

# Efecto de la presencia de oleato de etanolamina sobre la actividad desulfurizadora de *Pseudomonas sp* ATCC 39327

Oscar F. Sánchez, Carlos J. Almeciga y Edelberto Silva\*

## Resumen

Se evaluó la actividad desulfurizadora de la cepa *Pseudomonas sp* ATCC 39327 sobre el dibenzotiofeno (DBT) en un sistema de fermentación bifásico de agua: n-hexano y en presencia o no del tensoactivo oleato de etanolamina. Los metabolitos detectados al final del proceso indican que el microorganismo usa la ruta metabólica 4S para remover el azufre del DBT. El máximo porcentaje de azufre removido fue de 6,6 % en un sistema de fermentación 50:50 (agua: n-hexano) y en presencia de oleato de etanolamina.

**Palabras clave:** dibenzotiofeno - pseudomonas - desulfurización

## Summary

### Effect of the surfactance presence on the biodesulfurization activity of *Pseudomonas sp* ATCC 39327

Desulfurization activity on dibenzothiophen (DBT) by *Pseudomonas sp* ATCC 39327 was evaluated in a two phase fermentation system of water and n-hexane with and without the tensoactive ethanolamine oleate. The metabolics found at the end of the process show that the microorganism use the 4S metabolic path way to remove the sulfur from DBT. The highest percent of sulfur removed was 6.6% in a fermentation system of 50:50 (water: n-hexane) with ethanolamine oleate.

**Key words:** dibenzothiophene - *Pseudomonas* - desulfurization

## Introducción

El contenido de azufre en el petróleo varía entre 0.025 y 5% de acuerdo con la ubicación geográfica del pozo; en Colombia el nivel de azufre se encuentra entre un 0,55% (Caño Limón) y 1,5% (Barrancabermeja). El azufre se encuentra en forma elemental, inorgánica como sulfato, sulfito, tiosulfato ó en más de 200 compuestos organo azufrados incluyendo tioles, tiofenos, mercaptanos, sulfidas tianocíclicas y cíclicas, tiandanos,

bifenildisulfidas, benzotiofeno y dibenzotiofeno sustituidos (1-6).

El principal inconveniente en la combustión de los combustibles fósiles es la conversión del azufre y nitrógeno a sus respectivos óxidos, los que participan en la formación de lluvia ácida deteriorando lagos, zonas agrícolas, reservas forestales y edificaciones (4,7-9). Las emisiones de SO<sub>2</sub> son precursoras de la formación de aerosoles sulfatados, considerados como uno de

Recibido para evaluación: 27 de marzo de 2003  
Aceptado para publicación: 15 de mayo de 2004

\* Departamento de Farmacia, Universidad Nacional de Colombia. A.A. 14490. Bogotá D.C. Colombia.  
E-mail: esilvag@unal.edu.co

los agentes más importantes en el material particulado presente en el aire que afectan la salud (4).

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 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 (Artículo 1 y Artículo 4), donde 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. 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 (10).

La degradación microbiológica de los compuestos azufrados presentes en los combustibles fósiles ha surgido como un proceso alternativo frente a la degradación química mediante la hidrodesulfurización (HDS), lo que ha promovido la investigación del uso de microorganismos en la desulfurización. La alta proporción de tiofenos en el crudo ha permitido seleccionarlos como modelos para el estudio

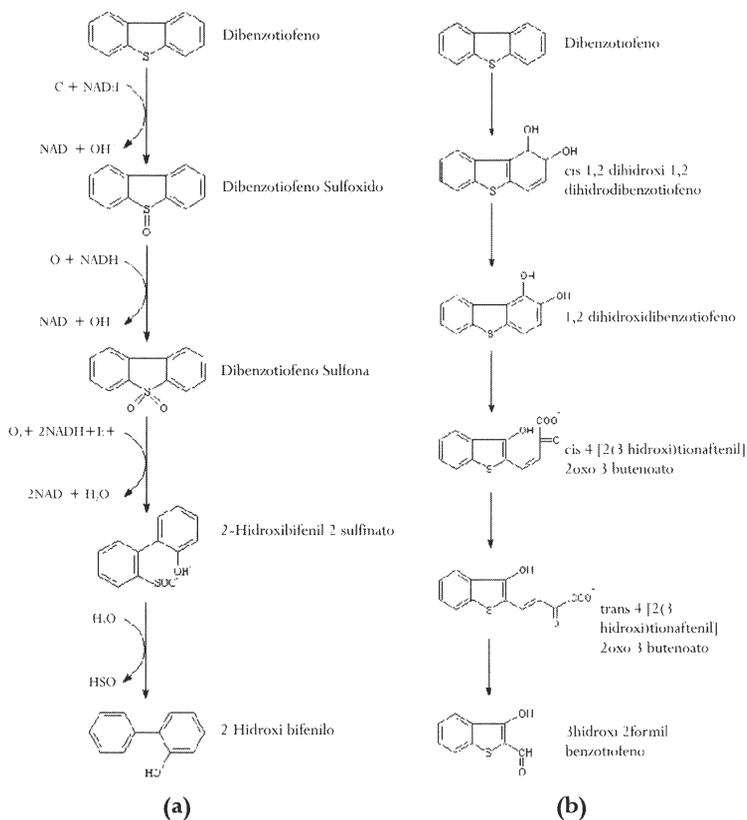


Figura 1. Rutas metabólicas de degradación del DBT (a) Ruta 4S y (b) Ruta de Kodoma.

de la actividad desulfurizadora de los microorganismos; siendo el dibenzotiofeno (DBT) el compuesto más utilizado debido a que es uno de los primeros en producirse durante el craqueo catalítico y uno de los más difíciles de remover mediante la HDS. Las investigaciones han encontrado tres rutas metabólicas para la remoción de azufre; la ruta 4S ataca selectivamente el azufre de los compuestos sin alterar el poder calorífico del combustible (Figura 1a), la ruta de Kodoma donde se obtienen derivados hidrosolubles con la disminución del poder calorífico del combustible (Figura 1b) y una tercera ruta la cual es completamente destructiva donde se produce  $\text{CO}_2$ ,  $\text{SO}_3$  y  $\text{H}_2\text{O}$ . (3, 8, 11-16).

El objetivo del artículo es mostrar el efecto de la proporción de fase orgánica y la presencia o no de oleato de etanolamina sobre la actividad desulfurizadora de la cepa *Pseudomonas sp* ATCC 39327.

## Materiales y métodos

**Microorganismo y medios de cultivo:** Se utilizó la cepa *Pseudomonas sp* ATCC 39327. La activación del microorganismo se realizó en caldo CASO (Oxoid) al 0,3% a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  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  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas. Finalmente se tomó una colonia desde el agar CVB y se inoculó 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, 1% de glicerina y 15 g de agar-agar (BBL)) a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  y 200 rpm hasta obtener una DO a 600 nm de  $25 \pm 1\%$  de

transmitancia equivalente a una población de  $10^8$  UFC  $\text{mL}^{-1}$  (17).

**Sistema de fermentación:** Se usó agua y n-hexano en proporciones de 50:50 y 70:30 respectivamente en un volumen total de 100 mL; de igual manera se adecuaron tres blancos (blanco 1 sin microorganismo ni oleato de etanolamina y con DBT, blanco 2 sin microorganismo con oleato de etanolamina y DBT y blanco 3 con tensioactivo sin microorganismo y DBT) y un control con microorganismo y oleato de etanolamina pero sin DBT): Tabla 1.

La fase acuosa se constituyó por un medio mínimo de sales (18) con oleato de etanolamina (Universidad Nacional de Colombia Dpto. Farmacia) en una concentración de 500 ppm (17) y n-hexano (Merck grado analítico) con DBT (Acros) en una concentración de 500 ppm. Las fermentaciones se realizaron durante 7 días a  $35 \pm 1^\circ\text{C}$  y 200 rpm (17), al finalizar la fermentación las fases se separaron a 3000 g durante 20 minutos, y se tomó una alícuota de 2 mL de la fase acuosa para el análisis de sulfato. El extracto seco de cada fase se obtuvo mediante evaporación al vacío (n-hexano) ó liofilización

**Tabla 1.** Composición de los sistemas de fermentación, blancos y control empleados. F.A.: Fase acuosa, T: Oleato de etanolamina, F.O.: Fase orgánica, M: Microorganismo, \*: La fase orgánica no contiene DBT.

70 : 30	68	1	1	30
70 : 30	69	0	1	30
50 : 50	48	1	1	50
50 : 50	49	0	1	50
Blanco 1	50	0	0	50
Blanco 2	49	1	0	50
*Blanco 3	48	1	0	50
*Control	49	1	1	50

(fase acuosa); cada fermentación se realizó por triplicado.

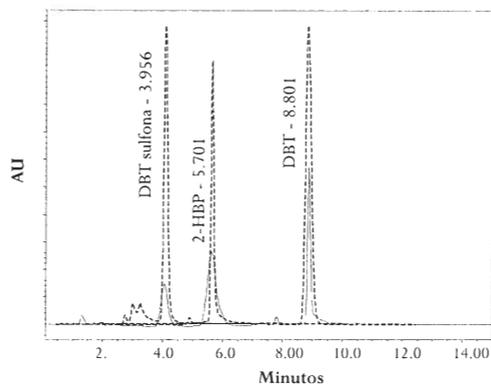
**Análisis:** La determinación del sulfato se realizó por turbidimetría a 420 nm previa precipitación con cloruro de bario. Para la determinación del DBT, DBT sulfona y 2-hidroxibifenilo (2-HBP) (Acros), se reconstituyeron los extractos secos mediante cuatro extracciones sucesivas con 1 mL de acetonitrilo (Merck grado analítico), procedimiento que se estandarizó mediante la determinación del porcentaje de recuperación de los metabolitos en muestras enriquecidas (datos no mostrados), realizando la cuantificación por HPLC (Waters 600) con una columna NovaPak C-18 (30 cm x 3.9 mm x 5  $\mu$ m) con un gradiente lineal de acetonitrilo (Merck grado HPLC)-agua a un flujo de 1 mL/min. Los picos fueron monitoreados a 254 nm y el espectro UV de cada pico se obtuvo en un rango de 210 y 400 nm (19), cada muestra se analizó por triplicado.

Los datos obtenidos se evaluaron a través del análisis de varianza ANOVA y la prueba de Duncan empleado el software Statgraphics 4.0.

**Perfil de viabilidad:** Se realizó un montaje de siete fermentaciones empleando el sistema 50:50 (agua – n hexano) y oleato de etanolamina, ya que fue el sistema que presentó mayor remoción de azufre. Diariamente se tomó una fermentación y se separaron las fases (según el procedimiento descrito anteriormente), tomando 100  $\mu$ L de la fase acuosa para realizar diluciones entre  $10^{-6}$  a  $10^{-9}$ , sembrando 1 mL de cada dilución en agar CVN a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas.

## Resultados

Mediante la comparación de los tiempos de retención y los espectros ultravioleta obtenidos mediante HPLC para los metabolitos obtenidos y los patrones se infiere que la cepa



**Figura 2.** Comparación de cromatogramas para fermentación cepa *Pseudomonas sp* ATCC 39327 (—) y los patrones (- -).

*Pseudomonas sp* ATCC 39327 remueve el azufre del DBT empleando la ruta 4S debido a la detección de DBT sulfona, 2-hidroxibifenilo en la fase orgánica (Figura 2) y de sulfato en la fase acuosa.

Empleando un diseño experimental factorial  $2^2$ , siendo los factores la proporción de las fases y la presencia o no de oleato de etanolamina, se aplicó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Duncan a los datos obtenidos. Se estableció mediante el ANOVA que los factores bajo estudio tiene efecto sobre la remoción de azufre (Tabla 2 y Figura 3a - 3b), demostrándose mediante la prueba de Duncan diferencia estadística entre los niveles de cada factor (Tabla 3 y Figura 3c).

El medio de fermentación 50:50 (agua – n hexano) con oleato de etanolamina presentó una remoción promedio de azufre del 6,6 %, siendo el sistema con mayor porcentaje de azufre removido frente a los otros sistemas de fermentación (Tabla 4). La baja remoción de azufre en el sistema fermentativo con proporción de fases 70:30 (agua - n-hexano) se pudo deber a la elevada pérdida de la fase orgánica por volatilización de ésta, produciendo la precipitación del DBT impidiendo ser metabolizado

**Tabla 2.** Análisis de varianza (ANOVA) para el porcentaje de azufre removido para los diferentes medios de fermentación.

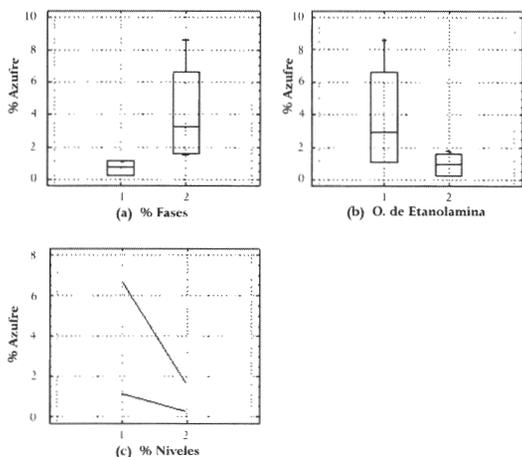
Análisis de varianza para el Azufre Removido - Suma de Cuadrados				
Variables	Suma de Cuadrados	g.l.	Media de Cuadrados	Valor-F
EFECTOS PRINCIPALES				
A: % Fases	35.576520	1	35.576520	37.303
B: O. Etanolamina	25.789872	1	17.388169	27.041
INTERACCIONES				
AB	13.259416	1	13.259416	13.903
RESIDUAL	7.6298113	8	0.9537264	
TOTAL	82.255620	11		

**Tabla 3.** Prueba de intervalos múltiples de Duncan para el porcentaje de azufre removido para los diferentes medios de fermentación.

Análisis de Intervalos Múltiples para [DBT] p			
Variable	Ensayos	Media Mínima Significativa	Grupos Homogéneos
1	6	0.7061667	X
2	6	4.1498333	X
	Contraste 1 - 2	Diferencia -3.44367*	
Análisis de Intervalos Múltiples para [DBT] ppm por Tensoactivo			
Variable	Ensayos	Media Mínima Significativa	Grupos Homogéneos
2	6	0.9620000	X
1	6	0.8940000	X
	Contraste 1-2	Diferencia 2.93200*	

\* denota una diferencia estadísticamente significativa

Factor	Hipótesis	$F_{0.05(1,8)}$	$F_0$	Test	Decisión
A: Proporción de las fases	$H_0 : \alpha_i = 0$ $H_1 : \alpha_i \neq 0$	5,32	26,8	Rechazar $H_0$ si $F_0 > F_{0.005(1,8)}$	Rechazar $H_0$
B: Presencia del Oleato de etanolamina	$H_0 : \beta_i = 0$ $H_1 : \beta_i \neq 0$	5,32	18,2	Rechazar $H_0$ si $F_0 > F_{0.005(1,8)}$	Rechazar $H_0$
Interracción entre A y B	$H_0 : \beta_{ij} = 0$ $H_1 : \beta_{ij} \neq 0$	5,32	21,7	Rechazar $H_0$ si $F_0 > F_{0.005(1,8)}$	Rechazar $H_0$



**Figura 3.** (a) Efecto de la proporción de las fases (1 = 70:30; 2 = 50:50), (b) Efecto del Oleato de etanolamina (1' = presente; 2' = ausente) y (c) la interacción de estos factores sobre el porcentaje de azufre removido.

por el microorganismo mientras que en la proporción 50:50 la pérdida de n hexano no causó la precipitación del DBT.

El perfil de viabilidad en el sistema 50:50 con oleato de etanolamina muestra que el microorganismo es viable manteniendo constante su población entre valores de  $6,3 \times 10^8$  a  $7,6 \times 10^8$  UFC mL<sup>-1</sup>. Estos resultados contrastan con estudios realizados por Oshiro (8) sobre la actividad desulfuradora de una cepa de *Rhodococcus* en presencia de varios hidrocarburos, mostrando que a una concentración del 30% de fase orgánica es optima para la desulfurización, por encima de la cual se reduce la actividad

**Tabla 4.** Remoción de azufre promedio para los diferentes sistemas fermentativos (N.D = No detectable y N.C = No cuantificable).

Proporción de Fase	Oleato de Etanolamina	
	Presente	Ausente
50:50	6,6 %	1,6 %
70:30	N.C	N.D

desulfurizadora dada la disminución en la viabilidad del microorganismo.

Estudios de biodesulfurización realizados en sistemas acuosos saturados con DBT y con diferentes microorganismos, han mostrado una actividad desulfurizadora hasta del 30% principalmente con *Rhodococcus eruthropolis* y *Arthrobacter*; no obstante presentan una baja resistencia frente a hidrocarburos por lo que su actividad en sistemas de dos fases agua:hidrocarburo se ve disminuida hasta un 2%, los hidrocarburos empleados principalmente son n-decano y n-dodecano dada su baja toxicidad para los microorganismos (8, 20)

Los resultados mostrados en este artículo permiten establecer una nueva metodología para la remoción de azufre a partir de DBT empleando una cepa *Pseudomonas*. Esta metodología se podría emplear para evaluar la actividad desulfuradora de aislados nativos de *Pseudomonas*, lo que permitiría el desarrollo de un nuevo modelo de desulfurización.

## Bibliografía

1. P. Fedorak y W. Westlake, Microbial degradation of organic compounds in Prudhoe Bay crude oil, *Can. J. Microbiol.*, **29**, 291 (1983).
2. P. Fedorak y D. Grbic-Galic, Aerobic cometabolism of benzothiophene and 3-methylbenzothiophene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 932 (1991).
3. M. Lee, J. Senius y M. Grossman, Sulfur-Specific Microbial Desulfurization of Sterically Hindered Analogs of Dibenzothiophene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 4362 (1995).
4. D. Monticello y W. Finnelly, Microbial Desulfurization of Fossil Fuels. *Ann. Rev. Microbiol.*, **39**, 371 (1985)

5. D. Monticello, D. Bakker y W. Finnerty, Plasmid mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* strains, *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 756 (1985).
6. Gestión Ambiental en Ecopetrol S.A. <http://www.ecopetrol.com.co>
7. Y. Izumi, T. Ohshiro, H. Ogino, Y. Hine y M. Shimao, Selective Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 223 (1994).
8. T. Oshiro, T. Hirata y Y. Izumi, Microbial desulfurization of dibenzothiophene in the presence of hydrocarbon, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **44**, 249 (1995).
9. F. Sagardía, J. Rigua, A. Martínez, F. Fuentes, C. Lopez y W. Flores, Degradation of benzothiophene and related compounds by soil *Pseudomonas* in a oil-aqueous environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **29**, 722 (1975).
10. 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)
11. S. Armstrons, B. Sankey y G. Voordouw, Conversion of dibenzothiophene to biphenyl by sulfate-reducing bacteria isolated from oil field production facilities, *Biotechnol. Lett.*, **17**, 1133 (1995).
12. K. Kodama, S. Nakatani, K. Umehara, K. Shimizu, Y. Minoda y K. Yamada, Induction of dibenzothiophene oxidation by *Pseudomonas jainii*, *Agr. Biol. Chem.*, **34**, 1320 (1970).
13. K. Kodama, K. Umehara, K. Shimizu, Nakatani Shigeru, Y. Minoda y K. Yamada, Identification of microbial products from dibenzothiophene and its proposed oxidation pathway, *Agr. Biol. Chem.*, **37**, 45 (1973).
14. J. Konishi, Y. Ishii, T. Onaka, K. Okamura y M. Suzuki, Thermophilic carbon-sulfur-bond-targeted biodesulfurization, *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**, 3164 (1986).
15. A. Laborde y D. Gibson, Metabolism of dibenzothiophene by *Beijerinckia* species, *Appl. Environ. Microbiol.*, **34**, 783 (1977).
16. T. Omori, L. Monna, Y. Saiki y T. Kodama, Desulfurization of dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. strain SY1, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 911 (1992).
17. S. Castro. "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 (2000).
18. S. Frassinetti, L. Setti, A. Corti, P. Farrinelli, P. Montevecchi y G. Vallini, Biodegradation of dibenzothiophene by a nodulating isolate of *Rhizobium meliloti*, *Can. J. Microbiol.*, **44**, 289 (1998).
19. D. Cruden, J. Wolfram, R. Rogers y D. Gibson, Physiological properties of a *Pseudomonas* strain which grows with p-xylene in a two-phase (organic-aqueous) medium, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2723 (1992).
20. R. Purdy, J. Lepo y B. Ward, Biodesulfurization of organic compounds, *Curr. Microbiol.*, **27**, 219 (1993).