

Microbiología industrial

Guillermo Gosset Lagarda*

Vol. 48, No. 2
Abril - Junio, 2006
pp. 91 - 98

RESUMEN. La aplicación industrial de los microorganismos es una actividad antigua que se orientaba principalmente a la producción y modificación de alimentos. El conocimiento acumulado acerca de la genética y la fisiología microbianas, así como el desarrollo de herramientas moleculares que permiten la ingeniería genética, generaron la posibilidad de modificar a los microorganismos para ser empleados en un amplio espectro de aplicaciones industriales que incluyen las áreas alimentaria, farmacéutica y química. En este trabajo, se presentan ejemplos sobre el desarrollo y caracterización de cepas microbianas para aplicaciones industriales específicas. Se presentan y discuten las estrategias seguidas para generar cepas sobreproductoras de compuestos aromáticos y ramnolípidos con *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. Por otro lado, la contaminación ocasionada por el azufre y el nitrógeno orgánicos presente en el petróleo es un problema serio en todo el mundo. En este trabajo se comparten experiencias sobre el aislamiento, la caracterización y el empleo de microorganismos autóctonos para la desulfurización y desnitrógenación de fracciones de petróleo.

Palabras clave: Control biológico, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, baculovirus, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Bauberia bassiana*, *Metarhizium anisopliae*1, *Trichoderma* spp.

INTRODUCCIÓN

El empleo de microorganismos para la producción de compuestos útiles es una actividad antigua. Estos organismos han sido empleados por pueblos en todo el mundo para la modificación de las propiedades de algunos alimentos y para la producción de bebidas alcohólicas. La existencia de los microorganismos y su participación en transformaciones químicas fue demostrada por los trabajos pioneros de científicos como Louis Pasteur y Antonie van Leeuwenhoek. Éstos y otros descubrimientos fueron la base para el desarrollo de la microbiología industrial. Durante el siglo pasado, el conocimiento acumulado por diferentes disciplinas, generaron el conjunto de herramientas conocidas como ingeniería genética, que permiten la modificación directa del material genético en cualquier organismo. La aplicación de estas herramientas al desarrollo de cepas microbianas de uso industrial, ha ampliado de forma muy importante el tipo y número de productos útiles que pueden ser obtenidos. Ahora es

ABSTRACT. In this review we cover the biological control of insects, bacteria and fungus that affect different crops. Using different microorganism as bacteria viruses and fungus can do the biological control of these important problems. In this work we describe with detail the mode of action of the different microorganisms used to control insects and plant diseases. We also present novel strategies to improve the efficiency of these microorganisms against their targets and we present the development and production of several formulations to be used in the fields for the biological control of some plant problems.

Key words: Biological control, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, baculovirus, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Bauberia bassiana* y *Metarhizium anisopliae*1, *Trichoderma* spp.

posible que bacterias puedan producir proteínas humanas para uso terapéutico, así como enzimas y compuestos químicos de uso industrial. Así mismo, ha sido posible identificar bacterias que degradan compuestos tóxicos e incrementar esta capacidad mediante modificaciones genéticas.

Actualmente, la industria química se basa en el empleo de derivados del petróleo como materia prima. Algunos de estos procesos tienen la desventaja de generar subproductos que pueden contaminar el medio ambiente. Esto ha generado la necesidad de identificar y utilizar bacterias capaces de degradar los compuestos tóxicos para convertirlos en sustancias inocuas. Por otro lado, al ser el petróleo recurso no renovable, su disponibilidad será limitada en el futuro. Por estos motivos, se buscan alternativas tecnológicas que permitan obtener productos mediante procesos no contaminantes y que no dependan del petróleo. Una de las alternativas tecnológicas más promisorias se basa en el empleo de materias primas constituidas por fuentes renovables de carbono como los azúcares de origen vegetal. La viabilidad de este tipo de tecnologías depende de la capacidad de obtener a un bajo costo azúcares a partir de material vegetal y la posibilidad de contar con cepas microbianas modificadas para convertir eficientemente dichas materias primas en compuestos útiles.

* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D. F. 04510.

Ingeniería de vías metabólicas para la producción de compuestos aromáticos en *Escherichia coli*

José Luis Báez-Viveros,* Joel Osuna,* Georgina Hernández-Chávez,* Xavier Soberón,* Francisco Bolívar,* Guillermo Gosset*

* Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 503-10, Cuernavaca, Mor. 62250. gosset@ibt.unam.mx

Los compuestos aromáticos tienen un gran número de aplicaciones en las industrias química, farmacéutica y de alimentos. El aminoácido aromático L-fenilalanina (L-Fen) es utilizado extensamente por la industria alimentaria, reportándose una producción anual mundial de 11,000 toneladas.² Este aminoácido es producido mediante síntesis química, en un proceso donde se genera una mezcla racémica de los isómeros D y L, lo cual complica el proceso de purificación.⁴ Una alternativa a este método, es la síntesis microbiana a partir de azúcares como materia prima. Sin embargo, para que un proceso biotecnológico como este pueda ser viable económicamente, debe aproximarse a la mayor productividad y el rendimiento posibles en la conversión de la materia prima (glucosa), al producto deseado.

En este trabajo, se aplicaron las herramientas de la ingeniería de vías metabólicas para el desarrollo y la caracterización de cepas de *E. coli* diseñadas para la producción de L-Fen. La estrategia utilizada se basó en incrementar la disponibilidad metabólica del precursor aromático fosfoenolpiruvato (PEP) y la redirección del flujo de carbono de la vía común de síntesis de compuestos aromáticos hacia la vía de síntesis de L-Fen. Esta estrategia fue implementada empleando una cepa de *E. coli* que carece del sistema de fosfotransferasa (PTS). El PTS participa en el transporte y fosforilación de la glucosa, utilizando al PEP como donador del grupo fosfato. Esta situación limita la cantidad de PEP que puede ser dirigido hacia la vía de síntesis de compuestos aromáticos. En este trabajo, se utilizó una cepa de *E. coli* previamente aislada, la cual carece del PTS pero ha recuperado la capacidad de transportar glucosa utilizando ATP como donador del grupo fosfato (fenotipo PTS⁻ Glucosa⁺).³ Por otro lado, la capacidad de dirigir el flujo de carbono hacia la vía de síntesis de L-Fen depende de que la célula contenga una versión mutante insensible a inhibición alostérica de la enzima bifuncional

corismato mutasa-prefenato deshidratasa (CM-PDT). Utilizando la reacción en cadena de polimerasa, se amplificó del gene *pheA*, el segmento correspondiente a la región catalítica de CM-PDT y eliminando el dominio involucrado en la inhibición alostérica por L-Fen. La enzima mutante fue mejorada en su actividad catalítica siguiendo un esquema de evolución dirigida. La cepa PTS⁻ Glucosa⁺ y una cepa control PTS⁺ fueron transformadas con tres plásmidos; conteniendo genes que codifican para una versión insensible a inhibición alostérica de la enzima DAHP sintasa, tranacetolasa y la versión evolucionada de CM-PDT. En condiciones de cultivo en matraz, se determinó que las cepas PTS⁺ y PTS⁻ Glucosa⁺ produjeron L-Fen con un rendimiento a partir de glucosa de 0.21 y 0.33 g/g, correspondiendo al 38 y 60% del rendimiento máximo teórico (0.55 g/g), respectivamente. El rendimiento obtenido con la cepa PTS⁻ Glucosa⁺ es el más alto reportado para la producción microbiana de L-Fen.¹ Estos resultados indican que la aplicación del fenotipo PTS⁻ Glucosa⁺ en cepas de *E. coli* es una estrategia que permite incrementar el rendimiento a partir de glucosa para compuestos aromáticos.

REFERENCIAS

1. Báez-Viveros J. L., Osuna J., Hernández-Chávez G., Soberón X., Bolívar F. & Gosset G. 2004. Metabolic Engineering and Protein Directed Evolution Increase the Yield of L-Phenylalanine Synthesized from Glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnology & Bioengineering*, 87:516-524.
2. Bongaerts J., Krämer M., Müller U., Raeven L. & Wubbolts M. 2001. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng* 3:289-300.
3. Flores N., Yong-Xiao J., Berry A., Bolivar F. & Valle F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 14:620-623.
4. Frost J.W. & Lievens J. 1994. Prospects for biocatalytic synthesis of aromatics in the 21st century. *J Chem* 18:341-348.

La síntesis de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*

Gloria Soberón Chávez,* Humberto García,* Marisela Aguirre,* Luz María Delgado,* Abigail González,* Jeiry Toribio,* Alsino Villarreal*

* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D. F. 04510.

Pseudomonas aeruginosa es una γ proteobacteria que puede ser aislada de una gran variedad de ambientes tanto acuáticos como terrestres, por lo que se ha considerado ubicua.^{3,6} Esta bacteria es, además, un patógeno oportunista humano que representa un problema de salud importante ya que presenta una alta resistencia a antibióticos¹² y es una infección común en ambientes hospitalarios.⁷ Por otra parte, presenta una alta tasa de morbilidad y mortalidad en pacientes que tienen fibrosis quística,⁵ el padecimiento genético más común en poblaciones caucásicas. La producción de gran parte de los factores de virulencia de *P. aeruginosa*, al igual que la de los ramnolípidos, está regulado a nivel transcripcional por una intrincada red llamada la respuesta sensora de quórum.^{20,25}

Sin embargo, a la vez que *P. aeruginosa* causa al hombre problemas de salud, esta bacteria tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Así se sabe que es uno de los pocos organismos capaces de degradar al-

gunos contaminantes como los alcanos de cadena ramificada.¹⁹ Produce biosurfactantes²² que son útiles para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos⁸ o con metales pesados¹⁰ y pueden ser usados en el control biológico de hongos zoospóricos;²⁴ y algunas enzimas, como la lipasa.⁹ con distintas aplicaciones potenciales.²³ *P. aeruginosa*, al igual que otras *Pseudomonas*, produce un polímero de ácidos grasos, el polihidroxialcanoato (PHA), que puede ser usado para producir plásticos biodegradables.¹⁵

Los biosurfactantes tienen una serie de ventajas sobre los surfactantes sintetizados químicamente, ya que no son tóxicos y son biodegradables.¹¹ *P. aeruginosa* produce los biosurfactantes ramnolípidos y sus precursores los dímeros de ácidos grasos (3-(3-hidroxi)alcanoiloxi)alcanoicos o HAAs²² (Fig. 1). Los principales ramnolípidos producidos por esta bacteria son los que tienen una molécula de ramnosa (mono-ramnolípidos, Fig. 1) y los que tienen dos (di-ramnolípidos, Fig. 1).

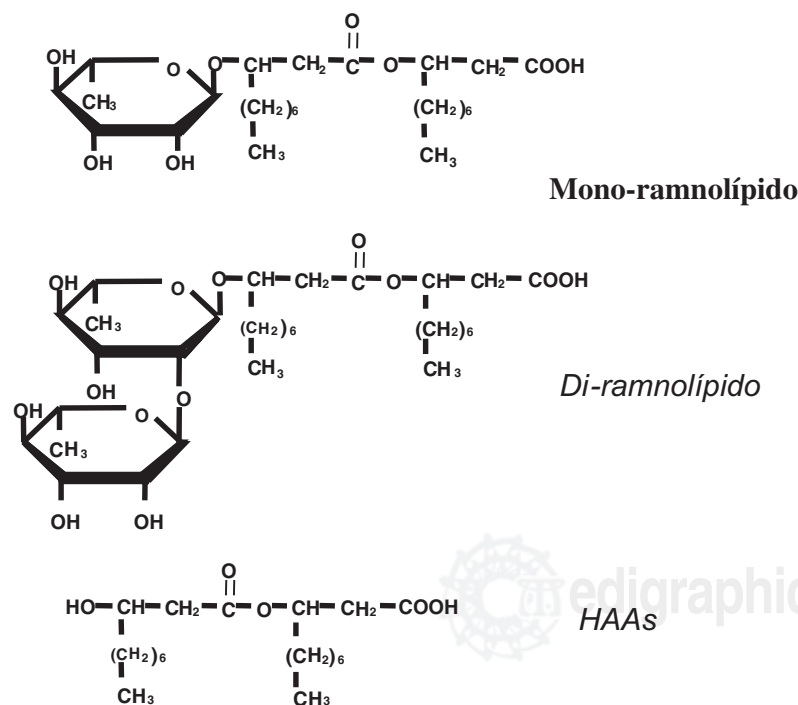


Figura 1. Estructura de los ramnolípidos y el ácido (3-(3-hidroxi)alcanoiloxi)alcanoico (HAAs). Se muestran las especies con dímeros de ácido 3-hidroxi)decanoico que es la especie más abundante.

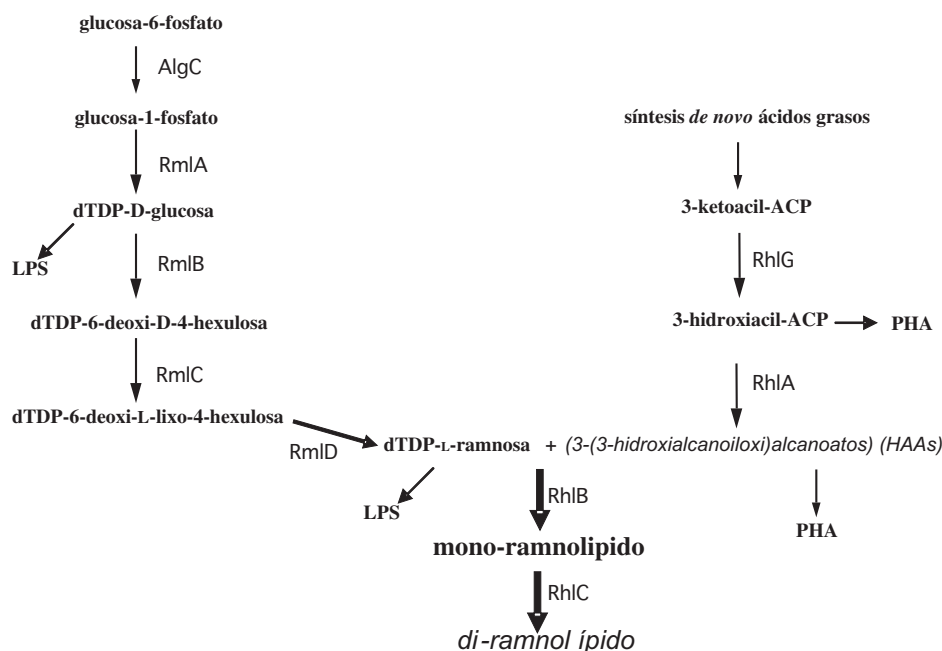


Figura 2. Ruta de síntesis de los ramnolípidos y HAA.

El sustrato de las dos ramnosiltransferasas que intervienen en la síntesis de los ramnolípidos, RhlB para los mono-ramnolípidos¹³ y RhlC para los di-ramnolípidos,¹⁸ es la dTDP-L-ramnosa (Fig. 2). Este azúcar activado es también un precursor del lipopolisacárido (LPS)¹⁷ y es sintetizado por las enzimas RmlA, RmlB, RmlC y RmlD a partir de glucosa-1-fosfato (17, Fig. 2). La enzima AlgC, que también participa en la síntesis del exopolisacárido alginato, convierte la glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato.¹⁶

La enzima RhlA (Fig. 2) usa como sustrato ácidos grasos de la síntesis celular, drenados del ciclo general de síntesis *de novo* por la enzima RhlG,² o del catabolismo de ácidos grasos, para sintetizar los HAA que son sustratos de RhlB en la síntesis del mono-ramnolípidos.^{1,4} La vía de biosíntesis de los ramnolípidos está muy relacionada con la de PHA, ya que la enzima RhlG provee sustratos para su síntesis (2, Fig. 2) la actividad de RhlA modifica la producción de este polímero (21, Fig. 2).

Debido a que la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* es un proceso multienzimático que usa intermediarios del metabolismo primario de la bacteria, como son la dTDP-L-ramnosa y los ácidos grasos, y a que su vía de síntesis está muy relacionada con la síntesis de otros compuestos celulares (alginato, LPS, PHA), la construcción de cepas hiperproductoras de estos biosurfactantes requeriría un enfoque de ingeniería de vías metabólicas. Por otra parte, ya que la expresión del operón *rhlAB* está regulado por la respuesta sensora de quórum, junto con diversos factores de virulencia,^{20,25} no es fácil construir deriva-

dos que sobre expresen estas enzimas clave en la vía de síntesis de los ramnolípidos. Sobre todos estos problemas para la construcción de cepas sobreproductoras de ramnolípidos está la limitante de que *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista y no puede ser usado para la producción industrial de ningún producto. Como un enfoque alternativo para tener cepas que puedan ser usadas a nivel industrial para la síntesis de ramnolípidos, se ha expresado el operón *rhlAB* en huéspedes heterólogos.^{13,14} Recientemente reportamos¹ que si se coexpresa en *Escherichia coli* el operón *rhlAB* y el que codifica para las enzimas de la síntesis de dTDP-L-ramnosa (*rmlBDAC*), se puede obtener una producción de mono-ramnolípidos que no es mucho más baja que la producida por *P. aeruginosa*. La optimización de las condiciones de cultivo y la manipulación genética de cepa recombinantes de *E. coli* que produzcan ramnolípidos podría representar una estrategia viable para la construcción de cepas que puedan ser usadas a nivel industrial para la síntesis de estos biosurfactantes.

REFERENCIAS

- Cabrera, N, A.-P. Richardson, C. Olvera, L. G. Treviño, E. Déziel, F. Lépine & G. Soberón-Chávez. 2006. Mono-rhamnolipid and 3-(3-hydroxyalkanoiloxo)alkanoic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. Appl. Microbiol. Biotechnol. Aceptado para su publicación.
- Campos-García, J., A. D. Caro, R. Nájera, R. M. Miller-Maier, R. A. Al-Tahhan, & G. Soberón-Chávez. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes a NADPH-dependent b-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. J. Bacteriol. 180:4442-4451.

3. Costerton, J. W. 1980. *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease, p. 15-24. In C. D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.
4. Déziel E., F. Lépine, S. Milot & R. Villemur. 2003. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol.* 149:2005-2013.
5. Govan, J. R. W. & V. Deretic 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60:539-574.
6. Hardalo, C. & S. C. Edberg. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23:47-75.
7. Lyczak, J. B., C. L. Cannon & G. B. Pier. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection* 2:1051-1060.
8. Maier, M. R. & G. Soberón-Chávez. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:625-633.
9. Martínez, A. & G. Soberón-Chávez. 2001. Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* IGB83. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:731-735.
10. Miller, R. M., 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 103(Suppl):59-62.
11. Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications of biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133:183-198.
12. Nikaido, H. 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:516-523.
13. Ochsner, U. A., A. Fiechter & J. Reiser. 1994. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol. Chem.* 269:19787-19795.
14. Ochsner, U. A., J. Reiser, A. Fiechter & B. Witholt. 1995. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous host. *Appl Environ. Microbiol.* 61:3503-3506.
15. Olivera, E. R., D. Cenicero, R. Jodra, B. Minambres, B. García, et al. 2001. Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.* 3:612-618.
16. Olivera, C., J. B. Goldberg, R. Sánchez & G. Soberón-Chávez. 1999. *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipids biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 179:85-90.
17. Rahim, R., L. L. Burrows, M. A. Monteiro, M. B. Perry & J. S. Lam. 2000. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 146:2803-2814.
18. Rahim, R., U. A. Ochsner, C. Olivera, M. Graninger, P. Messner, J. S. Lam & G. Soberón-Chávez. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40:708-718.
19. Schaeffer T. L., S. G. Cantwell, J. L. Brown, D. Watt & R. R. Fall. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:742-746.
20. Soberón-Chávez, G., M. Aguirre-Ramírez & L. G. Ordóñez. 2005. Is *Pseudomonas aeruginosa* only sensing quorum? *Critical Rev. Microbiol.* 31:171-182.
21. Soberón-Chávez, G., M. Aguirre-Ramírez & R. Sánchez. 2005. The *Pseudomonas aeruginosa RhlA* enzyme is not only involved in rhamnolipid, but also in polyhydroxyalkanoate production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:675-677
22. Soberón-Chávez, G., F. Lépine & E. Déziel. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:718-725.
23. Soberón-Chávez G. & B. Palmeros. 1994. *Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. *Critical Rev. Microbiol.* 20:95-105.
24. Stanghellini M. E. & R. M. Miller. 1997. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoospore plant pathogens. *Plant Diseases* 81:4-12
25. van Delden, C. & B. H. Iglewski. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4:551-560.

Compartiendo experiencias de microbiología y biotecnología petrolera

Sylvie Le Borgne*

* Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. División de Ciencias Naturales e Ingeniería.

La importancia de la industria petrolera a nivel mundial y en nuestro país es indiscutible. La explotación de los yacimientos petroleros empezó hace un siglo y, hoy en día, nuestra sociedad es fuertemente dependiente del petróleo para la producción de energía y de materias primas para diversas industrias. Otro problema asociado al petróleo es la contaminación ambiental. Los derrames de petróleo durante la extracción, producción y transporte de este energético son frecuentes. Los plásticos en la actual-

idad son en gran parte producidos a partir del petróleo, su producción mundial excede 100 millones de toneladas al año y se estima que cerca de la mitad de estos plásticos se desecha después de 2 años de uso sin ser reciclada.⁵ La producción de gases con efecto invernadero durante la quema de combustibles derivados del petróleo y la refinación del petróleo impacta fuertemente al medio ambiente y es responsable en gran medida del cambio global observado en nuestro planeta.

La refinación del petróleo es principalmente basada en procesos fisicoquímicos como destilación y catálisis química que operan a altas temperaturas y presiones. Estos procesos son muy costos a nivel energético además de ser altamente contaminantes. En años recientes se ha propuesto que los bioprocesos podrían ser una alternativa ya que las reacciones bioquímicas que ocurren en los microorganismos son muy específicas, operan a bajas temperaturas y presiones además de que generan pocos subproductos indeseables.⁷ Para poder implementar bioprocesos en la industria petrolera, es necesario poder contar con microorganismos resistentes y activos en las condiciones encontradas en la industria petrolera: medios hidrofóbicos complejos, altas temperaturas. Importantes avances ocurridos en ingeniería genética, microorganismos extremófilos, ingeniería de proteínas y biocatálisis en medios no convencionales soportan la idea de que la biotecnología podría integrarse en la industria petrolera. Los principales campos de acción de la biotecnología y de la microbiología petrolera se muestran en la Tabla 1.

A continuación se comparten experiencias sobre biodesulfuración de diesel con microorganismos aislados de suelos contaminados en refinerías mexicanas y sobre la caracterización de microorganismos extremófilos sulfoxidantes autóctonos para la eliminación de azufre inorgánico en corrientes gaseosas.

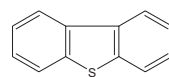
La quema de combustibles provoca la emisión atmosférica de óxidos de azufre que contribuyen a la formación de lluvia ácida y partículas contaminantes. La respuesta legal a este problema ha sido la implementación de normas muy estrictas sobre el contenido de azufre en combustibles como el diesel las cuales requieren de una reducción progresiva del contenido de azufre en este combustible hasta menos de 15 ppm para el año 2006.^{3,4} La Unión Europea propuso que el diesel producido sea libre de azufre en el 2011.⁹ La hidrosulfuración (HDS) es el proceso fisicoquímico que se utiliza actualmente para remover el azufre contenido en fracciones de petróleo a altas temperaturas (350-425°C) y presiones (10-50 kg/cm²). Los costos de mantenimiento y de operación de la HDS se incrementan rápidamente cuando la concentración de azufre y la complejidad de las moléculas azufradas aumenta y cuando se requieren niveles de azufre debajo de 100 ppm. El 70% del azufre contenido en el petróleo crudo se encuentra en tiofenos condensados, como el dibenzotiofeno (DBT) y sus formas sustituidas (Fig. 1) los cuales se concentran en las fracciones utilizadas para producir el diesel. Estas moléculas son las más recalcitrantes al proceso de HDS.⁸ Este escenario ha incentivado la búsqueda de métodos eficientes y novedosos que complementen en el corto plazo o sustituyan en el largo plazo los procesos actuales de HDS.

Dentro de este contexto, se aislaron cuatro cepas bacterianas capaces de utilizar al DBT como única fuente de azufre. Estas cepas fueron capaces de remover selectivamente el azufre del DBT y del 4,6-dimetilDBT sin atacar las estructuras carbonadas de estos compuestos mediante la ya reportada ruta metabólica "4S", produciendo los hidroxibifenilos correspondientes a cada uno de estos compuestos y sulfato inorgánico.⁶ Aunado a ello, se logró reducir de hasta un 60 % el contenido de azufre en dieseles previamente hidrosulfurados en refinerías de PEMEX (Tabla 2). Estas reacciones fueron realizadas con células creciendo en un medio mineral suplementado con diesel. Sin embargo, estas cepas presentaron una baja resistencia a este solvente inactivándose completamente en presencia de tan solo 15% de diesel en el medio de cultivo lo cual limita su aplicabilidad a un proceso industrial.

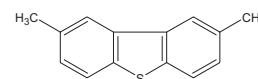
Al secuenciar las 1,500 bases del gene 16S rDNA de estas bacterias y compararlas con las secuencias publicadas en bases de datos publicas, se encontró que estas cepas presentaban una homología con *Rhodococcus erythropolis* (0.56% de diferencia) y *Rhodococcus globerulus* (0.76% de diferencia). Como la determinación de la especie no fue clara empleando la secuenciación del gene 16S

Tabla 1. Principales campos de acción de la biotecnología y de la microbiología petrolera.

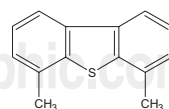
Recuperación microbiana mejorada del aceite
Biocorrosión
Biorrefinación
Biodesulfuración
Biodenitrificación
Biotratamiento
Biorremediación
Tratamiento de aguas y efluentes gaseosos



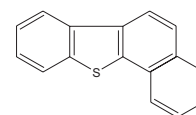
DBT



2,8-dimetilDBT



4,6-dimetilDBT

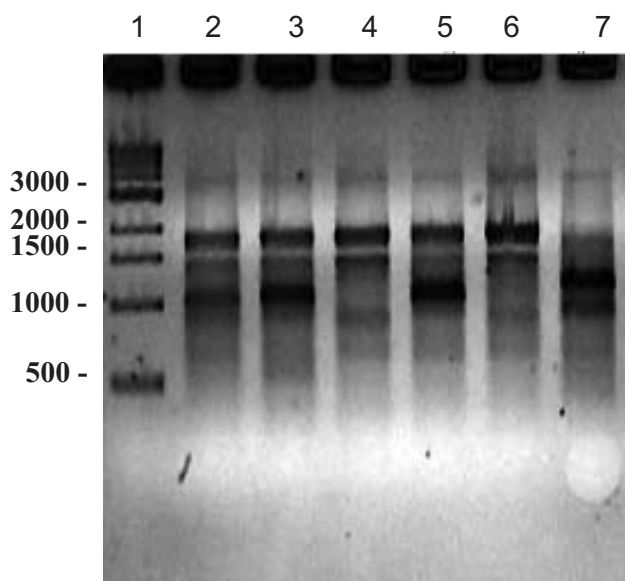


3,4-benzoDBT

Figura 1. Estructura química del DBT y de algunos de sus derivados sustituidos.

Tabla 2. Biodesulfuración de diesel con cepas bacterianas aisladas.

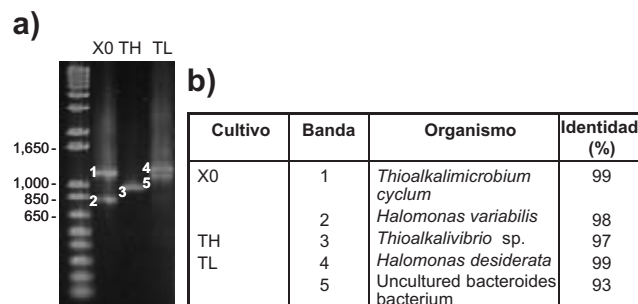
Diesel	% de diesel	[S] inicial (ppm)	[S] final (ppm)	% de remoción
Tula	5	550	210	62
Tula	10	550	380	31
Tula	15	550	550	0
Tula	20	550	550	0
Salina Cruz	5	440	180	60
Salina Cruz	10	440	318	28
Salina Cruz	15	440	440	0
Salina Cruz	20	440	440	0

**Figura 2.** Análisis RAPD de cepas desulfuradoras. Carril 1: cepa IGTS8; carriles 2, 3, 4, 5 y 6: cepas aisladas de refinerías mexicanas; carril 7: cepa X309.

rDNA, estas cepas fueron finalmente nombradas como *Rhodococcus* sp.² Posteriormente, las cepas fueron caracterizadas por el método RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* en inglés) con el fin de ver si estas cepas eran diferentes de otras cepas desulfuradoras de *R. erythropolis* prototipo patentadas IGTS8 y X309. Uno de los cebadores produjo patrones diferentes entre las diferentes cepas y las diferencias observadas fueron tanto en el tamaño como en la intensidad de las bandas (Fig. 2). El análisis RAPD fue entonces capaz de distinguir diferencias entre las diferentes cepas desulfuradoras aisladas en este y otros trabajos mostrando que las cepas aquí reportadas son diferentes de las cepas patentadas IGTS8 y X309 a nivel de su material genético global.

Tabla 3. Reacciones biológicas de sulfoxidación.

Sulfoxidación	
Oxígeno limitante:	
$H_2S + 0.5 O_2 \rightarrow S^0 + H_2O$	Azufre elemental
Exceso de oxígeno:	
$H_2S + 2O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$	Sulfato

**Figura 3.** Análisis de cultivos bacterianos sulfoxidantes.

Algunos efluentes gaseosos de la industria petrolera contienen azufre inorgánico en forma de ácido sulfhídrico H_2S . Este gas es también emitido durante la extracción del petróleo y el gas producido tiene un alto contenido de H_2S . Algunas bacterias denominadas sulfoxidantes tienen la capacidad de oxidar el H_2S en compuestos menos tóxicos a la diferencia del caso anterior en el que las bacterias aisladas tenían la capacidad de remover selectivamente el azufre de moléculas orgánicas complejas convirtiéndolo en sulfato. En el presente caso se produce azufre elemental (Tabla 3). Con estas bacterias se pueden diseñar y operar biofiltros para el tratamiento de emisiones gaseosas de H_2S . En esta parte se describe la caracterización molecular de consorcios bacterianos capaces de oxidar el H_2S y el H_2S en condiciones extremas con un pH de 10. Estos consorcios fueron desarrollados a partir de tierras alcalino-salinas recolectadas en diferentes puntos de la república y enriquecidos en un medio mineral pH 10 con tiosulfato como única fuente de azufre.¹

Se analizaron las poblaciones bacterianas presentes en estos cultivos mediante la técnica molecular de RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* en inglés). La Figura 3a muestra el perfil de bandas obtenido para tres cultivos enriquecidos mientras que la Figura 3b muestra la identificación molecular de los microorganismos correspondientes a cada una de las bandas.

En esta ocasión, se encontraron bacterias sulfoxidantes quimioautótrofas haloalcalófilas (*Thioalkalimicrobium* y *Thioalkalivibrio* así como bacterias heterótrofas halófilas

(*Halomonas*). La banda 5 mostró un porcentaje de homología muy bajo (93%) con una bacteria *Bacteroides* no cultivable por lo que se podría tratar de un género y especie nueva.

Hacia el futuro, la biotecnología y la microbiología petrolera se verán beneficiadas por el aislamiento de un número creciente de microorganismos extremófilos capaces de resistir las condiciones extremas encontradas en la industria petrolera. Los catalizadores biomiméticos que se empiezan a diseñar actualmente son prometedores ya que poseen la especificidad y la selectividad de los biocatalizadores con una base química que les confiere una mayor estabilidad. Finalmente, la biotecnología del futuro tiene que jugar un papel importante en el desarrollo de nuevos materiales biodegradables y fuentes de energía renovables menos contaminantes.

REFERENCIAS

1. Alcántara-Pérez S., Muñoz-Colunga A.M., Le Borgne S. & Olgún-Lora P. 2005. Molecular and physiological characterization of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing microbial cultures from Mexican saline alkaline environments. En preparación.
2. Castorena G., Suárez C., Váldez I., Amador G., Fernández L. & Le Borgne S. 2002. Sulfur-selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by newly isolated *Rhodococcus* sp. strains. FEMS Microbiol. Lett. 215: 157-161.
3. EPA. 2000. Heavy-duty engine and vehicle standards and highway diesel fuel sulfur control requirements. EPA420-F-00-057.
4. Fletcher S. 2000. US EPA proposes severe diesel sulfur limits. Oil Gas J. Online Story, may 17.
5. Greenpeace. 1998. The plastics boom and the looming PVC Waste Crisis. Amsterdam, The Netherlands. <http://archive.greenpeace.org/comms/pvctoys/reports/loomingcontents.html>
6. Kilbane J.J. 1992. Mutant microorganisms useful for cleavage of organic C-S bonds. US Patent 5,104,801.
7. Le Borgne S. & Quintero R. 2003. Biotechnological processes for the refining of petroleum: a general overview. Fuel Proc. Technol. 81:155-169.
8. Monticello D.J. & Finnerty W.R. 1985. Microbial desulfurization of fossil fuels. Annu. Rev. Microbiol. 39: 371-389.
9. Young D. 2001. European fuels meet 2005 specs; refiners look beyond. Oil Gas J. 99(47):Online.

Correspondencia:

Guillermo Gosset.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología/UNAM, Apdo. Postal 503-10, Cuernavaca, Mor. 62250. gosset@ibt.unam.mx