



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTONOMA
METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

"DESULFURACION DE DIBENZOTIOFENO POR
HONGOS AISLADOS DE SUELOS CONTAMINADOS
CON HIDROCARBUROS"

 COORDINACION DE SERVICIOS
DOCUMENTALES - BIBLIOTECA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN BIOLOGIA EXPERIMENTAL

P R E S E N T A

CLAUDIA MARCELA ZULETA VARGAS

MEXICO, D. F.

SEPTIEMBRE DE 1998

19-01-02-18

Universidad Autónoma Metropolitana

Iztapalapa

**“Desulfuración de dibenzotiofeno por hongos
aislados de suelos contaminados con
hidrocarburos”**

Maestría en Biología Experimental

Bióloga Claudia Marcela Zuleta Vargas

Asesores:

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas

Dr. Richard Auria

Dr. Jorge Romero Jarero

Este trabajo se realizó en la Planta Piloto 4 de Fermentaciones Sólidas de la Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, bajo la dirección del Dr. Mariano Gutiérrez Rojas y la co-dirección del Dr. Jorge Romero Jarero y el Dr. Richard Auria. Asimismo se trabajó en el laboratorio de Microbiología Ambiental del Departamento de Bioprocesos de la Subdirección de Protección Ambiental del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP), con la colaboración de la Maestra Ma. del Pilar Bremauntz Michavila, Jefe de la Línea de Investigación en Bioprocesos.

Las muestras de sedimentos marinos fueron proporcionadas por el Dr. Jorge Romero Jarero, responsable del Laboratorio de Microbiología Marina en el Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

El presente trabajo se realizó con financiamiento del IMP mediante el proyecto DOC-7101 y la beca-crédito otorgada por el CONACyT con el número 95361. La Maestría en Biología Experimental de la Universidad Autónoma Metropolitana está dentro del Padrón de Excelencia del CONACyT con el No. de registro 309-0.

A Sergio Alcántara

INDICE

1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
2.1. Contenido de azufre orgánico en el petróleo	3
2.2. Alternativas para la desulfuración de hidrocarburos	6
2.3. Hidrodesulfuración	7
2.4. Biodesulfuración	8
2.5. Ruta bioquímica de desulfuración en Bacterias	12
2.6. Ruta bioquímica de desulfuración en hongos	16
2.7. Antecedentes de trabajos de desulfuración en bacterias	18
2.8. Antecedentes de trabajos de desulfuración en hongos	21
3. JUSTIFICACIÓN	24
4. OBJETIVOS	25
5. MATERIALES Y MÉTODOS	26
5.1. Muestreo en campo	26
5.2. Microorganismos	26
5.3. Químicos	26
5.4. Medios de cultivo	26
5.5. Hongos	28
5.6. Consorcios	28
5.7. Identificación de cepas aisladas	28

5.8.	Selección de cepas para metabolizar el DBT	28
5.9	Método del tolueno para la extracción de DBT	29
5.10.	Método del diclorometano para la extracción de DBT	29
5.11.	Método en cromatógrafo de gases	30
5.12.	Cuantificación de DBT	31
5.13.	Cuantificación de DBT sulfona	31
5.14.	Cinéticas de desulfuración	31
5.15.	Otros	31
6.	DISCUSIÓN DE RESULTADOS	32
6.1.	Aislamiento de Microorganismos aislados de suelos y sedimentos marinos	32
6.2.	Extracción de DBT	37
6.3.	Selección de microorganismos	39
6.4.	Identificación de DBT sulfona	41
6.5.	Cinéticas de biotransformación de DBT	43
6.5.1.	<i>Cunninghamella elegans</i>	43
6.5.2.	Consortio microbiano I	44
6.5.3.	<i>Aspergillus sp A-01</i>	45
7.	CONCLUSIONES	47
8.	BIBLIOGRAFÍA	49

1. RESUMEN

Los compuestos que contienen azufre orgánico e inorgánico se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Cuando los materiales que lo contienen son utilizados, en un proceso de combustión para generar energía, producen SO_2 , el cual es arrastrado por los gases de combustión a la atmósfera. Las exposiciones prolongadas de concentraciones menores a 1 ppm de SO_2 causan daños respiratorios en los humanos. Asimismo el SO_2 está relacionado con la lluvia ácida que, junto con el calentamiento global y la destrucción de la capa de ozono, se considera uno de los problemas de contaminación de primera importancia. El contenido de azufre en los crudos mexicanos varía de un 0.9% a un 7.0 %. De este azufre alrededor del 40% se encuentra unido a moléculas orgánicas siendo la más representativa el dibenzotiofeno (DBT). Este compuesto está constituido por dos moléculas de benceno unidas a un tiofeno que contiene al átomo de S°. La eliminación del azufre de moléculas orgánicas como el DBT es difícil de realizar tanto por procesos fisicoquímicos como biológicos dada la especificidad del mecanismo de eliminación del azufre en la molécula de DBT. En la actualidad, los procesos fisicoquímicos en uso tienen un elevado costo por su alto requerimiento energético (altas temperaturas y presión) además no son totalmente eficientes ni específicos. En este sentido los métodos biológicos de desulfuración ofrecen una alternativa a esta problemática.

De esta manera, este trabajo tuvo como principal objetivo aislar y seleccionar de suelos y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos hongos con capacidad para desulfurar el dibenzotiofeno. De igual forma se describe el aislamiento de microorganismos con capacidad de metabolizar el DBT, además del desarrollo de la metodología para cuantificar esta molécula por cromatografía de gases.

Las muestras de suelos se obtuvieron de diferentes zonas contaminadas con hidrocarburos. Para la extracción de DBT y sus intermediarios se encontró que de los métodos evaluados el del tolueno resultó ser más confiable debido a la poca pérdida del compuesto (8%) mientras que con el método del diclorometano las pérdidas fueron de 32%. Las cepas de hongos aisladas se identificaron según su perfil de ácidos grasos. De Azcapotzalco se aislaron a las cepas de hongos *Aspergillus* sp N-02 y *Aspergillus fumigatus*, de Salamanca a la cepa *Phoma* sp, de Minatitlán a las cepas *Aspergillus* sp A-01 y *Aspergillus* sp B-03, de los sedimentos marinos a la levadura *Rhodotorula rubra* y de Salina Cruz dos consorcios microbianos. De los microorganismos aislados se seleccionaron a *Aspergillus* sp A-01 y el consorcio microbiano I de Salina Cruz debido a que desaparecieron la mayor cantidad de DBT. Estos microorganismos junto con *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 se utilizaron para cuantificar, a diferentes tiempos de fermentación, la acumulación de dibenzotiofeno sulfona y 2- hidroxibifenil. La mayor desaparición de DBT correspondió al cultivo de *Aspergillus* sp A-01 donde se cuantificó la desaparición de 0.45 g/l de DBT, mientras que con *Cunninghamella elegans* y el Consorcio microbiano la desaparición fue menor (0.23 g/l de remoción de DBT en ambos cultivos). En estos cultivos se observó la acumulación de dibenzotiofeno sulfona (DBTO_2) que es la forma oxidada del DBT y es también un intermediario en la ruta de desulfuración de DBT. En el cultivo del Consorcio microbiano I hubo mayor concentración de DBTO_2 (0.12 g/l) que en el cultivo de *Cunninghamella elegans* (0.089 g/l) mientras que en el cultivo de *Aspergillus* sp A-01 no se detectó DBTO_2 . En ninguno de los cultivos con *Aspergillus* sp A-01, *Cunninghamella elegans* y el consorcio microbiano I se detectó la acumulación de 2-hidroxibifenil o algún otro compuesto bajo las condiciones experimentales evaluadas. Es decir, ninguno de los microorganismos aislados desulfuró la molécula de dibenzotiofeno, sin embargo una cepa desapareció el compuesto y el consorcio microbiano fue capaz de oxidarlo hasta DBT sulfona.

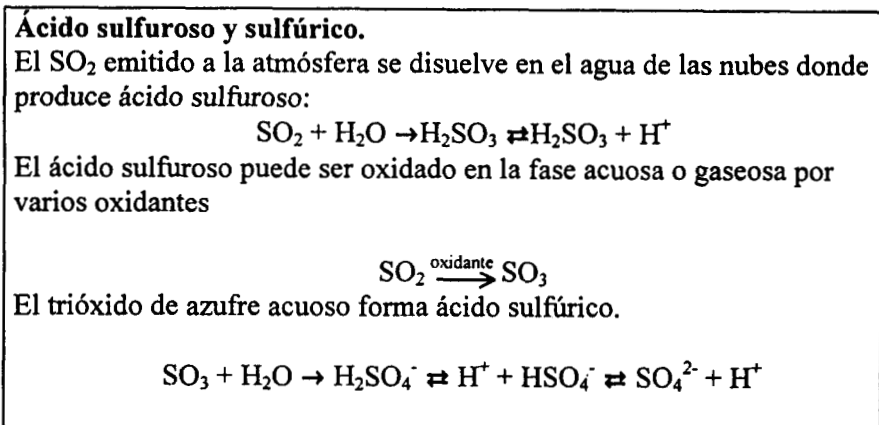
2. INTRODUCCIÓN

La emisión de compuestos de azufre inorgánico, como el bióxido de azufre (SO_2), representa un problema de contaminación ambiental. La nocividad de este gas radica en que en la atmósfera, este compuesto se transforma en ácido sulfúrico (H_2SO_4) el cuál se concentra sobre partículas sólidas suspendidas. Estas partículas cuando se inhalan llegan a los alvéolos pulmonares y pueden causar daños severos al irritar el tejido de los pulmones (Mc Eldowney, 1993). Además el bióxido de azufre por sí mismo, provoca padecimientos como la conjuntivitis, la disminución de la agudeza visual y enfermedades del aparato respiratorio. También provoca alteraciones de la mucosa y el epitelio nasal, edema y enfisema en fumadores y en personas asmáticas (Jiménez y Torres, 1996). Goldsmith (1986) reportó que las exposiciones prolongadas de concentraciones menores a 1 ppm de SO_2 causan daños respiratorios en personas con historial clínico de asma y otras enfermedades respiratorias. Los niveles máximos permitidos de SO_2 en la atmósfera son de 0.13 ppm/día (Finkelman, 1990).

Además de sus efectos nocivos sobre la salud humana, los óxidos de azufre están relacionados con otros problemas de contaminación de importancia a nivel mundial (Kayser y col., 1993, Izumi y col., 1994; Reporte UNEP, 1994; Li y col., 1996; Ohshiro y col., 1996). Entre los factores perjudiciales de este óxido está el hecho de que el bióxido de azufre es un precursor del ozono así como de la formación de la lluvia ácida. La formación de lluvia ácida, así como su impacto en el deterioro forestal y la acidificación de cuerpos de agua es un fenómeno bien estudiado y se puede señalar lo siguiente: el aumento en el grado de acidez de la lluvia se debe principalmente a la presencia de ácido sulfuroso (H_2SO_3) y ácido sulfúrico (H_2SO_4), que se forman por las reacciones de oxidación de SO_2 con agua, como se indica en el cuadro 2.1. Además intervienen los ácidos de nitrógeno provenientes de la contaminación atmosférica por los óxidos de nitrógeno. La velocidad de conversión de SO_2 en los ácidos mencionados puede variar en función de las condiciones ambientales¹ (Monticello y Finnerty, 1985; Mc Eldowney y col., 1993; Oldfield y col., 1997).

¹ En verano, bajo condiciones de humedad, el 100% de las emisiones de SO_2 puede convertirse en ácido en una hora; durante el invierno, la velocidad de conversión es mas baja, aproximadamente de 20% en una hora. En atmósferas secas la conversión es más lenta y depende en gran medida de reacciones fotoquímicas y la presencia de agentes oxidantes (Mannion y Bowley, 1992).

Cuadro 2.1. Procesos involucrados en la formación y depositación de la lluvia ácida (Mannion, 1992).



Las concentraciones más altas de SO₂ se presentan en las áreas de mayor actividad industrial y tránsito vehicular. El SO₂ también se libera a la atmósfera durante el procesamiento de sulfuros metálicos, la producción de ácido sulfúrico y la refinación del petróleo (Kayser y col., 1993; Jiménez y Bustillos, 1996). Su utilización en plantas termoeléctricas y vehículos automotores aporta aproximadamente el 90% de la emisión total de SO₂ hecha por el hombre². (Monticello y Finnerty, 1985; Girgis y Gates, 1991; Reporte UNEP, 1994; Janssen, 1996).

2.1. CONTENIDO DE AZUFRE ORGÁNICO EN EL PETRÓLEO.

El petróleo crudo contiene hidrocarburos simples como el metano y moléculas más complejas, como el dibenzotiofeno, con pesos moleculares altos (Kargi, 1982; Prince, 1993). La mayoría de estas moléculas están constituidas únicamente de carbono e hidrógeno, sin embargo la mayoría de los crudos también contienen nitrógeno y azufre orgánico. En el petróleo, el azufre es el tercer elemento más abundante después del carbono y del hidrógeno (Kropp y col., 1997). En función de la forma en que el átomo de azufre se encuentra unido a los hidrocarburos se presentan diversas familias de compuestos organoazufrados.

² En 1989 la emisión antropogénica global de azufre a la atmósfera se estimó en 200 millones de toneladas al año (Janssen, 1996).

De esta forma la distribución del azufre es amplia en todo el intervalo de ebullición del crudo³. Sin embargo, como se indica en el cuadro 2.2, existen fracciones de destilados donde predominan ciertas estructuras de organosulfuros como el dibenzotiofeno (Gates y col., 1979; Oldfield y col., 1997). Esto significa que en fracciones ligeras (< 200° C) se han detectado especies como mercaptanos, cicloalquil sulfuros, alquil-aril sulfuros y alquil-tiofenos de 4 hasta 10 átomos de carbono. En la fracción obtenida en el intervalo de 200° a 540°C se han reportado especies como disulfuros, tiofenos que presentan de dos hasta seis anillos aromáticos condensados, aunque predominan en abundancia los alquil-dibenzotiofenos y naftotiofenos de C₁₃H₁₀S a C₂₂H₃₄S (Yasui, 1994). En residuos de destilación al vacío, el contenido de azufre es mayor que cualquiera de las fracciones anteriores y su distribución en diversas especies organoazufradas es amplia, aunque dominan los sulfuros aromáticos, tiofenos y dibenzotiofenos (Gates y col., 1979; Kargi 1982; Yasui, 1994).

Cuadro 2.2.- Compuestos organoazufrados representativos de las fracciones de crudo separadas por destilación (Gates y col., 1979; Kargi, 1982; Yasui, 1994).

Fracción	Intervalo de ebullición °C	Compuesto organoazufrado representativo
Ligeras:		
Gasolina ligera	< 80	Mercaptanos, sulfuros, disulfuros
Nafta	80-160	Sulfuros, disulfuros.
Keroseno	150-230	Sulfuros, Tiofenos
Diesel	170-370	Tiofenos, Dibenzotiofeno
Pesadas		
Combustible residual	> 350	Tiofenos, Dibenzotiofeno

El DBT es una de las moléculas organoazufradas más abundantes en el petróleo y sus derivados. Se reporta que entre un 40% y 70% del azufre presente en el petróleo se encuentra en forma de DBT (Monticello y Finnerty, 1985; Schlenk y col., 1994; Yasui,

³ Basándose en sus propiedades fisicoquímicas, las moléculas presentes en el petróleo se separan en fracciones. Las fracciones se obtienen por destilación incrementando los niveles de ebullición del crudo. Cuando se presenta un incremento en el intervalo de ebullición de la fracción destilada del crudo, la complejidad de los constituyentes alquil o arilo es mayor. De esta manera se obtienen fracciones ligeras (menos de 200° C) como las gasolinas, donde predominan los hidrocarburos de hasta 10 átomos de carbono. En las fracciones obtenidas en el intervalo de ebullición de 220°C a 540°C aumenta la complejidad de los hidrocarburos presentes, encontrándose moléculas hasta con 6 anillos aromáticos condensados (Prince, 1993).

1994; Piddington y col., 1995). El DBT es una molécula plana formada por un núcleo tiofeno al que están unidos dos anillos de benceno. La presencia de los anillos de benceno en la estructura del DBT hace que esta molécula sea termodinámicamente estable debido a que posee una gran energía de resonancia negativa (Girgis y Gates, 1991; Pritchard y col., 1995; Vasudevan y Fierro, 1996). El DBT es hidrofóbico, su solubilidad en agua es menor de $0.10 \mu\text{M}$, es soluble en solventes orgánicos como el tolueno y el diclorometano, no es volátil y es difícil su transformación química en otros productos (Wu y col., 1994; Pritchard y col., 1995). En cuanto a la toxicidad del DBT, Leighton y col. (1989) reportaron su toxicidad en ratones. En este trabajo señalan que la aplicación oral de dosis de 335 a 475 mg de DBT/kg provocaron desde la inconsciencia hasta la muerte en los ratones estudiados. La mortalidad ocurrió a las 72 horas de tratamiento. Los estudios *post mortem* indicaron que hubo congestión y edema pulmonar, hemorragia intestinal y daños en el hígado. En el ámbito histológico hubo necrosis hepática centriobular, necrosis de linfocitos en cortes del timo y cambios degenerativos en las paredes de arterias pulmonares. Por otra parte debido a su naturaleza recalcitrante, el DBT se acumula en sedimentos marinos y en tejidos de moluscos y crustáceos y es tóxico a concentraciones menores de 1 ppm (Kropp y col., 1997).

2.2 ALTERNATIVAS PARA LA DESULFURACIÓN DE HIDROCARBUROS

Como resultado de las altas emisiones de azufre que se arrojan a la atmósfera, se han creado una serie de regulaciones con la intención de disminuir significativamente las emisiones de azufre por el uso de hidrocarburos.

Cuadro 2.3.- Normas. Comparación de valores de contaminantes atmosféricos (Finkelman, 1990). OMS: Organización Mundial de la Salud; APAEU: Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos; USEPA por sus siglas en inglés.

	Norma México	Norma APAEU	Norma OMS	Norma Europa
Partículas Suspendidas Totales ($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	275	260	100-150	70-125
Bióxido de azufre (ppm-24h)	0.13	0.14	0.04-0.06	0.05
Monóxido de carbono (ppm - 8h)	13	9	10	8.7
Bióxido de nitrógeno (ppm - 8h)	0.21	0.05 al año	0.10-0.17	0.21
Ozono (ppm-1h)	0.11	0.12	0.05-0.10	0.076-0.10

En el cuadro 2.3 se muestran los valores permitidos por diferentes legislaciones para diversos contaminantes, incluidos los óxidos de azufre. Las regulaciones ambientales actuales establecen que la concentración de azufre en los combustibles fósiles debe ser menor al 0.5% (Vasudevan y Fierro, 1996). Sin embargo, como se señala en el cuadro 2.4, el contenido de azufre en el petróleo varía significativamente respecto a cada yacimiento entre 0.5% y 7.0 %. Los crudos y derivados que México exporta se caracterizan por su alto contenido de azufre. El crudo tipo Olmeca contiene menos de 1% de azufre mientras que el denominado Pánuco contiene hasta 6.6% de azufre. Estos valores sobrepasan los requerimientos internacionales para cumplir con las emisiones permitidas para los óxidos de azufre (menos de 0.5%).

Cuadro 2.4.- Contenido de azufre orgánico en petróleo crudo de diferentes yacimientos de México y el mundo (Monticello y Finnerty, 1985; IMP, Contrato de compra-venta de petróleo crudo PR-CO-CV. PEP.-001/93).

Crudo de diferentes yacimientos en el mundo		Crudo de yacimientos de origen mexicano	
País de origen	Porcentaje de azufre	Tipo de crudo	Porcentaje de azufre
África del Norte	0.18	Olmeca	0.9
Canadá	0.44	Ligero	1.6
Venezuela	1.5-3.0	Pozoleo; Cuenca de Papaloapan; Terciaria, Istmo; Arenque	2.0
Kuwait	2.6	Naranjos, Alamo, Horcon, Pesado Tipo Maya	3.0-3.6
Estados Unidos	0.05-5.0	Muro	4.4
México	0.9-6.6	Tamaulipas, Pánuco	6.0-6.6

Estos datos señalan que en la mayoría de los combustibles que se extraen de México, y de otras partes del mundo, se debe eliminar al menos un 80% de su contenido de azufre. Con el fin de alcanzar este propósito se han reportado dos alternativas: la hidrodesulfuración que es un proceso fisicoquímico y la biodesulfuración que es un proceso biológico.

2.3 HIDRODESULFURACIÓN.

El propósito de la hidrodeshulfuración es remover el azufre de las fracciones pesadas del crudo. En términos generales, la hidrodeshulfuración consiste en pasar los hidrocarburos a elevadas temperatura y presión (300° C a 450° C y 55 a 200 atm.) a través de un reactor que contiene un lecho formado por un catalizador, al que se inyecta hidrógeno. El azufre contenido en las moléculas organoazufradas reacciona con el hidrógeno libre para producir sulfuro de hidrógeno (H₂S), obteniendo hidrocarburos desulfurados. No obstante, hay limitaciones en el proceso de hidrodeshulfuración para eliminar el azufre de ciertas moléculas que requieren una segunda etapa denominada hidrodeshulfuración profunda. Los compuestos organoazufrados como los sulfuros o disulfuros son desulfurados más fácilmente y rápidamente, es decir son más reactivos, que los compuestos como el DBT y sus derivados con sustituyentes, los cuales son menos reactivos. El DBT es de los compuestos organoazufrados menos reactivos en las fracciones pesadas del crudo⁴. Uno de los principales problemas en el proceso de hidrodeshulfuración profunda es que los catalizadores que actualmente se utilizan no consiguen eliminar el azufre del DBT y sus derivados. Esto significa que no es posible disminuir el contenido de azufre de las fracciones tratadas más que hasta cierto intervalo que no cumple con las normas establecidas (Gates y col., 1979; Girgis y Gates, 1991; Kulpa, 1994; Yasui, 1994; Jiménez y Torres, 1996; Vasudevan y Fierro, 1996). Otros de los inconvenientes que presenta la hidrodeshulfuración son los siguientes:

- El costo de inversión es muy elevado, al igual que el de operación por el requerimiento de altas temperaturas y presiones (Kulpa, 1994; Jiménez y Torres, 1996).
- Entre los compuestos a los cuales es más difícil separar el azufre están los compuestos heterociclos azufrados como el DBT y sus derivados con sustituyentes, los cuáles requieren de varios ciclos de hidrodeshulfuración (Kulpa, 1994). Incluso se ha reportado que después de disminuir por hidrodeshulfuración el contenido de azufre en una fracción de crudo de 1.9% a 0.24%, el DBT y sus derivados alquilados fueron los compuestos organoazufrados remanentes (Vasudevan y Fierro, 1996).

⁴ La reactividad de los compuestos organoazufrados presentes en el petróleo se reporta como la constante de velocidad de pseudo-primer orden de la desaparición de cada compuesto a 300° C y 71 atm. La reactividad del DBT es de $6.11 \cdot 10^{-5}$ L/g de catalizador * seg., mientras que la del tiofeno es de $1.38 \cdot 10^{-3}$ L/g de catalizador * seg. (Girgis y Gates, 1991)

- El uso y mantenimiento de catalizadores corresponde a un 10% del costo del proceso (Gates y col., 1979).
- Se genera una gran cantidad de sulfuro de hidrógeno que debe ser eliminado (Jiménez y Torres, 1996).

2.4 BIODESULFURACIÓN.

Una alternativa a la hidrodesulfuración catalítica es el tratamiento biológico o desulfuración microbiana. Este método puede ser específico, no generador de contaminantes secundarios y tendría la ventaja de requerir poco capital ya que sus costos de operación y la pérdida de energía serían bajos comparados con los costos del proceso de hidrodesulfuración (Kulpa, 1994; Yasui, 1994). Actualmente se sabe que algunos microorganismos como las bacterias y los hongos pueden transformar compuestos orgánicos e inorgánicos con azufre. Debido a que la selectividad de los microorganismos puede ser alta, es posible evitar la pérdida de hidrocarburos y la pérdida de poder energético. Por estas razones han recibido considerable atención los microorganismos capaces de metabolizar el azufre que se encuentra contenido en las moléculas heterocíclicas del petróleo (Kargi, 1982; Monticello y Finnerty, 1985; Armstrong y col., 1995; Jiménez y Torres, 1996).

El sistema biológico que permita la desulfuración microbiana de petróleo crudo con alto contenido de azufre debe tener las siguientes características:

- a) Especificidad de sustrato. Debe actuar sobre el enlace azufre-carbono sin atacar los enlaces carbono-carbono.
- b) Resistencia a la inhibición o toxicidad por producto final, ya sea eliminando los subproductos de reacción o aislando cepas resistentes.
- c) Los microorganismos utilizados deben ser genéticamente estables, no patógenos para el hombre, y deben soportar la naturaleza "áspera" del petróleo así como su procesamiento.
- d) Los productos finales deben ser seguros o útiles para otros procesos.

Debido a que hasta la fecha no se han cumplido todos estos requisitos en los sistemas modelo estudiados, el proceso de biodesulfuración que desde hace tiempo se ha considerado una alternativa para sustituir la hidrodesulfuración, no ha podido desarrollarse

como un proceso comercialmente viable para la eliminación de azufre orgánico de combustibles (Monticello y Finnerty, 1985; Lee y col., 1995).

Entre los microorganismos capaces de metabolizar compuestos de azufre se encuentran dos grandes grupos: (a) las bacterias, especialmente del género *Rhodococcus*, que aparentemente utilizan el azufre del DBT como fuente de azufre y lo incorporan a su biomasa y (b) hongos y levaduras que metabolizan compuestos que contienen azufre.

Sobre la base de las investigaciones de desulfuración de DBT hechas con bacterias y hongos se han caracterizado cuatro rutas metabólicas para el DBT representadas en la figura 2.1:

- 1) En el metabolismo tipo I el esqueleto de carbono es oxidado parcialmente mientras que la unión carbono-azufre permanece intacta (Laborde y Gibson, 1977; Monticello y col., 1985).
- 2) En el metabolismo tipo II, el DBT sirve como fuente de carbono, energía y/o azufre por lo que los microorganismos rompen indistintamente los enlaces carbono-carbono y carbono-azufre de la molécula (Izumi y col., 1994).
- 3) En el metabolismo tipo III, el DBT sirve únicamente como fuente de azufre. Los microorganismos eliminan el azufre del DBT oxidando primero el azufre y posteriormente rompiendo el enlace carbono-azufre. Este proceso oxidativo libera al azufre como sulfato y el producto final de esta ruta puede ser 2-hidroxibifenil o 2,2-hidroxibifenil (Kodama y col., 1973; Izumi y col., 1994; Lee y col., 1995).
- 4) En el metabolismo tipo IV el azufre de la molécula del dibenzotiofeno es oxidado hasta la forma de DBT sulfona, siendo esta molécula el producto final de la ruta de oxidación (Crawford y Gupta, 1990; Schlenk y col., 1994; Bezalel y col., 1996).

En la bibliografía se han reportado microorganismos que eliminan al azar el azufre del DBT rompiendo los enlaces carbono-carbono ya sea por el metabolismo 1 o 2 (Laborde y Gibson, 1977; Kitamura y col., 1993; Al Hasan y col., 1994; Launen y col., 1995; Resnick y Gibson, 1996). Estos microorganismos se consideran inadecuados para incorporarlos a los procesos de biodesulfuración del petróleo ya que la degradación del esqueleto de carbono implica una pérdida de combustible.

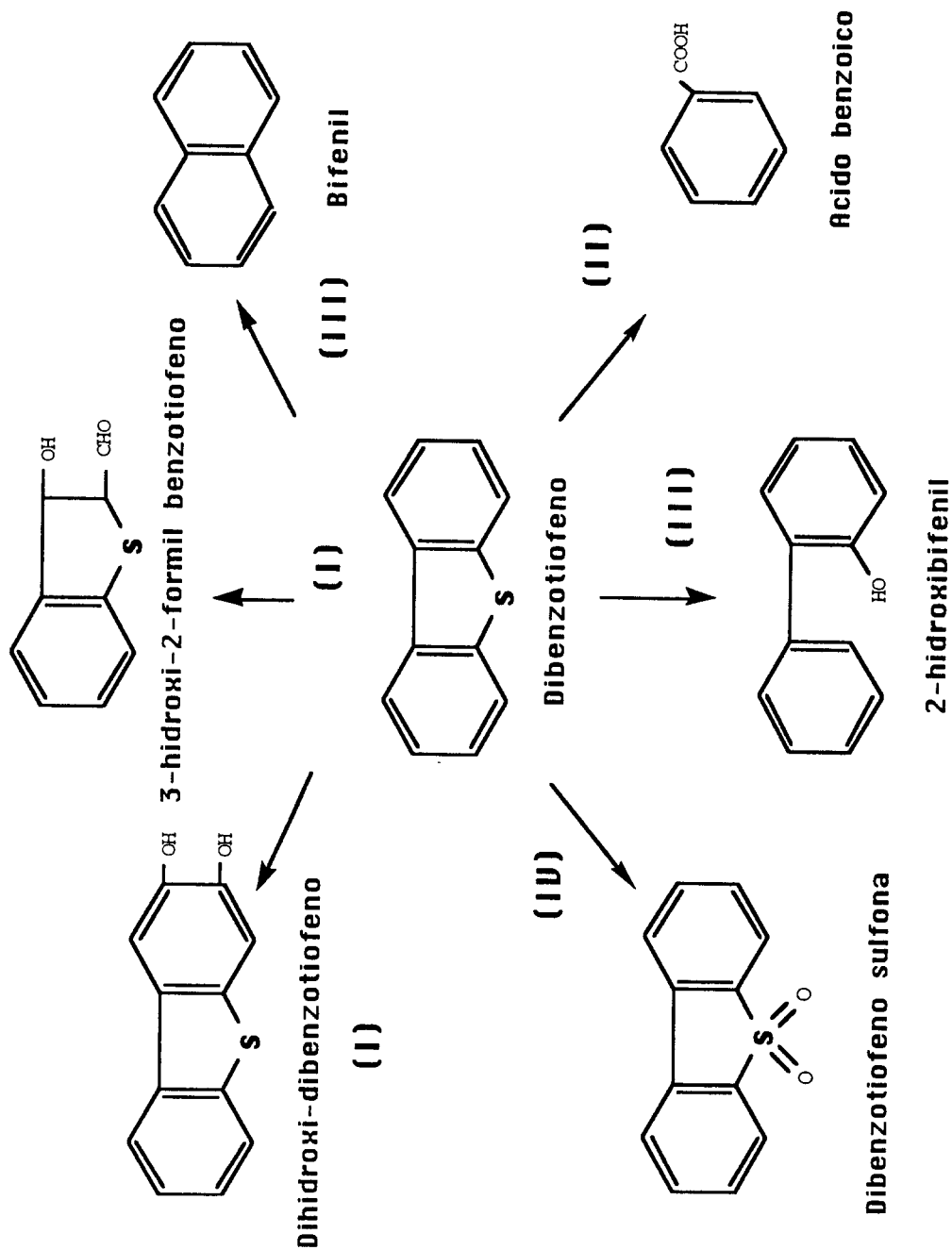


Figura 2.1.- Rutas metabólicas de Dibenzotiofeno reportadas en hongos y bacterias. Metabolismo tipo I. Oxidación parcial del esqueleto de carbono donde el átomo de azufre no se altera. Metabolismo tipo II. Rompimiento de enlaces carbono-carbono y carbono-azufre del dibenzotiofeno y posible utilización como fuente de carbono y azufre. Metabolismo tipo III. Rompimiento selectivo de enlaces carbono-azufre, utilización de dibenzotiofeno como fuente de azufre. Metabolismo tipo IV. Oxidación del átomo de azufre sin rompimiento de enlaces. Adaptado de Izumi y col., 1994 y Yasui, 1994.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
 INSTITUTO DE QUÍMICA

Sin embargo, pueden utilizarse en el desarrollo de estrategias biológicas de rehabilitación de suelos contaminados con hidrocarburos. Boscecker y col. (1993) reportaron un ejemplo de este tipo de aplicación trabajando suelos contaminados con petróleo y reportando eficiencias de biorremediación entre 20% y 60% de eliminación de hidrocarburos saturados.

Por otro lado, en los últimos años, los estudios hechos con bacterias del género *Rhodococcus*, el cual es de los pocos que presentan el fenotipo de desulfuración, han permitido conocer la ruta bioquímica para la desulfuración de DBT por bacterias y confirmar que existe la posibilidad de desarrollar a futuro un proceso biológico de desulfuración de DBT.

222478

2.5 RUTA BIOQUÍMICA DE DESULFURACIÓN DE DIBENZOTIOFENO EN BACTERIAS.

La ruta bioquímica de desulfuración del dibenzotiofeno ha sido estudiada principalmente en bacterias del género *Rhodococcus*. Actualmente se conocen las reacciones que la forman así como su secuencia. De igual forma se conocen las enzimas que catalizan las reacciones así como los genes que las codifican y su secuencia de bases. Se pueden señalar dos etapas importantes en esta ruta: en primer lugar la oxidación del átomo de azufre hasta la forma denominada DBT sulfona, ya que experimentalmente se ha demostrado que esta forma oxidada del azufre del DBT es una condición necesaria para la posterior eliminación del azufre. En segundo lugar, el rompimiento específico de los enlaces carbono-azufre que permiten la separación del átomo de azufre de la molécula de DBT (sulfona) y la formación del hidroxibifenil.

El fenotipo de desulfuración (Dsz^+) es resultado de la expresión del operón *dsz*, el cual se encuentra ubicado en un plásmido en la bacteria *Rhodococcus* sp IGTS8 (Denome y col., 1993; Piddington y col., 1994; Oldfield y col., 1997). La longitud del operón es de 4.0 a 6.5 kilobases y está constituido por un promotor y tres genes estructurales en *tandem* (Denome y col., 1993; Piddington y col., 1994). Estos genes son denominados *dszA*, *dszB* y *dszC* por ser los responsables de la actividad de desulfuración y por el orden en que aparecen en la secuencia aislada (Piddington y col., 1994; Oldfield y col., 1997; Xi y col., 1997). Los genes *dszA*, *dszB* y *dszC* corresponden respectivamente a los genes *soxA*, *soxB* y *soxC* reportados por Denome y col. (1993 y 1994) para la misma cepa.

El primer paso en la ruta de desulfuración del DBT es la oxidación por oxigenación del átomo de azufre contenido en la estructura del tiofeno. Esta reacción requiere de oxígeno y NADH. El balance de la reacción a pH neutro es:



El producto del gen *dszC* es el responsable de catalizar esta reacción y es suficiente para conferir a los microorganismos la capacidad para oxidar dibenzotiofeno (DBT) o dibenzotiofeno sulfóxido (DBTO) a dibenzotiofeno sulfona (DBTO₂). Debido a que tanto el DBT como el DBTO sirven como sustrato para la proteína *DszC*, y dado que el DBTO se

acumula transitoriamente en cultivos donde el DBT es el único sustrato, se ha concluido que la proteína DszC cataliza la oxidación secuencial:



En cuanto al tipo de enzima que pudiera ser DszC, Denome y col. (1994) han propuesto que posiblemente pertenece a la familia de las acil-Co-A deshidrogenasas, enzimas involucradas en la β -oxidación, y que al igual que éstas requiere del FAD como cofactor. Sin embargo, en los últimos años, la evidencia experimental acumulada respalda la hipótesis que propone que la proteína DszC es una monooxigenasa que puede catalizar la reacción secuencial de sulfoxidación mencionada en las ecuaciones 1 y 2 (Piddington y col., 1994; Oldfield y col., 1997; Xi y col., 1997). Es importante señalar que la proteína DszC es singular por el hecho de que utiliza al FMNH₂ como cosustrato mientras que en general, las monooxigenasas dependientes de flavinas utilizan un FAD unido a ellas como cofactor (Oldfield y col., 1997; Xi y col., 1997). La proteína DszC también es particular debido a que puede oxidar el DBT a DBTO₂ cuando la mayoría de las flavin-monooxigenasas o hemoproteínas oxidan los sulfuros orgánicos hasta sulfóxidos y su posterior oxidación a sulfona ocurre muy lentamente y no hay una conversión total a este último compuesto (Oldfield y col., 1997; Xi y col., 1997).

En esta cepa ha sido identificada una oxidoreductasa-FMN dependiente de NADH. Esta proteína de 25 kilodaltons, la cual no es codificada por el operón *dsz*, posiblemente sirve como fuente de FMNH₂ para la proteína DszC *in vivo*. El requerimiento de FMNH₂ como cosustrato implica la participación de un flavin 4a-peróxido como el donador de oxígeno para el sustrato y el mismo mecanismo general de reacción para otras monooxigenasas dependientes de flavinas. La especificidad del sustrato de la proteína DszC no ha sido estudiada pero aparentemente tiene una amplia especificidad por el sustrato (Oldfield y col., 1997).

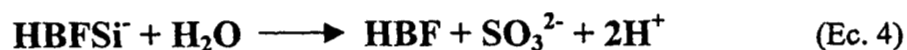
Una vez oxidado el DBT hasta DBTO₂, el siguiente paso en la ruta de desulfuración de DBT es catalizado por la enzima DszA, codificada por el gen *dszA* (Denome y col., 1994; Piddington y col., 1994; Oldfield y col., 1997; Xi y col., 1997). Esta enzima cataliza la siguiente reacción, dependiente de oxígeno y NADH:



Los datos experimentales publicados por Oldfield y col. (1997) señalan que no hay una oxidación completa en la conversión de DBTO₂ a 2-(2'-hidroxifenil)benceno sulfinato (HBFSi). Es posible que el mecanismo enzimático de esta reacción sea una hidrólisis catalizada por una base (es decir un ataque por un hidróxido al carbono del enlace C-S, seguido por la salida de un sulfinato). Sin embargo, debido a que en extractos libres de células la proteína DszA requiere de NADH para presentar actividad y debido a que el oxígeno que introduce esta enzima se deriva de oxígeno molecular, se ha propuesto que la enzima DszA cataliza una monooxigenación más que un mecanismo hidrolítico. Al igual que DszC, la enzima DszA utiliza como cosustrato FMNH₂, el cual aparentemente se deriva de una oxidoreductasa FMN dependiente de NADH. Es probable que el sitio activo de DszA tenga sitios de unión para DBTO₂, FMNH₂ y NADH. Un posible mecanismo de reacción es el siguiente:

El FMNH₂ se une a la proteína DszA y reacciona con oxígeno molecular para dar FMNH-4a-hidroperóxido. Es posible que esta molécula ataque a un carbono del enlace C-S del sustrato (DBTO₂), llevándose a cabo el rompimiento del enlace C-S por la expulsión del sulfinato. El intermediario peróxido resultante posiblemente se descompone por un ataque hídrico suministrado por el NADH para dar los productos HBFSi⁻ y el 4a-hidroxi FMNH, el cual puede perder espontáneamente una molécula de agua para dar FMN y dejar el sitio activo en la proteína DszA (Olson y col., 1993; Oldfield y col., 1997).

La última etapa en la ruta de desulfuración consiste en la separación del átomo de azufre de la molécula. La proteína DszB es codificada por el gen *dszB*. Esta proteína cataliza la conversión de HBFSi⁻ a 2-hidroxibifenil (HBF) y sulfito. Esta reacción no requiere de NADH. Basándose en estos datos se ha catalogado a la proteína DszB como una hidrolasa de ácido sulfínico aromático que cataliza la siguiente reacción:



El mecanismo enzimático propuesto implica el ataque nucleofílico de una molécula de agua activada por una base sobre el sulfuro sulfinato. Es posible que el sitio activo de DszB contenga una base de Lewis la cual podría activar una molécula de agua para que lleve a

cabo el ataque nucleofílico sobre el sulfuro sulfinato con la consecuente liberación de sulfito, dejando un intermediario carbanion el cual podría aceptar un protón para dar el producto final 2-hidroxibifenil (Oldfield y col., 1997; Xi y col., 1997).

Por los resultados de experimentos hechos con ^{18}O marcado radiactivamente se ha concluido que los átomos de oxígeno incorporados en cada paso de la secuencia DBT/DBTO/DBTO₂/HBFSi/HBF provienen de átomos de oxígeno molecular (van Afferden y col., 1993; Oldfield y col., 1997). Por lo que se ha propuesto que la estequiometría total de las reacciones involucradas en la biodesulfuración del DBT podrían ser:



En la figura 2.2 se esquematiza de manera completa la ruta de desulfuración de dibenzotiofeno representándose la oxidación sucesiva de DBT a DBTO y DBTO₂, la conversión posterior del DBTO₂ a HBFSi y finalmente la desulfuración de este compuesto para dar como productos finales al HBF y SO₃²⁻.

2.6 RUTA BIOQUÍMICA DE DESULFURACIÓN EN HONGOS

En el caso de los hongos no se conocen datos experimentales sobre los genes involucrados en la desulfuración de DBT. Sin embargo, los datos disponibles indican que en los hongos es común encontrar una ruta de oxidación de dibenzotiofeno hasta DBT sulfona, la cuál equivale a la primera etapa de la ruta bioquímica de desulfuración de DBT descrita para *Rhodococcus* sp IGTS8. La ruta de oxidación reportada para *Cunninghamella elegans* ATCC 36112 implica en primer lugar la oxidación de DBT hasta DBT sulfóxido y posteriormente la oxidación de DBT sulfóxido hasta DBT sulfona (Crawford y Gupta, 1990; Schlenk y col., 1994). Los datos experimentales reportados señalan que la enzima

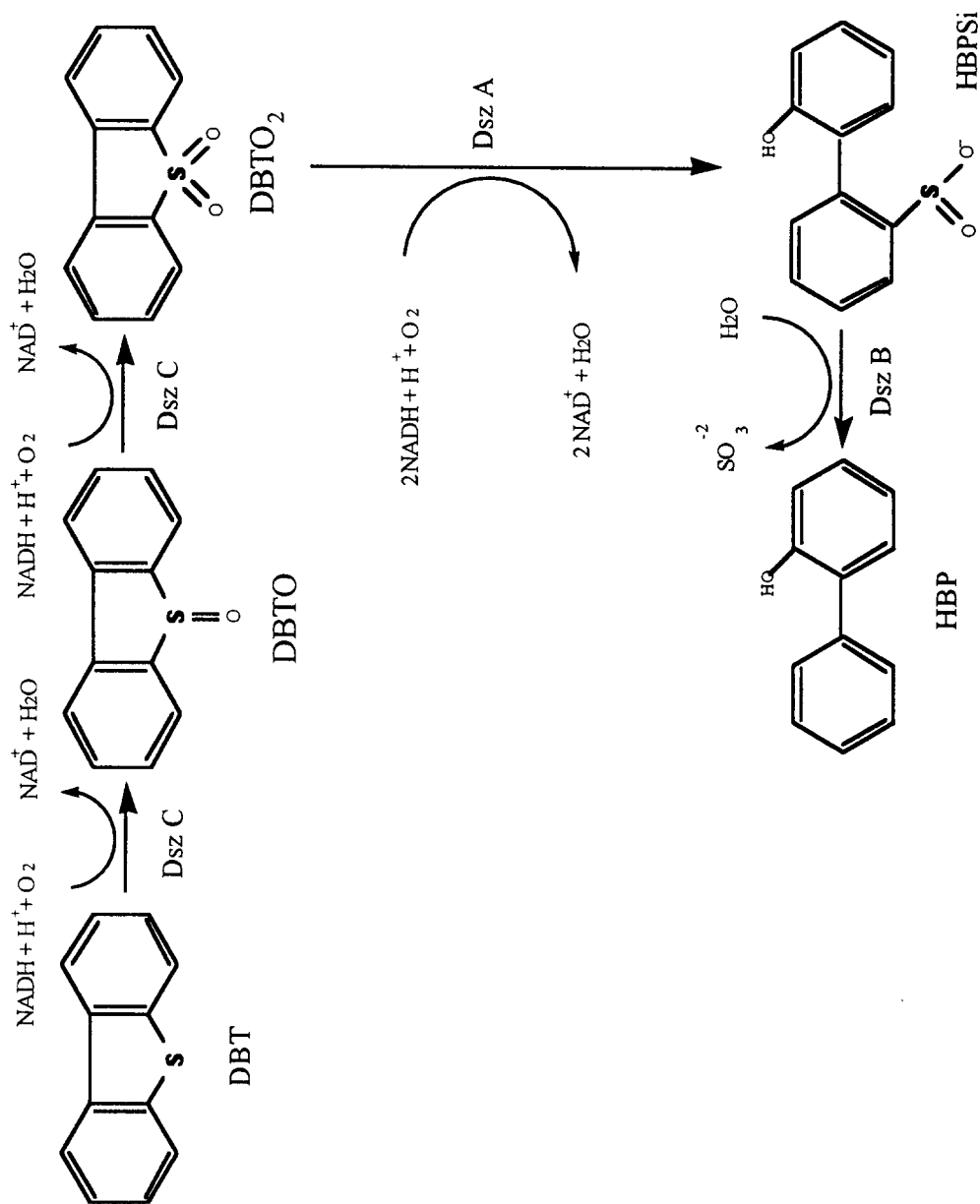


Figura 2.2. Ruta metabólica de la desulfuración de DBT a HBP y sulfito por *Rhodococcus* sp., cepa IGTS8. DBT: Dibenzotiofeno; DBTO: Dibenzotiofeno sulfóxido; DBTO₂: Dibenzotiofeno sulfonato; HBPSi: 2(2'-hidroxifenil)benzeno sulfinato; HBP: Hidroxibifenil (Oldfield y col., 1997).

responsable de ambas etapas de oxidación es el citocromo P450 el cuál es clasificado como una monooxigenasa (Schlenk y col., 1994). La misma ruta de oxidación de DBT se reporta para el hongo *Pleurotus ostreatus* (Bezalel y col., 1996) sin embargo no se indica el tipo de enzimas involucradas en la oxidación. Faison y col. (1991) reportaron la desulfuración de Dibenzotiofeno por el hongo *Paecilomyces* sp siendo el dihidroxibifenil el producto final de la desulfuración. Sin embargo no mencionan ni las enzimas ni los intermediarios de la ruta de desulfuración de este hongo.

2.7 ANTECEDENTES DE TRABAJOS DE DESULFURACION CON BACTERIAS

Los estudios de biodesulfuración de dibenzotiofeno se han realizado principalmente en bacterias. Los géneros reportados se muestran en el cuadro 2.5. Como se puede observar, salvo las bacterias del género *Desulfovibrio*, que son anaerobias, el resto de los microorganismos reportados son aerobios. La mayor parte de estudios sobre la bioquímica y la genética de la desulfuración biológica de DBT se han realizado con las especies *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 y *Rhodococcus erythropolis*.

Cuadro 2.5.- Géneros de bacterias reportados en estudios de biodesulfuración.

Género	Referencia
<i>Pseudomonas</i>	Monticello y col., 1985; van Afferden y col., 1992; Setti y col., 1995
<i>Corynebacterium</i> SY1	Omori y col., 1992
Oil -2	Khalid y col., 1991
<i>Brevibacterium</i>	van Afferden y col., 1992
<i>Arthrobacter</i> sp	Lee y col., 1995
<i>Sulfobolus brierly</i>	Khalid y col., 1992
<i>Desulfovibrio</i>	Armstrong y col., 1995
<i>R. rhodochrous</i> IGTS8	Kilbane y Jackowski, 1992; Denome y col., 1993; Kayser y col., 1993; Olson y col., 1993; Denome y col., 1994; Oldfield y col., 1997; Xi y col., 1997
<i>R. erythropolis</i>	Izumi y col., 1994; Wang y Krawiec, 1994; Ohshiro y col., 1995; Li y col., 1996; Ohshiro y col., 1996

La mayoría de los trabajos reportados, se han realizado en cultivo líquido donde el DBT se adicionó al medio en forma de polvo, o bien, disuelto en algún solvente orgánico.

Se ha estudiado el efecto de los *n*-alcanos sobre la actividad de biodegradación y biodesulfuración de DBT por los microorganismos utilizados (Setti y col., 1995; Ohshiro y col., 1995). En estos trabajos la presencia de *n*-alcanos mejoró la biodesulfuración y degradación del compuesto. Los autores de ambos estudios coinciden en señalar que estos hidrocarburos facilitan el contacto entre las células y el DBT, posiblemente formando una capa alrededor del DBT que favorece el contacto entre la bacteria y la molécula, incrementando de esta manera la disponibilidad del DBT tanto para su degradación como para su desulfuración.

Los estudios bioquímicos sobre la biodesulfuración de DBT con diversas bacterias han permitido establecer que aquellos microorganismos que presentan el fenotipo Dsz^+ no utilizan este compuesto como fuente de carbono. Asimismo, tienen la capacidad para desulfurar análogos del DBT metilados así como moléculas con estructura semejante. También se ha encontrado que la actividad de desulfuración es reprimida en presencia de aminoácidos azufrados, sulfato de sodio y ácido metanolsulfónico y que los productos finales de la biodesulfuración, el hidroxibifenil y el dihidroxibifenil, inhiben de un 70% a un 80% la actividad enzimática de biodesulfuración a concentraciones de 1.0 mM. En estos trabajos se ha señalado que la remoción de azufre está sujeta a los requerimientos de azufre de los microorganismos. La aplicación de diversas técnicas para la identificación de los intermediarios de la biodesulfuración del DBT en los cultivos de desulfuración, ha permitido establecer el tipo y la secuencia de las reacciones químicas que permiten la eliminación enzimática y selectiva del azufre del DBT. De tal manera que para los diferentes organismos estudiados (ver cuadro 2.5) la ruta de desulfuración propuesta consiste en la oxidación secuencial de DBT a DBTO y DBTO₂, HBPSi (hidroxibifenil benceno sulfinito) y finalmente HBF (Kayser y col., 1993; Omori y col., 1992; Olson y col., 1993; Wang y Krawiec, 1994; Lee y col., 1995; Ohshiro y col., 1996).

Del conjunto de estas investigaciones realizadas en el transcurso de aproximadamente 10 años, ha sido posible establecer que el fenotipo de desulfuración Dsz^+ corresponde al metabolismo tipo III de DBT (pags. 9 a 10), en el que se lleva a cabo el rompimiento selectivo de los enlaces carbono-azufre de la molécula de DBT. Este metabolismo implica la desulfuración selectiva de la molécula de DBT sin romper los enlaces carbono-carbono

de la molécula y por lo tanto, sin disminuir su potencial calorífico (Omori y col., 1992; van Afferden y col., 1992).

Por otro lado, los estudios de cinéticas de desulfuración han señalado que existe una relación entre crecimiento bacteriano y desaparición de DBT reportando que, en los cultivos, coinciden los tiempos de máximo crecimiento con la mayor concentración de DBT desulfurado. Los porcentajes de remoción de azufre del DBT reportados para diversas bacterias, varían de 1.14% hasta 100%. Es difícil comparar estos valores, ya que en los diversos trabajos revisados, las concentraciones iniciales de DBT son muy variadas, generalmente de 0.23 a 0.5 g/l en los medios de cultivo. De igual manera, las concentraciones iniciales de biomasa así como el tiempo de cultivo varía de un estudio a otro, lo que impide la comparación confiable de los resultados obtenidos en trabajos con diferentes microorganismos (Khalid y col., 1991; Omori y col., 1992; Izumi y col., 1994; Armstrong y col., 1995; Lee y col., 1995; Ohshiro y col., 1995).

En el área de Biología molecular, los estudios realizados han permitido aislar, identificar y caracterizar a los genes y productos de los genes responsables del fenotipo Dsz^+ (ver pags. 12 - 17), así como las zonas de ADN que están involucradas en su regulación y su ubicación en el genoma bacteriano (Denome y col., 1993; Piddington y col., 1993; Denome y col., 1994; Li y col., 1995; Oldfield y col., 1997; Xi y col., 1997).

En cuanto a sistemas biológicos de desulfuración alternativos, Khalid y col. (1991) realizaron un estudio de biodesulfuración en sistemas líquidos con petróleo, (1 volumen de petróleo por 20 de medio) en lugar de DBT como sistema modelo de desulfuración. Los autores reportaron una remoción de azufre de 65 % sin especificar si la desulfuración fue selectiva o destructiva ni los intermediarios o producto final del proceso. También se han utilizado enzimas portadoras de grupo hemo (mioglobinas, hemoglobina y peroxidasa) de origen animal y vegetal. Estas enzimas fueron encapsuladas y se utilizaron como biocatalizadores para desulfurar el DBT. En este trabajo, el azufre de la molécula del DBT fue oxidado hasta las formas de DBT sulfóxido y DBT sulfona. Estos resultados son similares a los obtenidos en los estudios de desulfuración con hongos (Wu y col., 1994).

2.8 ANTECEDENTES DE TRABAJOS DE DESULFURACIÓN CON HONGOS.

La capacidad degradativa de hidrocarburos aromáticos policíclicos observada en hongos, despertó el interés de evaluar este tipo de microorganismos usando como sustrato una amplia variedad de moléculas de este tipo. De este modo se ha evaluado la posibilidad de utilizarlos en la desulfuración de moléculas como el DBT, encontrándose que presentan capacidad oxidativa para producir sulfóxido y sulfona. Sin embargo los trabajos hasta ahora reportados son escasos; éstos se presentan a continuación.

222478

Crawford y Gupta (1990) trabajaron con el hongo *Cunninghamella elegans* (ATCC 36112) e investigaron su metabolismo para el DBT. Para evaluar las concentraciones de DBT y cualquiera de sus productos de oxidación, los autores tomaron muestras de los cultivos a diferentes intervalos de tiempo y los analizaron por HPLC. Los autores encontraron que la concentración de DBT en el medio disminuyó de 90 ppm a 2.4 ppm después de 24 horas de cultivo, llegando a una concentración de 0.72 ppm después de 7 días de incubación. Los metabolitos detectados a las 24 horas, además del DBT, fueron DBTO y DBTO₂. La identidad de los productos de oxidación fue confirmada por la comparación con sus estándares de sus cromatogramas, tiempos de retención y espectro en luz ultravioleta. Del mismo modo hicieron análisis por RMN y análisis espectrofotométricos de los metabolitos aislados de los medios de cultivo. La concentración de DBT sulfona a los 7 días fue de 0.8 ppm. Los autores proponen que posiblemente este bajo nivel de DBTO₂ se debe a su adsorción sobre el micelio del hongo. Las extracciones con etil acetato del micelio del hongo contenían DBT, DBTO y DBTO₂ en proporción de 1:10:1 respectivamente. La concentración calculada de DBT y DBTO₂ que pudo extraerse de micelio de 1 semana de crecimiento fue de 0.44 mg de DBT (2.4% de la concentración inicial de DBT) y 0.66 mg de DBTO₂. El metabolismo de DBTO y DBTO₂ por *Cunninghamella elegans* fue estudiado utilizando estos compuestos como sustrato para el hongo en lugar de DBT. El DBTO fue oxidado a DBTO₂, pero éste no fue transformado a ningún otro derivado bifenil. Sin embargo, hubo disminución en las concentraciones cuantificadas de DBTO₂ posiblemente debido a la adsorción del compuesto sobre el micelio. A partir de los resultados obtenidos, los autores proponen para el DBT la siguiente ruta en *C. elegans*:



Posiblemente la enzima responsable sea un citocromo P450. Los autores proponen que la incapacidad del microorganismo para desulfurar el DBT oxidado hasta DBT sulfona es debido a que carece de las enzimas necesarias para ello o a los efectos inhibitorios que pudiera tener el DBT sobre ciertas enzimas particulares.

Faison y col. (1991), trabajaron con el hongo *Paecilomyces sp*, aislado de muestras de carbón en el estado de Texas. Los autores reportaron que *Paecilomyces* pudo crecer con sulfito, tiosulfato, azufre elemental y sulfuro respectivamente como única fuente de azufre a concentración de 2 mM. Los autores señalan que esos datos sugieren que *Paecilomyces* es versátil respecto a su metabolismo de azufre y tiene la capacidad para utilizar el azufre reducido parcialmente. También señalan que observaron crecimiento de micelio sobre partículas insolubles de azufre elemental. Por esta forma de crecimiento los autores proponen la existencia de enzimas extracelulares o asociadas a superficie de membrana que metabolizan el azufre. En análisis por cromatografía en capa fina de los extractos de los cultivos del hongo con DBT como sustrato, identificaron DBT sulfona y 2,2-hidroxi-bifenil. Sin embargo, al analizar por cromatografía de gases los mismos extractos solamente identificaron dibenzotiofeno y bifenil. Basándose en estos datos, los autores señalan que *Paecilomyces sp* desulfura selectivamente la molécula de dibenzotiofeno sin romper el esqueleto de carbono. Los datos publicados en este trabajo son de orden cualitativo, sin embargo, los autores señalan que el balance de masa que realizaron indica que de un 22% a un 28% del sustrato es convertido. En este trabajo comentan que la glucosa inhibió la actividad enzimática contra el DBT. Los autores señalan que en la ruta metabólica de *Paecilomyces sp* al parecer hay una oxidación del azufre del DBT hasta DBT sulfona y posteriormente ocurre la formación del 2,2-hidroxi-bifenil.

Schlenk y col. (1994) realizaron un estudio sobre la S-oxidación de DBT por *C. elegans*. Los autores señalan que en cultivos con DBT como sustrato, el principal metabolito fue el DBTO a las 24 horas ya que el DBTO₂ se detectó a concentraciones menores. Debido a que el DBTO se detectó desde el comienzo del cultivo, mientras que el DBTO₂ se detectó hasta las 24 horas, el DBTO se utilizó para medir la actividad azufre-oxidasa. Los autores reportaron una disminución significativa en la concentración de DBTO cuando los cultivos

se incubaron con inhibidores del citocromo P450. Los filtrados enzimáticos libres de células no pudieron catalizar la sulfoxidación de DBT. La co-incubación con sustratos para flavin monooxigenasas también ocasionaron una disminución en la sulfoxidación de DBT. En estudios previos con estimuladores del citocromo P450, se ha incrementado la tasa de sulfoxidación de DBT. La disminución en la sulfoxidación del DBT en presencia de inhibidores del citocromo P450 indica su participación en la formación de DBTO. Se sabe que el citocromo P450 tiene una participación importante en la hidroxilación de numerosos hidrocarburos aromáticos policíclicos. Los resultados de este trabajo indican que una flavin monooxigenasa podría tener una participación mínima en la oxidación del azufre del DBT.

Bezalel y col. (1996) trabajaron con el hongo *Pleurotus ostreatus* En este trabajo el objetivo de los autores fue encontrar los metabolitos de la mineralización de hidrocarburos aromáticos policíclicos por lo que utilizaron como sustrato diferentes moléculas de este grupo incluido el DBT. Los autores reportaron que aproximadamente el 84% del DBT adicionado al cultivo fue metabolizado. El análisis de los metabolitos producidos reveló que el principal metabolito fue DBTO y en menor concentración el DBTO₂. La identidad de ambos compuestos fue confirmada por la comparación con estándares de sus tiempos de retención en HPLC, absorbancia en UV y propiedades en cromatografía de gases-espectrometría de masas. Basándose en estos resultados, los autores plantearon que la oxidación de DBT a DBT sulfona es catalizada por una monooxigenasa, citocromo P450, al igual que con *C. elegans*. Asimismo los autores señalaron que es posible que este hongo mineralice al DBT hasta convertirlo en CO₂.

3. JUSTIFICACIÓN

Los compuestos que contienen azufre orgánico e inorgánico se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza. Cuando los materiales que lo contienen son utilizados, en un proceso de combustión para generar energía, producen SO_2 , el cual es arrastrado por los gases de combustión a la atmósfera. Al respecto, el contenido de azufre en los crudos mexicanos varía de un 0.9% a un 7.0 %. De este azufre, alrededor del 40% se encuentra unido a moléculas orgánicas, siendo la más representativa el dibenzotiofeno (DBT), razón por la cuál el DBT se utiliza como compuesto modelo en estudios de biodesulfuración. Los estudios con microorganismos han permitido encontrar bacterias y hongos que tienen las enzimas específicas para eliminar el azufre de ésta molécula organoazufrada. Sin embargo, los requisitos necesarios para desarrollar una tecnología aplicada a la desulfuración a saber: especificidad de sustrato, resistencia a la inhibición o toxicidad por producto final, resistencia a la naturaleza áspera del petróleo y la conservación del poder calorífico de la molécula, no han logrado ser conjuntados para el diseño de un proceso de biodesulfuración. En la actualidad, la mayoría de los estudios de biodesulfuración han sido realizados con bacterias, lo que ha permitido conocer la ruta bioquímica de desulfuración del dibenzotiofeno. Por otra parte, el estudio de la biodesulfuración del DBT por hongos ha sido poco estudiado y el inicio del estudio de estos microorganismos surgió a partir de su capacidad de degradación y biotransformación de moléculas del petróleo con estructuras aromáticas policíclicas condensadas como el DBT, así como por su capacidad desulfurante. De esta manera, éste trabajo se orienta a contribuir a los estudios de biodesulfuración de combustibles fósiles por hongos, utilizando como compuesto modelo al DBT, aislando de suelos y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos, hongos con capacidad de crecer en presencia de DBT y seleccionando aquellos que lleven a cabo algún tipo de metabolismo sobre esta molécula.

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la actividad de desulfuración de Dibenzotiofeno en hongos aislados de suelos y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos derivados del petróleo.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Aislar de suelos y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos hongos tolerantes a dibenzotiofeno (DBT).
2. Establecer las técnicas analíticas para la cuantificación y extracción de DBT.
3. Evaluar en los microorganismos aislados la capacidad para metabolizar la molécula de dibenzotiofeno (desulfuración u oxidación).

5. MATERIALES Y MÉTODOS.

Microorganismos

5.1 *Muestreo en campo.*

Las muestras de suelos se tomaron en las instalaciones petroleras ubicadas en: Distrito Federal, Veracruz, Oaxaca y Guanajuato. Para ello se procedió de la siguiente manera: se eligieron las zonas destinadas al almacenamiento de hidrocarburos y áreas contaminadas con éstos. Se tomaron muestras de los primeros 15 centímetros superficiales, se guardaron en frascos estériles y se refrigeraron a 4° C durante su transporte al laboratorio. Una vez en el laboratorio se mantuvieron en refrigeración (4° C) para su posterior utilización. Las muestras de sedimento marino fueron proporcionadas por el laboratorio de microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

5.2 *Microorganismos*

Se trabajó con la cepa de colección *Cunninghamella elegans* (ATCC 36112) y además con dos consorcios microbianos y 5 cepas de hongos aislados de suelos y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos y posteriormente identificados, como se detalla más adelante.

5.3 *Químicos*

El dibenzotiofeno, DBT sulfona, 2-hidroxibifenil y antraceno fueron adquiridos de laboratorios Aldrich, con un grado de pureza de 99% excepto la DBT sulfona con un grado de pureza de 97%. El tolueno y diclorometano utilizados fueron grado HPLC de los laboratorios Sigma. Las sales utilizadas para los medios de cultivo fueron grado reactivo. La sal de salina utilizada para el aislamiento de hongos de sedimentos marinos fue proporcionada por el laboratorio de Microbiología Marina del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología de la UNAM.

5.4 *Medios de cultivo:*

Medio A.-Medio de cultivo para el aislamiento y crecimiento de hongos de suelos contaminados con hidrocarburos: Se utilizó un medio mineral sin azufre que contiene por litro: 5 g de glucosa; 0.5 g de KH_2PO_4 ; 4 g de K_2HPO_4 ; 1 g de NH_4Cl , 0.2 g de

MgCl₂·7H₂O; 0.02 g de CaCl₂, 0.01 g de NaCl, y 10 ml de solución de elementos traza. Para medio sólido se adicionaron 15 g de agar. La solución de elementos traza contiene en g/l: 0.5 g de FeCl₂·4H₂O; 0.5 g de ZnCl₂; 0.05 g de MnCl₂·4H₂O, 0.1 g de Na₂MoO₄·2H₂O; 0.05 g de CuCl₂ y 0.05 g de Na₂WO₄·2H₂O. El pH se ajustó a 5.0 con HCl.

Se adicionó como agente antibacteriano cloranfenicol a concentración de 35 mg/l.

En el caso de medio sólido el DBT se adicionó a las placas disuelto en etanol absoluto en una concentración de 1g/l (1 ml por caja). Cuando se realizaron cultivos líquidos se adicionó DBT en forma de cristales en concentración de 1 g/l.

Medio B.- Medio de cultivo para el aislamiento de hongos de sedimentos marinos con hidrocarburos: Se utilizó un medio mineral sin azufre que contiene por litro: 5 g de glucosa; 0.5 g de KH₂PO₄; 4 g de K₂HPO₄; 1 g de NH₄Cl, 0.2 g de MgCl₂·7H₂O; 0.02 g de CaCl₂, 0.01 g de NaCl. 15 g de agar y 15 g de sal de salina en lugar de la solución de elementos traza. El pH se ajustó a 5.0 con ácido láctico. Como agente antibacteriano se adicionó cloranfenicol a concentración de 35 mg/l.

El DBT se adicionó a las placas disuelto en etanol absoluto en una concentración de 1g/l (1 ml por caja).

Medio C.- Medio de cultivo para el aislamiento y crecimiento de consorcios microbianos de suelos contaminados con hidrocarburos: Se utilizó medio mineral sin azufre el cual contiene por litro: 5 g de glucosa; 0.5 g de KH₂PO₄; 4 g de K₂HPO₄; 1 g de NH₄Cl, 0.2 g de MgCl₂·7H₂O; 0.02 g de CaCl₂, 0.01 g de NaCl y 10 ml de solución de elementos traza. La solución de elementos trazas contiene en g/l: 0.5 g de FeCl₂·4H₂O; 0.5 g de ZnCl₂; 0.05 g de MnCl₂·4H₂O, 0.1 g de Na₂MoO₄·2H₂O; 0.05 g de CuCl₂ y 0.05 g de Na₂WO₄·2H₂O. El pH del medio se ajustó a 7.0.

El DBT se adicionó a los matraces en una concentración de 1g/l en forma de cristales.

Medio D.- Medio de cultivo para la propagación y conservación de la cepa *Cunninghamella elegans* ATCC 36112. La cepa se propagó y se conservó en tubos de rosca inclinados con Agar Papa-dextrosa.

Aislamiento de microorganismos.

5.5 Hongos

Se suspendió 1 g de suelo de muestra (suelo o sedimento marino) en 9 ml de solución salina estéril (0.85 %). La solución se homogeneizó por agitación y se hicieron diluciones hasta 1/10000. De cada dilución se tomaron alícuotas de 0.1 ml de esta solución y se inocularon, por triplicado, cajas de Petri con el medio A. Después de un periodo de incubación a 30° C durante 6 días se hicieron resiembras por punción bajo las mismas condiciones de las colonias obtenidas hasta obtener cultivos puros (Pepper y col., 1995).

Una vez obtenidos los cultivos puros se conservaron en refrigeración. En el caso de las muestras de sedimento marino se utilizó el medio B y fue necesario incubar por un periodo de 15 días.

5.6 Consorcios microbianos.

Se pesó 1 g de suelo de cada zona de muestreo, se adicionó a 9 ml de solución salina estéril y se agitó en vortex. Posteriormente se transfirió 1.0 ml de la suspensión a matraces con el medio C. Después de una semana de incubación se hicieron cuatro resiembras sucesivas bajo las mismas condiciones utilizando como inóculo los cultivos anteriores. Al término de cada periodo de incubación se tomaron alícuotas de 0.1 ml y se sembraron en cajas de Petri con el medio C. Posteriormente se incubaron las cajas a 30°C durante 7 días, al término de este tiempo las cajas se mantuvieron en refrigeración.

5.7 Identificación de cepas aisladas.

Las cepas puras de los hongos aislados de las muestras de suelos y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos, se identificaron por el análisis y comparación de su perfil de ácidos grasos realizado en los laboratorios Microbial ID Inc. en Newark, Estados Unidos.

5.8 Selección de cepas con capacidad para metabolizar el Dibenzotiofeno.

Se realizaron por separado cultivos líquidos con los microorganismos aislados de las muestras de suelos y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos (cepas puras y

Condiciones de cultivo.- Los cultivos líquidos se hicieron en matraces Erlenmeyer de 250 ml, con 50 ml. de medio A para las cepas puras, de medio B para las cepas aisladas de sedimentos marinos y del medio C para los consorcios microbianos, en una agitadora-incubadora orbital, a 150 r.p.m. y una temperatura de 30°C durante 15 días. Al término de este periodo se realizó la extracción de DBT y sus metabolitos y las muestras se analizaron por cromatografía de gases.

Métodos analíticos. Dibenzotiofeno

Extracción de DBT.

Se probaron por separado al tolueno y al diclorometano como agentes de extracción del DBT y sus metabolitos en los cultivos con biomasa. En ambos métodos el paso de acidificación previo a la extracción con el solvente permite mejorar la solubilidad de los productos ácidos al protonarlos (Faison y col., 1991). El antraceno se utilizó en ambos métodos como estándar interno. Las extracciones se realizaron en cultivos sin biomasa y se determinó el porcentaje de pérdida del compuesto con cada uno de los métodos probados. Las concentraciones de DBT evaluadas fueron: 0, 0.4, 0.8 y 1.0 g/l para el método del tolueno y 0, 0.5 y 1.0 g/l para el método de Diclorometano.

5.9 Método del Tolueno

El método de extracción con tolueno del DBT y sus metabolitos fue destructivo y total. El procedimiento fue el siguiente: una vez acidificados los cultivos a pH 2.0 con HCl 1N, el volumen total de cada matraz se pasó a embudos de extracción, donde se adicionaron 20 ml de una solución Antraceno/tolueno (Ant/Tol) 1g/l. Después se dejó reposar hasta la separación de fases. La fase orgánica se recuperó en un matraz y se le adicionó sulfato de sodio como agente secante. Finalmente se filtró con un filtro Whatman GF-GC para el posterior análisis del filtrado.

5.10 Método del Diclorometano.

La extracción del DBT y sus metabolitos fue total y destructiva. El procedimiento fue el siguiente: los cultivos se acidificaron a pH 2.0 con HCl 2N. El volumen total de cada matraz (50 ml) se pasó a embudos de extracción donde se adicionaron 60 ml de

diclorometano. El embudo se agitó vigorosamente y se dejó reposar hasta la separación de fases. La fase orgánica se recuperó en un matraz y se le adicionó sulfato de sodio anhidro como agente secante. Posteriormente se filtró con filtros de fibra de vidrio Whatman. El filtrado se recuperó en matraces de bola y con ayuda de un rotovapor se concentró hasta 5 ml. El concentrado se pasó a frascos viales con ayuda de una pipeta Pasteur y se secó bajo una corriente de nitrógeno. Los sólidos obtenidos se resuspendieron en 20 ml de solución Ant/Tol (1g/l) para su posterior análisis.

5.11 Método en cromatógrafo de gases para la identificación de Dibenzotiofeno y sus metabolitos.

La identificación de dibenzotiofeno, dibenzotiofeno sulfona y 2-hidroxibifenil se realizó por cromatografía de gases en un Cromatógrafo de gases Perkin Elmer 8000 equipado con detector de ionización de flama, en el IMP. La columna utilizada fue una Alltech Cat. 16843, Heliflex AT-1, RS-L-1601, serial S635; con 30 m de longitud, diámetro interno de 0.53 mm y tamaño de la partícula de 0.5 micrones. Se utilizó helio como gas acarreador. El programa de temperatura fue de 180° C durante un minuto, seguido por una velocidad de rampa de 10° C/min. hasta llegar a una temperatura de 235° C, con un tiempo total de 7 minutos. Las temperaturas del inyector y del horno se mantuvieron a 285° C. El tiempo de retención para el antraceno y dibenzotiofeno fue de 4.2 y 4.7 minutos respectivamente.

Para la identificación de DBT sulfona se utilizó el siguiente métodos: la temperatura del inyector y del detector se mantuvo en 350° C, la temperatura inicial del horno fue de 180° C durante 1 minuto con una velocidad de rampa de 10°C/ minuto hasta alcanzar los 235°C y de 20°C/min. hasta alcanzar los 300° y el tiempo de corrida fue de 10.2 min. Los tiempos de retención del 2-hidroxibifenil, dibenzotiofeno, antraceno y dibenzotiofeno sulfona fueron de 3.2, 5.4 5.8 y 8.7 minutos respectivamente. En todos los casos el volumen de muestra inyectado fue de 0.6 µl, independientemente que la extracción se haya realizado por el método del tolueno o diclorometano.

5.12 Cuantificación de DBT

Para la cuantificación de DBT se realizaron curvas patrón de relación masa/masa de DBT/ y Antraceno. Se trabajó con concentraciones de DBT de 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8,

0.9 y 1.0 g/l. En esta etapa se establecieron las condiciones para la curva patrón y la máxima concentración de DBT que se podía leer en el cromatógrafo de gases con una respuesta lineal.

5.13 *Cuantificación de DBT sulfona.*

Para la cuantificación de DBT sulfona se realizaron curvas patrón de relación masa/masa de DBT sulfona/ y Antraceno. Se trabajó con concentraciones de DBT sulfona de 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 g/l.

5.14 *Cinéticas de desulfuración*

222478

Para las cinéticas de desulfuración se utilizaron a los microorganismos aislados y seleccionados previamente y la cepa de colección *Cunninghamella elegans* (ATCC 36112). Las cinéticas se realizaron en matraces Erlenmeyer de 250 ml con 50 ml del medio A para los hongos, medio B para la levadura y medio C para los consorcios microbianos. El cultivo se realizó en una agitadora incubadora orbital, con una agitación de 150 r.p.m. a 30 °C durante 30 días. La cinéticas se hicieron por duplicado. Se tomaron muestras cada 5 días hasta los 20 días de cultivo y posteriormente hasta los 30 días de cultivo. En cada tiempo de muestreo se realizaron las extracciones de Dibenzotiofeno y sus metabolitos y se analizaron por cromatografía de gases

5.15 *Otros*

Consumo de glucosa por microorganismos

El consumo de glucosa se cuantificó utilizando el paquete para diagnóstico enzimático de glucosa en suero GOD-PAP de Laboratorios Lakeside.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS DE SUELOS Y SEDIMENTOS MARINOS CONTAMINADOS CON HIDROCARBUROS.

En el cuadro 6.6 se señalan los microorganismos aislados de las muestras de suelos y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos. Una vez aislados los microorganismos fueron identificados por análisis y comparación de su perfil de ácidos grasos (Microbial Inc. Newark, E.U), excepto los consorcios microbianos. El aislamiento de los microorganismos se llevó a cabo según los parámetros de selección reportados para el aislamiento de microorganismos tolerantes y con capacidad de desulfuración de DBT (Omori y col., 1992; Olson y col., 1993; Izumi y col., 1994; Wang y Krawiec, 1994; Lee y col. 1995).

Cuadro 6.6. - Microorganismos aislados de muestras de suelos y sedimentos marinos de diferentes regiones del país, contaminados con hidrocarburos. (MO: Microorganismos).

Origen de Muestra	Número de MO aislados	Nombre
Azcapotzalco, Distrito Federal	2	<i>Aspergillus fumigatus</i>
		<i>Aspergillus</i> sp N-02
Salamanca, Guanajuato	1	<i>Phoma</i> sp
Minatitlán, Veracruz	2	<i>Aspergillus</i> sp A-01
		<i>Aspergillus</i> sp B-03
Sedimentos Marinos	1	<i>Rhodotorula rubra</i>
Salina Cruz, Oaxaca	2	Consorcio I
		Consorcio II

HONGOS

Se aislaron hongos de las muestras de suelos de las refinerías de Veracruz, Guanajuato, Distrito Federal y de los sedimentos marinos de la zona denominada 45. De la refinería de Azcapotzalco D.F., se aislaron dos cepas de hongos identificados como *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus* sp N-02 (su especie no fue identificada). En cultivos en placa con

medio A y DBT como única fuente de azufre, la cepa identificada como *Aspergillus fumigatus* presentó crecimiento rápido, inicialmente se observaron colonias circulares de color blanco con crecimiento filamentoso superficial, pronto adquirieron un color negro y no se observó la formación de esporas. En cultivo líquido medio A y DBT como única fuente de azufre), se observó micelio de color blanco, la formación de pellets, pigmentación negra a los tres días y tampoco se observó la formación de esporas. En cuanto a la cepa *Aspergillus* sp N-02, al crecer en placas con medio A y DBT como única fuente de azufre se observó crecimiento filamentoso, colonias circulares blancas y la aparición de un pigmento negro en la orilla de las colonias a los tres días de crecimiento, no se observó la formación de esporas. Al crecer en cultivos líquidos con medio A y DBT como única fuente de azufre se observó el crecimiento de micelio blanco, formación de pellets y la aparición de esporas negras a los seis días de cultivo; en cultivos líquidos no se observó la aparición de pigmento negro. De las muestras de suelos contaminados con hidrocarburos obtenidas de la refinería de PEMEX localizada en Minatitlán, Veracruz se aislaron dos cepas de hongos pertenecientes al género *Aspergillus* sin que fuera posible determinar la especie a la cuál pertenecen. La cepa denominada *Aspergillus* sp B-03 al crecer en placas con medio A y DBT como única fuente de azufre presentó crecimiento filamentoso, formación de colonias circulares blancas sin formación de esporas. En cultivos con medio líquido (medio A y DBT como única fuente de azufre) se observó la formación de pellets de micelio de color blanco y la formación de esporas negras a los seis días de cultivo. La cepa denominada *Aspergillus* sp A-01 al crecer en placas con medio A y DBT como única fuente de azufre presentó crecimiento filamentoso, formación de colonias circulares inicialmente blancas, las cuáles adquirieron un color amarillo intenso a los dos días de incubación, hubo formación de esporas de color negro inmediatamente después de la aparición del pigmento amarillo. En cultivos líquidos la cepa *Aspergillus* sp A-01 presentó la formación de pellets de micelio color blanco, la aparición del pigmento amarillo se observó hasta los diez días de incubación y la formación de esporas negras se observó después de la aparición del pigmento.

La ubicación taxonómica del género *Aspergillus* según Alexopolus y Mims (1979) es la siguiente:

Reino	Mycetae (Hongos)
División	Amastigomycota
Subdivisión	Ascomycotina
Clase	Ascomycetes
Subclase	Plectomycetiae
Orden	Eurotiales
Familia	Eurotiaceae
Género	<i>Aspergillus</i>

El género *Aspergillus* está ampliamente distribuido desde las regiones árticas hasta los trópicos. En el suelo abundan las esporas de los *Aspergillus* pero no se sabe si estos hongos juegan un papel importante en la economía del suelo. Los *Aspergillus* son capaces de utilizar una enorme variedad de sustancias como alimentos por el gran número de enzimas que producen. Igualmente, es difícil encontrar un poco de materia orgánica y un poco de humedad sobre la cual los *Aspergillus* no puedan crecer. Ciertas especies del género *Aspergillus*, principalmente *Aspergillus fumigatus*, pueden causar el padecimiento denominado aspergilosis. La aspergilosis en pulmones es frecuente en aves, mamíferos y humanos. Comúnmente afecta los pulmones, los oídos, la piel o los bronquios, pero también puede afectar los huesos, las meninges y casi cualquier órgano del cuerpo. Se caracteriza por la presencia de lesiones inflamatorias granulomatosas en infecciones pulmonares que pueden resultar en la formación de aspergilomas. Las infecciones son clínicamente semejantes a otras infecciones micóticas o bacterianas. Los síntomas de la aspergilosis son semejantes a los de la tuberculosis. Frecuentemente la tuberculosis se ve complicada por la aspergilosis (Schneierson, 1965; Alexopolus y Mims, 1979). No es casual encontrar la presencia de hongos del género *Aspergillus* en las muestras de suelos contaminados con hidrocarburos. Radwan y col. (1995) reportaron la presencia de hongos del género *Aspergillus* en un estudio de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados con hidrocarburos. Del mismo modo Pritchard y col. (1995) señalan que microorganismos del género *Aspergillus* pueden crecer sobre hidrocarburos lineales y aromáticos, incluyendo a los aromáticos heterocíclicos que contienen azufre como el DBT. Respecto a esto, Laborde y Gibson (1977) han señalado que algunos hongos como *Aspergillus niger* oxidan tioésteres y sulfuros orgánicos cíclicos a sus correspondientes

sulfóxidos y sulfonas. Estos datos permiten suponer que si las cepas del género *Aspergillus* aisladas en este trabajo tienen capacidad de crecer en suelos contaminados con hidrocarburos es posible que metabolicen de alguna manera los hidrocarburos, incluida la desulfuración de dibenzotiofeno.

De las muestras de suelos contaminados con hidrocarburos de la refinería de PEMEX que se encuentra en Salamanca, Guanajuato se aisló una cepa que fue identificada como *Phoma* sp. Esta cepa presentó crecimiento filamentoso, formación de colonias circulares, adquisición de una coloración verde y posteriormente café del centro a la periferia conforme envejecían y no se observó la formación de esporas. Respecto a esta cepa no se encontró ningún antecedente que indique que este microorganismo sea utilizado en estudios de biorremediación o biotransformación de moléculas organoazufradas, sin embargo, por el hecho de haber sido aislado de las muestras de suelos contaminados con hidrocarburos y bajo las condiciones utilizadas para el aislamiento es posible que este hongo tenga la capacidad para metabolizar los compuestos organoazufrados del petróleo.

La ubicación taxonómica de estos microorganismos según Alexópulos y Mims (1979) es la siguiente:

Reino	Mycetae (Hongos)
División	Amastigomycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Deuteromycetes
Orden	Sphaeropsidales
Familia	Sphaeropsidaceae
Género	<i>Phoma</i>

La estructura distintiva de los Sphaeropsidales es el picnidio. El picnidio puede ser muy diferente de un género a otro. En la familia de los Sphaeropsidaceae los picnidios son oscuros, laterales, globosos, generalmente con una apertura circular. Esta familia contiene organismos saprófitos o especies de parásitos de plantas. *Phoma* es considerada parásito de plantas (Alexópulos y Mims, 1979).

De las muestras de sedimentos marinos se aisló a la levadura identificada como *Rhodotorula rubra* bajo las condiciones indicadas en Materiales y Métodos. A diferencia de las cepas aisladas de suelos, requirió de más del doble de tiempo de incubación (20 días) para que se observara crecimiento. En cultivos en placa con medio B y DBT, la cepa *Rhodotorula rubra* presentó crecimiento tipo filamentoso, formación de colonias circulares blancas que adquirieron una coloración rosa conforme envejeció la colonia hasta alcanzar un color naranja intenso a los 10 días de incubación. En cultivos en placa no se observó la formación de esporas. En cultivos líquidos con medio B y DBT como única fuente de azufre se observó la formación de pellets de color blanco que seguían el mismo patrón de pigmentación descrito anteriormente; en estos cultivos tampoco se observó la formación de esporas. La ubicación taxonómica de este microorganismo es la siguiente (Alexópoulos y Mims, 1979):

Reino	Mycetae (Hongos)
División	Amastigomycota
Subdivisión	Deuteromycotina
Clase	Deuteromycetes
Subclase	Blastomycetidae
Orden	Cryptococcales
Género	<i>Rhodothorula</i>

Los organismos de esta subclase pueden tener un soma formado por células de levadura con o sin pseudomicelio. Si llega a presentarse micelio verdadero se encontrará bien desarrollado. El orden Cryptococcales contiene a un grupo heterogéneo de microorganismos agrupados en una docena de géneros, que inicialmente se creía que eran formas imperfectas de levaduras de ascomicetos o basidiomicetos. La reproducción en este grupo es por gemación y ninguno de los organismos aquí clasificados forma balistosporas. Algunos forman pseudomicelio o verdadero micelio y algunos de estos forman arthosporas. Los cryptococcales son principalmente saprófitos, aunque se sabe de algunas especies que provocan enfermedades en humanos. Otros pueden ser usados como alimento y se ha probado que son una buena fuente de proteína y vitaminas. Asimismo, algunas de estas levaduras pueden ser cultivadas sobre materiales de deshecho como excremento

animal, basura, desechos y ciertos hidrocarburos. Los miembros del género *Rhodotorula* producen colonias rosas, naranjas o rojas. Según Alexópulos y Mims (1979) este género tiene poca o ninguna importancia económica para el hombre. Respecto a la cepa *Rhodotorula rubra*, Pritchard y col. (1995) mencionan que algunos miembros de este género pueden crecer sobre hidrocarburos lineales. Su aislamiento en este trabajo indica que posiblemente sea un poco más amplia su variedad de hidrocarburos que puede metabolizar y pueda utilizar compuestos heterocíclicos como el dibenzotiofeno.

CONSORCIOS.

De las muestras de suelos contaminados con hidrocarburos de la refinería de PEMEX localizada en Salina Cruz, Oaxaca se aislaron dos diferentes consorcios microbianos denominados Consorcio microbiano I y II (Cuadro 6.6). El crecimiento en placa de estos consorcios fue predominantemente filamentoso y se observó la presencia de micelio de diferentes tonalidades sin que se observara la formación de esporas. En cultivos líquidos con el medio C se observó crecimiento filamentoso, formación de pellets y medio líquido opaco, posiblemente por la presencia de bacterias.

Una vez aislados los microorganismos capaces de crecer en un medio en presencia de dibenzotiofeno como única fuente de azufre, la siguiente etapa fue evaluar la capacidad de estos microorganismos para metabolizar la molécula de dibenzotiofeno.

6.2 EXTRACCIÓN DE DIBENZOTIOFENO

Se evaluaron dos métodos para la extracción y posterior cuantificación de dibenzotiofeno: extracción con tolueno y extracción con diclorometano.

En el cuadro 6.7 se muestran los resultados de la recuperación y pérdida de DBT, utilizando como agente de extracción al tolueno. Como se observa, en todos los casos hubo pérdida del compuesto. La pérdida fue menor conforme se incrementó la concentración inicial de DBT. Esto puede explicarse considerando que mientras menor sea la concentración inicial cualquier pérdida es mas significativa que en los casos donde la concentración inicial es mayor. De hecho si se observan los valores de pérdida del compuesto en g/l se puede observar que son semejantes entre sí, del mismo orden de magnitud, pero el porcentaje que representan en cada caso varía en función de la concentración inicial.

Cuadro 6.7. – Porcentaje de DBT recuperado y pérdida de DBT por el método de extracción con **tolueno**. Los números entre paréntesis indican el número de repeticiones. D. E.: Desviación estándar.

Concentración inicial de DBT g/l	DBT				
	Recuperado g/l			Pérdida	
	Promedio	D. E	g/l	%	
(4) 0.4	0.32	0.049	0.08	20	
(6) 0.8	0.75	0.029	0.05	6.25	
(7) 1.0	0.95	0.039	0.05	5.0	
PROMEDIO				10	

En el cuadro 6.8 se muestran los resultados de la pérdida y recuperación de DBT utilizando diclorometano como agente de extracción. Como se puede apreciar en este caso los porcentajes de pérdida, así como sus valores en g/l, son mayores con respecto a los obtenidos con en el método del tolueno. Igualmente, los valores de las desviaciones estándar en cada uno de los resultados de la extracción de DBT con el método del diclorometano fueron mayores que las obtenidas con el método del tolueno. La mayor pérdida de compuesto con este método se puede explicar considerando que requiere de una mayor cantidad de pasos con respecto al método anterior lo que implica que en cada una de estas etapas del proceso de extracción o que en se va perdiendo parte del compuesto.

Cuadro 6.8. – Porcentaje de DBT recuperado y pérdida de DBT por el método de extracción con **diclorometano**. *:Promedio de tres repeticiones, D.E: Desviación estándar.

Concentración inicial de DBT g/l	DBT				
	Recuperado g/l			Pérdida	
	Promedio*	D. E	g/l	%	
0.5	0.28	0.015	0.32	44	
1.0	0.81	0.125	0.19	19	
PROMEDIO				32	

El método del tolueno resultó con menor pérdida de dibenzotiofeno, el promedio de la pérdida por extracción del compuesto fue de 10%. En este método hay una menor manipulación del cultivo y los extractos, lo que permite suponer que esto contribuye a que se tenga poca pérdida del compuesto. Por otro lado la extracción con diclorometano presentó pérdidas promedio de 32%. Esto posiblemente a que en este método se requieren de mas pasos para llevar a cabo la extracción.

En la bibliografía revisada se reportan los siguientes métodos de extracción:

Método	Referencia
Acetonitrilo	Wang y col., 1994
Cloruro de metileno	Lee y col., 1995
Metanol	Omori y col., 1992
Acetato de etilo	Crawford y Gupta, 1990
	Omori y col., 1992
	Schlenk y col., 1994
	Izumi y col., 1994
Diclorometano	Ohshiro y col., 1996
	Armstrong y col., 1995

En ninguna de estas referencias se encontraron datos sobre las pérdidas del compuesto por el método usado. En este trabajo, dada la diferencia encontrada según el método de extracción se decidió usar el método del tolueno que tuvo menor pérdida del compuesto.

6.3 SELECCIÓN DE MICROORGANISMOS

Con la finalidad de seleccionar de los microorganismos aislados aquellos que presentaran la capacidad de metabolizar DBT, se llevaron a cabo cultivos líquidos con DBT como sustrato para la biodesulfuración y Biotransformación. Los cultivos se hicieron por duplicado con una concentración inicial de DBT de 0.3 g/l y un tiempo de cultivo de 15 días. La extracción total de DBT se hizo al final del cultivo utilizando el método del tolueno. Los extractos se analizaron por cromatografía de gases y se compararon entre los

diferentes microorganismos estudiados. Los resultados se presentan en el cuadro 6.9. Los mayores porcentajes de desaparición de dibenzotiofeno, 68 % y 67 %, se observaron respectivamente en los cultivos de *Aspergillus sp A-01* y del Consorcio microbiano I. En el cultivo del consorcio microbiano II se cuantificó un 43% de desaparición de DBT; en el cultivo de la cepa *Aspergillus fumigatus* la desaparición fue 14% de dibenzotiofeno, las cepas *Aspergillus sp N-02* y *Aspergillus sp B-03* desaparecieron 16% de DBT cada una, en el cultivo de la cepa *Phoma sp* hubo una desaparición de DBT de 17% y finalmente en el cultivo de la cepa *Rhodotorula rubra* no hubo desaparición de DBT.

Cuadro 6.9.-Remoción de dibenzotiofeno por los microorganismos aislados de suelos y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos.

Nombre	Desaparición de Dibenzotiofeno	
	g/l	Porcentaje
<i>Aspergillus sp A-01</i>	0.20	68
<i>Aspergillus sp N-02</i>	0.05	16
<i>Aspergillus sp B-03</i>	0.05	16
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.03	14
<i>Phoma sp</i>	0.08	26
<i>Rhodotorula rubra</i>	0.00	0
Consorcio I	0.20	67
Consorcio II	0.13	43

La diferencia en la remoción de dibenzotiofeno en los cultivos de los diferentes microorganismos posiblemente es resultado de la capacidad metabólica característica de cada uno de estos microorganismos sobre esta molécula.

El valor de remoción en el cultivo del consorcio microbiano I posiblemente sea resultado de la acción de varios de los microorganismos que forman el consorcio. La menor cantidad de remoción de DBT en el consorcio microbiano II indica que posiblemente existan

diferencias en cuanto a la composición de organismos que lo forman con respecto al consorcio microbiano I.

En el cultivo de *Rhodotorula rubra* no hubo desaparición de DBT. Como se mencionó anteriormente los microorganismos de éste género pueden crecer solamente sobre hidrocarburos lineales y los resultados de este trabajo indican que tolera al DBT que es una molécula heterocíclica pero no tuvo la capacidad para metabolizarlo. Estas características hacen de *Rhodotorula rubra* un microorganismo con posibilidades de ser utilizado en estudios de biorremediación. En la página electrónica del Dynamic Underground Strippin Project: LLNL, que trata sobre biorremediación de suelos contaminados con gasolina (1998) señalan que los microorganismos dominantes en las muestras de suelos contaminados con hidrocarburos pertenecen al género *Rhodotorula*.

222478

Entre los cultivos de las cepas del género *Aspergillus* se observa que hubo diferencias en los valores de remoción de DBT, es posible que la diferencia la den los diferentes microorganismos, es decir por presentar cada uno de ellos diferentes afinidades o capacidad metabólica hacia el DBT.

En el caso del cultivo con *Phoma* sp, hubo remoción de DBT (26%). En la bibliografía no existen reportes donde se indique que este microorganismo presente capacidad de desulfuración o degradación contra el dibenzotiofeno o algún otro tipo de hidrocarburos. Como ya se ha mencionado, este hongo es señalado como patógeno de plantas, atacando principalmente el tallo. Es posible que algunas de las enzimas que utilice para dañar el tejido vegetal del tallo no fueran altamente específicas y le permitieran metabolizar moléculas con estructura semejante. En estudios con los hongos *Phanerochaete chrysosporium* y *Pleurotus ostreatus* (Mileski y col., 1988; Bezalel y col., 1996) se ha señalado que el sistema enzimático para degradar lignina con el que cuentan ambos hongos, pueden catalizar la oxidación inicial de un diverso número de xenobióticos con estructuras cíclicas como el pentaclorofenol, el antraceno y dibenzotiofeno. Launen y col. (1995) señalan que es posible la oxidación y mineralización de hidrocarburos aromáticos policíclicos por una amplia variedad de hongos no basidiomicetos del suelo. Un fenómeno semejante podría ocurrir con la cepa *Phoma* sp aislada en este trabajo.

6.4 IDENTIFICACIÓN DE DIBENZOTIOFENO SULFONA (DBTO₂).

Los extractos de los cultivos de los microorganismos aislados, también se analizaron para detectar en ellos los intermediarios de la ruta de biodesulfuración de DBT. Los resultados se muestran en el cuadro 6.10. Como se puede observar, solamente en los cultivos de *Aspergillus fumigatus* y del Consorcio microbiano I se detectó la presencia de DBT sulfona. En la bibliografía revisada no se encontraron antecedentes de la formación de DBT sulfona por la especie *A. fumigatus*. No obstante, a pesar de que *A. fumigatus* convierte el DBT en la forma oxidada DBT sulfona se decidió no continuar trabajando con esta cepa por los riesgos de salud que implica su manejo.

Cuadro 6.10 – Presencia de dibenzotiofeno sulfona en los cultivos de 15 días de las cepas aisladas de suelos y sedimentos marinos contaminados con hidrocarburos. (N. d. No detectado).

Nombre	Dibenzotiofeno sulfona (g/l)
<i>Aspergillus sp A-01</i>	N. d.
<i>Aspergillus sp N-02</i>	N. d.
<i>Aspergillus sp B-03</i>	N. d.
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.017
<i>Phoma sp</i>	N. d.
<i>Rhodotorula rubra</i>	N. d.
Consorcio I	0.15
Consorcio II	N. d.

Los microorganismos que presentaron el mayor porcentaje de desaparición de DBT fueron *Aspergillus sp A-01* y el consorcio microbiano I. En cuanto a la transformación de DBT, en los cultivos del Consorcio microbianos I se detectó DBT sulfona. Tomando como criterio estos resultados, se decidió realizar cinéticas de biotransformación de DBT con las cepas *Aspergillus sp A-01* y el consorcio microbiano I.

6.5 CINÉTICAS DE BIOTRANSFORMACIÓN DE DIBENZOTIOFENO.

Para evaluar la capacidad de los microorganismos seleccionados para transformar o utilizar al dibenzotiofeno como fuente de azufre, se determinó la remoción del compuesto en función del tiempo. Conjuntamente se cuantificó la aparición de DBTO₂ y el consumo de glucosa. El tiempo de cultivo fue de 30 días y el DBT fue la única fuente de azufre en una concentración de 1g/l. Los microorganismos utilizados fueron *Aspergillus* sp A-01, el Consorcio microbiano I y para comparar y corroborar los resultados se utilizó a la cepa de colección *Cunninghamella elegans* ATCC 36112. Este hongo presenta la característica de oxidar el azufre del DBT hasta DBT sulfona, que es el primer intermediario de la ruta de eliminación de azufre de la molécula. Los resultados que se detallan a continuación corresponden a *Cunninghamella elegans*, Consorcio microbiano I y *Aspergillus* sp A-01.

6.5.1 *Cunninghamella elegans*

En la figura 6.3 se observa que la desaparición de DBT por *C. elegans* alcanza un máximo a partir de los 15 días de cultivo.

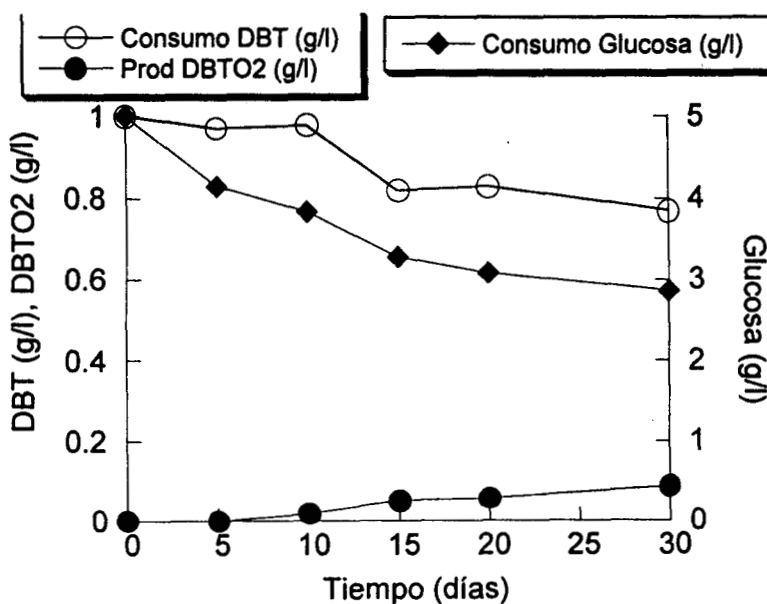


Figura 6.3. - Remoción de DBT, aparición de DBTO₂ y consumo de glucosa por *C. elegans* ATCC 36112.

Durante los primeros 10 días de cultivo la actividad enzimática sobre el DBT al parecer fue escasa. De esta manera se encontró una desaparición de DBT de aproximadamente 0.03 g/l a los 10 días y 0.20 g/l de DBT desaparecido a los 15 días de cultivo la cual se incrementa a 0.23 g/l a los 30 días. La aparición de DBTO₂ coincide con la desaparición de DBT y se alcanza un máximo de 0.089 g/l de DBTO₂ a los 30 días de cultivo. Respecto al consumo de glucosa, el hongo consume la mayor cantidad a los 15 días del cultivo y después de este tiempo su consumo varía ligeramente alcanzando un máximo de 2 g/l, que corresponde a 2/5 partes de la glucosa inicial adicionada. Al parecer el microorganismo crece limitadamente durante los primeros 15 días del cultivo y al encontrarse privado de azufre y encontrarlo en forma de DBT, las enzimas necesarias para utilizarlo como fuente de este elemento posiblemente son inducidas a partir de los diez días de cultivo. Sin embargo, como solo pueden llevarlo a su forma oxidada de DBTO₂, no es posible que lo incorporen a su biomasa. Crawford y Gupta, (1990) y Schlenk y col. (1994) reportan que efectivamente *C. elegans* oxida el azufre del DBT a DBTO₂. Como se indicó este fue el motivo de utilizar esta cepa de colección como control de nuestros resultados. Los primeros autores señalan que *C. elegans* transforma 90 mg/l de DBT a los 7 días de cultivo utilizando un medio Sabourad al que se añadió 90 mg/l de DBT. Por otra parte, otros trabajos reportan al DBT sulfóxido como una forma intermedia de la oxidación entre el DBT y DBTO₂, el cual no fue detectado en nuestros análisis (Crawford y Gupta, 1990; Schlenk y col., 1994; Bezalel y col., 1996). Esto debido a que este compuesto solo puede detectarse por cromatografía líquida debido a su inestabilidad térmica (Faison y col., 1991; Olson y col, 1993).

6.5.2 CONSORCIO MICROBIANO I

En la figura 6.4 se presentan los resultados encontrados para el Consorcio microbiano I. Se puede observar que de los 5 a los 10 días de cultivo la desaparición de DBT es lineal y a partir de este tiempo solo se incrementa ligeramente su desaparición. De este modo a los 5 días se encuentra una remoción de 0.03 g/l de DBT el cual se incrementa a los 10 días a 0.18 g/l para alcanzar un máximo a los 20 días de cultivo de 0.23 g/l de DBT. Por su parte la DBTO₂ presenta un comportamiento lineal entre los 5 y 15 días del cultivo la fermentación donde aparentemente alcanza el máximo con una concentración de 0.11 g/l de DBTO₂. Por su parte la glucosa es consumida totalmente desde los 15 días de cultivo.

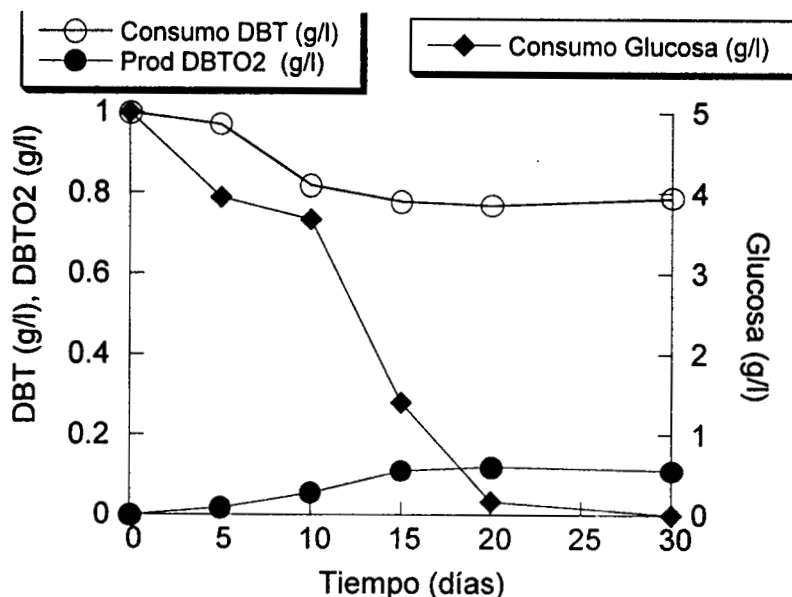


Figura 6.4. Remoción de DBT, aparición de DBTO₂ y consumo de glucosa por el Consorcio microbiano I. Prod: Producción.

Al parecer, en el Consorcio el crecimiento, relacionado indirectamente con el consumo de glucosa, y la desaparición de DBT no están relacionados y es posible que la mayor utilización de glucosa sea efectuada por microorganismos que no metabolizan al DBT y que puedan encontrar azufre como producto de la lisis de otras especies microbianas en el consorcio. Por otro lado en el trabajo reportado por Faison y col. (1991) con *Paecilomyces*, señalan que la presencia de una fuente de carbono fácil de metabolizar inhibe la actividad enzimática sobre el DBT pudiendo encontrar este efecto en los resultados presentados en la figura 6.4. Sin embargo los experimentos hasta aquí realizados no permiten afirmar con certeza ninguna de las posibilidades señaladas.

6.5.3 *Aspergillus* sp A-01

En la figura 6.5 se muestran los resultados de la cinética del metabolismo de dibenzotiofeno por *Aspergillus* sp A-01, donde se observa la desaparición de dibenzotiofeno en función del tiempo. Como se aprecia, este microorganismo presentó el doble de desaparición de DBT respecto a *C. elegans* y al Consorcio microbiano I, (0.41 g/l contra 0.23 g/l de DBT desaparecido respectivamente). La desaparición de DBT se observa como una función lineal hasta los 20 días de fermentación. El consumo de glucosa presenta una relación

similar, sin embargo se mantiene la forma lineal hasta los 30 días de cultivo, tiempo en el cual se agota el carbohidrato del medio. En este cultivo, bajo las condiciones experimentales utilizadas, no fue detectado DBTO_2 . Es posible que *Aspergillus* sp A-01, para utilizar al DBT como fuente de azufre, rompa el esqueleto hidrocarbonado del DBT, es decir, que sus enzimas no sean específicas para eliminar el azufre de la molécula del DBT, para después incorporarlo a su metabolismo. Es posible que posea el metabolismo de tipo II que consiste en romper indistintamente los enlaces del esqueleto hidrocarbonado de la molécula para obtener el azufre.

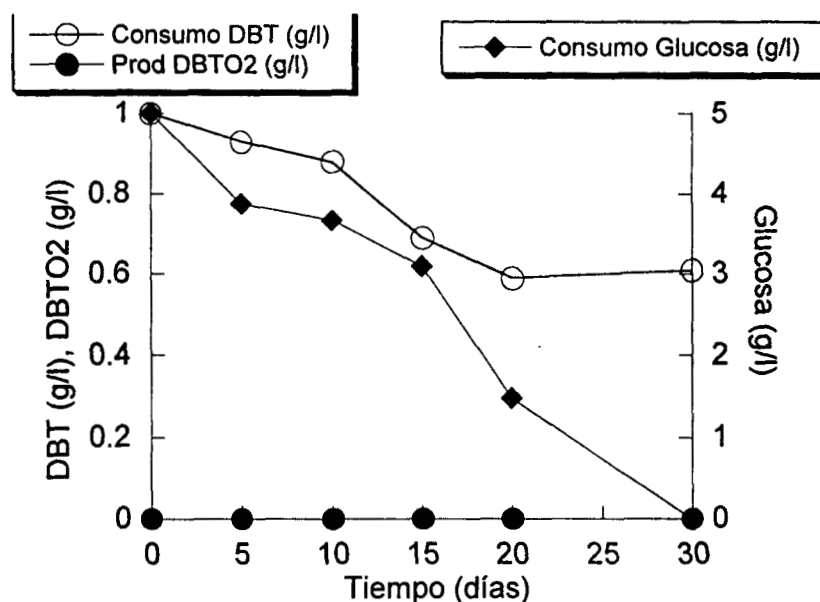


Figura 6.5. - Remoción de DBT, aparición de DBTO_2 y consumo de glucosa de *Aspergillus* sp A-01. Prod: Producción.

Los resultados coinciden con lo reportado por Pritchard y col., (1995), quienes han señalado que organismos de este género tienen capacidad para crecer sobre hidrocarburos aromáticos. A diferencia de lo que señalan Laborde y Gibson (1977) en un reporte con moléculas azufradas como el tiofeno, en este trabajo no se encontró evidencia de la formación de sulfonas por la oxidación del azufre del DBT en los cultivo de *Aspergillus* sp A-01. Como se ha mencionado, es muy probable que este microorganismo presente el metabolismo de tipo II, donde no hay formación de DBT sulfona ni de DBT sulfóxido.

7. CONCLUSIONES

- El método de cuantificación de Dibenzotiofeno, utilizando tolueno como fase orgánica para la extracción de compuestos organoazufrados, fue reproducible. La pérdida del compuesto por éste método de extracción fue de 8% (0.08 gl^{-1} de 1 gl^{-1} de DBT adicionado) mientras que con diclorometano la pérdida fue de 32%.
- Se aislaron 6 cepas de hongos y dos cultivos mixtos que mostraron tolerancia al DBT. Es posible afirmar que su capacidad de crecer en presencia de DBT es consecuencia del hábitat de donde fueron recolectados y del método de selección utilizado para su aislamiento.
- La identificación de las cepas aisladas, mediante el análisis del perfil de ácidos grasos, indicó que las cepas corresponden a la siguiente ubicación taxonómica: *Aspergillus* sp A-01; *Aspergillus* sp N-02; *Aspergillus* sp B-03, *Aspergillus fumigatus*, *Phoma* sp y *Rhodotorula rubra*.
- Los dos consorcios microbianos y las cepas de hongos *Aspergillus* sp A-01; *Aspergillus* sp N-02; *Aspergillus* sp B-03 y *Phoma* sp, al parecer utilizan al DBT como fuente de azufre, ya que en estos cultivos se encontró desaparición de DBT. Sin embargo al no encontrar los intermediarios de su oxidación y/o desulfuración, DBT sulfona o hidroxibifenil, es posible que presenten un metabolismo del tipo II, en el que no hay un rompimiento selectivo para separar el azufre de la molécula sino un rompimiento de enlaces al azar, incluidos los enlaces carbono-carbono del esqueleto hidrocarbonado de la molécula.
- De estas cepas, *Aspergillus* sp A-01 fue la que mostró una mayor capacidad de remoción de DBT (40%). Por su parte, en los cultivos de *Rhodotorula rubra* no hubo desaparición del compuesto.
- Al analizar la actividad de desulfuración de la cepa de colección *Cunninghamella elegans* (ATCC 36112) se encontró, como se ha reportado en la bibliografía, que C.

elegans oxida el azufre de la molécula de DBT hasta DBT sulfona. En este trabajo se encontró que convierte en DBT sulfona mas del doble que lo reportado.

- El consorcio microbiano I y *Aspergillus fumigatus*, al igual que *C. elegans*, oxidan el azufre del dibenzotiofeno hasta DBT sulfona, que corresponde a la primera etapa en la ruta de desulfuración de DBT. Los resultados señalan que estos microorganismos presentan el metabolismo tipo IV. Esto indica que posiblemente estas cepas tengan algún tipo de oxigenasa, que como se ha reportado en la bibliografía, es el tipo de enzimas responsables de la oxidación del azufre del DBT. Por la formación de DBT sulfona en el cultivo del consorcio microbiano, es posible que los microorganismos responsables de la oxidación sean hongos, ya que este metabolismo es característico de hongos y no se ha reportado en bacterias.
- Bajo las condiciones experimentales utilizadas, no se encontró en los cultivos de ninguno de los microorganismos aislados la formación de hidroxibifenil, el producto de la desulfuración del DBT por el metabolismo III, que implica el rompimiento selectivo de los enlaces carbono azufre sin dañar el esqueleto hidrocarbonado de la molécula.

8. BIBLIOGRAFIA

- Al Hasan R. H., Sorkhon N. A., Al Bader D., Radwan S. S., (1994), Utilization of hydrocarbons by cyanobacteria from microbial mats on oily coasts of the gulf, **Applied of Microbiology and Biotechnology**, 41:615-619.
- Alexopolus C. y Mims C., (1979), **Introductory Micology**, 3^a ed., John Wiley and sons, E. U., pc. 34-40, 291, 555, 556, 559.
- Armstrong S., Sankey B.M. y Voordow, G., (1995), Conversion of dibenzothiophene to biphenyl by sulfate reducing bacteria isolated from oil field production facilities, **Biotechnology Letters**, 17:1133-36.
- Bezalel L., Hadar Y., Fu P., Freeman J., Cerniglia C., (1996), initial oxidation products in the metabolism of pyrene, anthracene, fluorene, and dibenzothiophene by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, **Applied and Environmental Microbiology**, 62:2554-59.
- Bosecker K., Hollerbach A., Kassner H., Teschner M. y Whener H., (1993), Chemical and microbiological studies on petroleum contaminated soils after two years of biotreatment, en Torma A. E., Apel M. L. y Brierley C. L., (ed) **Biohydrometallurgical Technologies**, 365-373.
- Crawford D. y Gupta R., (1990), Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*, **Current Microbiology**, 21:229-231.
- Denome S., Olson E. y Young K., (1993), Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp strain IGTS8., **Applied and Environmental Microbiology**, 59:2837-2843.
- Denome S., Oldfield C., Nash L., Young K., (1994), Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp strain IGTS8, **Journal of Bacteriology**, 176: 6707-16.
- Faison B. D., Clark T. M., Lewis S. N., Ma C. Y.; Sharkey D. M., y Woodward C. A.; (1991), Degradation of organic sulphur compounds by a coal-solubilizing fungus. **Applied Biochemistry and Biotechnology.**, 28/29: 237-251.
- Finkelman, J. (1990). **Medio Ambiente y desarrollo en México**. Vol.2. Grupo editorial Porrúa.
- Foght J. M. y Westlake W. S., (1990), Expression of dibenzothiophene-degradative genes in two *Pseudomonas* species, **Canadian Journal of Microbiology** 36:718-724.
- Gates B.C., Katzier J., y Schut G., (1979), **Chemistry of catalytic process**, 1^aed., cap.5, Mc Graw Hill, New York.

- Girgis M. y Gates B., (1991), Reactivities, reaction networks, and kinetics in high-pressures catalytic hydroprocessing, **Industrial Engineering and Chemical Research**, 30:2021-2058
- Goldsmith J. R., (1986), Effects on human health. En Stern, A. C., (ed.), **Air Pollution**, Vol. 6, 3ª ed., pp. 391-463, Academic Press, New York.
- IMP, (1993), Contrato de compra venta de petróleo crudo PR-CO-CV PEP-001/93.
- Izumi Y., Ohshiro T., Ogino H., Hine Y., Shimao, M., (1994), Selective desulphurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1, **Applied and Environmental Microbiology**, 60:223-226.
- Janssen A., (1996), Formation and colloidal behavior of elemental sulphur produced from the biological oxidation of hydrogensulphide, **Tesis Doctoral**, Universidad Wageningen, Holanda, 12-16.
- Jimenez Cisneros B. y Torres Bustillos L., (1996), Eliminación del azufre por vía biológica del combustoleo, **Biodegradación de Compuestos Orgánicos Industriales**, 1:23-37.
- Kargi F., (1982), Microbiological coal desulphurization, **Enzyme and Microbiology Technology**, 4:13-19.
- Kayser J. K., Bielaga-Jones B., Jackowski K., Odusan O. y Kilbane II J., (1993), Utilization of organosulphur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, **Journal of General Microbiology**, 139:3123-3129.
- Khalid A., Aleem M., Kermode R., y Bhattacharyya D., (1991), Bioprocessing of coal and oil-water emulsions and microbial metabolism of dibenzothiophene (DBT), **Resources, Conservation and Recycling**, 5:167-181.
- Kilbane II J. y Jackowski K., (1992), Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, **Biotechnology and Bioengineering**, 40:1107:1114.
- Kitamura K., Ohmura N., Saiki H., (1993), Isolation of coal-solubilizing microorganisms and utilization of the solubilized product, **Applied of Biochemistry and Biotechnology**, 38:1-13.
- Kodama K., Umhara K., Shimizu K., Nakatani S., Minoda Y., Yamada K., (1973), Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway, **Agricultural and Biological Chemistry**, 37:45-50.
- Kropp K., Anderson J., y Fedorak P., (1997), Biotransformations of three dimethylbenzothiophenes by pures and mixed bacterial cultures, **Environmental Science & Technology**, 31:1547-1554.

- Kulpa CH., (1994), Biondesulfurization of petroleum distillates: A microbial approach, **OECD Workshop, Tokyo '94 on Bioremediation**, Kasumigaseki, Tokyo, Japan, 27-30.
- 222478**
- Laborde A. y Gibson D., (1977), Metabolism of dibenzothiophene by *Beijerinckia* species, **Applied and Environmental Microbiology** 34:783-790.
 - Launen L., Pinto L., Wiebe C., Kiehlmann E., Moore M., (1995), The oxidation of pyrene and benzo[*a*]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi, **Canadian Journal of Microbiology**, 41:477-488.
 - Lee M., Senius J., Grossman M., (1995), Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene, **Applied and Environmental Microbiology**, 61:4362-66.
 - Leighton F. A., (1989), Acute oral toxicity of dibenzothiophene for male CD-1 mice: LD50, lesions, and effect of preinduction of mixed-function oxidases, **Fundamental Applied of Toxicology**, 12:787-792.
 - Li M., Squires CH., Monticello D. and Childs J., (1996), Genetic analysis of the *dsz* promoter and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, **Journal of Bacteriology**, 178:6409-6418.
 - McEldowney S., Hardman D. J., Waite S., (1993), **Pollution: Ecology & Biotreatment**, pp. 193-230, Longman Scientific and Technical, Singapore.
 - Mannion A.M., (1992), Acidification and eutrophication. En Mannion, A. M., Bowley S. R., (eds.), **Environmental Issues in the 1990's**, pp. 177-197. John Wiley, Chichester.
 - Mileski G., Bumpus J., Jurek M., y Aust S., (1988), Biodegradation of pentachlorophenol by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, **Applied and Environmental Microbiology**, 54:2885-2889.
 - Monticello D. J. y Finnerty W. R., (1985), Microbial desulfurization of fossil fuels, **Annual Review of Microbiology**, 39:371-389.
 - Monticello D. J., Bakker D., Finnerty W. R., (1985), Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species, **Applied and Environmental Microbiology**, 49:756-760.
 - Ohshiro T., Hirata T., Izumi Y., (1995), Microbial desulfurization of dibenzothiophene in the presence of hydrocarbon, **Applied of Microbiology and Biotechnology**, 44:249-252.
 - Ohshiro T., Suzuki K. e Izumi Y., (1996), Regulation of dibenzothiophene degrading enzyme activity of *Rhodococcus erythropolis* D-1, **Journal of Fermentation and Bioengineering**, 81:121-124.

- Oldfield C., Pogrebinsky O., Simmons J., Olson E. y Kulpa Ch., (1997), Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulphurization by *Rhodococcus* sp strain IGTS8 (ATCC 53968), **Microbiology**, 143:2961-2973.
- Olson E., Stanley D., y Gallagher J., (1993), Characterization of intermediates in the microbial desulfurization of dibenzothiophene, **Energy & Fuels**, 7:159-164.
- Omori T., Monna L., Saiki Y., Kodama T., (1992) Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp strain SY1, **Applied and Environmental Microbiology**, 58:911-915.
- Pepper I., Gerba C. y Bredeckle J., (1995), **Environmental Microbiology, A Laboratory Manual**, Academic Press, E.U., 11-20.
- Piddington C., Kovacevich B., Rambosek J., (1995), Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon *Rhodococcus* sp strain IGTS8, **Applied and Environmental Microbiology**, 61:468-75.
- Prince R., (1993), Petroleum spill bioremediation in marine environments, **Critical Reviews in Microbiology**, 19:4:217-242.
- Pritchard P., Mueller J., Lantz S. y Santavy D., (1995), The potential Importance of Biodiversity in environmental biotechnology applications: Bioremediation of PAH-contaminated soil and sediments, en Allsopp D., Colwell R. y Hawksworth D., (Eds.), **Microbial diversity and ecosystem function**, Pub. CAB. International, Cambridge, UK.
- Radwan S., Sorkhon N., Fardoun R. y Al-Hasan H, (1995), Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert, **Applied of Microbiology and Biotechnology**, 44:265-270.
- Reporte UNEP., (1994), Motor vehicle fuels and their exhaust emissions, **UNEP, Industry and environment**, January - March, 56, 73-74.
- Resnick S. y Gibson D., (1996), Regio- and stereospecific oxidation of fluorene, Dibenzofuran, and dibenzothiophene by Naphtalene dioxygenase from *Pseudomonas* sp strain NCIB 98164-4, **Applied and Environmental Microbiology**, 62:4073-80.
- Setti L., Lanzarini. G., Pifferi G., (1995), Dibenzothiophene, biodegradation by *Pseudomonas* sp in model solutions, **Process of Biochemistry**, 30:721-728.
- Schlenk D., Bevers R. J., Vertino A. M., Cerniglia C. E., (1994), P540 catalyzed S-oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*, **Xenobiotica**, 24: 1077-83.
- Schneierson S., (1965), **Atlas of diagnostic microbiology**, Abbot Laboratories, North Chicago, Illinois, 44-45.

- van Afferden M., Tappe D., Beyer M, Truper H. G. Y Klein J., (1993), Biochemical mechanisms for the desulfurization of coal-relevant organic sulfur compounds, **Fuel**, 72:1635-1643.
- Wang P. y Krawiec S., (1994), Desulfurization of dibenzothiophene to 2-hidroxybiphenil by some newly isolated bacterial strains, **Archieves of Microbiology**, 161:266-271.
- Wu S., Lina J., Chan S., (1994), Oxidation of dibenzothiophene catalyzed by heme-containing enzymes encapsulated in sol-gel glass, **Applied Biochemistry and Biotechnology**, 47:11-20.
- Vasudevan P. T. Y Fierro J.l.G., (1996), A review of deep hydrodesulfuration catalysis, **Catal. Rev. Sci. Eng.**, 30:161-188.
- Xi, L., Squires, C., Monticello D. y Childs J., (1997), A flavin reductase stimulates DszA and DszC proteins of *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 in vitro. **Biochemistry and Biophysic Research Communicatio.**, 230:73-75.
- Yasui Y., (1994), Biondesulphurization in Japan: Possible Applications of biotechnology in oil refining, **OECD Workshop, Tokyo '94 on Biorremediation**, Kasumigaseki, Tokyo, Japan 27-30.

VDF
10/10/94

**LOS INTEGRANTES DEL JURADO, DESIGNADOS
POR LA DIVISION DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE
LA SALUD, DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA
METROPOLITANA, UNIDAD IZTAPALAPA,
APROBARON LA PRESENTE TESIS EL DÍA 30 DE
SEPTIEMBRE DE 1998.**

PRESIDENTE



DR. JORGE ROMERO JARERO

VOCAL



DR. MARIANO GUTIÉRREZ ROJAS

SECRETARIO



DR. RICHARD AURIA

