

## Evaluación de la actividad desulfurizadora de aislados nativos de *Pseudomonas* spp. en presencia de hidrocarburo

### Desulfurization activity evaluation of native strains of *Pseudomonas* spp. in the presence of hydrocarbon

Carlos Javier Alméciga-Díaz<sup>\*</sup>, Óscar Fernando Sánchez Medina<sup>\*\*</sup>,  
Edelberto Silva Gómez<sup>\*\*\*</sup>

#### RESUMEN

El principal inconveniente en la combustión de los hidrocarburos es la conversión del azufre y el nitrógeno a sus respectivos óxidos, los cuales participan en la formación de lluvia ácida y deterioran el medio ambiente e infraestructuras. La remoción de azufre a partir de compuestos órgano-azufrados mediante el uso de microorganismos ha surgido como una alternativa frente al proceso catalítico de hidrodesulfurización (HDS). En el presente trabajo se evaluó la actividad desulfurizadora de veintitrés aislados nativos de *Pseudomonas* spp. sobre dibenzotiofeno (DBT), usando un sistema de fermentación con igual proporción de fase acuosa y orgánica (n-hexano) en presencia de oleato de etanolamina. Los aislados 02, 05 y 06 conservaron su viabilidad en este medio y presentaron una remoción de azufre entre 6,0 y 9,4%, generando los metabolitos DBT-sulfona, DBT-sulfóxido, 2-hidroxibifenilo (2-HBP) y sulfato presentes en la ruta metabólica 4S. Con estos aislados se evaluó la actividad desulfurizadora sobre keroseno y se observó una remoción de azufre entre 19,9 y 62,6% y una disminución del poder calorífico entre 0,45 y 5,55%.

**Palabras clave:** dibenzotiofeno, desulfurización, *Pseudomonas* spp., keroseno.

#### ABSTRACT

The main difficulty with fossil fuel combustion lies in sulphur and nitrogen becoming converted to their respective oxides, forming part of the acid rain which deteriorates the environment and infrastructure. Removing sulphur from organo-sulfur compounds by using micro-organisms has become an alternative to hydrodesulphurisation (HDS). Twenty-three *Pseudomonas* spp. native strains' desulphurisation activity on dibenzothiophene (DBT) was evaluated by using a fermentation system having equal proportions of aqueous and organic (n-hexane) phases in the presence of ethanolamine oleate. The 02, 05 and 06 strains maintained their viability in this medium, presenting 6,0% to 9,4% sulphur removal, producing DBT-sulphone, DBT-sulphoxide, 2-hydroxybiphenyl (2-HBP) metabolites and sulphate belonging to the 4S pathway. These native strains' desulphurisation activity was evaluated on kerosene, presenting 19,9% to 62,2% sulphur removal having 0,45% to 5,55% calorific power loss.

**Key words:** dibenzothiophene, desulphurisation, *Pseudomonas* spp. kerosene.

\* Químico farmacéutico, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

\*\* Ingeniero químico, químico farmacéutico, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

\*\*\* Químico farmacéutico, Msc., Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia.

Dirección Postal: Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Farmacia, A..A. 14490. Correspondencia a: esilvag@unal.edu.co

**Recibido:** agosto 23 de 2004 **Aceptado:** mayo 17 de 2005

## INTRODUCCIÓN

El principal inconveniente en la combustión de los hidrocarburos es la conversión del azufre y el nitrógeno a sus respectivos óxidos, que participan en la formación de la lluvia ácida, que produce graves daños en el medio ambiente e infraestructuras (Monticello y Finnerty, 1996; Izumi *et al.*, 1994; Oshiro *et al.*, 1995; Sagardia *et al.*, 1975). Adicionalmente, las emisiones de SO<sub>2</sub> son precursoras en la formación de aerosoles sulfatados, considerados como uno de los principales agentes particulados que afectan la salud (Sagardia *et al.*, 1975).

El contenido de azufre en el petróleo varía entre 0,025 y 5% de acuerdo con la ubicación geográfica del pozo; en Colombia este nivel se encuentra entre 0,55% (Caño Limón) y 1.5% (Barrancabermeja) (Ecopetrol, 2002). Este azufre se puede encontrar en forma elemental, inorgánica como sulfato, sulfito, tiosulfato o en más de 200 compuestos órgano-azufrados como tioles, tiofenos, mercaptanos, sulfidas tianocíclicas y ciclinas, tiaindanos, bifenildisulfidas, benzotiofeno y dibenzotiofeno sustituidos (Monticello y Finnerty, 1996; Ecopetrol, 2002; Fedorak y Westlake 1983; Fedorak y Grbic-Galic, 1991; Lee *et al.*, 1995; Monticello *et al.*, 1985).

El impacto ambiental ocasionado por la combustión de productos azufrados ha motivado el incremento en la rigurosidad de las regulaciones mundiales sobre el contenido de azufre en los combustibles. La legislación sobre emisiones de azufre en Colombia se inició con el decreto 948 de junio de Salazar, T. 1996. Aislamiento de *Pseudomonas* nativas degradadoras de dibenzotiofeno. Trabajo de grado en Bacteriología, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca. 1995, el cual estableció al dióxido de azufre como uno de los contaminantes aéreos de primer grado; este decreto fue fortalecido con la resolución 898 de agosto de 1995 en su capítulo I (artículos 1 y 4), en la cual se estipularon las normas de calidad para los combustibles líquidos y sólidos utilizados en hornos, calderas y motores de combustión interna empleados en el territorio nacional (DAMA, 2002). Los decretos 2107 de noviembre de 1995 (artículo 25), 1224 de julio de 1996 y 1697 de junio de 1997 (artículo 40) incluyen restricciones sobre la presencia del azufre y otros contaminantes en la gasolina (DAMA, 2002).

La degradación microbiológica de los compuestos azufrados presentes en los combustibles fósiles ha surgido como una alternativa frente al proceso químico de HDS en que se lleva una mezcla de combustible y de aire rico en hidrógeno a temperaturas entre 533 K y 723 K, generando condiciones de alto riesgo industrial; adicionalmente los niveles de azufre remanentes están entre 300 y 500 ppm, por encima de las especificaciones que pretenden alcanzar los organismos internacionales (McFarland, 1998) y nacionales (DAMA, 2002). Por otro lado, el uso de microorganismos con actividad desulfuradora presenta como ventaja la alta especificidad por el sustrato al remover en la mayoría de los casos selectivamente el azufre de las moléculas, sin pérdida del poder calorífico del combustible y bajo condiciones de proceso moderadas, alcanzando niveles de azufre remanentes inferiores a los logrados con la HDS; sin embargo, uno de los principales problemas es la elevada sensibilidad de muchos de estos microorganismos frente a solventes orgánicos (Monticello, 2000). En la actualidad existen cerca de 50 patentes aprobadas para procesos de biodesulfurización sobre combustibles fósiles derivados del petróleo y el carbón, en los que se emplean microorganismos (bacterias u hongos, silvestres o recombinantes), enzimas y vectores que contienen genes pertenecientes a rutas metabólicas desulfuradoras (United States Patent and Trademark home page, 2004).

La alta proporción de tiofenos en el crudo ha permitido seleccionarlos como modelos para el estudio de la actividad desulfuradora de microorganismos; el DBT es el compuesto más utilizado debido a que es uno de los primeros en producirse durante el craqueo catalítico y más difíciles de remover mediante HDS (Monticello, 2000; Le Borgne y Quintero, 2003). De acuerdo con el microorganismo empleado se han encontrado tres rutas metabólicas para el proceso de desulfurización: a) la ruta 4S que remueve selectivamente el azufre de los compuestos sin alterar significativamente el poder calorífico del combustible (figura 1a); b) la ruta de Kodoma donde se obtienen derivados hidrosolubles con la disminución del poder calorífico (figura 1b), y c) una ruta completamente destructiva donde se produce CO<sub>2</sub>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup> y H<sub>2</sub>O. (Oshiro *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1995; Armstrongs *et al.*, 1995; Kodama *et al.*, 1970; Kodama *et al.*, 1973; Konishi *et al.*, 1986; Laborde y Gibson, 1977; Omori *et al.*, 1992).

Se han reportado reacciones oxidativas sobre el DBT por cepas de *Pseudomonas* (Huertas *et al.*; 1998; McFarland *et al.*, 1998; Izumi *et al.*, 1994; Laborde y Gibson, 1977), *Corynebacterium* (Omori *et al.*, 1992), *Arthrobacter* (Konishi *et al.*, 1986), *Beijerinckia* (Laborde y Gibson, 1977), *Rhodococcus* (Fedorak y Westlake, 1983; Laborde y Gibson, 1977; Monticello y Finnerty, 1985), *Desulfovibrio* (Armstrong *et al.*, 1995), *Rhizobium meliloti* (Frassinetti *et al.*, 1998) y *Cunninghamella elegans* (Crawford y Gupta, 1990). De estos microorganismos se destacan las *Pseudomonas*, debido a la resistencia que presentan algunas de sus especies frente a solventes orgánicos como n-decano, n-hexano, tolueno, dimetilftalato, etc., lo que es importante debido al interés que hay en la industria de la biorremediación por microorganismos que presenten crecimiento en sistemas compuestos por una fase orgánica y una acuosa (Cruden *et al.*, 1992; Fedorak y Galic, 1991; Sagardia *et al.*, 1975).

En un estudio preliminar se evaluó el efecto de la proporción de fase orgánica y acuosa sobre la remoción de azufre a partir de DBT con la cepa de referencia ATCC 39327, y se estableció que la mayor actividad desulfurizadora se alcanzaba en un sistema con igual proporción de fases en presencia de oleato de etanolamina, alcanzando una remoción del 6,6% de azufre (Alméciga-Díaz y Sánchez, 2001). En este sistema se evaluó la actividad desulfurizadora sobre DBT de 23 aislados nativos de *Pseudomonas* spp. pertenecientes al banco de cepas del Laboratorio de Microbiología, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. Esta actividad se determinó mediante la detección y cuantificación de DBT, DBT-sulfona, DBT-sulfóxido, 2-hidroxibifenilo y sulfato. Adicionalmente se construyeron los perfiles de desulfurización para la cepa de referencia y los aislados nativos que presentaron actividad desulfurizadora; se evaluó pH, viabilidad y concentración de metabolitos. Finalmente, se determinó la actividad desulfurizadora de estos microorganismos sobre keroseno y su efecto sobre el poder calorífico de este combustible.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Microorganismos.** El cultivo mixto desulfurizador ATCC 39327, empleado como cepa de referencia, y los veintitrés aislados nativos de *Pseudomonas* spp., se mantuvieron almacenados a  $-20 \pm 1$  °C en leche descremada al 10%  $P/V$  y meso-inositol al 3%  $P/V$ . Los

aislados nativos fueron previamente obtenidos de las lagunas de tratamiento de aguas residuales de la CAR ubicadas en la cabecera rural del municipio de Subachoque (Salazar, 1996). Todos los microorganismos se caracterizaron mediante tinción de Gram, prueba de oxidasa y cultivo en los medios TSI, LIA, SIM, MacConkey y agar sangre, empleando como microorganismos de control *Pseudomonas aeruginosa* (positivo) y *Serratia marsence* (negativo) (Krieg y Hotl, 1984).

**Crecimiento de los microorganismos.** La activación del microorganismo se realizó en caldo CASO (Oxoid) al 0,3% a  $30 \pm 1$  °C por 24 horas. Posteriormente se aisló el microorganismo en agar CVN (CASO - cristal violeta – nitrofurantoina, composición por litro: 2 ml solución de cristal violeta al 5%, 3 g de CASO, 15 g de agar-agar (BBL) y 7 ml de solución de nitrofurantoina al 5% en dimetilformamida) incubando a  $30 \pm 1$  °C por 24 horas. Finalmente se inoculó una colonia en 100 mL de caldo Lauria-Bertani (LB, composición por litro: 10 g de triptona (Oxoid), 5 g de extracto de levadura (Oxoid), 0,5 g de NaCl y 1% de glicerina, medio con fuente de azufre) a  $35 \pm 1$  °C y 200 rpm hasta obtener una DO a 600 nm de  $25 \pm 1\%$  de transmitancia equivalente a una población en fase estacionaria de  $10^8$  UFC  $ml^{-1}$  (Castro, 2000).

**Sistemas de fermentación.** Las fermentaciones se realizaron en erlenmeyer de 500 mL con igual proporción de fases acuosa y orgánica (Alméciga-Díaz y Sánchez, 2001). Un mililitro del microorganismo

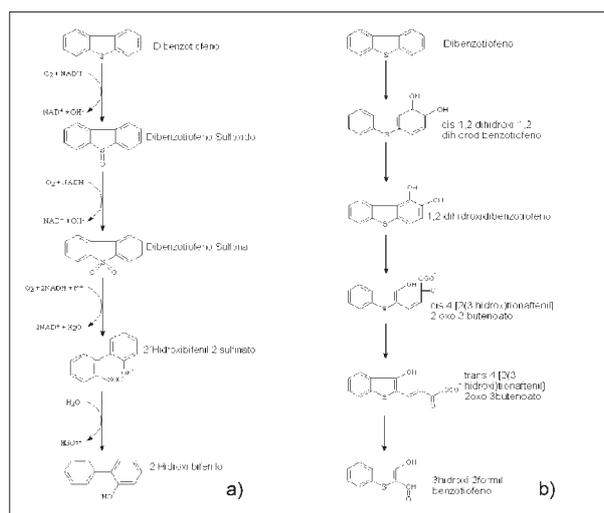


Figura 1. Rutas metabólicas de degradación del DBT: a) ruta 4S y b) ruta de Kodoma. (Adaptada de Monticello *et al.*, 2000).

( $10^8$  UFC  $\text{ml}^{-1}$ ) se inoculó en la fase acuosa constituida por medio mínimo de sales libre de azufre (Frassinetti *et al.*, 1998) y oleato de etanolamina al 5% (Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia); la fase orgánica se encontraba conformada por n-hexano (Merck grado analítico) enriquecido con 500 ppm de DBT (Acros). A esta concentración el DBT se disuelve completamente en la fase orgánica. Las fermentaciones se realizaron por triplicado y se incubaron durante 7 días a  $35 \pm 1$  °C y 200 rpm (Castro, 2000). Se montaron tres controles con la misma proporción de las fases (50:50) con presencia de oleato de etanolamina: el primer control no contaba con microorganismo, al segundo control no se adicionó DBT y el tercer control se encontraba sin DBT y sin microorganismo. La fase acuosa se esterilizó a 15 psi por 15 minutos y la fase orgánica por filtración a través de una membrana de teflón de 0,22  $\mu\text{m}$  (Millipore) bajo cabina de flujo laminar. Para las fermentaciones con combustible, se reemplazó la fase orgánica por keroseno y se incubó bajo las condiciones descritas.

**Análisis.** Las fases fueron separadas a 3000 g durante 20 minutos. Una vez separadas se tomó una alícuota de 2 mL de la fase acuosa para la cuantificación de sulfato por turbidimetría con cloruro de bario a 420 nm. El extracto seco de cada fase se obtuvo mediante evaporación al vacío (n-hexano) y liofilización (fase acuosa). Para la cuantificación de DBT, DBT-sulfona y 2-HBP (Acros) se realizaron extracciones sucesivas con acetonitrilo (Merck grado analítico) sobre los extractos secos, procedimiento estandarizado mediante la determinación del porcentaje de recuperación en muestras enriquecidas con estas sustancias (datos no mostrados). Los metabolitos fueron cuantificados por HPLC (Waters 600) empleando una columna Nova-Pak C-18 (30 cm  $\times$  3,9 mm  $\times$  5  $\mu\text{m}$ ) y un gradiente lineal de acetonitrilo-agua a un flujo de 1 mL/min; monitoreando los picos se monitorearon a 254 nm. La identificación de los picos se realizó mediante la determinación en tiempo real de los espectros a 210 y 400 nm (Crawford y Gupta, 1990), usando un detector de arreglo de diodos (DAD - Waters 996) acoplado al HPLC (Alméciga-Díaz y Sánchez, 2001). Cada muestra se analizó por triplicado.

El porcentaje de azufre removido (ecuación 3) se calculó por la relación entre los miligramos de azufre presente como sulfato al final de la fermentación en la fase acuosa (ecuación 1) y el aportado por

el DBT al inicio de la fermentación (ecuación 2). Para los cálculos no se tuvo en cuenta el azufre aportado por el DBT-sulfona y el DBT-sulfóxido, ya que se consideró como azufre no removido.

$$\text{mg S}_{\text{Removidos}} = \frac{\text{ppm SO}_4^{2-} \times \text{Vol Fase Acuosa}}{1000 \times 96 \text{ g/mol}} \times 32 \text{ g/mol} \quad (1)$$

$$\text{mg S}_{\text{Iniciales}} = \frac{\text{ppm DBT} \times \text{Vol Fase Orgánica}}{1000 \times 184,26 \text{ g/mol}} \times 32 \text{ g/mol} \quad (2)$$

$$\% \text{ S}_{\text{Removido}} = \frac{\text{mg S}_{\text{Removidos}}}{4,3416} \times 100 \quad (3)$$

donde: 32 g/mol, 96 g/mol y 184,26 g/mol corresponden a los pesos moleculares de azufre, sulfato y DBT, respectivamente y 4,3416 son los miligramos de azufre aportados por el DBT.

En las fermentaciones con keroseno la fase acuosa se analizó de la forma descrita y el keroseno se estudió cualitativamente mediante extracciones con acetonitrilo analizadas en el sistema cromatográfico mencionado anteriormente. La determinación de azufre total y poder calorífico (ecuación 4) se realizó sobre el condensado obtenido al someter el keroseno a una bomba calorimétrica adiabática (Icontec, 2003). El porcentaje de pérdida del poder calorífico se calculó empleando la ecuación 5.

Los datos obtenidos se evaluaron a través del análisis de varianza (Anova) y la prueba de Duncan mediante el software Statgraphics 4.0.

**Determinación de la viabilidad:** 100  $\mu\text{L}$  de fase acuosa fueron diluidos con 900  $\mu\text{L}$  de agua estéril, realizándose diluciones seriadas hasta obtener una equivalente a  $10^{-8}$ , de la cual se tomaron 100  $\mu\text{L}$  y se sembraron por extensión en agar CVN, para posteriormente realizar el conteo de unidades formadoras de colonias tras incubación por 12 horas a 37 °C.

**Perfiles de desulfurización:** para la cepa ATCC 39327 y los aislados nativos con actividad desulfurizadora se elaboraron 7 réplicas del sistema n-hexano:agua con oleato de etanolamina incubando bajo las condiciones descritas. Cada 24 horas se tomó una réplica y se separaron las fases, determinando pH, viabilidad (DO600 y UFC en agar CASO), concentración de sulfato, DBT, DBT-sulfona y 2-HBP.

$$-\Delta H_c = \frac{\Delta T \left( m_w C_{pw} + 103713 \frac{J}{^\circ C} \right) - \left( (m_{FeO} - m_{FeI}) * \left( 5857.6 \frac{J}{g} \right) \right)}{m_o} \quad (4)$$

$$\% \text{ Pérdida } \Delta H_c = \frac{(\Delta H_c \text{ sin tratamiento}) - (\Delta H_c \text{ posfermentación})}{(\Delta H_c \text{ sintratamiento})} * 100 \quad (5)$$

donde:  $\Delta H_c$  es el poder calorífico del combustible,  $\Delta T$  es la diferencia de temperatura que se presenta en la cámara interna,  $m_w$  es la masa inicial de agua,  $C_{pw}$  es el poder calorífico del agua,  $(m_{FeO} - m_{FeI})$  la masa del alambre de hierro inicial y final y  $m_o$  es la masa inicial de la muestra puesta en ignición.

## RESULTADOS

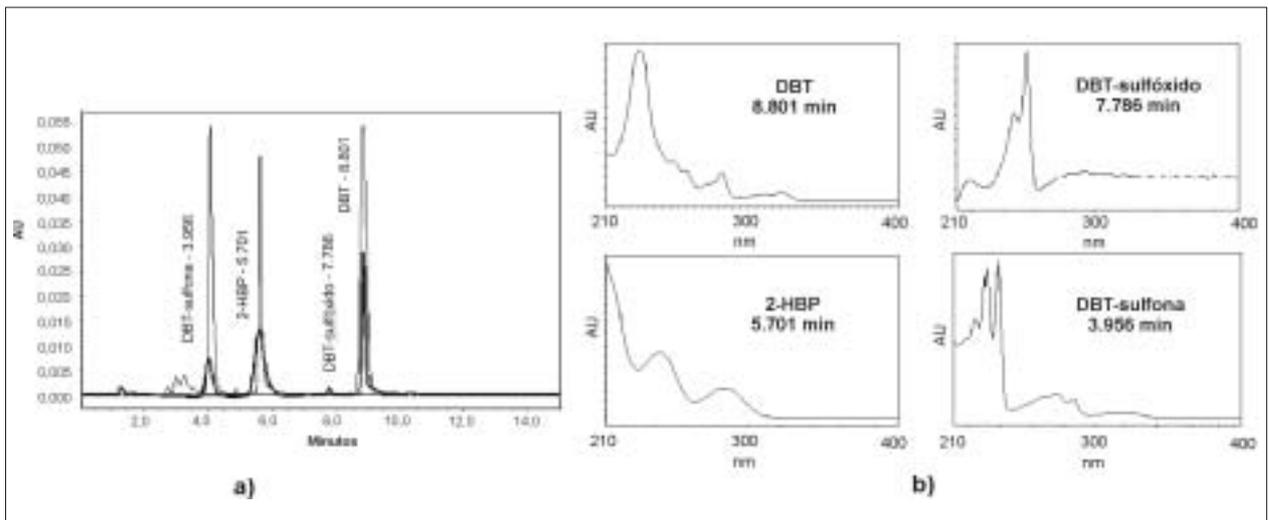
**Evaluación de la actividad desulfurizadora de los aislados nativos.** Inicialmente todos los microorganismos, incluyendo la cepa de referencia, se caracterizaron mediante la batería de ensayos bioquímicos descritos en "Materiales y métodos".

Se encontró que eran bacilos Gram negativos con movilidad, crecimiento en agar MacConkey, reacción de oxidasa positiva y hemólisis  $\alpha$  o  $\beta$ ; adicionalmente estos microorganismos no presentaron fermentación de carbohidratos, producción de indol y reducción de azufre, por lo que se confirmó que se trataba de aislados de *Pseudomonas*. La cepa de referencia mostró un comportamiento similar al obtenido con los aislados nativos y con el de *Pseudomonas*

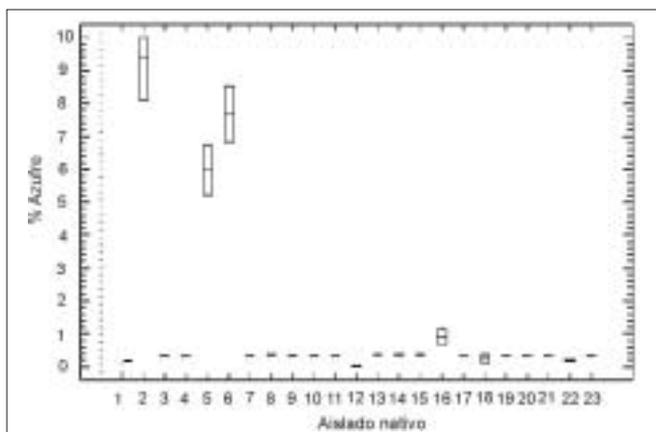
*aeruginosa* (control positivo), datos que coinciden con lo reportado por Salazar (1996).

De los 23 aislados nativos, los aislados 02, 05 y 06 presentaron actividad desulfurizadora evidenciada por una disminución en la concentración de DBT y la presencia de 2-HBP, DBT-sulfóxido y DBT-sulfona en los cromatogramas. Los parámetros empleados en la confirmación de estos metabolitos fueron el tiempo de retención (fi-

gura 2a) y el espectro de absorción (figura 2b), obtenido con el uso de un DAD acoplado al HPLC, el cual permitió obtener, para cada uno de los picos y en tiempo real, el espectro de absorción en el rango de 210 a 400 nm. Los espectros obtenidos para DTB, DBT-sulfona y 2-HBP encontrados en las muestras pos-fermentación coincidieron con los obtenidos con las soluciones estándar, mientras que el DBT-sulfóxido fue confirmado por comparación con el espectro reportado en la literatura (Crawford y Gupta, 1990). Estos aislados nativos presentaron un porcentaje de remoción de azufre del 9,4, 6,0 y 7,6% respectivamente (figura 3, tabla 1), que mediante el test de Duncan y Anova mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre ellos y con el resto de aislados nativos.



**Figura 2.** a) Comparación entre los tiempos de retención de los patrones (—) y los obtenidos al final de la fermentación (⇌). b) Espectros de absorción obtenidos para los picos de DBT-sulfona, 2-HBP, DBT-sulfóxido y DBT.



**Figura 3.** Porcentaje de azufre removido por los aislados nativos de *Pseudomonas* spp. en el sistema de fermentación. (Las barras representan el rango de azufre removido en porcentaje).

**Perfiles de desulfurización.** Debido a que los aislados nativos 02, 05 y 06 presentaron actividad desulfurizadora, se construyeron sus perfiles de desulfurización, empleando la cepa ATCC 39327 como microorganismo de referencia. Se observa que durante los siete días de fermentación el pH se estabiliza en un rango de 7.3 a 7.0 y la viabilidad se mantiene en un orden de  $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup> (figura 4).

La cepa de referencia y los aislados 02 y 05 muestran una disminución en la concentración de DBT a partir de las 48 h (figura 5a, b y c), mientras que el aislado 06 presenta una disminución constante desde el inicio de la fermentación hasta las 144 h (figura 5d). Se observa que cada microorganismo presenta diferentes perfiles de concen-

tración de 2-HBP y sulfato, sin embargo tienen un comportamiento similar en el tiempo para cada uno. Para el DBT-sulfona no se observa tendencia alguna (figura 5).

**Actividad desulfurizadora sobre keroseno.** A través del análisis de los espectros de cada señal registrada en el cromatograma del keroseno sin tratar, no se observó la presencia de DBT o de alguno de sus metabolitos; motivo por el cual se determinó el azufre inicial y final mediante combustión adiabática en una bomba calorimétrica. El keroseno presentó al inicio de la fermentación un poder calorífico de 49,7 kJ g<sup>-1</sup> y 319 ppm de azufre total.

La cepa de referencia ATCC 39327 y los aislados nativos 02, 05 y 06 presentaron un porcentaje promedio de remoción de azufre de 19,9, 35,9, 34,0 y 62,6% (figura 7a, tabla 1) y una disminución promedio del poder calorífico de 0,45, 5,55, 3,64 y 4,52% respectivamente (figura 7b, tabla 1). Se evidencia una disminución en el área de los picos entre el cromatograma al inicio y final de la fermentación (figura 6). La viabilidad de los microorganismos mantuvo el orden observado en las fermentaciones con n-hexano ( $10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>).

**DISCUSIÓN**

Los aislados nativos 02, 05 y 06 presentan actividad desulfurizadora a través de la ruta metabólica 4S, confirmada por la detección de los metabolitos DBT-sulfóxido, DBT-sulfona y 2-HBP durante el

**Tabla 1.** Resultados de porcentaje de remoción de azufre para la cepa de referencia y los aislados nativos 02, 05 y 06 sobre DBT y keroseno. Igualmente se muestra el porcentaje de pérdida de poder calorífico del keroseno. Los valores entre paréntesis representan el rango de los datos experimentales

Microorganismo	% remoción de azufre sobre DBT	% remoción de azufre sobre keroseno	% de pérdida de poder calorífico del keroseno
ATCC 39327	6,6 (4,7 – 8,6)	19,9 (19,1 – 21,2)	0,45 (0,38 – 0,48)
02	9,4 (8,1 – 10,7)	35,9 (35,7 – 36,1)	5,55 (5,11 – 5,99)
05	6,0 (5,2 – 6,7)	34,0 (32,9 – 35,7)	3,64 (2,99 – 4,28)
06	7,6 (6,81 – 8,54)	62,6 (61,8 – 63,1)	4,52 (4,26 – 4,79)

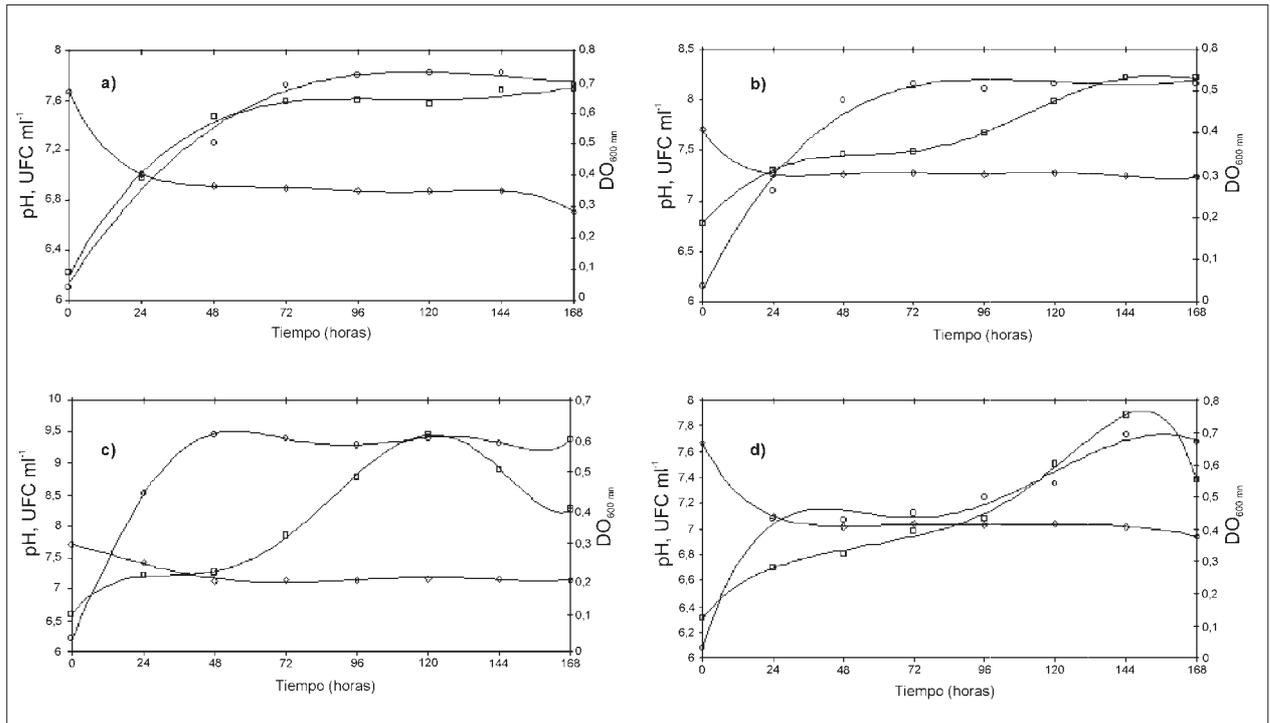


Figura 4. Perfiles de ( $\diamond$ ) pH, ( $\circ$ ) DO<sub>600nm</sub>, ( $\square$ ) UFC ml<sup>-1</sup> para las cepas a) ATCC 39327, b) 02, c), 05 y d) 06.

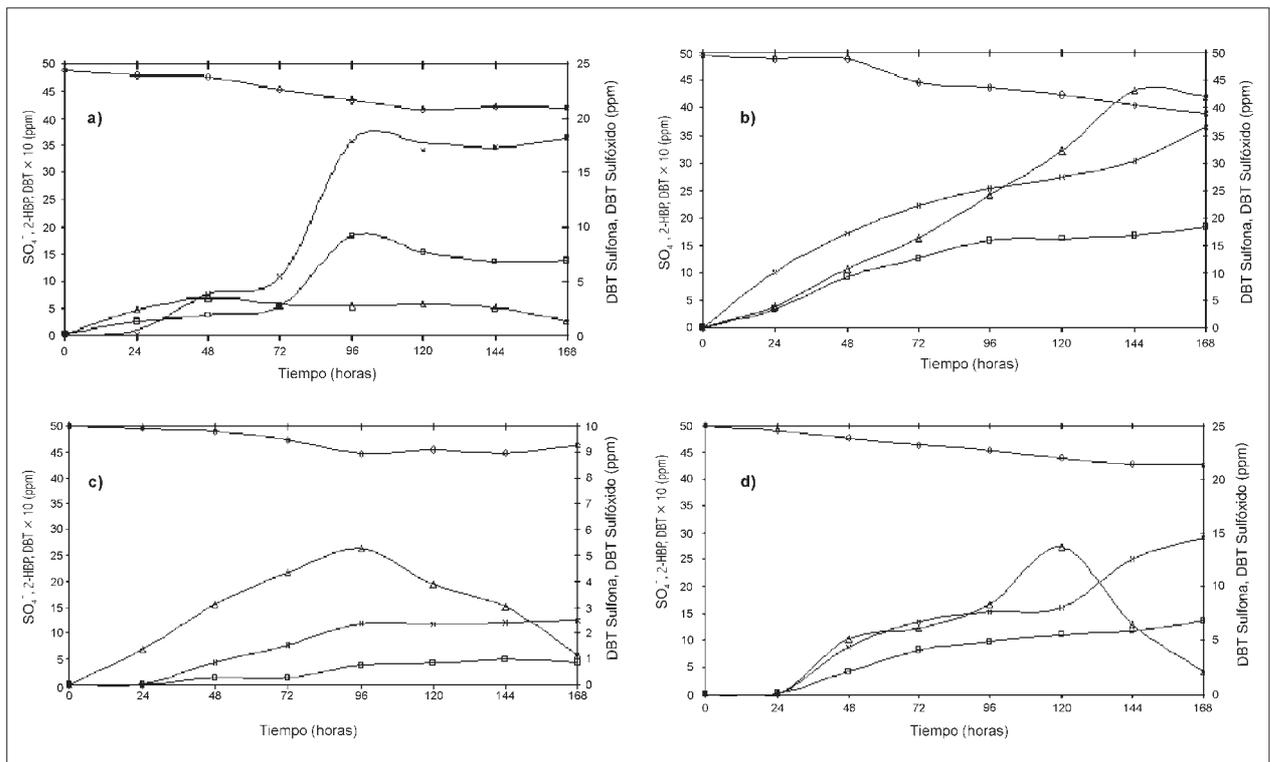


Figura 5. Perfiles de concentración de ( $\diamond$ ) DBT, ( $\Delta$ ) DBT-sulfona, ( $\times$ ) 2-HBP y ( $\square$ ) SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> para las cepas a) ATCC 39327, b) 02, c), 05 y d) 06.

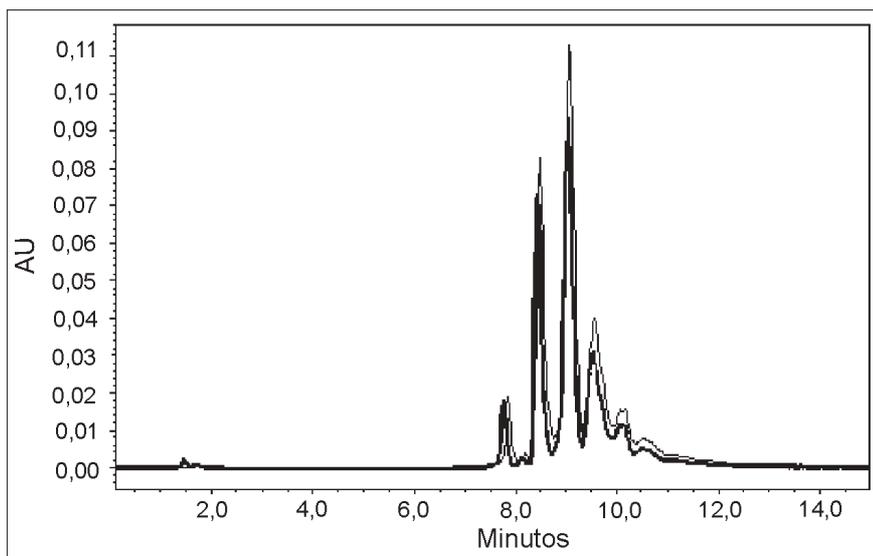


Figura 6. Comparación entre los cromatogramas al inicio (—) y final (---) de la fermentación en presencia de keroseno.

Kodoma. Esto permite que los aislados nativos 02, 05 y 06 sean importantes para el desarrollo de un modelo de biodesulfurización de combustibles fósiles.

Dado que los microorganismos mantuvieron el mismo orden de UFC durante las fermentaciones con n-hexano y keroseno, estos aislados constituyen una alternativa para el estudio de la remoción de azufre en sistemas de dos fases con hidrocarburos de mayor peso molecular. Los resultados difieren de lo reportado por Huertas *et al.* (1998), quienes

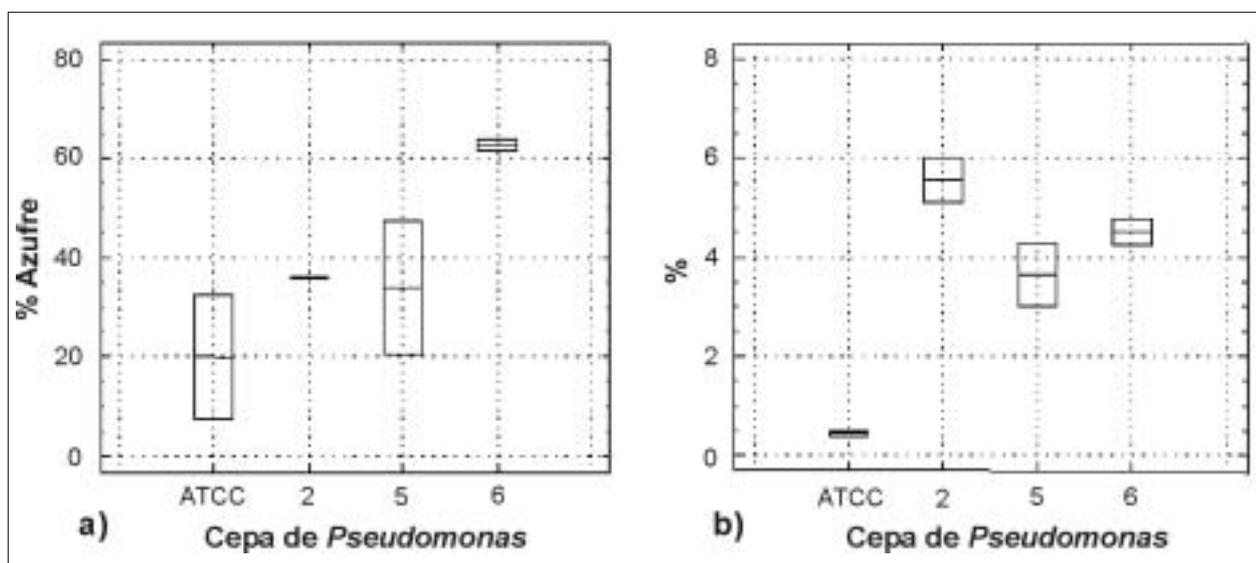


Figura 7. a) Porcentaje de azufre removido y b) disminución del poder calorífico en las fermentaciones con keroseno.

análisis cromatográfico; este resultado coincide con lo reportado por otros autores, los cuales usando diferentes cepas de *Pseudomonas* han obtenido como productos finales de fermentación 2-HBP y sulfato (Purdy *et al.*, 1993; Sagardia *et al.*, 1975). Sin embargo, estos resultados no coinciden con los reportados por Monticello y Finnerty (1985) y Kodama *et al.*, (1973), quienes encontraron 3-hidroxi-2-formil benzotiofeno, 3-oxo-[3'-hidroxi-tionafetil-(2)-metileno]-dihidrotionafeno y las formas hemiacetal y trans del ácido 4-[2-(3-hidroxi)-tianoftenil]-2-oxo-3-butenoico, los cuales son encontrados en la ruta metabólica de

encontraron que cepas de *Pseudomonas* mantienen su viabilidad en medios hasta con un 10% de n-heptano; sin embargo, Cruden *et al.* (1992) reportaron la capacidad de diferentes cepas de *Pseudomonas* para crecer en medios hasta de un 50% en fase orgánica.

La variabilidad en los perfiles de desulfurización de los diferentes microorganismos puede ser producto de isoformas de las enzimas presentes en la ruta metabólica 4S; producto del cambio de aminoácidos por otros con propiedades similares, que

afectan la afinidad de la enzima por el sustrato sin producir un cambio significativo en la estructura terciaria. De igual forma es probable que la cantidad producida de cada metabolito se relacione con la actividad enzimática; es así como en los aislados 02 y 06 se observa la mayor concentración de DBT-sulfona, lo que hace presumir que el sistema enzimático dibenzotiofen monooxigenasa y dibenzotiofen 5-oxido monooxigenasa, encargadas del paso de DBT a DBT-sulfona, presenta una mayor actividad en estos aislados; por otro lado la cepa de referencia y los aislados 02 y 06 muestran una elevada actividad en el sistema enzimático dibenzotiofen 5,5-dióxido monooxigenasa y 2'-hidroxibifenil 2-sulfinato sulfinolasa, que transforma DBT-sulfona a 2-HBP. Este posible comportamiento enzimático de los aislados 02 y 06 se manifestó en el alto porcentaje de azufre total removido sobre DBT (9,4 y 7,6%, respectivamente) y keroseno (32,9 y 62,6%, respectivamente).

En cuanto a la pérdida del poder calorífico del keroseno, puede deberse al uso del combustible como fuente de carbono por parte del microorganismo. Es así como los aislados que presentan el máximo porcentaje de remoción de azufre (02 y 06) producen la mayor pérdida del poder calorífico con 4,52 y 5,55%, respectivamente; sin embargo, no existen estudios que permitan establecer si esta pérdida es significativa o no para el combustible.

A partir de DBT se han reportado altos porcentajes de remoción de azufre por degradación del DBT a 2-HBP (ruta metabólica 4S), con diferentes microorganismos (hongos y bacterias Gram negativas, principalmente) y en medios libres de hidrocarburos, debido a la alta sensibilidad de estos frente a solventes orgánicos. Crawford y Gupta (1990) reportaron la remoción del 97,3% del azufre presente en 90 ppm de DBT iniciales, mediante el uso de *Cunninghamella elegans* en un lapso de 24 horas; similarmente, Omori *et al.* (1992), usando la cepa SY1 de *Corynebacterium* sp., lograron la remoción del 100% del azufre presente en 500 ppm de DBT en 65 horas de cultivo, mientras que Izumi *et al.* (1994) reportaron la remoción total de azufre a partir de 200 ppm de DBT en 150 minutos usando *Rhodococcus erythropolis* D-1; por otro lado, Armstrongs *et al.* (1995) reportaron una remoción del 1,14% de azufre a partir de 500 ppm de DBT. Sin embargo, pocos estudios se han realizado en presencia de hidrocarburos; en este aspecto, Oshiro *et al.* (1993) reportaron la remoción de hasta 500 ppm en 4 horas con células liofilizadas de

*Rhodococcus erythropolis* H-2 en presencia de 40% de tetradecano, pero con una marcada disminución en la viabilidad del microorganismo. Aunque los porcentajes de remoción de azufre sobre DBT de los aislados nativos estudiados en este trabajo son bajos al compararlos con los obtenidos con otros microorganismos, es importante destacar el mantenimiento de la viabilidad en presencia de n-hexano al 50% y el aumento en la remoción de azufre en presencia de keroseno al 50%, ya que esta pasó de entre 6,0 y 9,4% a 32,9 y 62,6%; que podría aumentar al realizar estudios con células inmovilizadas o en estudios de cooperatividad entre estas cepas con otros microorganismos que presentan actividad desulfurizadora, por lo que se presentan como una alternativa importante para el estudio de procesos de biodesulfurización de combustibles.

Es necesario continuar con la evaluación de la actividad desulfurizadora de los aislados 02 y 06 sobre otros hidrocarburos como gasolina, diesel y petróleo, la realización de un análisis molecular de las enzimas involucradas en el proceso, el diseño de biorreactores y el desarrollo de estudios de escalado, tendientes a aumentar los porcentajes de remoción de azufre. Finalmente, antes de llevar este modelo al ámbito industrial, se debe realizar un balance costo-beneficio, que en un corto tiempo permita superar las metas propuestas por las entidades gubernamentales sobre las emisiones de óxidos de azufre.

## BIBLIOGRAFÍA

- Alméciga-Díaz, C., Sánchez, O. 2001. Caracterización de la actividad desulfurizadora de aislados nativos de *Pseudomonas*. Trabajo de grado, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.
- Armstrongs, S.; Sankey, B.; Voordouw, G. 1995. Conversion of debenzothiophene to byphenyl by sulfate-reducing bacteria isolated from oil field production facilities. *Biotechnol Lett*, 17: 1133-1136.
- Biodesulfurization. United States Patent and Trademark home page <http://www.uspto.gov/>. 2004.
- Castro, S. 2000. Estudio de la biodesulfurización del DBT (dibenzotiofeno) en un sistema emulsionado por acción de una cepa de *Pseudomonas* spp. Trabajo de grado. Departamento de Ingeniería Química, Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá.
- Crawford, D.; Gupta, R. 1990. Oxidation of dibenzothiophene by *Cunninghamella elegans*. *Curr Microbiol.* 21: 229-231.

- Cruden, D.; Wolfram, J.; Rogers, R.; Gibson, D. 1992. Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium. *Appl Environ Microbiol.* 58: 2723-2729.
- Fedorak, P.; Westlake, W. 1983. Microbial degradation of organic compounds in Prudhoe Bay crude oil. *Can J of Microbiol.* 29: 291-296.
- Fedorak, P.; Grbic-Galic, D. 1991. Aerobic cometabolism of benzothiophene and 3-methylbenzothiophene. *Appl Environ Microbiol.* 57: 932-940.
- Frassinetti, S.; Setti, L.; Corti, A.; Farrinelli, P.; Montevecchi, P.; Vallini, G. 1998. Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*. *Can J of Microbiol.* 44: 289-297.
- Gestión ambiental en Ecopetrol S. A. <http://www.ecopetrol.com.co>. 2003.
- Huertas, M.; Duque, E.; Márquez, S.; Ramos, J. 1998. Survival in soil of different toluene-degrading *Pseudomonas* strains after solvent shock. *Appl Environ Microbiol.* 64: 38-42.
- Icontec. 2003. Determinación del poder calorífico bruto de carbón y coque, NTC 2128. Fecha de ratificación 03-07-23.
- Izumi, Y.; Ohshiro, T.; Ogino, H.; Hine, Y.; Shima, M. 1994. Selective desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Appl Environ Microbiol.* 60: 223-226.
- Kodama, K.; Nakatani, S.; Umehara, K.; Shimizu, K.; Minoda, Y.; Yamada, K. 1970. Induction of dibenzothiophene oxidation by *Pseudomonas jainii*. *Agr Biol Chem.* 34: 1320-1324.
- Kodama, K.; Umehara, K.; Shimizu, K.; Nakatani, S.; Minoda, Y.; Yamada, K. 1973. Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agr Biol Chem.* 37: 45-50.
- Konishi, J.; Ishii, Y.; Onaka, T.; Okamura, K.; Suzuki, M. 1986. Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization. *Appl Environ Microbiol.* 63: 3164-3169.
- Krieg, N.; Holt, J. 1984. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol 1. Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Laborde, A.; Gibson, D. 1977. Metabolism of dibenzothiophene by *Beijerinckia* species. *Appl Environ Microbiol.* 34:783-790.
- Le Borgne, S.; Quintero, R. 2003. Biotechnological processes for the refining of petroleum. *Fuel Processing Technology* 81: 155-169.
- Lee, M.; Senius, J.; Grossman, M. 1995. Sulfur-specific microbial desulfurization of sterically hindered analogs of dibenzothiophene. *Appl Environ Microbiol.* 61: 4362-4366.
- Legislación, en DAMA (Departamento Técnico Administrativo del Medio Ambiente). [http://www.dama.gov.co/actualizaciones/legisla/RI089895.htm#CAPITULO\\_I](http://www.dama.gov.co/actualizaciones/legisla/RI089895.htm#CAPITULO_I), 2003.
- McFarland, B.; Boron, D.; Deber, W.; Meyer, J.; Jonson, A.; Atlas, R. 1998. Biocatalytic sulfur removal from fuels: applicability for producing low sulfur gasoline. *Critical Reviews in Microbiology*, 24: 99-147.
- Monticello, D. 2000. Biodesulfurization and upgrading of petroleum distillates. *Curr Opin Biotechnol.* 11: 540-546.
- Monticello, D.; Bakker, D.; Finnerty, W. 1985. Plasmid mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* strains. *Appl Environ Microbiol.* 49: 756-760.
- Monticello, D.; Finnerty, W. 1985. Microbial desulfurization of fossil fuels. *Ann Rev Microbiol.* 39: 371-389.
- Omori, T.; Monna, L.; Saiki, Y.; Kodama, T. 1992. Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1. *Appl Environ Microbiol.* 58: 911-915.
- Oshiro, T.; Hirata, T.; Izumi, Y. 1995. Microbial desulfurization of dibenzothiophene in the presence of hydrocarbon. *Appl Microbiol Biotechnol.* 44: 249-252.
- Purdy, R.; Lepo, J.; Ward, B. 1993. Biodesulfurization of organic compounds. *Curr Microbiol.* 27: 219-222.
- Sagardia, F.; Rigua, J.; Martínez, A.; Fuentes, F.; López, C.; Flores, W. 1975. Degradation of benzothiophene and related compounds by soil *Pseudomonas* in an oil-aqueous environment. *Appl Environ Microbiol.* 29: 722-725.
- Salazar, T. 1996. Aislamiento de *Pseudomonas* nativas degradadoras de dibenzotiofeno. Trabajo de grado en Bacteriología, Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca.