

Biodesulfuración de dibenzotiofeno (DBT) por cepas bacterianas biodegradadoras de hidrocarburos aisladas de “Campo Boscán”

Beltrán Briceño¹, Ismenia Araujo², Alexa Senior³, Daysi Isea², Carmen Cárdenas² y Lenín Herrera²

¹La Universidad del Zulia, Facultad Experimental de Ciencias, Unidad de Investigaciones Microbiológicas Ambientales (UIMA).

²La Universidad del Zulia, Facultad de Ingeniería, Centro de Investigación del Agua. Tel. (061) 597189-597182; Fax (061) 597181. E-mail: beltbric@yahoo.com.

³La Universidad del Zulia, Núcleo Punto Fijo. Laboratorio de Investigaciones y Servicios Ambientales. Tel. (069) 450512.

Resumen

El propósito de esta investigación fue determinar la capacidad desulfuradora de bacterias biodegradadoras de hidrocarburos, utilizando DBT en un medio mineral libre de azufre (MMLA) suplementado con glutamato (Glu). Se utilizaron dos cepas bacterianas (AE9.2-7 y BA4.4), durante 15 días se determinó el crecimiento bacteriano y la concentración de sulfato y sulfito de la fase acuosa de los cultivos. Estas dos cepas utilizaron el Glu como fuente de carbono y energía, el DBT fue utilizado como fuente de carbono y única fuente de azufre; sin embargo, no utilizaron el DBT como única fuente de carbono, azufre y energía. La liberación de sulfato durante el ensayo no fue estequiométrica a la cantidad de DBT que puede ser catabolizado por la cepa AE9.2-7 y no se detectó sulfato en el cultivo de la cepa BA4.4. No se detectó sulfito en ninguno de los cultivos probablemente debido a la oxidación química del mismo a sulfato. Este estudio demostró que las cepas AE9.2-7 y BA4.4 utilizaron el azufre tiofénico del DBT para su crecimiento.

Palabras clave: Bacterias, dibenzotiofeno, biodesulfuración, hidrocarburos.

Dibenzothiophene (DBT) biodesulfurization by biodegradation bacteria strains of hydrocarbon isolated from “Campo Boscan”

Abstract

In this study the capacity of desulfurization in isolated bacteria of petroleum environment was evaluated, were used the DBT in a sulfur-free mineral medium (SFMM). Two bacterial strains which were cultivated 15 days, the bacterial growth was measured and also the concentration of sulfate and sulfite. Both strains used the Glu like source of carbon and energy and the DBT like only source of carbon. The sulfate was only detected in the SFMM supplemented with Glu and DBT/DMF of the AE9.2-7 strain and of the mixed culture, the liberation of sulfate during the rehearsal stoichiometrical amount didn't go to the quantity of DBT that it can desulfurize the AE9.2-7 strain. Sulfate was not detected in the culture of the BA4.4 strain. Sulfite was not probably detected in only of the cultures due to the chemistry oxidation from the same one to sulfate. This study demonstrated that the biodesulfurization of the DBT for the AE9.2-7 strain, was carried out through the direct oxidation of the thiophenic sulfur of the DBT way DBT-sulfone with the accumulation of benzoic acid, 2-hydroxibiphenil and the sulfate liberation.

Key words: Bacteria, dibenzothiophene, biodesulfurization, hydrocarbons.

Introducción

La presencia del azufre en el petróleo crea problemas a la industria petrolera y al medio ambiente. Este elemento si no es removido del crudo, causa corrosión de los equipos utilizados en el refinamiento y producción, disminuye el número de octanos, reduce la eficiencia de los agentes anti-detonantes de la gasolina, además la combustión de compuestos orgánicos azufrados emite a la atmósfera dióxido de azufre, por lo que contribuye a la contaminación del aire y a la producción de la lluvia ácida.

La remoción de azufre del petróleo tradicionalmente se realiza por métodos químicos tales como la hidrodesulfuración. Esta tecnología resulta onerosa en inversiones de capital y energía; además, su eficiencia es limitada ya que los metales pesados presentes en el crudo inhiben la catálisis durante los procesos de hidrogenación. Como

una solución a este problema diversos investigadores han propuesto en las últimas tres décadas la desulfuración biocatalítica como una tecnología alternativa enfocada en la remoción del azufre de moléculas con alto contenido del mismo.

El Dibenzotiofeno (DBT, $C_{12}H_8S$) es el compuesto que ha recibido mayor atención en los estudios de desulfuración y ha sido tomado por la mayoría de los investigadores como el compuesto modelo para estudiar la desulfuración del petróleo y el carbón (Foght, *et al*, 1990; Monticello, 1993). Este compuesto y sus derivados metilados son los más persistentes y probablemente los hidrocarburos poliaromáticos más tóxicos en ambientes marinos (Berthou y Vignier, 1986).

Se han reportado dos rutas diferentes para el catabolismo del DBT. La primera ruta consiste en la degradación oxidativa de uno de los anillos benzenicos del DBT (Kodama *et al*, 1973; Laborde y Gibson, 1977; Finnerty *et al*, 1983; Monticello *et al*,

1985; Oz y Jun, 1999). En esta ruta las cepas dejan intactos los enlaces carbono-azufre (C-S) y las moléculas tiofénicas polares resultantes pueden ser subsecuentemente removidas de los crudos por aguas de lavado; por lo tanto esta ruta es de aplicación limitada pues presenta la desventaja de remover moléculas hidrocarbonadas de importancia económica (Westlake, 1993).

La segunda ruta catabólica y la más estudiada en los últimos 10 años involucra la oxidación directa del azufre tiofénico del DBT por parte de los microorganismos, vía Dibenzotiofeno-5-dióxido con formación de 2-Hidroxibifenil (Mormile y Atlas, 1989; Kilbane y Jackowsky, 1992; Omori *et al*, 1992; Kayser *et al*, 1993; Romine y Gray, 1999) y Ácido Benzoico (Afferden *et al*, 1990) con la subsecuente liberación del azufre como sulfito el cual es oxidado químicamente a sulfato, dejando intacto el esqueleto hidrocarbonado.

Se han encontrado tres genes involucrados en la conversión de DBT a 2-hidroxibifenil, designados como *dszA*, *dszB* y *dszC*. La proteína del gen *dszC* convierte el DBT directamente a DBT-sulfona y las proteínas de los genes *dszA* y *dszB* actúan en conjunto para convertir DBT-sulfona a 2-hidroxibifenil (Denome *et al*, 1993; Piddington *et al*, 1995; Li *et al*, 1996).

El flavin mononucleotido (FMNH₂) es utilizado como co-sustrato por la enzima *dszC* para la oxidación de DBT a DBT-sulfona, e involucra al DBT-sulfóxido como un intermediario. El oxígeno insertado en DBT-sulfóxido y DBT-sulfona proviene del oxígeno molecular y no del agua (Lei y Tu, 1996).

Un complejo FMN:NAD(P)H óxido-reductasa es requerido para las reacciones catalizadas por las enzimas *dszA* y *dszC*, por lo que el FMNH₂ previamente reducido por una flavin reductasa, es el reductante utilizado por las oxidasas terminales, donde el fenilfenolsulfinato es el producto de la enzima *dszA*. Las enzimas *dszA* y *dszC* son oxidasas terminales y la otra proteína, la flavin reductasa, es requerida para la actividad total de ambas enzimas. El flavín no es un cofactor de las enzimas *dszA* y *dszC*, pero la forma reducida del flavín sirve como sustrato de *dszA* y *dszC*, por lo que ninguna de estas dos enzimas usa NAD(P)H directamente (Xi *et al*, 1997).

En la última década la biodesulfuración bacteriana ha tenido avances científicos significativos que han permitido entender las vías metabólicas del proceso, optimizar las condiciones de crecimiento y mejorar la composición de los medios de cultivo.

Los objetivos de esta investigación fueron evaluar la capacidad desulfuradora de bacterias autóctonas biodegradadoras de hidrocarburos, utilizando dibenzotiofeno en un medio mineral libre de azufre y determinar la presencia de sulfato y sulfito como productos de la biodesulfuración.

Materiales y Métodos

Muestra

Se utilizaron diez cepas bacterianas aisladas de la estación de PDVSA "Campo Boscán" (TABLA 1); estas cepas presentan un amplio registro de su capacidad para biodegradar hidrocarburos (Pareja de Cobos, 1993; Briceño, 1999) y las características microscópicas y morfología de sus colonias son descritas por estos autores.

Medios de Cultivo

Se utilizó un Medio Mineral Libre de Azufre (MMLA) (Omori *et al*, 1992). La composición de este medio fue: Na₂HPO₄ 2,2 g; KH₂PO₄ 0,8 g; NH₄NO₃ 3,0 g; FeCl₃·6H₂O 0,01 g; CaCl₂·2H₂O 0,01 g; MgCl₂·6H₂O 0,01 g; Agua desionizada 1000 mL

El MMLA fue suplementado con 0,2% de Glutamato (Merck, Darmstadt, FRD) como fuente de carbono (Kodama, 1977) y DBT (Merck, Darmstadt, FRD) como fuente de carbono y única fuente de azufre. La concentración final del DBT en el MMLA fue de 0,05% (Mormile y Atlas, 1989; Kayser *et al*, 1993). El DBT, fue adicionado al MMLA estéril en solución al 10% en N,N'-Dimetilformamida (Merck, Darmstadt, FRD) (Mormile y Atlas, 1989), el pH final del medio se ajustó a 7 ± 0,1 con NaOH 1 N. Los materiales de vidrio utilizados fueron previamente curados con HCl 4 N para prevenir una posible contaminación con sulfatos remanentes (Afferden, 1990) y se enjuagaron con agua desionizada.

Para la activación de las cepas y el conteo microbiano se utilizaron los medios comerciales:

Caldo de Trypticase de Soya (Merck, Darmstadt, FRD), Agar de Trypticase de Soya (Merck, Darmstadt, FRD) y Agar Estándar para Contaje en Placa (DIFCO, Illinois, USA y Merck, Darmstadt, FRD).

Biodesulfuración de DBT

Previamente a los ensayos de biodesulfuración las cepas fueron evaluadas para determinar su capacidad de crecimiento y adaptación al MMLA suplementado con Glutamato (GLU) y DBT disuelto en N,N'-Dimetilformamida (DBT/DMF); éstas se activaron en caldo tripticase de soya (CTS) y se incubaron a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 horas.

Los cultivos se centrifugaron a 3.500 rpm durante 30 minutos, se les descartó el sobrenadante y se les resuspendió el botón de centrifugado con Buffer Fosfato (BF) estéril. Se centrifugaron nuevamente bajo las mismas condiciones, descartando el sobrenadante y se les resuspendió nuevamente con BF estéril.

Se agitó vigorosamente el botón de centrifugado resuspendido y se sembró en las fiolas de MMLA por triplicado. Se incubaron las fiolas a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por quince días a 100 r.p.m. en una incubadora con agitación (New Brunswick modelo G-25).

Cada 48 horas se evaluó el crecimiento bacteriano mediante la utilización de la Técnica Estándar 9215B del APHA, correspondiente al Recuento de Heterótrofos Aerobios por Placa Fluida o Vertida (APHA *et al*, 1992).

Se seleccionaron las dos cepas que presentaron el mayor crecimiento y adaptación al MMLA. Las cepas seleccionadas fueron activadas en CTS a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por 24 horas y se realizó un cultivo mixto de ambas cepas en una concentración de 1:1. Se traspasó asépticamente los cultivos puros y el cultivo mixto a frascos de centrifuga y se centrifugaron bajo las mismas condiciones establecidas anteriormente.

El botón de centrifugado resuspendido se sembró en las fiolas con 50 mL de MMLA-Glu-DBT/DMF, este procedimiento se realizó por triplicado por cada tiempo de determinación del crecimiento bacteriano así como en los análisis químicos para la determinación de sulfato y sulfito; se inocularon además las siguientes fiolas controles con 50 mL de los medios: MMLA-Glu (Control N° 1),

MMLA-DBT/DMF (Control N° 2), MMLA-DMF (Control N° 3), MMLA-DBT (Control N° 4). Para observar algún cambio del medio de cultivo sin la intervención de los microorganismos se dejó una fiola MMLA-Glu-DBT/DMF sin inocular (Control N° 5). Todas las fiolas se incubaron a $37 \pm 0,5^\circ\text{C}$ por quince días a 100 r.p.m. Cada 48 horas se evaluó el crecimiento bacteriano utilizando la Técnica Estándar 9215B del APHA, correspondiente al Recuento de Heterótrofos Aerobios por Placa Fluida o Vertida (APHA *et al*, 1992) y se separó la fase acuosa y orgánica de los cultivos.

Se realizó la separación de las fases acuosa y orgánica mediante el método de extracción líquido-líquido, se utilizó Diclorometano (CH_2Cl_2) como solvente de extracción (Isea, 1995). El cultivo de cada fiola se acidificó con 8 gotas de HCl concentrado y se colocó en embudos de separación, estrictamente limpios. Se agregó 15 mL de diclorometano, se agitó lentamente, se dejó reposar y se separó la fase acuosa para la determinación de sulfato y sulfito. La fase orgánica se lavó dos veces con 5 mL de diclorometano y se separaron las fases en cada lavada, esta fase se utilizó para la determinación de los metabolitos orgánicos.

Para la determinación de sulfito se tomó una cantidad de 15 mL de la fase acuosa y se fijó inmediatamente con una solución de EDTA al 2,5% (p/v), se guardó en un vial teniendo cuidado de que el contacto con el aire fuera mínimo, el resto de fase acuosa recolectada se guardó en viales diferentes para la determinación de sulfato (APHA *et al*, 1992). Todos los viales fueron guardados a una temperatura de 4°C , hasta sus respectivos análisis químicos.

Análisis Químicos

En la fase acuosa se determinó la concentración de los iones sulfato mediante la utilización de la Técnica Estándar 4500-SO₄²⁻-E y sulfito mediante la Técnica Estándar 4500-SO₃²⁻-B del APHA. Estas técnicas tienen un límite de detección de 0,083 mg/L y 0,25 mg/L respectivamente (APHA *et al*, 1992).

Análisis Estadístico

El análisis estadístico se efectuó utilizando el software "Sistema de Análisis Estadístico" (SAS) con la finalidad de analizar el crecimiento bacte-

riano y la liberación de sulfato y sulfito por parte de los microorganismos. Para determinar si los ensayos experimentales (ensayos de biodesulfuración) y sus controles tenían una diferencia significativa en referencia al crecimiento bacteriano y liberación de sulfato y sulfito, fue necesario efectuar una prueba de hipótesis para la cual se utilizó un análisis de varianza con un modelo aditivo lineal y un diseño experimental de bloques al azar con arreglo de tratamiento en parcelas subdivididas en el tiempo.

Resultados y Discusión

La TABLA 1 muestra los valores de crecimiento obtenidos durante el proceso de adaptación de las cepas al MMLA suplementado con GLU y DBT/DMF.

Para los ensayos de biodesulfuración del DBT se seleccionaron las cepas AE9.2-7 y BA.4-4, ya que fueron las cepas que lograron un mayor crecimiento y adaptación al MMLA suplementado con Glu y DBT/DMF. Las características microscópicas y morfología de sus colonias son descritas por Pareja de Cobos (1993) y Briceño (1999).

El análisis estadístico mostró un $Pr > F$ de 0,0001 con un índice de correlación (R^2) de 0,971448; lo que señala que el modelo estadístico presentó un alto grado de significancia. El análisis de varianza demostró que el Ensayo de biodesulfuración (MMLA-Glu-DBT/DMF) y el Control 1 (MMLA-Glu) registraron medias significativa-

mente diferentes, los Controles 2 (MMLA-DBT/DMF), 3 (MMLA-DMF) y 4 (MMLA-DBT) presentaron medias similares pero significativamente distintas con respecto al Ensayo de biodesulfuración y el Control 1. Estos resultados pueden visualizarse en las FIGS. 1, 2 y 3 en las cuales se pueden observar los diferentes comportamientos que presentaron las cepas en cultivos puros y su cultivo mixto en el Ensayo de biodesulfuración y sus respectivos controles, en correspondencia con los análisis estadísticos que señalaron valores promedios diferentes, agrupándolos en tres grupos.

Los cultivos puros de estas dos cepas y su cultivo mixto alcanzaron su valor máximo de crecimiento a los 4 días de incubación en las fiolas que contenían todos los componentes (Ensayo de Biodesulfuración), con 19,28; 18,99 y 22,65 UFC/mL para AE9.2-7, BA4.4 y el cultivo mixto respectivamente y luego decreció hasta obtener valores mínimos a los 14 días con 1,43; 1,11 y 1,31 UFC/mL para AE9.2-7, BA4.4 y el cultivo mixto respectivamente. Por lo tanto, bajo estas condiciones de cultivo estas cepas mostraron una curva de crecimiento donde su fase logarítmica ocurre durante los primeros días de incubación, alcanzando su fase estacionaria entre el cuarto y sexto día de incubación, y luego disminuyen su densidad bacteriana lentamente durante su fase de muerte hasta los catorce días de incubación. Cuando se utilizó glutamato como única fuente de carbono y energía (Control 1), estos cultivos lo-

TABLA 1. Valores de crecimiento de las cepas en MMLA suplementado con Glu y DBT/DMF.

CEPA	Crecimiento x 10 ⁷ UFC/mL							
	T0	T2	T4	T6	T8	T10	T12	T14
AE9.1.1	3,12	7,57	10,60	15,20	8,13	3,42	0,98	0,53
AE9.1-4	2,43	5,70	6,21	6,50	6,00	4,18	1,40	0,44
AE9.2-1	2,15	4,80	5,34	4,45	4,39	1,97	0,97	0,50
AE9.2-7	2,93	13,30	28,30	19,70	12,50	4,79	2,00	0,76
S-252-3	3,42	5,20	8,35	8,54	7,39	3,29	1,27	0,52
S-252-7	2,06	2,70	2,98	2,12	1,43	0,49	0,34	0,33
BS1.7	3,93	5,47	8,53	9,02	8,30	3,63	1,51	0,51
BS4.12	2,09	7,40	5,84	3,80	2,70	2,09	0,88	0,35
BA4.4	3,05	9,98	18,40	16,00	9,00	4,47	1,66	0,45
A20	3,68	8,65	14,45	13,90	10,80	3,16	1,02	0,43

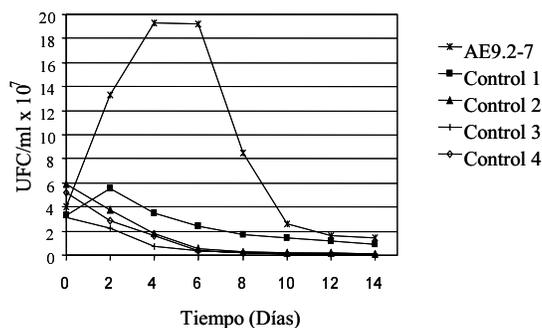


FIG. 1. Curva de crecimiento de la cepa AE9.2-7 en el ensayo de biodesulfuración y sus diferentes controles.

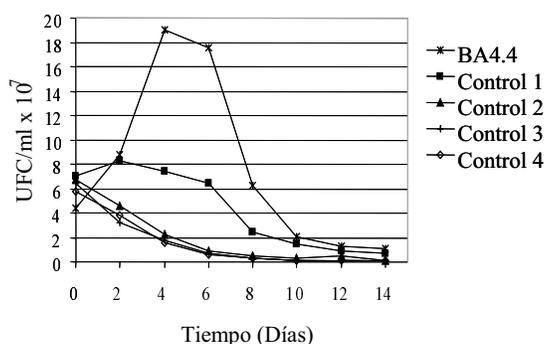


FIG. 2. Curva de crecimiento de la cepa BA4.4 en el ensayo de biodesulfuración y sus diferentes controles.

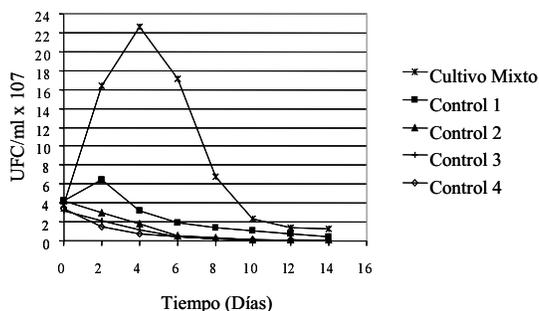


FIG. 3. Curva de crecimiento del cultivo mixto en el ensayo de biodesulfuración y sus diferentes controles.

graron valores máximos de crecimiento a las 48 horas de incubación y luego decrecieron; sin embargo, estos valores fueron menores a los obtenidos en las fiolas del Ensayo de biodesulfuración. No se observó un aumento en los valores de crecimiento para los cultivos en presencia de DBT

como fuente de carbono, azufre y energía, y DMF como co-sustrato (Control 2), DMF como única fuente de carbono y energía (Control 3) y DBT como única fuente de carbono, azufre y energía (Control 4), en estos controles los títulos bacterianos decayeron a partir del inicio del ensayo (Tiempo 0).

Estos resultados nos indican que las cepas AE9.2-7 y BA4.4 son capaces de utilizar el DBT como fuente de carbono y azufre, pero para disponer del mismo requieren de una fuente de carbono y energía alterna como co-sustrato que les permita sintetizar las enzimas necesarias para biodegradar el DBT. Kodama (1977), demostró que uno de los co-sustratos más eficientes para el crecimiento celular y la biodegradación de DBT es el glutamato. Las cepas seleccionadas para esta investigación utilizaron este aminoácido como co-sustrato para el crecimiento y la biodesulfuración co-metabólica del DBT, estos resultados se corresponden con el trabajo de Isea (1996), quien observó la biodesulfuración de DBT por estas cepas en diferentes fuentes de carbono y encontró una desulfuración más eficiente del DBT cuando utilizó el glutamato como co-sustrato.

El comportamiento de los cultivos en el Control 1 (MMLA y glutamato como única fuente de carbono y energía) evidenció que las cepas y su cultivo mixto al carecer de una fuente de azufre comenzaron a decaer en su crecimiento ya que éste es un elemento constituyente del protoplasma celular que debe ser asimilado durante la proliferación de los cultivos (Martín, 1980). El contenido de azufre en la mayoría de los microorganismos está entre el 0,1 al 1% del peso seco y es esencial para el metabolismo de los aminoácidos cistina, cisteína y metionina así como ciertas vitaminas (Martín, 1980; Atlas y Bartha, 1993). En los controles 2 (MMLA-DBT/DMF), 3 (MMLA-DMF) y 4 (MMLA-DBT), se excluyó el glutamato a los cultivos y se observó que los títulos bacterianos comenzaron a decaer desde el tiempo inicial (T_0), indicando con esto que en el Control 2 el DMF no representó el co-sustrato de preferencia de las cepas y por ende no pudo ser utilizado por las cepas para iniciar el co-metabolismo del DBT y es demostrado más directamente en el Control 3 donde las cepas no fueron capaces de crecer con DMF

como única fuente de carbono y energía. Con el Control 4 se demostró que las cepas y sus cultivo mixto no pueden utilizar el DBT como única fuente de carbono, azufre y energía. Esto se debe posiblemente a que el DBT es muy recalcitrante para un ataque inicial por los microorganismos que necesitan un co-sustrato para poder sintetizar las enzimas necesarias para poder biodegradar este compuesto. Los investigadores que han realizado trabajos en biodegradación y biodesulfuración han encontrado que los microorganismos heterótrofos aeróbicos son incapaces de utilizar el DBT como única fuente de carbono, azufre y energía para su crecimiento, pero al tener una fuente alternativa de carbono y energía pueden biodegradar y biodesulfurar este compuesto (Kodama *et al.*, 1973; Laborde y Gibson, 1977; Finnerty *et al.*, 1983; Barda *et al.*, 1987; Foght y Westlake, 1988; Omori *et al.*, 1992).

El sulfato como un metabolito producto de la biodesulfuración del DBT, fue detectado solamente en la fiola del Ensayo de biodesulfuración para la cepa AE9.2-7 y en la fiola del cultivo mixto, no se encontró sulfato en sus controles respectivos; así como para la cepa BA4.4 tampoco se detectó sulfato en ninguno de sus cultivos.

El análisis de varianza demostró que la concentración de sulfato en el cultivo puro de la cepa AE9.2-7 y el cultivo mixto fue significativamente diferente (FIG. 4). El sulfato comenzó a aparecer a las 48 horas de incubación en ambos cultivos y alcanzó su máxima concentración a los seis días de incubación con 1,8866 mg/L para la cepa AE9.2-7 y 1,6395 mg/L para el cultivo mixto; luego comenzó a disminuir hasta 0,5644 mg/L para la cepa AE9.2-7 a los 14 días de incubación; sin embargo, en el cultivo mixto la disminución del sulfato fue mayor e incluso no se detectó a los 14 días de incubación. Esto indica que probablemente el sulfato liberado por la cepa AE9.2-7 en el cultivo mixto pudo ser asimilado metabólicamente por la cepa BA4.4, lo que explica una disminución de la concentración de sulfato en el cultivo mixto y la ausencia del mismo a los 14 días de incubación.

Resultados similares fueron reportados por Omori *et al.* (1992), los cuales encontraron pequeñas cantidades de sulfato liberado en el medio de cultivo, indicando que la cepa *Brevibacterium* sp.

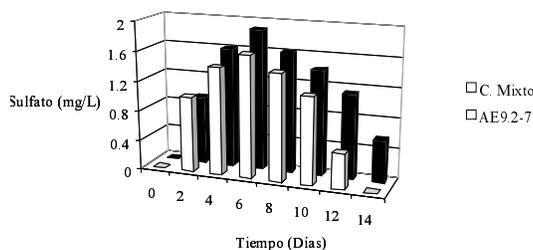


FIG. 4. Concentración de Sulfato en las fiolas Ensayo para la cepa AE9.2-7 y el Cultivo Mixto.

cepa SY1 utilizó efectivamente el mismo. Kayser *et al.* (1993) al utilizar cultivos mixtos de *Rhodococcus rhodochrous* cepa IGTS8 (biodesulfuradora) y *Enterobacter cloacae* (no biodesulfuradora) en un MMLA con DBT encontraron que el azufre liberado del DBT fue incorporado dentro de la célula bacteriana y está disponible para otros microorganismos con la condición que exista un contacto entre las superficies de las dos células bacterianas, y concluyeron al igual que Izumi *et al.* (1994), que las enzimas involucradas en la actividad de desulfuración se encuentran asociadas a la superficie celular de la membrana bacteriana.

La liberación de sulfato registrada en este ensayo no fue estequiométrica con relación a la cantidad de DBT que fue desulfurado por la cepa AE9.2-7. Isea (1996), reportó la biodegradación del DBT de la cepa AE9.2-7 en un 69%, con formación de DBT-sulfona, Ácido Benzoico y 2-Hidróxibifenil en el orden del 0,02; 64,61 y 0,18% respectivamente, con un porcentaje del 4,19% de metabolitos no identificados; para la cepa BA4.4, reportó la biodegradación de DBT en un 10,05 %, el cual fue convertido en pequeños porcentajes de Ácido Benzoico (1,91%), 2-Hidróxibifenil (0,015%) y metabolitos no identificados (7,63%).

No se detectó sulfato en ninguna de las cepas y su cultivo mixto, tanto en las fiolas Ensayo como en sus respectivos controles. Esto probablemente se debió a que pudo ser oxidado químicamente a sulfato (Martín, 1980; Afferden *et al.*, 1990); esta oxidación al parecer, se realizó a medida que se liberaba sulfato, ya que cada vez que se procedió a la extracción de la fase acuosa, se agregó EDTA

para inhibir esta oxidación (APHA *et al*, 1992).

Conclusiones

La mejor adaptación y el mayor crecimiento en el MMLA suplementado con Glu y DBT/DMF fueron alcanzados por las cepas identificadas como AE9.2-7 y BA4.4 ya que éstas lograron un mayor título bacteriano con respecto a las otras cepas.

Este estudio, junto con los resultados obtenidos por Isea (1996), demostró que la cepa AE9.2-7 cataliza el DBT siguiendo la ruta metabólica que involucra la oxidación directa del azufre tiofénico vía DBT-sulfona con la acumulación de ácido benzoico, 2-hidroxibifenil y la liberación de sulfato.

Las cepas AE9.2-7 y BA4.4 y su cultivo mixto son capaces de crecer en MMLA con DBT como fuente de carbono y azufre y Glutamato como co-sustrato para fuente de carbono y energía; y son incapaces de utilizar el DBT como única fuente de carbono y energía.

Se encontró sulfato solamente en el MMLA suplementado con DBT/DMF para la cepa AE9.2-7 y el cultivo mixto. La cantidad de sulfato liberado en el medio de cultivo de la cepa AE9.2-7, no fue estequiométrica a la cantidad de DBT que esta cepa puede biodegradar, indicando que posiblemente el azufre liberado fue asimilado metabólicamente por las bacterias. No se detectó sulfato en ninguno de los cultivos, probablemente por su oxidación química a sulfato o por su asimilación por parte de las cepas bacterianas.

Debido a que el límite de resolución de la técnica empleada para la determinación de sulfato no permite detectar concentraciones menores a 0,25 mg/L es necesario realizar experimentos con técnicas más sensibles como la cromatografía iónica.

Referencias Bibliográficas

- AFFERDEN, M.; SCHACHT, S.; KLEIN, J.; TRUPER, H. (1990). Degradation of Dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. DO. **Arch. Microbiol.**, Vol. 153: 324-328.
- APHA, AWWA.; WEF. (1992). **Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater**. 18th Ed. American Public Health Assoc. Washington, D.C.
- ATLAS, R.M.; BARTHA, R. (1993). **Microbial Ecology. Fundamentals and Applications**. The Benjamin/Cummings Publishing Company, INC. 3rd ed. Redwood City, California.
- BERTHOU, F.; VIGNIER, V. (1986). Analysis and Fate of Dibenzothiophene Derivates in the Marine Environment. **Intern. J. Environ. Anal. Chem.**, Vol. 27: 81-86.
- BHADRA, A.; SCHARER, J.M.; MOO-YOUNG, M. (1987). Microbial Desulphurization of Heavy Oils and Bitumen. **Biotech. Adv.**, Vol. 5: 1-27.
- BRICEÑO, B.R. (1999). Biodesulfuración Bacteriana de Dibenzotiofeno (DBT) en Medio Libre de Azufre y Determinación de Sulfato y Sulfito como Sub-productos. (Tesis de Pregrado), Facultad de Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- DENOME, S.A.; OLSON, E.S.; YOUNG, K. (1993). Identification and Cloning of Genes Involved in Specific Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. **Appl. Environ. Microbiol.**, Vol. 59: 2837-2843.
- FINNERTY, W.R.; SHOCKLEY, K.; ATTAWAY, H. (1983). Microbial Desulfurization and Denitrification of Hydrocarbons. In: J.E. Zajic, D.C. Cooper, T.R. Jack and Kosaric (ed.), **Microbial Enhanced Oil Recovery**. PennWell Publishing Co, Tulsa, Okla. 83-91.
- FOGHT, J.M.; FEDORAK, P.M.; GRAY, M.; WESTLAKE, D.W. (1990). Microbial Desulfurization of Petroleum. In: C. Brierly, J. Brierly and Ehrlich (ed.), **Microbial Mineral Recovery**, MacGraw-Hill, New York. 379-407.
- FOGHT, J.M.; WESTLAKE, D.W. (1988). Degradation of Polycyclic Aromatic Heterocycles by a *Pseudomonas* species. **Can. J. Microbiol.**, Vol. 34: 1135-1141.
- ISEA, D.J. (1996). Estudio de la Biodegradación del Dibenzotiofeno por Bacterias *Pseudomonas* Aisladas de Campo Boscán. (Tesis de Maestría), Facultad de Ingeniería, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- IZUMI, Y.; OHSHIRO, T.; OGINO, H.; HINE, Y.; SHIMAO, M. (1994). Selective Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. **Appl. Environ. Microbiol.**, Vol. 60: 223-226.
- KAYSER, K.; BIELAGA, B.; JACKOWSKI, K. (1993). **Characterization of Carbon-Sulfur Bond Cleavage by Axenic and Mixed Cultures of *Rhodococcus rho***

- dochrous* IGTS8. Institute of Gas Technology, Chicago, Illinois.
- KILBANE, J.J.; JACKOWSKI, K. (1992). Biodesulfurization of Water-soluble Coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. **Biotechnol. Lett.**, Vol. 12: 761-764.
- KODAMA, K. (1977). Co-Metabolism of Dibenzothiophene by *Pseudomonas jianii*. **Agric. Biol. Chem.**, Vol. 41: 1305-1306.
- KODAMA, K.; UMEHARA, K.; SHIMIZU, K.; NAKATANI, S.; MINODA, Y.; YAMADA, K. (1973). Identification of Microbial Products from Dibenzothiophene and Its Oxidation Pathway. **Agric. Biol. Chem.**, Vol. 37: 45-50.
- LABORDE, A.; GIBSON, D. (1977). Metabolism of Dibenzothiophene by a *Beijerinckia* Species. **Appl. Environ. Microbiol.**, Vol. 34: 783-790.
- LEI, B.; TU, S. (1996). Gene Over expression, Purification, and Identification of a Desulfurization Enzyme from *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8 as a Sulfide/Sulfoxide Monooxygenase. **J. Bacteriol.**, Vol. 178: 5699-5705.
- LI, M.Z.; SQUIRES, C.H.; MONTICELLO, D. J. and CHILDS, J. D. (1996). Genetic Analysis of the *dsz* Promoter and Associated Regulatory Regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8. **J. Bacteriol.**, Vol. 178: 6409-6418.
- MARTIN, A. (1985). **Introducción a la Microbiología del Suelo**. AGT Editor, S.A. México, 1980.
- MONTICELLO, D.J. (1993). Biological Desulfurization (BDS) of Middle Distillates. In: **1993 National Petroleum Refiners Association Annual Meeting**. AM-93-14, San Antonio, Texas.
- MONTICELLO, D.J.; BAKKER, D.; FINNERTY, W.R. (1985). Plasmid Mediated Degradation of Dibenzothiophene by *Pseudomonas* species. **Appl. Environ. Microbiol.**, Vol. 49: 756-760.
- MORMILE, M. R.; ATLAS, R. (1989). Biotransformation of Dibenzothiophene Sulfone by *Pseudomonas putida*. **Can. J. Microbiol.**, Vol. 35: 603-605.
- OMORI, T.; MONNA, L.; SAIKI, Y.; KODAMA, T. (1992). Desulfurization of Dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. Strain SY1. **Appl. Environ. Microbiol.**, Vol. 58: 911-915.
- OZ, G.; JUN OH, D. (1999). Dibenzothiophene Degradation Pathway. University of Minnesota. http://www.labmed.umn.edu/umbbd/dbt2_map.html.
- PAREJA DE COBOS, C. (1993). Aislamiento, Caracterización y Preservación de Cepas Bacterianas Degradadoras de Petróleo. (Tesis de Maestría), Facultad Experimental de Ciencias, Universidad del Zulia, Maracaibo, Venezuela.
- PIDDINGTON, C.S.; KOVACEVICH, B.R.; RAMBOSEK, J. (1995). Sequence and Molecular Characterization of a DNA Region Encoding the Dibenzothiophene Desulfurization Operon of *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. **Appl. Environ. Microbiol.**, Vol. 61: 468-475.
- ROMINE, M.; GRAY, K. (1999). "Dibenzothiophene Desulfurization Map. University of Minnesota. http://www.labmed.umn.edu/umbbd/dbt_map.html.
- WESTLAKE, D.W. (1993). Report on the Application of Biotechnology to the Oil Industry. [A review of the microbiological activities relative to the oil industry prepared for INTEVEP (Los Teques) and University of Zulia (Maracaibo) Venezuela]. Laboratorio de Microbiología. Centro de Investigación del Agua. Facultad de Ingeniería, LUZ. Maracaibo.
- XI, L.; SQUIRES, C.; MONTICELLO, D.J.; CHILDS, J.D. (1997). A Flavin Reductase Stimulates DszA and DszC Proteins of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 *in Vitro*. **Bioch. Biophysical Res. Commun.**, Vol. 230: 73-75.