QUÍMICA (Revisión)
*Acta Científica Venezolana, 57 (2): 77-86, 2006*

# BIODESULFURACIÓN DE COMBUSTIBLES FÓSILES

León[1], Vladimir; Núñez[2] , Oswaldo; Ferrer[2] , Juan

[1] Unidad de Biotecnología del Petróleo, Centro de Biotecnología, Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), c. Hoyo de La Puerta-Baruta, Sartenejas, Caracas 1080, Venezuela. Apartado Postal 17606, Caracas 1015 A, Venezuela.
[2] Laboratorio de Química Ambiental, Universidad Simón Bolívar, c. Hoyo de La Puerta-Baruta, valle de Sartenejas, Caracas 1080, Venezuela, Apartado Postal 89000, Caracas, Venezuela.

*Recibido: 13-10-2005*

**RESUMEN:** Se presenta a continuación una revisión documental relacionada con los aspectos de mayor interés en la desulfuración bacteriana de combustibles fósiles. Específicamente se desarrolló una investigación en cuanto al marco general y justificación de esta técnica, las rutas degradativas elucidadas hasta ahora, los microorganismos desulfuradores involucrados, elementos claves en el desarrollo de la desulfuración bacteriana, algunas áreas de progreso y tendencias futuras. **Palabras claves:** Biodesulfuración, combustible fósiles, rutas degradativas.

# FOSSIL FUEL BIODESULFURIZATION

**ABSTRACT:** A documental review related to the central aspects of the fossil fuel biodesulfurization is presented. Specifically, the investigation includes developments with respect to the general framework and justification of the technique, degradative pathways elucidated up to now, the microorganisms involved, applications, areas in progress and future trends. **Key words:** Biodesulfurization, fossil fuel, degradative pathways.

## INTRODUCCIÓN

El petróleo es una mezcla compleja de hidrocarburos orgánicos, incluyendo algunos constituyentes organometálicos. De estos compuestos orgánicos; los que contienen azufre constituyen una pequeña, pero importante fracción debido a que son considerados recalcitrantes o de difícil degradación en el ambiente [37]. El azufre usualmente es el tercer elemento más abundante en el petróleo crudo, normalmente entre un 0,05 y 5% en peso [30, 29,113]. En ese sentido, debido a las estrictas regulaciones ambientales para las emisiones de $SO_x$, gases producidos durante la combustión de los derivados del petróleo y responsables del efecto invernadero, el azufre contenido en la matriz de crudo debe ser reducido al mínimo antes de la quema de estos combustibles [31, 50].

Las refinerías remueven el azufre orgánico de la matriz de crudo y combustibles derivados mediante hidrodesulfuración (HDS). Este es un proceso catalítico que convierte el azufre en sulfuro de hidrógeno; haciendo reaccionar la fracción de combustible con hidrógeno a presiones entre 150-3000 psi y temperaturas entre 290-455 °C, dependiendo de la alimentación y del nivel de desulfuración requerido [32, 37,38,78]. Este procedimiento de hidrodesulfuración elimina solamente una porción de los heterociclos de azufre presentes, ya sea en gasolinas, crudos o destilados medios. Sin embargo, los benzotiofenos y dibenzotiofenos no son removidos totalmente [78]. Sólo son eliminados en mayor porcentaje los compuestos con el azufre en cadenas carbonadas ó como sustituyente. Más aún, los alquildibenzotiofenos con sustituciones cerca del átomo de azufre son conocidos como compuestos estéricamente protegidos, dado que el acceso del átomo de azufre a la superficie del catalizador se imposibilita [38]. Así, mientras mayores y más grandes sean estas sustituciones aumenta esta protección estérica, y por consiguiente su remoción se ve limitada [30,38,70]. En ese mismo sentido, un hecho que corrobora tal situación es la recalcitrancia de los dibenzotiofenos que ha sido comprobada en derrames como el del Amoco Cádiz, donde representaron la fracción con mayor bioacumulación y resistencia a biodegradarse naturalmente[67]. También, esta recalcitrancia mayor; relativa a otros heterociclos orgánicos ha sido demostrada en algunas otras investigaciones [50,67,76,102].

Desde hace algún tiempo, existe interés en estudiar la diversidad de microorganismos autóctonos capaces de degradar contaminantes tales como petróleo crudo, hidrocarburos policíclicos aromáticos y bifenilos policlorados en diferentes ambientes [8,9,101]. Se han identificado, secuenciado y clonado genes responsables de la producción de enzimas con capacidades desulfuradoras [46], se ha comprobado la participación de diferentes enzimas en la degradación de compuestos xenobióticos[99,110] y se ha encontrado que los genes dsz producen enzimas que degradan al dibenzotiofeno oxidándolo parcialmente [3]. Así, la remoción biológica de azufre (con el objeto de disminuir emisiones durante la quema de combustibles fósiles) es un campo de interés actual para microbiólogos y científicos de otras áreas [7]. La biodesulfuración, es un área de estudio relativamente joven en vista que solo en los últimos diez años se ha verificado un aumento de investigaciones por parte de la comunidad científica. Teniendo en cuenta la utilización creciente de estos combustibles fósiles, la emisión de azufre constituye actualmente uno de los problemas ambientales más notables. En tanto, se prevé que para el año 2010 la producción de petróleo sobrepase los 83 millones de barriles por día; representando esta cifra un gran porcentaje de azufre asociado [37]. Por esta razón la estrategia mayormente aplicada es la eliminación del azufre antes de la combustión, siendo allí donde la biodesulfuración emerge como una alternativa ante el tratamiento convencional. Por otra parte, es bien conocida la utilización de la biodesulfuración en la remediación de sitios contaminados con crudo.

Se pretende entonces tratar de abordar el concepto de biodesulfuración desde una óptica histórico documental con el objeto de entender y conocer lo que se ha logrado hasta nuestros días bajo los diversos enfoques por los cuales ha sido estudiada, desde un punto de vista

cinético, genético, aplicaciones a escala piloto, patentes relativas al tema; así como también se pretende explicar las perspectivas futuras de esta técnica.

*El dibenzotiofeno como modelo de los hidrocarburos sulfurados. Rutas degradativas.*

Entre los hidrocarburos cíclicos que contienen azufre, y que están generalmente integrados en la matriz de los combustibles fósiles, tales como crudo y carbón, los tiofenos condensados son una clase de compuestos que originan preocupación ambiental, debido a su alto potencial de toxicidad biológica, acumulación y persistencia en la biosfera [4].

El dibenzotiofeno, un heterociclo aromático de azufre es considerado como el compuesto modelo que representa la forma en que se encuentra mayoritariamente el azufre orgánico en los combustibles fósiles [107]. Por ello, en la gran mayoría de estudios de biodesulfuración, el dibenzotiofeno es escogido como sustrato. Sin embargo, existen algunos estudios donde se ha experimentado con el combustible de interés y o petróleo crudo. Así, son ejemplos las investigaciones de Fedorak [29], Bressler [12], Folsom [19], Monticello[82], Okada[92], Kirimura [59], entre otros. Algunas de las propiedades físicas, químicas y termodinámicas para esta sustancia (DBT) que también es conocida bajo los siguientes nombres: [1,1'-Bifenil]-2,2'-diyl sulfide, Diphenyliene sulfide, 2,2'-Biphenylylene sulfide, 9-Thiofluoreno, α-Thiofluoreno, se citan a continuación (Tabla I).

**Tabla I.** Propiedades del dibenzotiofeno

| Propiedad | Valor | Unidad | Ref. |
|---|---|---|---|
| **Solubilidad en agua** | 1,47 @ 25ºC | mg/l | 116 |
| **Calor de combustión** | -1570, 7 ±1,1 | Kcal/mol | 90 |
| **Calor de sublimación** | 21,8 ±0,1 | Kcal/mol | 90 |
| **Calor de formación (s)** | 28,76±0,35 | Kcal/mol | 90 |
| **Calor de fusión** | 5.1883 ( a 371 K) | Kcal/mol | 90 |
| **±S fusión** | 13,95 (a 371 K) | Kcal/mol K | 90 |
| **Capacidad calorífica a presión constante** | Cp=0.6709 T(K)-5,4(220-371)K | J/molK | 90 |
| **Temperatura Ebullición** | 605,7 | K | 90 |
| **Temperatura Fusión** | 372±1 | K | 90 |
| **T triple** | 371,820 | K | 90 |
| **Presión de vapor** | $LogP^{s}$(mPa)=17,27 - (4762)/(T(k)) (303.15-348.15)K | - | 90 |
| **Coeficiente de Partición(Agua/Octanol)** | 3120 | - | 77 |

Hasta la fecha han sido elucidadas tres rutas degradativas para la biotransformación del dibenzotiofeno. Básicamente, son oxidaciones parciales y secuenciales hasta modificar la estructura de esta sustancia. La primera es la ruta oxidativa de destrucción del anillo, también conocida como ruta de Kodama [64], la cual usa las mismas enzimas de la ruta de degradación del naftaleno. En esta ruta el DBT es parcialmente oxidado a intermediarios solubles en agua, pero el azufre del DBT permanece intacto. El DBT es degradado por la hidroxilación de uno de sus anillos benzoicos a DBT-dihidrodiol y DBT-diol, luego ocurre el rompimiento del enlace entre el anillo y los sustituyentes diol para que se formen los compuestos 4-2-(3-hidroxi)-tionaftenil-2-oxo-3-acido butenoico y 3-hidroxi-2-formilbenzotiofeno (HFBT), como se muestra en la Figura 1. Esta ruta de degradación generalmente ocurre en bacterias de suelo, ha sido reportada básicamente en cepas de Pseudomonas [30,101,104,111], Micrococus, Beijerinckia y Rhizobium melioti, así como en algunas cepas no identificadas aisladas del suelo. La degradación del DBT por estos microorganismos, involucra un cometabolismo en el cual el DBT es degradado cuando el organismo ha crecido en una fuente alterna de carbono, como puede ser un medio con extracto de peptona o glucosa, ya que el crecimiento es lento si se usa como fuente única de carbono. Es importante señalar también, la inhibición de la ruta por el metabolito HFBT en algunos casos.

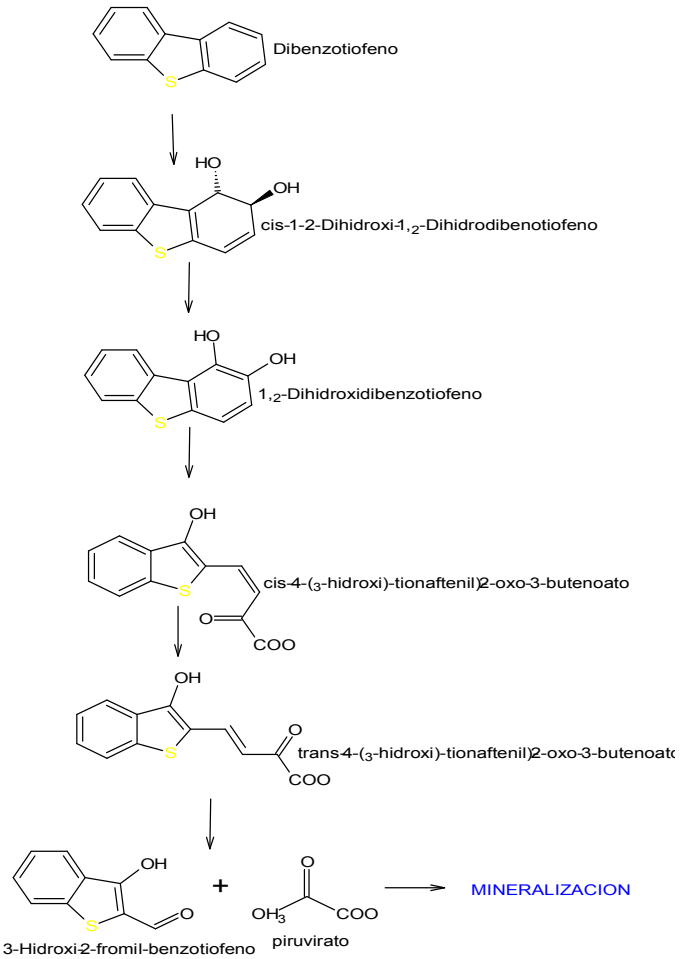


**Figura 1.** Mecanismo de degradación del DBT vía ruta oxidativa de destrucción del anillo, o ruta Kodama

La segunda ruta de degradación del DBT es la ruta de azufre específico. Fue elucidada por Monticello [81,82,95] Por esta vía el DBT es desulfurizado por el rompimiento selectivo del enlace carbono-azufre, resultando 2-hidroxibifenil como producto final (Figura 2). La característica importante de esta ruta es que no hay pérdida de carbonos en el proceso, manteniéndose el poder calorífico del combustible, asegurando así el valor económico de los productos de las industrias petroleras.

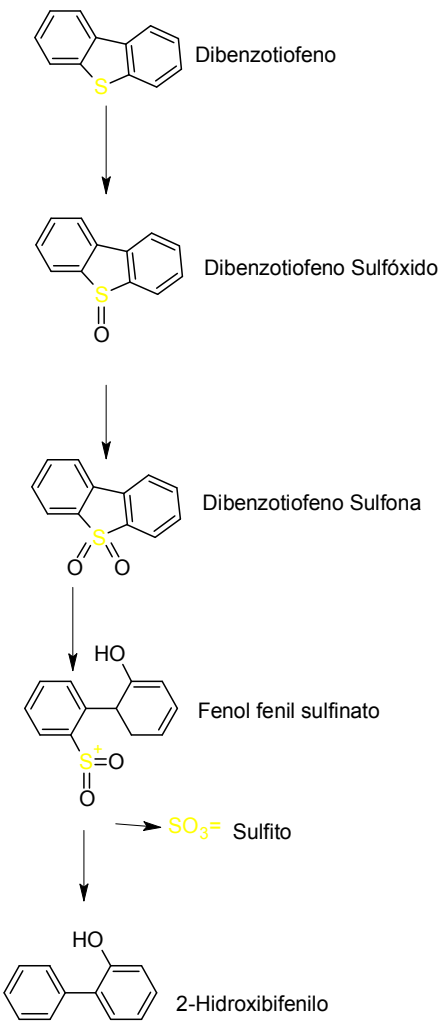


**Figura 2.** Mecanismo de desulfuración del DBT vía azufre específico

La primera etapa de este mecanismo es la transferencia de la molécula de DBT al interior de la célula. Posteriormente, ocurre la conversión a sulfona. La enzima directamente responsable de estas dos primeras oxidaciones ha sido aislada y caracterizada en detalle. El gen para esta enzima (dszC) ha sido clonado y secuenciado. La enzima ha sido llamada DBT monooxigenasa para reflejar la reacción que cataliza: la transferencia de un electrón desde Flavinmononucleótido ($FMNH_2$) al DBT para producir FMN, DBTO y $DBTO_2$ [81,74].

El primer ataque al enlace C-S es catalizado por DBT sulfona monooxigenasa ($FMNH_2$, $TO_2$ oxidoreductasa, la cual transfiere otro electrón desde $FMNH_2$ al $DBTO_2$). El gen para esta enzima ha sido llamado dszA. La liberación del azufre inorgánico, produciendo sulfito dejando intacta la molécula de hidrocarburo es la última reacción en la ruta. Esta es catalizada por una desulfinasa (codificada por el gen dszB) encargada de transformar el azufre a sulfito y la producción del hidroxi bifenil.

Se ha trabajado mucho con esta ruta degradativa. Las cepas mayormente estudiadas son: Rhodococcus UM3, Rhodococcus UM9 y Rhodococcus erythropolis [32,38,46,47,59,117,118], Corynecbacterium, Agrobacterium y algunas especies de Mycobacterium [100]. Todas ellas son Grampositivas, hasta ahora no se conoce la existencia de alguna Gramnegativa que siga la ruta de azufre específico.

Finalmente, la tercera ruta metabólica del DBT es la ruta de destrucción completa, en la cual es mineralizado a $CO_2$, sulfito y agua (Figura No. 3). Es conocida también como ruta de Van Afferden [109]. En esta ruta el DBT sirve como fuente de carbono y energía. Solo se conocen hasta ahora dos tipos de microorganismos que siguen esta ruta metabólica en la que además de desulfurizar al DBT, también se rompe el esqueleto del hidrocarburo, la cepa Brevibacterium, mineraliza al DBT dando como productos $CO_2$, sulfito y agua. La cepa Arthrobacter se reportó que oxida al sulfóxido de DBT, más no al DBT, con la consecuente formación de sulfato y benzoato.

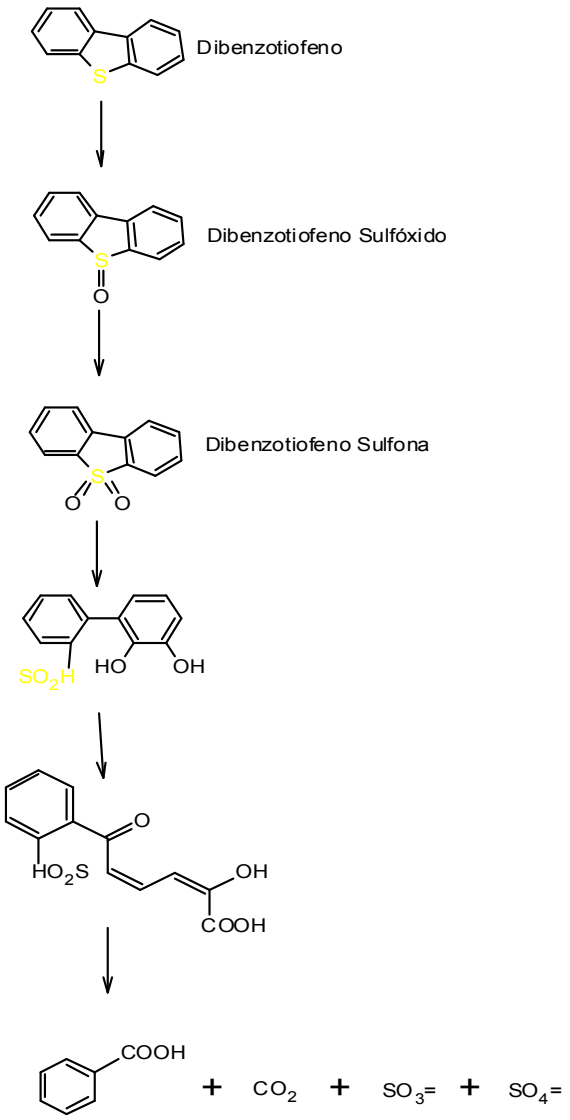


**Figura 3.** Mecanismo de desulfuración de Van Afferden

A continuación se presenta una recopilación de los organismos mayormente estudiados con capacidad de desulfurar combustibles fósiles (ver Tabla II).

**Tabla II.** Microorganismos con capacidad desulfuradora

| Microorganismo | Tipo | Ruta | Sustrato estudiado | Referencias |
|---|---|---|---|---|
| **Aeróbicos** | | | | |
| *Rhodococcus erythropolis* | BacteriaGram + | Azufre específico | DBT, destilados medios | 98, 32, 46, 116, 69,70, 25 |
| *Rhodococcus sp.* | BacteriaGram + | Azufre especifico | DBT, benzotiofeno, destilados medios | 23, 24, 86, 100, 59, 38, 40 |
| *Rhodococcus rhodohrous* | BacteriaGram + | Azufre especifico | DBT, carbón | 51, 54, 55 |
| *Pseudomonas* 107, 67,11, 12, 6, 37, 82 | BacteriaGram + | Kodama | DBT, alquil-DBT | |
| *Rhodosporidium toruloides* | LevaduraGram (-) | Azufre específico | DBT, Orimulsión | 7 |
| *Trametes trogiiTrametes hirsuta Phanerochaete chrysosporium Trametes versicolorT yromices palustri* | Hongos | No especificada | Dibenzil sulfoxido | 112 |
| *Gordonia* | BacteriaGram + | Azufre específico | DBT, diesel | 106,2 |
| *Sphingomonas* | BacteriaGram (-) | No especificada | DBT | 89 |
| *Paenibacilus spp.* | BacteriaGram (-) Termofilica | No especificada | Benzotiofeno, DBT | 62 |
| *Cunninghamela elegans* | HongoEucariota | No especificada | DBT | 17 |
| *Paecytomyces sp.* | Hongo | Azufre especifico | DBT, carbón | 28 |
| *Beijerinckia* | Bacteria | No especificada | DBT | 68 |
| *Agrobacterium* | BacteriaGram + | Azufre especifico | DBT sulfona y otros organosulfurados | 15,16 |
| *Arthrobacter* | Bacteria | Destrucción completa | Carbón, DBT sulfona, sedimentos | 19, 69 |
| *Corynebacterium* | BacteriaGram + | Azufre especifico | DBT | 94 |
| *Nocardia* | Bacteria | No especificada | DBT | 81 |
| *Mycobacterium* | BacteriaGram + | Azufre especifico | DBT | 91, 35, 92 |
| *Xanthomonas* | Bacteria | No especificada | DBT | 16 |
| *Klebtella* | Bacteria | No especificada | Arilsulfonatos | 26 |
| *Brevibacterium* | Bacteria | Destrucción completa | DBT | 109 |
| *Sulfolobus acidocaldaris* | BacteriaTermofilica | No especificada | DBT | 49, 108 |
| *Micrococus* | Bacteria | Kodama | DBT | |
| *Rhizobium* | Bacteria | Kodama | DBT | 111 |
| **Anaeróbicos** | | | | |
| *Desulfovibrio desulfuricans* | Bacteria | No especificada | DBT | 52, 53, 1, 48 |

*Aspectos de interés en el desarrollo de la biodesulfuración*

Estudios sobre la selectividad en los sustratos con sustituciones en anillos aromáticos

Fedorak et al [29, 30,] Atlas [4, 6] y Bressler [11] han estudiado la transformación bacteriana de algunos metabolitos finales de la ruta Kodama, y algunos otros alquildibenzotiofenos. Han encontrado que existe una ruta degradativa análoga a la de Kodama con Dibenzotiofeno, para por ejemplo, 1,2,3,4-Tetrahidrodibenzotiofeno, formándose también metil-hidrodibenzotiofenos. Específicamente, 4,6-dimetil-dibenzotiofeno produce 7-metil-hidrodibenzotiofeno y 3,4-dimetildibenzotiofeno conduce a 6,7-dimetil-hidrodibenzotiofeno. Sus resultados sugieren además, que la acumulación de los hidrodibenzotiofenos sustituidos no ocurre, dado que son químicamente inestables y susceptibles a ser mineralizados.

En este mismo sentido, Grossman[38], Fedorak[30], han estudiado la desulfuración microbiana específica de análogos del Dibenzotiofeno estéricamente protegidos. Ha quedado claro en esta y en otras investigaciones, la preferencia de los microorganismos por los dibenzotiofenos no sustituidos. Sin embargo, no se ha logrado obtener un análisis completo de la selectividad de este sistema para predecir el efecto de la desulfuración en una mezcla más compleja de sustratos.

Las publicaciones de Rhee [106], Grossman [38] y Folsom[32] ilustran la factibilidad de biodesulfurar destilados medios y dieseles, considerando estos autores la potencial aplicación en estos sustratos. Efectivamente, han comprobado la dificultad para remover tiofenos condensados y la selectividad decreciente en proporción a las sustituciones por grupos alquílicos cerca del átomo de azufre.

**Tabla III.** Parámetros cinéticos del modelo de Michaelis-Menten

| Sustrato | Vmáx. (mmol.DCW$^{-1}$h$^{-1}$) | Km (mM) | Ref |
|---|---|---|---|
| DBT | 54,2 | 0.73 | 32 |
| 4-MDBT | 29,8 | 0.84 | 32 |
| 4,6-DMDBT | 11,8 | 0.46 | 32 |
| 3,4,6-TMDBT | 9,8 | 0.43 | 32 |
| HFBT | *2,9x10$^{-8}$ M.min$^{-1}$ | 0.083 | 107 |

Un trabajo interesante, es el de Baldi et al[7]. Estos autores lograron hacer crecer una cepa de levadura en orimulsión; obteniendo una eliminación del 11% del azufre orgánico total contenido en la muestra. Es importante resaltar que hasta esta fecha no se habían reportado levaduras capaces de crecer y biotransformar este tipo de compuestos.

*Estudios genéticos*

A lo largo de los últimos años han surgido varias técnicas que permiten la manipulación y modificación del ADN, y que facilitan el cambio de uno o más genes sobre plásmidos o cromosomas de microorganismos. Estas metodologías han sido usadas para mejorar las propiedades deseables de algunos de ellos con uso industrial, agrícola o ambiental; y además, han sido usadas para la caracterización genética de los mismos [72]. La biodesulfuración no ha escapado a estos estudios. Han sido identificados los genes responsables de la biodesulfuración. Se encuentran en plásmidos y han sido secuenciados. También, entre otros estudios genéticos está la producción de microorganismos mutantes con amplias capacidades desulfuradoras.

Principalmente, la década de los noventa marca el inicio y desarrollo de variadas e importantes investigaciones genéticas a las cepas desulfuradoras, son ejemplo de ellas las de Monticello [82], Foght [31] y Kilbane [58]; quienes abordaron la degradación del DBT mediada por plásmidos, la expresión de genes desulfuradores en Pseudomonas y caracterizaciones genéticas en general, respectivamente.

Más a mediados de esa misma década, la purificación e identificación de enzimas, análisis genético del promotor del dsz y regiones reguladoras asociadas, secuencia y

**Tabla IV.** Patentes relacionadas a la biodesulfuración

| US Patente Número | Descripción | Referencia |
|---|---|---|
| 4632906 | Biodesulfurization of carbonaceous materials | 66 |
| 5002888 | Mutant microorganisms useful for cleavage of organic C-S bonds | 56 |
| 5104801 | Mutant microorganisms useful for cleavage of organic C-S bonds | 57 |
| 5358870 | Microemulsion process for direct biocatalytic desulfurization of organosulfur molecules | 84 |
| 5356801 | Recombinant DNA encoding a desulfurization biocatalyst | 103 |
| 5458758 | Apparatus and method for the desulfurization of petroleum by bacteria | 76 |
| 5472875 | Continuous process for biocatalytic desfulruization of sulfur bearing heterocyclic molecules | 87 |
| 5496729 | Process for the desulfurization and the desalting of a fossil fuel | 83 |
| 5516677 | Enzime from Rhodococcus rhodochrous ATCC 53968, Bacillus sphaericus ATCC 53969 or a mutant thereof for cleveage of organic C-S bonds | 54 |
| 5525235 | Method for separating a petroleum containing emulsion | 14 |
| 5529930 | Biocatalytic process for reduction of petroleum viscosity | 85 |
| 5510265 | Multistage process for deep desulfurization of a fuel fossil | 86 |
| 5593889 | Biodesulfurization of bitumen fuels | 114 |
| 5607857 | Rhodococcus species for removing sulfur from organic carbonaceous fuels substrates | 40 |
| 5807735 | Solvent resistant microorganisms | 60 |
| 5772901 | Oil/water separation biocatalyst three phase separation process | 119 |
| 5952208 | Dsz gene expression in Pseudomonas hosts | 21 |
| 5910440 | Method for the removal organic sulfur from carbonaceous materials | 39 |
| 6124130 | Microbial catalyst for desulfurization of fossil fuels | 97 |
| 6133016 | Sphingomonas biodesulfurization catalyst | 20 |
| 6130081 | High temperature desulfurization by microorganisms | 63 |
| 620446 | B1Gordona sp. CYKS1 capable of desulfurizing fossil fuel containing organic sulfur compounds | 13 |
| H1986 H | Method for removing organic sulfur from heterocyclic sulfur contaninig organic compounds | 5 |
| 6294351 | Biochemical transformation of solid carbonaceuous material | 75 |
| 6235519 | Gene involved in thiophene biotransformation from Nocardia asteroids KGB1 | 115 |
| 6337204 B1 | Biological culture containing Rhodococcus erythropolys and or Rhodococcus and process for desulfurization of petroleum fraction | 88 |
| 6420158 B1 | Gene encoding desulfurases | 44 |
| 6461859 B1 | Enzymatic oxidation process for desulfurization of fossil fuel | 27 |
| 6607903 B2 | Genes encoding desulfurization enzymes | 43 |

caracterización molecular de la región de ADN que codifica la desulfuración del dibenzotiofeno, identificación y clonación de genes fueron realizadas mayormente para las cepas del género Rhodococus que siguen la ruta del azufre específico [23, 24,71,73,103].

La caracterización de plásmidos, purificación y caracterización de cofactores (Flavin reductasa), producción de cepas mutantes con rendimientos mayores, desarrollo de vectores, aislamiento y nuevos promotores de la actividad biocatalítica y estudios genéticos completos a bacterias termofílicas han sido los aportes desde finales de los noventa hasta nuestros días [3,22,34,45].

*Estudios cinéticos y aplicaciones*

Los análisis cinéticos correspondientes a cultivos biodesulfuradores han estado orientados básicamente a la caracterización bioquímica de las enzimas involucradas en las transformaciones. Estas descripciones se han basado en la determinación experimental de las constantes cinéticas de algunos modelos, entre otros parámetros; y por otra parte, la medición de velocidades de reacción, velocidades de crecimiento celular y mineralización para diferentes concentraciones y tipos de sustratos. Estos cultivos han sido estudiados en biorreactores por lotes y continuos [10, 41, 80, 102].

Es así como para el modelo de Michaelis-Menten han sido reportados los siguientes valores en diferentes sustratos estudiados.

En lo que respecta a velocidades de degradación del DBT han sido reportadas algunas como 5 $\mu gDCW^{-1}min^{-1}$ [32], 0.1 y 0.2 $\mu gDCW^{-1}min^{-1}$ [41, 93], 0.15 $\mu gDCW^{-1}min^{-1}$ [105], 20 $\mu gDCW^{-1}min^{-1}$para una cepa manipulada genéticamente [33]. Representan investigaciones importantes en esta área las de Horiuchi [42], Furuya[35], Martín [78], Kobayashi [61], Ohshiro [98], Rhee[106], Wang [115], Olmo[95] y Rivas [107], entre otros autores.

Por otra parte, dentro de las aplicaciones biotecnológicas importantes están los procesos multietapas de biodesulfuración, las separaciones aceite/ agua, los estudios genéticos y estudios de microemulsiones. Dentro de las presentadas en la Tabla IV, las patentes No. 5472875 y No. 5510265, corresponden a un proceso completo para la biorefinación de combustibles; con capacidades de tratamiento promedio de 5 barriles por día. Un diagrama general del proceso puede observarse en la figura 4.

*Tendencias futuras*

Las áreas en las que la investigación actual está avanzando son: aplicación de la genética molecular al desarrollo de nuevas cepas bacterianas capaces de degradar eficientemente aquellos compuestos recalcitrantes al metabolismo microbiano, y el fortalecimiento de nuevas tecnologías de ingeniería para aumentar el alcance y la velocidad de la degradación. Específicamente, se desean superar los problemas de escalas, biodisponibilidad de contaminantes, y mejora en el diseño de reactores[72].

Los aspectos críticos en el diseño y operación del proceso incluyen la recuperación del producto, las separaciones aceite-agua y la presencia del oxígeno frente a un combustible. Además, la selección del tipo de

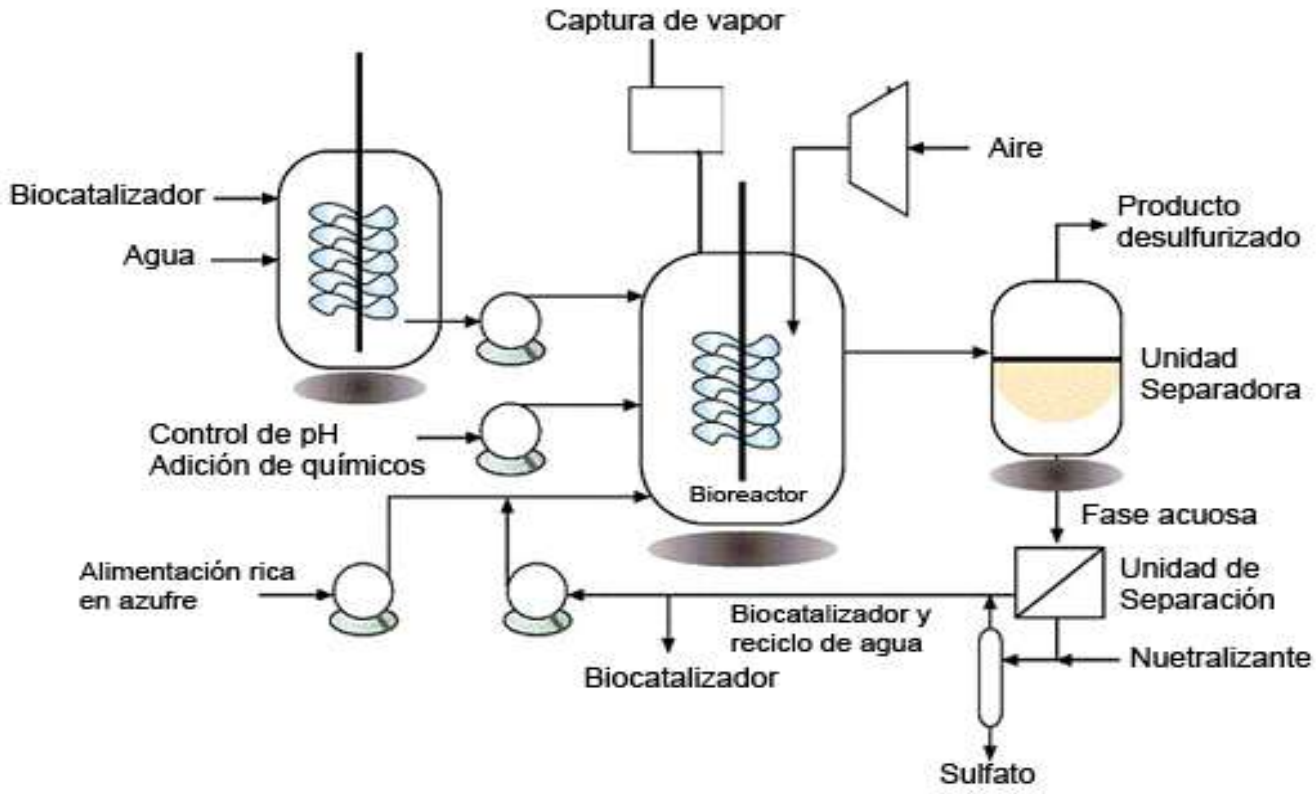


**Figura 4.** Proceso a escala piloto para la desulfuración de cortes livianos

reactor es también una variable crítica, debido la cinética del proceso[113]. Entonces los esfuerzos sinérgicos deben estar encabezados por estudios en fisiología microbiana, biología molecular e ingeniería bioquímica[37]. Sigue siendo importante también la búsqueda de nuevas cepas microbianas y elucidación de sus metabolismos, ya sean modificadas y/o asiladas en sitios específicos. Además, por lo pronto, parece muy atractiva la posibilidad de combinar la hidrodesulfuración y la desulfuración biológica[113], usando la biodesulfuración en las moléculas más recalcitrantes.

Otro aspecto de potencial interés es la biodesulfuración anaeróbica. Atendiendo al hecho de que la inmediata aplicación biotecnológica industrial es el tratamiento de combustibles se presenta la necesidad de llevar a cabo la reacción en condiciones anóxicas con el objeto de minimizar las condiciones de operación riesgosas. Además, esto podría tener aplicación en eventos donde el sustrato a desulfurizar y/o remediar se encuentre en una zona anaeróbia[65], por ejemplo, fondos marinos, acuíferos, entre otros.

Las bacterias termofílicas han sido de interés reciente en varios estudios [35,49,62]; lográndose encontrar temperaturas óptimas para el proceso de biodesulfuración alrededor de los 40 °C y hasta 60 ºC. Además, en aplicaciones tecnológicas la transferencia de masa juega un rol importante dado que la reacción ocurre en la interfase agua-hidrocarburo [10, 79].

Por último, los consorcios bacterianos han despertado interés en la degradación de contaminantes. Se conoce muy poco el efecto de este tipo de asociaciones sobre la actividad desulfuradora de los microorganismos; pero en trabajos recientes [18, 25, 41,105] se ha encontrado un efecto positivo de tales relaciones. Así, en ese sentido, la ecología microbiana representa también un área de futura investigación en el tratamiento biológico de compuestos organosulfurados.

## REFERENCIAS


1. **Annweiler E., Michaelis W., Meckenstock R.** Anaerobic Cometabolic Conversion of Benzothiophene by a Sulfate-Reducing Enrichment Culture and in a Tar-Oil–Contaminated Aquifer. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**:5077-5083, 2001.
2. **Alves L., Salgueiro R., Rodrigues C., Mesquita E., Matos J**. Desulfurization of Dibenzothiophene, Benzothiophene, and Other Thiophene Analogs by a Newly Isolated Bacterium, Gordonia alkanivorans Strain 1B. *Applied Biochemistry and Biotechnology,* **120**(3):199-208. 2005.
3. **Arensdorf, J., Loomis, A., DiGrazia, P., Monticello, D., Pienkos P.** Chemostat Approach for the Directed Evolution of Biodesulfurization Gain-of-Function Mutants. *Appl. Environ. Microbiol.,* **68**(2):691-698. 2002.
4. **Atlas, R.** Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: an Environmental Perspectiva. *Microbiological Reviews,* **45**:180-209. 1981.
5. **Atlas, R.** et al. Patente US H1986 H. Method for removing organic sulfur from heterociclyc sulfur contaninig organic compounds. 2001.
6. **Atlas, R., Mormile M.** Mineralization of the Dibenzothiophene Biodegradation Products 3-Hydroxy-2-Formyl Benzothiophene and Dibenzothiophene Sulfone. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**:3183-3184. 1988.
7. **Baldi, F., Pepi M., Fava F.** Growth of Rhodosporidium toruloides Strain DBVPG 6662 on Dibenzothiophene Crystals and Orimulsion. *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**:4689-4696. 2003.
8. **Beaudette, L., Davies, S., Fedorak, F., Ward, O., Pickard M**. Comparison of Gas Chromatography and Mineralization Experiments for Measuring Loss of Selected Polychlorinated Biphenyl Congeners in Cultures of White Rot Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.,* **64**:2020-2025. 1998.
9. **Bezalel, L., Hadar, Y., Fu, P., Freeman, J., Cerniglia, C.** *Appl. Environ. Microbiol.,* **62**:2554-2559, 1996.
10. **Borgne, S., Quintero, R.** Biotechnological processes for the refining of petroleum. *Fuel Processing Technology.* **81**:155- 169, 2003.
11. **Bressler, D., Fedorak, P.** Purification, Stability, and Mineralization of 3-Hydroxy-2-Formylbenzothiophene, a Metabolite of Dibenzothiophene. *Appl. Envrion. Microbiol.*, **67**:821-826. 2001.
12. **Bressler, D., Fedorak, P.** Bacterial metabolism of fluorene, dibenzofuran, dibenzothiophene, and carbazole. *Can. J. Microbiol.,* **46**:397-409. 2000.
13. **Chang, Y. K.** et al. Patente US 6204046 B1. Gordona sp. CYKS1 capable of desulfurizing fossil fuel containing organic sulfur compounds, 2001.
14. **Chen, J. C.** T. et al. Patente US 5525235. Method for separating a petroleum containing emulsion, 1996.
15. **Constanti, M., Giralt, J., Bourdon, A.** Degradation and desulfurization of dibenzothiophene sulfone and other sulfur compounds by Agrobacterium MC501 and mixed culture. *Enzime Microbiol. Technol.,* **19**:214-219, 1996.
16. **Constanti, M., Giralt, J., Burdon, A.** Desulfurization of dibenzothiophene by bacteria. World *J. Mcrobiol. Biotechnol.,* **10**:510-516. 1994.
17. **Crawford, D.L., Gupta, R.K.** Oxidation of dibenzothiophene by cunninghamela elegans. *Curr. Microbiol.*, **21**:229-231. 1990.
18. **Coulon, F., Pelletier, E., Gourhant, L., Delille, D.** Effects of nutrient and temperature on degradation of petroleum hydrocarbons in contaminated sub-Antarctic soil. *Chemosphere,* **58**:1439-1448. 2005.
19. **Dahlberg, M., Rohrer, R.L., Fauth, D.J., Sprecher, R., Olson, G.J.** Biodesulofurization of dibenzothiophene sulfone by Arthrobacter sp. and studies with oxidized Illinois *No. 6 coal fuel.* **72**:1645-1649. 1993.
20. **Darzins, A.** et al. . Patente US 6133016. Sphingomonas biodesulfurization catalyst., 2000.
21. **Darzins, A.** et al. Patente US 5952208. Dsz gene expresión in Pseudomonas hosts, 1999.
22. **Denis-Larose, C., Bergevon, H., Labbe, D., Greev, C. W., Hawari, J., Grossman, M. J., Sankey, B. M., Lav, P. C.** Characterization of the basic replicon of Rhodococcus plasmid pSOX and development of a Rhodococcus-Escherichia coli shuttle vector. Environ. *Appl. Microbiol.*, **64**:4363-4367. 1998.
23. **Denome, S., Olson, S.A., Young K.D.** Identification and cloning of genes involved in specific desulfurization of dibenzothiophene by Rhodococcus sp. Strain I6TS8. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**:2837-2843. 1993.

24. **Denome, S., Oldfield, C., Nash, J.,Young K.D.** Characterization of the desulfurizing genes from Rhodococcus sp. Strain I6TS8. *J. Bacteriol.,* **176**:6707-6716. 1994.
25. **Duarte, G**. et al. Analysis of Bacterial Community Structure in Sulfurous-Oil-Containing Soils and Detection of Species Carrying Dibenzothiophene Desulfurization (dsz) Genes. *Appl. Eviron. Microbiol.,* **67**:1052-1062. 2001.
26. **Duddley, M.W., Frost, J.W.** Biocatalitic desulfurization of arylsulfonates. *Bioorg. Med. Chem.*, **2**:681-690. 1994.
27. **Duhalt, R. V.** et al. Patente US 6461859 B1. Enzimatic oxidation process for desulfurization fossil fuel, 2001.
28. **Faison, B.D., Clarks, T.M., Lewis, S.N., Ma, C.Y., Sharkey, D.M., Woodward, C.A.** Degradation of organic sulfur compounds by a coal-solubilizing fungus. Appl. *Biochem. Biotechnol.,* **29**:237-251, 1991.
29. **Fedorak, P., Bressler, D.** Identification of Disulfides from the Biodegradation of Dibenzothiophene. *Appl. Environ. Microbiol.,* **67**:5084-5093. 2001.
30. **Fedorak, P., Kropp, K.,Anderson, J.** Bacterial Transformations of 1,2,3,4-Tetrahydrodibenzothiophene and Dibenzothiophene. *Appl. Environ. Microbiol.,* **63**:3032-3042, 1997.
31. **Foght, J., Westlake, D.W.** Expression of DBT degradative genes in two Pseudomonas species. *Can. J. Microbiol.*, **36**:718-724. 1990.
32. **Folsom, B., Schiece, D., DiGrazia, P., Werner, J., Palmer, S.** Microbial Desulfurization of Alkylated Dibenzothiophenes from a Hydrodesulfurized Middle Distillate by Rhodococcus erythropolis I-19. *Appl. Environ. Microbiol.,* **65:**4967-4972. 1999.
33. **Folsom, B., Le Borgne, S., Rojas, N.,Quintero, R.** Proceedings First International Conference on Petroleum Biotechnology: State of the Art and Perspectives, Institute Mexicans Petroleum, Mexico, 2000. /Le Borgne, S. and Quintero, R. Biotechnological processes for the refining of petroleum. *Fuel Processing Technology* , **81**(2):155-169. 2003.
34. **Franchi, E., Rodríguez, F., Serbolisca, L., Ferra, F.** Vector development, isolation and new promoters and enhancement of the catalytic activity of the dsz enzyme complex in Rhodococcus sp. Strains. *Oil & Gas science and Technology-Rev.,* IFP **58**:515-520. 2003.
35. **Furuya, T., Kirimura, K., Kino, K., Usami, S.** Thermophilic biodesulfurization of dibenzothiophene and its derivates by Mycobacterium phlei WU-F1. *Fems Microbiology Letters,* **204**:129-133. 2001.
36. **Gallagher, J., Olson, E., Stanley, D.C.** Microbial desulfurization of Dibenzothiophene: a sulfur specific pathway. *FEMS Microbiol. Lett.*, **107**:31-36. 1993.
37. **Girio, F., Alves, L., Mesquita, E.** Dessulfurizacao Bacteriana de Combustiveis Fósseis. *Biotecnologia Ambiental*, **62**:3-8. 1999.
38. **Grossman, M., Lee, M., Prince, R., Garrett, K., George G.** Pickering I. Microbial Desulfurization of a Crude Oil Middle-Distillate Fraction: Analysis of the Extent of Sulfur Removal and the Effect of Removal on Remaining Sulfur. *Appl. Environ. Microbiol.,* **65**:181-188. 1999.
39. **Grossman, M. J**. et al. Patente US 5910440 Method for the removal of organic sulfur from carbonaceous materials, 1999.
40. **Grossman, M. J.** et al. Patente US 5607857. Rhodococcus species for removing sulfur from organic carbonaceous fuels substrates, 1997.
41. **Honda, H., Sugiyama, H., Saito, I., Kobayashi, T.** High cell density culture of Rhodococcus rhodochrous by pH-stat feeding and dibenzothiophene degradation. *J. Ferment. Bioeng.*, **85**:334-338. 1998.
42. **Horiuchi, K., Kobayashi, M., Yosikawua, O., Hirasawa, K., Ishii, Y., Fujino, K., Sugiyama, H., Maruahsi, K.** Kinetic Analysis of Microbial Desulfurization Of Model and Light Gas Oil Containing Multiple Alkyl Dibenzothiophenes. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**:298-304. 2001.
43. **Ishii, Y.** et al. Patente US 6607903 B2. Genes encoding desulfurization enzymes, 2003.
44. **Ishii, Y.** et al. Patente US 6420158. Gene encoding desulfurases, 2002.
45. **Ishii, Y., Konishi, J., Okada, H., Hirasawa, K., Onaka, T., Suzuki, M.** Operon structure and functional analysis of the genes encoding thermophilic desulfurizing enzymes of Paenibacillus sp. A11-2. *Biochem. and Biophys. Res. Comm.,* **270**(1):81-88. 2000.
46. **Izumi, Y., Nishina, Y., Matsubara, T., Ohshiro, T.** Purification, Characterization, and Overexpression of Flavin Reductase Involved in Dibenzothiophene Desulfurization by Rhodococcus erythropolis D-1. *Appl. Environ. Microbiol.,* **67:**1179-1184. 2001.
47. **Izumi, Y., Oshiro, T., Ogino, H., Hine, Y., Shimao, M.** Selective desulfurization of Dibenzothiophene by Rhodococcus erythropolis D-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**:223-226. 1994.
48. **Juárez, R., Rodriguez, A., Torres, L., Jiménez, B.** Caracterización de bacterias con capacidad sulfatoreductora y su aplicación en el proceso de biodesulfuracion de combustoleo mexicano. Universidad Nacional Autonoma de Mexico. Insituto de Ingeniería, 2003.
49. **Kargi, F.** Biological oxidation of thionthrene, thioxanthrene and dibenzothiophene by the thermophilic organism Sulfolobus acidocaldarius. Biotechnol. Lett. **9:**478-482. 1987.
50. **Kasai, Y., Shindo, K., Harayama, S., Misawa, N.** Molecular Characterization and Substrate Preference of a Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Dioxygenase from Cycloclasticus sp. Strain A5. *Appl. Environ. Microbiol.,* **69**:6688-6697. 2003.
51. **Kayser, K.J., Bielaga-Jones, B.A., Jackowsky, K., Odusan, O., Kilbane, J.J.** Utilization of organosulfur compounds by axeni and mixed cultures of Rhodococcus rhodochrous IGTS8. *J. Gen. Microbiol.,* **139**:3123-3129. 2003.
52. **Kim, B.H., Kim, H.Y., Kim, T.S., Pack, D.H.** Selectivity of desulfurization activity of Desulfovibrio desulfuricans M6 on different petroleum products. *Fuel Processing Technol.,* **43**:87-94. 1995.
53. **Kim, H.T., Kim, T.S., Kim B.H.** Degradation of organic sulphur compounds and the reduction of dibenzothiophene to byfenil and $H_2S$. *Biotechnol. Letter.* **12:**761-764. 1990.
54. **Kilbane, J., Woodstock, J.J.** Patente US 5516677. Enzime from Rhodococcus rhodochrous ATCC 53968, Bacillus sphaericus ATCC 53969 or a mutant thereof for cleveage of organic C-S bonds, 1994.
55. **Kilbane, J., Jackowosky, K.** Biodesulfurization of water soluble coal derived material by Rhodococcus

rhodochrous IGTS8. *Biotechnol. Bioeng.* **40:**1107-1114. 1992.

**56. Kilbane, J**. Patente US 5002888 Mutant microorganisms useful for cleveage of organic C-S bonds, 1991.

**57. Kilbane, J.** Patente US 5104801. Mutant microorganisms useful for cleveage of organic C-S bonds, 1992.

**58. Kilbane, J., Bielage, A.** Genetic study of biodesulfurization. P 2/15-2/32. In S. Yunker and K. Rhee (ed.), Proccedings: 1990 First International Symposium of the Biological Processing of Coal,. Electric Power Research Institute, Inc., Palo Alto, Calif., 1990.

**59. Kirimura, K., Furuya, T., Sato, R., Ishii, Y.** Biodesulfurization of Naftothiophene and Benzothiophene trough Selective Cleavage of Carbon-Sulfur Bonds by Rhodococcus sp. Strain WU-K2R. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**:3867-3872. 2002.

**60. Klibanov, A. A.** et al. Patente US 5807735. Solvent resistant microorganisms, 1996.

**61. Kobayashi, M., Horiuchi, K., Yoshikawa, O., Hirazawa, K., Ishii, Y., Fujino, K., Sugiyama, H., Maruhashi, K.** Kinetics análisis of microbial desulfurization of model and Light gas oil containing multiple alkyl dibenzothiophenes. *Biosci. Biotechnol. Biochem*. **65**:298-304. 2001.

**62. Konishi, J., Onaka, T., Ishii, Y., Suzuki, M.** Demostration of the carbon sulfur bond targeted desulfurization of benzothiophene by thermophilic Paenibacillus sp. Strain A11-2 capable of desulfurizing dibenzothiophene. FEMS *Microbiol. Lett.* **187(2):**151-154. 2000.

**63. Konishi, J.** et al. Patente US 6130081. High temperature desulfurization by microorganisms. 2000.

**64. Kodama, Y., Nakatani, S., Umehara, K., Shimizu, K., Monoda, Y., Yamada, K.** *Agric. Biol. Chem.* **34**:1320-1324. 1970.

**65. Kodama, Y. and Watanabe, K.** Isolation and Characterization of a Sulfur-Oxidizing Chemolithotroph Growing on Crude Oil under Anaerobic Conditions. Appl. Environ. Microbiol. 69:107-112. 2003.

**66. Kopacz, E. P.** Patente US 4632906. Biodesulfurization of carbonaceous materials. 1986.

**67. Kropp, K. and Fedorak, P.** A review of the occurrence, toxicity, and biodegradation of condensed thiophenes found in petroleum. **Can. J. Microbiol. 44**:605-622. 1988.

**68. Laborde, A., Gibson, D**. Metabolism of Dibenzothiophene by a Beijerinckia Species. Appl. Environ. Microbiol. 34(6):783-790. 1977.

**69. Lee, M., Senius, J., Grossman, M.** Sulfur-Specific Microbial Desulfurization of Sterically Hindered Analogs of Dibenzothiophene. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:4362-4366. 1995.

**70. Lee, K., Tremblay, G.H., Coban, S.E**. Bioremediation of oiled-beach sediments: assessments of inorganics and organic fertilizers, 107-113. In proccedings of the international oil spill conference. American Petroleum Institute, Whasington D.C., 1995.

**71. Lei, B., Tu, S.** Gene overexpression, purification, and identification of a dseulfurization enzyme from Rhodococcus sp. Strain IGTS8 as a sulfide/sulfoxide monooxygenase. *J. Bacteriol.* **178**:5699-5705. 1996.

**72. Levin, M., Gealt, M.** Biotratamiento de residuos tóxicos y peligrosos. Serie Mc Graw-Hill. 375-378. 1997.

**73. Li, M., Squires, C., Monticello, D., Childs, J.** Genetic análisis of the dsZ promoter and associated regulatory regions of Rhodococcus erythropolis I6TS8. *J. Bacteriol.* **178**:6409-6418. 1996.

**74. Li, M., Squires, C., Monticello, D., Childs, J. A** flavin reductase stimulates DsZA and DsZC proteins of Rhodococcus erythropolis I6TS8 in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **230**:73-78. 1997.

**75. Lin, M. S.** et al. Patente US 6294351.Biochemical transformation of solid carbonaceous material. 2001.

**76. Lizama, H. M.** et al. Patente US 5458752. Apparatus and method for the desulfurization of petroleum by bacteria, 1995.

**77. Lu, P., Metcalf, R., Carlson, E.** Enviromental Fate of Five Radiolabeled Coal Conversion By-Products Evaluated in a Laboratory Model Ecosystem. *Enviromental Health Perspectives*. **24:**201-208. 1978.

**78. Martin, A., Alcon, A., Santos, V., Garcia-Ochoa, F.** Production of a Biocatalyst of Pseudomonas putida CECT5279 for Dibenzothiophene (DBT) Biodesulfurization for Different Media Compositions. *Energy & Fuels*. **18**:851-857. 2004.

**79. Marcelis, C., Leeuwen, M., Polderman, H., Janssen, A., Lettinga, G.** Model description of dibenzothiophene mass tranfer in oil/water dispersions with respect to biodesulfurization. *Biochemical Engineering Journal*. **16**:253-264. 2003.

**80. Merhnia, M., Towfighi, Y., Bonakdarpour, B., Mehdi, M.** Gas hold-up and oxygen transfer in a draft-tube airlift bioreactor with petroleum-based liquids. *Biochemical Engineering journal*. **22**:105-110. 2005.

**81. Monticello, D.** Riding The Fossil Fuel Biodesulfurization Wave. *Chemtech.* **28**:38-45. 1998.

**82. Monticello, D., Bakker, D., Finnerty, W.R.** Plasmid mediated degradation of dibenzothiophene by Pseudomonas species. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**:756-760. 1985.

**83. Monticello, D.** Patente US 5496729. Process for the desulfurization and the desalting of a fossil fuel. 1996.

**84. Monticello, D.** et al. Patente US 5358870. Microemulsion process for direct biocatalytic desulfurization of organosulfur molecules. 1994.

**85. Monticello, D.** et al. Patente US 5529930. Biocatalytic process for reduction of petroleum viscosity, 1996.

**86. Monticello, D.** Patente US 5510265. Multistage process for deep desulfurization of a fuel fossil. 1996.

**87. Monticello, D.** Patente US 5472875 Continuous process for biocatalityc desulfurization of sulfur bearing heterocyclic molecules, 1995.

**88. Monot,, F.** et al. Patente US 6337204 B1. Biological culture containing Rhodococcus erythropolys and or rodococcus and process for desulfruization of petroleum fraction, 2002.

**89. Nadalig, T., Raymond, N., Ni'matuzahroh, Glilewicz, M., Budzinski, H., Bertrand , J.C.** Degradation of phenantrene, metylphenantrenes and dibenzothiophenes by a Sphingomonas strain 2mpII. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**:79-85. 2002.

**90. National Institute of Standards and Technology** http://webbook.nist.gov/cgi/cbook.cgi?id=132-65-0

**91. Nekodzuka, S., Toshiari, N., Nakajima-Kambe, T., Nobura, N., Lu, J., Nakahara, Y.** Specific desulfurization of dibenzothiophene by Mycobacterium strain G3. *Biocatal. Biotranform.*,**15**:21-27, 1997.

**92. Okada, H., Nomura, N., Nakahara, T., Maruhashi, K.** Análysis of Dibenzothiophene Metabolic Pathway in Mycobacterium Strain G3. *Jounal of Bioscience and Bio engineering*. , **93**:491-497. 2002.

**93. Olfield, C., Pogrebinsky, O., Simmonds, J., Olson, E., Kulpa, C.F.** Elucidation of the metabolic pathway for dibenzothiophene desulfurization by Rhodococcus sp. strain I6TS8 (ATCC 53968). *Microbiology*, **143**:2961-2973. 1997.

**94. Omori, T., Monna, L., Saiki, Y., Kodama, T.** Desulfurization of dibenzothiophene by Corenybacterium sp. strain SY1. *Appl. Environ. Microbiol.,* **58**:911-915. 1992.

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

**96. Olmo, del C., Santos, V., Alcon, A. and García, F.** Production of a Rhodococcus erythropolis IGTS8 biocatalyst for DBT Biodesulfurization: influence of operational conditions. *Biochemical Engineering Journal*, **22**:229-237. 2004.

**97. Olson, G. J.** Patente US 6124130. Microbial catalyst for desulfurization of fosssil fuels. U.S, 2000.

**98. Oshiro, T., Hirata, T., Izumi, Y.** Characterization of Dibenzothiophene reaction by whole cells of Rhodococcus erythropolis H-2 in the presence of hydrocarbon. *J. Ferm. Bioeng.,* **82**:610-612. 1995.

**99. Parales, R., Bruce, N., Schmid, A., Wackett, L.** Biodegradation, Biotransformation and Biocatalisys (B3). *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**:4699-4709. 2002.

**100. Piddington, C.S., Kovacevich, B.R., Rambosek, J.** Sequence and molecular characterization of a DNA region encoding the dibenzothiophene desulfurization operon of Rhodococcus sp. strain I6TS8. *Appl. Environ. Microbiol.,* **61**:468-475. 1995.

**101. Pichel, F., Abed, R., Safi, N., Koster, J., Beer, D., El-Nahhal, Y., Rullkotter, J.** Microbial Diversity of a Heavily Polluted Microbial Mat and Its Community Changes following Degradation of Petroleum Compounds. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**(4):1674-1683. 2002.

**102. Prince, R., Grossman, M.** Substrate Preferences in Biodesulfurization of Diesel Range Fuels by Rhodococcus sp. Strain ECRD-1. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**:5833-5838. 2003.

**103. Rambosek, J.** et al. Patente US 5356801. Recombinant DNA encoding a desulfurization biocatalyst. 1994.

**104. Resnick, S., Gibson, D.** Regio- and Stereospecific Oxidation of Fluorene, Dibenzofuran, and Dibenzothiophene by Naphthalene Dioxygenase from Pseudomonas sp. Strain NCIB 9816-4. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**:4073-4080. 1996.

**105. Rhaeid, M. M., Koster, J.** The direct role of aerobic heterotrophic bacteria associated with cyanobacteria in the degradation of oil compounds. *International Biodeterioration & Biodegradation*, **55**:29-37. 2005.

**106. Rhee, S., Chang, J., Chang, Y., Chang, H.** Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated Gordona strain, CYKS1. *Appl. Envirom. Microbiol.,* **39**:2327-2331. 1998.

**107. Rivas, A.** Estudio de la Biodegradación del Dibenzotiofeno por la Cepa Bacteriana 5a1. Trabajo de Grado, Licenciado en Química, Universidad Simón Bolívar. 2004.

**108. Sönmezi, M., Tanyolaç, D., Seker, T.,Tanyolaç, A.** The double-substrate growth kinetics of Sulfolobus solfataricus, a thermophilic sulfur-removing archeabacterium. *Biochem. Eng. Journal*, **1**(3):243-248. 1998.

**109. Van Afferden, M., Schacht, S., Klein, J., Truper, H**. Degradation of Dibenzothiophene by Brevibacterium sp. DO. Arch. *Microbiol.*, **153**:324-328. 1990.

**110. Van Der Meer, J., Vos, W., Harayama, S., Zehnder, A.** Molecular Mechanisms of Genetic Adaptation to Xenobiotic Compounds. *Microbiological Reviews*, **56**:677-694. 1992.

**111. Van Elsas, J., Araujo, W., Seldin, L., Rosado, A., Duarte, G.** Analisys of Bacterial Community Structure in Sulfurous-Oil-Containing Soils and Detection of Species Carrying Dibenzothiophene Desulfurization (dsz) Genes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**:1052-1062. 2001.

**112. Van Hamme, J., Wong, E., Dettman, H., Gray, M., Pickard, M.** Dibenzyl Sulfide Metabolism by White Rot Fungi. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**:1320-1324. 2003.

**13. Van Hamme, J., Ajay, S., Owen, P.** Recent Advances in Petroleum Microbiology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **67**:503-549. 2003.

**114. Valentine, J.** Patente US 5593889. Biodesulfurization of bitumen fuels. 1997.

**115. Wang, Y.** et al. Patente US 6235519 B1. Gene involved in thiophene biotransformation from Nocardia asteroides KGB1. 2001.

**116. Wang, P., Krawiec, S.** Kinetic Analyses of Desulfurization of Dibenzothiophene by Rhodococcus erythropolis in Batch and Fed-Batch Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.*. **62**(5):1670-1675. 1996.

**117. Yalkowsky, S., He, Y.** Handbook of Aqueous Solubility Data. CRC Press, 822, 2003.

**118. Yoshikawa, O., Ishii, Y., Koizumi, K., Oshiro, T., Izumi, Y., Maruhashi, K.** Enhancement and Stabilization of Desulfurization Activity of Rhodococcus erythropolis KA2-5-1 by Feeding Ethanol and Sulphur Components. *Journal Of Bioscience and Bioengineering,* **94**:447-452. 2002.

**119. Yu, L. Q. et al.** Patente US 5772901 Oil/water/ biocatalyst three phase separation process. 1998.

**Correspondencia:** León, Vladimir, Núñez, Oswaldo. Unidad de Biotecnología del Petróleo, Centro de Biotecnología, Instituto de Estudios Avanzados (IDEA)., c. Hoyo de La Puerta-Baruta, Sartenejas, Caracas 1080, Venezuela. Apartado Postal 17606, Caracas 1015 A, Venezuela.

Correo Electrónico: vleon@idea.gob.ve