto no ha representado limitantes para generar alternativas al proceso de desnitrificación. Se han manipulado y modificado varias especies microbianas para la degradación de compuestos nitrogenados orgánicos, derivados del petróleo. De la década anterior a la fecha se han patentado algunos microorganismos modificados genéticamente para desnitrificación de compuestos modelo, como el carbazol o la quinolina.

Una de esas patentes es la estadounidense # 6,541,240 (Kilbane et al., 1999), en ella se encuentra descrita a la cepa *Pseudomonas ayucida*, que cuenta con actividad de desnitrificación, estas cepas se utilizaron con el fin de obtener cultivos capaces de utilizar quinolina como fuente de nitrógeno, y bajo condiciones de operación similares a las encontradas en los procesos industriales.

Otra de estas patentes es la # 20040110258 (Kayser et al., 2004) en la cual utilizan un cultivo bacteriano con la cepa del género *Sphingomonas* (ATCC N° BAA-487), la cual es capaz de metabolizar al carbazol de los hidrocarburos, ya que rompe selectivamente los enlaces C-N, y deja sin modificación los enlaces C-C, y se reporta la reducción de la concentración de carbazol hasta un 95%.

Otra de las especies con las que se ha trabajado es *Pseudomonas* sp. que se conoce que degrada carbazol, esto a partir de un aislamiento que se hizo en un suelo contaminado con hidrocarburos, ahora se sabe que esta bacteria utiliza al carbazol como fuente de carbono, nitrógeno y energía, en experimentos realizados con ¹⁴C-carbazol (carbazol marcado), se encontró que después de 3 días de incubación el 43% de carbono fue recuperado como ¹⁴CO₂ (Gieg et al., 1996). El producto de su metabolismo es una mezcla de ácidos, de los cuales cuatro son los característicos:

- Indol-3-ácido acético
- 5-(2-aminofenil)-5-ácido oxopentanoico
- 5-(2-aminofenil)-5-oxopenta-3-ácido enoico
- 6-(2-aminofenil)-2-hidroxi-6-oxohexa-2,4-ácido dienoico

Por otro lado se sabe que, uno de los componentes encontrados en suelos contaminados, es la quinolina, este compuesto ha sido objeto de estudio para su eliminación por los problemas mencionados anteriormente, sin embargo existe también en

buena medida carbazol, como parte de los compuestos nitrogenados, en donde algunos autores resultados obtenidos acerca de la biodegradación de carbazol. En uno de ellos se utilizaron cuatro cepas diferentes obteniéndose que algunas sólo utilizan el carbazol como fuente de carbono y otras como fuente de nitrógeno. Se utilizó carbazol marcado y se inoculó con especies de *Xanthomonas*, encontrándose una recuperación del 45% como $^{14}\text{CO}_2$, también se han propuesto rutas de este metabolismo, identificando al ácido antranílico y catecol como productos de dicho metabolismo (Gieg et al. 1996).

Aunque se conoce que las bacterias *Pseudomonas*, no son las únicas que se han encontrado que degraden carbazol, cuando se probaron cepas de este género con otros sustratos, principalmente compuestos aromáticos y heterocíclicos como: naftaleno, fenantreno, benceno, se observó que no había crecimiento de la bacteria (Grieg et al. 1996).

Otro microorganismo estudiado es *Ralstonia* sp. que se aisló de suelos contaminados con hidrocarburos, esto por la habilidad de mineralizar carbazol, en un medio donde se tenía al carbazol como única fuente de carbono, después de 15 días se observó que el 80% del carbono recuperado se encontraba como moléculas de CO_2 , un 1% como carbazol que no había sido degradado, y el resto se observó como productos de su metabolismo, se separaron por medio de HPLC, y se reconocieron cuatro de ellos, que son: ácido antranílico, indol-2-ácido carboxílico, indol-3-ácido carboxílico, y 1(H)-4-quinolina. Estos resultados son muy parecidos con los obtenidos con *Pseudomonas* sp. (Schneider et al. 2000).

Como en se vió en los trabajos citados anteriormente, la degradación del carbazol es conocida, pero en sistemas donde este compuesto está presente en medios acuosos, sin embargo en el proceso de refinación del petróleo, el carbazol se encuentra disuelto en una fase orgánica. Existen pocos estudios que se han enfocado al estudio de degradación en presencia de fases orgánicas, en uno de ellos se vieron los efectos que tienen estos compuestos sobre la actividad de las enzimas que realizan la transformación del carbazol por *Pseudomonas* sp (Li et al. 2004). En este trabajo se probaron diferentes solventes como: tolueno, xileno, hexano, heptano, tetradecano, gasolina y diesel, encontrándose que después de una hora con la adición de gasolina, diesel o tetradecano; el porcentaje de carbazol en el medio era cercano al 20%, es decir, que no hubo degradación, esto indica la toxicidad de los solventes sobre los microorganismos, haciendo que se tome en

cuenta en la elección del solvente a utilizar en el proceso de remoción del carbazol en los diferentes procesos (Li et al. 2004), en este proyecto el gasóleo es el solvente.

Para este caso se encontró que los mejores disolventes que se pueden usar en la degradación del carbazol son tetradecano y gasolina o diesel, ya que su polaridad es aceptada por esta bacteria, sin causar daño a su estructura y funcionalidad (Li et al., 2004).

Como antecedente directo de este proyecto se ha caracterizado una bacteria *Burkholderia* sp. IMP5GC, que se aisló en el Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), de una muestra proveniente de Los Azufres, Michoacán, por su capacidad de degradar carbazol en medio bifásico acuoso/orgánico la composición del medio bifásico compuesto con hexadecano y agua (10% a 70% v/v) se observó un buen porcentaje de degradación del carbazol, esto incrementa las expectativas del uso de este microorganismo en los procesos de refinación (Castorena et al., 2004).

Esta bacteria gram-negativa es mesofílica, crece a una temperatura óptima entre 30 °C a 40 °C, pero puede soportar temperaturas mayores a 70 °C y trabajar a un pH de 6 a 8, (Castorena et al., 2004).

Los antecedentes anteriormente mostrados solo han estudiado la eliminación de compuestos nitrogenados en sistemas cerrados por lotes, y ya que existen pocos reportes de la aplicación directa de la incorporación de estos estudios a los procesos en la industria petrolera, tales como el uso de biorreactores, se puede considerar un campo potencial de investigación.

3.4. Características deseables que deben tener las poblaciones microbianas para la eliminación de compuestos nitrogenados en el gasóleo:

Para la utilización de los sistemas biológicos en los procesos del petróleo, es deseable que los microorganismos cumplan con ciertas características, dentro de las cuales se pueden mencionar:

- Crecimiento rápido en un medio económico de biomasa que desarrolle actividad biocatalítica rápidamente inducible.
- Que no presente actividad ante sustratos diferentes a los de interés (selectividad).

- Que sea un sistema genético manipulable para poder aislar los mutantes con la ruta enzimática truncada, para mantener la fracción de carbono.
- Estabilidad (con la utilización de células completas)
- Actividad en un sistema bifásico donde el sustrato esté en la fase orgánica (Ej. petróleo) a una razón volumen/suspensión celular alta.
- Tolerancia a la toxicidad de las corrientes de alimentación o a los productos biocatalíticos.
- No patogenicidad.
- Proceso escalable.
- Requerimientos mínimos de agua.

Todos estos requerimientos darán la pauta para la utilización de catalizadores biológicos.

3.5. Los Biorreactores en la industria petrolera.

Los resultados positivos que se obtienen de la utilización de tratamientos biológicos dependen en buena medida de la población microbiana y la configuración de los reactores también es importante, por lo que a continuación se presenta una revisión sobre los tipos de reactores estudiados para la biotransformación en la industria del petróleo. De los reportes existentes en la literatura las configuraciones más utilizadas son de reactores tipo agitados, donde existen ambas fases acuosa y orgánica y forman una emulsión, sin embargo la separación de estas emulsiones pueden presentar serios problemas, obteniendo bajas eficiencias en la recuperación del producto.

Las investigaciones para lograr el mejoramiento de destilados de petróleo, llevadas a cabo por diferentes empresas, compañías o centros de investigación avanzada, se han enfocado principalmente a las transformaciones de desulfuración biológica. Algunos ejemplos los mencionan McFarland et al. (1998).

Un ejemplo es la compañía ENCHIRA Biosystem Corporation (EBC) que se enfocó en la desulfuración de diesel, para tal caso se obtuvo un sistema que tiene la capacidad de procesar 0.5 a 5 barriles de destilado por día, a relaciones agua-petróleo de 1:10 hasta 1:0.2, con tiempos de residencia que van desde 0.2 a 40 h. El biocatalizador se encontró formando una emulsión con la fase acuosa y la fase orgánica, dentro de un tanque agitado (CSTR), posteriormente esta emulsión formada se separa por centrifugación con un hidrociclón desemulsificante, presentando bajos rendimientos en la

recuperación, mediante este sistema reportan una disminución de azufre en diesel de 1900 a 570 ppm, 649 a 314 ppm y 294 a 79 ppm.

Otro caso es el Laboratorio Nacional Brookhaven (BNL) el cual desarrolló un sistema para mejorar el crudo. Mediante la utilización de microorganismos tanto termófilos como extremófilos, lograron reducir la concentración de azufre de 25-35%, y de compuestos nitrogenados de 20-50%, así como de metales traza de 20-50%, obteniendo una recuperación del 90%, incorporando la creación de una emulsión con la fase acuosa, orgánica y la bacteria, en un reactor agitado, la proporción de agua-crudo utilizada es de 3:2, después esta emulsión separa mediante una centrifuga de sedimentación, el tiempo por lote reportado fue de 48 h/lote.

Dada la dificultad que presenta la separación de la emulsión, en este tipo de reactores, esta etapa representa un reto para su posible escalamiento a planta piloto o su uso en la industria y estas dificultades presentadas propician la búsqueda de nuevas configuraciones de reactores para minimizar estos obstáculos.

Tal es el caso de los reactores de dos fases particionadas, donde la fase orgánica flota sobre la fase acuosa. En esta configuración la fase orgánica está disuelta en un solvente no miscible en agua y biocompatible con las células, logrando que las bacterias no interactúen directamente con la fase orgánica, aún a grandes cantidades de esta fase. Mediante este arreglo existe una alimentación suficiente y la velocidad de alimentación está ligada a la actividad celular, así conforme aumenta el número de microorganismos, aumenta la demanda por el sustrato y se satisface por la partición del compuesto que tiende al equilibrio entre ambas fases (Daugulis, 2001).

Otra configuración es el uso de reactores empacados en donde las células o microorganismos se encuentren inmovilizados. En estos sistemas los microorganismos pueden ser más estables y su recuperación para su reutilización puede ser más fácil, el principio de estos tipos de reactores es el paso de la corriente a tratar a través del empaque, este tipo de reactores son de gran utilidad cuando se tiene solo una bioconversión ya que al aumentar el número de reacciones el nivel de complejidad aumenta, tal es el caso de las mezclas de hidrocarburos del petróleo (McFarland et al., 1998). Una limitación de este tipo de sistemas es el mantener la actividad del catalizador, ya que durante la transformación puede desactivarse, lo cual implica que debe mantenerse en una solución acuosa. Algunas ventajas de estos reactores son: su posible

utilización en continuo, ya que se evita la saturación, tiene un bajo costo de operación y el tamaño es menor comparado con uno agitado (McFarland et al., 1998).

Reactores de membrana y su posible utilización en la biodesnitrificación

Los reactores de membrana presentan la ventaja de no requerir aditivos para recuperar el producto, pueden operar a temperaturas y presiones moderadas y reducen la formación de productos intermedios. La actividad del biocatalizador puede ser muy eficiente y selectiva comparada con los catalizadores químicos, además pueden presentar tasas de reacción más altas (Giorno y Drioli, 2000).

En un panorama general, las membranas pueden tener textura densa o porosa y pueden ser de origen natural o artificial. Se pueden clasificar como orgánicas (polímeros) o inorgánicas (cerámica) (Hsieh, 1989); pueden ser mixtas, neutras o con carga (intercambio de iones); su estructura puede ser homogénea o asimétrica. Estas clasificaciones son arbitrarias y una membrana puede tener varias de las características mencionadas a la vez (Novelect, 1993). Las membranas poliméricas orgánicas han servido para los fines de separación de fases acuosa-orgánica. Estas pueden estar constituidas por materiales celulósicos, como acetato de celulosa o poliestireno; otras opciones pueden ser las poliamidas, los derivados acrílicos, el policarbonato o el polipropileno (Novelect, 1993).

Las membranas inorgánicas presentan propiedades interesantes como la resistencia mecánica. Su estructura es a base de compuestos de carbono, aluminio, aluminosilicatos o carburo de silicio y la superficie activa está hecha a base de óxidos metálicos, de vidrio o de carbón. La presentación que se comercializa más, de estas membranas, es la tubular o multicanal (Novelect, 1993; Hsieh, 1989).

Los biorreactores de membrana se pueden clasificar con base en su modo de operación. Por ejemplo, los de dos fases (orgánica-acuosa) pueden ser de membrana de microfiltración o de ultrafiltración. Los reactores de ultrafiltración se utilizan cuando el sustrato tiene peso molecular más alto que el del producto, y cuando tanto el sustrato como el producto son solubles en el mismo disolvente. En este caso, si el tamaño de poro de la membrana es apropiado el sustrato se puede transportar al biocatalizador inmovilizado en o sobre la membrana, pero no puede pasar a través de ella, mientras el producto pasa libremente a través de la misma, recuperando éste del otro lado de la membrana. Si el sustrato y el producto tienen el mismo tamaño molecular, ambos

atraviesan la membrana; por ello, es necesario asegurar que el sustrato llegue a el catalizador, se transforme y que el producto atraviese la membrana (Giorno y Drioli, 2000). Los arreglos tanto de microfiltración como de ultrafiltración utilizados a nivel industrial son del tipo tangencial. Este arreglo consiste en la circulación del fluido de forma paralela a la membrana, con la finalidad de disminuir la acumulación de las especies o moléculas a la superficie de la membrana (fenómeno de polarización de concentración). Los reactores con estos arreglos operan a bajas presiones (< 3 bar) (Novelect, 1993).

Cuando el sustrato y el producto tienen diferentes solubilidades, se puede utilizar un reactor de membrana bifásico, en el cual se coloca la membrana con el biocatalizador entre la fase orgánica y acuosa. La fase orgánica contiene el sustrato de interés, el cual se transporta por difusión a el catalizador, donde se lleva a cabo la reacción de transformación, y el producto se extrae a la fase acuosa (Giorno y Drioli, 2000).

Cuando el sustrato y el producto tienen diferentes solubilidades, se puede utilizar un reactor de membrana bifásico, en el cual se coloca la membrana con el biocatalizador entre la fase orgánica y acuosa. La fase orgánica contiene el sustrato de interés, el cual se transporta por difusión a la enzima, donde se lleva a cabo la reacción de transformación, y el producto se extrae a la fase acuosa (Giorno y Drioli, 2000).

Dadas estas características de presentar una selectividad al paso de una de las fases, el empleo de membranas en el proceso de biodesnitrificación hace que sea un método de separación con perspectivas interesantes.

4. Justificación

Los crudos pesados y los residuos constituyen una porción significativa y creciente de las reservas de petróleo mundiales. Estos crudos tienen un alto contenido calorífico pero un valor de mercado muy bajo debido a las altas concentraciones de azufre, nitrógeno y metales, además de su viscosidad y peso molecular. Conforme se van consumiendo los crudos ligeros a una tasa desproporcionada, el porcentaje de crudos pesados de las reservas mundiales de crudo sigue escalando.

Los procesos utilizados en la refinación del petróleo para obtener mejores productos, son continuos, e involucran grandes volúmenes de procesamiento. El conocer las condiciones necesarias para el buen desempeño del biocatalizador, y lograr una transformación óptima, asociada a los fenómenos de transferencia de materia, del medio exterior hacia la célula y conocer las características del proceso propuesto ayudará a encontrar ese óptimo desempeño.

Los esfuerzos por aplicar procesos biológicos a la refinación del petróleo a niveles superiores a las pruebas en laboratorio son incipientes. Uno de los principales retos que enfrenta la biorrefinación es el mantenimiento de actividad microbiana y su relación con la presencia de una fase acuosa. Por lo que es importante en un proceso a desarrollarse y aplicarse en la industria del petróleo el considerar la minimización de la misma e incorporar una etapa de separación de la fase orgánica ya que las especificaciones para venta y comercialización de los destilados de petróleo se requiere que esté libre de agua.

La existencia de reportes o investigaciones acerca del uso de reactores en procesos involucrados con la biodesnitrogenación de los derivados del petróleo es escasa, creando un campo potencial para la investigación de configuraciones o sistemas óptimos de biorreactores en la industria del petróleo.

Así mismo el uso de membranas en procesos industriales que se ha hecho más común en los últimos años por el bajo costo energético requerido, no necesita aditivos para lograr una separación, se puede utilizar en continuo y por el desarrollo de nuevos materiales con los que se fabrican disminuyendo el costo de la membrana, esto ha hecho que se llegue a considerar un método potencial para separar la fase orgánica de la fase acuosa incorporando el uso de una membrana permeable al producto en un reactor.

Lo anterior nos da una referencia de la importancia de la búsqueda de las mejores condiciones a utilizar en el proceso de biodesnitrogenación de una corriente de gasóleo, para mejorar la calidad de los combustibles.

5. Objetivos

General

- Estudiar el proceso de biodesnitrogenación de gasóleo en un biorreactor de membrana y en un biorreactor de lecho empacado utilizando un catalizador biológico

Específicos

- Configurar los reactores para un proceso en operación continua.¹
- Caracterizar el proceso de biodesnitrogenación en ambos reactores, determinando los puntos siguiente:
 - ✓ Actividad del catalizador.²
 - ✓ Tiempo de vida medio del catalizador.³
 - ✓ Capacidad máxima de eliminación en ambos sistemas
- Comparar la eficiencia en la eliminación de compuestos nitrogenados entre ambos tipos de reactores.
- Propagar los microorganismos (catalizador) con una fuente de carbono alterna

¹Se determinará la capacidad y eficiencia en la eliminación del carbazol así como de los compuestos nitrogenados totales.

²Se observará la variación de la actividad con respecto al tiempo que se tenga en operación el sistema.

³Se determinará el tiempo útil del catalizador sin disminuir su capacidad de eliminación durante la operación, manteniendo las condiciones constantes.

6. Metodología

En la Figura 1 se presenta la estrategia experimental seguida para el desarrollo de este trabajo.

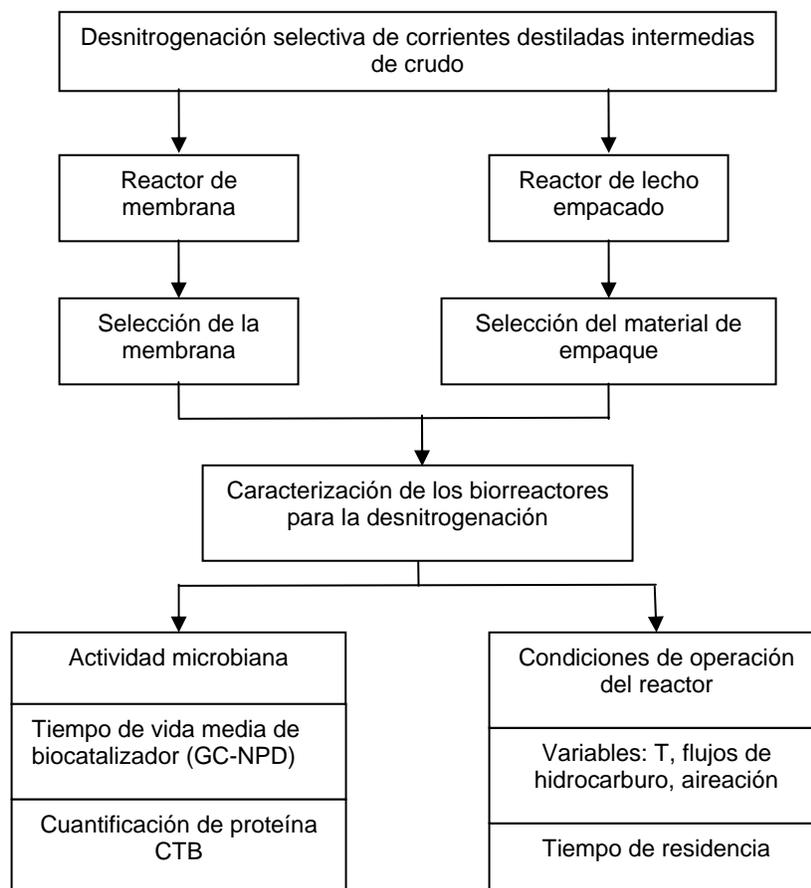


Figura 1. Estrategia experimental

El primer punto abordado fue determinar la tasa de degradación de la cepa a utilizar en este estudio, ésta fue obtenida en el Instituto Mexicano del Petróleo y se caracterizó por tener la tasa de degradación más alta con respecto a otras obtenidas en el laboratorio.

Una vez escogido el sistema biocatalítico se planteó el montaje del arreglo de los biorreactores (a nivel laboratorio), el primero con una membrana acoplada de tal manera que permita la separación selectiva y en continuo de la fase orgánica de un arreglo de reactor de mezcla completa. Para ello, la primera etapa consistirá en la selección de la membrana, que por sus características, permita una separación adecuada de la fase orgánica de la emulsión formada de medio mineral en fase acuosa: microorganismos y la propia fase orgánica.

Para el segundo reactor, que es el de lecho empacado, los microorganismos están inmovilizados en un material de empaque, en este tipo de arreglo la fase orgánica no se encuentra en contacto directo con los microorganismos. En este caso, la selección del empaque es de suma importancia ya que debe permitir el paso de la fase orgánica y mantener a los microorganismos en un ambiente menos severo comparado con un sistema de mezcla total. Además debe tener estabilidad estructural y ser resistente a la fase orgánica.

Una vez realizadas estas etapas se procederá a caracterizar la remoción de nitrógeno en los biorreactores considerando dos aspectos, la actividad microbiana y las condiciones de operación del reactor. Basados en la capacidad de eliminación del catalizador (previamente determinada) se hará una variación de los parámetros de operación (tiempo de residencia, cantidad de catalizador) para ver su efecto en la remoción del carbazol en la corriente de gasóleo.

Por otro lado, dadas las características que presenta la población microbiana a utilizar, tales como un tiempo de crecimiento lento y bajos rendimientos, la cepa se cultivará con una fuente de carbono alterna, glucosa, ya que se tiene el antecedente, por experimentos previos a este trabajo, que se obtiene un buen crecimiento con esta fuente de carbono. Para evaluar la pertinencia de utilizar una fuente alterna de carbono se analizará el tiempo que tarda en reactivarse así como la cantidad de biomasa obtenida, comparando con la propagación con carbazol.

6.1 Gasóleo

Se trabajó una mezcla de gasóleo y aceite cíclico ligero (ACL) obtenidas de las refinerías “Miguel Hidalgo” en Tula, Hgo. y de Ciudad Madero, cuyas características se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3. Características de los gasóleos de la refinería en Tula:

FRACCIÓN	B26	B13	B32	B14*
Azufre, %peso	1.0711	1.4777	1.637	3.2783
Nitrógeno total, ppm	263	456	543	779
Nitrógeno básico, ppm	77	126	145	285
Aromáticos, %peso	29.5	32.02	35.7	78.4

*B14 es ACL

El gasóleo de la Refinería de Madero proviene de 100% crudo Maya, por lo tanto es más pesado que el gasóleo B32 de la Refinería de Tula. Las características de las cargas de ACL y gasóleo se muestran en la Tabla 4.

Tabla 4. Características de ACL y Gasóleo

	Azufre (%)	Nitrógeno (%)	PM
ACL	2.75	0.0361	190
LGO	2.08	0.0561	280

Se trabajó con una mezcla de 85% Gasóleo y 25 % ACL.

6.2. Microorganismos

El microorganismo con el cual se trabajo fue una cepa aislada en el IMP denominada IMP-C2, que pertenece al género *Pseudomonas*, que es capaz de degradar carbazol. Y de acuerdo con el antecedente de este proyecto se sabe que tiene una actividad de 95.5 mg de carbazol/h*g biomasa en una mezcla de hidrocarburo-agua 70:30, a 38 °C

Esta cepa antes de utilizarla se encontraba cultivada en caja de petri con agar noble y carbazol en refrigeración y proviene de la colección de cepas del Instituto Mexicano del Petróleo.

6.3. Medio mineral

El medio mineral de preparará a base de sales sin fuente de nitrógeno; composición (por litro de solución): KH_2PO_4 , 0.2 g; K_2HPO_4 , 0.6 g; MgSO_4 , 0.25 g; CaSO_4 , 0.03 g; FeSO_4 , 0.01 g. La proporción entre KH_2PO_4 y el K_2HPO_4 confiere al medio un pH de 7.

6.4. Propagación de microorganismos

Inicialmente el inóculo se obtuvo de una caja de petri, de la colección de cepas del Instituto Mexicano del Petróleo, identificada como IMP-C2, perteneciendo a una bacteria del género *Pseudomonas* sp, este inóculo se propagó en una primera instancia en un matraz de 250 mL de volumen total, y con un volumen de operación de 125 mL, posteriormente se inoculó en los matraces de procultivo descritos a continuación.

La propagación de microorganismos para las distintas pruebas se realizó por medio de matraces de procultivo de volumen total de 2 L, trabajando con un volumen líquido de 1 L dejando un headspace con el volumen restante. Los matraces se mantuvieron en agitación, a una temperatura aproximada de 38 °C, se airearon diario por 15 minutos, ya que no tienen un suministro continuo de oxígeno. Para su propagación se utilizó el medio mineral descrito anteriormente cambiándolo cada semana con medio fresco, y adicionando carbazol 1 mL de una solución de 300 mg/L (carbazol en dimetilsulfóxido). Las adiciones de carbazol se fueron incrementando conforme la degradación del mismo aumentaba. Esto se realizó a lo largo de mes y medio. Posteriormente la biomasa se cosechaba y utilizaba en los diferentes experimentos, dejando una parte para continuar su propagación.

Por otro lado se pusieron en propagación tres matraces con las características descritas anteriormente, a dos de ellos se les agregó glucosa 1 g/L y cloruro de amonio 0.8 g/L como fuente de carbono y nitrógeno respectivamente, al tercero se le adicionó únicamente carbazol, esto para comparar los rendimientos de biomasa en los microorganismos usando una fuente de carbono alterna y posteriormente activándola mediante la adición de carbazol, y comparando con un tercer matraz donde desde un comienzo se propagó con carbazol. Los matraces que se inocularon en el medio con glucosa y cloruro de amonio después de tres días se les cambió el medio y se les adicionó carbazol, estos matraces se estuvieron revisando periódicamente para observar el tiempo que tardaban en reactivarse. Se cuantificó proteína total del inóculo de los tres matraces. De los dos matraces que se propagaron con glucosa en un principio, se cuantificó proteína cuando se cambio medio siendo el final de la propagación con glucosa y el principio de la propagación con carbazol. Después del periodo de propagación nuevamente se recuperó la biomasa y se cuantificó proteína total final de los tres matraces.

6.5. Caracterización del reactor de membrana

El biorreactor es un sistema de mezcla completa (CSTR) con una membrana acoplada en la parte inferior del reactor que le permite separar la fase orgánica de la acuosa, el volumen nominal es de 400 mL, el volumen de trabajo fue de 200 mL, con una proporción 50:50 fase acuosa/fase orgánica, cuenta con un sistema de agitación mediante un impulsor magnético, tiene tres entradas por la parte superior: la línea de alimentación de la mezcla de Gasóleo-ACL fresca, otra con la aireación, y una última para la

recirculación. Se recupera el filtrado por la parte inferior. El sistema se ubicó dentro de una cámara de temperatura controlada a 37 °C.

A este sistema se le incorporó un colector para llevar a cabo la recirculación y realizar la recuperación del producto. El diagrama de la configuración se muestra en la Figura 2.

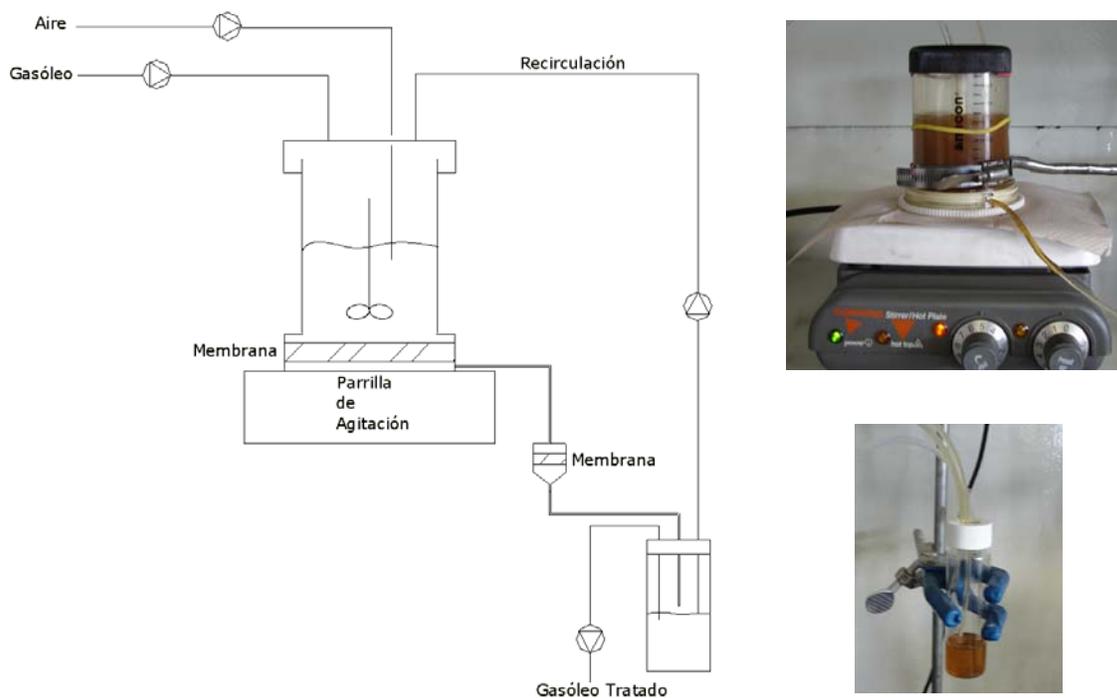


Figura 2. Sistema del reactor de membrana

Se inoculó con una cantidad de proteína de 35.5 mg y con el fin de poder variar los tiempos de residencia del gasóleo en el sistema se estableció un tiempo de residencia alto e ir disminuyéndolo conforme respondiera el sistema, por tal motivo se propuso un flujo de alimentación inicial de 1.25 mL/h, es decir un tiempo de residencia de 160 horas, considerando un volumen de operación de 200 mL. Pero dadas las características de la bomba de alimentación utilizada no daba este flujo, el flujo mínimo que daba era de 3 mL/h, por este motivo se conectó la bomba a un temporizador que la enciende y apaga cada dos horas, con esto se obtuvo un flujo de 1.3 mL/h, obteniendo un tiempo de residencia de aproximadamente 154 horas, que fue el tiempo de residencia con el que se trabajó inicialmente, el sistema operó con agitación constante y se alimentó aire con un flujo de 12.41 mL/min. Adicionalmente se trabajaron cuatro flujos de alimentación 32, 65, 90 y 115 mL/día, con las mismas condiciones de operación.

Membranas.

Se trabajó con dos membranas la primera de polietileno y la segunda de teflón.

La membrana que se probó inicialmente (polietileno) tiene las características siguientes:

- Membrana de la Marca POREX No X-4896
- Material: Polietileno de alta densidad (HDPE)
- Diámetro de poro: 45 micras

La segunda membrana que se utilizó (teflón) tiene las siguientes características:

- Membrana de la Marca POREX No PM3VL
- Material: Teflón (PTFE)
- Diámetro de poro: 20 micras

6.6. Caracterización del reactor de lecho empacado

Este sistema experimental consistió en una columna de vidrio con un volumen total de 370 mL, empacándola hasta un volumen de 200 mL. El volumen restante se llenó con perlas de vidrio con el fin de mantener la zona empacada y promover la separación de la fase orgánica. La zona empacada permaneció sumergida en medio mineral y en el interior se mantuvo una relación 1:1 de las fases orgánica/acuosa. La alimentación del sistema se hizo con flujo ascendente contando con un sistema de recirculación (200 mL/min) que transportó la fase orgánica de la parte superior y la re-inyectó en la parte inferior de la columna. La salida del sistema se encontró en la parte superior y el efluente del sistema se generó por desborde de nivel. En la parte inferior del sistema se inyectó aire con un flujo de 21 mL/min, para mantener condiciones aerobias, el volumen de operación fue de 370 mL. El sistema se presenta en la Figura 3.

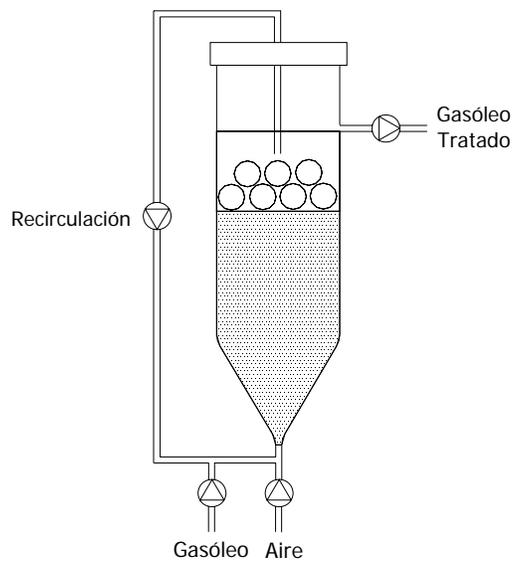


Figura 3. Sistema del reactor de lecho empacado con biomasa inmovilizada

Este sistema operó en continuo posteriormente de una operación en lote que sirvió para determinar la tasa de degradación del carbazol, la cantidad de biomasa inoculada fue de 11.9 mg de proteína total. La inoculación consistió en agregar la biomasa de la cepa IMP-C2 en el sistema para impregnarla o inmovilizarla en el material de empaque, la cual se recirculó solo con el medio mineral hasta que el color del recirculado se viera claro.

Material de empaque

Características del material de empaque de tipo polimérico fibra de nylon 3M utilizado en el reactor de lecho empacado:

- Material: fibra de nylon 100 %
- Densidad material: 0.031 g/mL
- Resistencia a diesel: excelente
- Retención de agua (por $g_{\text{soporte seco}}$)
 - Saturado (esc): 27.13 g
 - Sin escurrimiento: 1.77 g

7. Técnicas analíticas

7.1. Cuantificación de nitrógeno (carbazol).

Análisis cromatográficos. Cromatografía de Gases para determinación de perfiles de compuestos nitrogenados (GC-NPD) Thermo Quest 2000, la temperatura del inyector es 250 °C, temperatura del detector 275 °C, flujo de aire 50 mL/min, flujo de H₂ 2 mL/min, flujo Makeup (N₂) 10 mL/min, horno 100 °C por 1min, con una velocidad de 4 °C/min hasta una temperatura de 156 °C, después a 198°C a una velocidad de 2 °C/min, por último a 250 °C a una velocidad de 4 °C/min, se utiliza una columna Alltech TM10 de 30 m x 0.32 mm x 0.20 µm para separar los compuestos nitrogenados.

Para cuantificar la concentración de carbazol se agregó 1 mL de muestra en un vial con 1 µL de quinolina como estándar externo con el fin de corregir errores por la inyección. Se realizó una curva estándar de carbazol en tolueno de 100 ppm hasta 300 ppm.

7.2. Cuantificación de nitrógeno total.

Análisis de nitrógeno total. Este análisis se hizo en el laboratorio de evaluación en micro y escalamiento de catalizadores del Instituto Mexicano del Petróleo, bajo el procedimiento ASTM-D-5762-02 y ASTM-D-4629-02.

7.3. Hidrocarburos

Los perfiles de hidrocarburos en general y los azufrados se determinaron en un cromatógrafo de gases (GC-FID) HP6890, acoplado a un detector de quimiluminiscencia (SCD) Sievers 355, con quemador de aire libre de hidrocarburos a 800 °C, horno: temperatura inicial de 100 °C por 2 minutos, después a 280 °C por 5 min a una velocidad de 5 °C/min, temperatura del inyector 185 °C, detector a una temperatura de 250 °C, flujo de H₂ de 40 mL/min, flujo de aire 450 mL/min, flujo de makeup (helio) 45 mL/min, columna HP1 de Metil Siloxano de 30 m x 320 µm x 0.25 µm.

7.4. Biomasa

La determinación se llevó a cabo mediante la cuantificación de proteína utilizando la técnica de Azul de Coomassie. Para la preparación del reactivo de Azul de Coomassie,

se utilizó Azul brillante de Coomassie G 250 (0.66 %) disuelto en ácido perclórico (al 3 % w/v). Este reactivo se debe agitar por lo menos 3 h, hasta que el reactivo esté totalmente disuelto. Posteriormente se debe filtrar en papel Whatam No. 1, almacenando en un recipiente ámbar a temperatura ambiente.

Para determinar la proteína de las muestras, primero se deben hidrolizar: 300 μ L de muestra, agregar 1.2 mL de solución salina al 0.85 % y 1.5 mL de una solución de NaOH 0.1 N., agitar las muestras y poner a hervir en baño María durante 1 h. Dejar enfriar y realizar la cuantificación colocando 800 μ L del hidrolizado en un tubo (por triplicado) y adicionar 200 μ L del reactivo de Coomassie. Agitar y leer después de 5 minutos en un espectrofotómetro a 595 nm. La curva estándar de proteína se preparó con seroalbúmina bovina.

Se realizaron siembras en placas con agar nutritivo para determinar pureza. Se tomó de la suspensión una muestra y se hicieron diluciones hasta 10^{-9} , sembrando por extensión con varilla sobre cajas con agar nutritivo las últimas tres diluciones.

8. Definiciones.

Carga: Cantidad de sustrato alimentado a tratar por unidad de volumen del bio-reactor por unidad de tiempo.

$$\text{Carga} = (\text{Concentración entrada}) (\text{flujo de gasóleo}) / \text{volumen de reactor}$$

Capacidad de eliminación: Es la cantidad de sustrato bio-degradado por unidad de volumen de bio-reactor por unidad de tiempo.

$$\text{Capacidad de eliminación} = [\Delta C] / \text{Tiempo de residencia}$$

Eficiencia de remoción: es la fracción de contaminante removido por el bio-reactor, expresado como un porcentaje.

$$\% \text{ Eficiencia de remoción} = (1 - [C_{\text{Salida}} / C_{\text{Entrada}}]) \times 100$$

Las definiciones anteriores sirvieron para caracterizar la operación en continuo de los reactores.

Tasa de degradación.

Las tasas de reacción indican la cantidad de sustrato consumido por unidad de tiempo por unidad de proteína, dichas tasas de reacción son obtenidas a partir de los experimentos realizados en lote, de los cuales se obtienen gráficas del consumo de sustrato con el tiempo. Los datos de degradación de los compuestos se ajustaron mediante el modelo de Gompertz, el cual es un modelo de tres parámetros, que pasa por los puntos graficados, y que determina la velocidad de consumo del contaminante a tratar con un mayor ajuste en los datos experimentales. El modelo se desarrolló por Benjamín Gompertz en 1825, y se basa en una función matemática con una doble exponencial.

$$Y = \alpha \exp(-\beta \exp^{-\kappa x})$$

Donde:

Y = es la cantidad de sustrato consumido

α = es la máxima cantidad de sustrato consumida (mg de sustrato)

β = es el incremento del consumo del sustrato cuando el tiempo se incrementa indefinidamente

κ = es la velocidad de consumo del sustrato (1/tiempo.)

x = es el tiempo

Para obtener la velocidad de consumo del sustrato de interés se realiza la derivación del modelo de Gompertz, esto es la derivación de Y con respecto al tiempo X teniéndose:

$$V_{\text{máx}} = 0.368\alpha\kappa$$

La velocidad de consumo obtenida por la expresión anterior se expresa en mg de sustrato consumido/h, para complementar dicha ecuación y debido a que se realiza la cuantificación de proteína inicial de cada experimento, se puede dividir la velocidad de consumo entre la cantidad de proteína inicial para tener una tasa de consumo en función de la proteína cuantificada, teniéndose entonces que las tasas de reacción se expresan en $(\text{mg}_{\text{sustrato}} \text{ consumido})/(\text{g}_{\text{proteína}} \text{ h})$.

9. Resultados y Discusión

9.1 Reactor de Membrana

Degradación de carbazol.

Operación por lotes.

Para determinar la actividad del catalizador en cuanto a la remoción de los compuestos nitrogenados, en especial el carbazol, se realizaron 8 experimentos en lote con una duración de 24 horas cada uno, en las cuales se tomaron muestras de la fase orgánica cada dos horas y se analizaron en el cromatógrafo de gases, las condiciones con las cuales se pusieron en marcha estas operaciones fueron las siguientes: volumen total de operación de 200 mL, con una relación de fase acuosa:fase orgánica 50:50, la fase acuosa estuvo compuesta por el catalizador y medio mineral descrito anteriormente en la sección metodología, la fase orgánica estuvo constituida por la mezcla de gasóleo y ACL descrita anteriormente. Al final de cada lote se recuperó la biomasa que inicialmente fue de 35.5 mg como proteína total y se inoculó en el reactor con fase orgánica y fase acuosa fresca cada vez, así mismo para cada lote se suministró aire en forma continua a una razón de 12.41 mL/min, estos lotes se realizaron en el biorreactor, manteniendo las mismas condiciones en los diferentes lotes.

Las muestras de cada lote se analizaron obteniéndose perfiles de compuestos nitrogenados que se muestran en la Figura 4. En esta se pueden comparar los perfiles de los compuestos nitrogenados presentes en las muestras analizadas de los lotes 1 y 5, observando que el tiempo de degradación del carbazol en el primer lote fue de dos horas obteniendo una tasa de degradación de 468 mg/proteína*h y en el lote 5 el tiempo es de ocho horas con una tasa de degradación de 15.50 mg/proteína*h.

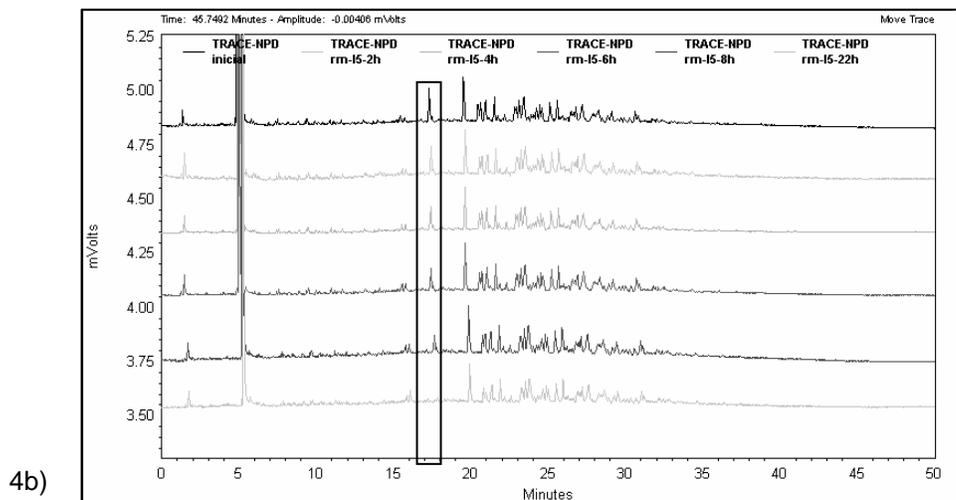
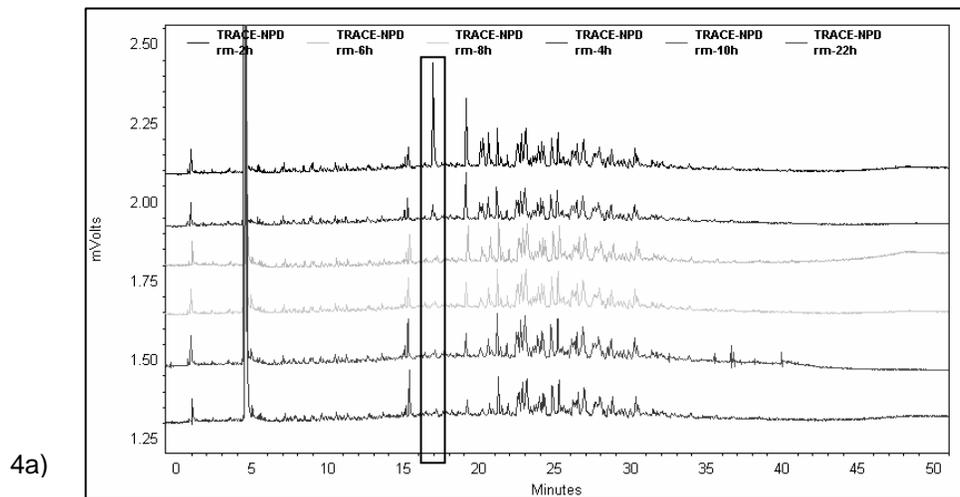


Figura 4. a) Perfil de compuestos nitrogenados lote 1*.

b) Perfil de compuestos nitrogenados lote 5*.

*Se enmarca el área del carbazol en la figura

Como se observa en la Figura 4 la diferencia en los tiempos de degradación puede ser debido a que en un principio esta biomasa se encontraba en un medio acuoso, con condiciones adecuadas para que se pudiera desarrollar y al momento de inocular en el reactor estas condiciones cambiaron por la incorporación de la fase orgánica, y conforme los lotes fueron transcurriendo, esta bacteria pudo ir disminuyendo su actividad, llegando a un punto donde la actividad de la bacteria tiende a ser constante, esto se puede observar en la Figura 5 donde los últimos lotes (5 a 7) se observa que la tasa de degradación se ve más uniforme respecto a los que le anteceden siendo 22 mg/L día la promedio y la máxima donde se estabilizó, esto contrasta con el valor de 140 mg/L día que es el que se obtuvo en el lote 2, también se puede ver la alta tasa de degradación en

el lote 1 que fue de 480 mg/L día esta alta tasa se debe a que la cantidad de carbazol fue mayor que la que trae el gasóleo, esto posiblemente porque en el inóculo se arrastró carbazol de la propagación en los matraces.

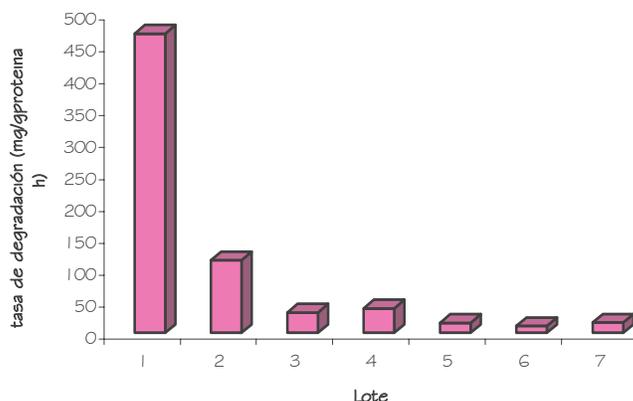


Figura 5. Tasa de degradación respecto a los lotes.

Sin considerar este punto la tasa de degradación en el lote 1 sería de 113 mg/g_{proteína} h. La tasa promedio de degradación es de 22.6 mg/g_{proteína} h, a la cual se estabilizó.

En la Tabla 5 se muestran los resultados para el nitrógeno total presente al inicio y final de cada uno de los lotes, en cada uno de los casos se presenta también la diferencia de concentraciones, es decir, el nitrógeno total consumido. Como se puede observar, el consumo más alto de nitrógeno total se observó en el lote 1, lo cual coincide con lo observado en la Figura 4a donde se notó que, además del carbazol, se eliminaron otros compuestos nitrogenados. De ahí en adelante la cantidad de compuestos nitrogenados totales varió ente 12 y 35 ppm.

Tabla 5. Nitrógeno total de los lotes en el reactor de membrana

	Nitrógeno total (ppm)	ΔC (ppm)
Inicial	432.35	
Lote 1	382.33	50.02
Lote 2	403.32	29.03
Lote 7	420.36	11.99
Lote 8	397.01	35.34*

*En este lote se dejó recirculando la fase orgánica por tres días.

También se analizaron los hidrocarburos totales y los azufrados, y se observa en la Figura 6 que los perfiles no cambian durante los experimentos indicándonos que el catalizador es específico en la degradación de los compuestos nitrogenados.

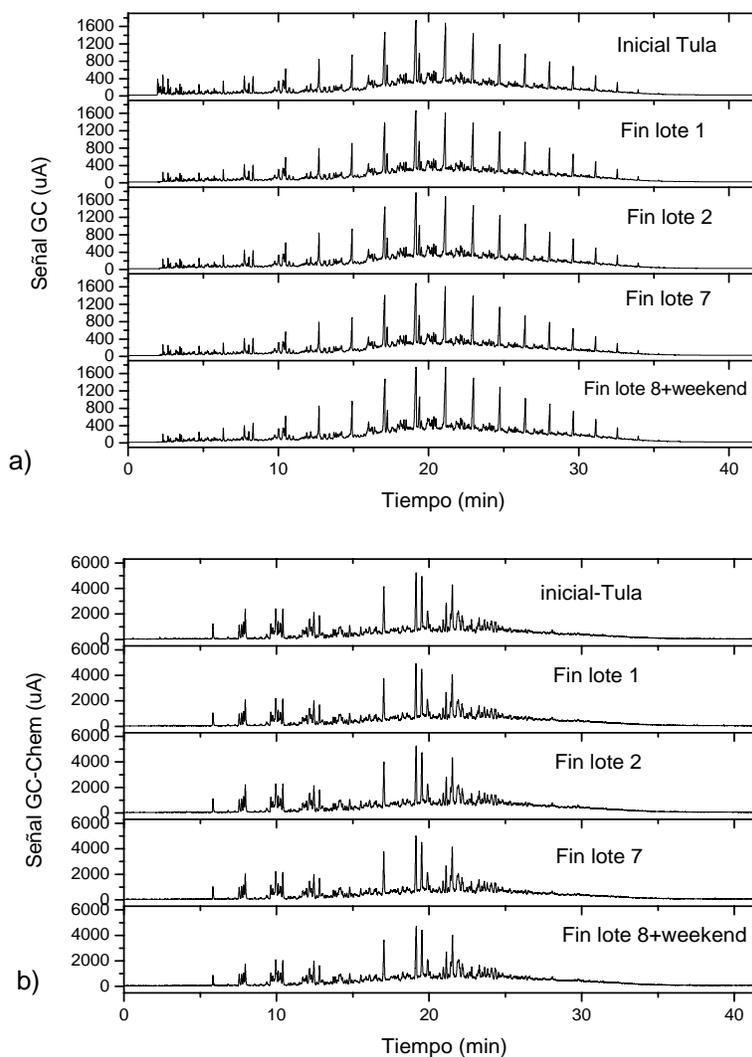


Figura 6. a) Perfil de hidrocarburos totales, b) Perfil de azufrados totales.

Caracterización de las membranas

Antes y durante la operación en continuo del reactor se caracterizaron las dos membranas utilizadas (HDPE y Teflón) y para ello, lo primero que se determinó fue la velocidad de filtración de las membrana con la mezcla libre de microorganismos a una relación fase acuosa:fase orgánica 50:50, esto para observar las variaciones que se obtienen durante el tiempo de operación, las condiciones usadas fue en agitación en sistema abierto y sin aireación, con estas condiciones de operación se obtuvieron flujos de filtración de 12.3 mL/min para la membrana de HDPE y 9.7 mL/min para la de teflón. En este modo de operación no se observó ningún cambio en la estructura de ambas

membranas, tal como deformaciones, y en ambos casos, la salida de fase acuosa fue nula, obteniendo con esto permeabilidad al producto (fase orgánica) y un flujo alto de filtración. Con el flujo que se obtenía con la membrana de HDPE (que fue la primera que se utilizó) no se lograba tener el tiempo de residencia inicial propuesto, ya que nos da un tiempo de residencia de 0.3 horas, siendo un tiempo de residencia muy corto, por esto se recirculó utilizando el colector mencionado anteriormente, para poder tener un mayor tiempo de residencia, en una primera instancia y asegurar la degradación de carbazol. Lo mismo sucedió con la membrana de teflón, por lo tanto se siguió utilizando el mismo colector.

Después de caracterizar la membrana de HDPE se puso en marcha el reactor con el inóculo teniendo un total de 35.5 mg de proteína total, cuantificada por la técnica de azul de Coomassie con una fase acuosa a base de medio mineral. Se le suministró aire por medio de una bomba, con agitación constante. Se llevaron a cabo experimentos en lote, durante los cuales se observó que comenzó a pasar agua por la membrana esto desde los primeros lotes, este flujo de agua alcanzó un valor de 0.9 mL/min, esto se debió a que la membrana no estaba colocada de manera adecuada, por esto permitía el paso del agua, se corrigió el problema colocándola de nuevo, este paso de agua continuó pero disminuyó hasta un flujo de 4.86×10^{-3} mL/min, conforme el flujo de agua disminuía el flujo de filtración también disminuía a lo largo de los experimentos en lote desde un flujo de 12 mL/min, hasta un flujo de 0.9 mL/min en un periodo de 12 días que fue el tiempo que duraron las cinéticas, esta disminución del flujo de filtración posiblemente se deba a la reducción de la porosidad de la membrana, así como también a la formación de la emulsión, ya que posiblemente la fase acuosa ganó afinidad con la membrana por la posible producción de tensoactivos por parte de las bacterias, ya que en cada lote se recuperaban ambas fases (acuosa y orgánica), y lo que se observaba en la fase acuosa recuperada era que parecía un color amarillento que incrementaba su tonalidad conforme los lotes se corrían. Después de este periodo se dejó el reactor con la membrana recirculando gasóleo para promover la impregnación de la misma, esto se dejó por tres días.

Al terminar los lotes, el reactor se empezó a operar en continuo, con fase acuosa compuesta por el medio mineral 5 veces concentrado y la biomasa contenida en un volumen de 100 mL, para la fase orgánica se utilizó en primera instancia lo recuperado de la fase orgánica de la última operación en lote (lote 8), llegando a una relación de 50:50 fase orgánica/fase acuosa, en un volumen total de operación de 200 mL, y se empezó a

operar el sistema después de 2 horas con una alimentación de fase orgánica de 32 mL/día, ya que se estableció comenzar con un tiempo de residencia alto para obtener una alta eficiencia de eliminación del compuesto nitrogenado (carbazol) en la alimentación, posterior a este flujo de alimentación se aumento la cantidad de biomasa como proteína total con el fin de aumentar la alimentación a el doble, esto es, se inoculó la biomasa que se recuperó de la primera etapa de operación en continuo (operación con 32 mL/día), y se le agregó más de los reactores de propagación teniendo un total de proteína de 42.25 mg, el flujo de alimentación, a esta nueva condición, fue de 65 mL/día, en total esta operación con la membrana de HDPE duró un periodo de 94 días, entre los dos flujos trabajados.

El flujo de filtración del producto disminuyó respecto al tiempo, este comenzó en 0.2 mL/min y disminuyó hasta un flujo de 0.035 mL/min, este flujo es muy bajo que aunado al hecho de tener una alimentación continua con un flujo superior al de salida a través de la membrana provocaba que el volumen de fase orgánica se incrementara dentro del reactor. Ante esta disminución en la velocidad de permeación de la membrana se hizo pasar aire en contraflujo a una razón de 0.64 mL/min, mejorando el flujo de filtración que llegó a ser de 0.11 mL/min. En la Figura 7 se muestra el comportamiento del flujo de filtración en la operación en continuo.

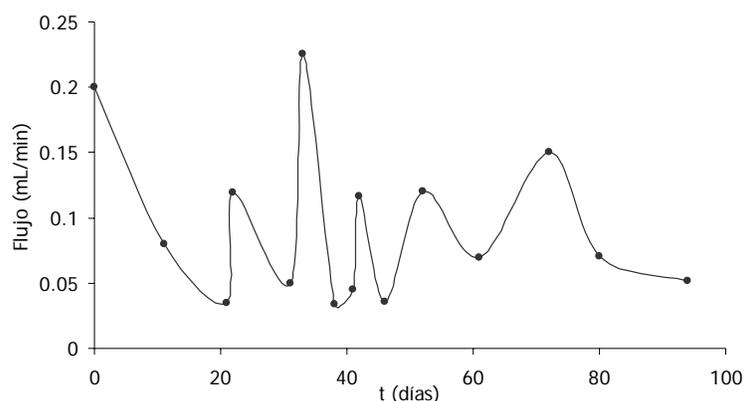


Figura 7. Flujo de filtración con la membrana HDPE con respecto al tiempo

El sistema a lo largo de la operación en continuo siguió presentando los mismos problemas de filtración, y como se puede observar en la Figura 7 cada vez que se pasaba aire en contraflujo el flujo de filtración aumentaba. A lo largo de los 94 días que duró la operación en continuo de este biorreactor con la membrana de HDPE se debió implementar la medida de hacer pasar aire en contraflujo periódicamente. Esta

disminución en el flujo de filtración se debía a que los poros de la membrana se tapaban con la biomasa ya que el diámetro de poro es alto en comparación al tamaño de los microorganismos, y en ocasiones se observaba acumulación de fase acuosa junto con la biomasa en el contenedor ya que esta pasaba por la membrana, debido a la pérdida de especificidad de membrana, no solo permeaba el producto sino también la fase acuosa pasaba y se recuperaba tanto fase orgánica como fase acuosa. La utilización del aire en contraflujo es una operación recomendada para mantener la eficiencia de filtración de las membranas en los diferentes procesos y por lo observado en este tiempo de operación el paso de aire en contraflujo se tiene que realizar periódicamente, por lo menos 1 vez cada semana durante 15 minutos para lograr un flux adecuado a las cargas alimentadas.

Después de los 94 días de operación en continuo la membrana presentaba problemas de filtración, y aunque se hacía pasar aire en contraflujo y se dejaba recirculando fase orgánica para que se impregnara la membrana este flujo no aumentaba más allá de 0.05 mL/día, para la alimentación que se tenía de 65 mL/ día el flujo de filtración era suficiente, pero deseábamos operar el reactor con tiempos de residencia más bajos, específicamente incrementaríamos el flujo de alimentación a 90 mL/día, pero esto requería de por lo menos un flujo de filtración de 0.06 mL/min, por tal motivo se decidió utilizar otra membrana que por sus características hidrofóbicas y diámetro de poro menor (20 μm), permitiera que la permeación de la fase orgánica fuera mayor.

La membrana de teflón permitió operar el sistema con flujos de alimentación más altos. Se operó el reactor utilizando biomasa nueva, y se decidió, empezar de nuevo con un flujo de alimentación bajo (32 mL/ día), y se probaron diferentes flujos de alimentación: 32, 65, 90 y 115 mL/día, el flujo de filtración inicial fue de 2.27 mL/min, este flujo fue disminuyendo y a los diez días de operación el flujo de filtración bajo a 0.12 mL/min, este flujo fue bajo respecto al inicial, pero era suficiente para los flujos de alimentación que se estaban manejando, este flujo se observó que bajó a los 13 días, por lo tanto se decidió pasar aire en contraflujo para limpiar la membrana y aumentar el flujo de filtración, este flujo aumentó, pero aún seguía siendo bajo respecto al inicial, por esto se hizo pasar de nuevo aire en contraflujo, y se observó que el flujo de filtración aumentaba, si la limpieza se realizaba periódicamente, la operación se puede observar en la Figura 8. Esta disminución del flujo de filtración se puede deber al tipo de flujo que es transversal, esto ocasiona que la membrana se sature de sólidos (biomasa), impidiendo que la permeación se lleve a cabo debido a la obstrucción de la membrana al paso del filtrado, este es un problema que se ha observado en los estudios que se han hecho con membranas, por

esto mismo se ha utilizado el flujo tangencial donde este problema se ve disminuido, impidiendo que se obstruya la membrana y se tenga en operación la membrana un tiempo mayor.(Tejeda A., 1995)

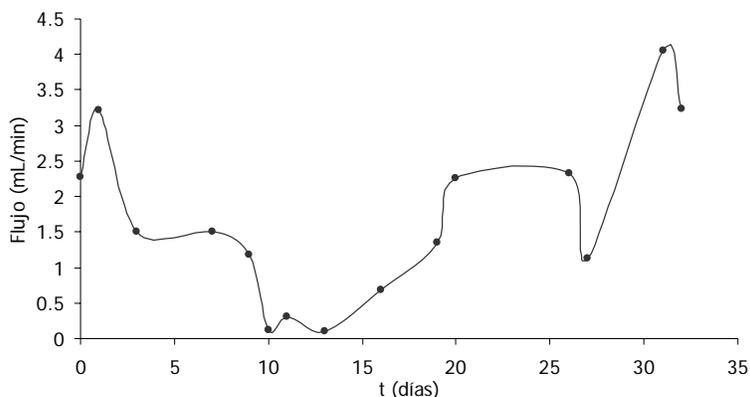


Figura 8. Flujo de filtración de la membrana de teflón con respecto al tiempo

Operación en continuo del reactor de membrana.

Operación en continuo con la membrana de HDPE

Después de realizar los experimentos en lote, con 35.5 mg de proteína total inicial inoculada presente, en el reactor con la membrana de HDPE se procedió a la operación en continuo, para este proceso, se utilizó la misma biomasa utilizada en los experimentos en lote y la misma relación de fase orgánica:fase acuosa de 50:50. La fase orgánica estuvo constituida, al inicio de la operación en continuo, por la mezcla resultante del tratamiento efectuado en el lote 8. Después de aproximadamente 2 horas de término de dicho lote se empezó a alimentar con la mezcla de gasóleo con un flujo de 1.3 mL/h y la fase acuosa utilizada consistió de medio mineral cinco veces concentrado (5x), esta composición de medio mineral en fase acuosa tuvo como objetivo el evitar una reducción en la actividad debida a una limitación por nutrientes, sin embargo se tenía en mente que eventualmente debería existir un reemplazo de la fase acuosa presente estableciéndose que debería cambiarse cada 15 días (ver resultados de la operación del reactor de biomasa inmovilizada). Como se mencionó anteriormente, el aire se suministró continuamente a una razón de 12.41 mL/min y el flujo de salida del producto fue el mismo que el de alimentación, recuperándose aproximadamente 32 mL de fase orgánica por día. Se tomaron muestras periódicas, cada tercer día, así también se recuperó el efluente cada tercer día .

En la Figura 9 se presenta la gráfica de la evolución de la carga y capacidad de eliminación de este sistema.

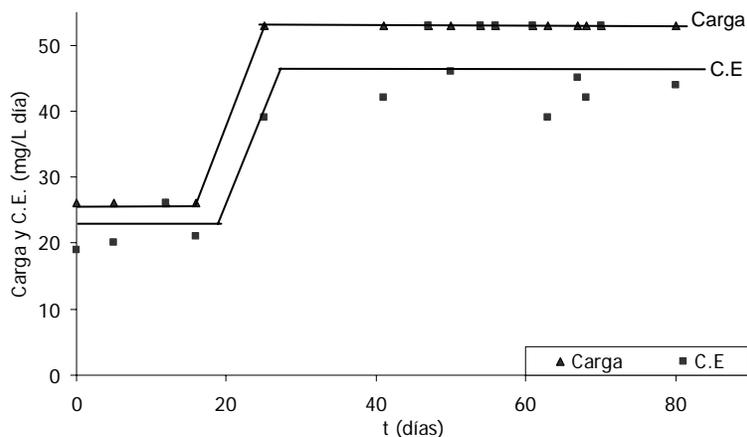


Figura 9. Evolución de la carga y capacidad de eliminación para carbazol en el biorreactor con membrana de HDPE con una alimentación de gasóleo de 32 y 65 mL/día

Durante los primeros 20 días se alimentó gasóleo a una razón de 32 mL/día equivalente a una carga de carbazol de 26 mg/L día y se obtuvieron capacidades de eliminación entre 19 y 26 mg/L día correspondiendo a eficiencias de eliminación entre 70 y 100% (ver Figura 10).

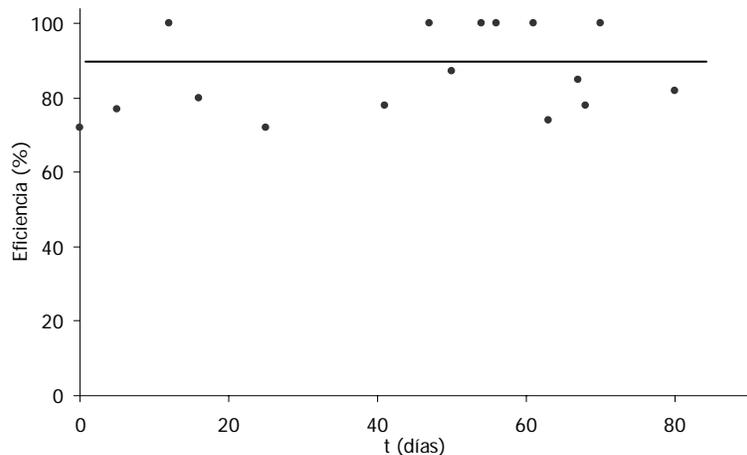


Figura 10. Eficiencia de eliminación de carbazol contra tiempo del biorreactor con membrana de HDPE con una alimentación de 32 y 65 mL/día

Posteriormente se aumentó el flujo de gasóleo a tratar a 65 mL/día incrementando el contenido de proteína total a 42.25 mg. Este nuevo flujo de alimentación se mantuvo

por 60 días. La carga de carbazol alimentado bajo estas nuevas condiciones fue de 53 mg/L día, las capacidades de eliminación oscilaron entre 39 a 53 mg/L día obteniéndose nuevamente eficiencia de eliminación entre 70 y 100%. Durante los 80 días, que se operó el sistema con esta membrana, se observó que no hubo decaimiento en la actividad del sistema, esto se atribuye al hecho de que se mantuvieron las condiciones adecuadas para la conservación de la actividad y desarrollo de la biomasa como temperatura, la aireación y la relación 50:50 de la fase orgánica/fase acuosa incorporando medio fresco cada 15 días. Debido a las altas eficiencias de eliminación observadas se hicieron análisis del nitrógeno total, los cuales se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6. Eficiencia y capacidad de eliminación de la operación en continuo a 32 mL/ min

Tiempo (días)	Concentración ppm		Flujo gasóleo mL/día	Carga g/L día gasóleo total	Carga mg N/L día nitrogenados	Capacidad de eliminación mg N/L día	Eficiencia de eliminación de nitrógeno total %
	Entrada	Salida					
0	445	394.44	32	144	71.2	8.09	11.36
4	445	386.07	32	144	71.2	9.43	13.24
7	445	393.08	32	144	71.2	8.31	11.67
11	445	400.32	32	144	71.2	7.15	10.04
14	445	398.52	32	144	71.2	7.44	10.44

Estos resultados corresponden a las condiciones de operación con el flujo más bajo, es decir, 32 mL/día y corresponden a los primeros 14 días de operación del sistema. Como se puede observar, bajo estas condiciones, la carga de nitrógeno total alimentado fue de 71.2 mg N/L día con capacidades de eliminación que variaron entre 7.15 y 9.43 mg N/L día con una eficiencia promedio de $11.35\% \pm 1.25\%$. Vale la pena mencionar que, para este tipo de análisis la eficiencia de eliminación no podría haber sido 100% ya que la cepa degrada solo el carbazol y en algunos casos, como se observó anteriormente, algunos carbazoles sustituidos y estos constituyen solo una fracción de los compuestos nitrogenados totales presentes en el gasóleo.

Debido a los flujos de filtración de la membrana (HDPE), ésta no permitió incrementar el flujo de gasóleo a tratar, sin que hubiera problemas de acumulación de la fase orgánica en el biorreactor, y por lo tanto no se pudo probar la respuesta del sistema ante tiempos de residencia más cortos a los ensayos que fueron 6.25 y 3 días. Por lo tanto se decidió probar la membrana de teflón.

Operación en continuo del biorreactor con la membrana de Teflón

Posteriormente se trabajó el sistema de reacción con la membrana de teflón, utilizando biomasa nueva (18.04 mg), y se operaron 4 diferentes flujos de alimentación: 32, 65, 90 y 115 mL/día, con un volumen de operación de 200 mL, con una relación fase orgánica:fase acuosa 50:50, la fase acuosa era el medio mineral 5 veces concentrado, se alimentó aire en forma continua a una razón de 12.41 mL/min, con agitación a una temperatura de 37 °C antes de operar en continuo se realizó una cinética (Figura 11) que duró 24 horas tomando muestras cada dos horas, para determinar la tasa de degradación de carbazol, la cual fue de 110.9 mg carbazol/L/h, se observa que prácticamente a las 6 horas ya había removido todo el carbazol presente en la fase orgánica, esto nos indica que la biomasa esta activa y podía utilizarse para la operación continua del biorreactor con esta nueva membrana.

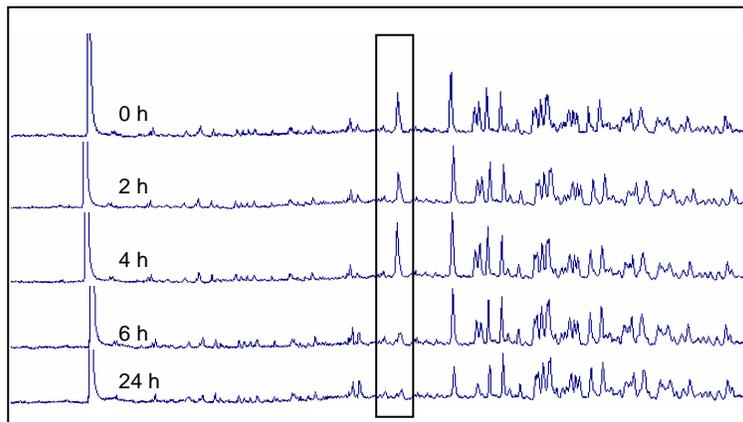


Figura 11. Perfil de compuestos nitrogenados durante la cinética, se enmarca el área del carbazol

Una vez que el experimento por lote concluyó, es decir, 24 horas después de la inoculación de la biomasa en el reactor, se comenzó a alimentar de forma continua al gasóleo al flujo más bajo de 32 mL/día. En este caso, al igual que el anterior, se tomaron muestras periódicas para realizar los análisis.

En la Tabla 7 se muestran las condiciones experimentales que se fijaron para la realización de los experimentos de variación de carga, por incremento en los flujos de gasóleo alimentado, así como los resultados en cuanto a la capacidad de eliminación de carbazol en el biorreactor .

Tabla 7. Carga de eliminación, eficiencia de eliminación de carbazol y tiempo de residencia a diferentes flujos en el biorreactor con membrana de teflón

Flujo de gasóleo (mL/día)	Carga de carbazol (mg/L día)	Capacidad de Eliminación de carbazol (mg/L día)	Eficiencia de Eliminación de carbazol (%)	Tiempo de Residencia de gasóleo (días)
32	26	25 ± 2	96	6.25
65	53	35 ± 3	66	3.08
90	74	74 ± 0	100	2.22
115	96	96 ± 0	100	1.74

Como se puede observar las cargas de carbazol ensayadas correspondieron a valores entre 26 y 96 mg/L día con tiempos de residencia entre 6.25 y 1.74 días, respectivamente, obteniéndose eficiencias de eliminación, en la mayoría de los casos, cercanas al 100%. Vale la pena mencionar que en el experimento realizado a 65 mL/día se obtuvo una eficiencia de 66%, esto probablemente se debió a que este experimento se realizó después de un período donde se interrumpió la operación del reactor y la biomasa de mantuvo en refrigeración. Esto pudo afectar la actividad de la biomasa, necesitándose un tiempo de reactivación mayor. Sin embargo, como puede observarse en la misma Tabla 7, el sistema se recuperó ya que para el siguiente punto probado a un flujo de 90 mL/día se obtuvo una eficiencia de eliminación del 100%.

En la Figura 12 se presenta de forma gráfica la capacidad de eliminación contra la carga de alimentación de carbazol para el biorreactor con membrana de teflón.

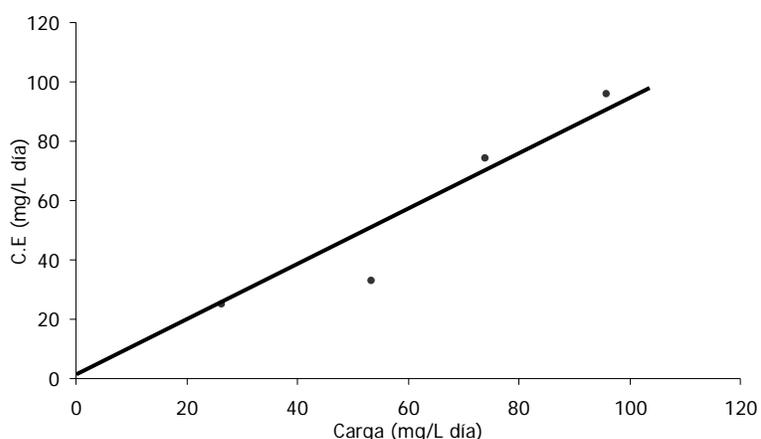


Figura 12. Carga contra capacidad de eliminación de carbazol en el biorreactor de membrana de teflón.

Como se puede observar conforme la carga se incrementó también lo hizo la capacidad de eliminación, presentándose una relación lineal correspondiente a eficiencias de eliminación del 100% (ver Figura 13). Sin embargo, bajo el rango de cargas ensayadas el sistema no alcanzó su máxima capacidad de eliminación, por lo que ante estos resultados tan buenos era deseable el haber ensayado cargas más altas incrementando el flujo de alimentación al sistema, pero nuevamente la membrana que se utilizó en la separación de las fases, no permitió que se aumentara la carga más allá de 96 mg/L día sin que hubiera problemas de acumulación de la fase orgánica en el biorreactor. A pesar de todo lo anterior esta membrana nos permitió trabajar a flujos mayores que la de HDPE.

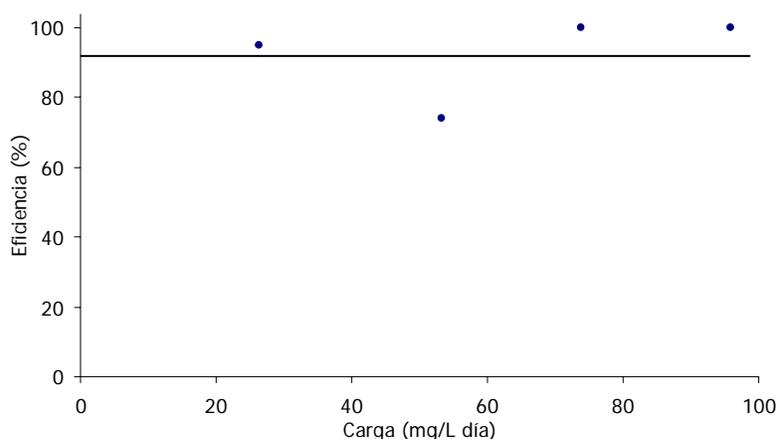


Figura 13. Carga contra eficiencia de eliminación

Estos experimentos se llevaron a cabo en un período de 38 días en los cuales tanto la capacidad de eliminación del carbazol, así como la eficiencia en la eliminación de carbazol se mantuvo constante esto se pudo llevar a cabo manteniendo las condiciones de operación constantes; temperatura, agitación, aireación, así como el mantenimiento de la relación 50:50 de la fase orgánica:fase acuosa adicionando medio fresco cada 15 días.

En la operación en continuo del reactor de membrana de teflón se observó, a partir de los cromatogramas obtenidos (ver Figura 14), que además de eliminar carbazol del gasóleo también se degradaban otros carbazoles, mono y dimetilados, esto pudo deberse a una adaptación de los sistemas enzimáticos de la cepa inoculada o bien a la presencia de otros microorganismos que fueran capaces de eliminarlos. Para descartar la posibilidad de contaminación con otros microorganismos se hicieron siembras en cajas petri con agar nutritivo y se observó un solo tipo de microorganismos que coincidió con la morfología de la cepa inoculada inicialmente, por lo que la posibilidad de contaminación se desechó.

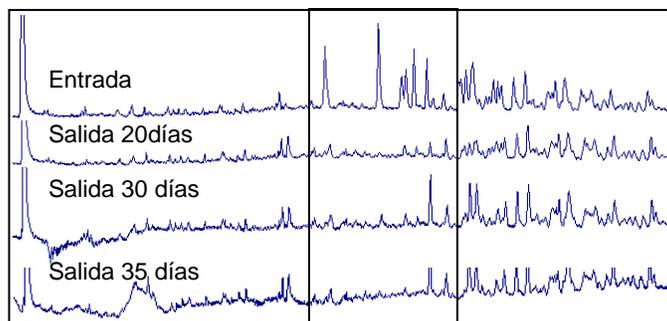


Figura 14. Perfil de compuestos nitrogenados. Se enmarca la zona donde se observa la disminución de otros compuestos además del carbazol (primer pico de izquierda a derecha)

En específico en la Figura 14 se compara un cromatograma que se obtiene con el gasóleo sin tratar, y lo que se observó en muestras analizadas a diferentes tiempos de operación, después de ser tratadas con los microorganismos, se puede apreciar la disminución de otros picos además del carbazol, con esto se da la base para posteriores estudios donde no solo se estudie la remoción del carbazol en el gasóleo, sino otros compuestos nitrogenados. En este caso por falta de estándares no se pudo hacer un análisis cuantitativo de los otros compuestos eliminados.

Este resultado es bastante promisorio ya que el hecho de que se degraden más compuestos nitrogenados adicionales al carbazol hace que disminuya la cantidad de nitrógeno total, y por tanto potencialmente disminuya el efecto negativo que podrían tener estos compuestos en el tratamiento posterior en la unidad de hidrodesulfuración aumentando su eficiencia.

9.2 Reactor con biomasa inmovilizada

Operación en lote del reactor con biomasa inmovilizada

El sistema utilizando biomasa inmovilizada (11.9 mg como proteína total) se operó en continuo después del experimento en lote donde se determinó una tasa de degradación de $162 \text{ mg/g}_{\text{proteína}} \text{ h}$, este valor obtenido en el reactor inmovilizado es comparable con el valor obtenido en el segundo lote en el biorreactor con membrana de HDPE y a la actividad inicial de la biomasa inoculada en el biorreactor de membrana de teflón. Sin embargo este valor es mayor que el que se obtuvo globalmente después de la realización de 8 lotes en las cinéticas realizadas en el biorreactor de membrana donde, como se pudo observar, la tasa de degradación se estabilizó en un valor de aproximadamente $22.6 \text{ mg/g}_{\text{proteína}} \text{ h}$, sin embargo hay que tomar en cuenta diversos

factores como el hecho, de que en el biorreactor empacado solo se realizó un experimento en lote y que la biomasa se encontraba sumergida en un medio acuoso donde tiene mejores condiciones para su crecimiento, etc. A pesar de la ventaja aparente de no estar en contacto directo los microorganismos y la fase orgánica es posible que haya problemas de disponibilidad de sustrato orgánico.

Operación en continuo del reactor empacado.

Tanto en la operación en continuo como en lote se llevó a cabo con un volumen de operación de 370 mL, y una relación 50:50 fase acuosa:fase orgánica, y medio mineral cinco veces concentrado, temperatura de 37 °C y un flujo de aireación de 1.4 L/h. La operación en continuo se inició con un flujo de alimentación de 95 mL/día y una carga de carbazol de 42 mg/L día, estas condiciones de operación se mantuvieron durante un período de aproximadamente 130 días, sin realizar adiciones de medio mineral. Como se puede observar en la Figura 15 la capacidad de eliminación del sistema fue lentamente disminuyendo desde 35 mg/L día a alrededor de 10 mg/L día, pasando la eficiencia de eliminación (ver Figura 16) de 87% a alrededor de 22%.

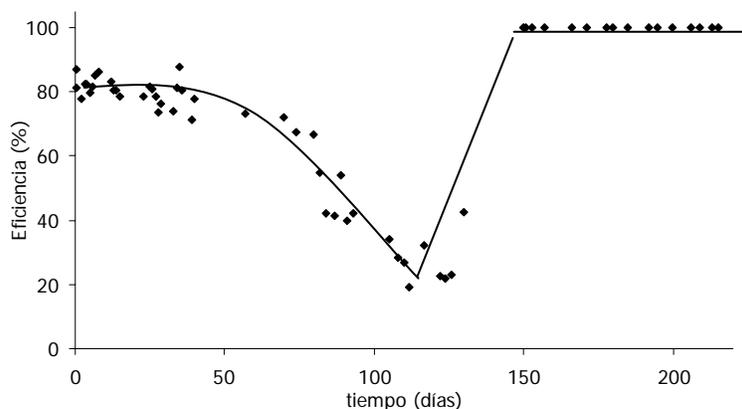


Figura 15. Carga y capacidad de eliminación de carbazol del reactor con biomasa inmovilizada

Durante esta etapa de decaimiento en la capacidad de eliminación se observó que la relación 50:50 de la fase acuosa:fase orgánica en el período de 130 días se había alterado y para ese tiempo la relación era 7:93 esta disminución se debió a pérdida de volumen de la fase acuosa bajando a un valor de 5 % del volumen líquido total, para una relación tan baja de agua como ésta, los reportes indican que no debería haber actividad, únicamente se tiene el antecedente del estudio realizado por un grupo de investigación donde se indica que para un sistema bifásico agua-hexadecano, a relaciones del 10 al 70 % V/V de la fase acuosa, la degradación de carbazol en operación en lote, (Castorena

et al., 2004) que baja la actividad del 100% a un 20%. Con la relación de agua tan baja observada en el sistema de reacción (reactor inmovilizado), éste dato queda como antecedente para posteriores estudios donde se varíen las relaciones de fase orgánica:fase acuosa para una operación en continuo. Por otra parte, la deficiencia en los nutrientes que le aportaba el medio mineral a los microorganismos además del alto flujo de alimentación fueron otras razones posibles para que el sistema bajara su actividad, haciendo necesario que se tomaran medidas como disminuir el flujo de alimentación y cambiar o restituir el medio mineral por lo menos cada 15 días. Vale la pena mencionar que los experimentos en este reactor fueron anteriores a los biorreactores de membrana, por lo que estos resultados marcaron la pauta en cuanto al cambio de medio mineral adoptados para todos los casos.

Una vez que se realizó el cambio de la fase acuosa con medio mineral 5x reestableciéndose la relación 50:50 de las fases acuosa:orgánica, la eficiencia de eliminación se incrementó hasta 100 % (ver Figura 16) sin embargo cabe resaltar que la carga de alimentación se había disminuido a un valor de 17.7 mg/L día ya que el flujo de alimentación se redujo a 40 mg/L, para alcanzar este flujo la bomba de alimentación tuvo que conectarse a un temporizador, al igual que en la operación con el reactor de membrana.

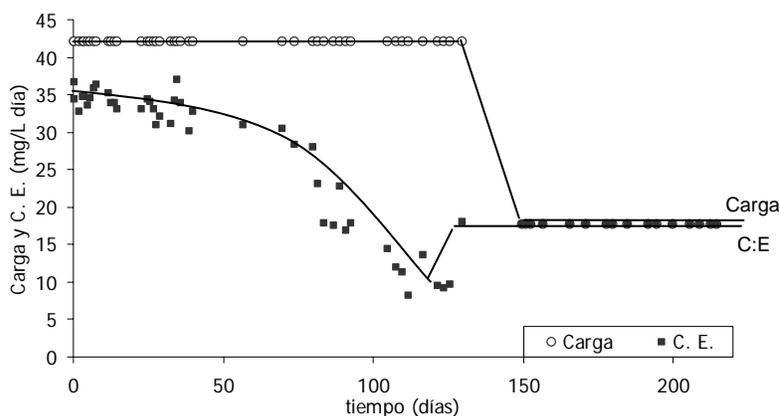


Figura 16. Eficiencia de eliminación de carbazol en el reactor con biomasa inmovilizada

El sistema operó alrededor de 80 días a esta nueva condición manteniendo valores constantes tanto en la capacidad de eliminación como en la eficiencia de eliminación, y removiendo el 100% del carbazol en la corriente.

La biomasa inicial inoculada al sistema fue de 11.9 mg de proteína y se observó que se había incrementado 4 veces, es decir alrededor de 49.46 mg de proteína después

de 215 de operación. Ante esta situación y por los buenos resultados en cuanto a la eficiencia de eliminación se decidió incrementar la cantidad de biomasa pasando a un contenido de biomasa total de 71.58 mg de proteína y realizar los experimentos de carga contra capacidad de eliminación para tratar de determinar la máxima capacidad de eliminación observada bajo estas condiciones.

En la Tabla 8 se presenta el rango de cargas y los tiempos de residencia ensayados así como las capacidades y eficiencia de eliminación obtenidas. Como se puede observar después de esta segunda inoculación el sistema presentó una capacidad de eliminación y una eficiencia de eliminación del 17.68 mg/L día y 100%, respectivamente, esto para un flujo de alimentación de 40 mL/día; posteriormente se aumentó el flujo de alimentación a 80 mL/día, bajo esta condición el sistema presentó una eficiencia y una capacidad de eliminación promedio de 100 % y 35.6 mg/L día, respectivamente. Dados estos resultados favorables se incrementó nuevamente el flujo de alimentación a 108 mL/día con estas condiciones, la capacidad de eliminación y la eficiencia fueron de 40.49 mg/L día y 84.82 %, respectivamente. Si bien el sistema ya había bajado su eficiencia de eliminación se decidió aumentar una vez más la carga de carbazol alimentada al sistema incrementando el flujo de alimentación a 125 mL/día, con esta alimentación la eficiencia y la capacidad de eliminación fueron de 59.92% y 33.10 mg/L día, respectivamente.

Tabla 8. Operación del reactor inmovilizado a diferentes flujos de alimentación

Flujo mL/día	Carga mg/L día	Capacidad de Eliminación mg/L día	Eficiencia de Eliminación %	Tiempo de Residencia días
40	17.68	17.68	100.00	9.25
80	35.36	35.36	100.00	4.625
108	47.74	40.49	84.82	3.426
125	55.25	33.10	59.92	2.96

En la Figura 17 se observa la representación gráfica de la carga contra la capacidad de eliminación presentados anteriormente.

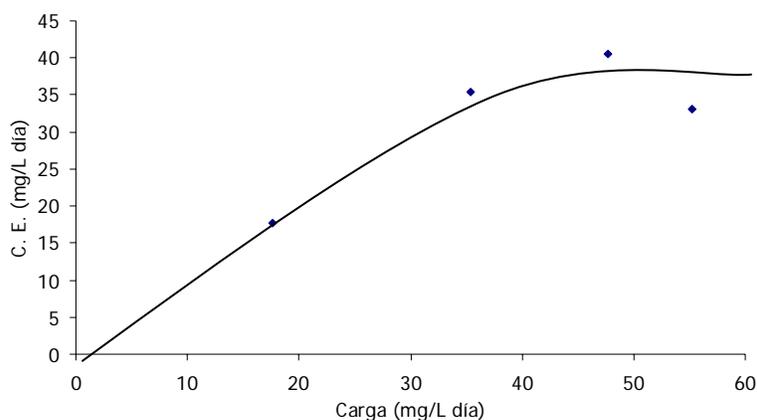


Figura 17. Capacidad de eliminación de carbazol para diferentes cargas manejadas en el biorreactor con biomasa inmovilizada

Como se puede observar, existe una zona entre 0 y 35 mg/L día donde la capacidad de eliminación se incrementa conforme lo hace la carga del carbazol alimentado, en una relación lineal con eficiencias de eliminación de 100% (ver Figura 18) posteriormente la capacidad de eliminación se estabiliza a un valor de alrededor de 36.5 mg/L día que es la capacidad máxima del sistema, en esta zona aunque se incremente la carga la capacidad de eliminación ya no se incrementa decreciendo por tanto la eficiencia de eliminación observada en la Figura 18. De aquí se deduce que para este sistema experimental debe tener más biomasa si se quiere tratar tiempos de residencia más cortos con eficiencias cercanas al 100% o variar las condiciones recirculación con el fin de fomentar el contacto entre los microorganismos y la fase orgánica, pero teniendo cuidado de no formar emulsiones que sean difíciles de separar y que hasta el momento con las condiciones ensayadas no fue necesario realizar.

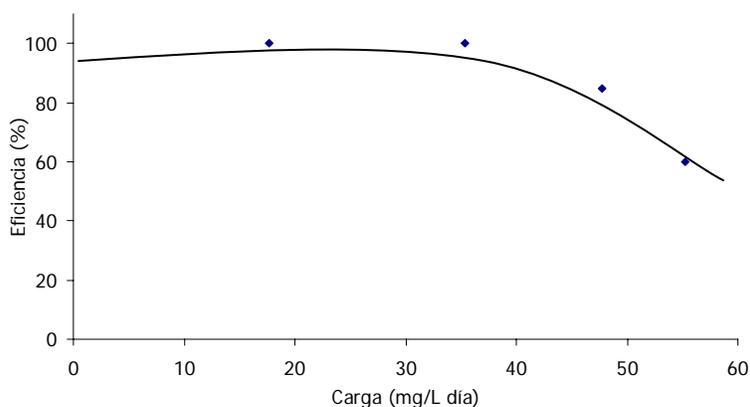


Figura 18. Eficiencia de eliminación de carbazol a diferentes cargas en el reactor con biomasa inmovilizada

Los resultados a lo largo de toda la experimentación realizada indican que el microorganismo puede tener una actividad constante si se trabaja en condiciones adecuadas (temperatura, agitación, aireación, la relación de fase orgánica:fase acuosa 50:50 y el suministro periódico de nutrientes). Por el tiempo de operación tan largo (8 meses del reactor inmovilizado y 5 meses del reactor de membrana), que no ha sido reportado anteriormente en literatura, daría la pauta para proponer trabajar volúmenes más grandes de reactores, y como se observó en el primer flujo de operación de 95 mL/día donde la cantidad de agua en el sistema fue poca y aun así se obtuvo una remoción de nitrogenados, esto nos muestra una posibilidad de experimentar con relaciones menores de agua en volúmenes mayores al utilizado. Ya que lo que se quiere también es reducir la cantidad de agua empleada en los procesos de la industria petrolera, que para venta de los destilados del petróleo se requiere que estén libres de agua.

Ambos sistemas de reacción; reactor de membrana y reactor inmovilizado, funcionaron bien por periodos largos de operación. Cada sistema utilizado tiene sus ventajas y desventajas, pero dentro de sus características se puede resaltar el hecho que en el reactor de membrana al tener un sistema en mezcla total el catalizador es capaz de remover otro tipo de compuestos nitrogenados no solo el carbazol, esto por su directa relación con la corriente a tratar, cosa que no ocurrió en el reactor inmovilizado, posiblemente en este sistema se hubiera presentado este fenómeno si el tiempo de residencia dentro del reactor hubiera sido mayor. Uno de los inconvenientes del reactor de membrana son los problemas de filtración que en este caso limitó la posibilidad de poder operar con tiempos de residencia de un día o menor, comparado con el reactor inmovilizado donde por su configuración en la cual se obtenía el procesado por desborde, no existía el problema de dar mantenimiento al reactor constantemente para obtener el efluente tratado. En la Tabla 9 se comparan los dos sistemas utilizados.

Tabla 9. Comparación de los sistemas utilizados

	Reactor de membrana	Reactor inmovilizado
Limpieza constante	Si	No
Posibilidad de tratar corrientes altas	Si	No
Agitación	Si	No
Recirculación	Si	Si
Volumen del reactor	Menor	Mayor
Eficiencia de eliminación	70-80%	60-100%
Requerimientos especiales	Meter aire en contraflujo	No

9.3 Sistema de Propagación

En cuanto al sistema de propagación de los tres matraces que se pusieron, dos con la fuente alterna de carbono (glucosa) y uno con carbazol para comparar, de los dos matraces de procultivo con glucosa después de tres días se cuantificó la proteína, y estos resultados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 10. Proteína utilizando glucosa

Proteína (mg/L)	Matraz 1	Matraz 2
Inicial	9.23	16.64
Final	47.25	77.01

Después de los tres días se cambió el medio, se lavaron las células y se agregó 1mL de la solución de carbazol a ambos matraces, y en el periodo que se dejaron propagando que fue de 5 semanas al matraz 1 se le agregó 14.5 mL de la solución de carbazol, al matraz 2, 15 mL, y al matraz que se propagó únicamente con carbazol desde un principio para comparar se le adicionó un total de 32.5 mL de dicha solución, después del tiempo de propagación se cuantificó la proteína en los tres matraces, los resultados se muestran en la Tabla 11. La diferencia en los volúmenes agregados a cada matraz se debe al tiempo en que tardó en reactivarse la bacteria después de utilizar otra fuente de carbono, este tiempo fue de aproximadamente tres semanas y media, después de ese tiempo se comenzó a agregar la solución de carbazol.

Tabla 11. Proteína total después de 5 semanas de propagación

Matraz	Proteína (mg/L)		
	Inicial	Final	Total
1	9.23	55.40	46.17
2	16.64	101.08	84.44
3	56.27	155.53	99.25

Lo que se puede observar en la Tabla 11, es que aunque da la impresión de que se obtiene más biomasa utilizando solo carbazol, esto no es real, ya que se tiene que tomar en cuenta la cantidad de proteína inicial, en el matraz 3 esta cantidad es mayor que en los otros dos y haciendo un análisis podemos ver que en el matraz 1 y 2 la biomasa se incrementa 5 veces, no así para el matraz 3, que solo se incremento 1.8 veces la cantidad inoculada. Con esto se puede observar que utilizando la glucosa como fuente alterna de carbono se obtiene una mayor cantidad de biomasa comparando con lo que se obtiene utilizando únicamente carbazol, pero el tiempo que tarda en reactivarse la cepa es demasiado largo además de los cuidados que se tiene que tener al utilizar glucosa, en cuanto a que se puede contaminar el medio fácilmente con otros microorganismos, podría considerarse como un inconveniente cuando no se cuenta con espacios estériles. Comparando todo lo anterior se puede decir que el mejor sistema para propagar esta bacteria es utilizando glucosa como fuente carbono en un principio, aunque claro se podría utilizar otra fuente de carbono alterna diferente de la glucosa, para ver si es posible que se tenga un mayor incremento en la biomasa comparado con la que se tiene utilizando el carbazol, y que el tiempo que tarde en reactivarse sea menor que cuando se utiliza glucosa.

10. Conclusiones

Las investigaciones para desarrollar tecnologías que involucran procesos biológicos, como complemento para los procesos de refinación actuales, teniendo como objetivo la producción de combustibles limpios, han demostrado que el uso de microorganismos con capacidad de remoción selectiva de los compuestos heteroaromáticos, como los nitrogenados, podrían ser viables para cumplir dicho objetivo. Una de las principales ventajas reportadas es la reducción de los riesgos de operación y el bajo costo. Sin embargo hasta ahora este tipo de bioprocesos requieren de grandes cantidades de agua (50-50% en volumen, respecto a las corrientes de destilado tratadas) para llevar a cabo la transformación deseada, lo cual limita la aplicación de éstos a escala industrial además los tiempos de residencia son altos con respecto a los requerimientos del procesamiento del petróleo.

En este trabajo se estudiaron dos configuraciones de biorreactores, uno con membrana y otro con biomasa inmovilizada, para contribuir a la generación de conocimiento acerca de la operación en continuo y desempeño de los sistemas biológicos para analizar su posible incorporación en la industria del petróleo. Estas configuraciones fueron seleccionadas con el fin de minimizar el efecto negativo que tiene la presencia del agua en la corriente orgánica. En el caso del biorreactor de membrana a través de la separación de las fases en continuo por el uso de dos membranas hidrofóbicas y en el caso del biorreactor con biomasa inmovilizada tratando de evitar la formación de emulsiones que necesitarían posteriormente una separación.

Los resultados obtenidos mostraron varias cosas relevantes:

Con respecto a la biomasa podemos concluir que:

1. La biomasa presenta altas tasas de degradación de alrededor de 100 mg/L día independiente del sistema de propagación.
2. La biomasa permaneció activa por períodos de operación mayores a 215 días, siempre y cuando se realice un suministro continuo de aire y el recambio periódico de medio mineral, esto aplica para cualquiera de los sistemas en que se encuentre operando.
3. Se observó una adaptación de la población para la degradación de carbazoles sustituidos, característica que la biomasa no tenía al inicio de los experimentos

4. El mejor sistema de propagación fue con la utilización de glucosa como sustrato, incrementándose 5 veces la biomasa en comparación con el incremento de 1.8 veces la biomasa utilizando carbazol, sin embargo se puede probar otra fuente alterna de carbono para mejorar la propagación y disminuir el tiempo de reactivación.

Con respecto al biorreactor con membrana:

1. La configuración del reactor con la membrana fue eficiente ya que se logró recuperar el producto libre de agua.
2. El reactor tuvo tiempo de operación superior a 120 días con eficiencias de eliminación del 100% y una capacidad de eliminación de 96 mg/L día.
3. Las membranas pueden operar en continuo manteniendo los flujos de filtración a través del paso de aire a contraflujo. Pero esta es una medida que debe hacerse rutinariamente.
4. La operación de los biorreactores con membrana estuvo limitada por la velocidad de filtración a través de la misma, no se pudieron ensayar flujos mayores con el fin de reducir los tiempos de residencia, condición deseable en el procesamiento en la industrial del petróleo.

Con relación al biorreactor de lecho empacado con biomasa inmovilizada se puede concluir:

1. El material de empaque seleccionado nylon, presentó buena retención de biomasa y resistencia a la fase orgánica
2. La configuración del reactor fue adecuada presentando facilidad de operación, bajo mantenimiento y recuperación de producto sin agua.
3. La máxima capacidad de eliminación obtenida en este sistema fue de alrededor de 36.5 mg/L día con eficiencias del 100%
4. El sistema operó por un tiempo mayor de 240 días manteniendo la actividad microbiana

11. Recomendaciones

Uno de los problemas que presenta el reactor de membrana es la filtración ya que se debe pasar aire en contraflujo a periodos constantes de tiempo (cada semana) para limpiarla, esta limpieza constante de la membrana del reactor se puede mejorar realizando otra configuración de reactor, donde la membrana este sumergida en la fase orgánica, y se filtre por una diferencia de presión y para que la separación de la mezcla sea más fácil, se reduciría la agitación para que la mezcla no sea total y las fases se mantengan separadas, y por la diferencia de densidades de la fase acuosa y la fase orgánica, se encuentren bien definidas cada una y poder utilizar la membrana sin que este en contacto con la fase acuosa, promoviendo el paso a el producto, este sistema se presenta en la Figura 19.

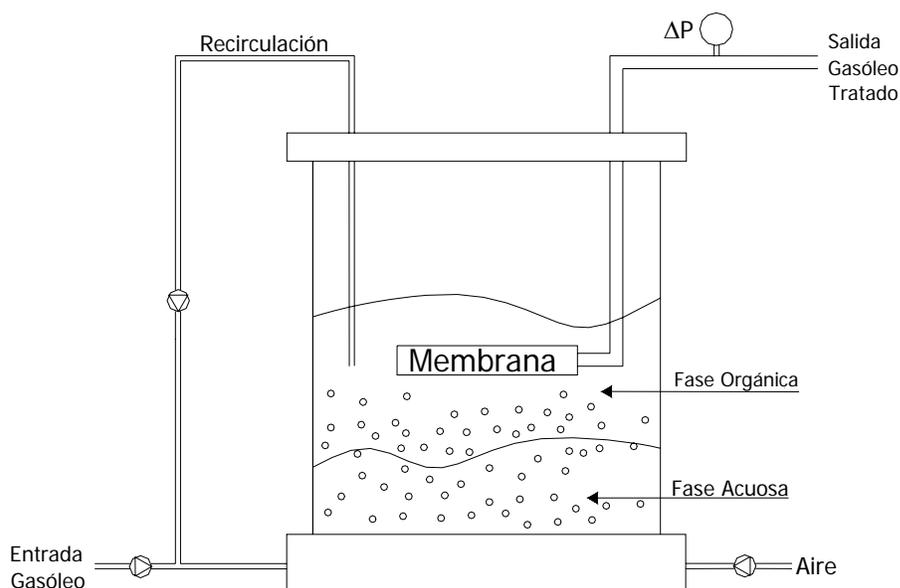


Figura 19. Sistema de reacción propuesto

Otro aspecto importante en futuros estudios es probar las diferentes relaciones de fase acuosa/fase orgánica a las cuales el microorganismo puede tener una buena eficiencia de eliminación, ya que como se vio a una relación baja de agua 7:93 fase acuosa/fase orgánica el microorganismo era aún capaz de remover nitrógeno de la corriente a tratar, esto también sería importante por las especificaciones de venta de los destilados del petróleo que requieren estén libres de agua.

En este trabajo solo se determinó la eficiencia de eliminación así como la capacidad de eliminación del carbazol que es uno de los compuestos nitrogenados

presentes en el gasóleo, pero también se observó que el microorganismo es capaz de remover otros compuestos nitrogenados además del carbazol, esto es muy interesante ya que por las leyes ambientales el contenido de nitrógeno en los combustibles debe ser muy bajo (50 ppm. Song, 2003), por lo tanto el observar cualitativamente la degradación de otros compuestos nitrogenados da la pauta para poder hacer estudios de forma analítica y cuantificar que porcentaje de lo que entra de los otros compuestos nitrogenados el microorganismo es capaz de eliminar aumentando la eficiencia en la eliminación total de los compuestos nitrogenados.

12. Referencias

Athawale, V., N. Manjrekar, (2000) "Enzymatic synthesis of the acrylic esters: a comparative study". *J. Mol. Cat.B: Enzymatic*, 10:551-554,.

Bressler, D. C., Gray, R. M., (2002). "Hydrotreating chemistry of model products from bioprocessing of carbazoles". *Energy Fuel*. 16: 1076-1086.

Castorena G, Mújica V, Le Borgne S, (2004) Carbazole biodegradation in gas oil-water biphasic media by a new isolated bacterium *Burkholderia* sp. Strain IMP5GC, Publicación en proceso.

Daugulis, A. J., (2001) "Two-phase partitioning bioreactors: a new technology platform for destroying xenobiotics" *TIBTECH* 19: 457-762

Dixon-Decleve, S. (2004) "Up coming fuel quality changes in the European Union" *World Refining Magazine*. Sep-Oct : 19.

ENCHIRA Biotechnology Corporation (2001). "Gasoline biodesulfurization DE-FC07-97ID13570: Final report"

Giorno L., Drioli, E., (2000) "Biocatalytic membrane reactors: applications and perspectives". *TIBTECH* 18: 339-349.

Gray, M. R., (1994) "Upgrading petroleum residues and heavy oils". Marcel Dekker, Inc. USA

Grieg L, Otter A, Fedorak P (1996) Carbazole Degradation by *Pseudomonas* sp. LD2: Metabolic Characteristics and the Identification of Some Metabolites, *Environmental Science & Technology*, Vol 30, NO 2.

Hsieh, H.P., (1989) "Inorganic membrane reactors – a review" in *Membrane Reactor Technology*, AIChE Symposium series, Govind, R. e loth, N. Eds. 85: 53–67.

Kayser, K. J.; Kilbane II, J. J., (2004) "Method for metabolizing carbazole in petroleum" United States Patent Application # 20040110258.

Kilbane II, J. J.; Ribeiro, C. M. S. And Linhares, M. M., (1999) "Bacterial cleavage of only organic C-N bonds of carbonaceous materials to reduce nitrogen content". United States Patent (6541240).

Kilbane II, J.J., R. Ranganathan, L. Cleveland, K.J.Kayser, C. Ribiero, M.M. Linhares, (2000) "Selective removal of nitrogen from quinoline and petroleum by *Pseudomonas ayucida* IGTN9m". *Appl. Environ. Microbiol.* 6:688-693.

Li L, P.Xu, H.D. Blankespoor (2004) Degradation of carbazole in the presence of non-aqueous phase liquids by *Pseudomonas* sp. *Biotechnology Letters*.

Lange, E., Q. Lin, K. Nielsen, C. Dooyema, (1999) "Surfactants derived from 2-(2-hydroxyphenyl) benzene sulfinate and alkyl-substituted derivatives". US Patent 5973195.

Laredo G, Leyva S, Alvarez R (2002) Nitrogen compounds characterization in atmospheric gas oil and light cycle oil from blend of Mexican crudes, *Science Direct*, 1341-1350

Laredo G, Montesinos A, De los Reyes J.A (2004) Inhibition effects observed between dibenzothiophene and carbazole during the hydrotreating process, *Science Direct*, 171-183

McFarland, B. L.; Boron, D. J., Deever, W., Meyer, J. A., and Atlas, R. M., (1998). "Biocatalytic sulfur removal from fuels: aplicability for producing low sulfur gasoline". *Critical Reviews in Microbioogy*, 24: 99-147

Monticello DJ (2000) Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates. *Curr Opin Biotechnol* 11: 540-546

Moritis, G., (1999) "Massive oil resource to be targeted by new EOR techniques" .*Oil & Gas Journal*, 97(50) diciembre.

NOM-086-ECOL-1994. "Contaminación atmosférica, especificaciones sobre protección ambiental que deben reunir los combustibles fósiles líquidos y gaseosos que se usan en fuentes fijas y móviles".

Novelect, (1993) Manual: "Les applications innovantes des techniques membranaires dans l'industrie". Paris.

Ohshiro, T., Y. Izumi, (1999) "Microbial desulfurization of organic sulfur compounds in Petroleum". Biosci. Biotechnol. Biochem., 63:1-9.

Petróleos Mexicanos, 2005. <http://www.pemex.com>

Riddle R, Gibbs P, Willson R (2003) Recombinant carbazole-degrading strains for enhanced petroleum processing. J Ind Microbiol Biotechnol 30: 6-12

Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K (2000) Biodegradation of carbazole by *Ralstonia* sp. RJGII.123 isolated from a hydrocarbon contaminated soil, J. Microbiol. 46:269-277

Secretaría de Energía, 2000. *Balance Nacional de Energía*. México, D.F.

SEMARNAT-SENER 2003. PROYECTO DE NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-086-SEMARNAT-SENER-2003. Especificaciones de los Combustibles Fósiles para la Protección Ambiental.

Song, C. (2003) "An overview of new approaches to deep desulfurization for ultra-clean gasoline, diesel fuel and jet fuel". Catal. Today 83: 211-263

Tejeda A., Montesinos, R. M., Guzmán, R. 1995. Bioseparaciones. Ed. Unison. México.

US Department of Transportation, Federal Highway Administration. Sitio web: <http://www.fhwa.dot.gov/environment/aqfactbk/factbk12.htm>

Xu, G.W., K.W. Mitchell, D.J. Monticello. (1998) "Fuel product produced by demetalizing a fossil fuel with an enzyme". US Patent 5624844.