



00551

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOQUIMICAS**

**BIODESULFURACIÓN DE PETROLEO MEDIANTE
CATALISIS ENZIMÁTICA**

Tesis

**Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias**

Presenta

María del Pilar Bremauntz Michavila

2000



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Este trabajo concluyó gracias al apoyo, tiempo, dedicación y amistad de mi comité tutorial: mi asesor principal Dr. Rafael Vázquez-Duhalt, Dr. Eduardo Bárzana y Dr. Agustín López-Munguía. *Gracias...*

De igual forma agradezco a mi jurado por dedicar su tiempo a la revisión de esta tesis y a sus valiosos comentarios, gracias Dr. Agustín López-Munguía, Dra Amelia Farrés, Dra Susana Saval, Dra Amanda Gálvez y Dra. Sylvie Le Borge.

Agradezco inmensamente al Instituto Mexicano del Petróleo por su apoyo económico, técnico y profesional, así como la facilidades que me brindaron para poder concluir mis estudios de Maestría. Muy especialmente al Ing. Luis Morales Hernández y el Ing. Carlos Valdés Olmedo. *Gracias Jefes.....*

Igualmente agradezco a Petróleos Mexicanos-Refinación, Gerencia de Investigación y Desarrollo Tecnológico, en especial al Ing. Oliverio Moreno por su apoyo y confianza, al Ing. Alejandro Suárez por su colaboración y al Dr. Miguel Leiva por las facilidades brindadas para la adquisición de datos e información. Quisiera hacer patente mi agradecimiento especial al Ing Gildardo Saldivar, Coordinador del área ecológica de la Refinería Francisco I. Madero, Cd. Madero Tamps., por su ayuda en las instalaciones de la refinería para la toma de muestras así como de su interés en este trabajo.

Por último quiero hacer patente mi agradecimiento al Dr. Rafael Vázquez-Duahl mi asesor por su comprensión y apoyo y a Raunel Tinoco que me brindo siempre ayuda y apoyo cuando lo solicite, además de su amistad.

Este trabajo se realizo en el Laboratorio de Bioprocesos del Instituto Mexicano del Petróleo, y en el Laboratorio del Dr. Rafael Vázquez-Duhalt en el Instituto de Biotecnología

A todos mis amigos, colaboradores y compañeros del Laboratorio de Bioprocesos del IMP, por su cariño, apoyo comprensión, y paciencia, gracias a las cuales pude desarrollar este trabajo:

Luis, Juan, Román, Claudia, David, Alfredo, Araceli, Xochitl, Diego, Maurilio, Laura, Gladis, Elías.....Los quiero mucho, Gracias.....

A mis padres, que me enseñaron que los valores de constancia y tenacidad hacen una vida y que la única forma de vivirla es luchando.....

*Por que como dice mi pingolín: **SI SE PUEDE.....***

Gracias Mis amores Rodrigo y Miguel, sin su apoyo, empuje y comprensión no hubiera podido llegar hasta aquí.....

Mig Te amo.... Gracias.....

INDICE

Resumen

I.-Introducción	1
II. Objetivos	2
II. Antecedentes	3
III.1. El problema del azufre	3
III.2 Características químicas del petróleo	4
III.3 Hidrodesulfuración (HDS).	9
III.4 Biodesulfuración (BDS).	10
III.5 Biodesulfuración reductiva	13
III.6 Biodesulfuración oxidativa	14
III.7 <i>Rhodococcus rhodochrous</i> IGTS8	18
III.8 Desulfuración enzimática	20
IV. Materiales y métodos	22
IV. 1 Aislamiento y enriquecimiento de microorganismos.	22
IV.2 Evaluación de la actividad biodesulfuradora.	23
IV.3 Caracterización de la actividad biodesulfuradora.	25
IV.4 Actividad de extractos celulares.	26
IV.5 Caracterización de la cepa y conservación.	27
V. Resultados.	28
V.1 Aislamiento de microorganismos.	28
V.2 Actividad biodesulfuradora.	31
V.3 Caracterización de las cepas IMP-BS-4 e IMP-BS-23.	
V.4 Pruebas con extractos celulares.	48
VI. Discusión de resultados.	50
VI.1 Aislamiento de microorganismos.	50
VI.2 Actividad biodesulfuradora.	51
VI.3 Pruebas cinéticas cepa IMP-BS-23	54
VI.4 Pruebas con extractos celulares.	54
VII. Conclusiones y recomendaciones.	56
VIII. Bibliografía	58

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

TABLAS

Tabla 1.	Contenido de Azufre en crudos comerciales	5
Tabla 2.	Tipos de crudos mexicanos y sus propiedades	6
Tabla 3.	Estructuras modelo de organosulfurados	7
Tabla 4.	Distribución de sulfuros en fracciones de petróleo	8
Tabla 5.	Aislamiento de microorganismos potencialmente biodesulfuradores	28
Tabla 6.	Primera resiembra de los cultivos aislados	28
Tabla 7.	Segunda resiembra de los cultivos aislados	29
Tabla 8.	Cultivos obtenidos por enriquecimiento	30
Tabla 9.	Valoración de la extracción directa de dibenzotiofeno	31
Tabla 10.	Valoración de la extracción indirecta de dibenzotiofeno	32
Tabla 11.	Biotransformación de DBT por los cultivos seleccionados.	33
Tabla 12.	Actividad de la cepa IMP-BS-4	34
Tabla 13.	Actividad de la cepa IMP-BS-23	34
Tabla 14.	Espectro de masa de los productos de la cepa IMP-BS-4	37
Tabla 15.	Espectro de masa de los productos de la cepa IMP-BS-23	38
Tabla 16.	Cinética de la cepa IMP-BS-23 (0.024 g/l)	41
Tabla 17.	Cinética de la cepa IMP-BS-23 (0.048 g/l)	42
Tabla 18.	Cinética de la cepa IMP-BS-23 (0.24 g/l)	43
Tabla 19.	Eliminación de DBT (mg) por la cepa IMP-BS-4	52
Tabla 20.	Eliminación de DBT (mg) por la cepa IMP-BS-23	53

FIGURAS

Figura 1.	Proceso de Refinaci3n con Biodesulfuraci3n	12
Figura 2.	Vias metab3licas de Biodesulfuraci3n	17
Figura 3.	Via metab3lica caracterizada para el <i>Rhodococcus rhodochrous</i>	19
Figura 4.	Validaci3n de m3todos cromatogr3ficos	32
Figura 5.	Perfil cromatogr3fico de los productos cepa IMP-BS-4	35
Figura 6.	Espectro de masas de los productos cepa IMP-BS-4	36
Figura 7.	Perfil cromatogr3fico de los productos de la cepa IMP-BS-23	37
Figura 8.	Espectro de masas de los productos de la cepa IMP-BS-23	39
Figura 9.	Cin3tica cepa IMP-BS-23 (0.024 g/l)	40
Figura 10.	Cin3tica cepa IMP-BS-23 (0.048 g/l)	41
Figura 11.	Cin3tica cepa IMP-BS-23 (0.24 g/l)	43
Figura 12.	Fotografia cepa IMP-BS-23 al tiempo 0	44
Figura 13.	Fotografia cepa IMP-BS-23 al tiempo 24 hrs.	45
Figura 14.	Fotografia cepa IMP-BS-23 al tiempo 8 dias.	45
Figura 15.	Fotografia cepa IMP-BS-4 al tiempo 0	46
Figura 16.	Fotografia cepa IMP-BS 4 al tiempo de 5 d3as.	47
Figura 17.	Gr3fica de resultado extractos con adici3n de azida	48
Figura 18.	Gr3fica de resultado de lisados celulares	49

RESUMEN

Bremauntz Michavila, Ma. del Pilar. "Biodesulfuración de petróleo mediante catálisis enzimática". Tesis de Maestría. Universidad Nacional Autónoma de México, México D.F. (2000)

La lluvia ácida es uno de los principales problemas ambientales a los que se enfrenta la sociedad actualmente. Este fenómeno se debe a la presencia de óxidos de azufre y nitrógeno en la atmósfera, los cuales reaccionan con radicales libres concurrentes en la misma, formando ácidos, que posteriormente son depositado a través de la lluvia en la superficie de la tierra. La acidificación de suelos, ríos, y sistemas lacustres es el principal efecto, alterando la ecología de los lugares afectados. También debe considerarse los daños a los monumentos en las ciudades.

La presencia de azufre en la atmósfera se debe a la combustión de hidrocarburos con un alto contenido de azufre. Aún cuando, se han implantado normas muy estrictas respecto al contenido de azufre en el petróleo y sus derivados es cada vez mayor. Debido a esto, los procesos clásicos para reducir el contenido de azufre en los combustibles deben ser cada vez más eficientes, lo que los convierte en más costosos y muchas veces no viables. La búsqueda de procesos alternos para la eliminación de azufre ha llevado al desarrollo de la biodesulfuración.

Durante la última década se ha buscado microorganismos que sean capaces de eliminar los compuestos azufrados de los hidrocarburos. Actualmente se cuenta con algunos microorganismos que prometen ser una fuente de biocatalizadores para el desarrollo del proceso de biodesulfuración, como es el caso del *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. Sin embargo, ninguno de los microorganismos empleados hasta la fecha ha permitido desarrollar un proceso a escala industrial.

El objetivo de este trabajo fue aislar un microorganismo mexicano que presentara potencial para iniciar el desarrollo de un biocatalizador. Para ello se empleo como molécula modelo de los organosulfurados al dibenzotiofeno. Se lograron obtener dos bacterias, aisladas de la Refinería Francisco I. Madero de Cd. Madero, Tamps., clasificadas como *Klebsiella oxytoca* GC A, denominada como IMP-BS-4 y *Aureobacterium estercariosium* denominada como IMP-BS-23. Ambas presentan actividad biodesulfuradora. El aislado IMP-BS-4 produjo como metabolitos del dibenzotiofeno, el sulfóxido y la sulfona de dibenzotiofeno. La bacteria IMP-BS-23 produjo 2-hidroxibifenilo. Estos metabolitos forman parte de la vía metabólica de biodesulfuración denominada "4S", misma que sigue el *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8.

Con la cepa IMP-BS-23, las pruebas cinéticas determinaron una velocidad máxima de remoción del dibenzotiofeno de 0.0276 mg DBT/ml/día. Igualmente se hicieron pruebas con extractos celulares que permiten suponer que la actividad persiste a pesar del rompimiento celular.

I. INTRODUCCIÓN

La industria petrolera obtiene una gran cantidad de productos potencialmente contaminantes dentro de los cuales se encuentran compuestos organosulfurados, los cuales son los promotores de la lluvia ácida.

Los procesos clásicos de eliminación de azufre (hidrodesulfuración, HDS), disminuyen notablemente el azufre contenido en los hidrocarburos, sin embargo para poder alcanzar la normatividad ambiental en cuanto al contenido de azufre en diferentes fracciones del petróleo, los procesos actuales deben ser sometidos a mejoras técnicas que hacen que su costo se incremente notablemente, lo que los hace poco viable y por tanto se abre el nicho de oportunidad para procesos alternos.

Desde inicios del siglo XX se ha explorado la posibilidad de emplear la biotecnología como una de las herramientas para desarrollar un proceso que elimine el azufre en hidrocarburos, el cual ha sido denominado Biodesulfuración, sin embargo a la fecha no se cuenta con un proceso a escala industrial.

En los últimos años se han aislado gran cantidad de microorganismos que han mostrado tener la capacidad de romper enlaces carbón-azufre (1) a través de diferentes vías metabólicas, siendo el *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 el más estudiado y el que hasta el momento ha presentado resultados prometedores en cuanto a la remoción de azufre de moléculas modelo e incluso de fracciones de petróleo, de hecho a la fecha existen algunos procesos a escala piloto que han sido financiados por compañías petroleras importantes de los Estados Unidos de Norteamérica.

La búsqueda de microorganismos como fuente de biocatalizadores de la biodesulfuración de petróleo y sus derivados es el punto de partida para el desarrollo de un proceso que podría ayudar a la industria petrolera a alcanzar los parámetros ambientales que están siendo requeridos en el ámbito internacional.

En el escenario nacional, el problema del azufre en el petróleo y sus derivados es prioritario, ya que los petróleos autóctonos tienen un contenido de azufre mucho más alto que los de otros países, por lo que los procesos de eliminación de azufre deben ser aún más eficientes y por tanto más costosos. De ahí que en este trabajo se busque obtener microorganismos autóctonos, no patentados que permitan el desarrollo de un biocatalizador mexicano.

II OBJETIVOS.

Aislar y caracterizar cepas microbianas y sus extractos celulares que sean capaces de modificar los compuestos organosulfurados presentes en el petróleo en términos de reducción de azufre.

Los objetivos particulares son:

1. Aislar microorganismos de suelos y aguas contaminadas con hidrocarburos o residuos petrolíferos, y obtener cultivos enriquecidos con actividad biodesulfuradora frente a DBT.
2. Seleccionar cepas con alto potencial biodesulfurador.
3. Caracterizar los productos y/o intermediarios metabólicos de la degradación de dibenzotiofeno.
4. Determinar la actividad biodesulfuradora de extractos celulares, de la cepa seleccionada.

Para lograr dichos objetivos se propuso la siguiente estrategia experimental:

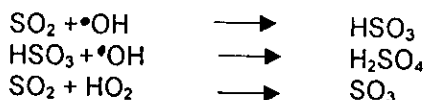
1. Aislamiento de microorganismos capaces de utilizar el DBT como única fuente de azufre.
2. Enriquecimiento de las cepas, para lograr obtener biomasa.
3. Seleccionar la concentración de DBT óptima para evaluar la actividad.
4. Determinar la cinética de biotransformación y los productos metabólicos de la cepa(s) seleccionadas.
5. Preparar extractos celulares y determinar de su actividad biodesulfuradora.

III. ANTECEDENTES

III.1 El problema del azufre

Uno de los fenómenos más difundidos que ocurren por las emisiones a la atmósfera durante la combustión de compuestos petrolíferos es el conocido como precipitación ácida. Los óxidos de azufre y nitrógeno producidos durante la combustión son transformados en la atmósfera para producir ácidos. Así, la acidez media de las precipitaciones sobre todo el hemisferio va en continuo aumento (1,2).

El mecanismo de las transformaciones de los óxidos de azufre no se conoce tan bien como el de los óxidos de nitrógeno; sin embargo se sabe una parte de dióxido de azufre (SO_2), se convierte en ácido sulfúrico, con la intervención de los radicales libre producidos por mecanismos fotoquímicos:



En otros casos, la oxidación ocurre directamente en las gotitas de líquido, y es favorecida por los óxidos metálicos (de magnesio, hierro y vanadio) que emiten las fuentes fijas. Un ejemplo de las reacciones en cadena que ocurren son las siguientes:



Puesto que el pentóxido de vanadio que se forma en la reacción puede volver a ser utilizado en la primera reacción, el resultado neto final es que el trióxido de azufre se convierte en ácido sulfúrico (4).

La acidez de las precipitaciones es hoy en día entre 5 y 40 veces más fuerte que las características en una lluvia no contaminada, y estos valores pueden aumentar durante temporales, ya que las descargas eléctricas favorecen los fenómenos de oxidación (2).

Los efectos de las precipitaciones ácidas son múltiples y afectan a la vegetación, a los sistemas hidráulicos, las obras murales y a la salud. En

aquellos suelos deficientes en sustancias calcáreas, la acidez de las precipitaciones provoca modificaciones en el intercambio de elementos químicos entre plantas y suelo. A consecuencia de ello se tienen pérdidas de calcio, sodio, magnesio y además ocurre una alteración de los procesos microbiológicos que intervienen en la fijación de nitrógeno. En los ríos, lagos y mares, provoca el abatimiento del pH original, causando daños en el desarrollo embrionario de algunas especies e incluso la desaparición de las mismas. En cuanto a monumentos de mármol, son atacados provocando la dilución de los mismos, y en otro tipo de materiales como el cobre, causa una grave oxidación (1,2).

Todos los efectos de las emisiones de óxido de azufre a la atmósfera han provocado que la normatividad internacional fije nuevos límites de azufre total para los combustibles fósiles. Así, para este año 2000 los límites deberán alcanzar 50-100ppm y para el año 2010 se proponen valores límites de 30 ppm, dependiendo del combustible (3). Esta normatividad se hace aún más difícil de alcanzar considerando que las reservas de crudos ligeros, bajos en azufre son cada vez más escasas y como promedio podríamos decir que los crudos que serán empleados para el año 2010 contienen 40% más de azufre que los que se emplean actualmente en la industria petrolera mundial (4,5).

Este nuevo escenario hace necesaria la implementación de tecnologías más eficientes para la remoción de azufre de combustibles fósiles ya que la tecnología clásica tal cual existe ahora no puede cumplir con dichas especificaciones. Dentro de las alternativas para estas nuevas tecnologías se podría pensar en:

- Desarrollar nuevos catalizadores y condiciones de operación para el proceso clásico de hidrodesulfuración.
- Desarrollar nuevas tecnologías para la eliminación de compuestos azufrados dentro de las cuales se encontraría la biodesulfuración.

III.2 Características químicas del petróleo.

La generación del petróleo está asociada con la deposición de detritos orgánicos en rocas sedimentarias que aparecieron en el mar, lugares cercanos e incluso en ambientes no marinos.

Se cree que el petróleo surgió del decaimiento de restos animales y vegetales que fueron incorporados a sedimentos en el momento de la deposición. Sin embargo los detalles de las transformaciones y mecanismos mediante los cuales el petróleo salió de los sedimentos y se acumuló en las rocas reservorios aún no se esclarece.

La importancia de diferentes formas de vida en la producción de la hidrosfera a través de las eras geológicas se ha demostrado, sin embargo es difícil determinar y cuantificar la relación entre los fósiles y su productividad orgánica, por tanto su contribución a la formación del petróleo.

En cuanto a los compuestos que forman el petróleo, fueron generados por la diseminación de materia orgánica en los lechos. De hecho la primera apariencia del petróleo es en forma dispersa. Los procesos de migración primaria y secundaria que dieron origen a la acumulación del petróleo deben estar acompañados de los mecanismos que concentraron los compuestos dispersos del petróleo.

No se puede conocer mucho acerca de los compuestos que dieron origen al petróleo a partir de la composición del mismo, tal cual lo conocemos ahora, sin embargo de las transformaciones biológicas de porfirinas, ácidos grasos, glicéridos, carbohidratos, proteínas, lignina y esteroides pueden haber dado origen a la cantidad de compuestos originales que se encontraban en diferentes zonas de la tierra y en consecuencia a los diferentes tipos de petróleo.(6)

Una de las características en cuanto a la composición química de los diferentes tipos de petróleo, que es prioritaria para determinar el costo del mismo, es el contenido de azufre total. Se encuentran petróleos crudos con variaciones de 0.1 – 6 % de azufre total. Algunos de los valores de % de azufre para crudos comerciales se muestran en la tabla 1 (7).

Tabla 1
Contenido de azufre en crudos comerciales.

País	% azufre
Arabia Saudita	1.7-2.9
Irán	1.4-2.6
México	1.5-6.0
Venezuela	2.0-5.4
Mar del Norte	0.1-0.4
W. Texas Sur	1.9

En cuanto al dato del petróleo mexicano es importante aclarar que existen 18 clases de crudo diferentes en nuestro país (tabla 2) y que de hecho los que se refinan localmente son los más pesados, mientras los más ligeros son destinados a la exportación. Es importante aclarar que los crudos más pesados generalmente tienen un contenido mayor de moléculas azufradas complejas.

Tabla 2
Tipos de Petróleos crudos que se extraen en México y sus principales propiedades (8).

Tipo de crudo	Grado API (gravedad mínima)	Azufre (%peso, máximo)
Ligero	32-38	1.6
Pesado maya	22-23	3.6
Olmeca	38	0.9
Naranja	27	3.0
Alamo	13	3.2
Muro	14	4.4
Horcón	12	3.4
Marino F.Oro	28	3.0
Pozoleo	28	2.0
Antares	23	3.0
Cuenca Papaloapan	40.4	2.0
No ceroso	21.9	2.0
Terciario, La Venta	32	2.0
Itsmo	33	2.0
Maya	21.6	3.6
Arenque	34	2.0
Altamira	17	6.0
Pánuco	11	6.0

Grado API: es una medida de la gravedad específica que va desde 45.3 para crudos ligeros y 10 para los más pesados

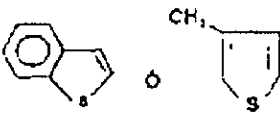
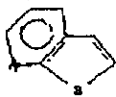
El conocimiento del contenido de azufre total no es suficiente para poder establecer tecnología para reducirlo. Es necesario conocer las estructuras sulfuradas que están conformando el petróleo.

El heteroátomo más abundante en el petróleo es el azufre. La forma en que el azufre se encuentra enlazado a los hidrocarburos da origen a diversas familias de compuestos organosulfurados y prácticamente se pueden encontrar en cualquiera de las estructuras conocidas de los hidrocarburos del petróleo. De esta forma su distribución es amplia en todo el intervalo de ebullición del crudo. Sin embargo, existen fracciones de destilados intermedios (entre los 250°C y 350°C)

donde predominan ciertas estructuras modelo de organosulfurados, como el dibenzotiofeno (DBT) (9,10).

Las especies organosulfuradas presentes en el crudo se pueden clasificar en seis grandes familias de acuerdo a la forma en la que se encuentra unido el átomo de azufre con la cadena hidrocarbonada. En la tabla 3 se presentan las estructuras modelo y la clasificación de las diversas familias de organosulfurados.

Tabla 3
Estructura modelo de diversas familias de organosulfurados

Especie Modelo	Familia
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{CH}_2 - \text{SH}$ propanotiol	Mercaptanos
$\text{CH}_3 - \text{CH}_2 - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$ dietil sulfuro	Sulfuros
$\text{CH}_3 - \text{S} - \text{S} - \text{CH}_2 - \text{CH}_3$	Disulfuros
 <p>benzotiofeno metil tiofeno</p>	Tiofenos
$\begin{array}{c} \text{O} \\ \\ \text{CH}_3 - \text{S} - \text{CH}_3 \end{array}$ dimetil sulfóxido	Sulfóxido y Acido Sulfónicos
	Mixto más de 2 heteroátomos.

ESPECIES MODELO QUE SE PRESENTAN EN DISTINTAS FRACCIONES DE PETROLEO CRUDO Y SU CLASIFICACION EN FAMILIAS DE ACUERDO A SU GRUPO FUNCIONAL.

Indudablemente cuando se presenta un incremento en las temperaturas finales de ebullición (TFE) de la fracción destilada del crudo, la complejidad de los

constituyentes alquilo o arilo es mayor. Esto significa que en fracciones ligeras (con TFE menores a 200°C) se han detectado especies como mercaptanos, cicloalquil sulfuros, alquil-aril sulfuros y alquil-tiofenos de 4 a 10 átomos de carbón. En la fracción obtenida en los intervalos de 200-540°C se reconocen especies como disulfuros, tiofenos de dos hasta seis anillos aromáticos condensados, aunque predominan en abundancia los alquilbenzotiofenos y naftotiofenos de C₃H₁₀S a C₂₂H₃₄S (10,11).

En la tabla 4 se muestra la distribución de sulfuros en fracciones de destilados de crudo maya (12,13)

El proceso para disminuir el azufre depende del tipo de compuesto organosulfurado presente en el hidrocarburo. Las tecnologías actuales de hidrodesulfuración no son muy eficientes para la eliminación de azufre en compuestos aromáticos como es el caso de los tiofenos sustituidos, sin embargo al emplearlo condiciones muy severas de temperatura y presión la hidrodesulfuración de destilados intermedios ha permitido, hasta el momento cumplir con los límites de la normatividad, sin embargo se presentan dificultades para disminuir aún más el contenido de azufre.

Tabla 4
Distribución de organosulfuros en la fracción de petróleo entre 250°C y 350°C, que corresponde al diesel.

Isómeros ^b	Muestra (%peso) ^a
metil-benzotiofeno	0.07
C ₂ -benzotiofeno	0.28
C ₃ -benzotiofeno	2.46
C ₄ -benzotiofeno	2.05
C ₅ -benzotiofeno	19.54
C ₆ -benzotiofeno	1.29
C ₇ -C ₁₄ -benzotiofenos	no cuantificados
dibenzotiofeno	40.90
metil-dibenzotiofeno	16.66
C ₂ -dibenzotiofeno	3.99
C ₃ -dibenzotiofeno	1.74
C ₄ -dibenzotiofeno	7.05
C ₅ -dibenzotiofeno	3.19
C ₆ -C ₁₀ -dibenzotiofeno	no cuantificados

a: Concentración relativa al % en peso de organosulfuros en la fracción estudiada.

b: Cada nombre agrupa a los isómeros del mismo peso molecular.

III.3 Hidrodesulfuración (HDS).

La hidrodesulfuración es uno de los procesos de hidrogenación que ocurre en la refinación del petróleo, de hecho el uso de hidrógeno en procesos térmicos es uno de los grandes avances tecnológicos de la refinación (6).

El proceso clásico de eliminación de azufre es conocido como hidrodesulfuración, se emplea en todas las refinerías del mundo desde los años 70's y consiste básicamente en el tratamiento con hidrógeno en presencia de un catalizador (cobalto-molibdeno/alúmina) aplicando presiones de hasta 54 atmósferas y temperaturas que alcanzan los 400°C, obteniéndose ácido sulfhídrico, que posteriormente a través del proceso catalítico Clauss, produce el azufre en su estado elemental (6). La definición de los parámetros tales como el tiempo de residencia, la presión y temperatura se definen de acuerdo al tipo de compuestos organosulfurados que se desean remover así como del combustible a tratar y la normatividad que debe cumplir el mismo.

Para poder alcanzar los valores que dicta la normatividad actual, el proceso clásico requiere de condiciones aún más severas. Al elevar aún más la temperatura, presión y buscar nuevos catalizadores, los costos se incrementan notablemente de hecho si el proceso busca disminuir el contenido de azufre por debajo de la 100ppm, el costo se eleva exponencialmente, hasta el punto de convertirse en un proceso no viable que requiere de alternativas.

Como se definió anteriormente el conocimiento de los compuestos azufrados que conforman el azufre total es uno de los factores más importante para poder eliminar el contenido de azufre en el petróleo y derivados

En los Estados Unidos los expertos en la industria de la refinación esperan que la inversión en una refinería para aumentar y mejorar la capacidad para remover el azufre rebase los 30,000 mil millones de Dolares EUA para este año 2000 (5,15).

Existen varias alternativas convencionales para utilizar procesos que disminuyan el contenido de contaminantes azufrados. La primera de ellas es obtener petróleo crudo con bajo contenido de azufre. La segunda consiste en el uso de nuevos catalizadores y condiciones de operación más severas de hidrodesulfuración. Una tercera opción consiste en desarrollar nuevas tecnologías para la eliminación de compuestos azufrados en hidrocarburos. Dentro de estas últimas alternativas se encuentra el proceso de biodesulfuración. En cuanto a la transformación de estas especies para remover el azufre de los hidrocarburos, se ha demostrado que la hidrodesulfuración catalítica es más efectiva frente a especies organosulfuradas con el átomo de azufre fuera de una estructura

aromática como sería el caso de mercaptanos disulfuros etc., siendo recalitrantes a este proceso las estructuras tiofénicas(10). Lo cual representa en el proceso de la refinación que cuanto más pesada sea la fracción destilada mayores problemas se tendrán para eliminar el contenido de azufre en la misma

III.4 Biodesulfuración (BDS)

El azufre es un elemento esencial para la vida, ya sea como componente de aminoácidos, conformando coenzimas y como puente estructural de algunas proteínas. Igualmente para algunos organismos, el azufre actúa como donador y aceptor de electrones en reacciones de producción de energía. Los microbiólogos han tratado desde hace tiempo de explotar los procesos enzimáticos involucrados en el metabolismo de azufre, para encontrar una alternativa viable económicamente, aplicable a la desulfuración del petróleo (14).

Existe evidencia que desde 1930 Maliyants, describió un sistema reductivo/anaerobio empleando *Spirillum aestuarri* que convertía azufre orgánico en ácido sulfhídrico, y un sistema oxidativo/aeróbico, empleando bacterias tioacídicas, que convertían el azufre orgánico en ácido sulfúrico (15,16). La distinción entre sistemas oxidativos y reductivos es una forma clara de dividir los horizontes de la biodesulfuración (BDS), la cual se puede definir como la transformación de moléculas organosulfuradas mediante la acción de un agente biológico.

En muchos de los sistemas de biodesulfuración, los microorganismos funcionan degradando las moléculas organosulfuradas a productos solubles en agua, los cuales pueden ser así fácilmente separados del petróleo. Como resultado de estos sistemas existe un gran número de reportes en los últimos 20 años que presentan sistemas de biodesulfuración frente a moléculas organosulfuradas modelo, sin embargo han mostrado tener limitaciones tales como una baja actividad biodesulfuradora, problemas en la estabilidad de la actividad de las cepas, requerimientos de formulación de medios de cultivo muy costosos y pérdida de actividad frente a la existencia de otros sustratos organosulfurados o fuentes de carbón ricos, entre otros (14).

El nicho más importante de la BDS es desarrollar tecnologías en las que el microorganismo y sus enzimas catalicen una reacción específica donde el azufre sea liberado y el hidrocarburo permanezca intacto. Esta tecnología sería análoga al proceso convencional de HDS. El problema con los sistemas biológicos es que tienden a ser más lentos que un sistema catalítico, para el primer caso hablamos de horas e incluso días y para el según hablamos de minutos o segundos y en muchos casos el proceso de separación del biocatalizador resulta complicado ya

que generalmente se encuentra difundido en el lecho de la reacción y en el segundo son pellets.

En el proceso de Refinación del petróleo, existen varios puntos donde se podría aplicar la BDS, estos se muestran en la Figura 1. La BDS podría acoplarse a la HDS o para tratar fracciones de petróleo que actualmente no son desulfuradas como sería el petróleo crudo antes de entrar a ser refinado y cortes de destilación muy pesados. La ventaja de la BDS sobre la HDS se debe a las bajas temperaturas, presiones de operación y el hecho de que en general los biocatalizadores no son sensibles a la presencia de metales pesados, que existen en el crudo y fracciones muy pesadas.

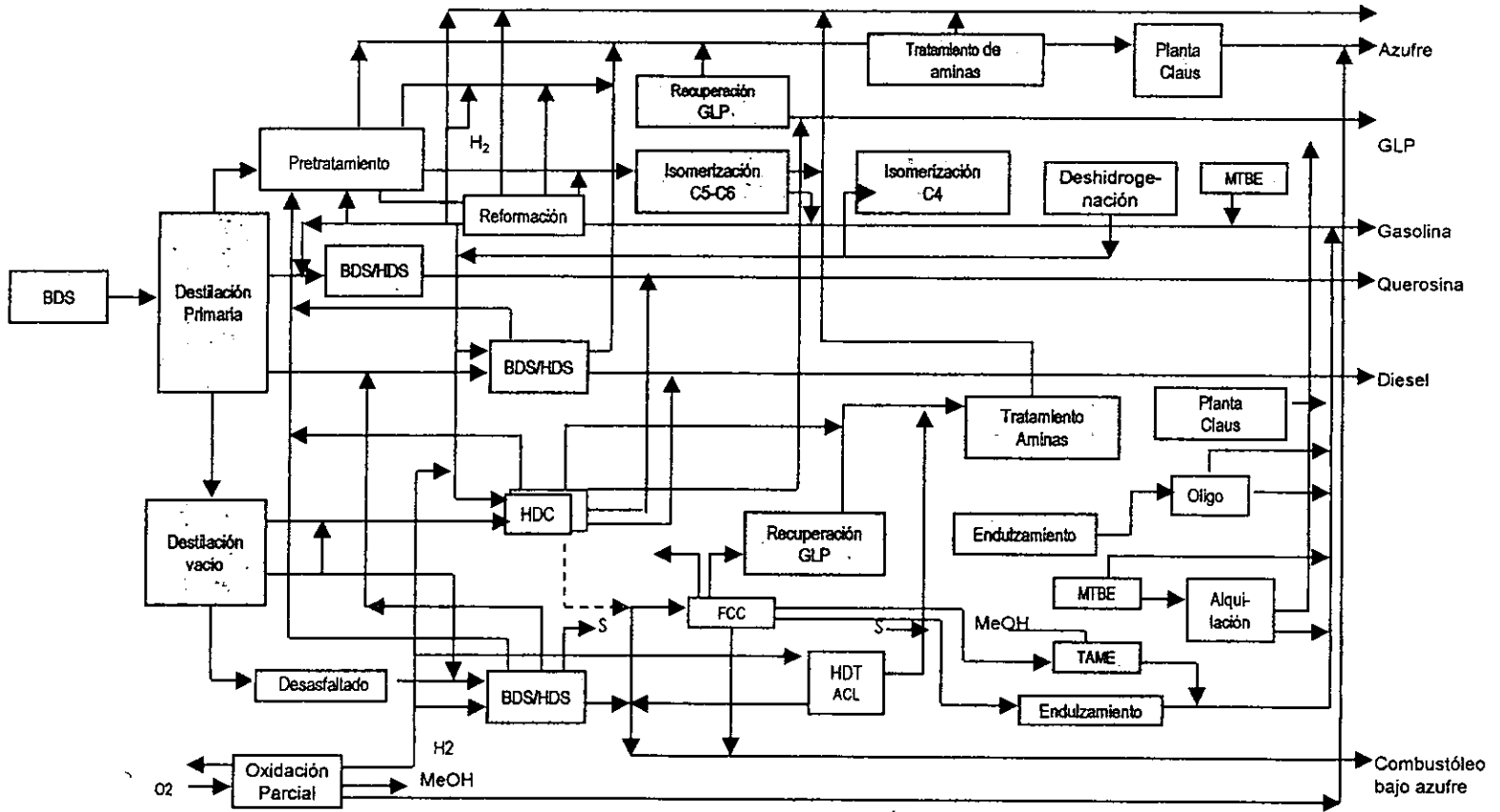


Figura 1
Esquema del proceso de refinación con las opciones de biodesulfuración

En cuanto a los tipos de biocatalizadores posibles, como se mencionó anteriormente son de dos tipos oxidativos o reductivos, dando lugar a la BDS oxidativa o a la BDS reductiva.

III.5 Biodesulfuración reductiva.

Conceptualmente esta vía podría ser la más atractiva, ya que el producto azufrado que se obtiene es ácido sulfhídrico, el cual se remueve fácilmente del seno de la reacción y es el mismo producto que en la HDS, por lo que se podrían juntar corrientes con el gas existente en las refinerías, finalmente, requiere de hidrógeno que es un suministro existente en la infraestructura de las refinerías. Por otro lado, la ausencia de oxígeno en el proceso de BDS limitaría la oxidación no deseada de hidrocarburos ya que ésta produce acidificación incluso y producción de gomas que dificultan los procesos posteriores(14).

Las bacterias sulfatoredutoras han sido las más empleadas para la BDS reductiva de compuestos organosulfurados, ya que tienen la capacidad de obtener energía reduciendo sulfatos a ácido sulfhídrico. La reducción de organosulfuros no es muy común pero se ha comprobado que ocurre (17,18).

ZoBell (1953) fue el primero en describir la remoción de azufre orgánico del petróleo, por medio de una reducción disimilatoria de azufre. El proceso lo describió, haciendo reaccionar petróleo con hidrógeno en presencia de uno o más microorganismos o enzimas aisladas, capaces de activar el hidrógeno, tal como la reducción y remoción de azufre ocurre (19).

La principal enzima requerida para la activación del hidrógeno fue la hidrogenasa, que permitía a las bacterias sulfato-reductoras usar el hidrógeno como fuente de electrones. La bacteria *Desulfovibrio desulfuricans* fue el microorganismo más adecuado debido a su notable actividad hidrogenasa (19). Desdichadamente, las evidencias que soportan la eficiencia de este proceso no fueron muchas. Posteriormente la relación entre hidrogenasa y la actividad biodesulfuradora fue comprobada por otros autores (18, 20).

La capacidad de las bacterias sulfatoredutoras de eliminar azufre de compuestos orgánicos fue reportada por Kohler (20), que trabajando con *Desulfovibrio* e hidrógeno como reductor, demostró la producción de ácido sulfhídrico, empleando como molécula modelo disulfuro y dibenzotiofeno (DBT). Los productos de la desulfuración fueron tolueno, bencilmercaptanos y ácido sulfhídrico. Sin embargo dicho microorganismo no presentó actividad frente a otros organosulfurados como el butilsulfuro y el tiantreno.

Miller *et al* (21) emplearon lactato en vez de hidrógeno, como donador de electrones y cultivos mixtos de sulfatoredutoras, logrando desulfurar los dibencil-

sulfuros, obteniendo tolueno y ácido sulfhídrico. Sin embargo Kohler (20) mostró que en este sistema el dibenzotiofeno (DBT), la sulfona del DBT y la fenilsulfona no eran atacados.

El grupo de Lizama (22), encontró crecimiento de sulfatoredutoras en DBT, empleándolo como única fuente de azufre y aceptor de electrones. Usaron hidrógeno, lactato y ácido butírico como donadores de electrones y sugirieron que la reducción de DBT a ácido sulfhídrico debe ser una vía común para todas las bacterias sulfatoredutoras.

Kim *et al.* (23), desarrollaron un proceso bioelectroquímico para liberar electrones mediante una celda electrolítica y usando *Desulfovibrio desulfuricans* M6. La reacción se realiza en el cátodo al entrar en contacto con una mezcla de sustratos sulfurados, el microorganismo y metil-violágeno como mediador de electrones. Los estudios que realizaron con DBT demostraron la producción de bifenilo y ácido sulfhídrico, mientras que estudios con petróleo crudo y diesel resultaron en la reducción de azufre total en un 20%, en 5 días de incubación.

Aparentemente la vía reductiva era exclusiva de bacterias sulfatoredutoras, pero Finnerty (24), reportó dicha vía trabajando con una bacteria aeróbica gram (+), designada FE-9. En medio no acuoso empleó la FE-9 con DBT en 100% de dimetilformamida en atmósfera de hidrógeno y reportó la conversión de DBT bifenilo y ácido sulfhídrico. Sin embargo estos trabajos no han podido ser reproducidos.

Ninguno de los trabajos anteriores ha sido escalado aún a nivel piloto y al parecer las condiciones de anaerobiosis y en tiempos de residencia del sistema no resultan atractivos para la industria petrolera.

III.6 Biodesulfuración oxidativa

La BDS oxidativa se puede dividir en asimilatoria y disimilatoria. Los productos para estos sistemas son compuestos oxidados tales como sulfatos que generalmente son solubles en agua.

La oxidación disimilatoria de azufre ocurre cuando el compuesto azufrado se usa como donador de electrones en reacciones que producen energía. La oxidación asimilatoria es para obtener el azufre para biosíntesis de compuestos organo-sulfurados. En estos sistemas generalmente el azufre no es oxidado o lo es indirectamente al oxidar el hidrocarburo, el producto de este metabolismo es la

producción de biomasa, productos parcialmente oxidados y/o la completa mineralización de los compuestos a bióxido de carbono y sulfato (14).

La BDS oxidativa disimilatoria esta asociada a bacterias sulfatooxidativas, que se pueden encontrar en los efluentes ácidos de minas (*Thiobacillus*) o en aguas termales (*Sulfolobus*). Investigadores como Kirshenbam (25), Kargi and Robinson (26, 27) han trabajado en la BDS de petróleo empleando dichos microorganismos, sin embargo consideraron que tenían actividad únicamente al observar el aumento en la concentración de sulfatos en el medio, sin identificar el producto carbonado. La falta de soporte analítico en estas pruebas no permitió asegurar que el azufre haya sido removido de los compuestos organosulfurados. Igualmente se ha trabajado con bacterias termofilicas *Sulfolobus*, pero el soporte analítico, basado en el aumento de sulfatos, no es lo suficientemente sólido para aseverar la actividad biodesulfuradora.

En cuanto a la BDS oxidativa no específica, los sistemas que la presentan han sido ampliamente estudiados. Strawinski (28, 29) describió las propiedades de algunos microorganismos que degradaban los compuestos organosulfurados e indiscriminadamente degradan hidrocarburos. Empleó petróleo como única fuente de azufre en presencia de una gran diversidad de fuentes de carbono tales como glucosa. Sin embargo la mineralización de compuestos organosulfurados es un evidente problema.

Posteriormente, Kodama et al (1, 30, 31), Monticello et al (32, 33), Malik y Clause (34, 35), Yen y Gunsalus (36), estudiaron la vía de degradación de DBT en *Pseudomonas*, *Rhizobium* y *Acinetobacter*. Finalmente se concluyó que en la vía de degradación de DBT, este se oxidaba mediante el ataque del hidrocarburo, de una manera semejante a la degradación de naftaleno. Se han realizado varias pruebas empleando microorganismos que no ataquen al hidrocarburo en su estructura carbonada ya sea que estos contenga o no azufre y sí a los enlaces carbón-azufre, mediante esta vía, sin embargo ninguno de estos procesos es económicamente viable, ya que el costo de producción del biocatalizador, el tiempo de residencia en el reactor y el tiempo de vida media del biocatalizador son grandes limitantes (14).

La BDS oxidativa de azufre puede remover azufre de los compuestos organosulfurados sin degradación del hidrocarburo. Ibister and Kobylinski en 1985 (37), fueron los primeros que presentaron evidencias analíticas de la vía oxidativa selectiva de azufre; mientras aislaban microorganismos que pudieran remover azufre del carbón, encontraron un microorganismo que después de un tratamiento mutagénico, adquiriría una alta actividad para oxidar DBT, creciéndolo en benzoato como fuente de carbón.

El microorganismo se identificó como Gram (-), del género *Pseudomonas* y se designó CB1. La oxidación del DBT por CB1 producía 2-2' hidroxibifenilo y

sulfatos. CB1 aparentemente se perdió pero dio origen a la vía metabólica "4s", la cual tomó dicho nombre debido a los cuatro intermediarios de la oxidación del DBT que involucran sulfóxido, sulfona, sulfonato y sulfato (38).

A partir del descubrimiento de la vía "4S" se inició la búsqueda de microorganismos que pudieran realizarla, Kilbane et al (39), lograron aislar una cepa de *Rhodococcus rhodochrous* designada IGTS8 que desarrollaba la vía "4s" de forma estable, produciendo 2-hidroxobifenilo y sulfatos, sugiriendo una modificación a la vía que desarrollaba CB1. Una gran variedad de compuestos organosulfurados también servían como sustratos de desulfuración, tiantreno, fenilsulfóxido, tritiano y bencildisulfuro, entre otros.

En 1991 el Institute of Gas Technology otorgó la licencia exclusiva a través de patentes (39,40) para proteger IGTS8 a la compañía estadounidense Energy Biosystems. Co., que cuenta actualmente con un programa de desarrollo comercial de la Biodesulfuración.

En la figura 2 se resumen las diferentes vías metabólicas que se sugieren para la biodesulfuración de DBT.

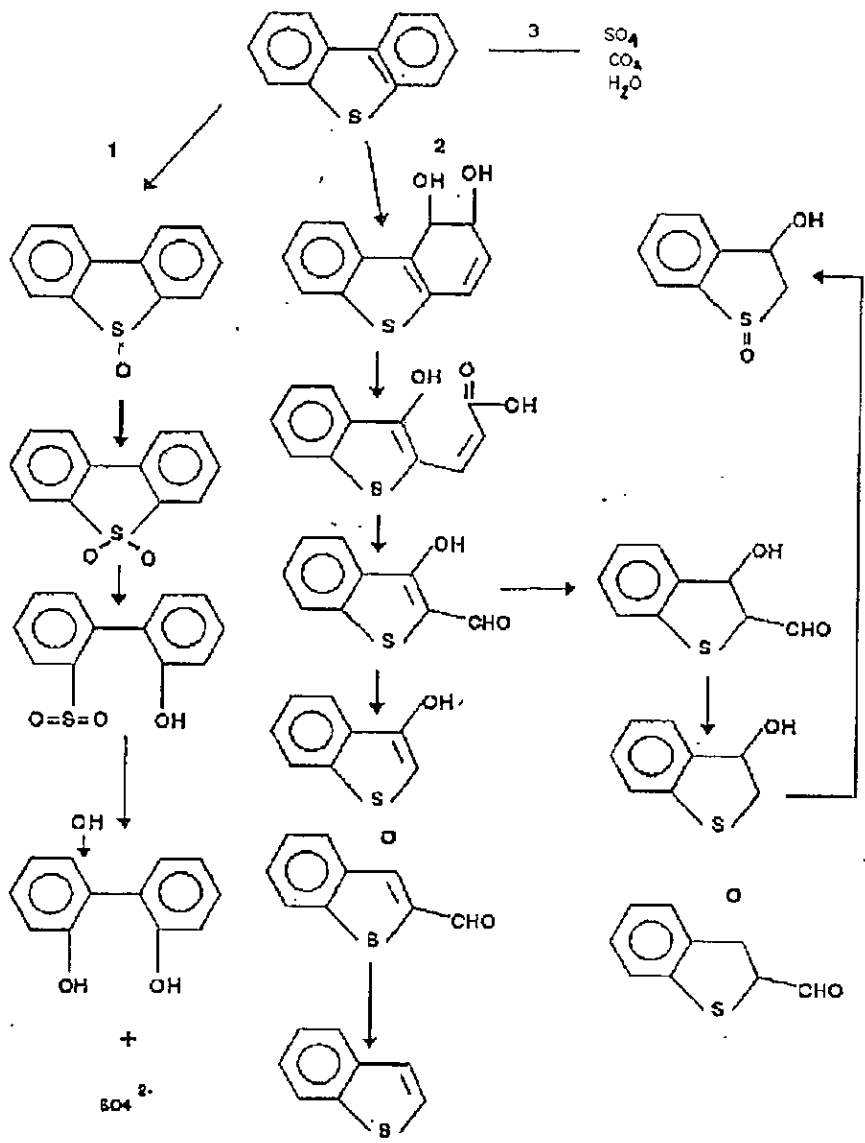


Figura 2.
 Vías metabólicas propuestas para la biodegradación de dibenzotiofeno.
 1: vía "4S"; 2: Vía destructiva y 3: Vía de mineralización.

III.7 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8

Rhodococcus rhodochrous IGTS8, es el organismo con mayor actividad biodesulfuradora que se ha reportado a la fecha, habiendo alcanzado 80% w/w de eliminación de DBT en medios sintéticos y 40% w/w de reducción de azufre total en fracciones de petróleo tales como diesel (39-49). Presenta las siguientes características

- a) Actinomiceto aeróbico, gram positivo, perteneciente a la familia Nocardiae.
- b) No produce esporas.
- c) Pleomorfo, después de la formación de micelio primario se fractura en bacilos y cocos.
- d) Coloración de amarillo crema a salmón.
- e) Quimiotipo de pared celular tipo IV
- f) Contenido de G+C 59-69%
- g) El crecimiento y estabilidad del micelio y su fragmentación se ve regulada por la composición del medio, temperatura de incubación y factores físicos.
- h) La pared celular esta constituida de ácido diaminopimérico, teniendo ácido tuberculoesteárico.
- i) Catalasa positivo y oxidasa negativo.

Fue aislado de fuentes naturales tales como lodos contaminados con hidrocarburos, aguas residuales de refinerías y suelos contaminados con petróleo crudo. (44).

Inicialmente lo aislaron con la cualidad de ser un microorganismo biodegradador de hidrocarburos, posteriormente lo mantuvieron en cultivo bajo condiciones continuas de restricción de azufre y en presencia de DBT; este cultivo fue expuesto a 1-metil-3-nitro-1-nitrosoguanidina o luz UV, provocando una mutación que confirió al microorganismo mayor actividad biodesulfuradora de DBT, a través de la vía "4s" (40,41).

La actividad biodesulfuradora es intracelular (45-47), a través de un complejo multienzimático, dependiente de oxígeno.

Se han realizado estudios para el aislamiento de los genes y enzimas responsables de la BDS. Los genes han sido secuenciados y clonados permitiendo caracterizar las enzimas participantes: la primera DBTmonooxidasa, la segunda DBTmonoxigenasa y la última una aril-sulfonasa, que actúa como una C-S ligasa. Las dos primeras requieren de Flavin-mononucleótido (FMN) reducido para ser activas. Los genes que codifican las dos primeras han sido clonados en

diferentes bacterias tanto Gram (+) y Gram (-). En la figura 3 se muestra la vía metabólica "4S" señalando las enzimas implicadas.

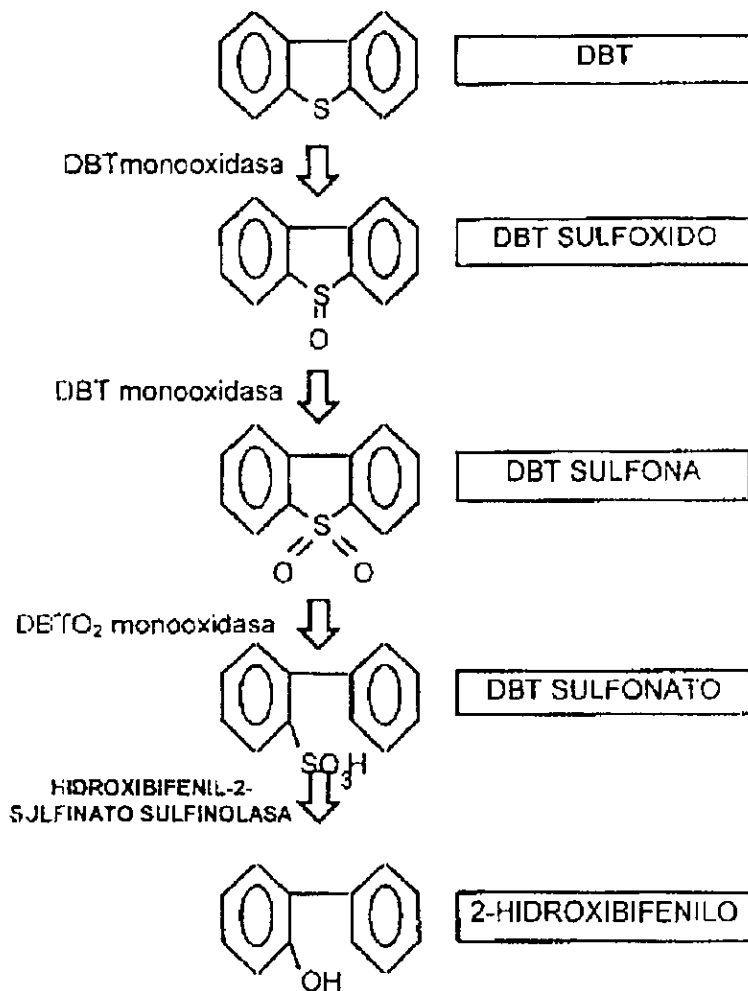


Figura 3.
Vía metabólica de BDS como la realiza el *Rhodococcus rhodochrous* con las enzimas que han sido identificadas.

La vía metabólica se encuentra codificada en plásmido en el cual tres genes son responsables *soxABC* arreglados en un operón que ocupa una región de 4kb. La proteína SoxC de 45Kda ha sido secuenciada y tiene ciertas semejanzas a los miembros de la familia acetil CoA deshidrogenasa y se ha caracterizado que participa en la primera oxidación del DBT a DBT sulfona (48), esta enzima ha sido denominada sulfuro/sulfóxido monooxigenasa, la cual se enlaza con FMN y lo reduce, se ha demostrado que es la responsable de la transformación del DBT a DBT sulfóxido y subsecuentemente a sulfona.

Se cree que SoxA (proteína de 50Kda) y SoxB (proteína de 40Kda) actúan en la transformación del DBT-sulfona al 2-hidroxibifenilo y sulfato (48, 49). La pregunta de que si este paso es directo o a través de la formación de un intermediario, 2-hidroxibifenil-2-sulfonato, no esta resulta aún (48-50).

Se ha encontrado que existe represión de la vía por metionina, cistina, casa-aminoácido y sulfato, pero no por DBT o dimetil-sulfóxido. Después de clonar *sox A* en el gen *lacZ* de *E.coli*, se encontró que en esta región esta el promotor y al menos tres regiones regulatorias. Igualmente se encontró que la transcripción se reprime por sulfato y cisteína. Finalmente parece ser que la actividad de los genes desulfuradores no está controlada solo por la expresión de los mismos, sino por otros factores aún no determinados (51).

III.8 Biodesulfuración enzimática.

La desulfuración empleando como catalizadores microorganismos presenta ciertas desventajas, entre ellas que requiere una fase acuosa que contenga el microorganismo, lo cual implica que la BDS se realiza en reactores bifásicos y posteriormente se tendría que plantear un sistema de separación relativamente complejo. Es cierto que la fase acuosa puede ser reducida a un mínimo, sin embargo debe existir, lo cual provoca además problemas de transferencia de masa al tener el sustrato insoluble en la fase acuosa o el microorganismo insoluble en la fase orgánica.

Parte de estos problemas se podría resolver si se emplearan las enzimas y no el microorganismo completo.

Se ha demostrado que las enzimas pueden llevar a cabo reacciones biocatalíticas en solventes orgánicos, de hecho en algunos casos su termoestabilidad y actividad son mayores. Este hecho favorecería la transferencia de masa (52).

El medio de la reacción sería el solvente mismo. Se pueden presentar tres efectos del solvente orgánico sobre el biocatalizador:

- El solvente causa inhibición o inactivación por interactuar directamente con la enzima.
- El solvente puede interactuar en la difusión del sustrato y el producto.
- El solvente puede interactuar con el agua en la vecindad de las enzimas.

Estos tres factores pueden ser controlados, si el solvente es hidrofóbico, caso que ocurre con los hidrocarburos.

Existen algunas enzimas que son capaces de oxidar tiofenos y compuestos organosulfurados en solventes orgánicos, algunas de ellas son:

- Citocromo P₄₅₀ (53)
- Lignina peroxidasa (54).
- Lactoperoxidasa (55).
- Cloroperoxidas (56).
- Horseradish peroxidasa (53).
- Citocromo C (57)
- Hemoglobina (58).

Todas ellas tienen en común que son hemoproteínas, cuyos productos de oxidación son los respectivos sulfóxidos.

En el caso específico de la peroxidasa se han realizado estudios para oxidar compuestos organosulfurados contenidos en el diesel primario mexicano, los resultados han mostrado que existen la BDS de organosulfuros pesados a través de biocatálisis enzimática (59).

El campo de la biocatálisis enzimática se presenta como una solución muy atractiva para biodesulfurar derivados del petróleo, por lo que este trabajo se realizó para establecer las bases para desarrollar un sistema biocatalítico enzimático, partiendo desde el aislamiento de microorganismos biodesulfuradores mexicanos, adaptados a las altas concentraciones de azufre que contienen los crudos nacionales y llegando hasta la caracterización de la actividad de extractos celulares.

IV MATERIALES Y METODOS

El trabajo realizado para esta tesis se dividió en:

1. Aislamiento de microorganismos.
2. Evaluación de la actividad biodesulfuradora.
3. Caracterización de la actividad biodesulfuradora.
4. Determinación de actividad biodesulfuradora de extractos celulares.

De acuerdo a las actividades realizadas los materiales y métodos empleados fueron los siguientes

IV.1 Aislamiento y enriquecimiento de microorganismos.

Con el objetivo de encontrar microorganismos que estuviesen adaptados a altas concentraciones de azufre y existieran mayores posibilidades de encontrar biodesulfuradores, de las seis refinerías que existen en el país se decidió hacer un muestreo en la que procesa petróleo con mayor contenido de azufre: la Refinería Francisco I. Madero en Cd. Madero Tamaulipas.

Se muestrearon siete zonas diferentes, en las cuales existían derrames de hidrocarburos, las zonas fueron: suelo contaminado con diesel, suelo contaminado con gasolina Nova, derrame de crudo en suelo, tanque de almacenamiento de crudo en reparación, canal de descargas, terminal marítima y Playa Miramar. El muestreo se realizó directamente sobre cajas Petri con el siguiente medio de cultivo:

Medio A: (sólido) (60 modificado)

KH ₂ PO ₄	1.36 g/l
K ₂ HPO ₄	1.72 g/l
NH ₄ Cl	1.32 g/l
Solución de metales	
Trazas	100µl/l
CaCl ₂ (Soln. 40g/l)	500µl/l
Extracto de levadura	0.01 g/l
Agar	20g/l
pH 7	
Sol. DBT/THF	5.4 mM (250µl por caja)

Solución de metales trazas para 1 l agua desionizada:

ZnCl ₂	105 mg
CoCl ₂	81 mg
Na ₂ MoO ₄	51 mg
MnCl ₂ 4H ₂ O	72 mg
CuCl ₂	54 mg
EDTA	100 mg

Para preparar las cajas Petri, el medio ya estéril (120°C, 15 lb/pulg² durante 15 min.) se vació en las cajas con todo excepto el DBT. Una vez que solidificó el medio se distribuyó la solución de DBT en THF en toda la superficie del mismo, y se esperó a que se evaporara el THF, de esta forma el DBT se distribuyó de forma homogénea.

Las muestras se incubaron durante 48 hrs a 37°C y aquellas que mostraran crecimiento abundante se resembraron. En total se hicieron tres resiembras.

Para el enriquecimiento, los cultivos con crecimiento abundante fueron inoculados en medio líquido:

Medio B (líquido) (60 modificado):

KH ₂ PO ₄	1.36 g/l
K ₂ HPO ₄	1.72 g/l
NH ₄ Cl	1.32 g/l
Solución de metales trazas* 100µl/l	
CaCl ₂ *	500µl/l
Extracto de levadura	0.01 g/l
DBT	0.1 g/l

pH 6.5

- mismas concentraciones que el medio de cultivo A.

Cada uno de los aislamientos se hizo por triplicado, se sometió a agitación rotatoria en un agitador de piso New Brunswick a 125rpm durante 8 días, determinando cada 24 hrs el crecimiento seguido como densidad óptica a 550 nm en un colorímetro Hach DR/2000 EUA.

IV.2 Evaluación de la actividad biodesulfuradora

Las cepas resultantes del aislamiento se sometieron a pruebas de degradación de dibenzotiofeno, para ellos se formularon dos medios diferentes dependiendo si el microorganismo era bacteria u hongo. Los medios fueron los siguientes:

Medio C (actividad biodesulfuradora en bacterias) (60)

K ₂ HPO ₄	4 g/l
NaH ₂ PO ₄	4 g/l
NH ₄ Cl	2 g/l
MgCl ₂	0.2 g/l
CaCl ₂	0.001 g/l

FeCl ₃	0.001 g/l
Glicerol	0.2% v/v
DBT	0.1 g/l
pH 6.5	

Medio D (actividad biodesulfuradora en hongos) (60modificado)

K ₂ HPO ₄	4 g/l
NaH ₂ PO ₄	4 g/l
NH ₄ Cl	2 g/l
MgCl ₂	0.2 g/l
CaCl ₂	0.001 g/l
FeCl ₃	0.001 g/l
Dextrosa	0.2% v/v
DBT	0.1 g/l
pH 6.5	

En todos los casos se trabajó en medio líquido en matraces nefelométricos de 250 ml, con 50 ml de medio de cultivo y cada matraz se inoculó con 1% v/v de paquete celular resuspendido en solución salina 0.85% p/v de NaCl.

El crecimiento se siguió por densidad óptica como se describió con anterioridad, y se hicieron determinaciones cada 24 hrs; cada punto se determinó por triplicado y la muestra para poder determinar la degradación de DBT se sacrificaba. La corrida completa tuvo una duración de ocho días.

Para evaluar la remoción de dibenzotiofeno en el medio en esta actividad fue necesario extraerlo de la muestra completa, para ello se emplearon dos métodos, con el objetivo de determinar cuál era más eficiente. Los métodos empleados fueron:

Método directo (61)

Extracción con tolueno:

Se hicieron para cada muestra tres extracciones con una solución de antraceno (estándar interno) en tolueno 1g/l, en un volumen total de 9ml para 50 ml de muestra. Se separaron las fases y la fase orgánica fue analizada.

Método indirecto

Extracción con diclorometano:

Se hicieron cinco lavados con diclorometano, volumen total de 20 ml, se filtró la fase orgánica a través de una membrana de fibra de vidrio (GF/C) y se eliminó la humedad con sulfato de sodio anhidro.

La solución de diclorometano con dibenzotiofeno se evaporó a sequedad, el precipitado se solubilizó en la solución antraceno/tolueno 1g/l y se analizó.

Para los dos métodos de extracción se realizaron pruebas de valoración del método empleando blancos con concentraciones de DBT en medio de cultivo desde 0.1 g/l hasta 0.01g/l, para determinar el porcentaje de DBT recuperado.

Para esta actividad la cuantificación del DBT se realizó como un seguimiento rutinario del remanente, por medio de cromatografía de gases. Se empleó un Cromatografo de gases Perkin-Elmer 8500 con detector de ionización de flama empleando una columna Alltech Heliflex AT-1, EUA. La condiciones fueron:

Temperatura inicial	100°C
Temperatura final	235°C
Rampa de temperatura	10°C/min.
Temperatura del inyector	300°C
Temperatura del detector	300°C
Tiempo total de la corrida	15 min
Gas de arrastre Helio	

En caso de encontrar compuestos no esperados, se determinó por Espectrometría de masa en un equipo CG-EM Finnigan de alta resolución (61).

IV.3 Caracterización de la actividad biodesulfuradora.

La cepa seleccionada de la actividad anterior se sometió a pruebas para determinar la cinética de remoción de DBT, para la cual se uso el medio de cultivo C. Se inoculó con un paquete celular resuspendido en NaCl 0.85% para alcanzar en cada una de las muestras una absorbancia a 550 nm de 0.1 uA. Equivalente a 8.6+/-0.81 mg/ml de proteína.

Se inoculó en matraces nefelométricos de 125 ml, en un volumen total de 25ml con medio de sales basales y se añadió 1 ml de DBT en dimetilformamida., se sometió a agitación durante 300 hrs., se extrajo el DBT con 25 ml de tetrahidrofurano, se sometió a centrifugación para eliminar la biomasa, de ahí se tomo 1ml para determinar DBT en HPLC (61). En las siguientes condiciones:

Fase: acetonitrilo/agua 70:30 v/v
Detector UV a 230 nm.
Flujo 0.3 ml/min.
Columna: HP ODS Hypersill 5µm 100 x 2.1mm.

Se determinó el error de extracción el cual fue de 5%.

El crecimiento se determina mediante la cuantificación de proteína total según el ensayo DC-Protein de BioRad, empleando como estándar Albúmina.

IV. 4 Actividad de extractos celulares

Para determinar la actividad metabólica se realizaron dos tipos de pruebas: inhibición del proceso de respiración a través de azida de sodio y lisado celular completo.

Prueba con azida:

Se preparó una concentración alta de biomasa (A_{550nm} mayor a 2uA) incubando durante 4 días a 125 rpm la cepa seleccionada en MSB (medio A sin glicerol y DBT) y $1\mu M$ de tiantreno como fuente de azufre, esto para evitar que en el análisis de final DBT remanente de la preparación del inóculo. La biomasa obtenida se lavó tres veces con solución salina y se resuspendió en medio sin fuente de carbono y azufre, hasta alcanzar una absorbancia a 550 nm de 1.85 uA (solución salina 0.85%).

El volumen total de la muestra para cada prueba fue de 10 ml, 8ml de la suspensión celular y 2 ml de una solución de DBT en acetonitrilo 0.5 mM, se trabajaron tres lotes, cada uno por triplicado; biomasa activa completa, biomasa esterilizada (15 min, $150^{\circ}C$ y $15lb/pulg^2$) y biomasa con 0.1% de azida de sodio.

Todas las muestras se pusieron en agitación a temperatura ambiente durante cinco días. Para determinar la remoción de DBT se empleó el método de extracción con tolueno y mediante CG-FID.

La prueba fue diseñada para este fin en específico.

Prueba con células lisadas:

Se trabajo con las mismas condiciones que la prueba anterior a diferencia que el lote con azida, se sustituyó por células lisadas.

La metodología para el rompimiento celular fue a la suspensión celular añadir cristal pulverizado resuspendido en buffer pH 7.73. (62). Para hacer control del lisado se emplearon cajas petri con medio A en incubación por 72 hrs a $37^{\circ}C$

La prueba fue diseñada para este fin en específico.

IV.5 Caracterización de las cepas seleccionadas y conservación.

Para caracterizar las cepas se enviaron a la compañía MICROBIAL ID INC, donde se caracterizaron por su perfil de fosfolípidos de la membrana.

Las fotografías se tomaron después de la tinción de Gram, con aumento de 100x, en el microscopio Carl Zeiss, Axioscop MC-100.

En cuanto a la conservación, se emplearon dos técnicas, una para conservar las cepas mientras se estaba trabajando con ellas, para lo cual se prepararon tubos de ensayo con el medio de cultivo C, en 2% de agar, sin DBT, se dejaba solidificar inclinado el tubo y finalmente se espolvoreaba el medio con DBT. El segundo método era para conservar a largo plazo las cepas para lo cual se centrifugó la cepa en suspendida en medio C, a 5000rpm durante 20min, en una Centrifuga Beckman 50.1 (Alemania), y se procedió a hacer lavados con solución salina al 0.85% w/v, en cada lavado se centrifugó en las mismas condiciones y finalmente el paquete celular se resuspendió en una solución de glicerol al 50 % como agente criogénico, se dispuso en viales y se almacenó en un ultracongelador a -40 C. Ambos métodos habían sido empleados en

V. RESULTADOS

V.1 Aislamiento de microorganismos biodesulfuradores.

El total de muestras tomadas de la Refinería F. I.Madero fueron 50, las cuales después de 72 hrs. de incubación mostraron los resultados que se muestran en la tabla

Tabla 5. Resultados del aislamiento a las 72 hrs. de incubación a 37°C.

Zona de muestreo	Número de cajas con crecimiento	Tipo de microorganismos
Suelo contaminado con gasolina.	2	Bacterias
	1	Hongo
Suelo contaminado con diesel.	9	Bacteria
	6	Bacterias y hongos
Crudo en suelo	2	Bacterias y hongo
Tanque de almacenamiento de crudo	1	Bacterias
	1	Hongos
Canal de descarga	14	Bacterias
	2	Bacterias y hongos
Puerto	2	Bacterias
	1	Bacterias y hongos
Playa Miramar	1	Bacterias
	2	Hongos

Cuando se refiere a hongos y bacterias significa que ambas crecieron en la misma caja.

En la tabla 5 cuando se refiere a bacterias y hongos, esto quiere decir que en la misma caja había hongos y bacterias.

No se observó ninguna tendencia en cuanto al tipo de microorganismo o abundancia de crecimiento dependiente de la zona de muestreo.

Se procedió a realizar las resiembras para iniciar el enriquecimiento, empleando el medio de cultivo B, los resultados se muestran en las tablas 6 y 7.

Tabla 6. Resultados de la primera resiembra de las muestras de Refinería.

Zona de muestreo	Tipo de microorganismos
Suelo contaminado con gasolina	Bacterias beige con aureola rosa y hongos con micelio.
Suelo contaminado con diesel.	Bacterias beige con aureola rosa, bacterias azulosas y hongos con micelio aéreos.
Crudo en suelo	Bacterias beige con aureola y hongos con micelio.
Tanque de almacenamiento de crudo	Bacterias beige y hongos con micelio.
Canal de descarga	Bacterias beige y azulosas.
Puerto	Bacterias beige.
Playa Miramar	Bacterias beige y azulosas

En esta primera resiembra 5 de las cincuenta cajas no presentaron crecimiento.

Tabla 7. Resultados de la segunda resiembra de las muestras de Refinería.

Zona de muestreo	Tipo de microorganismos
Suelo contaminado con gasolina	Bacterias beige y hongos
Suelo contaminado con diesel.	Bacterias beige y hongos con micelio aereos.
Crudo en suelo	Bacterias beige hongos con micelio.
Tanque de almacenamiento de crudo	Bacterias beige y hongos con micelio.
Canal de descarga	Bacterias beige y azulosas.
Puerto	Bacterias beige.
Playa Miramar	Bacterias beige y azulosas

En el caso de esta segunda resiembra se perdieron la mayoría de las bacterias azulosas y en 8 cajas de las 50, no hubo crecimiento.

De acuerdo a las observaciones de las colonias de las cincuenta cajas cuadrículadas se seleccionaron aquellas que además de presentar mayor crecimiento, fueran diferentes entre sí ya fuera por el tipo de colonia, color o zona de muestreo, ya que se deseaba obtener al menos un cultivo de cada zona. Las colonias seleccionadas para realizar el enriquecimiento fueron:

- 1.- bacteria beige con aureola rosa.
- 2.- bacterias beige
- 3.- bacteria beige elevadas
- 4.- bacterias beige rugosas
- 5.- bacterias beige
- 6.- hongo blanco con micelios
- 7.- bacteria beige rosada
- 8.- bacteria beige
- 9.- bacteria beige
- 10.- bacteria beige
- 11.- bacterias con sombra rosada
- 12.- bacterias azulosas
- 13.- hongo con micelio blanco
- 14.- bacterias azulosa
- 15.- bacterias beige
- 16.- bacterias beige
- 17.- bacterias beige
- 18.- bacterias beige
- 19.- bacterias beige
- 20.- bacterias beige
- 21.- bacterias beige

Estas colonias fueron inoculadas en el medio líquido B, cada una por duplicado y se prepararon tres blancos. Para seguir el crecimiento se determinó absorbancia a 550 nm., a los ocho días de haber inoculado y a las 24 hrs siguientes. Los resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Enriquecimiento de los aislamientos de Microorganismos biodesulfuradores

Número de muestra	Colonia de origen	A ₅₅₀ inicial (t = 0)	A ₅₅₀ ocho días	A ₅₅₀ 9 días	Observaciones.
1	1	0.0487	0.097	0.105	
2	1	0.0504	0.154	0.150	
3	2	0.0488	0.120	0.119	Cambio color del medio a ambar
4	2	0.049	0.128	0.118	Cambio el color del medio a ambar
5	3	0.0508	0.026	0.037	
6	3	0.0515	0.075	0.060	
7	4	0.0503	0.072	0.063	
8	4	0.05	0.66	0.048	
9	5	0.05	0.40	0.030	
10	5	0.0501	0.012	0.008	
12	6	0.0508	0.023	0.031	Hongos blancos
13	7	0.0505	0.031	0.026	
14	7	0.0502	0.035	0.047	
15	8	0.0495	0.042	0.041	
16	8	0.0501	0.029	0.023	
17	9	0.0503	0.029	0.010	
18	9	0.0515	0.012	0.021	
19	10	0.051	0.012	0.018	
20	10	0.0503	0.03	0.041	
21	11	0.05	0.037	0.043	
22	11	0.0505	0.030	0.058	
23	12	0.051	0.122	0.138	
24	12	0.0509	0.062	0.081	
25	13	0.0508	0.045	0.037	
26	13	0.05	0.021	0.022	
27	14	0.0504	0.021	0.020	
28	14	0.0498	0.048	0.074	
29	15	0.051	0.032	0.014	
30	15	0.049	0.035	0.025	
31	16	0.0502	0.078	0.066	
32	16	0.051	0.081	0.020	
33	17	0.0513	0.036	0.053	
34	17	0.0509	0.034	0.025	
35	18	0.050	0.013	-	El matraz se rompió
36	18	0.049	0.022	0.023	
37	19	0.051	0.02	0.018	
38	19	0.050	0.015	0.014	
39	20	0.050	0.042	0.051	
40	20	0.050	0.030	0.027	
41	21	0.0494	0.048	0.044	
42	21	0.050	0.006	0.012	
43	B	0.049	0	0	
44	B	0.0501	0	-	Se contaminó
45	B	0.0493	0.062	-	Se contaminó

De acuerdo al crecimiento así como de las características de la colonia en cuanto a cambios de color en el medio o el tipo de microorganismo se seleccionaron seis aislamientos para hacer las pruebas de actividad biodesulfuradora. Estos aislamientos fueron: 2,3,4,12,23 y 45.

V.2 Actividad biodesulfuradora

Una vez obtenidos los cultivos enriquecidos se procedió a determinar su potencial biodesulfurador, para lo cual se prepararon inóculos de cada enriquecimiento con una concentración final de 1% v/v de paquete celular con una densidad óptica $_{550nm}$ de 0.05. El inóculo se resuspendió en medio de cultivo líquido con sales basales y 0.1 g/l de DBT. Cada enriquecimiento se preparó por triplicado para cada tiempo de muestreo 3,8 y 30 días. El seguimiento de la prueba fue determinar crecimiento celular por densidad óptica $_{550nm}$. (DO $_{550nm}$) y DBT removido.

El DBT biodegradado se determinó por cromatografía de gases, empleando antraceno como estándar interno. Para poder realizar la determinación en el cromatógrafo fue necesario sacrificar la muestra completa, ya que se extrajo el DBT del medio de cultivo. Con el objetivo de lograr extraer la mayor cantidad de DBT se probaron 2 métodos diferentes. El primero, una extracción directa con una solución antraceno/tolueno 1g/l (64) y, el segundo, mediante una extracción indirecta iniciando con la solubilización del DBT en diclorometano, evaporación a sequedad y resolubilización en la solución de antraceno/tolueno. Los resultados se presentan en las tablas 9 y 10.

Tabla 9
Prueba de extracción directa de dibenzotiofeno. Método directo

DBT estándar	DBT recuperado	% error
6.2	4.6	18.8 ± 5.0
10.3	9.0	4.6 ± 3.7
15.3	14.7	4.0 ± 2.4
20.9	20.1	3.1 ± 0.7

Tabla 10
Prueba de extracción indirecta de dibenzotiofeno. Método indirecto.

DBT estándar	DBT recuperado	% error
5.5	4.6	16.2 ± 4.6
10.3	9.1	11.7 ± 3.1
15.4	14.6	4.7 ± 7.0
22.2	23.7	-8.3 ± 8.0

De las tablas podemos observar que el error promedio que presenta el método directo es de 3.65 %, eliminando el primer dato que se encuentra fuera de rango y para el método indirecto fue de 10.82% eliminando el valor negativo. Ya que el método directo en estas condiciones presenta un menor grado de error, éste se seleccionó para extraer el DBT remanente en las pruebas posteriores.

Una vez establecido el método de extracción se determinó la respuesta del cromatógrafo frente a diferentes concentraciones de DBT para poder asegurar que los resultados obtenidos en el análisis fueran verídicos en cuanto a la remoción de DBT. Los resultados se muestran en la figura 4. Donde se observa que el equipo con el método seleccionado detecta con muy buena precisión concentraciones de DBT en un intervalo de 5 a 35 mg, que sería el intervalo esperado a detectar para determinar la concentración de DBT removido en las pruebas de actividad.

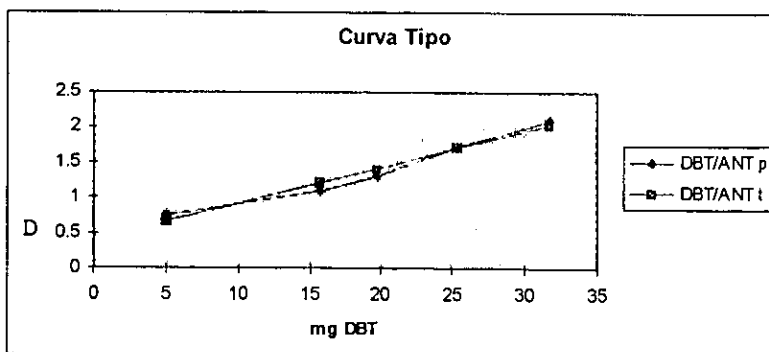


Figura 4
Valoración del método cromatográfico para la identificación de concentraciones de DBT entre 5 y 35 mg

Sobre la base de las valoraciones analíticas realizadas se iniciaron las pruebas de actividad biodesulfuradora en los enriquecimientos denominados:

2,3,4,12,23 y 45. Dichos resultados se muestran de manera resumida en la tabla 11.

Tabla 11
Porcentaje de biodegradación de dibenzotiofeno de los diferentes cultivos enriquecidos.

Enriquecimiento	3 Días de incubación	8 Días de incubación	30 Días de incubación
2 (bacteria)	5.1	5.7	11.9
3 (bacteria)	2.5	6.2	14.1
4 (bacteria)	1.4	3.0	16.4
12 (hongo)	2.0	13.3	15.2
23 (bacteria)	2.4	10.2	17.0
45 (hongo)	2.0	5.2	14.0

- Error de extracción 20%, el cual ya fue considerado en los resultados mostrados.

Se observa que existe mayor biodegradación en todos los casos a los treinta días de incubación, aunque a los ocho días ésta ya es apreciable, siendo los cultivos que presentan mejores resultados 4, 12 y 23. De ellos el 4 y 23 son bacterias y el 12 es un hongo. En este último caso los resultados a lo largo de las pruebas mostraron variaciones importantes en cuanto a la biodegradación de DBT, de hecho se observó que los valores cambiaban si se hacían mayor cantidad de lavados con tolueno, lo que podría explicarse como la probable existiera un fenómeno de adsorción. En el caso de las bacterias este fenómeno no se observó por lo que estas se seleccionaron para seguir el trabajo, ya que el objetivo del mismo es transformar el DBT. De aquí en adelante los cultivos se identificarán como IMP-BS-4 e IMP-BS-23.

De acuerdo a los resultados obtenidos se realizaron pruebas con diferentes concentraciones de DBT (0.24 g/l, 0.5 g/l y 1 g/l) para poder calcular la remoción y velocidad de remoción en un tiempo total de 8 días que, de acuerdo a las pruebas anteriores resultaba tiempo suficiente para realizar una prueba confiable.

Los resultados obtenidos para la cepa IMP-BS-4 se muestran en la tabla 12.

Tabla 12
Actividad biodesulfuradora de la cepa IMP-BS-4, determinados en un tiempo de 8 días de prueba.

Dibenzotiofeno inicial (g/l)	Dibenzotiofeno final (g/l)	Dibenzotiofeno biodegradado(%)	Velocidad de biodegradación g/l DBT/ día
0.24	0.08	65.9	0.02
0.50	0.34	29.8	0.02
1.00	0.84	14.8	0.02

Se observa que la velocidad de volumétrica de biodegradación en todos los casos es muy semejante independientemente de la concentración inicial.

Para la cepa IMP-BS-23 los resultados obtenidos fueron

Tabla 13
Actividad biodesulfuradora de la cepa IMP-BS-23 determinados en un tiempo de 8 días de prueba.

Dibenzotiofeno inicial (g/l)	Dibenzotiofeno final (g/l)	Dibenzotiofeno biodegradado(%)	Velocidad de biodegradación g/l DBT/ día
0.24	0.22	65.9	0.002
0.50	0.38	29.8	0.015
1.00	0.66	14.8	0.042

En este caso el comportamiento nos muestra que según aumenta la cantidad de DBT, aumenta la biodegradación del mismo y la velocidad con que lo realiza.

La biodegradación de DBT, como se dijo con anterioridad fue calculada a partir de la disminución relativa del área del pico correspondiente al DBT en el perfil cromatográfico de cada muestra. En los cromatogramas obtenidos para ambas cepas se observó además de la disminución del área del pico correspondiente al DBT, la aparición de otros picos. Para poderlos identificar, las muestras se enviaron al laboratorio de espectrometría de masas, donde fueron identificados. Para la cepa IMP-BS-4 se observó en el cromatograma un pico dobleteado a mayor tiempo de retención. En la figura 5 se presenta el cromatograma.

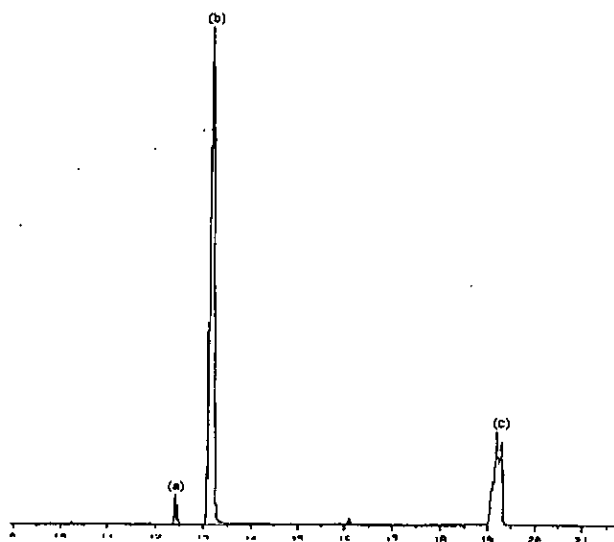
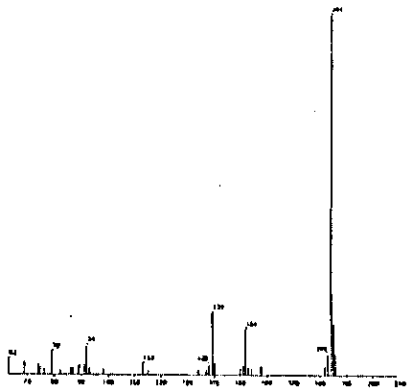


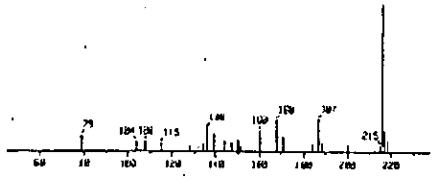
Figura 5
 Perfil cromatográfico obtenido de prueba de actividad de la cepa IMP-BS-4. Pico (a) DBT, (b) antraceno y (c) sulfóxido/sulfona.

El análisis de la espectrometría de masas muestra tres compuestos que se pueden identificar como, dibenzotiofeno, DBT-Sulfóxido y DBT-sulfona. Cabe señalar que el pico correspondiente al antraceno no se analizó por espectrometría de masas, ya que es el estándar interno añadido al seno de la reacción. En la tabla 14 se presenta el resumen de los resultados de los lo espectros de masas y en la figura 6 se presentan los espectros obtenidos para el DBT, DBT-sulfona y DBT-sulfóxido

Dibenzotiofeno



Sulfona



Sulfóxido

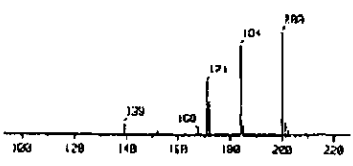


Figura 6
Espectros de masas de los productos obtenidos por la actividad de la cepa IMP-BS-4

Tabla 14
 Identificación de productos por cromatografía de gases acoplada a masas
 realizada en pruebas de actividad de la cepa IMP-BS-4

Tiempo de retención	Ión molecular	Identificación
12.4	184	Dibenzotiofeno
13.3	ND	Antraceno
19.1	200	Sulfóxido
19.3	216	Sulfona

Estos resultados muestran que la cepa IMP-BS-4 podría estar realizando una oxidación parcial del azufre del DBT, de una forma similar a como se realiza en parte de la vía metabólica "4S", en donde los intermediarios son el sulfóxido y la sulfona.

Al analizar detalladamente los cromatogramas de la cepa IMP-BS-23 se encontró además de la remoción de DBT otro pico a menor tiempo de retención, como se presenta en la figura 7.

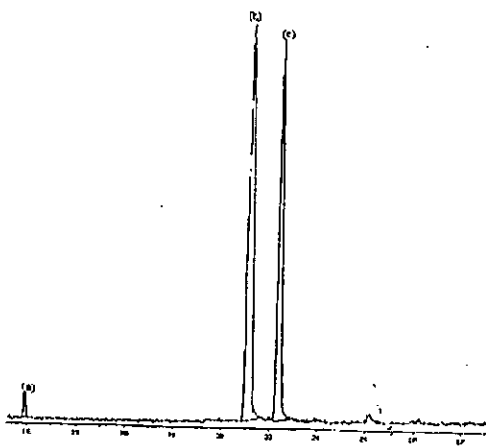


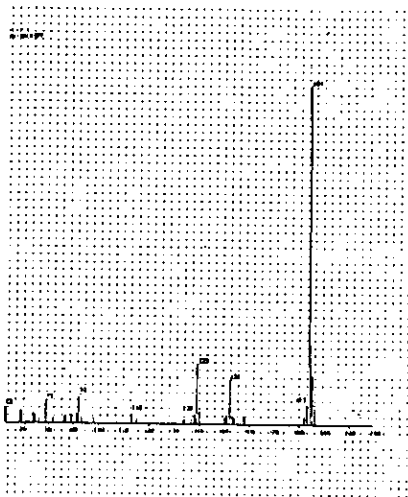
Figura 7
 Perfil cromatográfico obtenido de prueba de actividad de la cepa IMP-BS-23.
 Pico (a) 2-hidroxibifenilo, (b) DBT y (c) antraceno.

Cuando se realizó la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas se identificaron los siguientes compuestos:

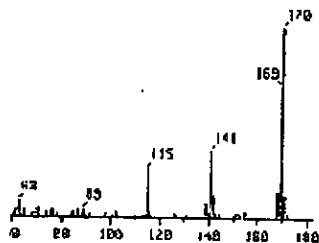
Tabla 15
Identificación de productos por cromatografía de gases acoplada a masas realizada en pruebas de actividad de la cepa IMP-BS-23

Tiempo de retención	Ión molecular	Identificación
17.8	170	2-hidroxibifenilo
22.7	ND	Antraceno
23.25	184	Dibenzotiofeno

Los espectros correspondientes al DBT y al 2- hidroxibifenilo se muestran en la figura 8. Los productos identificados muestran que la cepa IMP-BS-23 transforma el DBT en 2-hidroxibifenilo de la manera que se realiza en la vía "4S" , donde el producto es el mismo.



Dibenzotiofeno



2-Hidroxibifenilo

Figura 8
Espectros de masas de los productos obtenidos por la actividad de la cepa
IMP-BS-23

En vista de que la cepa IMP-BS-23 aparentemente degrada el dibenzotiofeno hasta 2-hidroxibifenilo, se decidió seguir el trabajo con esta cepa y mantener en conservación a la cepa IMP-BS-4.

Se prosiguió con la cinética de biodegradación de la cepa IMP-BS-23, para lo cual se emplearon tres concentraciones diferentes de DBT - 0.024 g/l, 0.048 g/l y 0.24 g/l, en este caso las concentraciones empleadas fueron menores para poder determinar la velocidad de biodegradación sin que el medio se saturara de sustrato. En esta ocasión, para poder determinar el crecimiento celular con exactitud, se determinó proteína mg/ml (BioRad), y el dibenzotiofeno residual se determinó por cromatografía de líquidos de alta resolución. Las modificaciones a las técnicas analíticas se debieron a que en esta prueba se buscaba una mayor exactitud, ya que en las pruebas anteriores, se presentaron varios problemas en las determinaciones, tales como variaciones importantes en la densidad óptica, dependiendo del tipo de célula.

Los resultados obtenidos se presentan en las siguientes figura 9, 10, y 11. En ellas se observa que para la primera concentración la cepa consumió el DBT en los primeros tres días por lo que fue necesario agregar más DBT, para poder seguir observando el comportamiento. En la tabla 16 se muestran las velocidades de biodegradación calculadas.

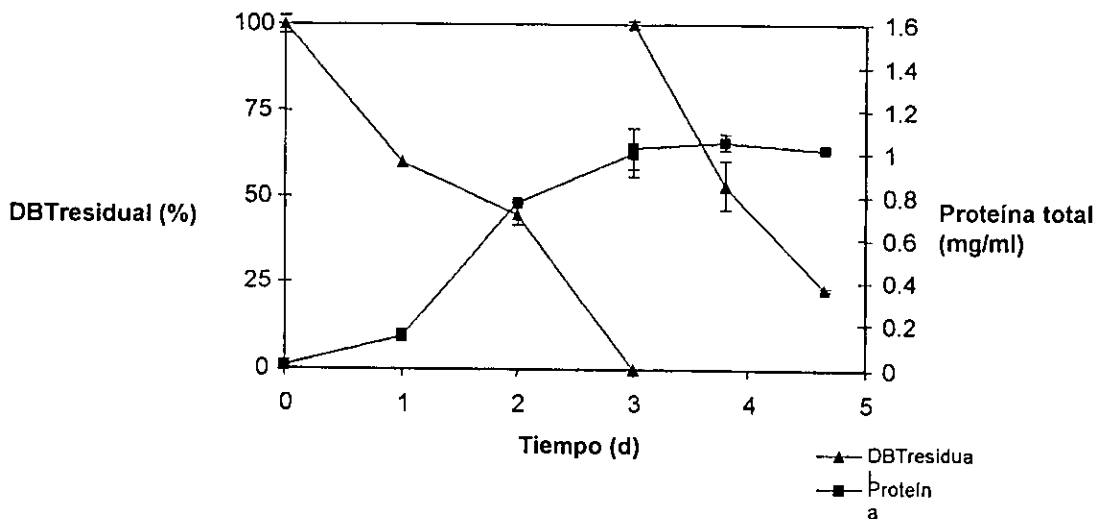


Figura 9
Cinética de eliminación de DBT de la cepa IMP-BS-23 empleando 0.024 g/l de DBT

Tabla 16
 Velocidad de biodegradación en la cinética de la cepa IMP-BS-23 con 0.024 g/l de DBT

Tiempo (días)	DBT residual %	Proteína cel (mg/ml)	Velocidad de biodegradación mg DBT/mg proteína/ día	Velocidad de biodegradación de mg DBT/ml/día
0	100 ± 2.4	0.02 ± 0		
1	60 ± 2	0.15 ± 0	1.6	0.0096
2	45 ± 3.4	0.77 ± 0.01	0.21	0.0066
3	0.0	1.01 ± 0.01	0.20	0.0080
Adición DBT	100 ± 1	1.02 ± 0.10		
3.8	53.3 ± 6.9	1.05 ± 0.04	0.08	0.0029
4.66	23 ± 0.5	1.02 ± 0	0.09	0.0039

Cuando se empleó 0.048 g/l de DBT se obtuvo la gráfica que se presenta en la figura 10, donde se puede observar con claridad el consumo del DBT con respecto al crecimiento celular.

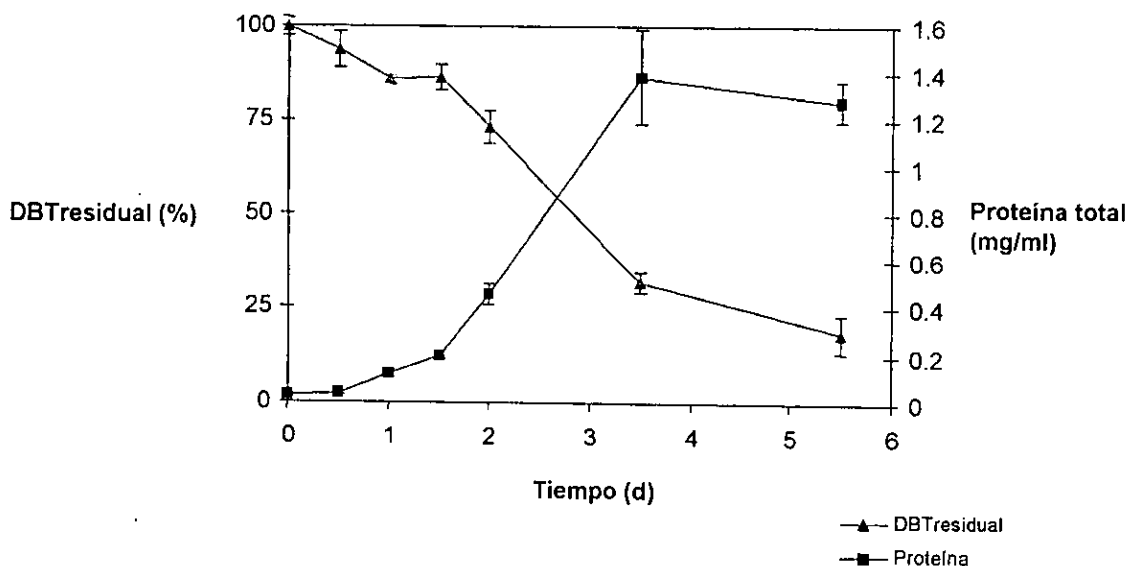


Figura 10
 Cinética de eliminación de DBT de la cepa IMP-BS-23 empleando 0.048 g/l de DBT

Los resultados de los cálculos de las velocidades se muestran en la tabla 17:

Tabla 17
Velocidad de biodegradación en la cinética de la cepa IMP-BS-23 con 0.048 g/l de DBT

Tiempo (días)	DBT residual %	Proteína mg/ml	Velocidad de biodegradación mg DBT/mg proteína/día	Velocidad de biodegradación de mg DBT/ml/día
0	100.0 ± 2.5	0.03 ± 0.01		
0.5	93.8 ± 4.7	0.04 ± 0.01	3.9	0.0059
1	85.9 ± 1.3	0.12 ± 0.02	1.36	0.0067
1.5	86.4 ± 3.3	0.20 ± 0.02	0.53	0.0276
2	73.1 ± 4.3	0.45 ± 0.05	0.36	0.0064
3.5	31.9 ± 2.9	1.38 ± 0.20	0.17	0.0093
5.5	18.2 ± 4.8	1.23 ± 0.09	0.14	0.0071

Finalmente, cuando se empleó una concentración de 0.24 mg/l de DBT los resultados mostraron una probable saturación por sustrato, lo que se observa en la figura 11.

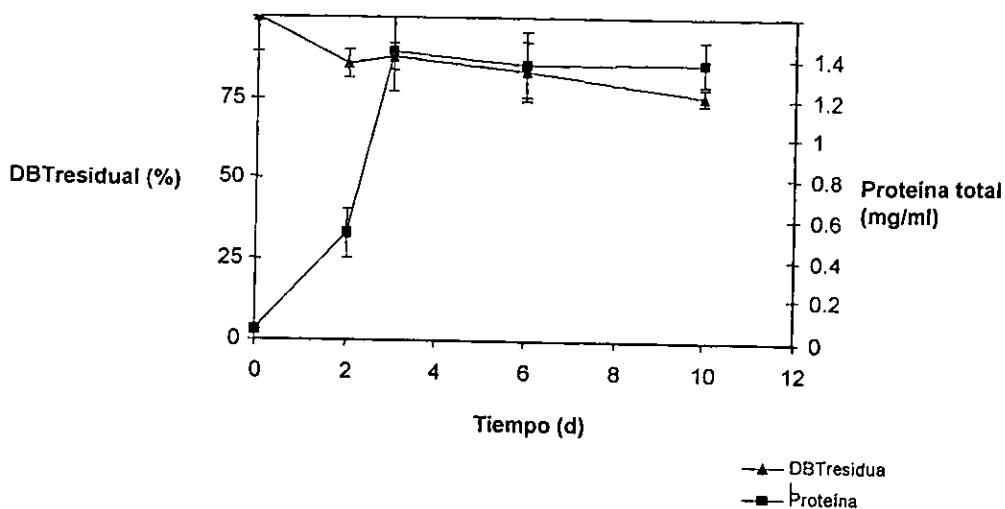


Figura 11
Cinética de eliminación de DBT de la cepa IMP-BS-23 empleando 0.24 g/l de DBT.

Los resultados de los cálculos de las velocidades se muestran en la tabla 18:

Tabla 18
Velocidad de biodegradación en la cinética de la cepa IMP-BS-23 con 0.048 g/l de DBT

Tiempo (días)	DBT residual %	Proteína mg/ml	Velocidad de biodegradación mg DBT/mg proteína/día	Velocidad de biodegradación de mg DBT/ml/día
0	100.0 ± 2.5	0.03 ± 0.01		
0.5	93.8 ± 4.7	0.04 ± 0.01	3.9	0.0059
1	85.9 ± 1.3	0.12 ± 0.02	1.36	0.0067
1.5	86.4 ± 3.3	0.20 ± 0.02	0.53	0.0276
2	73.1 ± 4.3	0.45 ± 0.05	0.36	0.0064
3.5	31.9 ± 2.9	1.38 ± 0.20	0.17	0.0093
5.5	18.2 ± 4.8	1.23 ± 0.09	0.14	0.0071

V.3 Caracterización de las cepas .

La cepa IMP-BS-23 se mandó caracterizar mediante perfil de fosfolípidos de la membrana, se eligió este método ya que es muy rápido y se obtienen resultados confiables, las muestras se enviaron a compañía MICROBIAL INC., la cual envió como resultado que podría tratar de alguna de las bacterias: *Nocardia asteroides* GC subgrupo A, con la cual presenta una semejanza en el perfil del 0.707, o podría ser una *Aureobacterium estercoisium* con una semejanza en el perfil de 0.832. No obstante, no se realizó la comprobación de dicha clasificación por otro método tal como pruebas bioquímicas o ácidos nucleicos.

Por tinción de Gram se observó en el microscopio que corresponde a una bacteria Gram (-) en forma de coco-bacilos que, conforme el proceso de BDS va ocurriendo se van agrupando. Las siguientes fotografías muestran las diferentes morfologías de dicha cepa.

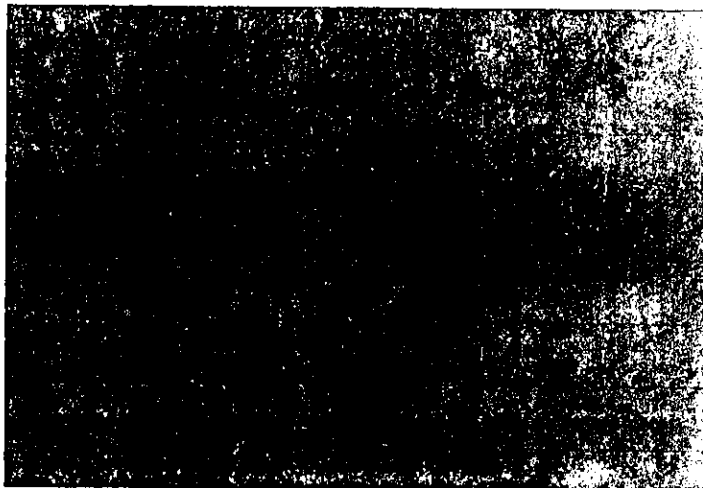


Figura 12
Fotografía del aspecto de la cepa IMP-BS-23 al iniciar las pruebas de actividad

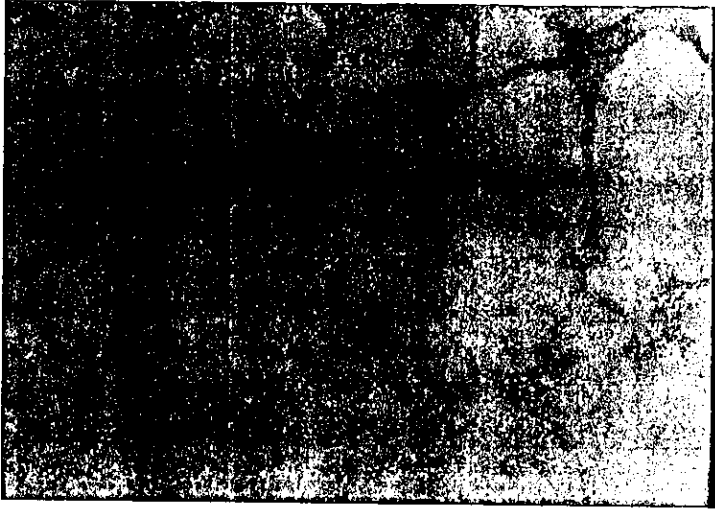


Figura 13
Fotografía del aspecto de la cepa IMP-BS-23 a las 24 horas de haber iniciado la prueba de actividad biodesulfuradora

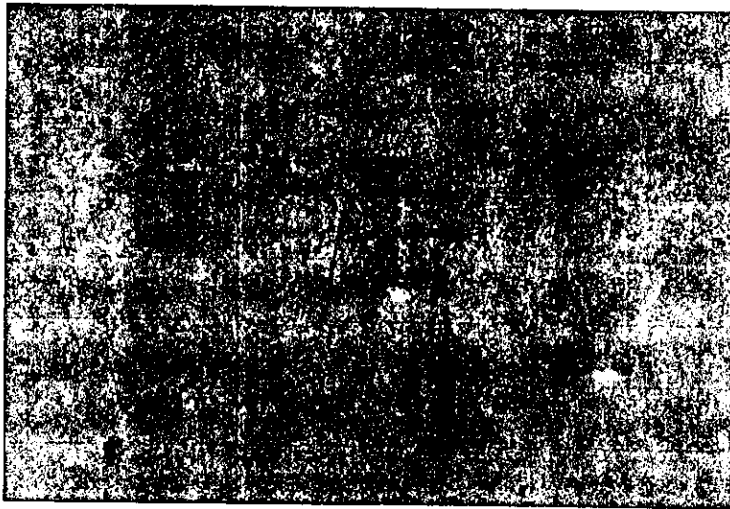


Figura 14
Fotografía del aspecto de la cepa IMP-BS-23 a los ocho días de haber iniciado la prueba de actividad biodesulfuradora

En cuanto a la cepa IMP-BS-4, la caracterización de su perfil de fosfolípidos de la membrana mostraron que podría tratarse de una *Klebsiella oxytoca* GC

subgrupo A, presentando una semejanza de 0.578. Como se mencionó en la sección V.2, los metabolitos que se obtienen por la biodegradación de DBT de esta cepa son la sulfona y el sulfóxido del DBT, los cuales implican necesariamente una eliminación del azufre de la molécula del DBT, por lo que para esta bacteria no se realizaron pruebas cinéticas. Por tinsión de Gram, se observó en el microscopio que son bacterias Gram (-) en forma de cocos. Su apariencia en el microscopio se puede observar en las figuras 15 y 16.

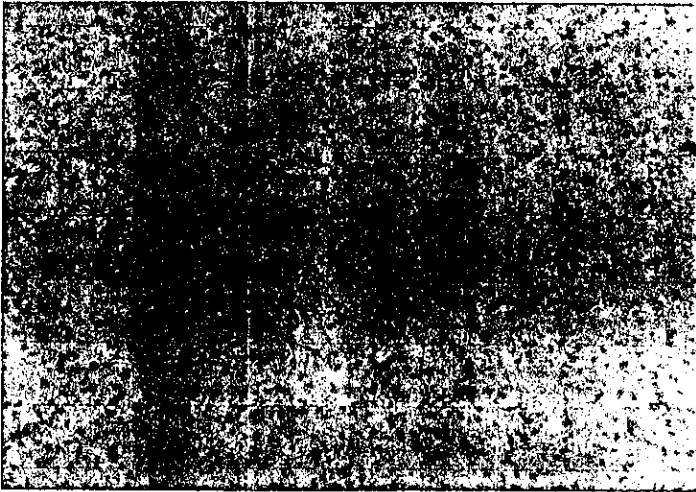


Figura 15
Fotografía de la cepa IMP-BS-4 a las 24 hrs de haber iniciado la prueba de actividad biodesulfuradora.

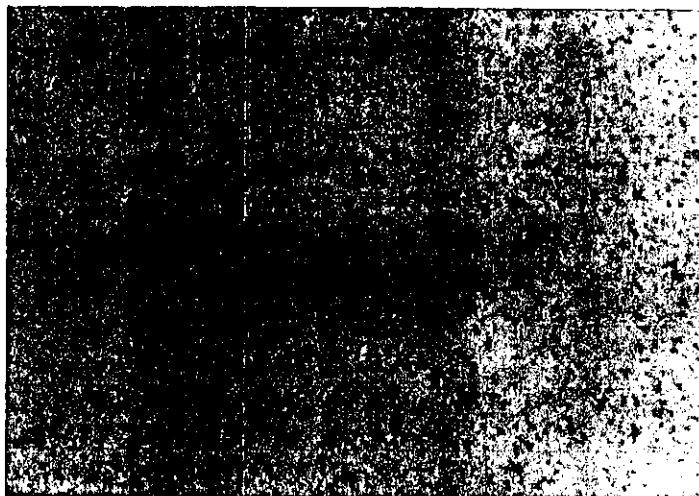


Figura 16
Fotografía de la cepa IMP-BS-4 a los 5 días de haber iniciado la prueba de actividad biodesulfuradora.

En las fotografías se muestra que no existe ningún cambio aparente en cuanto a la disgregación de la bacteria, ni existe formación de cúmulos alrededor de los cristales de DBT.

En cuanto a la conservación de ambas cepas como se explicó en el capítulo de materiales y métodos, las dos técnicas empleadas: tubos inclinados con DBT y congelación en glicerol, permitieron contar con las cepas activas durante todo el desarrollo de este trabajo. De hecho hasta la fecha permanecen en conservación para su uso posterior en otros proyectos. Es importante hacer notar que en el caso de los tubos inclinados, se reactivó en el medio B la cepa una vez por mes y para las cepas en congelación se reactivaban en el mismo medio al menos una vez cada tres meses, y en todos los casos se confirmó la actividad de las mismas.

V.5 Pruebas con extractos celulares.

Para determinar la actividad metabólica de extractos celulares, se realizaron dos tipos de pruebas diferentes, inhibición con azida de sodio y lisado celular.

Para la prueba de inhibición se preparó un inóculo concentrado de biomasa activa de la cepa IMP-BS-23, empleando tiantreno como fuente de azufre, en vez de DBT. Esto con el objetivo de que en la cuantificación de DBT aparecieran residuos de la preparación del inóculo,. Después de lavar el inoculo se alcanzó una concentración de $1.85 \mu A_{550nm}$. Se trabajaron tres lotes cada uno por triplicado: biomasa activa completa, biomasa esterilizada por autoclave (15min. $150^{\circ}C$ y 15 psig) y finalmente biomasa con azida de sodio, cada una con 100 microgramos de DBT en acetonitrilo. Las muestras se pusieron en agitación durante 5 días. Se evaluó el DBT residual mediante CG-FID. Los resultados se muestran en la figura 16.

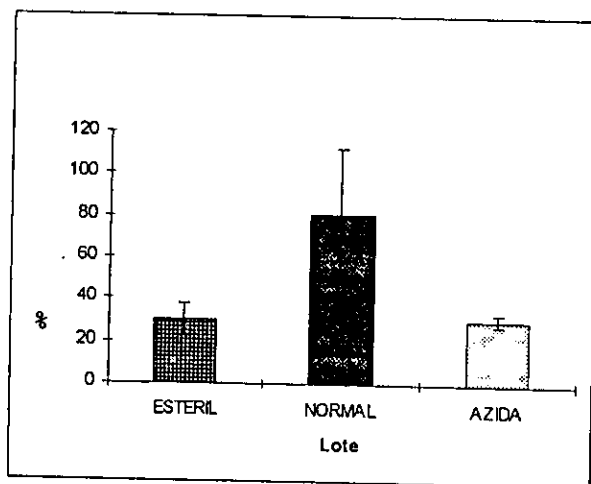


Figura16

Resultados de la prueba de extractos celulares de la cepa IMP-BS-23 con adición de azida.

Cabe mencionar que se empleó como blanco una muestra estéril se puede considerar. Se observa en la gráfica la adición de azida inhibió la actividad de remoción de DBT, lo cual podría deberse a que al inhibir la respiración se inhibe la producción de cofactores de la cadena respiratoria, que según se reporta en la literatura (48-50), se requieren para llevar a cabo la vía metabólica "4S" de biodesulfuración.

En cuanto a la prueba de células lisadas, este proceso se realizó con cristal molido y agitación de la biomasa durante 15 min. Para seguir el control de la cantidad de células lisada se inoculó varias veces el lisado en cajas petri, en las que no hubo crecimiento por lo que se consideró que el proceso de lisado era eficiente.

Los resultados de la prueba fueron los siguientes:

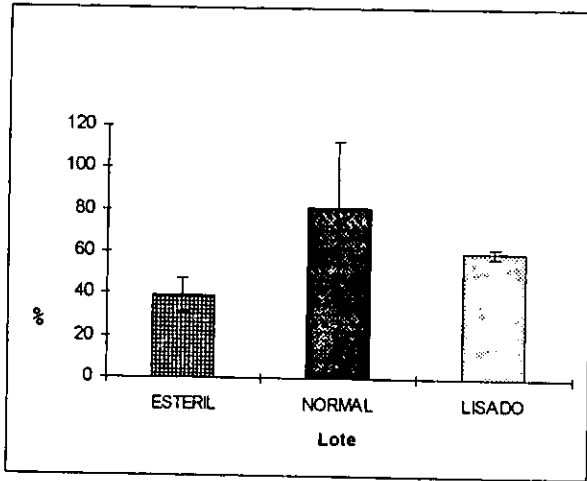


Figura17

Resultados de la prueba de extractos celulares de la cepa IMP-BS-23 lisados.

En la gráfica se observa que el lisado celular biodegrada 60% del DBT, la cepa íntegra biodegrada alrededor de 80% de DBT, estos resultados muestran que la actividad biodesulfuradora no se perdió al romper la membrana celular a través de la lisis.

V DISCUSIÓN DE RESULTADOS

V.1 Aislamiento de microorganismos biodesulfuradores.

Durante el aislamiento que se realizó en este trabajo se obtuvieron 21 cepas de bacterias y hongos los cuales fueron capaces de subsistir en un medio de sales basales minerales con glicerol como única fuente de carbono y dibenzotiofeno como única fuente de azufre. Aunque no se realizó la evaluación de la actividad de todas, es importante hacer notar que muy probablemente estaban metabolizando el azufre que requieren para su crecimiento. De hecho algunas de ellas cambiaron la apariencia del medio de cultivo, en cuanto a la coloración o a la desaparición de los cristales de DBT.

Los aislamientos obtenidos definitivamente pueden servir como un banco tanto de bacterias y hongos potencialmente biodesulfuradoras e incluso como un banco de enzimas y/o material genético que sea capaz de biotransformar hidrocarburos azufrados. Otro aspecto importante es que no se emplearon otras condiciones como anaerobiosis, o aislamientos de consorcios microbianos a partir de los cuales, se lograría probablemente obtener microorganismos capaces de realizar biotransformaciones a moléculas hidrocarbonadas, únicamente se trabajó en condiciones similares a las que se ha trabajado durante muchos años con el *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, en cuanto a los medios de cultivo, las concentraciones de DBT y la evaluación de la actividad, ya que esta bacteria ha sido ampliamente caracterizada por grupos de investigación como Energy Biosystems Co. (39-45).

Desde el punto de vista metodológico el aislamiento en condiciones de stress debido al medio de cultivo pobre, resultó eficiente ya que fueron eliminadas desde el momento del muestreo un sin número de microorganismos que podrían haber sido contaminantes y que no permitirían aislar los microorganismos deseados.

Los cultivos obtenidos presentaban características similares. Por ejemplo los hongos tenían aspecto de ser el mismo y en el caso de las bacterias se podría decir que había tres diferentes, una cambiaba en medio de cultivo de color beige a color anaranjado, otra completamente beige y una tercera que en medio sólido tenía color azulado.

En cuanto a los enriquecimientos se lograron muy buenos resultados ya que se obtuvieron al final cuatro cepas puras que eran capaces de eliminar el DBT del medio de cultivo entre un 4 y 10 % w/v. De ellas dos eran hongos y dos bacterias. Las cepas aisladas en este trabajo tienen menor capacidad de eliminación de DBT, comparado con otras cepas reportadas en la literatura (62). Sin embargo en la literatura no menciona la concentración inicial del DBT, simplemente reportan la actividad y para el caso del *Rhodococcus rhodochrous*

IGTS8, no se reporta la actividad que tenía antes de ser mutado, reportan 80% de eliminación de DBT después de la mutación que se realizó expresamente para aumentar la actividad (40). Por todo lo anterior, se podría considerar que las cepas obtenidas tienen un potencial de actividad importante.

VI.2 Actividad biodesulfuradora.

El primer problema que fue la validación de la metodología analíticas para poder cuantificar la remoción de DBT. Como se dijo con anterioridad el DBT estaba en forma de cristales insolubles en el medio de cultivo que era una solución acuosa, para lo cual se probaron los métodos de extracción con solventes que tuviesen gran afinidad por DBT, resultando más eficiente el método directo, en el cual se determinó un error del 3.6%. Sin embargo este error no fue constante ya que en cada prueba realizada se determinó el error de extracción alcanzando en algunos casos hasta $20 \pm 5\%$, lo cual se podría deberse a errores metodológicos, como por ejemplo que el DBT quede adherido en la superficie de los matraces, en las jeringas para inyectar el cromatógrafo y en cada uno de los pasos de la prueba puede haberse perdido DBT.

En cuanto a la valoración del método seleccionado en el cromatógrafo para el análisis de diferentes concentraciones de DBT, esta muestra según se observó en la figura 4, una respuesta lineal en el rango deseado para el análisis de DBT remanente. Cabe mencionar que el método cromatográfico fue diseñado para esta determinación en especial, y que algunas veces para casos especiales de búsqueda de metabolitos se alteraba cambiando las rampas de temperatura, para poder determinar con mejor precisión los compuestos deseados.

En la prueba realizada para determinar la actividad biodesulfuradora de los seis aislamientos obtenidos, según se muestra en la tabla 11, se observa que la mayor remoción de DBT se logra a los 30 días de incubación, sin embargo es considerable a los 8 días. En ambos casos se puede observar que los aislamientos que tienen mayor actividad son el 4, 12 y 23, de ellos el denominado 12 es el único que es hongo los otros dos son bacterias. En el caso de hongo la eliminación de DBT es mayor, sin embargo como se mencionó con anterioridad, si se realizaban mayor número de extracciones del DBT el porcentaje de eliminación de DBT disminuía, esto probablemente a un fenómeno de adsorción, que podría resultar importante para otro tipo de trabajo en el área de biodesulfuración que de hecho se han planteado por otros grupos de investigación, donde lo que se busca es absorber la molécula de DBT, más que biotransformarla (61). Para los objetivos de este trabajo donde se busca la biotransformación del DBT se seleccionaron las dos bacterias, y a ambas se les determinó la velocidad de

remoción en diferentes concentraciones de DBT así como los metabolitos obtenidos durante la remoción de DBT.

Los resultados obtenidos en esas pruebas mostraron varios hechos interesantes, en la tabla 12 se observa que para las diferentes concentraciones de DBT, la velocidad de remoción no cambia y si se calculan los mg de DBT biotransformados en cada caso estos son:

Tabla 19
Cantidad de DBT eliminado por la cepa IMP-BS-4 a los ocho días de incubación.

mg DBT iniciales	mg de DBT eliminado
12	7.9
25	7.45
50	7.4

En los tres casos se observa que los mg de DBT eliminados son prácticamente iguales. Esto podría hacernos suponer que la actividad de esta cepa es únicamente sobre el dibenzotiofeno soluble, es decir depende de la saturación de DBT en el medio acuoso. Es un hecho que el DBT estaba en su mayor parte en forma de cristales tanto antes como después de la actividad de microorganismos y que no se observó ningún cambio en la apariencia de medio de cultivo, a excepción de aumento de la turbidez. La concentración de saturación de DBT en agua es de $5\mu\text{M}$ (55), lo cual correspondería a 0.92 mg/l, considerando el volumen empleado para las pruebas con la cepa IMP-BS-4 la concentración de DBT removido es de 140 mg/l, la cual esta por arriba del grado de saturación del DBT. Aunque no se observe ningún mecanismo en el cual dicha bacteria facilite el contacto con el DBT insoluble, se podría producir algún tensoactivo que lo permita. Este tipo de mecanismos se presenta en la mayoría de las bacterias que tienen acción sobre sustratos insolubles en medio acuoso, en especial aquellas que biotransforman hidrocarburos (1), por lo que sería de suponer que la cepa IMP-BS-4 lo presentara.

En la figura 15 y 16 se presentan las fotografías en el microscopio de la cepa IMP-BS-4 a través de la prueba de actividad. Donde se observa que no existe ningún cambio aparente en cuanto a la disgregación de la bacteria, ni que forme cúmulos alrededor de cristales de DBT.

Para el caso de la cepa IMP-BS-23, los resultados mostrados en la tabla 13, nos permiten observar que la velocidad de remoción aumenta según aumenta la concentración del DBT y si se calculan los mg de DBT eliminados los resultados son:

Tabla 20
Cantidad de DBT eliminado por la cepa IMP-BS-23 a los ocho días de incubación.

mg DBT iniciales	mg de DBT eliminado
12	0.71
25	6.02
50	17.01

En este caso la actividad de la bacteria es mayor para la concentración mayor, por lo que podríamos suponer que la actividad no depende de la solubilidad del DBT en el medio sino que la bacteria actúa sobre el sustrato independientemente de que este sea soluble o no. Durante estas pruebas además de determinar las concentraciones de DBT, se hicieron observaciones en el microscopio, para la cepa 23 las fotografías de la cepa a través del proceso se mostraron en el capítulo anterior (Figuras 12,13 y 14) y se observa que dicha bacteria sigue un comportamiento muy similar al del *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (63,64). Conforme se manifiesta la actividad biodesulfuradora se va agrupando, e incluso se podría decir que forma un tensoactivo para tener mayor contacto con el sustrato DBT, en el caso de la cepa IMP-BS-23, lo que se observa en la fotografía es que según ocurre el proceso, se va agrupando e incluso se ven cúmulos alrededor de los cristales de DBT, lo que se observa claramente en la Figura 15. Entre mayor sea la concentración de DBT mayor será la velocidad de remoción del mismo al existir mayor superficie de contacto sobre la que puede actuar el microorganismo.

En cuanto a los metabolitos que se obtuvieron para la cepa IMP-BS-4, la sulfona y sulfoxido del DBT, estos son productos de una oxidación parcial del sustrato, que siguen parte de la vía metabólica de biodesulfuración "4S". Igualmente se podría suponer que esta bacteria cuenta con las dos enzimas iniciales de la vía metabólica, que serían DBTmonooxidasa, y DBTmonoxigenasa (45-47). Estas suposiciones tendrían que ser confirmadas buscando las enzimas o los genes que codifican las mismas, y probablemente las condiciones no fueron los indicados para que realizara la oxidación completa, ya que se conoce que este último paso de la vía metabólica es el limitante de la misma (65).

El metabolito que se identificó después de la acción de la cepa IMP-BS-23, fue el 2-hidroxibifilo, que es igualmente el producto de la vía metabólica de biodesulfuración "4S". Desafortunadamente no se cuantificó, para poder determinar el valor de rendimiento de la acción de la cepa expresado como obtención del producto en mg/ml. Aunque se hicieron varios intentos para identificar el producto azufrado, que se esperaba fuesen el sulfato y sulfito, no se logró detectar. Para ello se probaron desde técnicas de volumetría hasta

cromatografía de iones en la fase acuosa del medio de cultivo. Una posible razón es que el sulfato permanece dentro de la célula, de hecho existen reportes en la literatura donde menciona que no se detecta en el medio y aparente para el caso del *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 (65, 66) podría ser reutilizado por la célula.

Según la caracterización por perfil de fosfolípidos de la membrana la cepa 23 se podría tratar de *Nocardia asteroides* GC subgrupo A, con la cual presenta una semejanza en el perfil del 0.707, o podría ser una *Aureobacterium estercariosum* con una semejanza en el perfil de 0.832. Para el caso de la *Nocardia*, pertenece a la misma familia del *Rhodococcus*, lo cual se explica la gran semejanza que tienen ambas, tanto en la formación de cúmulos, como en los productos metabólicos que se obtienen para ambas

VI.3 Pruebas cinéticas de la Cepa IMP-BS-23.

De las tres pruebas cinéticas que se realizaron el análisis de resultados muestra puntos interesantes. Para la cinética realizada con 0.6 mg en la tabla 16 se observa que el total del DBT se consumió al tercer día de la prueba sin embargo después de añadir la misma cantidad de DBT, la velocidad de remoción disminuye y la cantidad de biomasa expresada como mg/proteína tampoco aumenta, sin embargo permanece la actividad de remoción del DBT.

En el caso de la prueba con 6 mg, después del tercer día de la prueba, la velocidad de remoción sigue aumentando, aunque la proteína no presenta grandes cambios.

Finalmente para la cinética con 1.2 mg las velocidades de remoción disminuyen notablemente después del tercer día de la prueba y la proteína a partir de ese momento se conserva casi igual.

El fenómeno de los cambios en las velocidades así como de la biomasa (proteína) se observan más claramente en la prueba con 1.2 mg, y de ella podemos decir que aparentemente se alcanza una velocidad volumétrica máxima de 27.6 mg DBT//día, a los 1.5 días de la prueba, sin embargo la biomasa sigue aumentando hasta el tercer día de la prueba donde se alcanza un máximo de 1.4mg/ml de proteína. Si comparamos el comportamiento de esta cepa con el del *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 reportado (61), sigue el mismo patrón de presentar mayor actividad al término de la fase exponencial de crecimiento de la cepa.

VI.4 Pruebas con extractos celulares.

Estas pruebas se realizaron para contar con algunos resultados presuntivos de actividad en diferentes circunstancias de esta cepa, así como de

su complejo enzimático. Las pruebas con azida Sugieren que esta cepa requiere de cofactores involucrados en la cadena respiratoria tales como FMN (flavin mononucleótido), ya que al inhibir la cadena respiratoria se pierde la actividad, este resultados se esperaba, ya que al realizarse la biodesulfuración aparentemente siguiendo la vía metabólica "4S" se conoce por la literatura que requiere de cofactores (31, 40, 47, 50, 66)

En los casos de la actividad del lisado celular, se conservó la actividad aún lo cual se ha reportado con anterioridad (66), que puede suceder e incluso se conoce que se conserva aún en el fraccionamiento del extracto lisado, en la fase soluble.

VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Partiendo de la hipótesis que cepas aisladas de una Refinería mexicana, deben estar mejor adaptadas a los altos contenidos de azufre del petróleo nacional, se esperaba que el desarrollo de un biocatalizador partiendo de ellas permita un proceso de Biodesulfuración más efectivo que si se emplearan cepas obtenidas en otros países donde el contenido de azufre del petróleo es menor. Se procedió al aislamiento de ellas logrando obtener dos cepas IMP-BS-4 e IMP-BS-23, que biotransforman dibenzotiofeno.

Se identificaron los metabolitos de cada una de las cepas siendo la sulfona y el sulfóxido de DBT en el caso de la cepa IMP-BS-4 y el 2-hidroxibifenilo para la IMP-BS-23, por lo que se puede proponer que ambas siguen la vía de biodesulfuración "4S", reportada como la más ventajosa para la BDS de hidrocarburos.

En cuanto a la actividad encontrada para la cepa IMP-BS-23 la cual fue más profundamente estudiada, se encuentra dentro de las actividades reportadas para otras cepas.

Los extractos celulares obtenidos de la cepa IMP-BS-23 tienen actividad biodesulfuradora.

Por lo que se puede considerar una contribución importante en para el desarrollo de un biocatalizador mexicano, ya que el contar con cepas permitiría iniciar los trabajos de desarrollo de un biocatalizador, lo cual le daría a la industria petrolera nacional una oportunidad para establecer procesos alternos para el cumplimiento de la normatividad ambiental en cuanto a niveles de azufre en hidrocarburos.

Las recomendaciones que se pueden hacer para trabajos futuros serían:

- Tratar de identificar las enzimas biodesulfuradoras y los genes que las codifican de los microorganismos aislados para poder obtener sondas de material genético para mejorar el método de aislamiento de microorganismos, lo cual podría ofrecer el aislamiento de consorcios microbianos que presentaran una actividad biodesulfuradora importante, así como la detección de microorganismos que no son aislables en las condiciones empleadas en este trabajo.
- Emplear técnicas de mejoramiento genético para incrementar la actividad de las cepas obtenidas en este trabajo.
- Es importante que las cepas obtenidas sean patentadas a la brevedad posible, ya que en el ámbito internacional el valor de este tipo de cepas y sus genes biodesulfuradores es cada vez mayor y es importante proteger los derechos de las cepas nacionales.

- Los métodos analíticos y parámetros que determinan la actividad biodesulfuradora empleados en este trabajo fueron específicamente desarrollados en trabajos anteriores del grupo de bioprocesos del IMP por lo que sería importante su homologación y validación internacional, ya que podría decirse que cada trabajo reportado emplea diferentes técnicas analíticas y diferentes parámetros para determinar la actividad biodesulfuradora.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Ronald, Atlas. Ed. "*Petroleum Microbiology*" MacMillan Publishing Co. USA. (1984)
- 2.- Godish T. "*Air Quality*" Ed Lewis E.V. (1991).
- 3.- Caselli, M. "La contaminación atmosférica:sus causas y efectos" Siglo XXI, México (1992)
- 4.-Nebel B. and Wright R.. "Environmental Science. Prentice Hall E.U.. (1996)
- 5.- Monticello, D.J. "Biocatalytic Desulfurization" *Hydrocarbon Processing* Feb 1994 39- 45.
- 6.- Speight, James G. "*The Chemistry and Technology of Petroleum*" 2nd Ed. Heinz Heinemann USA (1991).
7. Petróleos Mexicanos. "Memorias de labores 1996" PEMEX.
- 8.- Información proporcionada por la Gerencia de Investigación y desarrollo tecnológico, PEMEX- Refinación.
- 9.-Aguilar, M. Cid, J, Rosas, F. y Bremauntz M.P. "*Procesos de desulfuración microbiológica en petróleo crudo*" MONITEC. PEMEX-Refinación. **3** (6) 7-10 sep. 1996.
- 10.-Bogh, J. W., Reynolds J.W., " Analysis of heavy oils: methods development and applications to Cerro Negro heavy petroleum. Detailed separation analysis of sulfur compounds" *Fossil Energy, NIPPER* # 325, October 1988, US Department of Energy.
- 11.-Nishioka M., Lee M., & Castle. R.N., "Sulfur Heterocycles in Coal Derived Products: Relation Between Structure and Abundance", *Fuel*, **65**, 1986, pp. 390-396
- 12.-Slater D., Lee M., Bartley K., Kong R. & Vasellares D., "Chemical Class Separation & Characterization of Organic Compounds in Synthetic Fuels", *Analytical Chemistry*, **53**, 1981, pp. 1602-1620.
- 13.- Aguilar, M., Bremauntz, M.P. y Leiva M.A. "Enhanced ligand exchange chromatography of organir sulfur compounds in Maya oil: Isolation and analysis by

- HPGC/MS" 22nd International Symposium on Chromatography. 13-18 september 1998. Roma. Italia.
- 14.- Grossman, M.J. " Microbial removal of organic sulfur from fuels: a review of past and present approach" Exxon Research and Engineering Co. USA (1996)
 - 15.-Maliyantz.A.A.Azerbaindzhanskoe Nefyanoe Khoz **15**:89 (1935). Citado en Grossman, M.J (14)
 - 16.- Maliyantz.A.A.Azerbaindzhanskoe Nefyanoe Khoz**15**:36 (1936). Citado en Grossman,M.J. (14)
 - 17.-Klein,J. Van Afferden,M.,Pfeifer,F., y Schacht,S. "Microbial desulfurization of coal and oil". *Fuel Processing Technology*; **40**: 297-310 (1994).
 - 18.-Setti,L., Lanzarini,G., Pifferi, P.G. " Difusion as a rate controlling step in heavy-oil biodesulfurization processes" *Fuel processing Technology* ;**40**:311-317; (1994)
 - 19.-Zo Bell. " Process of removing sulfur from petroleum hydrocarbons and aparatus".U.S. Pat 2,641,564 to Texaco Developmenr Corporation (1953)
 - 20.- Kohler M. Genz I.L. Schicht and Eckart. " Microbial desulfurization of petroleum and heavy petroleum fractions. IV Anaerobic degradation of organic sulfur compounds". *Zentralbl Mikrobiol* **139**: 239 (1984).
 - 21.- Miller K.W. *Applied Environmental Microbiology* **58**: 2176 (1992).
 - 22.- Lizama H.M.Wilkens, L.A. and Scott, T.C." Dibenzothiophene sulfur can serve as the sole electron acceptor during growth by sulfate-reducing bacteria" *Biotechnology Letters* **17**:113 (1994)
 - 23.- Kim, T.S., Kim, T.S. and Kim H.Y. U.S. patent 4,954,229. Korea Advanced Institutwe of Science and Technology (1990).
 24. Finnerty.W.R. "Organic sulfur biodesulfurization in nonaqueous media". *Fuel* **72**:1631 (1993)
 - 25.-Kirshenbaum, I., U.S.Patent 2,975,103 to Exxon Research and Engineering Company (1961)
 - 26.-Kargi, F.,and Robinson, J.M. " Microbial oxidation of dibenzothiophene by the thermophilic organism *Sulfobus acidocaldarius*"., *Biotechnology and Bioengineering* **26**:6877 (1984)

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- 27.- Kargi, F., and Robinson, J.M., " Removal of organic sulfur from bituminous coal" *Fuel*, **65**:397 (1986).
28. Strawinski US Patent 2,521,761 to Texaco Development Corp (1950).
- 29.- Strawinski US Patent 2,574,070 to Texaco Development Corporation (1951)
- 30.-Kodama, K., Nakatani, S., Umehara, K., Shimizu, K., Minoda, Y., and Yamada, K.. "Microbial conversion of petrosulfur compounds: Isolation and identification of products from Dibenzothiophene " *Agriculture Biology and Chemistry* **34**:1320 (1970)
- 31.-Kodama, K., Umehara, K., Shimizu, K., Minoda, Y., and Yamada, K.. "Identification of microbial products from DBT and its propose oxidation pathway " *Agriculture Biology and Chemistry* **37**:45 (1973)
- 32.-Monticello, D.J., Bakker, D., and Finnerty, W., R. " Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* species". *Applied Environmental Microbiology* **49**:756 (1985)
- 33.- Monticello, D.J., and Finnerty, W., R., "Microbial desulfurization of fossil fuels". *Annual Rev. Microbiology* **39**:371, (1985).
- 34.-Malik, K. A., and Claus, D., in *Abstracts of the Fifth Int Ferment. Symp. Berlin* 1976. pp 421.
- 35.-Malik, K.A., "Microbial removal of organic sulfur from crude oil and environment: some new perspectives". *Process Biochemistry* **13**(9):10 (1978).
- 36.-Yen, K.M., and Gunsulus, I.C., *Proc. Natl. Acad. Sci.* **79**:874 (1982).
- 37.-Ibister, J.D., and Kobylinski, E.A. in *Coal science and technology series No. 9* (Y.A. Attia ed), Elsevier, Amsterdam, 1985, p.627-641.
- 38.- Campbell. " An Orphaned child makes good-The story of USDOE/PETC's Foray into fossil fuel Biodesulfurization". *American Chemical Society. Division of Petroleum Chemistry*. **38**: 175 (1993).
39. Kilbane J.J2. and Bielaga B.A. "Toward sulfur-free fuels". *CHEMTEC* **20**:747 (1990).
40. Kilbane J. "Mutant microorganism useful for cleavage of organic C-S bonds" USP 5,002,888, Marzo 1991.

- 41.- Kilbane, J. "Bacterial produced extracts and enzymes for cleavage of organic C-S bonds" Europ. Pat. No. 445,896, A2; (1991)
- 42.-Monticello D.J. " Biological desulfurization (BDS) of middle distillates" NPRA Annual Meeting March 21-23 (1993)
- 43.-Kilbane, J. " BDS of water soluble coal derived material by *Rhodococcus rhodochrous_IGTS8*" *Biotec. & Bioeng.* **40**(9) 1107-1114 (1992).
- 44.-Monticello, D.J., "The Molecular Biology of Microbial Desulfurization" Symposium on Bioprocessing in the Petroleum Industry 212th National Meeting, American Chemical Soc. August (1996).
- 45.-Kilbane J.J. " Desulfurization of coal: the microbial solution " *TEBTECH* **7**: 97-100 (1989).
- 46.-Monticello D.J. " Biocatalytic desulfurization of petroleum and medium distillates" Energy Biosystems Corporation (EBC), octubre 1992.
- 47.-Kilbane, J. " Enzyme from *Rhodococcus rhodochrous*_ATCC No 53968 *Bacillus sphaericus* ATCC No. 53969 and mixtures there of cleavage of organic C-S bonds of carbonaceous" US Patent 5,132,219 (1992).
- 48.-Denome,S.A.,Oldfield E.S. and Young, K.D. " Characterization of the desulfurization genes from *Rhodococcus* sp. Strain IGTS8. *J. Bacteriology* **176**: 6707-6717 (1994).
- 49.-Denis-Larose,C., Labbé D., Bergeron, H., Jones, A., Greer C., Al-Hawari, J., Grossman m., Sanke, B. And Lau,P. Coservation of plasmid-encoded dibenzothiophene desulfurization genes in several *Rhodococci*. *Applied and Environmental Microbiology* **63**(7)1919-2915 (1997).
- 50.-Gallagher J.R., Olson F.S. and Stanley D.C. " Microbial desulfurization of dibenzothiophene: a sulfur specific pathway" *FEMS Microbiology Letter* **107**:31-35 (1993).
51. Li. M., Squires C., Monticello D. And Childs.A. " Genetic analysis of the *dsz* promotor and associated regulatory regions of *Rhodococcus erythropolis_IGTS8*. *Journal of Bacteriology* **178**[22]: 6409-6418 (1996).
- 52.- Jonathan S. Dordick " Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents" *Enzyme Microbiology Thecnology* **11** (1989).
- 53.-Vazquez-Duhalt, R., Fedorak P.M. Westlake, D., " Chemical modification of the protein molecules improve their activity in organic solvents" en *Stability and*

- stabilization of enzymes" *Proceeding of International Symposium, Netherlands*, 22-25 November 1992
- 54.- Torres, E., Tinoco, R., Vazquez-Duhalt, R., " Biocatalytic oxidation of Polycyclic aromatic hydrocarbons in media containing organic Solvent". *Water Science technology* **36** (10), 37-44 (1997)
- 55.- Doerge,D.,R., Cooray,N.M., Brewster,M.E. *Biochemistry*. **30**, 8960, (1991).
- 56.-Scheiner, R.P., Stevens, S.E.,Tien, M.*Applied Environmental Microbiology*, **54**, 1858, (1988).
57. -Vazquez-Duhalt R., Westlake, D., Fedorak, P. " Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfide".*Enzyme Microbiology Technology*, **15**, 494-499, (1993)
- 58.- Ortiz-Leon, M., Velasco, L., Vazquez-Duhalt, R. "Biocatalytic oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Haemoglobin and Hydrogen Peroxide". *Biochemical and Biophysical research communication*. **215** (3), 968-971 (1995).
- 59.- Marcela Ayala, Raunel Tinoco, Veronica Hernández, Pilar Bremauntz y Rafael Vázquez-Duhalt. " Biocatalytic oxidation of fuel as an alternative to biodesulfurization" *Fuel Processing Technology* **57**:101-111 (1998).
- 60.- Olson, E.D., Stanley, D.C., Gallanger, J.R.. " Characterization of intermediates in microbial desulfurization of dibenzothiophene" *Energy and Fuels* **7**, 159-164 (1993).
- 64.- Aguilar,M., Cid, J., Flores, A., Zaragoza, D. Y Bremauntz , M.P: " "Estudio para el desarrollo de un biocatalizador para disminuir el contenido de azufre en hidrocarburos" Informe técnico para PEMEX,DOC-7338, (1997)
- 62.-Scopes,K.,Robert."Protein Purification, Principles and Practices. Ed.Springer-Velag (1994). Pp32,33
- 63.,McFarland,B., Boron,D.,J., Deever,W.,Meyer, J.,A., Johnson A.,R., and Atlas, R.." Biocatalytic sulfur removal from fuels: Applicability for reducing low sulfur gasoline".*Critical Reviews in Microbiology*, **24**(2): 99-147(1998)
- 64.-Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Buchanana and Gibbons ED. 8th Edición. Pp 322 (1974)
- 65.- Flores Escamilla Araceli."Estudio de la bacteria *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 para el proceso de biodesulfuración de dibenzotiofeno aplicado a diesel primario" Tesis de licenciatura, UNAM (1998).

66.-Gray, K.A., Pogrebinsky,O.S., Mrachko,G.T., Xi,L.,Monticello,D.J., and Squires, C.H., "Molecular Mechanisms of Biocatalytic Desulfurization of Fossil Fuel", *Nature Biotechnology*, **14** 1705, (1996)

67.-Mormile, M.R.,and Atlas,R.M.."Mineralization of dibenzothophene biodegradation products 3-hydroxy-2-formyl Benzothiophene and benzothiophene sulfone". *Applied environmental Microbiology* .**54**, 1383,(1988)

68.- Aguilar,M., Cid, J., Flores, A., Zaragoza, D. Y Bremauntz , M.P: Desarrollo del proceso de síntesis de un biocatalizador de desulfuración de diesel" Informe técnico para PEMEX,DOC-7104, (1998)