

60  
2e1



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"ESTUDIO DE LA BACTERIA *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8  
PARA EL PROCESO DE BIODESULFURACION DEL  
DIBENZOTIOFENO APLICADO A DIESEL  
PRIMARIO MEXICANO"**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
**B I O L O G A**  
P R E S E N T A:

**ARACELI FLORES ESCAMILLA**

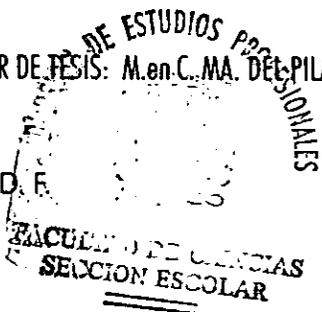
DIRECTOR DE TESIS: M.en.C. MA. DEL PILAR BREMAUNTZ MICHAVILLA



MEXICO, D. F.

1998

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



26 8033



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule  
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis:

Estudio de la bacteria Rhodococcus rhodochrous IGTS8 para el  
proceso de biodesulfuración del DBT aplicado al diesel primario mexicano.  
realizado por FLORES ESCAMILLA ARACELI

con número de cuenta 8759445-4 , pasante de la carrera de BIOLOGIA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario M.en C. Ma. del Pilar Bremauntz Michavila

Propietario M. en C. Rodrigo A. Cárdenas y Espinoza

Propietario Dr. René de J. Cárdenas Vázquez

Suplente Dr. J. Adelfo Escalante Lozada

Suplente M. en C. Sigfrido Sierra Galván

*Virginia Abrin Batule*

*Rodrigo A. Cardenas y Espinoza*  
*René de J. Cardenas Vazquez*

*Jose Adolfo Escalante Lozada*

*Sigfrido Sierra Galvan*

Consejo Asesor de Biología.  
*Edna Naranjo*  
Dra. Edna Naranjo Pérez Díaz



DEPARTAMENTO  
DE BIOLOGIA

A Valentín y Yolanda con  
todo mi amor, cariño y  
respeto.

A Quetzal, Bruno, Ale,  
Vale, Frank, Bombo, Lety,  
Javier y mamá Oli.

## **Agradecimientos:**

A la luz que ilumina nuestro entendimiento y corazón.

A mis padres, Valentín y Yolanda, por su incansable apoyo y entrega cariñosa, además de sus sabios consejos los cuales me devolvieron la confianza y seguridad en mi misma.

A mis seis hermanos, Ivonne y Lety por ser mis amigas y compañeras en pláticas y diversión; a Vale, Ale y Frank por su apoyo emocional y una mano amiga muy querida; "La perseverancia refleja siempre el estado de nuestra vida interior, de nuestra filosofía y de nuestra perspectiva".

A mi hermano Izcoatl Bruno que en evolución espiritual se encuentra, por su amor incondicional y tu alegría que lleno por siempre mi corazón. Te amo.

A mamá Oli de quien aprendí que la felicidad se siembra con la lucha incansable, se riega con la resistencia a las adversidades y se cosecha con los logros de los retos propuestos obteniendo lo mejor al enfrentarlos.

A mi hijo Quetzal, por ser el pequeño ser que mueve mi espíritu e incrementa la fuerza para seguir dando pasos adelante. Te amo corazoncito.

A Javier, por todo lo que has caminado a mi lado.

A la M. en C. Ma. del Pilar Bremauntz Michavila por permitirme realizar este trabajo de tesis.

A mis sinodales: Dr. René Cárdenas, M. en C. Rodrigo Cárdenas, Dr. Adelfo Escalante y al M. en C. Sigfrido Sierra, por revisar y corregir mi tesis así como su paciencia para la culminación de este trabajo.

A mis maestros, laboratoristas, compañeros y amigos de la Facultad de Ciencias, por compartir conmigo sus conocimientos, apoyo incondicional, amistad y cariño.

A mis amigos y compañeros del laboratorio de Bioprocesos del Instituto Mexicano del Petróleo: Juan Cid, Diego Zaragoza, Luis Fernández, Román Castañeda, Maurilio Aguilar y Gladys, por su ayuda incondicional, apoyo académico-técnico y moral, por su presencia agradable y confianza.

A los vecinos del laboratorio de biotecnología del IMP: Alejandro Montes de Oca, Juan Antonio Zermeño y Benjamín Chávez, por su apoyo material y su amistad.

A los del laboratorio central del IMP Hector del Río, por procesar las muestras de los experimentos y por prestarme atención en dudas técnicas del equipo para la realización del trabajo de esta tesis.

Al Instituto Mexicano del Petróleo por facilitarme las condiciones necesarias equipo y reactivos para realizar este trabajo de tesis, así como la beca otorgada durante el transcurso de la realización de la misma.

**Sí**

Sí puedes estar firme cuando en tu derredor,  
todo el mundo se ofusca y tacha tu entereza.

Sí cuando dudan todos, fías en tu valor y  
al mismo tiempo sabes excusar su flaqueza.

Sí puedes esperar y a tu afán poner brida o a blanco de  
mentiras esgrimir la verdad; o siendo odiado al odiono  
dejarle cabida y ni ensalzas tu juicio ni ostentas tu verdad.

Sí sueñas pero el sueño no se vuelve tu rey.

Sí piensas y el pensar no mengua tus ardores.

Sí el triunfo y el desastre no te imponen su ley y los tratas  
lo mismo como a dos impostores.

Sí puedes soportar que tu frase sincera sea trampa de necios  
en boca de malvados, o mirar hecha trizas tu adorada quimera  
y tornas a forjarla con útiles mellados.

Sí todas tus ganancias poniendo en un montón las arriesgas en  
un golpe de azar y las pierdes y luego con bravo corazón sin  
hablar de tus pérdidas vuelves a comenzar.

Sí puedes mantener en la ruda pelea, alerta el pensamiento y  
el músculo tirante para emplearlos cuando todo en ti flaquea  
menos la voluntad que te dice ¡ADELANTE!

Sí entre la turba das a la virtud abrigo.

Sí marchando con reyes del orgullo has triunfado.

Sí no pueden herirte ni amigos ni enemigos.

Sí eres bueno con todos; pero no demasiado y sí puedes llenar  
los preciosos minutos con sesenta segundos de combate bravío,  
TUYA ES LA TIERRA Y TODOS SUS CODICIADOS FRUTOS Y LO QUE MÁS  
IMPORTA, SERÁS ¡HOMBRE! HIJO MÍO.

R. Kipling

## Índice

Resumen	iii
Introducción	1
Objetivos	2
<b>Capítulo 1</b>	<b>3</b>
Marco teórico	
1. Características del petróleo	3
1.1 Composición química del crudo	3
1.2 Componentes de los hidrocarburos	3
1.3 Composición del diesel primario mexicano	6
1.4 Componentes no hidrocarbonados	8
1.4.1 Compuestos azufrados	8
1.5 Efectos del azufre en la industria petrolera y el medio ambiente	9
1.6 Fundamentos teóricos de la hidrodesulfuración	11
1.6.1 Fundamentos del proceso	11
1.6.2 Reacciones químicas de hidrodesulfuración HDS	11
1.6.3 Desventajas de la hidrodesulfuración	13
1.7 Biodesulfuración (BDS) Fundamentos teóricos	13
1.7.1 Breve historia de la microbiología del petróleo	13
1.7.2 El azufre en la materia viva	
1.7.3 Fundamentos de la biodesulfuración	14
1.7.4 Biodesulfuración degradativa o reductiva	15
1.7.5 Biodesulfuración oxidativa	15
1.7.6 <i>Rhodococcus rhodochrous</i> IGTS8	16
<b>Capítulo 2</b>	<b>20</b>
Material y métodos	
2.1 Microorganismo de estudio y condiciones de cultivo	20
2.1.1 <i>Rhodococcus rhodochrous</i> IGTS8	20
2.1.2 Condiciones de cultivo	20
2.2 Conservación del microorganismo	20
2.3 Pruebas experimentales de crecimiento de <i>R. rhodochrous</i> IGTS8	21
2.3.1 Determinación de la concentración óptima del inóculo para observar las 3 etapas de maduración en la fase exponencial	21
2.3.2 Determinación del efecto de la fuente de azufre sobre el crecimiento del microorganismo	21
2.4 Seguimiento analítico de la eliminación y oxidación del DBT por <i>R. rhodochrous</i> IGTS8 para el proceso de biodesulfuración	23
2.4.1 Determinación de la actividad desulfuradora en los diferentes estados morfológicos del microorganismo en DBT.	23
2.4.2 Cuantificación de la remoción del DBT por <i>R. rhodochrous</i> IGTS8 e identificación del producto 2-hidroxibifenilo.	24
2.5 Pruebas de remoción de azufre en el diesel	24
2.6 Estabilidad de la capacidad de <i>R. rhodochrous</i> IGTS8 para degradar DBT	25

<b>Capítulo 3</b>	27
Resultados y discusiones	27
I Concentración óptima del inóculo para observar las 3 etapas de maduración en la fase exponencial de <i>R. rhodochrous</i> IGTS8	27
II Efecto de la fuente de azufre en el crecimiento de <i>R. rhodochrous</i> IGTS8 utilizando Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> y DBT	30
III Determinación del estado morfológico de <i>R. rhodochrous</i> IGTS8 en la que se lleva a cabo la actividad de desulfuración del DBT	34
IV Remoción de DBT por <i>R. rhodochrous</i> IGTS8 y formación del producto "2-hidroxibifenilo".	38
V Remoción de azufre total en diesel mexicano primario por <i>R. rhodochrous</i> IGTS8 a nivel matraz	42
Conclusiones	45
Bibliografía	46

## Resumen

*Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 es un microorganismo que presenta la capacidad de eliminar el azufre de la molécula dibenzotiofeno (DBT) y de los combustibles fósiles liberando sulfatos ( $\text{SO}_4$ ) solubles en agua y a la molécula 2-hidroxibifenilo (2-HBP) a través de la vía "4S" la cual requiere de oxígeno para su proceso metabólico. Como parte de este trabajo se realizaron pruebas experimentales de crecimiento a nivel matraz de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 en DBT con la finalidad de conocer al microorganismo y evaluarlo a diferentes concentraciones de diesel, para determinar si es aplicable a un proceso biodesulfurador a gran escala, debido al alto contenido de azufre en los combustibles fósiles, en este trabajo experimental se utilizó el diesel primario mexicano. Este microorganismo presenta diferentes morfologías: coco, bacilo y pseudohifa esperando obtener la misma capacidad de remoción de azufre en todo su pleomorfismo sin embargo, en el estado de coco-bacilo se llevo a cabo la mayor remoción de DBT (98%) y de azufre presente en el diesel (17.73%). El hecho de presentar diferente morfología se debe a la maduración celular y a las condiciones del medio de cultivo en el cual se desarrolla el microorganismo. Al aplicarlo a diferentes concentraciones de diesel se obtuvo un mayor índice de remoción de azufre en la concentración de 25% en el tiempo de crecimiento de 96 horas indicando estar en la etapa final de la fase exponencial de crecimiento. Como parte del estudio de este microorganismo resultará de gran interés estudiar los cambios en la permeabilidad de la membrana en sus diferentes estados morfológicos, así como el control de la estabilidad de la forma de coco-bacilo, sin afectar su cualidad específica de eliminar azufre de las moléculas orgánicas provenientes de los combustibles fósiles.

## Introducción

Los estudios relacionados con la microbiología del petróleo han evolucionado a través de intensas investigaciones realizadas a partir de los años 30's cuando se encontraron interacciones entre microorganismos y petróleo. En 1940 el mayor interés fue centrado sobre la posibilidad del desarrollo de microorganismos en la formación de los depósitos de petróleo (Atlas Ronald 1984). Entre las décadas de los 50's y 60's el interés de estudio se dirigió hacia diversos puntos de investigación, por un lado estaba el desarrollo del petróleo y por otro la degradación del mismo, así como la posible forma de extraer el azufre a través de microorganismos (Strawinski, 1950; Zobell, 1953; Atlas R., 1984).

En la actualidad uno de los mayores problemas de contaminación ambiental son las emisiones de contaminantes atmosféricos producidos por las actividades de las poblaciones urbanas. Estas emisiones conforman los elementos de un gran contenedor natural en el que ocurren complejas reacciones fotoquímicas que dan lugar a la formación de compuestos oxidantes como el ozono, poliaromáticos nucleares y otros, así como la formación del ácido sulfhídrico y ácido nítrico constituyendo el fenómeno de lluvia ácida. Las fuentes de emisión de estos contaminantes son principalmente los automóviles, la industria ligera y pesada y los expendios de gasolina (Bravo y col., 1991).

A causa de los efectos nocivos irreversibles a todos los ecosistemas acuáticos y terrestres provocados por la contaminación que existe sobre todo por el elevado porcentaje de azufre en los productos combustibles del petróleo, las compañías petroleras de todo el mundo han intentado remover el azufre por métodos químicos y físicos utilizando plantas de hidrotatamiento que separa el azufre por medio de altas temperaturas y presiones, sin embargo, este método de desulfuración no es del todo eficiente debido a que no alcanza a eliminar el azufre de ciertas moléculas organoazufradas.

Por esta razón la investigación científica ha abierto una nueva puerta hacia la remoción de azufre a través de microorganismos los cuales no requieren de altos costos operacionales y presentan habilidad de tomar moléculas organoazufradas que pueden ser recalcitrantes para el sistema del hidrotatamiento. Ello a causado gran interés por parte de las compañías petroleras de todo el mundo, logrando que subsidien los proyectos de investigación, los cuales han llegado a desarrollar a nivel planta piloto procesos de biodesulfurización eliminando 90% del contenido de azufre en el diesel en un tiempo de 6 horas (Kilbane J.J.1990).

En este proyecto se utilizó a la bacteria *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 la cual utiliza al dibenzotiofeno (DBT) como fuente de azufre por la vía metabólica 4S (sulfoxido/sulfona/sulfonato/sulfato) siendo específica por atacar los enlaces C-S con lo cual obtiene energía para su crecimiento, además de extraer el azufre de los combustibles fósiles, sin alterar las propiedades caloríficas del combustible.

En el presente trabajo se evaluaron los parámetros cinéticos que presenta el microorganismo en su crecimiento y actividad en DBT para aplicarlo al diesel primario mexicano.

El microorganismo a estudiar presenta un polimorfismo diferencial, por esta razón, se evaluaron sus distintos estadios con respecto a la actividad desulfuradora en DBT.

## **Objetivos**

### **Objetivo general**

Estudiar el mecanismo de la disminución de azufre presente en el diesel primario a través de un proceso biológico.

### **Objetivos particulares**

Determinar el rendimiento, capacidad metabólica y condiciones óptimas para el desarrollo de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 como agente de un posible bioproceso, específicamente para diesel primario mexicano.

Realizar el seguimiento analítico de la eliminación y oxidación del DBT como compuesto modelo para la biodesulfuración con el microorganismo *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8.

Evaluar la actividad desulfuradora del microorganismo frente al diesel a nivel matrás.

## Marco teórico

### 1. Características del petróleo.

#### 1.1 Composición química del crudo.-

El petróleo es una mezcla de compuestos químicos del tipo hidrocarburo en estado sólido, líquido y gaseoso que se encuentra en depósitos de rocas sedimentarias a través del mundo. En estado crudo tiene un valor mineral, y cuando es refinado provee de combustibles líquidos y gaseosos de alto valor comercial, como solventes, lubricantes y muchos otros productos (Speight, 1991).

La composición elemental del petróleo es variable debido a que crudos provenientes de distintos yacimientos, incluso pozos muestran distinto contenido de carbón, hidrogeno, oxígeno, nitrógeno y azufre (Speight, 1980); Tabla # 1 Composición del petróleo.

Sobre las bases moleculares del petróleo, éste contiene hidrocarburos, los cuales presentan compuestos orgánicos con azufre, nitrógeno y oxígeno, además de constituyentes metálicos estos en muy baja proporción y dependiendo de las distintas proporciones en el petróleo determina la naturaleza y por consiguiente el procesamiento que requiere el combustible crudo para su destilación, (Speight G. J. 1991).

La inclusión de los compuestos orgánicos de azufre, nitrógeno y oxígeno presentes en el crudo provocan mezclas más complejas causando problemas a la industria de refinación cuando se presentan en altas cantidades.

Una clasificación de los componentes del petróleo es la siguiente:

Hidrocarburos saturados:	Alcanos lineales y ramificados (parafinas) y cicloalcanos (naftenos)
Hidrocarburos aromáticos:	Aromáticos puros, cicloalcanoaromáticos (naftenoaromáticos)
Resinas y asfaltenos:	Formados por la fracción policíclica de alto peso molecular, tienen incluidos átomos de N, S y O
Hidrocarburos insaturados	Alquenos (olefinas) y alquinos (acetilenos), estos son muy escasos

La distribución del contenido de hidrocarburos saturados es de 60% y esta relacionado con los aceites "parafínico nafténico"; los hidrocarburos aromáticos se encuentran entre un 40-45%, normalmente éstos y los naftenoaromáticos son el segundo grupo más importante de los constituyentes de la fracción que hierve por arriba de 210°C, su contenido varía desde 20-45% en peso (Tissot y Welte, 1982).

#### 1.2 Componentes de los hidrocarburos.-

En 1930 se estableció una clasificación general de los componentes de alto peso molecular de los hidrocarburos presentes en el petróleo, los cuales son los siguientes:

Familia de las parafinas

Familia de las naftas,

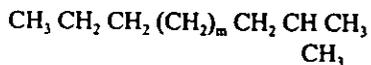
Familia de los aromáticos y

Familias de las olefinas y acetilénicas.

La familia parafínica presenta hidrocarburos saturados con cadenas lineales y ramificadas, pero sin ninguna estructura anillada; por ejemplo:



Cadena lineal de parafina



Cadena ramificada de parafina

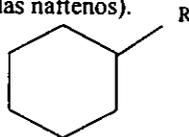
La proporción de parafinas en el crudo varía dependiendo de donde provenga éste, sin embargo, regularmente decrece con el incremento del peso molecular promedio del petróleo.

En las gasolinas el contenido de parafinas es alto, alrededor del 80%; en los aceites y lubricantes presenta 30%.

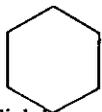
La familia naftalénica presenta hidrocarburos saturados conteniendo uno o más anillos, teniendo cada uno de los cuales una o más cadenas parafínicas a los lados (conocidas como cadenas alicíclicas también llamadas naftenos).



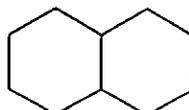
Alquil ciclopentano



Alquilociclohexano



Ciclohexano

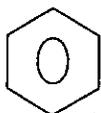


Decahidronaftaleno

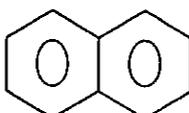
R= Compuestos orgánicos

La proporción de hidrocarburos naftalénicos varía con el tipo de crudo y en general constituyen una cantidad sustancial en el petróleo.

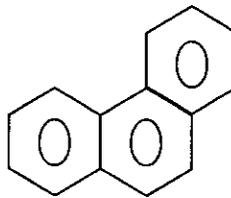
La familia aromática presenta hidrocarburos que contienen uno o más núcleos aromáticos en sistemas de anillos, los cuales pueden ser enlazados o substituidos por cadenas parafínicas y/o anillos de naftaleno.



Benceno

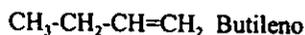
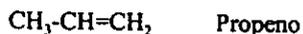


Naftaleno



Fenantreno

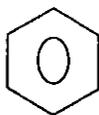
Las olefinas son hidrocarburos con fórmula general  $C_nH_{2n}$  o alquenos, son insaturados porque contienen menos cantidad de hidrógeno para balancear la saturación del átomo de carbono y por lo general se encuentran en las fracciones destiladas del petróleo.



Regularmente las olefinas se encuentran en las fracciones destiladas del petróleo.

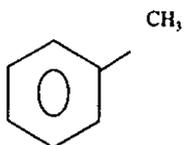
Otra clase de hidrocarburos insaturados son los acetilenos los cuales presentan una triple ligadura entre los carbonos ( $-C\equiv C-$ ). Raramente se encuentran en el petróleo crudo debido a que presentan reactividad muy alta por sus enlaces insaturados, tanto los acetilenos como las olefinas son unidades moleculares básicas en la industria petroquímica, para la elaboración de polímeros los cuales utiliza la industria en general, p.e. para fabricar el nylon, tubos de PVC, etc.

La familia de los aromáticos es de los compuestos más importantes que se encuentran en el petróleo están basados en el benceno representado por un anillo de seis carbonos los cuales se encuentran asociados por una alteración de enlaces simples y dobles. Este anillo es una estructura simétrica y es más estable o menos reactiva debido a sus tres enlaces insaturados, debido a la estabilidad de la aromaticidad que presentan estos compuestos.



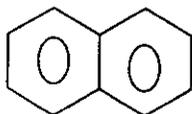
Benceno

Los átomos de hidrógeno pueden ser reemplazados por otros átomos o grupos, por ejemplo:

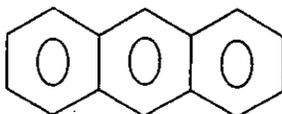


Metilbenceno

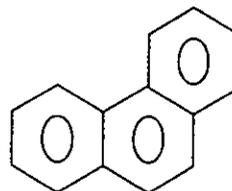
O puede estar fusionado con más anillos



Naftaleno

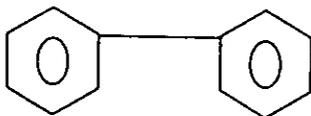


Antraceno



Fenantreno

También se encuentran derivados de compuestos con multianillos no condensados tales como el bifenil.



Todos los crudos presentan compuestos aromáticos en porciones variadas desde 10 hasta 50% o más alto. La mayoría de estos compuestos aromáticos presentan cadenas parafínicas, anillos de naftaleno y anillos aromáticos de un lado u otro.

En general el incremento en el peso molecular promedio de estas sustancias va en proporción a la cantidad de anillos aromáticos y a la presencia de compuestos pesados por ejemplo cadenas lineales o ramificadas con 50 ó más átomos de carbono y metales.

Análisis elemental del petróleo de acuerdo a su composición química; procedente de diferentes localidades.

**Tabla 1.-Análisis del petróleo crudo**

Composición (%peso)					
Origen	Carbón	Hidrógeno	Nitrógeno	Oxígeno	Azufre
UAR	82.8-85.1	10.8-12.4	0.4-0.8	0.5-1.5	2.1-4.8
USSR	83.6-87.1	11.6-16.1	0.1-1.5	0.1-1.5	0.2-3.5
Canadá	82.8-86.9	10.3-12.9	0.3-1.7	0.3-1.7	3.4-5.1
México	83.0-83.8	11.0-11.3	1.1-1.7	1.1-1.7	3.8-4.3
USA	83.5-87.9	11.0-14.2	1.1-3.6	1.1-3.6	0.4-0.8
Venezuela	82.5	10.4	0.6	0.8	5.7

(Speight 1991)

### 1.3 Composición del diesel primario mexicano.-

El diesel es un corte de destilación proveniente del petróleo, el cual se presenta en el intervalo de 200-450°C, ver (tabla # 2); en esta fracción las especies predominantes son los alquilsulfuros, alquil-aril-sulfuros y los alquil-aromáticos-disulfuros; entre los que se encuentran isómeros de benzotiofenos y dibenzotiofenos estos últimos representan el 40.90% del total de los compuestos organosulfurados presentes en la fracción del diesel (Aguilar 1997). Ésta ubicuidad de los derivados aromáticos del tiofeno en los crudos ha provocado el uso del dibenzotiofeno (DBT) como compuesto modelo en las investigaciones de biodesulfuración del petróleo (Kilbane 1988-95, Monticello 1989-97, Kim *et al*; 1993, Grossman *et al*: 1994-95, entre otros) debido a que no se logra desulfurar por medio del hidrotreamiento; presenta baja reactividad por la deslocalización de los electrones en el

anillo bencénico provocando mayor estabilidad molecular y dificultad en la transformación por métodos químicos (Klyachko, 1992). Sin embargo, se utilizan otros compuestos tales como bifenilo, naftaleno, salicilato, tritiano y compuestos con impedimentos estéricos, p.e.: el 4,6-dietildibenzotiofeno (4,6-DEDBT), el cual presenta sustituciones alquílicas adyacentes al átomo de azufre (Isbister *et al*; 1985).

**Tabla 2.-**Composición de la fracción 250°-300°C (diesel)

Clase de crudo	%Parafínico	%Nafténico	%Aromático	%Ceras	%Asfalto
<b>Parafínico</b>	46-61	22-32	12-25	1.0-1.5	0-6
<b>Parafínico-Nafténico</b>	42-45	38-39	16-20	1-6	0-6
<b>Nafténico</b>	15-26	61-76	8-13	Traza	0-6
<b>Parafínico-Nafténico-Aromático</b>	27-35	36-47	26-33	0.05-1	0-10
<b>Aromático</b>	0-8	57-78	20-25	0-0.5	0-20

(Speight 1991).

En las tablas 3 y 4 se observan los resultados cuantitativos de la composición del diesel que se encuentra en la fracción de destilación de 200-450°C proveniente del crudo Maya (que es una mezcla de diferentes corrientes de crudo dándole la condición de ser el más pesado), obtenidos de la separación por cromatografía de adsorción, indicándose la subfracción o familia funcional y el tipo de clases químicas que presentan (Aguilar M. y Leyva M. 1997).

**Tabla 3.-** Composición de diesel por familias químicas

Subfracción	Tipo de hidrocarburos	% presente en el diesel
Fracción saturada	Alifáticos y alicíclicos	75.01
Fracción aromática	Polinucleares aromáticos, poliaromáticos sulfurados, compuestos polinucleares aromáticos sulfurados	20.00
Fracción nitrogenada	Compuestos poliaromáticos nitrogenados	1.50
Fracción oxigenada	Poliaromáticos oxigenados	2.30
Total recuperado		98.81

% en peso recuperado de cada fracción, obtenida de la separación sobre alumina neutra, promedio: cinco determinaciones.

**Tabla 4.- Composición de la fracción aromática del diesel**

Fracción	% presente en el diesel
Hidrocarburos poliaromáticos	7.44
Hidrocarburos poliaromáticos sulfurados	2.81
Compuestos polinucleares aromáticos sulfurados	6.37
Total fracción*aromática	16.72

Composición de la parte aromática en fracciones que contienen a las especies organosulfuradas. Los valores son dados en % peso. (\*) corresponden a valores semejantes obtenidos para la fracción aromática en la tabla anterior.

El % en peso de azufre presente en las muestras de diesel es de 0.025 a 1.37.

#### **1.4 Componentes no hidrocarbonados.-**

El petróleo presenta cantidades apreciables de constituyentes no hidrocarbonados principalmente azufre, nitrógeno y oxígeno contenidos en los compuestos orgánicos y en suspensiones coloidales como sales orgánicas, además de presentar metales como el níquel, vanadio, entre otros. Estos constituyentes aparecen en todo el intervalo de la ebullición del petróleo, pero tienden a concentrarse principalmente en las fracciones pesadas y en los residuos no volátiles.

##### **1.4.1 Compuestos azufrados.-**

El azufre es el tercer constituyente atómico más abundante de los crudos después del carbono e hidrógeno se presenta en las fracciones intermedias y pesadas; por esta razón, los compuestos azufrados se encuentran entre los más importantes constituyentes heteroatómicos del petróleo, contribuyen a la generación de la alta densidad del crudo; el contenido de azufre varía desde 0.04% para una parafina ligera hasta 6% o más para los crudos pesados (Speight 1991). Sin embargo, la distribución del azufre en las diferentes fracciones del petróleo varía de un crudo a otro.

Los compuestos de azufre identificados en la fracción ligera e intermedia de los crudos (hasta C<sub>25</sub>) pertenecen a 4 clases principales en distintas cantidades.

- a) Tioles ó mercaptanos
- b) Sulfuros
- c) Disulfuros
- d) Derivados del tiofeno.

##### **Tioles**

La mayoría de los tioles tienen peso molecular bajo menos de ocho átomos de carbono; pueden considerarse como derivados del sulfuro de hidrógeno por medio de la sustitución de un radical alquilo o cicloalquilo por un átomo de hidrógeno.

##### **Sulfuros**

Pueden considerarse como derivados del sulfuro de hidrógeno mediante la sustitución de dos átomos de hidrógeno por grupos de alquilo; generalmente son escasos.

#### Disulfuros

Tienen una estructura similar a los sulfuros pero el puente de azufre se compone de 2 átomos de azufre en lugar de uno algunos cuantos se han identificado en el intervalo de peso molecular bajo p.e., ditiabutano y ditiáhexano.

#### Derivados del tiofeno

El tiofeno es un anillo insaturado de cinco miembros formado por un azufre y cuatro carbonos; el propio tiofeno es muy escaso, pero los benzotiofenos, dibenzotiofenos y benzonaftiofenos (formados por un anillo de tiofeno y uno, dos ó tres anillos benceno, respectivamente), son constituyentes importantes de todos los crudos de alto contenido de azufre, se encuentran en pequeña cantidad en los crudos de baja cantidad de azufre.

Ho y colaboradores en 1974 (Tissot y Welte, 1982) demostraron que los dibenzotiofenos constituyen el principal grupo de los compuestos tiofénicos en crudos con alto contenido de azufre.

#### Heteroátomos

Los elementos oxígeno, nitrógeno y azufre pueden encontrarse en núcleos policíclicos aromáticos con cadenas lineales o ramificadas; constituyen los extremos pesados del petróleo y deben considerarse como los miembros extremos del alto peso molecular de las series aromáticas y naftenoaromáticas. Cuando aumenta el peso molecular por arriba de 700 es probable que contenga uno o más heteroátomos, la concentración de O, N y S es alta. Consecuentemente en el petróleo pesado no existe una molécula pura aromática en el extremo pesado del petróleo y todos los constituyentes contienen átomos de oxígeno, nitrógeno ó azufre sustituyendo en ocasiones a los átomos de carbono en la estructura cíclica.

La tabla 5 proporciona los datos acerca de la nomenclatura y los tipos de compuestos organoazufrados presentes en los combustibles fósiles.

### 1.5 Efectos del azufre en la industria petrolera y el medio ambiente.-

Los compuestos de azufre producen contaminantes primarios como el bióxido de azufre ( $\text{SO}_2$ ) y el ácido sulfhídrico ( $\text{H}_2\text{S}$ ) los cuales proceden directamente de la combustión de carburantes éstos al interactuar químicamente con los componentes normales de la atmósfera originan contaminantes secundarios como los sulfitos ( $\text{SO}_3$ ), el ácido sulfúrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) entre otros, dando como resultado el fenómeno de la lluvia ácida (Seinfeld 1982); provocando a la ecología y medio ambiente, desde cambios drásticos en la naturaleza florística y faunística de la tierra hasta la desaparición de especies, p.e.:

1. En la vegetación daña los tejidos aéreos de los árboles, el lixiviamiento foliar y cambios en los procesos metabólicos.

2. Provoca toxicidad ó mutagénesis en muchos sistemas biológicos (Tilka, y Tetrahedron, 1960-1976).

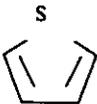
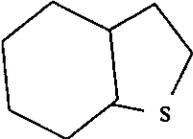
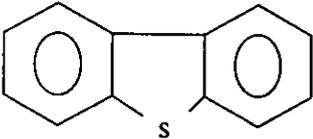
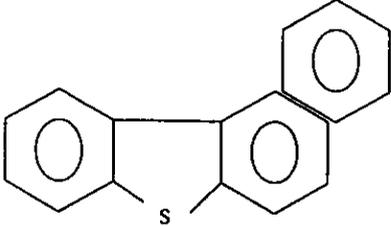
3. En los animales se manifiesta con la sensibilidad a nivel cutánea, con pérdida de pelo y sequedad de las vías respiratorias.

En la industria de refinación:

1. Envenena los catalizadores incrementando el costo de proceso y parando el tren de producción.

2.- Corroe y destruye tuberías , equipos de refinación y sistemas de transporte.

**Tabla 5.- Nomenclatura y tipos de compuestos orgánicos azufrados.**

RSH	Tioles (mercaptanos)
RSR'	Sulfuros
S	Sulfuros cíclicos
	
RSSR'	Disulfuros
S	Tiofeno
	
	Benzotiofeno
	Dibenzotiofeno
	Naftobenzotiofeno

R= Compuestos orgánicos lineales y/o ramificados. ( Speight 1991)

## **1.6 Fundamentos teóricos de la hidrosulfuración.-**

### **1.6.1. Fundamentos del proceso.-**

La hidrosulfuración catalítica es el proceso mediante el cual se reduce el contenido de azufre presente en las diferentes fracciones del petróleo, por reacción de estos compuestos con hidrógeno en presencia de un catalizador a condiciones de operación convenientes (temperatura y presión altas); dando como resultado compuestos fáciles de remover tales como el ácido sulfhídrico e hidrocarburos saturados, además del amoníaco y cloruro de amonio. Además de remover el azufre también remueve nitrógeno y oxígeno.

Dado que se efectúan reacciones de hidrogenación, se obtienen incrementos en la calidad de los productos hidrotratados por la remoción de compuestos contaminantes y la disminución en el contenido de compuestos insaturados logrando obtener la saturación de las moléculas, como por ejemplo, los compuestos aromáticos y olefinas entre otros. Esto provoca un mejoramiento en el valor comercial de las gasolinas y el diesel, además de mejorar el índice de viscosidad de los aceites lubricantes.

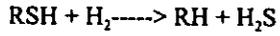
### **1.6.2 Reacciones químicas de hidrosulfuración HDS.-**

La hidrosulfuración de los compuestos orgánicos es una reacción endotérmica e irreversible bajo las condiciones de operación empleadas en la industria de refinación (Temperatura de 290 a  $>540^{\circ}\text{C}$  ; presión de 28 a 100 atmósferas).

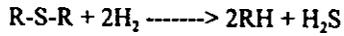
Estas reacciones se caracterizan por el rompimiento del enlace C-S, seguido por la saturación de los enlaces olefinicos y la formación de ácido sulfhídrico. En la figura 1 se muestran algunas reacciones teóricas que pudiesen suceder en la HDS; sin embargo algunas reacciones tales como en los compuestos aromáticos la HDS no es muy eficiente.

**Figura 1.- Reacciones teóricas en la hidrodesulfuración**  
**R= Radical orgánico**

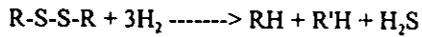
**A) Mercaptanos**



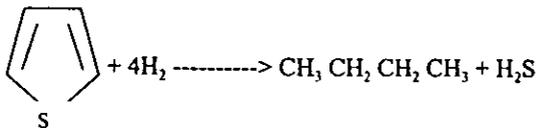
**B) Sulfuros**



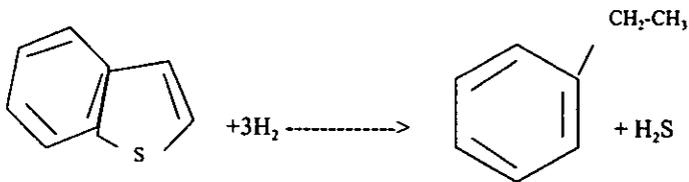
**C) Disulfuros**



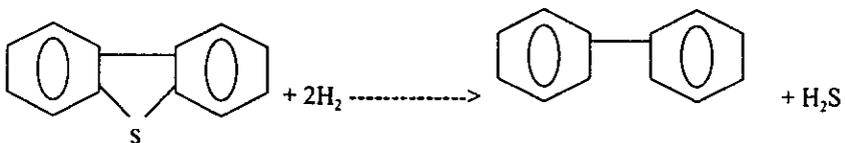
**D) Tiofenos**



**E) Benzotiofenos**



**F) Dibenzotiofenos**



### **1.6.3 Desventajas de la hidrodesulfuración.**

La hidrodesulfuración es en la actualidad, el proceso de eliminación de azufre orgánico de los hidrocarburos convencional, sin embargo, presenta algunas desventajas en cuanto al elevado costo del equipo por el requerimiento de alta presión y temperatura; el envenenamiento de los catalizadores por el  $H_2S$  resultante provoca un aumento considerable en los costos de producción.

Por otra parte la HDS no elimina el azufre de los compuestos que presentan ramificaciones complejas tanto de grupos aromáticos como de cadenas lineales limitando de esta forma la eficiencia desulfuradora.

## **1.7 Biodesulfuración (BDS) Fundamentos Teóricos**

### **1.7.1 Breve historia de la microbiología del petróleo.-**

Inicialmente los trabajos relacionados con la microbiología del petróleo se enfocaron a la interacción de los organismos con los combustibles fósiles, por un lado hacia el origen de la química de la transformación de la materia orgánica en petróleo (Atlas, 1984) sugiriendo que esta transformación es debida a la actividad bacteriana que forma una matriz compleja de los distintos grupos de hidrocarburos en sedimentos recientes, esto influenciado por las condiciones geofísicas y químicas del medio en el cual se encuentran inmersos. Y por el otro, en 1913 y 1925 Sohngen y Tausson respectivamente iniciaron sus trabajos con bacterias que oxidan a los hidrocarburos; tanto el geólogo ruso Mogilevskii y el microbiólogo Butkevich indicaron que este tipo de bacterias serían una buena herramienta para la industria del petróleo así se dio comienzo a la investigación de la microbiología del petróleo

Por otra parte, a partir de 1980 hasta la fecha, la integración de la ecología microbiana, fisiología, microbiología, genética y molecular, ha contribuido al avance en el aprovechamiento de los organismos que se encuentran presentes en los combustibles fósiles para aumentar su capacidad metabólica ya sea de degradación, desulfuración, denitrificación, producción de biosurfactantes entre otros; además de proporcionar los requerimientos nutricionales que necesitan los microorganismos para un óptimo aprovechamiento.

### **1.7.2 El azufre en la materia viva.-**

El azufre juega un papel importante en la gran variedad de actividades celulares, se encuentra en la mayor parte de las proteínas, es componente en algunos aminoácidos tales como, la metionina o la cisteína y en una gran variedad de coenzimas; puede influir en la determinación de la estructura y función de las proteínas o presentarse como donador o aceptor de electrones para la generación de reacciones de alta energía (Davis *et al.*, 1973; Dayson, 1975; Grossman, 1995).

Muchos microorganismos utilizan el azufre de los aminoácidos cisteína y/o metionina, pero también pueden utilizar el sulfato inorgánico ( $SO_4$ ) como única fuente de

azufre para sintetizar estos aminoácidos y también vitaminas que contienen azufre como la tiamina, biotina, ácido lipoico y proteínas ferredoxinas. A partir del azufre de la cisteína pueden sintetizarse otros compuestos orgánicos de azufre que van a contribuir a la estructura y actividad celular (Dyson, 1975; Brock, 1978). Representa el 1% en peso celular (Huxtable, 1986; Atlas, 1989).

### 1.7.3 Fundamentos de la Biodesulfuración.-

A partir de los años 30's, se realizan varios estudios con el fin de complementar la HDS y aumentar la eficiencia de remoción del azufre con procesos biológicos, aplicados antes de la combustión de los hidrocarburos, naciendo de esta forma el concepto de biodesulfuración, proceso por el cual se remueve el azufre, p.e., de los combustibles (petróleo, carbón y sus fracciones destiladas) y gases, entre otros, a través de la acción de los microorganismos ó sus enzimas, que en su mayoría son bacterias aerobias y anaerobias, así como algunas clases de hongos.

Estos estudios se iniciaron al observar que existía crecimiento microbiano en zonas contaminadas de petróleo; aislaron las cepas y realizaron pruebas de crecimiento utilizando muestras de suelo, petróleo o carbón como fuente de azufre con medio líquido mineral (Maliyantz, 1935; Stravinski, 1950; Kirshenbaum, 1961; Sorkhoh, 1990), y en base a los resultados concluyeron que se producían dos líneas de metabolismo que realizan la conversión de los compuestos organosulfurados: un sistema aerobio/oxidativo, que produce compuestos solubles en agua como los sulfatos y sulfitos; y un sistema anaerobio/reductor en donde se reduce el carbon adyacente de la molécula del DBT y da la producción de H<sub>2</sub>S, siendo este un compuesto fácil de remover por las plantas Claus de las refinerías; sin embargo, por los requerimientos específicos tecnológicos y la capacitación de personal especializado en esas fechas y en las actuales no se ha logrado comercializar esta tecnología (Maliyantz, 1935; Kilbane *et al.*, 1989-92; Monticello *et al.*, 1985-94; Grossman *et al.*, 1995-96; Kulpa, 1996).

Hasta el momento se ha aislado un gran número de microorganismos provenientes de lugares contaminados con hidrocarburos, de origen petrolero, aguas termales sulfurosas y aguas residuales industriales. (Maliyantz, 1935; Strawinski, 1950; Kirshenbaum, 1961; Sorkhoh, 1990). Sin embargo no todos los microorganismos realizan de manera eficiente la escisión específica del enlace C-S. Entre los principales microorganismos aislados podemos citar a: *Pseudomonas sp.*, *Bacterium sp.*, *Achromobacter sp.*, *Clostridium sp.*, *Alcaligenes sp.*, *Micrococci sp.*, *Proactinomyces sp.*, *Penicillium sp.*, *Actinomyces sp.*, *Aspergillus sp.*, *Bacillus sp.*, *Rhodococcus sp.*, *Beijerinckia sp.*, *Desulfovibrio sp.*, etc. (Monticello *et al.*, 1985; Kim *et al.*, 1990; Omori *et al.*, 1992; Lee *et al.*, 1995; Malik, 1978; Finnerty *et al.*, 1986).

Algunas de estas cepas presentan actividades óptimas y estabilidad genética para obtener una adecuada eficiencia de remoción de azufre y conservar el poder calorífico del combustible.

En general se han descrito dos principales vías metabólicas de remoción de azufre:

1. La oxidativa rompe los enlaces C-S de manera específica, produce compuestos solubles en agua tales como los sulfatos y sulfitos; no afecta el poder calorífico del combustible (Kilbane *et al.*, 1989-1992; Denome *et al.*, 1993; Gallagher *et al.*, 1993; Campbell 1993; Omori *et al.*, 1994; Izumi *et al.*, 1994; Oshiro *et al.*, 1994; Grossman *et al.*, 1995-96; Kitchell *et al.*)

2. La reductiva no es específica del azufre, rompe enlaces C-C; produce H<sub>2</sub>S fácil de remover por los sistemas de recuperación de azufre; provoca una disminución en el poder calorífico del combustible (Kim *et al.*, 1990; Pifferi 1990; Armstrong 1995; Lizama 1995).

#### 1.7.4 Biodesulfuración degradativa ó reductiva.-

El proceso anaerobio degradativo requiere de una fuente de electrones, utilizando al hidrógeno ó al metilviolágeno como agentes reductores, para reducir al carbón adyacente del azufre presente en la molécula aromática y liberar al azufre rompiendo la estructura molecular del compuesto aromático (Kim *et al.*, 1988). La remoción de los compuestos azufrados se da en forma de mercaptanos y H<sub>2</sub>S; éste último es colectado por las plantas de recuperación de azufre. A través de esta vía se obtienen remociones del 25 al 90% del azufre total en los combustibles fósiles.(Kim *et al.*,1988; Pifferi *et al.*, 1990; Lanzarini *et al.*, 1994; Armstrong *et al.*, 1995; Lizama *et al.*, 1995); sin embargo, Setti *et al.*, (1993), demuestra que esta vía no es muy eficiente debido a la baja remoción que presenta en las moléculas aromáticas, menciona que remueve de manera más eficiente el azufre presente en las moléculas lineales o ramificadas. La vía propuesta para este proceso se muestra en la figura 2.

#### 1.7.5 Biodesulfuración oxidativa.-

Los organismos aerobios presentan la vía "4S" propuesta inicialmente por Kee Rheen 1987 (Kulpa, 1996) (Omori *et al.*, 1992; van Afferden *et al.*, 1990; Monticello *et al.* 1996), en la cual es escindido el azufre del anillo aromático de la molécula dejando su estructura intacta y liberando al medio sulfatos y sulfitos solubles en agua y un producto metabólico el 2-hidroxibifenilo (2-HBP). Posteriormente Kilbane (1989), reporta que la molécula de DBT es utilizada como fuente de azufre para crecer. Otros autores mencionan esta vía explicando que además de las características mencionadas arriba, la molécula aromática no pierde su poder calorífico (Crawford *et al.*, 1990; Omori *et al.*, 1992; Izumi, 1993; Campbell, 1993; Olson *et al.*, 1993; Afferden *et al.*, 1993; Klein *et al.*, 1994; Johnson *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1994).

En algunos trabajos se utilizaron bacterias tioácidas: *Thiophyso volutants*, *Thiobacillus thiooxidans* y *Thiobacillus thiioparus*; realizando pruebas de remoción de azufre en los combustibles fósiles, principalmente carbón a través de una columna de corriente, por contacto estrecho de las fases bacteriana y combustible; obteniendo un 90% de remoción en menos de 10 minutos de contacto.(Kirshenbaum, 1961).

Como se mencionó con anterioridad existen diversos microorganismos capaces de realizar el proceso de biodesulfuración de manera eficiente, entre los que se puede mencionar a diferentes especies de *Pseudomonas spp.*, las cuales presentan un sistema de

desulfuración oxidativo no específico, en donde utilizan a los compuestos orgánicos azufrados y también degradan indistintamente a los compuestos hidrocarburos utilizándolos como fuente de carbono, sin embargo, para que el organismo no degrade a los hidrocarburos se les adiciona fuentes de carbono más accesibles como la glucosa, logrando así una significativa reducción del azufre en los combustibles fósiles.

Strawinski, (1950), realizó pruebas con este microorganismo obteniendo una reducción de 12.5% en el contenido de azufre proveniente del crudo de Arabia.

Diferentes autores, tales como Kodama *et al.*, 1970; Setti *et al.*, (1994), entre otros, han realizado experimentos de crecimiento, remoción de azufre, así como la aparición de productos metabólicos con este microorganismo, obteniendo como producto final al 3-hidroxi-2-formil-benzotiofeno, además de un producto al finalizar el crecimiento el DBT-sulfona, sin embargo, este microorganismo no es específico para el anclaje del azufre de las moléculas aromáticas azufradas.

En otros estudios relacionados con la eliminación del azufre presente en las moléculas aromáticas, Hartdegen *et al.*, (1984), presolubiliza al DBT, obteniendo un aumento en la actividad enzimática del microorganismo para desulfurar a las moléculas azufradas mencionando que es debido al transporte o la fijación de la molécula de DBT a la superficie de la membrana; disminuyendo así la tensión superficial, provocando un mejor contacto entre el sustrato a desulfurar y un aumento en la concentración celular (Hartdegen *et al.*, 1984).

Durante algún tiempo la mayoría de los investigadores realizaron pruebas de remoción de azufre utilizando cepas puras, tanto silvestres como mutadas, obteniendo índices de remoción de DBT alrededor del 90% y en combustibles reales obtenían remociones de azufre que iban desde 12.5% hasta 90% (Strawinski *et al.*, 1961; Kilbane *et al.*, 1992; Monticello *et al.*, 1994); posteriormente decidieron realizar experimentos utilizando combinaciones de microorganismos (Kilbane *et al.*, 1993) que utilizó combinaciones de dos cultivos microbianos de los géneros: *Rhodococcus rhodochrous Rhodococcus erythropholis*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Pseudomonas putida*, *Bacillus sphaericus*, encontrando que la mezcla más apropiada para remover el azufre es *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 y *Bacillus sphaericus* IGTS9 además de observar crecimiento en concentraciones de 4 a 50% de petróleo crudo; con lo que se llega a pensar que los sistemas mixtos son más eficientes, debido a la interacción que se puede dar entre ellos como un sistema de cooperatividad de tipo nutrimental, en donde uno de los organismos pueda separar el azufre de las moléculas orgánicas y el otro microorganismo realice la absorción de éste azufre.

Todos estos estudios nos llevan a utilizar al *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 como organismo desulfurador.

### 1.7.6 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8.

*Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 es el organismo con la mayor actividad hasta ahora reportado (Kilbane *et al.*, 1992; Monticello *et al.*, 1996; Grossman, 1996); presenta las siguientes características:

- a) Es un actinomiceto aerobio, gram positivo, perteneciente a la familia Nocardiae;
- b) No produce esporas;

- c) Es pleomórfico, el cual después de la formación de un micelio primario se fractura rápidamente en bacilos y cocos;
- d) La coloración de colonias va desde amarillo crema hasta salmón;
- e) Presenta el quimiotipo de pared celular del tipo IV y contenido G+C de 59-69%.
- f) El crecimiento y la estabilidad del micelio y su fragmentación está afectada por la consistencia y composición del medio de crecimiento, la temperatura de incubación y otros factores similares. (Lechevalier, 1976; Goodfellow & Minnikin, 1977).
- g) El análisis quimiotaxonomico revela que la pared celular está constituida de ácido diaminopimélico, teniendo ácido tuberculoesteárico; además, siendo la mayoría de los ácidos grasos el ácido palmítico, el palmitoleico y el esteárico;
- h) Es catalasa positivo y oxidasa negativo.
- i) Crece en glucosa, maltosa, manitol, sorbitol, benzoato de sodio, lactato de sodio, testosterona, L-tirosina, glicerol y ácido p-hidroxibenzoico como fuentes de carbón, y no crece sobre inositol ni trehalosa; (Lechevalier, 1976; Goodfellow y Minnikin, 1977; Sorkhon, 1990).

Este microorganismo fue obtenido de fuentes naturales tales como lodos contaminados, aguas residuales, suelos contaminados de petróleo crudo (Kilbane y Maka, 1988; Sorkhon *et al.*, 1990; Monticello *et al.*, 1993).

Inicialmente lo aislaron con la cualidad de ser un organismo biodegradador de hidrocarburos, posteriormente lo mantuvieron en cultivo bajo condiciones continuas de restricción de azufre y en presencia de dibenzotiofeno; este cultivo fue expuesto a un mutageno químico 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina (NTG) o por luz UV provocando una mutación no dirigida a nivel plásmido; esta mutación le confiere al microorganismo utilizar al dibenzotiofeno como fuente de azufre al metabolizarlo por la vía "4S" (Kilbane J.J. 1988-1990; Monticello D. 1993. Kee Rheen 1987 (Kulpa, 1996) Figura 3. Gracias a su habilidad para obtener el azufre de material carbonaceo pulverizado se realizaron pruebas con otras moléculas y para 1990 el microorganismo se utilizaba para desulfurar muestras de petróleo y sus fracciones derivadas (Monticello, 1993)

La vía metabólica tiene lugar en el citosol de las células (Omori *et al.*, 1992; Gallagher *et al.*, 1993; Izumi *et al.*, 1994; Ohshiro *et al.*, 1994; Denome, 1994; Monticello *et al.*, 1996); a través de un complejo multienzimático que depende del oxígeno para realizar la vía completa; la identificación, secuenciación, expresión y clonación de los genes se realizó en la cepa IGTS8. El operón esta constituido por tres genes nombrados *dsz* A, B y C (por desulfuración) en donde la proteína DBT-monooxigenasa (DBT-MO) del gen *dsz*C provoca la primera etapa de la vía, oxidando al DBT en DBTO<sub>2</sub>; la proteína DBTO<sub>2</sub>-monooxigenasa (DBTO<sub>2</sub>-MO) que es codificada por el gen *dsz* A realiza la conversión de DBTO<sub>2</sub> a HPBS y la proteína 2-(2-hidroxifenil)benzenosulfonato desulfinasas (HPBS desulfinasas) codificada por el gen *dsz* B produce al HPB y azufre inorgánico (SO<sub>4</sub>); a pesar de las técnicas genéticas tan avanzadas, este sistema catalítico no es muy claro (Denome *et al.*, 1993-1994; Sunairi *et al.*, 1993; Piddington *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1996).

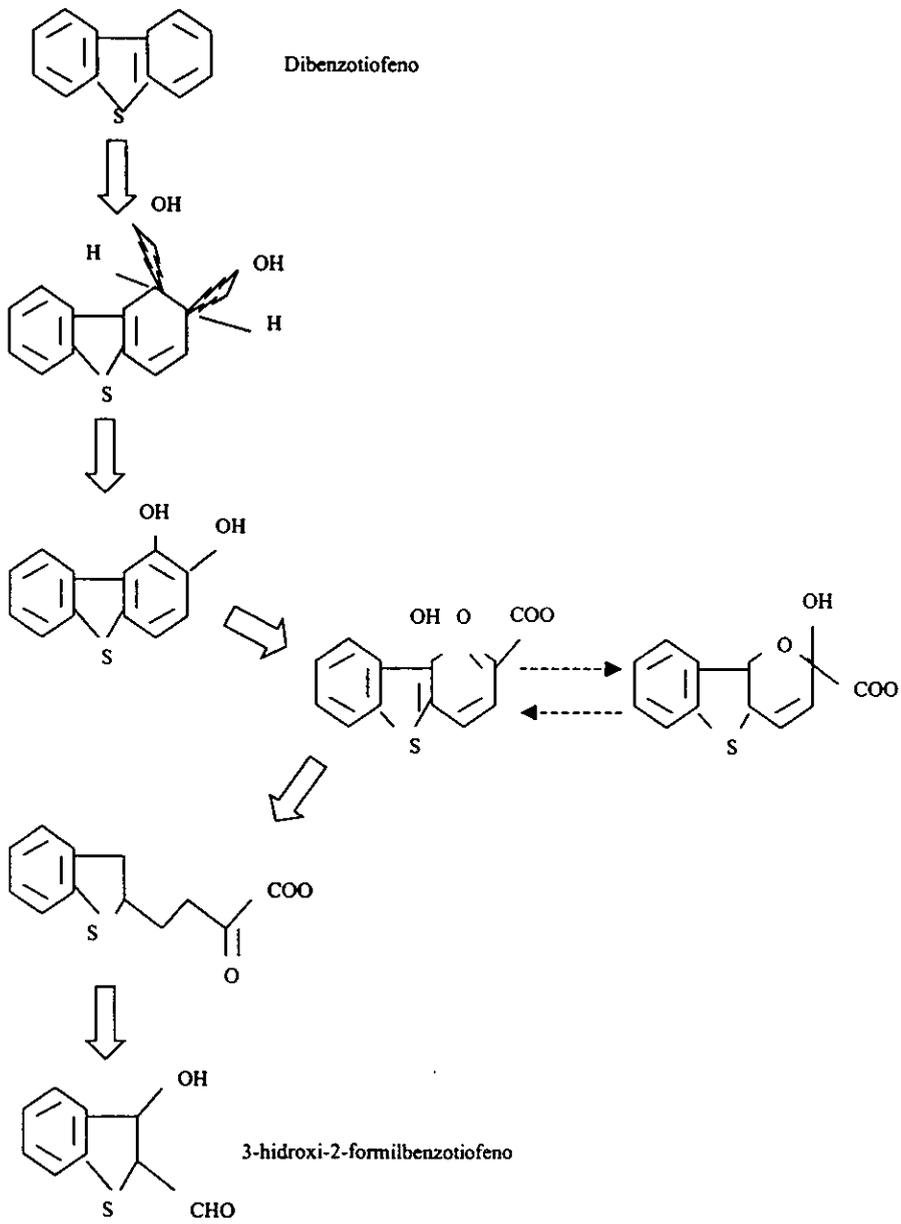


Figura 2. Vía degradativa ó reductiva del dibenzotiofeno (Kodama *et al.*, 1970; Laborde y Gibson, 1977; Monticello *et al.*, 1985)

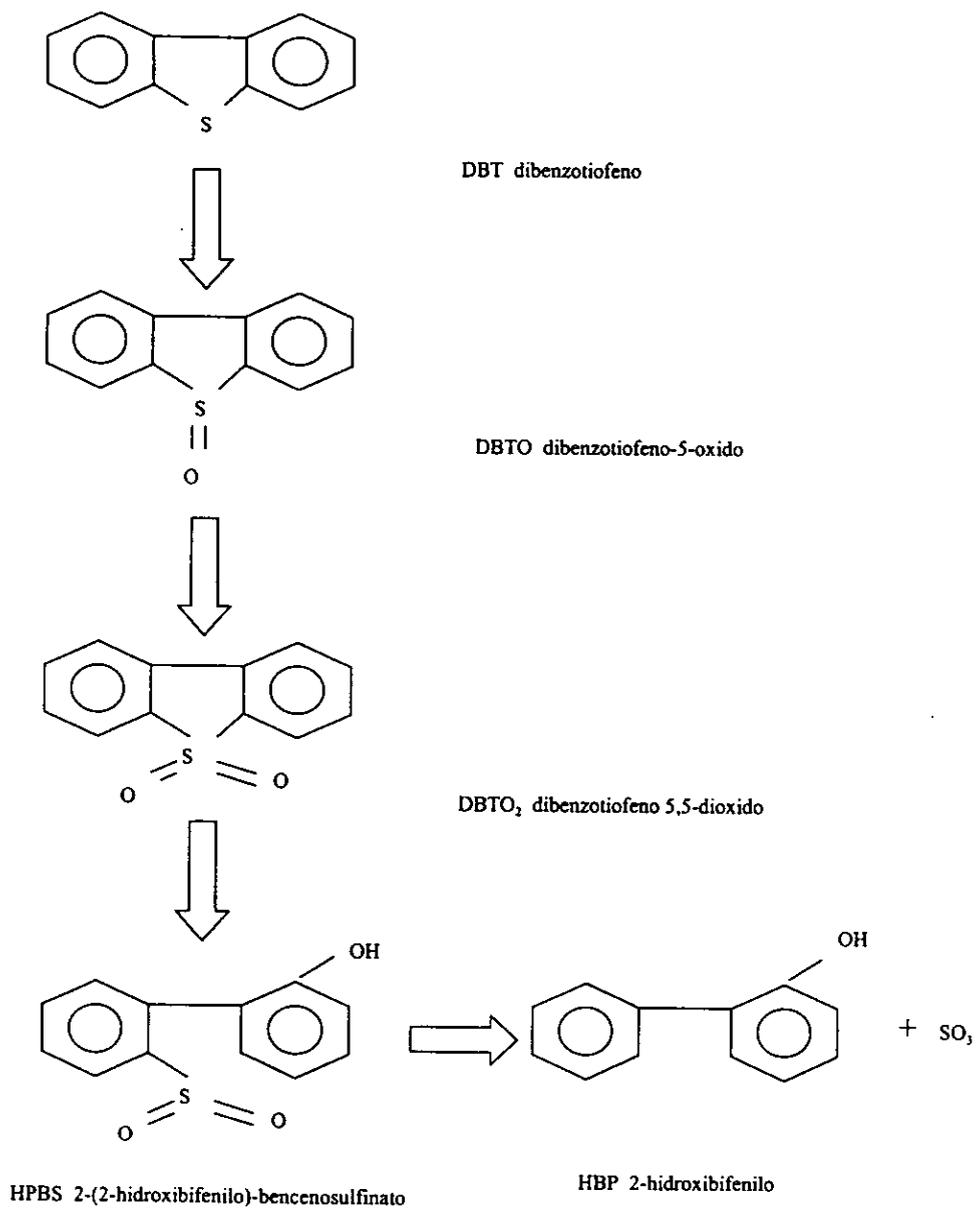


Figura 3. Vía oxidativa del dibenzotiofeno (Gray *et al.*, 1996)

## Material y métodos:

### 2.1 Microorganismo de estudio y condiciones de cultivo.-

#### 2.1.1 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8

*Rhodococcus rhodochrous* inicialmente se presenta como un organismo biodegradador de hidrocarburos por lo que ha sido seleccionado de una gran variedad de cultivos bacterianos provenientes de distintas fuentes incluyendo lodos de aguas residuales, lodos activados provenientes de aguas de sistemas de tratamiento de las refinerías, suelos contaminados de carbón y colección de cultivos de laboratorio; estos microorganismos son tratados bajo estrictas condiciones de ausencia de azufre, sustituyendo con compuestos orgánicos azufrados, siendo el más utilizado dibenzotiofeno, gracias a los esfuerzos realizados por Kilbane *et al.*, 1985, Finnerty *et al.*, 1985 y Monticello *et al.*, 1985, sobre los microorganismos más hábiles para tomar el azufre de los compuestos orgánicos se logró obtener un microorganismo mutado, estable y con la habilidad de escindir los enlaces C-S de las moléculas organosulfuradas llamado *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 el cual se encuentra y se adquirió en American Type Culture Collection (ATCC) con número de registro 53968.

#### 2.1.2 Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo se refirieron a las establecidas por Kilbane y Maka (1985), Monticello, *et al.*, (1985), Kilbane y Bielaga (1990); Olson *et al* (1993), en donde el microorganismo se creció en un precultivo constituido de caldo nutritivo 8g/l, se incubó por 96 horas para estandarizar el crecimiento, se procedió a lavar tres veces utilizando el medio basal de sales (MBS) propuesto por los autores arriba mencionados que consistió de los siguientes reactivos:  $K_2HPO_4$  4g,  $Na_2HPO_4$  4g,  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  0.2g,  $CaCl_2 \cdot 2H_2O$  0.001g,  $FeCl_3 \cdot 6H_2O$  0.001g, por litro de agua destilada desionizada, pH 6.8-7. La fuente de carbono utilizada fue glicerol al 1% (P/V) y dibenzotiofeno (DBT) como fuente de azufre.

La biomasa obtenida del precultivo se centrifugó a 10,000 r.p.m. a 4°C en una centrifuga Beckman modelo J2-21M/E. Al obtener el botón celular éste se resuspendió en 100 ml de MBS, y se utilizó en posteriores pruebas.

### 2.2 Conservación del microorganismo:

Un método para conservar al microorganismo fue resuspender el botón celular extraído del precultivo en 30 ml del siguiente medio de conservación:  $KH_2PO_4$ , 3g;  $K_2HPO_4$ , 7g; Citrato de sodio, 0.5g;  $MgSO_4$ , 0.1g; glicerol al 50% (v/v); en un litro de agua desionizada (BIBLIO). Esta suspensión celular se colocó en viales estériles sellados y guardados a -70°C.

Otra forma de conservación a corto plazo de utilización fue, en tubos slant los cuales contenían agar, 15g; dextrosa, 3g; caldo nutritivo, 8g; en un litro de agua desionizada; después de solidificado el agar se adiciona DBT 0.1%; los tubos fueron inoculados con una

asada e incubados en una incubadora modelo VWR 1740 duplex a 35°C hasta la aparición de crecimiento después se guardaron a 4°C.

### **2.3 Pruebas experimentales de crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8.**

#### **2.3.1 Determinación de la concentración óptima del inóculo para observar las 3 etapas de maduración en la fase exponencial.**

Para estas pruebas se utilizaron cuatro variables de diferentes concentraciones de inóculo: 1%, 2%, 3%, 4% (V/V) del precultivo; una prueba de crecimiento fue inoculada con un mililitro del precultivo en cada matraz lo que equivale al 1%; al inocularse con esa cantidad, los matraces presentaron una densidad óptica inicial de 0.01 a 550 nm. La siguiente prueba fue inoculada con dos mililitros del precultivo lo que equivale al 2%, presentando una densidad óptica inicial en los matraces inoculados de 0.05 a 550 nm.

Otra fue inocular con tres mililitros del precultivo equivalente al 3% dando una densidad óptica inicial de 0.1 a 550 nm.

La última de estas pruebas se inoculó con cinco mililitros del precultivo obteniendo una densidad óptica inicial de 0.4.

Se utilizaron 124 matraces con 50 ml de medio MBS y 1% (P/V) de glicerol como fuente de carbono más 0.1% de dibenzotiofeno (DBT) como fuente de azufre; 2 matraces para cada tiempo de muestreo el cual se realizó cada 12 horas durante 192 horas para cada una de las cuatro variables. Cada prueba tenía sus blancos, es decir, medio sin organismos. Los matraces estaban integrados con una celda para medir densidad óptica a 550nm con un espectrofotómetro Hach modelo DR/2000. Ya inoculados se colocaron en agitación (Agitador New Brunswick) a 100 r.p.m. a 30°C.

A cada uno de los matraces de cada prueba se les midió lo siguiente:

- a) Medición turbidimétrica determinando la densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm.
- b) Conteo celular en placa para medir las unidades formadoras de colonias (UFC), de cada matraz por duplicado, las cajas fueron incubadas a 30°C C en una incubadora modelo VWR 1740 duplex. Después de 24 horas se realizó el conteo de colonias.
- c) Tinción de gram para verificar la pureza del cultivo; además de observar los cambios morfológicos del microorganismo.

#### **2.3.2 Determinación del efecto de la fuente de azufre sobre el crecimiento del microorganismo.**

Para determinar el efecto de la fuente de azufre orgánico e inorgánico y la ausencia de azufre sobre el crecimiento del microorganismo se inocularon 45 matraces con 50 ml de MBS y 1% (P/V) de glicerol como fuente de carbono más la fuente de azufre en cada prueba experimental de crecimiento del microorganismo; la cantidad de inóculo fue de 2 ml para cada matraz con una densidad óptica inicial estandarizada de 0.05 a 550nm. Para estas pruebas se utilizaron 3 matraces para cada tiempo de muestreo el cual se realizó cada 12 horas durante 192 horas para cada una de las tres variables: azufre inorgánico ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$  a 20mM), azufre orgánico (0.1% de DBT) y sin azufre. Cada prueba tenía sus blancos, es

decir, medio sin organismos. Los matraces estaban integrados con una celda para medir densidad óptica a 550nm con un espectrofotómetro Hach modelo DR/2000. Ya inoculados se colocaron en agitación (Agitador New Brunswick) a 100 r.p.m. a 30°C.

A cada matraz (3X) de los muestreos se realizó lo siguiente:

- a) Medición turbidimétrica determinando la densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm.
- b) Conteo celular en placa para medir las unidades formadoras de colonias (UFC), de cada matraz por duplicado, las cajas fueron incubadas a 30°C C en una incubadora modelo VWR 1740 duplex. Después de 24 horas se realizó el conteo de colonias.
- c) Tinción de gram para verificar la pureza del cultivo; además de observar los cambios morfológicos del microorganismo.
- d) A las 96 horas de crecimiento uno de los matraces de cada prueba se centrifugó y se lavó tres veces con solución salina al 0.85% y al matraz de la prueba con DBT se le agregó una solución de hexano al 15% para disolver al dibenzotiofeno y separarlo de los microorganismos; posteriormente se procedió a secar las muestras en una estufa Fisher Isotemp 500 Series a 120°C por 24 horas, las muestras se enviaron al laboratorio central del Instituto Mexicano del Petróleo (IMP) para el análisis elemental del microorganismo.

Los métodos utilizados son los siguientes:

Método de prueba para la determinación de carbono, nitrógeno y oxígeno en sólidos y líquidos IMP-QA-208; este método se emplea para determinar C, H, N y O en muestras cuya descomposición suceda como máximo a 1150 °C; se resume de la siguiente manera:

La muestra, ya preparada se coloca en una de las 49 posiciones del alimentador automático de muestras que a su vez la introduce al tubo de combustión de cuarzo, empacado con CuO a una temperatura de 1050 °C dando origen a la formación de óxidos de nitrógeno (Nox.), CO<sub>2</sub> y agua, que luego son transportados por una corriente de helio a un tubo de cuarzo a 650 °C empacada con cobre elemental donde se efectúa la reducción de los óxidos de nitrógeno gaseoso y posteriormente son trasladados al detector de conductividad térmica, proporcionando en forma automática los resultados en % en peso de carbono, hidrógeno y nitrógeno. Para determinar oxígeno la muestra se prepara de la misma forma que para CHN se alimenta a un tubo de cuarzo empacado con carbón a temperatura de 1140 °C, efectuándose una pirólisis y dando lugar a la formación de CO para luego ser transportada por una mezcla de 95% de nitrógeno y 5% de hidrógeno ( como gas de arrastre) a un fotómetro de infrarrojo donde se efectúa la detección de CO, proporcionando el resultado en % en peso de oxígeno. El registro de las mediciones, documentación y evaluación se basa en la curva de calibración tanto para el modo CHN como para el modo O. El equipo utilizado es un analizador CHN-O RAPID HERAUS cuenta con una computadora Hewlett Packard 9123, con un monitor HP 15II TOCHSCREEN, una impresora HP THINKJET y una microbalanza Perkin-Elmer AD-4 autobalance como equipo auxiliar para efectuar este método de prueba.

En cuanto a la determinación de azufre se utilizó el método IMP-QA-202, se resume como sigue: La muestra se pesa en un crisol y se quema en un horno de combustión en una atmósfera de oxígeno en donde el azufre es oxidado a SO<sub>2</sub>; la humedad y el polvo son retenidos en dos filtros y el SO<sub>2</sub> producido en forma gaseosa es medido por un detector de

infrarrojos, la calibración programada y el peso de la muestra son enviados al microprocesador, el cual se encarga de calcular el resultado del análisis para ser proyectado e impreso en la consola del equipo de control. El equipo utilizado es un Sistema Leco para azufre modelo SC-32 equipado con una consola de control.

#### **2.4 Seguimiento analítico de la eliminación y oxidación del DBT por *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 para el proceso de biodesulfuración.**

##### **2.4.1 Determinación de la actividad desulfuradora en los diferentes estados morfológicos del microorganismo en DBT.**

La realización de estas pruebas se fue dando al observar los cambios morfológicos que se dieron en el microorganismo a través de las cinéticas de crecimiento y remoción de azufre en el dibenzotiofeno.

Para cada una de las pruebas de crecimiento y remoción del azufre del DBT se utilizó un lote de 15 matraces por duplicado para cada tiempo de muestreo el cual se realizó cada 12 horas durante 192 horas más el blanco, los cuales contenían 50 ml de MBS y 1% (P/V) de glicerol como fuente de carbono más 0.1% de DBT como fuente de azufre. En cuanto al inóculo, se utilizó de la manera antes descrita para la primera prueba siendo la concentración inicial de 2% para cada matraz con una densidad óptica inicial estandarizada de 0.05 a 550nm; las posteriores cinéticas fueron inoculadas utilizando como inóculo el matraz del último muestreo de la cinética anterior con una densidad óptica inicial en todas las pruebas de 0.05 a 550nm; posteriormente se colocaron en agitación (Agitador New Brunswick) a 100 r.p.m. a 30°C.

Durante todos los cambios morfológicos presentados en las diferentes pruebas de crecimiento se les realizó lo siguiente:

- a) Medición turbidimétrica determinando la densidad óptica a una longitud de onda de 550 nm.
- b) Conteo celular en placa para medir las unidades formadoras de colonias (UFC), de cada matraz por duplicado, las cajas fueron incubadas a 30°C en una incubadora modelo VWR 1740 duplex. Después de 24 horas se realizó el conteo de colonias.
- c) Tinción de gram para verificar la pureza del cultivo; además de observar los cambios morfológicos del microorganismo.
- d) Pruebas de remoción de DBT que se realizaron de la siguiente manera:

A los matraces del tiempo de muestreo correspondiente se les adicionó 15 ml (de 5 en 5 ml) de una solución de antraceno-tolueno 1g/l, agitando de manera vigorosa durante 10 minutos, posteriormente se procedió a extraer la muestra colocándola en embudos de separación, dejando reposar el tiempo necesario hasta que las dos fases se observaran de manera clara, la fase orgánica se colocó en frascos ambar ésta contenía al DBT disuelto; la fase acuosa se colocó en frascos normales y se enviaron al laboratorio central para cuantificar sulfatos. La fase orgánica se inyectó en un cromatógrafo de gases Perkin Elmer 8500, presenta detector de ionización de flama con columna HP-1 fase no polar con dimensiones de 30mts x 0.3mm de diámetro interno, el volumen de inyección fue de 5µl.

#### 2.4.2 Cuantificación de la remoción del DBT por *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 e identificación del producto 2-hidroxibifenilo.

La cuantificación de la remoción del dibenzotiofeno se realizó como se indicó en el inciso (d) del punto anterior.

Posteriormente cuando se observó un pico diferente en el cromatógrafo se mando al laboratorio central del IMP a realizarle un estudio de espectrometría de masas para identificar el compuesto observado en el cromatógrafo de gases. El resumen de la técnica es el siguiente: se utiliza un Sistema de Cromatografía de Gases (CG) Hewlett Packard 5890 Serie II con Detector Selectivo de Masas 5971; las condiciones de análisis son:

- a) Temperatura inicial 40°C del horno del CG a 0 minutos
- b) Incremento de temperatura de 10°C por minuto
- c) Temperatura final de 270°C durante 10 minutos
- d) La columna es una HP5 MS
  - 1) Se inyectan 0.2 µl de la muestra al cromatógrafo de gases,
  - 2) La columna separa la muestra
  - 3) Con forme salen los efluentes de la columna hacia el detector son bombardeados por iones, provocando que las moléculas se ionicen , esta nube de iones se separa por medio de un cuadrupolo detectados con un multiplicador de electrones,
  - 4) Las señales son captadas y procesadas por comparación de espectros realizados por la computadora.

#### 2.5 Pruebas de remoción de azufre en el diesel.

Las pruebas de remoción de azufre sobre el diesel, se realizaron de la siguiente forma:

- a) Se utilizaron diferentes concentraciones de diesel/solución salina al 0.85%; de 1:3, 2:2, 3:1; que equivalen al 25, 50 y 75% de diesel primario por triplicado agregando un mililitro de inculo con una concentración de  $1 \times 10^9$  UFC/ml en fase exponencial de crecimiento y su respectivo blanco; se colocaron en agitación (Agitador New Brunswick) a 100 r.p.m. durante 24 horas a 30°C.

Transcurrido este tiempo se procedió a extraer la muestra, colocándola en un embudo de separación mandando la fase orgánica (diesel) al laboratorio central del IMP, el cual utiliza el método ASTM D-4294 que cuantifica el azufre en productos del petróleo por espectrometría fluorescente de rayos-X no dispersiva; a continuación se resume el método:

- i) La muestra es colocada en la radiación emitida de una fuente de rayos X. La energía de excitación puede ser derivada de una fuente radioactiva ó de un tubo de rayos X.
- ii) La exitación resultante característica de los rayos X es medida y el conteo acumulado es comparado con conteos de muestras de calibración previamente preparadas para obtener la concentración de azufre en % masa.
- iii) Tres grupos de calibración son requeridos para asegurar el intervalo de concentración de 0.0 a 5% masa de azufre.

iv) Los equipos utilizados son :

- 1) Analizador de fluorescencia de energía dispersa de rayos X,
  - 2) Fuente de excitación de rayos X con significativa energía arriba de 2.5 KeV,
  - 3) Taza de muestra removible equipada con una ventana de película plástica transparente reemplazante de rayos X y previniendo una profundidad de la muestra de al menos 3 mm,
  - 4) Detector de rayos X con alta sensibilidad en 2.3 KeV,
  - 5) Filtros u otros medios de discriminación entre radiación de azufre Ka y otros rayos X,
  - 6) Condiciones de señales electrónicas que incluyan las funciones de conteo de pulso y análisis de pulso de altura y por último
  - 7) Una pantalla ó impresora que registre en conteos % de azufre.
- b) Cuando la muestra se encontraba emulsificada se procedía a centrifugar y separar utilizando pipeta pasteur.
- c) Se realizó una prueba de remoción de azufre en diesel utilizando inóculo de las diferentes etapas de la fase exponencial de crecimiento del microorganismo en DBT.
- d) Se utilizaron tres matraces para cada prueba más su blanco, cada matraz contenía 25% de diesel y 75% de solución salina 0.85%, los tres matraces fueron inoculados con 1 ml de muestra proveniente de una prueba común de crecimiento del microorganismo con DBT como fuente de azufre de diferentes partes de la fase exponencial (temprana, media y tardía), las cuales ya se tenían identificadas en los tiempos de muestreo de 72, 96, 120 y 144 horas. Posteriormente, los matraces se colocaron en agitación (Agitador New Brunswick) a 100 r.p.m. durante 24 horas a 30°C.
- e) Se extrae la muestra, colocándola en un embudo de separación para que a la fase orgánica (diesel) se le realicen los análisis requeridos del % de azufre en el laboratorio central del IMP, el cual utiliza el método ASTM D-4294 antes descrito.

## **2.6 Estabilidad de la capacidad de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 para degradar DBT.**

Para revisar que el microorganismo se encuentre viable y con la capacidad de desulfurar se procedió a realizar la siguiente metodología:

- a) En placas con agar, 15g; dextrosa, 3g; por litro de agua desionizada, se le adicionó 250 µg/ml de estreptomina antes de solidificarse,
- b) Solidificado el agar se le adicionó 1 ml de una solución de DBT 0.1%/ hexano obteniendo la formación de una película fina de cristales de DBT en toda la caja,
- c) Se sembró con 1 ml de muestra tomada del matraz de crecimiento del microorganismo, el sembrado de las cajas se realizó con una varilla de vidrio en forma de L;
- d) Las cajas se incubaron en una incubadora modelo VWR 1740 duplex a 35°C por 24 horas,
- e) Se irradiaron bajo luz ultravioleta a 540nm, observando los halos fluorescentes formados alrededor de la colonia. Estas colonias se aislaron e incubaron en cajas y tubos slant nuevos a 35°C.

Otra prueba para verificar la estabilidad del *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 fue:

- a) Sembrar al microorganismo en cajas petri con agar, 15g; dextrosa, 3g; caldo nutritivo, 8g; por litro de agua desionizada,

- b) Se incubaron a 42°C por 24 horas
- c) Las colonias que lograron crecer se aislaban en nuevas cajas y tubos para trabajar con estos en pruebas posteriores. Este método y el anterior sobre la capacidad del *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 para degradar el DBT son tomados de las técnicas descritas por Monticello 1988 y Kilbane 1988, 1990, 1992.

La esterilización del material se realizó a 15 lb de presión por un tiempo de 20 minutos en un autoclave (Electric Pressure Steam Sterilizer Modelo No. 25X).

Para agitar los tubos slant y los tubos de diluciones para las UFC's se utilizó un Vortex (Gene 2 Scientific Industries).

El manejo de las muestras se realizó bajo una campana de flujo laminar EAC1 ENVIRCO (ENVIRONMENTAL AIR CONTROL, Inc.), la cual se limpió con fenol al 4% cada mes y antes de utilizarla se limpió con etanol al 70%.

El compuesto DBT (dibenzotiofeno) fue adquirido de Aldrich Chemical Company Inc., se esterilizó con radiación de luz ultravioleta de 366nm durante 24 horas para ello se requirió de una lámpara Multibanda de rayos UV-254 modelo UVGL-25.

Para la extracción de alicuotas de grado menor o igual a 1 ml se utilizaron pipetas automáticas Eppendorf con una graduación de 10µl-100µl y 100µl-1000µl con puntas esterilizadas en la autoclave.

## Resultados y discusiones

### I.- Concentración óptima del inóculo para observar las 3 etapas de maduración en la fase exponencial de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8.

El tamaño de inóculo es muy importante en lo que se refiere a crecimiento celular, modifica los parámetros cinéticos y la productividad del microorganismo de interés; por lo que el propósito de estas pruebas fue determinar la concentración adecuada de inóculo para identificar las tres etapas de la fase exponencial (temprana, media y tardía), esto con la intención de encontrar el momento preciso para obtener una mayor remoción de DBT y aplicarlo al diesel; por otra parte se pretendió reducir la fase de adaptación ó fase lag. Los resultados se observan en la figura 4.

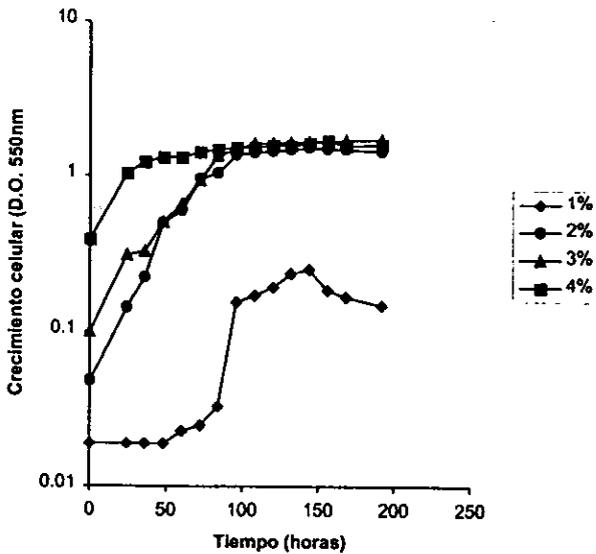


Figura 4. Crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 en MBS con glicerol como fuente de carbono y 0.1% de DBT como fuente de azufre, con diferente concentración de inóculo: ◆, 1%  $v/v$ ; ●, 2%  $v/v$ ; ▲, 3%  $v/v$  y ■, 4%  $v/v$ .

La proporción del crecimiento microbiano esta caracterizada por la velocidad específica de crecimiento  $\mu$  la cual se define como:

$$\mu = \frac{1}{X} \frac{dX}{dt}$$

donde X es la concentración celular (g/l), t es el tiempo (h) y  $\mu$  se mide en ( $h^{-1}$ ).

En la fase exponencial se tiene lo siguiente:

$$\frac{dX}{dt} = \mu X, \quad X = X_0 \text{ cuando } t = 0$$

Al integrar la ecuación anterior resulta:

$$\ln \frac{X}{X_0} = \mu t, \quad \text{Ó} \quad X = X_0 e^{\mu t}$$

en donde X y  $X_0$  son concentraciones celulares al tiempo t y t = 0.

El tiempo requerido para que la concentración celular se duplique se muestra en la siguiente ecuación. El crecimiento exponencial esta caracterizado como una línea recta en un papel semilogaritmo de ln X contra tiempo.

$$t_d = \frac{\ln 2}{\mu} = \frac{0.693}{\mu}$$

donde  $t_d$  es el tiempo de duplicación celular.

En la tabla 6 se muestran los resultados de los parámetros cinéticos obtenidos durante el crecimiento de *R. rhodochrous* IGTS8 a diferentes concentraciones de inóculo.

**Tabla 6.** Efecto del tamaño del inóculo en los parámetros cinéticos de crecimiento de *R. rhodochrous* IGTS8

Concentración de inóculo (% %)	D.O. inicial (550nm)	$\mu$ ( $h^{-1}$ )	Tiempo de duplicación ( $h^{-1}$ )	Tiempo de duración de la fase exponencial (horas)
1	0.01	0.129	5.37	84-96
2	0.05	0.042	16.5	0-72
3	0.1	0.029	23.9	0-84
4	0.4	0.033	21	0-36

Al observar la figura 4 y la tabla 6 se aprecia que al utilizar una concentración de inóculo muy pequeño de 1% obtenemos una densidad óptica inicial (D.O.) de 0.01 a una longitud de onda de 550 nm y una concentración celular inicial de 5 UFC's/ml; la curva de crecimiento se observa lenta en todas sus fases, sobre todo en la fase lag o de adaptación la

cual transcurrió durante 72 hrs; en la fase exponencial la velocidad específica de crecimiento es de  $0.129\text{h}^{-1}$  y el tiempo de duplicación es de  $5.37\text{h}^{-1}$ ; en la etapa estacionaria se obtuvo una densidad celular de  $1 \times 10^5$  UFC's/ml en un tiempo de 132 a 156 horas, para después ir en declive; lo cual nos indica que la concentración utilizada en esta prueba tiene relevancia importante por presentar una productividad muy baja en tan largo tiempo de exposición a los nutrientes; esto no significa que los microorganismos presenten baja actividad sino que la cantidad de inóculo es tan pequeña que las pruebas de análisis no alcanzan a detectar los cambios del crecimiento a esa concentración.

En la prueba de 2% se obtuvo una densidad celular inicial de  $1 \times 10^3$  UFC's/ml y una absorbancia inicial de 0.05 a 550nm en la fase exponencial la velocidad de crecimiento fue de  $0.042\text{h}^{-1}$  y su tiempo de duplicación fue de  $16.5\text{h}^{-1}$ ; en la fase estacionaria se obtuvo una densidad celular de  $1 \times 10^{10}$  UFC's/ml en el tiempo de 120hr.

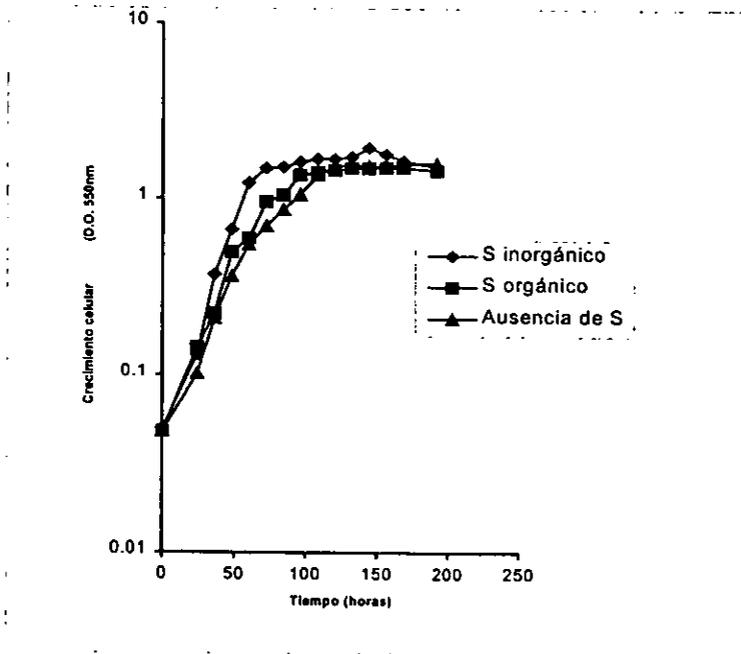
Mientras que en la concentración de 3% la absorbancia inicial fue de 0.1, presentando  $1 \times 10^5$  UFC's/ml; en la fase exponencial se obtuvo una velocidad específica de crecimiento de  $0.029\text{h}^{-1}$  con un tiempo de duplicación de  $23.9\text{h}^{-1}$ ; en la fase estacionaria se obtuvo  $1 \times 10^{10}$  UFC's/ml a las 108 horas.

Por último la concentración de 4% presentó una absorbancia inicial de 0.4 con una densidad celular en el tiempo cero de  $1 \times 10^6$ ; en la fase exponencial la velocidad específica de crecimiento fue de  $0.033\text{h}^{-1}$  y el tiempo de duplicación fue de  $21\text{h}^{-1}$ ; la densidad celular en la fase estacionaria fue de  $1 \times 10^{10}$  UFC's/ml a las 72 horas.

De los resultados anteriores se propone utilizar la concentración de 2% en la cual se observan de manera clara las tres etapas de ésta fase exponencial (temprana, media y tardía) para determinar la mejor actividad desulfuradora del microorganismo; esto con la finalidad de reforzar los trabajos de Kayser y colaboradores que en 1993 realizaron pruebas de crecimiento con *R. rhodochrous* IGTS8 utilizando una concentración de inóculo necesaria para obtener 0.04 de absorbancia inicial a 550nm obteniendo un crecimiento en el cual les fue posible analizar las diferentes etapas de la fase exponencial, identificaron que la etapa tardía fue la más óptima para que el microorganismo removiera el azufre del dibenzotiofeno; así pues, al comparar estos resultados con los obtenidos en este trabajo confirmamos que la concentración seleccionada fue la correcta. Las posteriores cinéticas con dibenzotiofeno se realizaron con la concentración de 2% de inóculo inicial.

## II.- Efecto de la fuente de azufre en el crecimiento de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 utilizando $\text{Na}_2\text{SO}_4$ y DBT.

En estas pruebas se intentó determinar el efecto de la fuente de azufre inorgánico y del dibenzotiofeno sobre el crecimiento del microorganismo así como el crecimiento en ausencia de azufre; por un lado fue corroborar los resultados obtenidos por diferentes autores como Kilbane y Maka (1985), Monticello y colaboradores (1985); así como determinar si el microorganismo utiliza el azufre del dibenzotiofeno para su crecimiento; por otro lado se observó la consistencia de los microorganismos en las diferentes pruebas bajo microscopio óptico a 100X. Se obtuvieron resultados de la velocidad específica de crecimiento y del tiempo de duplicación en las tres variables del crecimiento. A estas pruebas de crecimiento se les realizó un análisis elemental en el tiempo de 96 horas con la finalidad de obtener resultados acerca de la cantidad de azufre presente en el microorganismo, porque en ese tiempo se observa que termina la fase exponencial de crecimiento, los datos se observan en la tabla 7.



**Figura 5.** Crecimiento de *R. rhodochrous* IGTS8 en MSB con glicerol como fuente de carbono; con dos diferentes fuentes de azufre: D.O., (densidad óptica);  $\blacklozenge$   $\text{Na}_2\text{SO}_4$  (20mM);  $\blacksquare$  DBT (0.1%);  $\blacktriangle$  sin fuente de azufre.

**Tabla 7.** Parámetros cinéticos del crecimiento de *R. rhodochrous* con diferentes fuentes de azufre.

Parámetro cinético	Fuente de azufre		
	Inorgánico (Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	Orgánico (DBT)	Sin azufre
μ (velocidad específica de crecimiento) h <sup>-1</sup>	0.055	0.042	0.042
td (tiempo de duplicación) h <sup>-1</sup>	12.6	16.5	16.5
Tiempo de duración de la fase exponencial (horas)	0-60	0-72	0-60

**Tabla 8.** Análisis elemental de biomasa del *R. rhodochrous* IGTS8 en un tiempo de 96 horas.

Fuente de azufre	Análisis elemental				
	Carbón %	Hidrógeno %	Oxígeno %	Nitrógeno %	Azufre %
Sin azufre	40.5	3.0	21.6	0.5	0.07
Azufre orgánico	42.4	6.3	25.6	8.5	0.34
Azufre inorgánico	45.6	7.2	27.3	7.4	0.48
Datos teóricos*	50	8	20	14	1

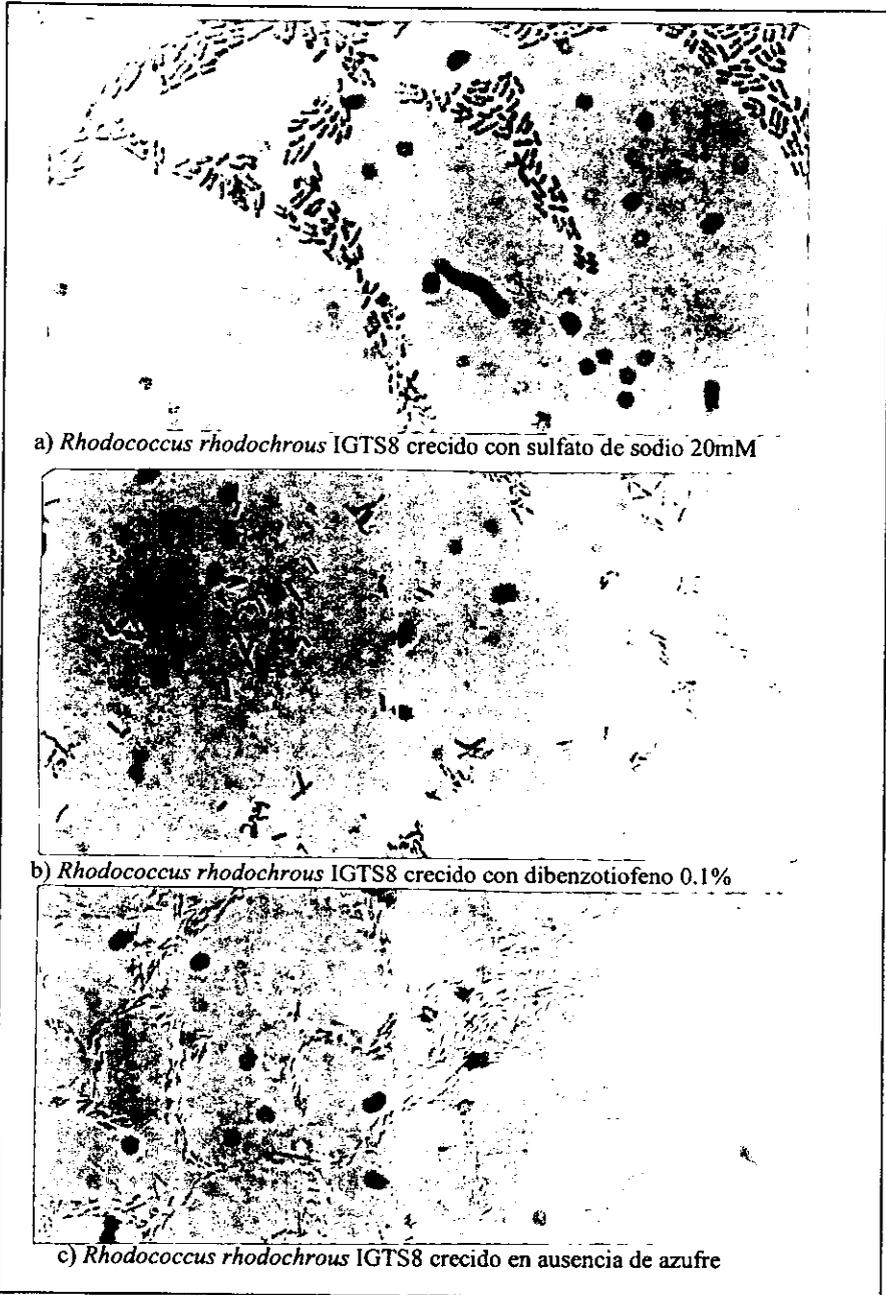
\*Datos tomados del libro de Quintero R.

Si observamos la figura 5 y tabla 7 con respecto al crecimiento obtenido con la fuente de azufre inorgánica y orgánica, se aprecia que el crecimiento es muy similar, sin embargo con azufre inorgánico el microorganismo muestra una coloración salmón tanto en el matraz como en el crecimiento en cajas de petri y al observar bajo el microscopio las células (cocos y bastones) se ven más grandes que el microorganismo crecido en DBT el cual presenta una coloración crema en el matraz de crecimiento y en las colonias que crecen en las cajas de petri, bajo el microscopio los cocos y bastones se ven más delgados y de menor tamaño ver figura 6a y 6b, además se observan los microorganismos adheridos a los cristales, esto nos lleva a suponer que *R. rhodochrous* IGTS8 podría utilizar al DBT como fuente de azufre.

Al analizar la gráfica del crecimiento en DBT con la de ausencia de azufre, en la figura 5 y tabla 7 se observa que los resultados son semejantes porque se obtiene el mismo valor tanto en la velocidad específica de crecimiento de 0.042 h<sup>-1</sup> y el tiempo de duplicación de 16.5 h<sup>-1</sup>, con la diferencia de que la fase exponencial de crecimiento con DBT transcurre del tiempo cero a las 72horas mientras que en la prueba sin fuente de azufre la fase exponencial transcurre de cero a 60 horas, al observar a los microorganismos en el matraz los que se encuentran en ausencia de azufre disminuye la coloración crema y las colonias crecidas en caja petri se ven muy pequeñas así como tardan más tiempo en

aparecer, esto es que su consistencia celular y habilidad para crecer disminuyen; al verlos bajo el microscopio, los microorganismos se ven iguales que en el crecimiento con DBT sólo que un poco más transparentes figura 6c. Se esperaba que no hubiese crecimiento en la prueba de ausencia de azufre por ser un elemento esencial, sin embargo se sugiere que el crecimiento se da debido a que el microorganismo presenta sustratos endógenos provenientes del almacenamiento de nutrientes en las células aportados por el caldo nutritivo que constituye al precultivo; esto se debe a que el crecimiento observado durante toda la cinética de crecimiento y la duración de la fase exponencial depende parcialmente de la concentración del sustrato limitante, por lo tanto el cultivo pasa de un estado en el que crece con exceso de sustrato en este caso del precultivo, a otro de carencia de sustrato, de manera que los periodos a velocidades menores que la máxima no son suficientemente largos para permitir al organismo ajustar su estructura interna a las nuevas condiciones.

Los resultados presentes en la tabla 8 se refieren al análisis elemental del microorganismo para las diferentes pruebas indicando que la cantidad de azufre varía en gran medida entre una prueba y otra, tal es el caso de los microorganismos crecidos en azufre orgánico los cuales presentan 0.34 % de azufre a diferencia de los que crecieron sin fuente de azufre obteniendo un 0.07% de azufre, en cuanto a la comparación entre la prueba con azufre inorgánico que presenta un 0.48% de azufre y la prueba con DBT se observan más cercanos los valores; lo que nos indica que el microorganismo crece de una manera más eficiente con azufre inorgánico debido a que se encuentra disuelto en el medio y por lo tanto está más disponible para que el microorganismo lo asimile; en comparación con el dibenzotiofeno a pesar de que es una molécula orgánica se pudiera pensar que puede atravesar fácilmente la membrana por ser liposoluble en el caso de que se encontrara en estado líquido, sin embargo, se encuentra en forma de cristales, lo que lo hace menos disponible para que el microorganismo lo asimile y aún así se observa que se adhiere a los cristales del dibenzotiofeno. De alguna manera el microorganismo está utilizando el dibenzotiofeno ó simplemente lo adsorbe sin incorporarlo a algún ciclo metabólico, estas suposiciones se podrían dilucidar implementando técnicas de análisis de subfracciones celulares. La figura 6 muestra al microorganismo teñido con tinción de gram y visto a 100X..



**Figura 6.** Consistencia celular de *R. rhodochrous* IGTS8 en medio MSB con glicerol 1% como fuente de carbono y diferentes fuentes de azufre y en ausencia de azufre: (a) Con azufre inorgánico, (b) Con azufre orgánico y (c) Sin fuente de azufre. 100X

### III.- Determinación del estado morfológico de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 en la que se lleva acabo la actividad de desulfuración del DBT.

Como se mencionó en los antecedentes *R. rhodochrous* es un organismo pleomórfico que se encuentra dentro del grupo de los actinomicetos, por esta razón se realizaron pruebas experimentales de crecimiento y del % de remoción del DBT en los diferentes estados morfológicos, estos cambios en su morfología se deben a las condiciones nutritivas del medio de cultivo, y condiciones físicas así, como a la maduración del microorganismo pues se estuvo tomando de la fase estacionaria para colocarlo en medio fresco de manera progresiva y fue entonces cuando se observaron los cambios morfológicos. En ningún trabajo realizado con este microorganismo se reportan los cambios morfológicos ni la remoción de DBT a través de estos; figura 7 y tabla 9.

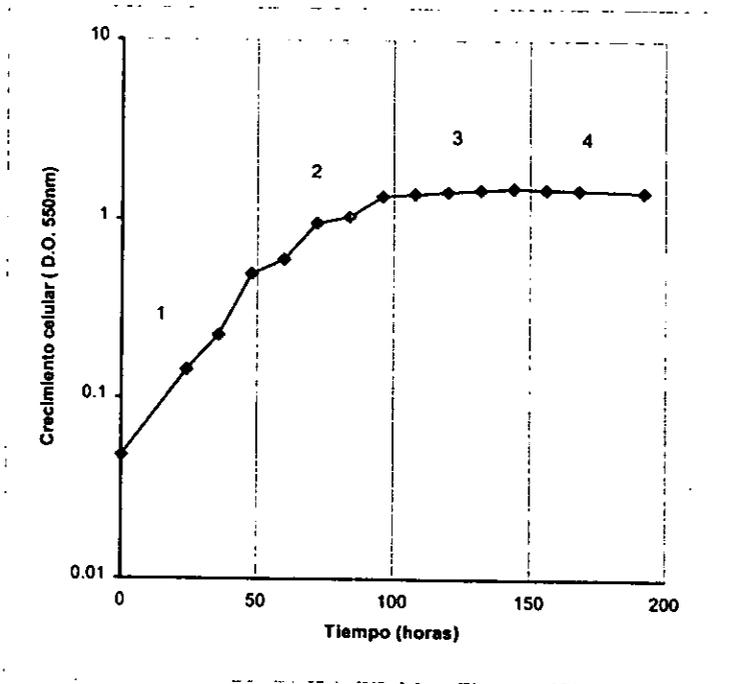


Figura 7. Estados morfológicos de *R. rhodochrous* durante el crecimiento en MSB con glicerol como fuente de carbono y DBT como fuente de azufre, 1, coco; 2, bacilos; 3, bacilos largos e inicio de la formación de pseudohifas; 4, pseudohifas.

**Tabla 9.** Evaluación de la remoción del DBT en los diferentes estados morfológicos de *R. rhodochrous* IGTS8.

Estado morfológico	% de remoción de DBT
Coco	96.47
Coco-bacilo	98
Bacilo-pseudohifa	90
Pseudohifa	0

Los cambios que se observan en la figura 7, no se presentan siempre en todas las pruebas de crecimiento del microorganismo.

Las divisiones que se observan en la gráfica corresponden a los diferentes estados morfológicos que se presentaron en una de las cinéticas de crecimiento en donde todos los cambios fueron observados a través de ésta; esto sucedió después de varias pruebas experimentales de crecimiento.

Así pues, al iniciar una prueba de crecimiento con la concentración de inóculo de 2% su morfología fue de coco durante toda la prueba hasta llegar a la fase estacionaria; al iniciar una nueva cinética utilizando como inóculo el microorganismo que se encontraba en la fase estacionaria de la anterior prueba con una concentración adecuada para que se tuviera una densidad óptica inicial de 0.05 a 550nm se observaba un cambio en la morfología la cual fue de bacilo, esta forma se mantenía durante toda la prueba experimental de crecimiento hasta llegar a la fase estacionaria la cual servía de inóculo para la siguiente prueba experimental de crecimiento.

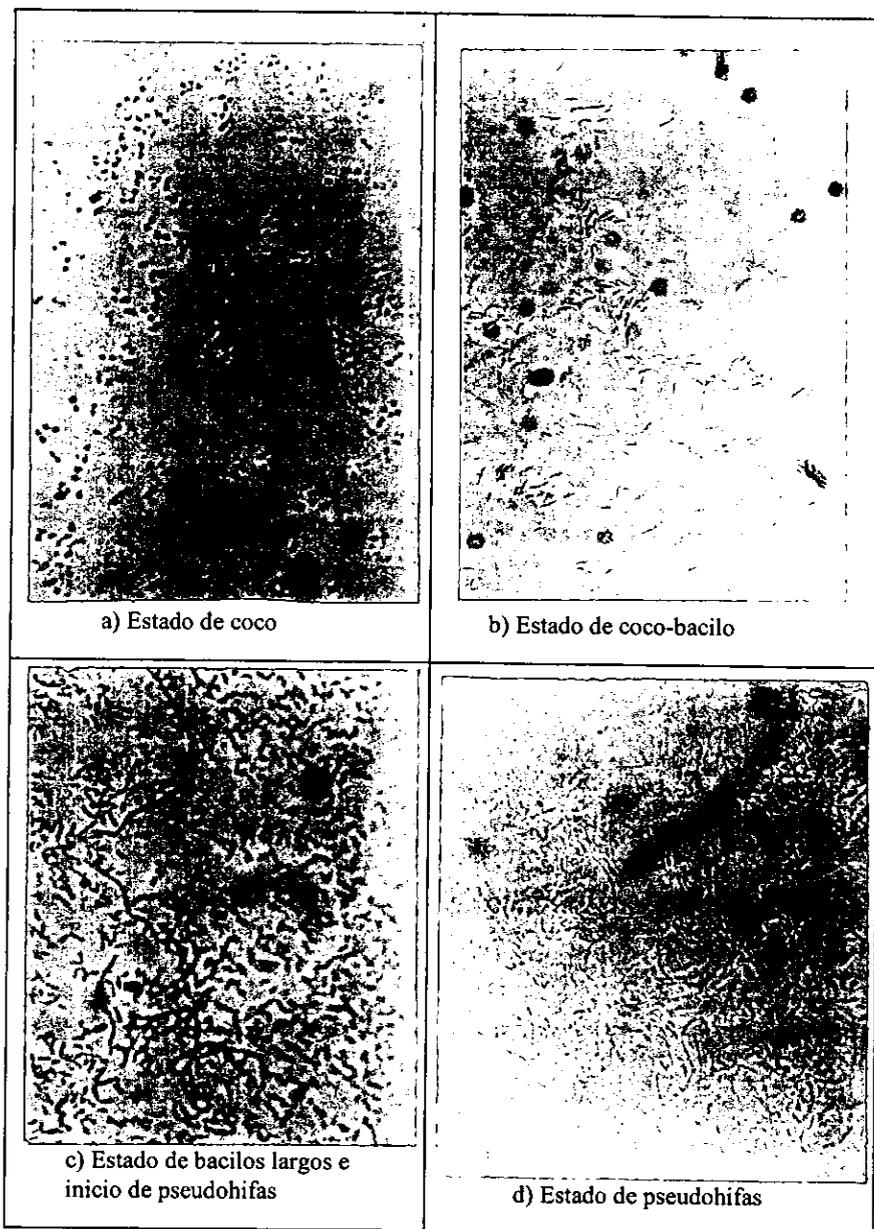
Al comenzar nuevamente la prueba de crecimiento la morfología cambió de forma a bacilos largos durante toda la prueba experimental de crecimiento siendo estos el inicio de la formación de pseudohifas.

En la siguiente prueba experimental de crecimiento las pseudohifas se observan muy desarrolladas durante toda la cinética. Al volver a inocular una nueva prueba de crecimiento con el microorganismo de la última cinética las pseudohifas se fragmentan dando la formación de cocos cerrando así el ciclo morfológico, los cuales se observan en los primeros tiempos de muestreo observados en la figura 7 con el número 1, conforme avanza el crecimiento se observan los cambios morfológicos en los cuales se transforma de coco a bacilo en las dos primeras etapas de la fase exponencial de crecimiento (temprana y media) señalados con el número 2; al transcurrir el tiempo se observa que los bacilos se vuelven más largos, esto en la etapa tardía de la fase exponencial y principios de la fase estacionaria observados con el número 3; al llegar a la fase estacionaria los bacilos largos se han transformado totalmente en pseudohifas con el número 4. Figura 7.

En cada una de las pruebas experimentales de crecimiento de los diferentes estados morfológicos se realizaron las pruebas pertinentes de remoción de azufre en las etapas de la fase exponencial obteniendo los datos presentados en la tabla 9, en donde se determinó que el estado morfológico más activo es el de coco-bacilo con un 98% de remoción de DBT.

En cuanto a la condición del porque no en todos los estados morfológicos el microorganismo presenta la misma capacidad para remover el dibenzotiofeno, puede

sugerirse que el *R. rhodochrous* IGTS8 experimenta cambios en la permeabilidad de la membrana que de alguna manera la molécula del DBT no puede ser metabolizada, por otro lado, se sugiere que en determinado estado morfológico algún complejo enzimático que se encuentra activo en el estado de coco-bacilo para remover el DBT se apaga al suceder el cambio morfológico, provocando que la molécula del DBT no pueda ser degradada; sin embargo estas son sólo suposiciones, desafortunadamente no existen trabajos realizados que toquen el tema de las cualidades que presente el complejo enzimático a nivel de la membrana en los diferentes estados morfológicos, por otro lado estos estudios apenas comienzan a dilucidarse, uno de los autores que se ha interesado en el estudio del complejo enzimático es Monticello y colaboradores que en 1997 realizaron un estudio de las enzimas que se encuentran en la membrana las cuales se han identificado como enzimas desulfuradoras, sin embargo aún no es muy claro el proceso por el cual actúan éstas. En la figura 8 se observan los estados morfológicos que presenta el microorganismo *R. rhodochrous* IGTS8 bajo el microscopio a 100X teñidos con tinción de gram.

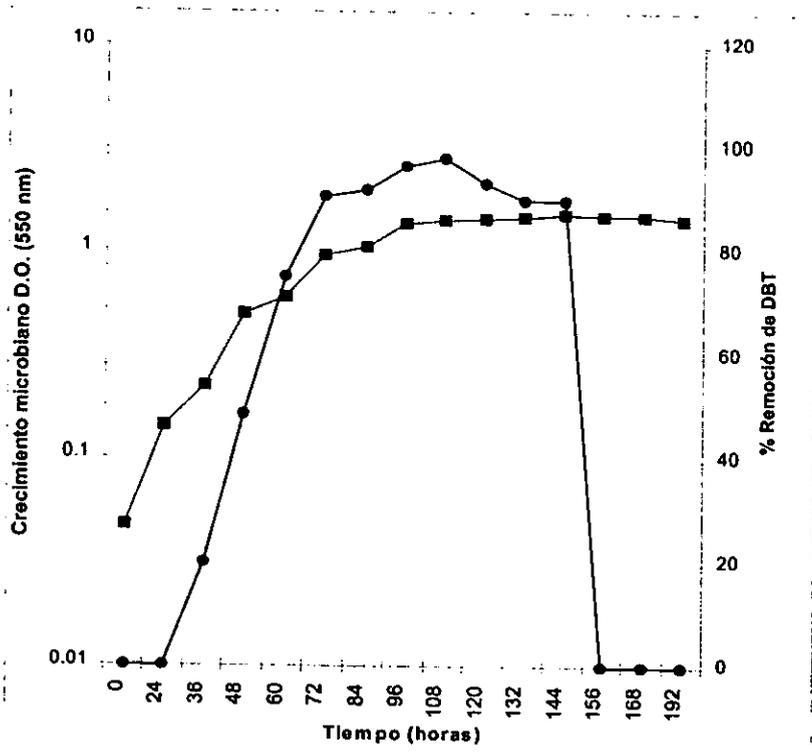


**Figura 8.** Estados morfológicos de *R. rhodochrous* IGTS8: (a) Coco; (b) Coco-bacilo; (c) Bacilos largos ó inicio de pseudohifas; (d) Pseudohifas. Vistos a 100X.

**IV.- Remoción de DBT por *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 y formación del producto "2-hidroxibifenilo".**

Gran parte de los autores que trabajan con microorganismos aerobios y que utilizan la vía "4S" han reportado al 2-hidroxibifenilo como producto final de la biodesulfuración (Kodama *et al.*, 1970; Monticello y Finnerty, 1985; Kilbane y Maka, 1985-88; Pifferi *et al.*, 1990; Kilbane, 1990b; Omori *et al.*, 1992; Denome *et al.*, 1993; Gallagher *et al.*, 1993; Monticello, 1993; Olson *et al.*, 1993<sup>a,b</sup>; Grossman, 1996; Kulpa, 1996). Además de mencionar que toman el azufre del dibenzotiofeno para su crecimiento.

En la figura 9 se muestra el porcentaje de remoción del dibenzotiofeno a través del crecimiento de *R. rhodochrous* IGTS8 en estado de coco-bacilo, en esta prueba experimental de crecimiento e índice de remoción del DBT se obtuvo el producto 2-hidroxibifenilo a las 132 horas cuando se obtuvo un índice de remoción de 90% esto en la



**Figura 9.** Crecimiento de *R. rhodochrous* IGTS8 en estado de coco-bacilo en MSB con glicerol 1% como fuente de carbono y DBT 0.1% como fuente de azufre y Remoción de DBT vs. Tiempo. ♦ Crecimiento celular; ● índice de remoción de DBT.

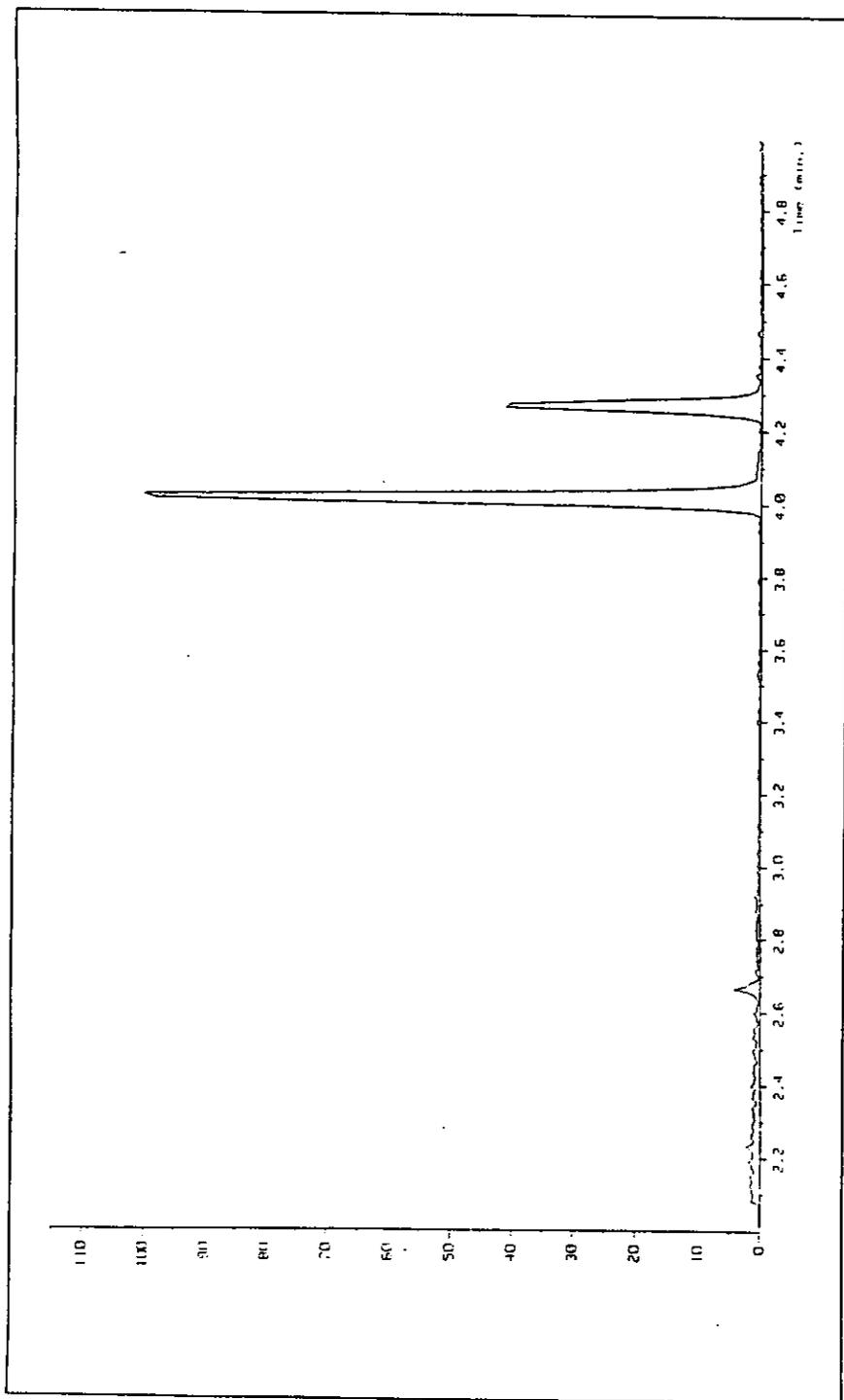
fase estacionaria; el cual fue identificado primeramente de manera cualitativa al observar un pico pequeño en el cromatograma obtenido por cromatografía de gases (figura 10), posteriormente fue identificado por espectrometría de masas (figura 11c).

Los resultados anteriores muestran que *R. rhodochrous* IGTS8 tiene su máxima remoción de 98% en estado de coco-bacilo al finalizar la fase exponencial en el tiempo de 96 horas; por otro lado al entrar en la fase estacionaria el índice de remoción baja considerablemente hasta llegar a cero, en el tiempo de 156 horas hasta 192 horas.

Mucho se ha mencionado acerca de la cualidad que presentan algunos microorganismos para remover ciertas moléculas orgánicas que son en cierta medida contaminantes para el medio ambiente, sin embargo, cuando se intenta reproducir un experimento con la finalidad de obtener resultados positivos y aplicarlo a sistemas reales el trabajo experimental nos lleva por distintos caminos, uno de ellos esta relacionado con la aparición del producto 2-hidroxibifenilo el cual se presenta de manera cuantificable en los experimentos realizados por Monticello, (1993), Kilbane, (1990b) y Olson *et al.*, (1993a, b); estos autores mencionan que este producto se observa al obtener un 100% de degradación de DBT; Kayser et al., (1993) identifica al 2-hidroxibifenilo por medio de cromatografía de gases y por espectrometría de masas, lo cuantifica por el método de Gibbs, menciona que el crecimiento y la aparición del producto van de manera paralela; sin embargo, en las pruebas realizadas en este trabajo de tesis no se detecta de manera constante al 2-hidroxibifenilo, con lo que se sugiere que el producto y el DBT se encuentran adheridos a la membrana del microorganismo, no detectándose en cantidades apreciables; por otro lado al observar la figura 9 se ve la declinación del por ciento de remoción que va de 90% a cero, con este resultado se propone que el microorganismo suelta al DBT que se encuentra adherido a la membrana.

El otro camino esta relacionado con la forma en la que los distintos autores reportan el crecimiento de *R. rhodochrous* IGTS8 mostrado en medición de densidad óptica ya sea por unidades Klett o por absorbancia y muy raramente por valores de UFC's. Al tener un patrón de metodología para realizar ciertos experimentos se observa que los métodos utilizados para determinar el crecimiento no fueron los más adecuados, tan sólo son aproximaciones a los valores reales, debido a que se presentaron dificultades para medir el crecimiento de este microorganismo, por una parte, el método de densidad óptica no es el adecuado porque el microorganismo es pleomórfico y en distintos momentos se presentaba en pequeños pellets dificultando así una correcta lectura de absorbancia; en otro aspecto al medir las unidades formadoras de colonias los valores al inicio eran coherentes pero conforme aumentaba el muestreo los valores se disparaban de manera elevada y no llevaban una coherencia; por ello se propone utilizar el método de cuantificación de proteína para posteriores estudios. Otro aspecto importante es la coloración que se observó en las preparaciones de este microorganismo y es que se teñían de rojo, lo cual pudiese pensar que el organismo utilizado es una bacteria gram negativa, sin embargo la bibliografía reporta que es una bacteria gram positiva, por lo que este tipo de micobacterias presentan una cápsula cérica que envuelve a las células provocando que se tomen con dificultad los colorantes y que una vez teñidas no es fácil decolorarlas por tratamiento con ácidos, por ello se requiere de una técnica de coloración que sea para bacterias ácido-resistentes.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



**Figura 10** Cromatograma del 2-hidroxibifenilo, producto de la biodegradación del dibenzotiofeno.

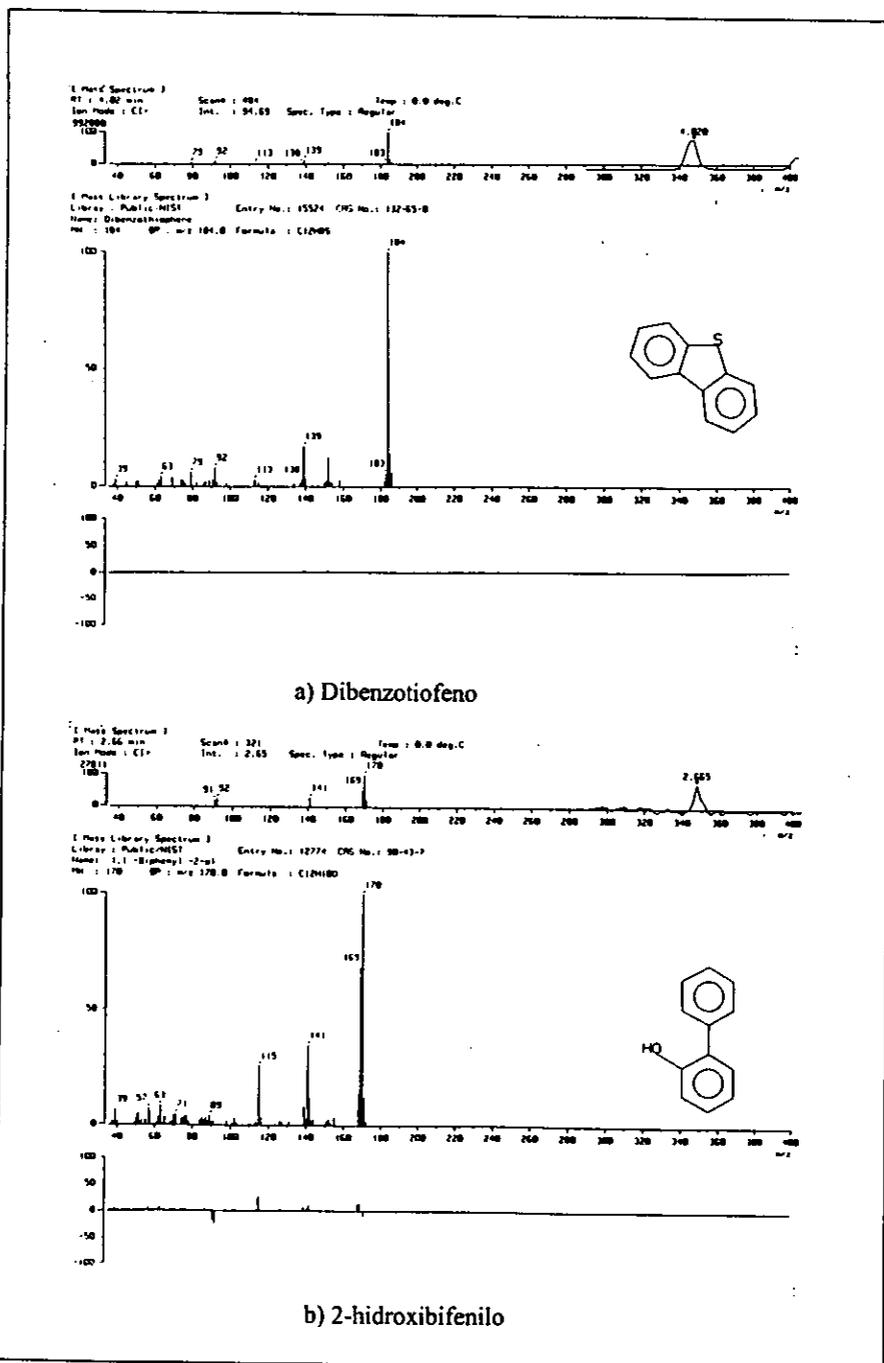


Figura 11 Espectro de masas de: a) Dibenzotiofeno, b) 2-hidroxibifenilo.

**V.- Remoción de azufre total en diesel mexicano primario por *Rhodococcus rhodochromus* IGTS8 a nivel matraz.**

En México los altos índices de azufre que se encuentran presentes en los combustibles derivados del petróleo han llevado a buscar nuevas alternativas para disminuir el contenido del azufre de los combustibles sin que se requieran de altos costos de operación, por ello en el Instituto Mexicano del Petróleo se desarrolla un proyecto referente a biodesulfuración con la finalidad de que sea una herramienta complementaria con la hidrodesulfuración. En el laboratorio inicialmente se trabajó con petróleo crudo y *R. rhodochromus* IGTS8 como organismo biodesulfurador pero al intentar analizar la muestra hubo dificultades para separar las fases orgánica y fase acuosa, por lo que, las siguientes pruebas de eliminación de azufre se realizaron en diesel primario.

Las anteriores pruebas de crecimiento, morfología y por ciento de remoción de dibenzotiofeno se realizaron con la finalidad de conocer la capacidad del microorganismo para remover o eliminar el azufre de un sustrato real que en este caso fue diesel primario. Los resultados obtenidos se muestran en las siguientes tablas.

**Tabla 10.** Diferentes concentraciones de diesel primario en solución salina al 0.85%, inoculados con *R. rhodochromus* IGTS8.

% de diesel primario	% de azufre total inicial	% de azufre total final	% de azufre eliminado
25	1.41	1.24	12.06
50	1.41	1.38	2.13
75	1.41	1.39	1.42

**Tabla 11.** Eliminación de azufre en el diesel primario inoculado con 1ml de *R. rhodochromus* IGTS8 extraído a diferentes tiempos de la curva de crecimiento e incubados por 24 horas en el diesel.

Tiempo de la curva de crecimiento (horas)	% de azufre inicial	% de azufre final	% de remoción de azufre
72	1.41	1.24	12.06
96	1.41	1.16	17.73
120	1.41	1.20	14.90
144	1.41	1.20	14.90

Al realizar pruebas experimentales de remoción de azufre en el diesel primario utilizando diferentes concentraciones de diesel/sol. salina 0.85% e inocularlas con 1 ml de inóculo tomado en el tiempo de muestreo de 48 horas y dejando en agitación por espacio de 24 horas, se obtuvo que la concentración más adecuada de diesel es de 25% al obtener un

12.06% de remoción de azufre. Por ello se utilizó esta concentración de diesel para las posteriores pruebas experimentales de remoción de azufre.

En cuanto a este experimento hizo falta tomar por un lado, diferentes concentraciones de inóculo con la finalidad de aumentar el índice de remoción de azufre presente en el diesel, y por otro lado, aumentar el tiempo de residencia del microorganismo en el diesel, sin embargo, por cuestiones prácticas no se realizaron estas pruebas debido a que se intenta utilizar el mínimo de material (microorganismo) en el menor tiempo posible, esto, porque al pensar en un sistema real en la desulfuración del petróleo y diesel el tiempo para biodesulfurar debe ser mínimo por el valor y requerimiento que presenta el combustible ya desulfurado para ser utilizado por la industria y el mercado.

Al analizar los resultados de la tabla 11 se observa que el mejor tiempo de cosecha de microorganismos para desulfurar al diesel a la concentración de 25% por 24 horas fue de 96 horas que equivale a la parte final de la fase exponencial obteniendo un 17.73% de eliminación de azufre presente en el diesel primario.

Mientras que distintos autores han reportado que obtuvieron un 90% de remoción de azufre presente en el diesel con una concentración inicial de 0.25-0.4% de azufre al utilizar al *R. rhodochrous* IGTS8 (Kilbane y Bielaga, 1990, Monticello, 1994, Rhodes, 1995); los resultados obtenidos por estos autores y los obtenidos en este trabajo son muy extremos en cuanto a la cantidad de azufre eliminado de un sistema real, sin embargo estos autores utilizaron un diesel con muy poca concentración de azufre y el que se utilizó en este trabajo presenta una cantidad apreciable de este elemento, a este respecto se sugiere que se realicen aislamientos de microorganismos provenientes de los crudos mexicanos o de lugares contaminados con estos, con la finalidad de obtener microorganismos más eficientes para los distintos procesos de los cuales se requieran, ya sea biodegradadores de hidrocarburos, desulfuradores, desnitrificadores, etc., por otro lado se podría utilizar un cultivo mixto o un consorcio microbiano, para este caso, Kayser y colaboradores (1993) utilizaron cultivos mixtos con diferentes combinaciones logrando obtener que la mejor combinación de microorganismos fue utilizando a *R. rhodochrous* IGTS8 y a *Enterobacter cloacae* siendo que este último no tiene nada que ver con la escisión de los enlaces C-S sin embargo, concluyeron que toma el azufre que posteriormente se libera al medio en forma de sulfato inorgánico por *R. rhodochrous* IGTS8. Se sugiere que se utilice una combinación de microorganismos para realizar la biodesulfuración o cualquier otro tipo de biodegradación, esto en base a lo observado en la naturaleza en la cual los microorganismos presentan distintas actividades en conjunto con las comunidades de distintos organismos formando un ciclo vital para beneficio de cada uno de ellos.

En cuanto a la cantidad de sulfatos presentes en la fase acuosa no fue detectada, lo que lleva a suponer que no es liberado al medio debido a que el microorganismo al encontrarse en condición limitante de azufre probablemente utilice el azufre que ha obtenido de la molécula de DBT (en caso de que el microorganismo utilice al DBT como fuente de azufre) ó del diesel; sin embargo, como se menciona en los antecedentes *R. rhodochrous* IGTS8 utiliza la vía "4S" en la que se menciona que rompe los enlaces C-S presentes en las moléculas orgánicas de los combustibles fósiles dando como resultado al 2-hidroxibifenilo y sulfatos solubles en agua, esta vía es producto de un metabolismo secundario, la cual va a utilizar el microorganismo cuando se encuentre en condiciones de ausencia de fuente de azufre, por lo cual puede llegar a utilizar al DBT como fuente de

azufre, sin embargo, para comprobar esto se requiere de estudios referentes al seguimiento enzimático de la ruta metabólica y la dirección que lleva el azufre que ha sido desprendido de las moléculas orgánicas a través del metabolismo principal que necesita el microorganismo para desarrollarse. Kodama *et al* en 1992 trabajó con *Corynebacterium* sp. SY1 crecido en medio con dibenzotiofeno como fuente de azufre observó que la cantidad de sulfatos liberados al medio es en cantidades muy pequeñas alrededor de 0.1 mM; también Kilbane *et al* (1988) obtuvo datos semejantes en cuanto a la cantidad de sulfatos presentes en el medio indicando que es mínima la concentración de estos; se propone realizar el estudio analítico de la vía "4S" utilizando dibenzotiofeno marcado radiactivamente.

## Conclusiones

La habilidad desulfuradora que presenta *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 sobre la molécula de dibenzotiofeno fue satisfactoria al probarlo a nivel matraz, al obtener resultados de 98% de remoción de dibenzotiofeno sin embargo, la capacidad de este microorganismo no es tan alta en el diesel primario utilizado en estas pruebas ya que se obtuvo un 17.73% de remoción de azufre.

En una de las pruebas experimentales de crecimiento se obtuvo la aparición de uno de los productos metabólicos de la ruta "4S" que utiliza el microorganismo para eliminar el azufre de las moléculas orgánicas presentes en los combustibles fósiles: el 2-hidroxibifenilo aunque no se logró cuantificar; además de que no se apreciaron de manera cuantificable a los sulfatos en la fase acuosa.

El género *Rhodococcus* al ser un organismo pleomorfo presenta diferentes formas y con los estudios realizados en este trabajo se logró identificar que la morfología de coco-bacilo es la óptima para realizar el proceso de biodesulfuración.

A través de este trabajo se observó que la morfología influye en la actividad biodesulfuradora de *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, lo cual no ha sido reportado anteriormente; se propone realizar un estudio específico de la morfofisiología de la membrana de este organismo.

Se sugiere que se realicen aislamientos de microorganismos provenientes de los crudos mexicanos o de lugares contaminados con estos, con la finalidad de obtener microorganismos más eficientes para los distintos procesos de los cuales se requieran, ya sea biodegradadores de hidrocarburos, desulfuradores, desnitrificadores, etc.

Gracias a los resultados obtenidos de crecimiento del microorganismo se logró determinar que los métodos utilizados de densidad óptica y unidades formadoras de colonias no son los más apropiados, sólo son aproximaciones a los valores reales; así que se sugiere utilizar otro método de cuantificación, p.e., cuantificación de proteína.

Los estudios de biodesulfuración son pocos comparados con la gran diversidad que presenta el campo de esta ciencia multidisciplinaria. Por lo que nuevos avances en el conocimiento de este tipo de organismos sentarán bases más firmes para el desarrollo sustentable de este y otros procesos.

## Bibliografía

1. Afferden M., Schacht S., Klein J. and Truper H. G. 1990. Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp. DO Achieves of microbiology 153: 324-328pp.
2. Afferden M., Tappe D., Beyer M., Trüper G. H. And Klein J. 1993. Biochemical mechanisms for the desulfurization of coal-relevant organic sulfur compounds. Fuel. 72 (12): 1635-1643pp.
3. Atlas R. M. 1984. Petroleum Microbiology. Macmillan Publishing Company. USA. 692pp.
4. Atlas R.M. 1989. Microbiology fundamentals and applications. Macmillan Publishing Company. USA.
5. Bravo A. H., Sosa E. R., y Torres J. R. 1991. Ozono y lluvia ácida en la Ciudad de México. Ciencias UNAM. No. 22: 33-40pp.
6. Brock D. T. 1978. Biología de los microorganismos. Ed. OMEGA. España.
7. Crawford L. D., and Gupta K. R. 1990. Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. Current Microbiology. 21:229-231pp.
8. Denome A. S., Olson S.E. and Young D. K. 1993. Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus* sp. IGTS8. Applied and Environmental Microbiology. Vol 59. 2837-2843pp.
9. Denome A. S., Oldfield C., Nash J. L., and Young D. K. 1994. Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. Journal of Bacteriology. 176 (21): 6707-6716pp.
10. Dyson D. R. 1975. Principios de biología celular. Fondo Educativo Interamericano. México.
11. Finnerty P. M. and Robinson M. 1986. Microbial desulfurization of fossil fuels: a review. Biotechnol. Bioeng Symp. 16: 205-215pp.
12. Finnerty R. W. 1992. Fossil resource biotechnology: challenges and prospects. Environmental Biotechnology. 277-282pp.
13. Gallagher J. R., Olson E. S. and Stanley D. C. 1993. Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur specific pathway. FEMS Microbiology Letters. 107:31-35pp.
14. Genevieve Gray Young. 1977. Microbiología. CECSA. México.
15. Gray A. K., Pogrebinsky S. O., Mrachko T. G., Xi L., Monticello J. D., and Squires H. C. 1996. Molecular mechanisms of biocatalytic desulfurization of fossil fuels. Nature Biotechnology. 14: 1705-1709pp.
16. Grossman J.M., Senius D.J. and Lee K. M. 1995. Sulfur-specific microbial desulfurization of Sterically Hindered analogs of DBT. Applied and Environmental Microbiology . Vol. 4 . 362-436pp.
17. Grossman J.M. 1996. Microbial removal of organic sulfur from fuels: A review of past and present approaches . Symposium Microbial Removal of Organic Sulfur from Fuels. Exxon Research and Engineering Co. New Jersey.
18. Hartdegen J.F., Coburn M. J. and Roberts R. L. 1985. Microbial desulfurization of Petroleum. Chemical Engineering Progress. 80 (5): 63-67pp.

19. Hiebert K. F., Bennett C. P., and Pope R. S. 1994. Microbial degradation of petroleum and mineral alteration in a fresh water aquifer. Symposium on microbial degradation and modifications of hydrocarbons presented before the division of petroleum chemistry, Inc., 208<sup>th</sup> national meeting, American Chemical Society Washington D. C. 644-651pp.
20. Huxtable J. R. 1986. Biochemistry of sulfur. Plenum Publishing Corporation.
21. Isbister D.J. and Doyle C.R. 1985. Mutant microorganism and it's use in removing organic sulfur compounds. United States American Patent No. 4,562,156.
22. James M.V. 1990. Biodesulfurization of bitumen fuels. International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty (PCT).WO 92/09706. PCT/US91/08702.
23. Jerry Oliver and Donald B. A. 1994. Pollution prevention a global perspective. National Petroleum Refiners Association. 1-15pp.
24. Johnson S., Oldfield C., Brzozowski L., Monticello D. and Kulpa C. 1994. Biodesulfurization of petroleum by *Rhodococcus erythropolis*. Symposium on microbial degradation and modifications of hydrocarbons. Presented before the Division of Petroleum Chemistry, Inc. 208<sup>th</sup> National Meeting, American Chemical Society. Washington D. C.
25. Kayser J. K., Bielaga A. B., Jackowski K., Odusan O. and Kilbane J. J. 1993. Utilization of organosulphur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Journal of General Microbiology*. 139: 3123-3129pp.
26. Kern E.E., *et al* .1992. Enzymatic coal desulfurization. United States American Patent No. 5,094,668.
27. Kilbane J.J. and Maka A. Oct. 1985-1988. Microbial removal of organic sulfur from coal. Final Report U. S. Department of Energy Pittsburgh Energy Technology Center.. Contract No. DE-AC22-85PC81201. 91pp.
28. Kilbane J.J. 1989. Desulfurization of coal: The microbial solution. *Trends in biotechnology*. 7. 97-101pp.
29. Kilbane J.J. 1990a. Biodesulfurization of coal. In *Gas, Oil and Coal Biotechnology*.33-48pp
30. Kilbane J.J. 1990b. Sulfur-specific microbial metabolism of organic compounds. *Resources, Conservation and Recycling*. 3. 69-79pp.
31. Kilbane J. J. and Bielaga B. A. 1990. Toward sulfur-free fuels. *Chemtech*. 20: 747-751pp.
32. Kilbane J.J. 1991. Microbial removal of organic sulfur from coal and petroleum. In *Proceedings: 1991 Second International Biological Processing of Coal*. Palo Alto, California: Electric Power Research Institute.
33. Kilbane J.J. and Jackowski K. 1992. Biodesulfurization of water soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnology and Bioengineering*. 40: 1107-1114pp.
34. Kim B.H.,*et al* 1988. Bioelectrochemical desulfurization of petroleum. European Patente Application No. 032,3748.
35. Kim Hae Yeong, Tae Sung Kim and Byung Hong Kim. 1990. Degradation of organic sulfur compounds and the reduction of dibenzothiophene to biphenyl and

- hydrogensulfide by *Desulfovibrio desulfuricans* M6. *Biotechnology Letters*. 12 (10): 761-764pp.
36. Kim Hae Yeong, Tae Sung Kim and Byung Hong Kim. 1990. Petroleum desulfurization by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 using electrochemically supplied reducing equivalent. *Biotechnology Letters*. 12 (10): 757-760pp.
  37. Kirshebaum Isidor 1961. Bacteriological desulfurization of petroleum\_ United States American Patent No. 2,975,103.
  38. Klein J., Afferden M., Pfeifer F. And Schacht S. 1994. Microbial desulfurization of coal and oil. *Fuel Processing Technology*.40: 297-310pp.
  39. Kodama K., Nakatani S., Umehara K., Shimizu K., Minoda Y. And Yamada K. 1970. Microbial conversion of petrolsulfur compounds:isolation and identification of products from dibenzothiophene. *Agric. Biol. Chem.* 34: 1320-1324pp.
  40. Kohno T. 1988. Morphology, physiology, and nutrition of a sulfur-oxidizing filamentous organism isolated from activated sludge. *Wat. Sci. Tech.* Vol. 20 No. 11/12. 241-247pp.
  41. Kopacz P.E. 1986. Biodesulfurization of carbonaceous materials. United States American Patent No. 4,632,906.
  42. Kulpa F. Ch. 1996. Biodesulphurization of petroleum distillates: a microbial approach . Department of Biological Sciences, University of Notre Dame, Indiana, United States.
  43. Laborde A. L. and Gibson D. T.1977. Metabolism of dibenzothiophene by a *Beijerinckia* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 783-790pp.
  44. Lee K. M., Senius D. J. and Grossman J. M. 1995. Sulfur -specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 61.No. 12.4362-4366pp.
  45. Lizama M.H., Wilkins A. L. and Scott C.T. 1995.Dibenzothiophene sulfur can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria. *Biotechnology Letters*. Vol. 17 No.1. 113-116pp.
  46. Maka A., Akin C.,Lau F.,Srivastava V. and Punwani D.V. 1989. Microbial desulfurization of Eastern Oil Shale: Bioreactor studies . Eastern Oil Shale Symposium Nov. 15-17, Institute for Mining and Minerals Research University of Kentucky. USA.
  47. Malik K. A. 1978. Microbial removal of organic sulfur from crude oil and the environment: some new perspectives. *Process Biochemistry*. 13:10-12.
  48. Monticello J. D. and Finnerty R.W. 1985. Microbial desulfurization of fossil fuels. *Ann. Rev. Microbiol.* 39: 371-89pp.
  49. Monticello J. D. Bakker D. and Finnerty R.M. 1985. Plasmid-mediated degradation of DBT by *Pseudomonas sp.* *Applied and Environmental Microbiology* . Vol. 49 No. 4. 756-760pp.
  50. Monticello J. D., and Kilbane J. J. 1990. Practical considerations in biodesulfurization of petroleum. *Gas, Oil, Coal and Environmental Biotechnology III*. 1-12pp.
  51. Monticello J. D. 1992. Continuous process for biocatalytic desulfurization of sulfur-bearing heterocyclic molecules. *International Application Published Under The Patent Cooperation Treaty (PCT)*.WO 92/19700.
  52. Monticello J. D. 1993a. Biocatalytic desulfurization of petroleum and middle distillates. *Environmental Progress*. Vol. 12. No.1: 1-4pp.