
ACTIVIDADES SULFOREDUCTORA Y DESULFURIZADORA POR BACTERIAS TERMÓFILAS AISLADAS DE LODOS HIDROTERMALES DE LAS TRINCHERAS, VENEZUELA

OSCAR VALBUENA, JUAN CARLOS PEREIRA, REBECA DAZA, FREDDY GONZÁLEZ, ANGELINA HERNÁNDEZ, MÓNICA MORA, GRACIELA MORALES y LUIS MEDINA

RESUMEN

Uno de los procesos de mayor relevancia y costo en la refinación del petróleo es la eliminación de átomos de azufre en moléculas orgánicas constituyentes del mismo o de sus combustibles derivados. Para alcanzar tal fin, se requiere de reacciones de hidrodesulfurización (HDS) que deben tener lugar bajo condiciones severas de temperatura y presión, y con catalizadores metálicos. Una alternativa biotecnológica a este proceso lo constituye el uso de bacterias con sistemas enzimáticos capaces de efectuar tales reacciones en condiciones experimentales de baja severidad, sin catalizadores metálicos y a más bajo costo. A tales efectos, poblaciones bacterianas aisladas de lodos hidrotermales de Las Trincheras, Venezuela, incubadas en medios químicamente definidos usando hexano, heptano y dibenzotiofeno (DBT) como fuentes de carbono, bajo anaerobiosis, efec-

tuaron reacciones de sulforeducción. La actividad detectada en un amplio intervalo de temperaturas (42°-75°C) fue estimulada por la incorporación de lactato al medio. Una cepa aislada (RD) de bacilos Gram positivos, utilizó DBT como fuente de carbono y azufre en cultivos anaeróbicos a 55°C. La degradación (desulfurización) de DBT, evaluada por cromatografía de gases sin y con espectrometría de masa, fue también efectuada por el medio de cultivo libre de células (FLC), previamente utilizado por la cepa, indicando que el sistema enzimático degradador de DBT puede funcionar extracelularmente y es probablemente excretado al medio de cultivo durante el crecimiento bacteriano. Tanto en el sistema bacterial como en el FLC, se detectó bifenilo como único intermediario en el proceso de desulfurización del DBT.

La capacidad de efectuar reacciones de sulforeducción por bacterias está bien documentada (Kim *et al.*, 1996; Castro *et al.*, 1999; Roychoudhury, 2004) y su importancia es obvia en el ciclo del azufre en la naturaleza (Le Fau *et al.*, 1990; Madigan, 1998; Mohebbi y Ball, 2008). El suelo constituye una fuente abundante de microorganismos

con capacidad de degradar/transformar compuestos orgánicos de diferentes estructuras (Altamirano y Pozo, 2000). Para Venezuela, con sus abundantes recursos petroleros, sería importante la búsqueda de cepas bacterianas capaces de utilizar como fuentes de carbono (C) y azufre (S) a compuestos orgánicos presentes particularmente en crudos pesados (Kim *et al.*, 1996). Estos crudos consti-

tuyen una mezcla heterogénea de hidrocarburos alifáticos y aromáticos, muchas de cuyas moléculas incluyen átomos de S unidos covalentemente a su esqueleto carbonado. Estas moléculas se encuentran preferencialmente presentes en la fracción conocida como asfaltenos, de las cuales una de las mejor estudiadas es el dibenzotiofeno (DBT), una molécula aromática sulfurada (Galárraga y Pérez,

Palabras clave / Bacterias / Desulfurización / Dibenzotiofeno / Termófilos /

Recibido: 22/07/2009. Modificado: 03/05/2010. Aceptado: 18/05/2010.

Oscar Valbuena. Licenciado en Biología, Universidad Central de Venezuela (UCV). Ph.D. en Biología Molecular, University of Pennsylvania, EEUU. Profesor, Universidad de Carabobo (UC), Venezuela. Dirección: Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología (FACYT-UC), Universidad de Carabobo, Venezuela. e-mail: ovalbuena@uc.edu.ve

Juan Carlos Pereira. Licenciado y M.Sc. en Química, UCV, Venezuela. Doctor en Química, Universidad de los Andes, Venezuela. Profesor, FACYT-UC, Venezuela.

Rebeca Daza. Licenciada en Química, UC, Venezuela.

Freddy González. Licenciado en Química, UC, Venezuela.

Angelina Hernández. Licenciada en Química, UC, Venezuela.

Mónica Mora. Licenciada en Química, UC, Venezuela.

Graciela Morales. Licenciada en Química, UC, Venezuela.

Luis Medina. Licenciado en Biología, UCV, Venezuela. Doctor en Biología Celular, Université de Grenoble, Francia. Profesor, Facultad de Ciencias de la Salud, UC, Venezuela.

1991; Mc Farland, 1999). La presencia de tales especies sulfuradas es indeseable debido a los altos costos requeridos para su eliminación en productos derivados del petróleo y a los efectos contaminantes para los ambientes naturales originados después de su combustión y la posterior precipitación de lluvias ácidas (Bubrenick *et al.*, 1983; Ramson y Rivas, 1999). Una alternativa válida para la eliminación de estos compuestos del petróleo o de sus derivados, o para sanear habitats contaminados con hidrocarburos, podría constituirlo el uso de bacterias capaces de utilizar tales moléculas como fuentes de C y S para sustentar su crecimiento (Kurita *et al.*, 1971; Monticello y Finnerty, 1991; Konishi *et al.*, 1997; Pineda-Flores y Mesta-Howard, 2001; Mohebbali y Ball, 2008). La existencia de bacterias y hongos capaces de degradar estos compuestos sulfurados ha sido reportada en la literatura (Reuter *et al.*, 1994; Tanimoto y Bak, 1994; Kim *et al.*, 1996; Ming So y Young, 1999; Onodire-Yamada *et al.*, 2001; Franzmann, 2002; Baldi *et al.*, 2003). Varios trabajos señalan la degradación de DBT por diferentes géneros de microorganismos, entre los que se reporta *Gordona* cepa CYKS1 (Rhee *et al.*, 1998), *Rhodococcus erithropolis* (Izumi *et al.*, 1994; Oda y Ohta, 2002; Yu *et al.*, 2006), *Desulfovibrio desulfuricans* (Kim *et al.*, 1990), *Sulfolobus acidocaldarius* (Kargi y Robinson, 1983), *Brevibacterium* sp. (van Afferden *et al.*, 1990), *Corynebacterium* sp. (Omori *et al.*, 1992), variados *Mycobacterium* sp. (Kayser *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2003, 2005, 2007; Ishii *et al.*, 2005), *Sphingomonas* sp. (Gai *et al.*, 2007), y *Bacillus subtilis* (Oshiro *et al.*, 2005). También han sido postuladas las posibles vías de degradación de compuestos sulfurados (Kodama *et al.*, 1973; Kilbane, 1990; van Afferden *et al.*, 1993; Lizama *et al.*, 1995). El objetivo del presente trabajo fue demostrar la capacidad de cepas bacterianas, aisladas del manantial hidrotermal de Las Trincheras, para efectuar la remoción de átomos de S de moléculas aromáticas tipo dibenzotiofeno, usualmente presentes en crudos pesados y sus derivados.

Materiales y Métodos.

Material biológico

Muestras de lodos provenientes de pozos con temperaturas entre 55 y 60°C fueron trasladadas en recipientes térmicamente aislados, previamente desinfectados, desde el Centro Termal Las Trincheras, Estado Carabobo,

Venezuela a los laboratorios ubicados en la Escuela de Medicina de Bárbula, Universidad de Carabobo.

Crecimiento bacteriano

Caldo nutritivo (CN). Cantidades de lodo colocadas sobre papel de filtro, previamente esterilizado por irradiación con luz ultravioleta, fueron resuspendidas en 100ml de caldo nutritivo MO88 HIME-DIA, suministrado por Didacta, Caracas, Venezuela. La incubación se efectuó por 24h a 55°C, en aerobiosis y con agitación constante. Posteriormente, alícuotas de 1ml fueron transferidas a 100ml de CN, bajo iguales condiciones y se siguió el crecimiento mediante la absorbancia a 540nm hasta 24h, registrándose, las 6-7 primeras lecturas a intervalos de ~2h. Alícuotas de este cultivo fueron transferidas a cuñas de agar y almacenadas a 4°C hasta su posterior uso.

Medio I. Porciones de 1g de lodo o alícuotas de 1ml provenientes de cultivos crecidos en CN, fueron transferidas a 12ml de medio I, el cual contenía los siguientes componentes (g·l⁻¹): 0,013 MgCl₂; 0,06 CaCl₂·2H₂O; 0,5 KH₂PO₄; 1 NaCl; 0,01 Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O; 7 (NH₄)₂SO₄; 4 lactato Na; 0,36 citrato Na·2H₂O; y 1g de extracto de levadura; con pH 7,8. Las incubaciones se efectuaron entre 42 y 75°C, en estufa, en anaerobiosis y sin agitación, por 24-72h. En posteriores experimentos la totalidad de los componentes carbonados del medio I fueron reemplazados (medio mínimo mineral, MM) por hexano (Hx), heptano (Hp) o dibenzotiofeno (DBT). Las condiciones de anaerobiosis fueron establecidas al cerrar los tubos de rosca con un tapón de algodón/gasa impregnado con unas gotas de pirogalol 1% y tapa de bakelita. Para detectar la actividad sulfuroreductora se agregó a cultivos paralelos 1ml de FeSO₄ 0,1M; la aparición de una coloración oscura de FeS era indicativo de sulforeducción positiva (Mora y Morales, 2002).

Medios DBTs y DBT. Alícuotas de 1ml de cultivos bacterianos previamente crecidos en CN y en aerobiosis, fueron transferidas a 12ml de medio DBTs, el cual contenía medio MM y 3,3mg·l⁻¹ de dibenzotiofeno (17,9µM) como única fuente de C disponible para el crecimiento bacteriano bajo las condiciones establecidas para el medio I. Posteriormente, los sulfatos también fueron eliminados del medio salino, de tal manera que el DBT constituyó la única fuente de C y S disponible para el crecimiento bacteriano; este medio denominado DBT

presentó pH 7,8. Para detectar la actividad sulfuroreductora/desulfurizadora, se implementaron dos incubaciones adicionales: un control positivo al cual se adicionó inóculo bacteriano, DBT y 1ml FeSO₄ y un control negativo al cual no se adicionó bacterias, pero sí DBT y 1ml FeSO₄ (Daza, 2003).

Placas de Petri. Alícuotas provenientes de los cultivos bacterianos en CN y medio DBT fueron sembradas por extensión sobre placas de agar cuenta estándar, incubándose hasta por 90h en anaerobiosis (cámara Gas Pack) a 55°C. Esto se llevó a cabo para determinar la morfología macroscópica y microscópica de las bacterias aisladas (Daza, 2003).

Obtención y procesamiento de filtrados libres de células (FLC)

Volúmenes apropiados (4-8ml) de cultivos bacterianos crecidos por 0, 24 y 72h en medio DBT, fueron filtrados (con vacío) a través de membranas microbiológicas (0,45µm de diámetro de poro) y 4ml de cada filtrado fue extraído con 4ml de tolueno. Los extractos orgánicos fueron analizados con cromatografía de gases (CG) y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/MS), para la determinación de DBT remanente.

Actividad degradadora de DBT por extractos libres de células

Alícuotas de 1ml de FLC provenientes de cultivos bacterianos en medio DBT fueron adicionadas a 12ml de medio DBT e incubadas de acuerdo a lo establecido arriba. Después de 72h de incubación se procedió a la extracción de los FLC con tolueno.

Cromatografía de gases (CG)

Alícuotas de 0,5µl de los extractos orgánicos de FLC fueron analizadas por cromatografía de gases empleando un cromatógrafo VARIAN 3800 con una columna Chromopack de 30m, con 0,25mm y 0,25µm de diámetro interno y espesor de capa, respectivamente. El equipo fue acoplado a un detector de ionización a la llama FID, (Hernández, 2004; González, 2004). La corrida se realizó con N₂ como gas de arrastre, a 150°C y 7psi/min, durante 15min. Los resultados se tabularon y registraron gráficamente. Mediante una curva de calibración relacionando las unidades de área en función de la molaridad de DBT, se estimó la cantidad remanente de DBT (González, 2004).

TABLA I
SULFOREDUCCIÓN
A DIFERENTES TEMPERATURAS Y
DIFERENTES COMPUESTOS CARBONADOS*

Compuesto carbonado	Temperatura (°C)		
	42	65	75
Hexano	+	+	+
Heptano	+	+	+
Dibenzotiofeno	+	+	+
Hexano + Lactato	++	++	++
Heptano + Lactato	++	++	++
Dibenzotiofeno + Lactato	++	++	++
Dibenzotiofeno + Hexano	+++	+++	++

* Las cruces indican la intensidad de la coloración oscura producida por el FeS. Un sistema control constituido por medio I sin inóculo bacteriano (lodo) no desarrollo coloración. Las muestras de lodos (1g) se resuspendieron en 12ml medio MM suplementado con los compuestos señalados, incubándose en anaerobiosis, sin agitación a las temperaturas indicadas.

Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG/EM)

Alícuotas de 0,5µl fueron inyectadas en un cromatógrafo de gases HP5890, serie II, dotado con un detector de masa 5971 y una columna HP-1, a una temperatura de horno de 40°C por 15min. La rampa de calentamiento se efectuó por 3min entre 10 y 270°C. Los resultados se registraron gráficamente (González, 2004).

Resultados

Crecimiento bacteriano

A fin de incrementar la biomasa y disponer de suficiente inóculo bacteriano para los experimentos, la muestra de 1g de lodo fue inoculada en caldo nutritivo bajo condiciones de aerobiosis y, posteriormente, alícuotas de tales cultivos fueron transferidas a caldo nutritivo, incubándose en las condiciones descritas. En presencia de medio I y aerobiosis, tanto la muestra de lodo como la población bacteriana crecida en CN no efectuaron la reacción de sulforeducción; no obstante, en anaerobiosis, la reacción fue detectada en medio I y en medio MM suplementado con hexano (Hx), heptano (Hp) o medio DBTs, a diferentes temperaturas y en ausencia o presencia de lactato (Tabla I). La reacción fue evaluada cualitativamente por inspección visual de la intensidad de la coloración oscura debida a la

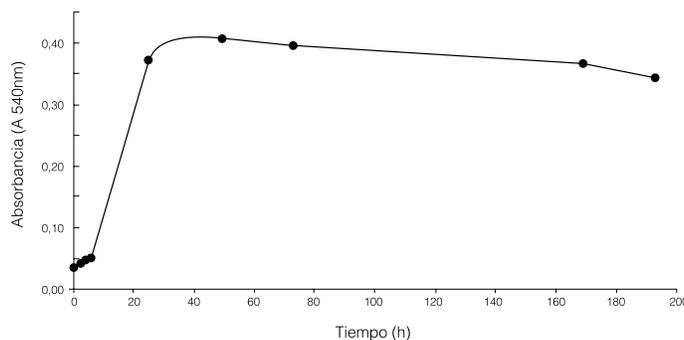


Figura 1. Curva de crecimiento en caldo nutritivo de la población bacteriana proveniente de medio DBT. Alícuotas de 1ml fueron incubadas en aerobiosis, a 55°C, con agitación.

formación de FeS en los cultivos. La reacción fue evidente en las tres temperaturas ensayadas (42, 65 y 75°C) al suministrar al menos uno de los sustratos carbonados señalados. La máxima estimulación se observó en el medio con Hx-DBT a 42 y 65°C. El lactato estimuló la reacción en todos los medios y temperaturas. Para constatar la viabilidad de las bacterias e incrementar la biomasa bacteriana capaz de efectuar reacciones de sulforeducción, alícuotas de los cultivos a 65°C fueron transferidas a caldo nutritivo e incubadas a 55°C, en aerobiosis y agitación. En la Figura 1 se muestra el

crecimiento en CN de las bacterias provenientes del medio DBT, caracterizado por una fase de latencia (4-6h), un crecimiento exponencial hasta 24h y luego una fase estacionaria hasta 196h, sin evidencia de mortalidad. El aislamiento de colonias de este cultivo mostró un solo tipo de colonias circulares, brillantes, planas, de bordes rizados y amarillentas; la observación microscópica evidenció bacilos Gram positivos (Figuras 2a, b). La cepa bacteriana aislada fue denominada RD. En estos experimentos iniciales el origen del sulfuro generado por los cultivos en medio DBTs no pudo atribuirse al DBT, debido a la presencia en el medio de

sulfato ferroso amoniacal y de amonio. Para subsanar la situación, el medio fue preparado omitiendo los sulfatos; de igual manera luego de las incubaciones respectivas se detectó la presencia de FeS, lo que demostró el uso del S del DBT por las bacterias. Esto indica que la cepa RD fue capaz de efectuar reacciones de sulforeducción porque en el medio de cultivo había sulfatos y las fuentes carbonadas, Hx, Hp y Lactato, las cuales no contienen S; en el medio DBT, carente de sulfatos, se detectó la presencia de sulfuro, el cual necesariamente debió provenir de la desulfurización del DBT. Alícuotas de estos cultivos transferidas a placas de agar cuenta estándar, si bien al principio mostraron colonias muy pequeñas, al transcurrir el tiempo fueron progresivamente adquiriendo la morfología característica de las bacterias provenientes de culti-

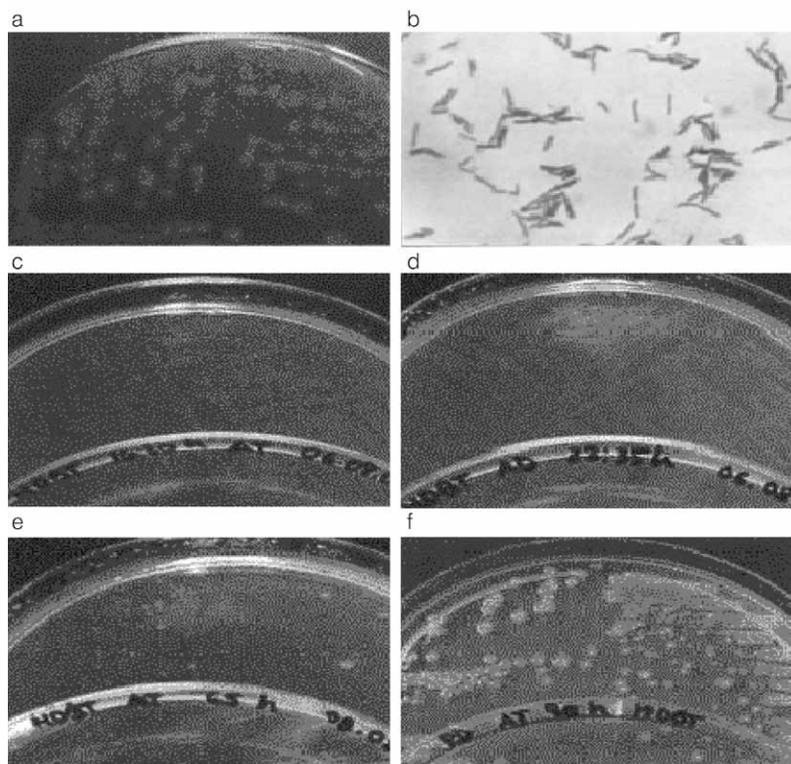


Figura 2. Colonias bacterianas crecidas en agar cuenta estándar. a: bacterias provenientes de caldo nutritivo, en aerobiosis y 55°C, b: microfotografía de bacilos Gram positivos provenientes de la placa en a, c-f: bacterias provenientes de cultivos en medio DBT, en anaerobiosis y 55°C, a diferentes tiempos de cultivo en placas de agar (c: 16h, d: 23h, e: 65h, y f: 90h).

vos en CN y posteriormente crecidas en agar cuenta estándar (Figuras 2c-f).

Degradación de DBT por cultivos bacterianos

La Figura 3 y Tabla II muestran la determinación, mediante CG, de DBT remanente en FLC proveniente de cultivos bacterianos en presencia de DBT como única fuente de C y S. A tiempo cero ($t = 0$) de incubación se evidenció una señal de 9 904 077 unidades de área (15,446 μ M) con un tiempo de retención de 12min, correspondiente a DBT (Figura 3a); a las 24h (3b) se observó una disminución de DBT (2 448 304 unidades de área; 4,577 μ M) y la aparición de una nueva señal a los 9min, asignada a bifenilo, y a las 72h (3c) la señal de DBT se redujo a 184 245 unidades (1,277 μ M), lo cual representa una degradación del 91,7% del DBT al inicio de la incubación (Tabla II), mientras el bifenilo incrementó considerablemente. Estos datos demuestran la desaparición de DBT del medio de cultivo y a su vez aportan evidencia de uno de los compuestos, el bifenilo, implicados en el proceso metabólico y desulfurización del DBT por las bacterias. Mediciones del pH en los cultivos hasta por 190h de incubación, indicaron variaciones entre 7,80 y 8,05. La incorporación en el medio de cultivo de KH_2PO_4 proporcionó la capacidad amortiguadora del pH.

Finalmente, en la Figura 4 se muestran los cromatogramas obtenidos mediante CG/

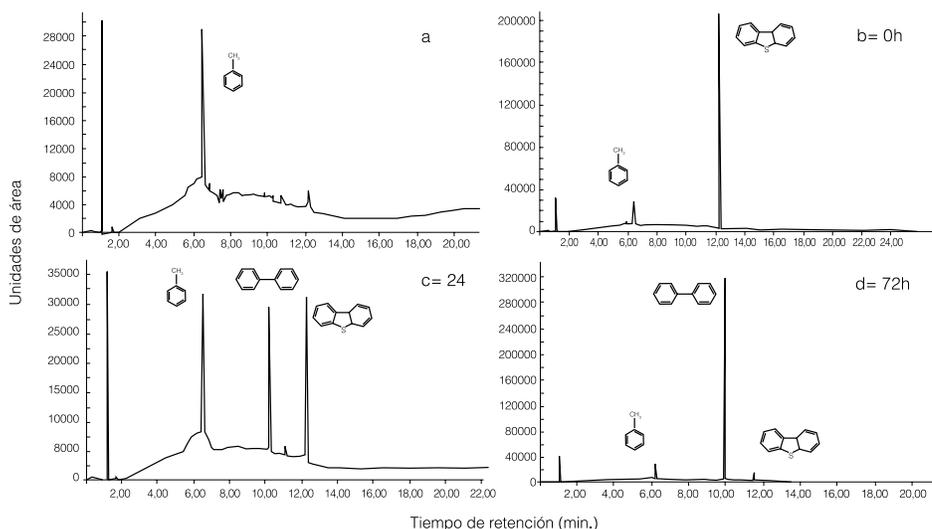


Figura 4. Determinación de DBT remanente y sus productos de degradación por bacterias, mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

TABLA II
DEGRADACIÓN DE DBT POR BACTERIAS*

Tiempo de incubación (h)	DBT remanente (μ M)*	Tiempo de retención (min)
0	15,446	12,05
24	4,577	11,99
72	1,277	11,97

* El DBT se determinó por cromatografía de gases. Las cifras indican el DBT remanente en el medio de cultivo, calculado mediante la curva de calibración obtenida por regresión lineal ($Y = -691881 + 685981X$; $r = 0,9978$). Las incubaciones se efectuaron en 12ml medio DBT, en anaerobiosis, sin agitación y a 55°C, por los tiempos indicados.

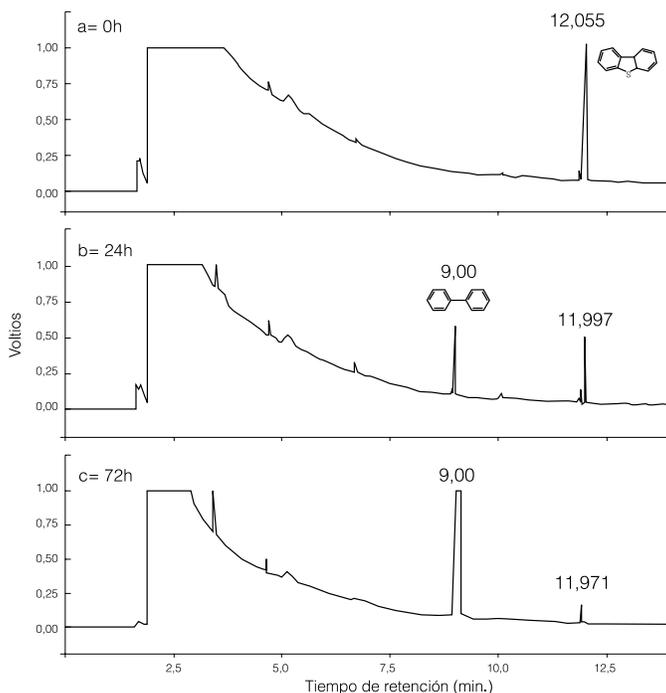


Figura 3. Determinación de DBT remanente en cultivos bacterianos mediante cromatografía de gases.

EM, de FLC provenientes de cultivos bacterianos. El solvente puro utilizado mostró una señal a los 6,5min (a) la cual corresponde a

tolueno; en el extracto a $t = 0$ de incubación (b) se observó básicamente una señal a los 12,29min, correspondiente a DBT (con una abundancia superior a 200 000 unidades); a las 24h de incubación (c) se evidenciaron tres señales, la primera a 6,5min correspondiente al tolueno utilizado como solvente extractor; la segunda a 10,2min correspondiente a bifenilo (abundancia ~30 000 unidades) y la tercera a 12,3min asignada al DBT (abundancia ~30 000 unidades). A las 72h de cultivo (d) el bifenilo incrementó su abundancia a 320 000 unidades, mientras el DBT fue <10 000 unidades. Nótese que la abundancia del tolueno en los cromatogramas a y c resultó ser muy similar, ~30 000 unidades, lo cual es de esperar pues el tolueno es adicionado como agente extractor a los FLC. La reducción de la cantidad de DBT después de 72h de incubación fue >95%, mientras el bifenilo alcanzó las 320 000 unidades, siendo inicialmente cero.

Degradación de DBT por filtrados libres de células (FLC)

Posteriormente se realizaron experimentos a fin de evaluar la posible degradación extracelular del DBT (Figura 5 y Tabla III). Alícuotas de filtrados libre de células (FLC) provenientes de cultivos bacterianos de 72h de incubación en medio DBT se incubaron con medio DBT sin previo uso por otras 72h a las condiciones ya establecidas. Paralelamente un sistema a $t = 0$ fue procesado para determinar la actividad degradadora de DBT por extractos de FLC mediante CG. En la Figura 5a se aprecia las dos señales detectadas a $t = 0$ de incubación, la señal de 9min corresponde a bifenilo y la de 12min a DBT. La presencia de bifenilo a $t = 0$ en estos experimentos se justifica porque en los FLC provenientes de incubaciones previas, dicha molécula es el producto final del proceso biodegradativo. La presencia de DBT es obvia pues es incorporado por el medio DBT. A las 72h de incubación, mientras la señal del DBT disminuyó en 91,1% (de 15,156 a 1,343 μ M, Tabla III), la correspondiente a bifenilo aumentó (Figura 5b).

Discusión

La presencia de poblaciones bacterianas provenientes de las aguas termales de Las Trincheras, consumidoras de hidrocarburos alifáticos (hexano y heptano) y aro-

TABLA III
DEGRADACIÓN DE DBT POR FILTRADOS LIBRES
DE CÉLULAS (FLC)*

Tiempo de incubación (h)	DBT remanente (μM)*	Tiempo de retención (min)
0	15,156	12,00
72	1,343	12,11

* El DBT se determinó por cromatografía de gases. Las cifras indican el DBT remanente en el medio de cultivo, calculado mediante la curva de calibración obtenida por regresión lineal ($Y = -691881 + 685981X$; $r = 0,9978$). Medio DBT (12ml) se inoculó con 1ml de FLC proveniente de cultivos bacterianos previos en medio DBT, incubándose en anaerobiosis, sin agitación, a 55°C, por los tiempos indicados.

máticos sulfurados (dibenzotiofeno; DBT), y que además efectúan reacciones de sulforeducción, ha sido demostrada. Estas bacterias pueden considerarse como organismos aerobios facultativos por su capacidad de crecer en medios aeróbicos (CN) y anaeróbicos (medios I, DBTs y DBT). La curva de crecimiento de la población bacteriana proveniente de medio DBT, crecida en medio CN, presentó una fase de latencia y otra de crecimiento exponencial de 4-6h y 24h, respectivamente, mientras la fase estacionaria se prolongó hasta 196h sin aparente mortalidad, lo que demuestra la viabilidad de las bacterias después de la incubación en medio DBT. Las reacciones de sulforeducción y desulfurización se detectaron a las 24h de incubación en condiciones de anaerobiosis y en un intervalo de temperaturas relativamente amplio (42°-75°C). La estimulación inducida por lactato en la intensidad de la reacción podría explicarse ya que el lactato, una molécula más fácilmente degradable por las bacterias, suministraría el C para sustentar las necesidades metabólicas de las células, mientras el S sería suministrado por el DBT (Kurita *et al.*, 1971). Este último actuaría como el único aceptor de electrones durante el crecimiento bacteriano, originando H_2S (Lizama *et al.*, 1995). Además, el bifenílo originado en la reacción de desulfurización del DBT es una molécula muy refractaria a la biodegradación, por lo que las células preferirán al lactato para satisfacer su necesidad de C. No obstante, en experimen-

tos previos se constató que en medio DBT 17,9 μM , la población bacteriana alcanzaba la fase estacionaria a las 72-90h de incubación, pero la adición de cantidades apropiadas de DBT a los cultivos cada 72h estimuló la división bacteriana y permitió su crecimiento por periodos mayores (240h), manteniéndose el pH del cultivo en valores cercanos a 8, lo cual es indicativo de la utilización del C del DBT para sustentar los requerimientos metabólicos bacterianos (Hernández, 2004). Además, en presencia únicamente de DBT, la acumulación de bifenílo en el medio de cultivo fue constante y muy abundante, sin detectarse intermediarios a los tiempos ensayados. Parecía que el DBT es directamente desulfurado a bifenílo y H_2S . Kim *et al.*, (1990) señalan que en la desulfurización de DBT en anaerobiosis se produce bifenílo mercaptano, el cual es inmediatamente transformado a bifenílo por acción de una hidrogenasa, liberándose H_2S . Al respecto, Brugna *et al.* (1999) reportan evidencia de una hidrogenasa en la bacteria sulfuroreductora *Desulfuromonas acetoxidans*. En los presentes experimentos (CG y CG/MS) no fue detectado tal intermediario, situación que podría implicar un sistema enzimático propio de la cepa RD para la desulfurización de compuestos sulfurados.

La cepa aislada de medio DBT, un bacilo Gram positivo, transformó el compuesto aromático a niveles de 70% a las 24h de incubación, y a las 72h la degradación alcanzó el 91%. El sistema enzimático responsable de la degradación de DBT fue capaz de realizar la transformación en condiciones extracelulares, pues extractos libres de células provenientes de la cepa crecida en medio DBT, incubados con medio DBT sin

previo uso, fueron capaces de efectuar la reacción de desulfurización. Estos eventos fueron demostrados mediante la detección de DBT remanente en los sobrenadantes libres de células obtenidos de tales sistemas. A las 72h de incubación, el sistema libre de células, redujo la cantidad de DBT en más del 90%. No obstante, estos experimentos no descartan la posibilidad de que el sistema enzimático degradador de DBT no pudiese funcionar intracelularmente, aunque los resultados indican que el sistema enzimático responsable de la degradación de DBT funciona extracelularmente, y que probablemente es excretado al medio de cultivo, para lograr degradar la molécula orgánica (DBT) presente en el mismo. Sin embargo, existe la posibilidad de que la actividad enzimática presente en los medios pudiese originarse por lisis bacteriana, lo cual no fue evaluado. Este es un punto en discusión, ya que hay reportes indicativos de que la degradación de DBT se efectúa intracelularmente, mientras otros sostienen que la desulfurización ocurre en la interfase pared celular y medio extracelular, o membrana plasmática-pared celular (Kayser *et al.*, 1993; Oldfield *et al.*, 1997; Patel *et al.*, 1997; Kilbane y Le Borgne, 2004). Independientemente de donde actué el sistema enzimático, las bacterias podrían incorporar productos sulfurados y carbonados a vías metabólicas que le asegurasen la síntesis de productos indispensables para satisfacer sus necesidades metabólicas.

De acuerdo a los resultados obtenidos, el DBT es transformado en bifenílo, acumulándose en el medio de cultivo e indicando que la vía de degradación sería la no destructiva y reductiva, la cual procede a través de la remoción del S del DBT por ruptura de los enlaces C-S-C en la molécula, y el S se liberaría como H_2S . La formación de H_2S se evidenció por la coloración oscura desarrollada en los sistemas bacteriano y libre de células y por el fuerte y característico olor generado por las incubaciones.

Estos resultados indican que la cepa bacteriana RD posee la maquinaria enzimática necesaria para efectuar reacciones de sulforeducción, usando hidrocarburos como únicas fuente de C y los sulfatos presentes en el medio de cultivo. Además, debe poseer la actividad desulfurizadora, pues en ausencia de sulfatos y usando DBT como única fuente de C y S, efectuó la remoción del heteroátomo. Si se asume la intervención del H_2 en el proceso, el DBT aceptaría electrones de éste, reduciéndose, y el bifenílo y H_2S serían los receptores del hidrógeno oxidado.

La biodesulfurización (BDS) aventaja a la hidrodesulfurización (HDS) en varios aspectos. Mientras la HDS debe llevarse a cabo a altas temperaturas (200-450°C), la BDS ocurre a ba-

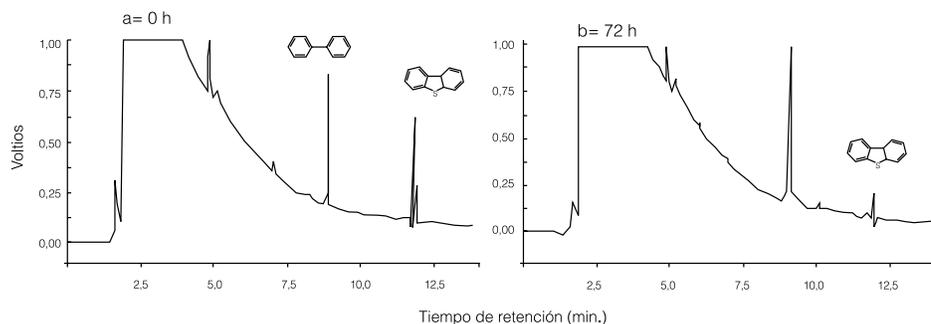


Figura 5. Determinación de DBT remanente en incubaciones de filtrados libres de células mediante cromatografía de gases.

jas temperaturas (30-60°C); HDS requiere altas presiones (150-200psig) y BDS ocurre a presión atmosférica; HDS requiere fuentes exógenas de hidrógeno y catalizadores metálicos, lo cual es innecesario en BDS. Además, en BDS no se generan productos colaterales que eventualmente incrementarían los costos de refinación (Mohebalí y Ball, 2.008). Finalmente, la molécula producto de la desulfurización, el bifenilo, es de un alto valor agregado, entre otros para elevar el octanaje en gasolinas. No obstante, la complementación de ambas metodologías constituye aún una estrategia válida para la remoción de S en hidrocarburos y sus derivados.

Adicionalmente, disponer de organismos termófilos que realicen desulfurizaciones a temperaturas relativamente altas (55-65°C) proporciona condiciones experimentales deseables respecto a los sistemas mesófilos (30-40°C); las relativas altas temperaturas inducirán una menor viscosidad del medio de reacción, habrá una mayor solubilización de los reactantes, se incrementará la velocidad de reacción y se reducirá al mínimo la posibilidad de contaminación microbiana (Gray *et al.*, 2003; Soleimani *et al.*, 2007).

Finalmente, el aislamiento de una cepa bacteriana pura, termófila, degradadora de DBT, suministra la posibilidad de ser usada, al menos en primera instancia, para descontaminar habitats terrestres o acuáticos contaminados por derrames petroleros o por productos derivados de hidrocarburos. Adicionalmente, la presencia del sistema enzimático activo en el medio extracelular, podría plantear su inmovilización para la desulfurización de productos provenientes del petróleo y otras fuentes, sin la necesidad de usar cultivos bacterianos o sistemas solubles libres de células.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la colaboración de Luís Amaiz y Darío Valbuena. Este trabajo fue financiado por la subvención CDCH-UC (No. 1014-04); FACYT-UC (partida 4.07) y por el CIMA-UC, de la Universidad de Carabobo.

REFERENCIAS

Altamirano M, Pozo M (2000) Aislamiento e identificación de bacterias hidrocarburoclíticas provenientes de un suelo sometido a biorremediación. XXVII Cong. Interam. Ingeniería Ambiental y Sanitaria. Buenos Aires, Argentina. 6 pp.

Baldi F, Pepi M, Fava F (2003) Growth of *Rhodospiridium toruloides* strain DBVDG on dibenzothiophene crystals and orimulsion. *Appl. Environ. Microbiol* 62: 2689-2696.

Brugna M, Nitschke W, Toci R, Bruschi M, Giudici-Ortoni MT (1999). First evidence for the pres-

ence of a hydrogenase in the sulfur-reducing bacterium *Desulfuromonas acetoxidans*. *Amer. Soc. Microbiol.* 17: 5505-5508.

Bubrenick DV, Record FA, Kindy RJ (1983) Acid rain, an overview of the problem. *Env. Progr.* 2: 15-31.

Castro H, Williams N, Ogram A (1999) Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiol. Ecol.* 31: 1-9.

Daza R (2003) *Aislamiento Caracterización de Bacterias Termófilas Sulfurreductoras, Capaces de Utilizar Dibenzotiofeno como Única Fuente de Carbono y Azufre*. Tesis. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. 54 pp.

Franzmann PD, Robertson WJ, Zappia L, Davis GB (2002) The role of microbial population in the containment of aromatic hydrocarbons in the subsurface. *Biodegradation* 13: 65-78.

Gai Z, Yu B, Li L, Wang Y, Ma C, Feng J, Cheng Z, Xu P (2007) Cometabolic degradation of dibenzofurane and dibenzothiophene by a newly isolated carbazol degrading *Sphingomonas* sp. strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 2832-2838.

Galárraga F, Pérez J (1991) Compuestos orgánicos con azufre en el petróleo: Usos y aplicaciones. *Soc. Venez. Quím.* 14: 3-8.

González F (2004) *Estudio de la Posible Vía de Utilización de Dibenzotiofeno por Bacterias Termófilas Sulfurreductoras*. Tesis. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. 69 pp.

Gray KA, Mrachko GT, Squires CH (2003) Biodesulfurization of fossil fuels. *Curr. Opin. Microbiol.* 25: 229-235.

Hernández A (2004) *Fraccionamiento de la Actividad Sulfo-Reductora de Bacterias Termófilas Degradadoras de Dibenzotiofeno*. Tesis. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. 77 pp.

Ishii Y, Kogaki S, Furuya T, Kino K, Kirimura K (2005) Thermophilic biodesulfurization of various heterocycle sulfur compounds and crude straight run light gas oil fraction by a newly isolated strain *Mycobacterium phlei* WU 0103. *Curr. Microbiol.* 50: 63-70.

Izumi Y, Ohshiro T, Ogino H, Hine Y, Shima M (1994) Selective Desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 223-226.

Kargi F, Robinson JM (1983) Microbial oxidation of dibenzothiophene by the thermophile organism *Sulfolobus acidocaldarius*. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 687-690.

Kayser KJ, Bielaga-Jones BA, Jackowski K, Odusan O, Kilbane JJ (1993) Utilization of organosulfur compounds by axenic and mixed cultures of *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *J. Gen. Microbiol.* 139: 3123-3129.

Kayser KJ, Cleveland L, Park H, Kwan J, Kolhatkar A, Kilbane J (2002) Isolation and characterization of a moderate thermophilic *Mycobacterium phlei* GTIS10 capable of dibenzothiophene desulfurization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59: 737-746.

Kilbane JJ (1990) Sulfur specific microbial metabolism of organic compounds. *Res. Conserv. Recycl.* 3: 69-79.

Kilbane JJ, Le Borgne S (2004) Petroleum biorefining: the selective removal of sulfur, nitrogen, and metals. In Vazquez Duhalt R, Quintero Ramírez R (Eds.) *Petroleum Biotechnology, Developments and Perspectives*. Elsevier. Amsterdam, Holanda. pp. 29-65.

Kim BH, Shin PK, Na JU, Park DH, Bang SH (1996) Microbial petroleum desulfurization. *J. Microbiol. Biotechnol.* 6: 229-308.

Kim HY, Kim TS, Kim BH (1990) Degradation of organic sulfuric compounds and reduction of dibenzothiophene by biphenyl and hydrocarbons sulfide by *Desulfovibrio desulfuricans* MC. *Biotech. Lett.* 12: 761-764.

Kodama K, Umehara K, Shimizu K, Nakatani S, Minoda Y, Yamada K (1973) Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway. *Agric. Biol. Chem.* 37: 45-50.

Konishi J, Ishii Y, Onaka T, Okumura K, Suzuki M (1997) Thermophilic carbon sulfur bond targeted biodesulfurization. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 3164-3169.

Kurita ST, Endo T, Nakamura H, Yagi T, Tamiya N (1971) Decomposition of some organic sulfur compounds in petroleum by anaerobic bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 17: 185-198.

Le Fau A, Rajagopal B, Daniels L, Fauque G (1990) Thiosulfate, polythionates and elemental sulfur assimilation and reduction in the bacterial world. *FEMS* 70: 351-382.

Li FL, Xu P, Ma C, Lou LL, Wang XS (2003) Deep desulfurization of hydrodesulfurization treated diesel oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium* sp. X7B. *FEMS Microbiol. Lett.* 223: 301-307.

Li FL, Xu P, Feng J, Zheng Y, Ma C (2005) Microbial desulfurization of gasoline in a *Mycobacterium goodii* X7B immobilized cell system. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 276-281.

Li FL, Zhang Z, Feng J, Cai X, Xu P (2007) Biodesulfurization of DBT in tetradecane and crude oil by a facultative thermophilic bacterium *Mycobacterium goodii* X7B. *J. Biotechnol.* 127: 222-228.

Lizama HM, Wilkins LA, Scott TC (1995) Dibenzothiophene sulfur can serve as sole electron acceptor during growth by sulfate reducing bacteria. *Biotechnol. Lett.* 17: 113-116.

Madigan M (1998) *Biología de los Microorganismos*. Prentice Hall. España. pp 140-152.

Mc Farland BL (1999) Biodesulfurization. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 257-264.

Ming So C, Young L (1999) Isolation and characterization of a sulfate reducing bacterium that anaerobically degrades alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2969-2976.

Mohebalí G, Ball AS (2008) Biocatalytic desulfurization (BDS) of petrodiesel fuels. *Microbiology* 154: 2169-2183.

Monticello DJ, Finnerty NR (1991) Microbial desulfurization of fossil fuels: A review. *Biotechnol. Bioeng. Sym.* 16: 205-209.

Mora M, Morales G (2002) Caracterización de bacterias reductoras de sulfato provenientes de las aguas termales de Las Trincheras, Estado Carabobo. Tesis. Universidad de Carabobo. Valencia, Venezuela. 51 pp.

Oda S, Ohta H (2002) Biodesulfurization of dibenzothiophene with *Rhodococcus erythropolis* ATCC 53968 and its mutant in an interface bioreactor. *J. Biosci. Bioeng.* 94: 474-477.

Oldfield C, Pogrebinsky O, Simmonds J, Oson ES, Kulpa CF (1997) Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by *Rhodococcus* sp. strain IGTS8 (ATCC 53968). *Microbiology* 143: 2961-2973.

Omori T, Mounal, Saiki Y, Komada T (1992) Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strains SY1. *Appl. Environ. Microbiol* 58: 911-915.

Onodire-Yamada K, Marimoto M, Tani Y (2001) Degradation of dibenzothiophene by sulfate

- reducing bacteria cultured in the presence of only nitrogen gas. *J. Biosci. Bioeng.* 91: 91-93.
- Oshiro T, Así Y, Matsubara T, Ueda K, Sumí Y, Kina K, Kirimura K (2005) Dibenzothiophene desulfuring enzymes from moderately thermophilic bacterium *Bacillus subtilis* WU S2B: purification, characterization and over expression. *J. Biosci. Bioeng.* 100: 266-273.
- Patel SB, Kilbane JJ, Webster DA (1997) Biodesulfurization of dibenzothiophene in hydrophobic media by *Rhodococcus* strain IGTS8. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 69: 100-106.
- Pineda-Flores G, Mesta-Howard AM (2001) Petroleum asphaltenes: generated problematic and possible biodegradation mechanisms. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 43: 143-150.
- Ramson I, Rivas C (1999) Biocatalizador para remover azufre orgânico e hidrocarburos. *Vis. Tecnol.* 7: 15-22.
- Reuter P, Rabus R, Wilkes H, Aeckersberg F, Rainey F, Jannasch H, Widdel F (1994) Anaerobic oxidation of hydrocarbons in crude oil by new types of sulfate reducing bacteria. *Nature* 372: 455-458.
- Rhee SK, Chang JH, Chang YK, Chang HN (1998) Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated *Gordonia* strain, CYKS1. *Appl. Env. Microbiol.* 64: 2327-2331.
- Roychoudhury AN (2004) Sulphate metabolism among thermophiles and hyperthermophiles in nature aquatic systems. *Biochem. Soc. Trans.* 32: 172-174.
- Soleimani M, Bassi A, Margaritis A (2007) Biodesulfurization of refractory organic compounds in fossil fuels. *Biotechnol. Adv.* 25: 570-596.
- Tanimoto Y, Bak F (1994) Anaerobic degradation of methylmercaptan and dimethyl sulfide by a newly isolate thermophile sulfate reducing bacteria. *Appl. Env. Microbiol.* 60: 2450-2455.
- van Afferden M, Schacht S, Klein J, Trupper H (1990) Degradation of dibenzothiophene by *Brevibacterium* sp DO. *Arch. Microbiol.* 153: 324-328.
- van Afferden M, Tappe D, Beyer M, Trupper H, Klein J (1993) Biochemical mechanisms for the biodesulfurization of coal relevant organic sulfur compounds. *Fuel* 72: 635-643.
- Yu B, Xu P, Shi Q, Ma C (2006) Deep desulfurization oil diesel and crude oils by a newly isolated *Rhodococcus erithropolis* strain. *Appl. Env. Microbiol.* 72: 54-58.

SULFOREDUCTION AND DESULFURIZATION REACTIONS BY THERMOPHILIC BACTERIA ISOLATED FROM HYDROTHERMAL MUD AT LAS TRINCHERAS, VENEZUELA

Oscar Valbuena, Juan Carlos Pereira, Rebeca Daza, Freddy González, Angelina Hernández, Mónica Mora, Graciela Morales and Luis Medina

SUMMARY

A relevant and expensive process for refining crude oil is the elimination of sulfur atoms from organic molecules usually present in it or its derived products. For achieving such a goal, hydrodesulfurization reactions must be executed under severe temperature and pressure conditions, in the presence of metallic catalysts. A biotechnological alternative to solve this situation could be the use of bacteria endowed with appropriate enzymatic systems to perform the reactions under milder experimental conditions, at lower cost, and without catalysts. For such purposes, bacterial populations isolated from hydrothermal mud at Las Trincheras, Venezuela, were grown on chemically defined media complemented with hexane, heptane and dibenzothiophene (DBT) as carbon sources, and under anaerobic conditions they carried out sulfate reduction

reactions. The enzymatic activity was detected on a wide range of temperatures (42-75°C) and it was stimulated by adding lactate to the media. An isolated strain (RD), Gram positive bacilli, used DBT as the sole carbon and sulfur source under anaerobic condition at 55°C. The DBT degradation (desulfurization) evaluated by gas chromatography without and with mass spectrography, was also achieved by cell free growing media previously used by the strain RD. This fact indicated that the DBT degrading enzymatic system can work in the extracellular medium, and the possibility exists that it could be secreted to the culture medium. Besides, in both systems, bacteria and cell free growing media, biphenyl was detected as the unique intermediary molecule in the DBT desulfurization reaction.

ATIVIDADES DE REDUÇÃO DE SULFATO Y DESSULFURIZAÇÃO POR BACTÉRIAS TERMÓFILAS DE LODOS HIDROTÉRMICOS DE LAS TRINCHERAS, VENEZUELA

Oscar Valbuena, Juan Carlos Pereira, Rebeca Daza, Freddy González, Angelina Hernández, Mónica Mora, Graciela Morales e Luis Medina

RESUMO

Um processo relevante e custoso para o refinamento de petróleo pesados é a eliminação de átomos de enxofre de moléculas orgânicas usualmente presentes naqueles ou em seus produtos derivados. Para alcançar tal meta, reações de hidrodessulfurização (HDS) devem ser executadas sob condições severas de temperatura, pressão e em presença de canalizadores metálicos. Uma alternativa biotecnológica para solucionar esta situação poderia implicar o uso de bactérias dotadas de sistemas enzimáticos apropriados capazes de efetuarem as reações sob condições de temperatura e pressão menos severas e em ausência de canalizadores. Para esse efeito, populações bacterianas isoladas de lodo hidrotermal de Las Trincheras, Venezuela, foram cultivadas em meios quimicamente definidos suplementados com hexano, heptano e dibenzotiofeno (DBT), como fontes de carbono, e, sob anaerobiose, efetuaram reações de redução

de sulfato. A atividade enzimática foi detectada num amplo intervalo de temperaturas (42-75°C) e, estimulada pela incorporação de lactato ao meio de cultivo. Uma cepa isolada, bacilos Gram positivos, utilizou DBT como fonte exclusiva de carbono e enxofre em cultivos anaeróbicos a 55°C. A degradação de DBT (dessulfurização) pela bactéria foi avaliada através de cromatografia gasosa e espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa, e a reação foi também alcançada pelo meio de cultivo livre de células, previamente utilizado pela cepa. Isso indica que o sistema enzimático degradador de DBT pode funcionar extracelularmente e é provavelmente excretado para o meio de cultivo durante o crescimento bacteriano. Tanto no sistema bacteriano como no filtrado livre de células, foi detectado bifenilo como um intermediário no processo de dessulfurização do DBT.