

Biodesulfuración de dibenzotiofeno a partir de *Aspergillus niger* y *Penicillium notatum*

M. A. CASTILLO COLLAZO, S. P. CORTÉS SÁNCHEZ, A. M. PALACIOS CANDIA, I. A. SALINAS RANGEL Y T. VERA SOTO

Resumen— En este trabajo se analizó la capacidad de dos hongos filamentosos, *Aspergillus niger* y *Penicillium notatum*, para metabolizar la molécula de dibenzotiofeno a partir de una técnica de Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución CLAR (HPLC por sus siglas del idioma inglés) para la cuantificación de la concentración del dibenzotiofeno, además de las mediciones de biomasa. Encontrando una disminución en la concentración de la molécula de dibenzotiofeno (DBT) después de dos semanas con la posible formación de subproductos.

I. INTRODUCCIÓN

El petróleo y otros combustibles fósiles constituyen más del 60% de las fuentes de energía primaria, este hecho ha generado apreciables problemas ambientales en los últimos años. Al quemarse, los combustibles fósiles producen óxidos de azufre y de nitrógeno que, al combinarse con el agua de las nubes, se precipitan en forma de lluvia ácida, esto puede afectar a los bosques, eliminar la vida de los lagos y desertizar grandes superficies terrestres. Éstas son algunas razones por lo que es necesario llevar a cabo un proceso de eliminación del azufre en los combustibles fósiles antes de su utilización [1].

El contenido de azufre en los crudos mexicanos varía de un 0.9% a un 7.0%. De este azufre alrededor del 40% se encuentra unido a moléculas orgánicas siendo la más representativa el dibenzotiofeno. Este compuesto está constituido por dos moléculas orgánicas de benceno unidas a un tiofeno que contiene el átomo de azufre. El DBT es un compuesto con un peso molecular de 184. 26 g/mol; es soluble en disolventes no polares como hexano, y poco polares como el acetonitrilo, la acetona y en alcoholes calientes [2].

La eliminación del azufre de moléculas orgánicas como el DBT es difícil de realizar tanto por métodos fisicoquímicos como biológicos dada la especificidad del mecanismo de eliminación del azufre de moléculas orgánicas como el DBT. Actualmente, los procesos fisicoquímicos tienen un elevado costo por su alto requerimiento energético, siendo los

métodos biológicos de desulfuración una alternativa a esta problemática.

La biodesulfuración es un proceso en el cual participan microorganismos, en este caso hongos, para la desulfuración del carbón. El metabolismo de estos microorganismos se basa en que pueden oxidar los compuestos reducidos del azufre, transformándolos en compuestos solubles de fácil eliminación.

La metabolismo de estos hongos tienen la capacidad de transformar una gran variedad de compuestos orgánicos, mineralizándolos, ya sea a través de enzimas intracelulares o excretándolas al medio, esto ofrece un gran potencial para su uso en estos procesos y una ventaja sobre el metabolismo bacteriano, puesto que está obligado a la internalización de los compuestos, antes de ser degradados.

Penicillium notatum es un hongo filamentosos que está ampliamente distribuido en la naturaleza donde se puede hallar en el suelo, la vegetación caída y en el aire. Este organismo prefiere climas frescos y moderados, tiene mejor crecimiento en lugares húmedos y comúnmente está presente donde hay una variedad de materia orgánica disponible. Vive principalmente en las sustancias orgánicas biodegradables y en materias primas si hallan el agua y los nutrientes necesarios, ya sean de origen vegetal o animal. Asimismo, este es uno de los hongos más utilizados en la degradación de hidrocarburos del petróleo en muestras de suelo [3], pues durante la biodegradación, se ha comprobado que este tipo de hongos está equipado con la maquinaria metabólica para utilizar al contaminante como fuente de carbono y energía para su crecimiento, produciendo biomasa, subproductos, dióxido de carbono y agua [4].

Los *Aspergillus* son capaces de utilizar una enorme variedad de sustancias como alimento debido al gran número de enzimas que producen. Se ha encontrado la presencia de hongos de éste género en suelos contaminados con hidrocarburos. En la bibliografía se encuentra reportado que microorganismos de éste género pueden crecer sobre hidrocarburos lineales y aromáticos, incluyendo a los aromáticos heterocíclicos que contienen azufre como el DBT. Particularmente algunos hongos como *Aspergillus niger* oxidan tioésteres y sulfuros orgánicos cíclicos a sus correspondientes sulfóxidos y sulfonas [5]; éstos datos permiten suponer que es posible metabolizar de alguna manera los hidrocarburos, incluida la desulfuración de DBT.

II. CONCEPTOS BÁSICOS

A.niger al igual que *P. notatum*, son hongos filamentosos cuyas enzimas relacionadas con la oxidación del DBT son el

M. A. CASTILLO COLLAZO, S. P. CORTÉS SÁNCHEZ, A. M. PALACIOS CANDIA, I. A. SALINAS RANGEL y T. VERA SOTO pertenecen a la carrera de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ciencias Químicas y realizaron el proyecto dentro del curso de INGENIERÍA DE REACTORES Y MICROBIOLOGÍA (Email: mario_castillocollazo@hotmail.com).

El proyecto fue asesorado por el Dr. TOMÁS EDUARDO CHÁVEZ MIYAUCHI y la Maestra ANABELLE CERÓN NAVA.

citocromo P450 (CIP450) y las ligninolíticas lacasa, siendo ésta última un fenol oxidasa extracelular producido por el micelio de este ascomiceto.

Bioquímicamente, la lacasa es una enzima que oxida una variedad de compuestos aromáticos, es decir, cataliza la remoción de un electrón y un protón de hidroxilos fenólicos o de grupos amino aromáticos, para formar radicales libres fenoxilo y radicales amino, respectivamente. Si la oxidación se llevara a cabo por esta enzima oxidasa, el oxígeno sería el aceptor final de electrones y el DBT el donador de estos. La enzima lacasa oxida los sustratos al remover un electrón por vez y genera radicales libres los cuales pueden polimerizarse. La enzima almacena electrones de reacción de oxidación individuales y en su estado totalmente reducido contiene un total de cuatro electrones, así, la enzima puede transferir estos electrones al oxígeno molecular para formar agua [6].

Además del sistema enzimático extracelular, los hongos poseen otro intracelular donde se involucra el CIP450, esta ruta intracelular está presente en todos los organismos eucariotas, que lleva a cabo funciones del metabolismo endógeno, es decir, la degradación de sustancias del propio organismo y la eliminación de sustancias exógenas como son drogas, sustancias carcinógenas, pesticidas, etc. El CIP450, clasificado como una enzima monooxigenasa, es el componente final de una cadena de electrones que cataliza la oxidación de sustratos. Los electrones involucrados en la oxidación de los sustratos por el CIP450 pueden provenir de la nicotinamida y la adenina dinucleótido fosfato (NADPH), que es una coenzima que participa en reacciones tanto anabólicas como catabólicas.

Radwan en [7] reportar la presencia de hongos del género *Aspergillus* en un estudio de biodegradación de hidrocarburos en suelos contaminados con petróleo. Del mismo modo Pritchard en [8] señalan que microorganismos del género *Aspergillus* pueden crecer sobre hidrocarburos lineales y aromáticos, incluyendo a los aromáticos heterocíclicos que contienen azufre como el DBT.

De acuerdo a la literatura, la ruta metabólica propuesta que explica la oxidación del átomo de azufre sin rompimiento de enlaces se muestra en la figura 1.

III. METODOLOGÍA

En este experimento utilizamos tres matraces, el control y dos con el contaminante. En el matraz control añadimos 5 ml de una cepa del hongo *A. niger*, con una cantidad aproximada de 1×10^6 - 1×10^8 esporas, en 80 ml de la solución buffer; en los dos matraces restantes (1 y 2), agregamos las mismas proporciones de cepa y de buffer además de añadir 4 ml de la solución de DBT 0.02170 mM como sustrato. Asimismo, todos los matraces se metieron a una incubadora a 28°C.

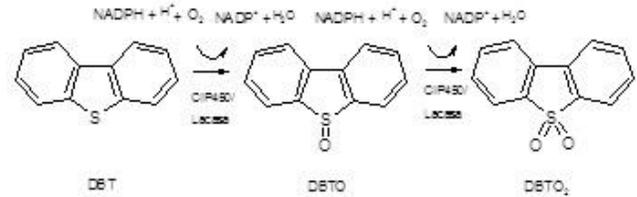


Figura 1. La ruta metabólica implica en primer lugar la oxidación del DBT hasta DBT sulfóxido (DBTO) y posteriormente de DBTO hasta DBT sulfona (DBTO₂). La degradación de DBT se lleva a cabo, ya que el DBT se oxida parcialmente, permaneciendo intactos los enlaces C-S, para distinguirla de la desulfuración del DBT, en que los enlaces C-S se rompen. Además, en este proceso finalmente no se extrae el átomo de azufre de la molécula.

En el Apéndice se muestra la curva de calibración que se realizó para la determinación de la concentración final del DBT.

Del matraz 1 se tomó la primera muestra después de una semana mientras que en el matraz 2, se tomó la muestra en la segunda semana. Antes de filtrar se pesaron los filtros, y después se filtraron, posteriormente se dejaron secando durante un día en la incubadora a 28°C y se determinó la biomasa de los hongos.

Para determinar la cantidad de DBT remanente por el hongo, se extrajo 1 ml del líquido residual del filtrado y se agregó 1 ml de acetonitrilo, finalmente se determinó su absorbancia en HPLC y con la curva de calibración se determinó la concentración del remanente.

IV. RESULTADOS

En la Figura 2 se observa que durante la primera semana ambas cepas se encontraban en fase de adaptación por lo que el crecimiento fue mínimo; mientras que para la segunda semana el crecimiento de éstos fue superior a 10 veces su peso anterior.

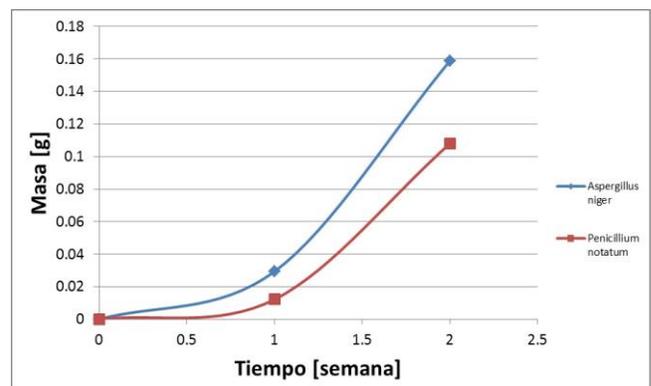


Figura 2. Biomasa del hongo

En la Figura 3 se aprecia la disminución de la concentración del DBT en diferente proporción para cada cepa, lo que indica la degradación del sustrato por el hongo.

De acuerdo a los perfiles de crecimiento de hongo y degradación de DBT, se obtuvieron los parámetros cinéticos de acuerdo a la ecuación de Monod para un crecimiento microbiano en un sistema no estructurado no segregado, en el cual se puede apreciar en el cuadro I.

$$\mu = \mu_m \frac{S}{K_s + S}$$

$$\mu = \left(\frac{dX}{dt} \right) / X$$

donde μ representa la velocidad específica de crecimiento, μ_m la velocidad máxima de crecimiento, S la concentración de sustrato y K_s constante de velocidad media.

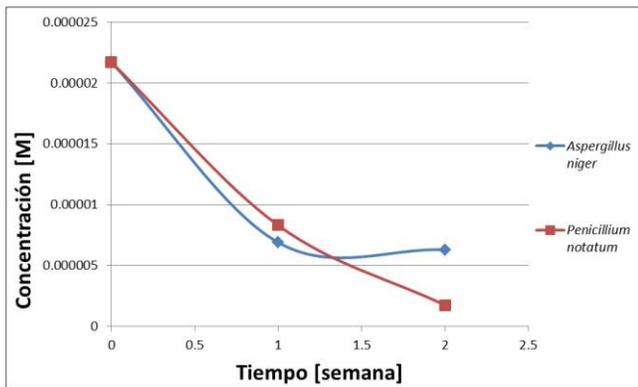


Figura 3. Concentración del DBT

CUADRO I
PARÁMETROS CINÉTICOS DE CRECIMIENTO DE MONOD

Hongo	K_s [M]	μ_m [hr^{-1}]
<i>Aspergillus niger</i>	9.097×10^{-6}	0.0195
<i>Penicillium notatum</i>	2.205×10^{-6}	0.01365

Por lo tanto, la ecuación cinética que describe la degradación del DBT por *A. niger* (1) y *P. notatum* (2) se muestra a continuación:

$$\mu = 0.01948 \frac{S}{9.097 \times 10^{-6} + S} \quad (1)$$

$$\mu = 0.01365 \frac{S}{2.205 \times 10^{-6} + S} \quad (2)$$

V. CONCLUSIONES

Aspergillus niger y *Penicillium notatum* mostraron tolerancia al DBT, por lo que es posible afirmar su capacidad de crecer en presencia de este contaminante; sin embargo, no se lleva a cabo la desulfuración del DBT, es decir, no se rompen los enlaces carbono-azufre de la molécula.

De acuerdo a la literatura, el metabolismo de los hongos supone la oxidación del DBT hasta la forma de DBT sulfona, siendo esta molécula el producto final de la ruta de oxidación de tal manera que hay una disminución en la concentración final del DBT como se mostró en los resultados.

Para comprobar la formación de los subproductos generados durante la oxidación del DBT se tienen que hacer más estudios; éstos nuevos compuestos azufrados, aumentan su polaridad y modifican algunas de sus propiedades tales como su punto de ebullición, lo que permite que su separación se lleve a cabo por operaciones unitarias más sencillas como la extracción con solventes o la destilación fraccionada.

La investigación en esta área es de gran importancia para la industria petrolera, ya que reduciría los costos inherentes a la adaptación de tecnologías que permitan el cumplimiento de las normativas ambientales cada vez más exigentes de nuestros mercados tradicionales y, por otro lado, facilitaría la introducción de nuestros productos en nuevos mercados aunque para este tipo de técnica se tienen que cuidar ciertos parámetros como: la elección del microorganismo, el tiempo de conservación, la manipulación, la velocidad de crecimiento, la ruta metabólica, el tipo de subproductos, etc.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a nuestros padres por darnos la posibilidad de estudiar en una institución de prestigio como lo es la Universidad La Salle. Los autores agradecen a la Maestra Anabelle Cerón Nava por su apoyo incondicional y entusiasmo para el desarrollo del proyecto, así como al Dr. Tomás Eduardo Chávez Miyauchi por la inspiración que nos brindó durante el desarrollo experimental.

APÉNDICE

En el cuadro II se muestran las concentraciones que utilizamos de DBT, con acetonitrilo como disolvente, para realizar la curva de calibración, asimismo se puede observar en la Figura 4 la curva de calibración.

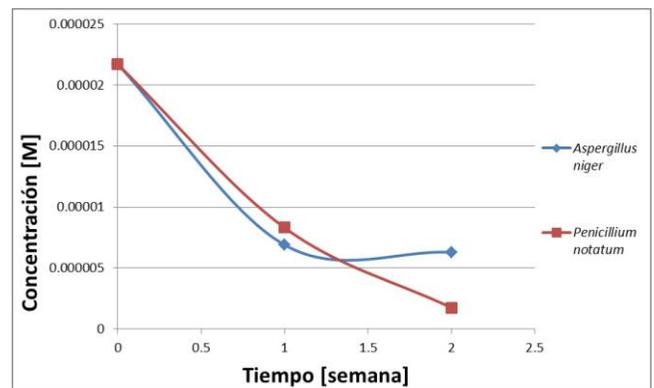


Figura 4. Curva de calibración del DBT

REFERENCIAS

- [1] C. Hernández del Olmo, "Desulfuración de dibenzotiofeno con *Rhodococcus erythropolis* IGTS8," 2014. Recuperado el 15 de Mayo de 2014, de <http://biblioteca.ucm.es/tesis/qui/ucm-t28349.pdf>
- [2] C. M. Zuleta Vargas, "Desulfuración de dibenzotiofeno por hongos aislados de suelos contaminados con hidrocarburos," 1998. Obtenido de <http://148.206.53.84/tesi/ami/UAM3663.pdf>
- [3] R. Atlas "Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective," *Microbiol. Rev.*, vol 45, No. 1, 180-209, 1981.

CUADRO II
CONCENTRACIONES DE LAS MUESTRAS PARA LA CURVA DE CALIBRACIÓN

Muestra	Concentración [M]	Área [mVs]
1	0.0001	12434.04
2	0.00005	10824.15
3	0.000025	6582.59
4	0.0000125	3531.67
5	0.00000625	2399.72

- [4] J. Eweis, et al. Principios de biorrecuperación. Ed. Mac Graw Hill, 1999.
- [5] A. Laborde y D. Gibson, "Metabolism of dibenzothiophene by *Beijerinckia* species," *Applied and Environmental Microbiology*, vol 34, no. 6, 783-790, 1977.
- [6] F. Villaseñor Ortega, "Oxidación del dibenzotiofeno mediante los sistemas: enzima lacasa-ABTS o ácido fosfotúngstico-peróxido de hidrógeno y desulfuración oxidativa del diésel," 2004. <http://tesiMiami.izt.uam.mx/uam/asp/am/presentatesis.php?recno=200181175&docs=200181175.pdf>
- [7] S. Radwan, N. Sorkhon, R. Fardoun y H. Al-Hasan, "Soil management enhancing hydrocarbon biodegradation in the polluted Kuwaiti desert," *Applied of Microbiology and Biotechnology*, vol. 44, no. 1-2, 265-270, 2005.
- [8] P. Pritchard, J. Mueller y D. Santavy, "The potential Importance of Biodiversity in environmental biotechnology applications: Bioremediation of PAH-contaminated soil and sediments," Allsopp D., Colwell R. y Hawksworth D., (Eds.), *Microbial diversity and ecosystem function*, Pub. CAB. International, Cambridge, UK. 1995.