

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	
1.1. EL PETRÓLEO	3
<u>Reservas mundiales de petróleo y gas</u>	6
1.2. LA CONTAMINACIÓN ATMOSFÉRICA	9
<u>Impacto Ambiental: Lluvia Ácida</u>	10
1.3. EXPLOTACIÓN INDUSTRIAL DEL PETRÓLEO	14
1.3.1. Tratamientos de depuración	16
<u>Procesos de desulfuración</u>	17
1.4. HIDRODESULFURACIÓN	18
1.4.1. Hidrodesulfuración del dibenzotiofeno (DBT)	20
1.5. BIODESULFURACIÓN (BDS)	21
1.5.1. Mecanismos de biodesulfuración (BDS) aerobia	23
1.5.2. Desulfuración del DBT con ruptura del enlace C-S	26
<u>Ruta metabólica 4S</u>	26
<u>Cofactores en la ruta metabólica 4S</u>	28
<u>Ruta alternativa de BDS no destructiva</u>	29
1.5.3. Procesos de BDS	31
<u>Biocatalizadores</u>	32
<u>Sistemas de Operación</u>	34
<u>Sistemas de BDS con células en crecimiento</u>	34
<u>Sistemas de BDS con extractos libres de células</u>	35
<u>Sistemas de BDS con células en resting cell</u>	36
1.6. OBJETO Y ALCANCE DEL TRABAJO	40
1.6.1. Transferencia de materia gas-líquido	41
<u>Modelos de transferencia de materia</u>	43
1.6.2. Crecimiento y Biodesulfuración con células en crecimiento	45
<u>Crecimiento del biocatalizador desulfurante</u>	46
<u>Crecimiento con DBT</u>	48
1.6.3. Biodesulfuración con células en resting cell	51
<u>Medio de reacción</u>	52
<u>Estudio de la velocidad del proceso de BDS</u>	53

2. MATERIALES Y MÉTODOS	
<i>2.1. EQUIPO EXPERIMENTAL</i>	59
2.1.1. Tanque Agitado.....	59
2.1.2. Columna de burbujeo con recirculación interna (air-lift).....	61
2.1.3. Unidad de Control Fermentador BIOSTAT®B.....	62
2.1.4. Electrodo de O ₂ disuelto.....	63
2.1.5. Compresor de aire.....	63
2.1.6. Medidor de flujo másico.....	63
2.1.7. Electrodo de pH.....	63
<i>2.2. EQUIPOS AUXILIARES</i>	64
2.2.1. Balanza de precisión.....	64
2.2.2. Autoclave.....	64
2.2.3. Incubadoras orbitales.....	64
2.2.4. Campana de flujo laminar.....	64
2.2.5. Centrífugas.....	65
2.2.6. Ultrasonidos.....	65
<i>2.3. MATERIALES EMPLEADOS</i>	65
2.3.1. Microorganismos.....	65
2.3.2. Reactivos utilizados.....	66
<i>2.4. EQUIPOS DE ANÁLISIS</i>	67
2.4.1. Espectrofotómetro de absorción UV/VISIBLE.....	67
2.4.2. Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC).....	68
2.4.3. Cromatógrafo de gases (GC-FID).....	68
<i>2.5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL</i>	69

2.5.1. Protocolo de conservación y mantenimiento	70
<u>A largo plazo</u>	70
<u>A corto plazo</u>	70
2.5.2. Preparación del inóculo	71
2.5.3. Protocolo de crecimiento en fermentador, medio acuoso	72
<u>Crecimiento de <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8</u>	73
<u>Crecimiento de <i>Pseudomonas putida</i> CECT527973</u>	
2.5.4. Proceso de Biorreducción, (BDS)	74
<u>BDS en crecimiento</u>	74
<u>BDS en resting cell</u>	75
2.6. MÉTODOS DE ANÁLISIS	76
2.6.1. Método de determinación del coeficiente volumétrico de transferencia de materia, (K_La)	76
<u>Técnica de medida</u>	76
<u>Operaciones previas</u>	78
<u>Preparación de las emulsiones</u>	78
<u>Rutina de calibración del electrodo de pO_2</u>	79
2.6.2. Análisis de la biomasa	79
2.6.3. Determinación de los compuestos de la ruta 4S	81
<u>Análisis de la Fase Orgánica</u>	82
<u>Análisis de la Fase Acuosa</u>	84
<u>Medidas con HPLC</u>	84
<u>Medidas con GC-FID</u>	85
2.6.4. Análisis de la BDS	87
2.6.5. Análisis cinético del crecimiento y de la BDS	88
3. TRANSFERENCIA DE MATERIA GAS-LÍQUIDO	
3.1. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN SOBRE EL K_La EN REACTORES TIPO TANQUE AGITADO	93
3.1.1. Influencia del caudal de aire con líquidos puros	93
3.1.2. Influencia de la velocidad de agitación con líquidos puros y emulsiones	94
3.1.3. Influencia de la fracción de fase orgánica	95
3.2. INFLUENCIA DE LAS CONDICIONES DE OPERACIÓN SOBRE EL K_La EN REACTORES TIPO AIR-LIFT	97

3.2.1. Influencia de la fracción de fase orgánica y caudal de aire.....	97
3.3. MODELOS DE TRANSFERENCIA DE MATERIA	99
3.3.1. Modelo de Transferencia de Materia en Tanques Agitados.....	99
3.3.2. Estimación de las propiedades de las emulsiones	
C12-agua y C16-agua.....	103
Viscosidad.....	103
Difusividad del oxígeno.....	103
Densidades.....	104
Tensión superficial.....	104
Velocidad de escape de burbujas.....	104
3.3.3. Simulación del coeficiente de transferencia de materia en reactores tipo tanque agitado.....	106
3.3.4. Modelo de Transferencia de Materia en Columnas de Burbujeo con Recirculación Interna, (AIR-LIFT).....	108
3.3.5. Simulación del coeficiente de transferencia de materia en reactores tipo air-lift.....	113
3.3.6. Modificaciones al modelo de transferencia de materia para sistemas trifásicos.....	115
4. CRECIMIENTO Y BIODESULFURACIÓN (BDS) CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO	
4.1. ESTUDIOS PREVIOS	123
4.1.1. Crecimiento en medio acuoso en fermentador.....	123
4.1.2. Influencia de la fracción de fase orgánica sobre el crecimiento.....	126
4.1.3. Estudio de la fuente de azufre en el crecimiento.....	128
4.2. BIODESULFURACIÓN (BDS), CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO	133
4.2.1. Influencia de la concentración inicial de inóculo.....	134
4.2.2. Estudio de la fuente de carbono y de la fuente de azufre.....	135
<u><i>Pseudomonas putida</i> CECT5279</u>	136
<u><i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8</u>	139
4.2.3. Influencia de la fracción de fase orgánica.....	141

4.2.4. Influencia de la concentración de DBT en medios bifásicos.....	144
<u>Ensayos con 27% v/v de FFO</u>	<u>145</u>
<u>Ensayos con 50% v/v de FFO.....</u>	<u>148</u>
4.2.5. Influencia de la adición de una fuente de carbono adicional.....	151
4.2.6. Influencia de la adición de ciclodextrinas en medios bifásicos.....	154
4.3. BIODESULFURACIÓN CON CÉLULAS EN CRECIMIENTO	
EN FERMENTADOR DE 2L.....	157
4.3.1. Influencia de la fracción de fase orgánica (FFO).....	158
4.3.2. Influencia de la fuente de carbono.....	160
4.3.3. <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8 frente a	
<i>Pseudomonas putida</i> CECT5279.....	162
4.4. ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE BDS CON CÉLULAS	
EN CRECIMIENTO.....	164
<u>Modelo cinético con <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 en medios bifásicos ...</u>	<u>167</u>
<u>Modelo cinético con <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8 en medios bifásicos...</u>	<u>171</u>
5. BIODESULFURACIÓN CON CÉLULAS EN	
RESTING CELL	
5.1. ESTUDIOS PREVIOS.....	182
5.1.1. Elección del tampón a utilizar como fase acuosa.....	182
5.1.2. Elección del solvente orgánico empleado como fase orgánica.....	185
5.1.3. Elección del pH en el medio de reacción.....	187
5.1.4. Influencia de la adición de una fuente de carbono adicional.....	188
5.1.5. Mejora de la transferencia y solubilidad del DBT en medios	
bifásicos.....	190
<u>Influencia del uso de Emulsionantes y/o Codisolventes.....</u>	<u>191</u>
<u>Influencia de la Velocidad de Agitación o el uso de Codisolventes.....</u>	<u>194</u>
5.2. INFLUENCIA DE LA FRACCIÓN DE FASE ORGÁNICA.....	195
<u>Resultados con <i>P. putida</i> CECT5279.....</u>	<u>197</u>
<u>Incremento del volumen de hexadecano, C16.....</u>	<u>198</u>
<u>Incremento del volumen de fase orgánica, FO.....</u>	<u>199</u>
<u>Resultados con <i>R. erythropolis</i> IGTS8.....</u>	<u>200</u>
<u>Incremento del volumen de hexadecano, C16.....</u>	<u>201</u>
<u>Incremento del volumen de fase orgánica, FO.....</u>	<u>203</u>

5.3.	<i>EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE DBT</i>	204
	<u>Resultados con <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279</u>	205
	<u>Resultados con <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8</u>	209
	<u>Estudio de BDS con compuestos intermedios de la ruta 4S como</u> <u>Sustratos</u>	213
5.4.	<i>EFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE BIOMASA</i>	215
	<u>Resultados con <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279</u>	216
	<u>Resultados con <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8</u>	218
5.5.	<i>INHIBICIÓN DE LA BDS EN RESTING CELL</i>	221
5.5.1.	Estudio de la inhibición de las etapas de la ruta metabólica 4S por la presencia de HBP	223
5.5.2.	Inhibición del proceso de BDS por la acumulación de HBP	227
	<u>Evolución de la BDS en</u> <u>condiciones acuosas con <i>P. putida</i> CECT5279</u>	228
	<u>Evolución de la BDS</u> <u>en condiciones bifásicas con <i>P. putida</i> CECT5279</u>	229
	<u>Evolución de la BDS</u> <u>en condiciones acuosas con <i>R. erythropolis</i> IGTS8</u>	231
	<u>Evolución de la BDS</u> <u>en condiciones bifásicas con <i>R. erythropolis</i> IGTS8</u>	233
5.6.	<i>ESTUDIO CINÉTICO DEL PROCESO DE BDS CON</i> <i>CÉLULAS EN RESTING CELL</i>	234
	<u>Modelo cinético</u> <u>con <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 en medios acuosos</u>	236
	<u>Modelo cinético</u> <u>con <i>Pseudomonas putida</i> CECT5279 en medios bifásicos</u>	239
	<u>Modelo cinético</u> <u>con <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8 en medios acuosos</u>	240
	<u>Modelo cinético</u> <u>con <i>Rhodococcus erythropolis</i> IGTS8 en medios bifásicos</u>	243
6.	CONCLUSIONES	
6.1.	<i>TRANSFERENCIA DE MATERIA GAS LÍQUIDO</i>	251
6.2.	<i>CRECIMIENTO Y BIODESULFURACIÓN (BDS) CON</i> <i>CÉLULAS EN CRECIMIENTO</i>	252
6.3.	<i>BIODESULFURACIÓN (BDS) CON CÉLULAS EN RESTING CELL</i> ...	254
7.	NOMENCLATURA	
8.	BIBLIOGRAFÍA	