

DEGRADACION DE COMPUESTOS ORGANO-SULFURADOS EN UNA FRACCION AROMATICA MEDIANTE CEPAS DE HONGOS *ASPERGILLUS* Y *PENICILLIUM*.

DEGRADATION OF ORGANIC-SULFUR COMPOUNDS IN AN AROMATIC FRACTION, BY FUNGAL STRAINS OF *ASPERGILLUS* AND *PENICILLIUM*

F. Galarraga¹, J. Ramos², N. Malaver² y A. Pérez¹

1. Instituto de Ciencias de la Tierra, Laboratorio de Geoquímica Orgánica. Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela. Apartado 3895. Caracas 1010-A, Venezuela. 2. Instituto de Zoología Tropical, Sección de Dinámica Ecológica, Facultad de Ciencias, Universidad Central de Venezuela.

RESUMEN

Dois cepas identificadas como *Aspergillus* sp1 y *Penicillium* sp1 y un pool constituido por ambas cepas junto a otras cinco fueron utilizadas con el objeto de medir su capacidad biodegradativa sobre compuestos organo sulfurados presentes en la fracción aromática extraída del crudo MFB-14, proveniente de la Faja Bituminosa del Orinoco. Los resultados obtenidos mediante la técnica de cromatografía de gases con detector específico de azufre (FPD), permiten visualizar un patrón característico de los compuestos benzotiofenos, dibenzotiofenos y de sus respectivos derivados alquílicos con uno o dos grupos metilos. El análisis por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-EM), permitió un estudio más detallado del patrón de oxidación en cada experimento. Para el caso de la cepa *Aspergillus* sp1 se observó una mayor degradación que para la cepa de *Penicillium* sp1 y del pool de cepas. En general en los tres experimentos realizados hay una remoción parcial y/o total de los compuestos dibenzotiofeno (DBT), metil dibenzotiofeno (Me) DBT y dimetil dibenzotiofeno (Me)2DBT siendo el orden degradativo: DBT > ME-DBT (1-Me-DBT > 3,2-Me-DBT > 4-Me-DBT) y, por ultimo, la serie de compuestos (Me)2DBT, comenzando por los isómeros (4.6) y (2.4) > (2.6) y (3.6) > (2.8) y (2.7) > (1.3) y (3.4) dejando prácticamente intactos los isómeros (1.4), (1.6) y (1.7) (Me)2DBT. Análisis por cromatografía iónica a las soluciones acuosas indican que la degradación de los compuestos organo sulfurados no produce cantidades significativas del ion sulfato (SO₄²⁻), además no fueron detectados compuestos bifenilos. Esto sugiere que la remoción de azufre en las moléculas ocurre más por una vía como la propuesta por Kodama y Col. (1973) que con la producción directa de sulfato como lo propone Gallager y Col. (1994). Por otra parte, se evidenció la acción diferencial de las dos cepas de hongos sobre los compuestos organo-sulfurados y la modificación de sus patrones individuales debido a las interacciones entre ellas en el pool.

ABSTRACT

Two strains *Aspergillus* sp1 and *Penicillium* sp1 and a pool constituted by both of them together with five other strains, were used with the main objective of measuring the biodegradative capacity on some organo-sulfur compounds present in an aromatic fraction already extracted from a heavy oil (MFB-14) from Orinoco Oil Belt. The analysis of the aromatic fraction using gas chromatography with a sulfur specific detector (FPD), indicated a visual pattern of a serie of compounds such as Benzothiophenes (BT), Dibenzothiophenes (DBT) and their alkyl derivatives with one or more methyl groups. Furthermore gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), allowed to get more detailed insight about the oxidation pattern in each experiment. In the assay with *Aspergillus* sp1 it was observed a greater degradation of sulfur-organic compounds than in the case of *Penicillium* sp1 and by the pool of strains. In general, in all the experiments performed there was a partial or total removal of the DBT, methyl DBT and dimethyl DBT, with the following degradative order: DBT > Me-DBT (1 MeDBT > 3,2 MeDBT > 4 MeDBT) and finally the dimethyl series with the following isomers: (4.6) and (2.4) > (2.6) and (3.6) > (2.8) and (2.7) > (1.3) and (3.4), leaving intact (1.4), (1.6) and (1.7) isomers. Aqueous solutions analyses done by ionic chromatography indicated that organic-sulfur degradation do not generate a significant amount of sulfate ion (SO₄²⁻). Also non bifenils hidrocarbon were identified. These data suggests that remotion of sulfur from molecules takes place probably through a similar pathway to that proposed by Kodama y Col. (1994) rather than those proposed by Gallger y Col. (1973). On the other hand, it was observed a differential degradation of the heterocycles sulfur organic compounds by the two strains and changes in the degradation pattern of the individual compounds due to interactions by this two strains in the pool.

Palabras Clave: Biotransformación / Fracción Aromática / GC/MS / Hongos / Petróleo / DBT.

Key words: Biotransformation / Aromatic Fraction / Organic Sulfur Compounds / Fungal Strains / Petroleum.

INTRODUCCION

El azufre es el tercer elemento mas abundante en el petróleo, después del carbono y el hidrógeno, encontrándose valores promedio para crudos de diferentes partes del mundo entre 0.03 % a 7.89 % en peso (Ho y Col., 1978). La mayoría del azufre en el petróleo se encuentra en moléculas orgánicas tales como, tiofenos, sulfuros, disulfuros, benzotiofenos, dibenzotiofenos, etc., y en forma inorgánica mayormente como pirita (FeS_2) (Fig. 1). La remoción del azufre para la industria petrolera es de suma importancia ya que se conoce que este elemento es el responsable del envenenamiento catalítico, durante los procesos de reducción del azufre a sulfuro de hidrógeno, proceso este que se conoce como hidrodesulfuración. Otro aspecto que preocupa de manera mas general es el efecto de este elemento al ser liberado a la atmósfera a través de los combustibles fósiles, generando grandes cantidades de dióxido de azufre el cual es convertido en ácido sulfúrico, originando las denominadas lluvias ácidas. La oxidación biológica de los compuestos de azufre mediante el uso de los microorganismos ha sido probada en los últimos años, con la idea de desarrollar una biotecnología que reúna las condiciones necesarias para sustituir en el futuro los procesos petroquímicos de muy alto costo que producen un gran deterioro del ambiente. Con la utilización de diferentes organismos se ha logrado oxidar diferentes clases de compuestos orgánicos presentes en el crudo y entre ellos los heterocíclicos con azufre (Kodama 1977; Kropp y Col., 1994; Wang and Kramiec, 1994). Muchos son los trabajos publicados sobre el efecto que tienen las bacterias en estos compuestos orgánicos, encontrándose transformaciones ya sea por biodegradación, biodesulfuración o mineralización, tanto a nivel de moléculas simples in vitro (por ejemplo DBT) como en muestras naturales complejas como en el petróleo (Fedorak and Westlake, 1984; Foght y Col., 1988; Oshiro y Col., 1995; Constanti y Col., 1996). Sin embargo son muy poco los trabajos dirigidos a entender el efecto de los hongos sobre los compuestos órgano sulfurados.

Ramos y Col. (1997) demostraron la capacidad degradativa de un *pool* de cepas de hongos sobre la fracción aromática de un crudo pesado, en especial de dos cepas identificadas como *Aspergillus*

sp1 y *Penicillium sp1*, estableciendo que la capacidad degradativa está en función de la complejidad molecular.

El objetivo del presente trabajo es determinar en muestras tomadas de esos mismos experimentos, la biotransformación sufrida por los compuestos órgano sulfurados presentes en la fracción aromática de un crudo semipesado proveniente de la Faja Bituminosa del Orinoco.

MATERIALES Y METODOS

Las cepas de los hongos fueron aisladas por Márquez (1992), de distintas fuentes, en particular *Aspergillus sp1* fue aislada de un mene y *Penicillium sp1* de granos de una leguminosa. Las cepas fueron crecidas individualmente en cultivos en tanda y conformaron un *pool* junto a otras 5 cepas de hongos. En todos los casos, como medio de cultivo se utilizó el descrito por Ramos y Col. (1997), el cual es un medio libre de sulfato y con una concentración de 500 ppm de la fracción aromática del crudo MFB-14.

Este crudo pesado, proveniente de la Faja Petrolífera del Orinoco, tiene un contenido de azufre de 3.1% y su fracción aromática, con una alta diversidad química, representa el 32% del total del crudo (Ramos y Col. 1997).

Cada experimento fue replicado de tal manera que al final de cada tiempo de incubación (5, 15 y 60 días), una muestra tomada al azar, después de tratada, fue utilizada para los análisis químicos. En el caso del *pool* se tomó una alícuota para seguir el crecimiento de las cepas. (Márquez, 1992).

El grado de biodesulfuración fue seguido por la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) y la producción del ion sulfato por medio de la técnica de cromatografía iónica.

El análisis de la fracción aromática por CG-EM se llevó a cabo con un espectrómetro de masas, Perkin-Elmer modelo Qmass-910, equipado con una columna capilar de alta resolución tipo SE-54 de 30 metros de largo y 0.25 mm de diámetro interno y

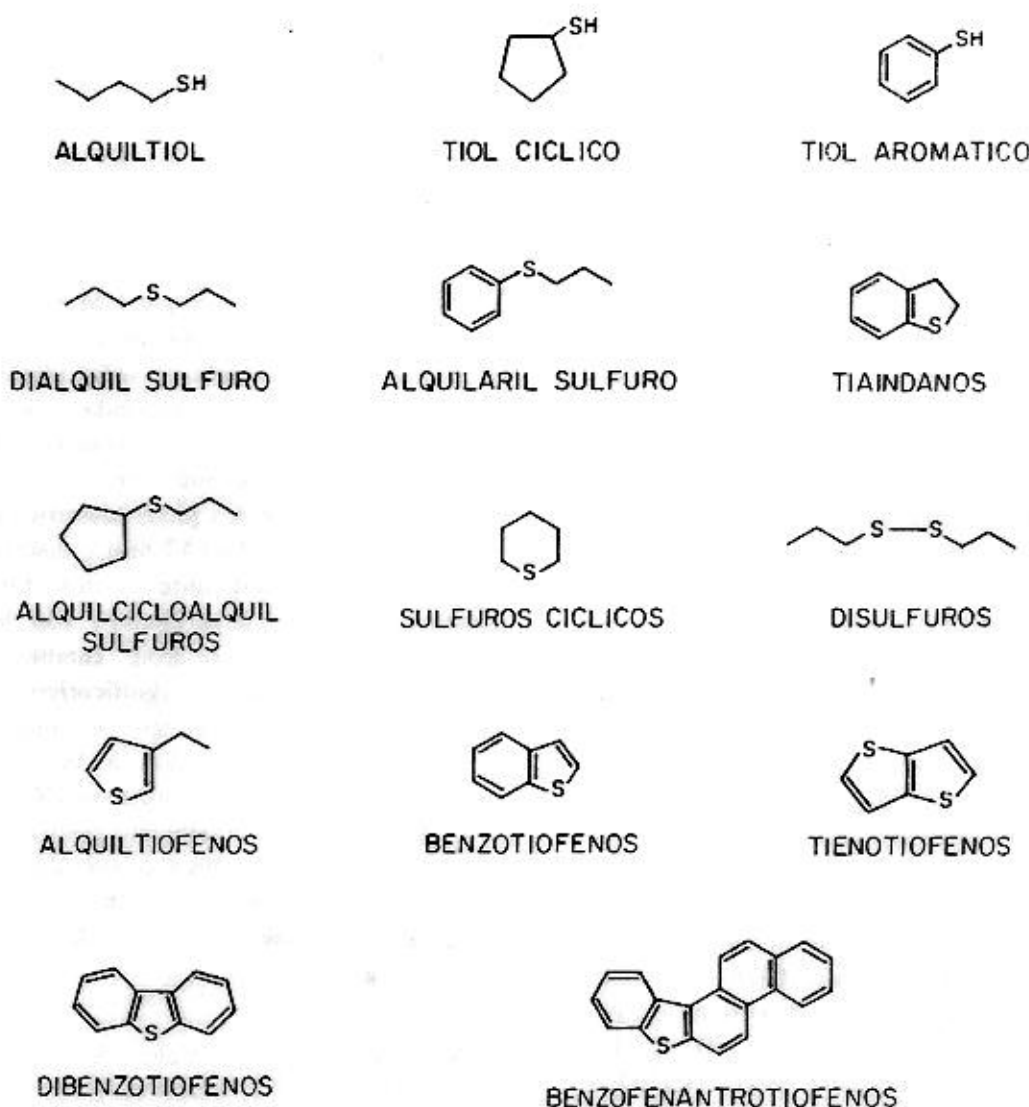


Figura 1. Estructuras representativas de las clases de compuestos azufrados presentes en el petróleo

0.25 micras de espesor de película. El equipo fue operado por método de barrido completo (*full scanning*) y luego por el modo de selección de iones, monitoreando los iones o fragmentos cuya relación m/z es: 184, 198, y 212 para los compuestos dibenzotiofeno (DBT), metildibenzotiofeno y dimetildibenzotiofeno respectivamente y los iones m/z 154 y m/z 170 para los compuestos bifenilo y el hidroxibifenilo.

La fase acuosa fue analizada mediante cromatografía iónica, utilizando un cromatógrafo iónico Water modelo ICL-1 equipado con una columna del tipo AS 11 y como fase móvil se empleó gluconato

de potasio bajo las siguientes condiciones: Velocidad de flujo de 1 a 2 ml/min., atenuación 32, carta 2 mm/seg. y tiempo final 12 min. (Ramos y Col., 1997).

RESULTADOS

Los experimentos de incubación se realizaron sobre la fracción aromática previamente extraída de un crudo semipesado (MFB-14) proveniente de la Faja Bituminosa del Orinoco (Márquez, 1992). Las cepas de hongos *Aspergillus* sp1 y *Penicillium* sp1 fueron aisladas e identificadas por Márquez

(1992), quien demostró la capacidad biodegradativa de los hongos anteriormente mencionados sobre los compuestos poliaromáticos con 1 a 4 anillos fusionados entre sí (PAH). Indicando además que *Penicillium* sp1 presenta un mayor ataque sobre los tri y poliaromáticos de esta fracción que *Aspergillus* sp1.

Debido a este hecho se continuó el estudio para medir el grado de biodegradación sobre las moléculas orgánicas con azufre; en estas muestras, especialmente benzotiofenos, dibenzotiofenos y sus derivados alquílicos con 1 y 2 sustituciones metílicas. Para medir el grado de biotransformación se procedió a un análisis detallado mediante la técnica de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, la cual permite la identificación precisa de la reducción de las señales en los diferentes compuestos organo-sulfurados y de los metabolitos resultantes de la biodesulfuración como el bifenilo m/z 154 y el hidroxibifenilo m/z 170. La Figura 2 muestra las señales obtenidas a través de la técnica de cromatografía de gases con detector de fotometría de la llama (FPD), específico para compuesto con azufre, estas señales son las correspondientes a los compuestos heterocíclicos con azufre presente en la fracción aromática del crudo, antes de ser sometidos al proceso de biodegradación (control). En esta figura se puede identificar a la familia de los benzotiofenos, DBT y sus derivados alquílicos. En la Figura 3 se presenta el análisis de cada fragmento (M/z 184, 198 y 212) correspondiente a los compuestos DBT, MeDBT y (Me)2DBT, antes de ser sometidos al proceso de biodegradación. La Tabla 1 resume la identificación de cada pico o señal determinado por cromatografía de gases con detector FPD y por espectrometría de masa. La identificación de cada pico se llevó a cabo por comparación de los datos espectrales obtenidos según los reportados por Stephanie y Col., (1998).

Una vez sometidas las fracciones aromáticas a incubación con las cepas individuales de hongos, *Aspergillus* sp1, *Penicillium* sp1 y por un pool de hongos constituido por ambas cepas, junto a otras cinco, se procedió al análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas de manera de medir y verificar los cambios correspondientes mediante la pérdida o remoción de las señales de los com-

puestos azufrados. La Figura 4 corresponde al experimento con *Aspergillus* sp1 a los 5, 15, y 60 días de incubación. En ella se aprecia en relación a la muestra control una degradación secuencial, en donde el compuesto DBT (m/z 184), a un tiempo de retención de 28,80 min., va desapareciendo hasta una total remoción a los 60 días. De manera análoga se observó para los compuestos MeDBT (m/z 198) una alteración drástica a los 15 días de incubación, en donde los picos identificados como 3,2 MeDBT (tr=32.10 min.) y 1 MeDBT (tr= 32.48 min.) respectivamente desaparecen. A los 60 días de incubación no se observa señal alguna de estos compuestos. Las señales asociadas a los compuestos (Me)2DBT (m/z 212) no presentan alteraciones importantes sino después de los 15 días de incubación en donde los picos identificados con las letras (a-g, tr entre 39-43.12 min.), disminuyen hasta desaparecer totalmente a los 60 días de incubación. En los experimentos con la cepa de *Penicillium* sp1 se observaron cambios importantes pero menos intensos y significativos en relación a la cepa de *Aspergillus* sp1, en este caso sólo se muestran los resultados a los 60 días de incubación (Fig. 5), el compuesto DBT (m/z 184, tr = 28,80 min.) fue totalmente removido, sin embargo solamente se observó remoción total del compuesto 1 MeDBT (tr = 32.48 min.) y oxidación parcial de los isómeros 3,2 y 4 MeDBT (m/z 198, tr = 31-32 min.).

Por otro lado, las señales de los compuestos (Me)2DBT (m/z 212) muestran remoción total del pico "a" y parcial de los picos "c" y "g" al compararlos con la muestra control (Fig. 3), lo cual indica un proceso menos severo por parte de la cepa de *Penicillium*. Los cambios composicionales por proceso de oxidación microbiana en los experimentos realizados con el pool de hongos se ilustran en la Figura 6, en esta se puede notar claramente la remoción total del compuesto DBT (m/z 184) pero, poca alteración de los compuestos MeDBT (m/z 198), se nota una ligera alteración del 1MeDBT. Cabe destacar que la remoción de los compuestos (Me)2DBT(m/z 212), sufren reducciones mas intensas en sus diferentes isómeros (a - g). Los picos o señales en cada experimento presentan patrones diferentes al comparado con los obtenidos en la muestra control (Fig. 3). No obstante para el caso de los experimentos constituidos

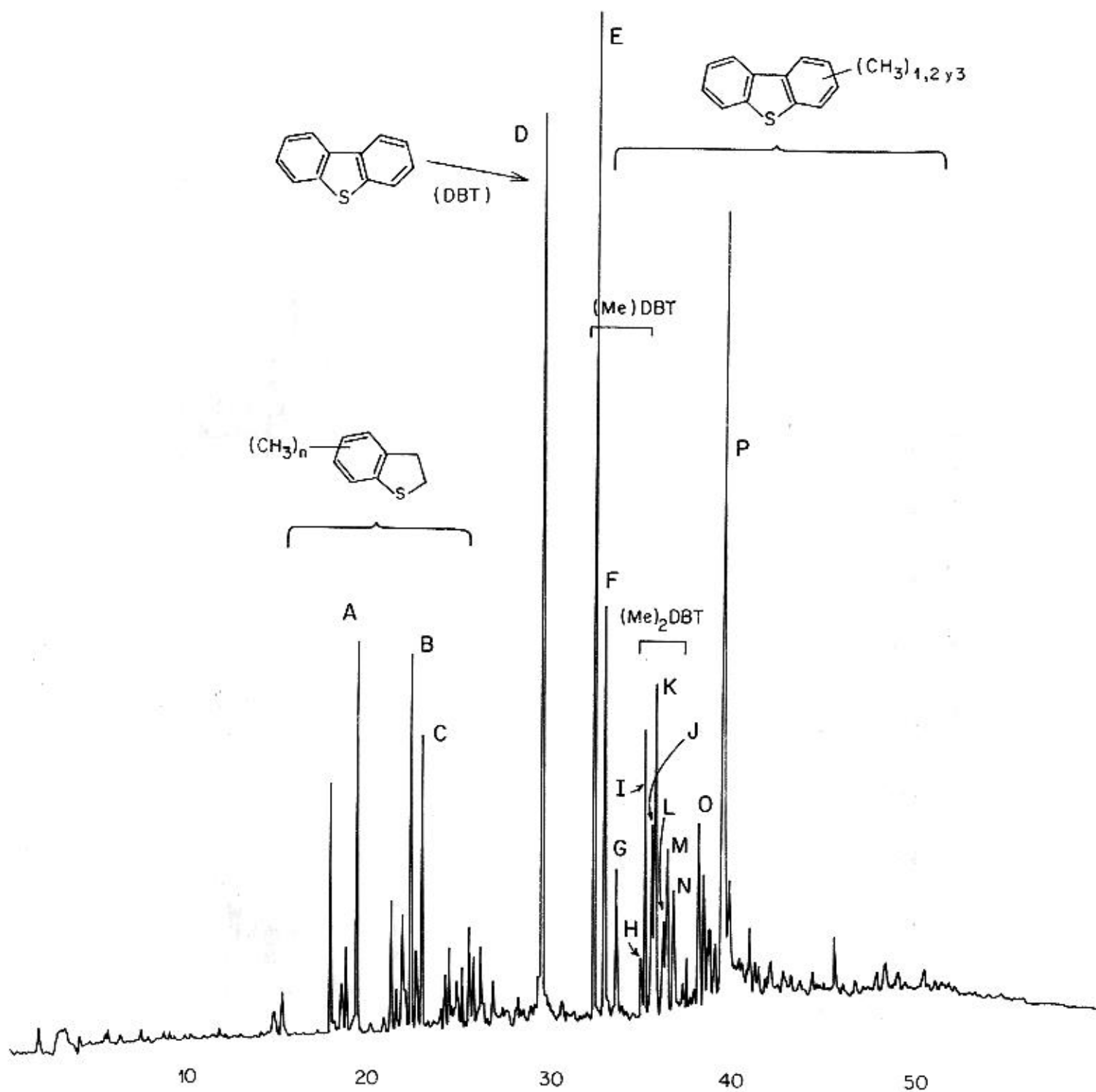


Figura 2. Familia de compuestos heterocíclicos con Azufre en la fracción aromática antes de incubación

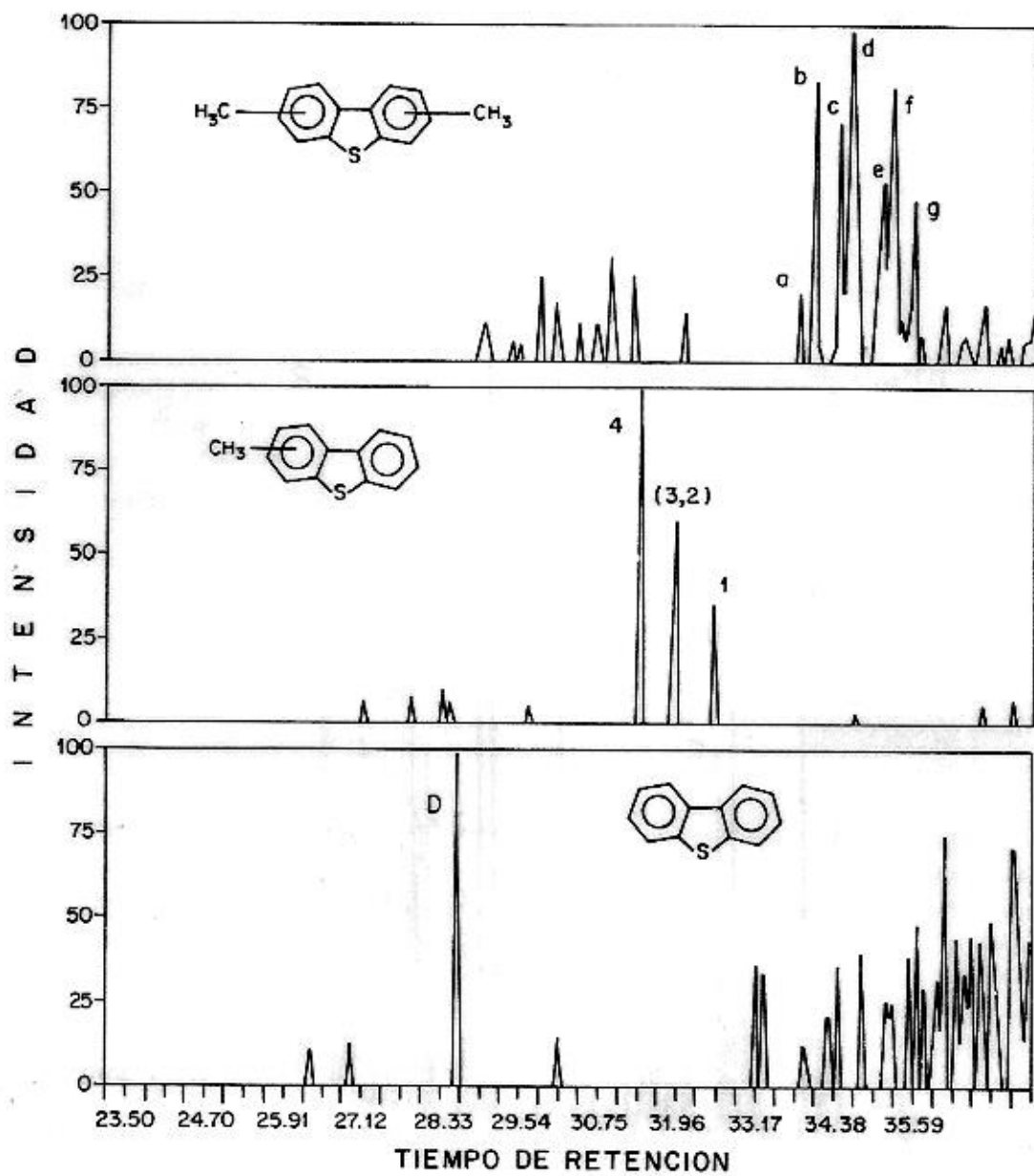


Figura 3. Fragmentogramas $m/z = 184, 198$ y 212 de la fracción aromática control

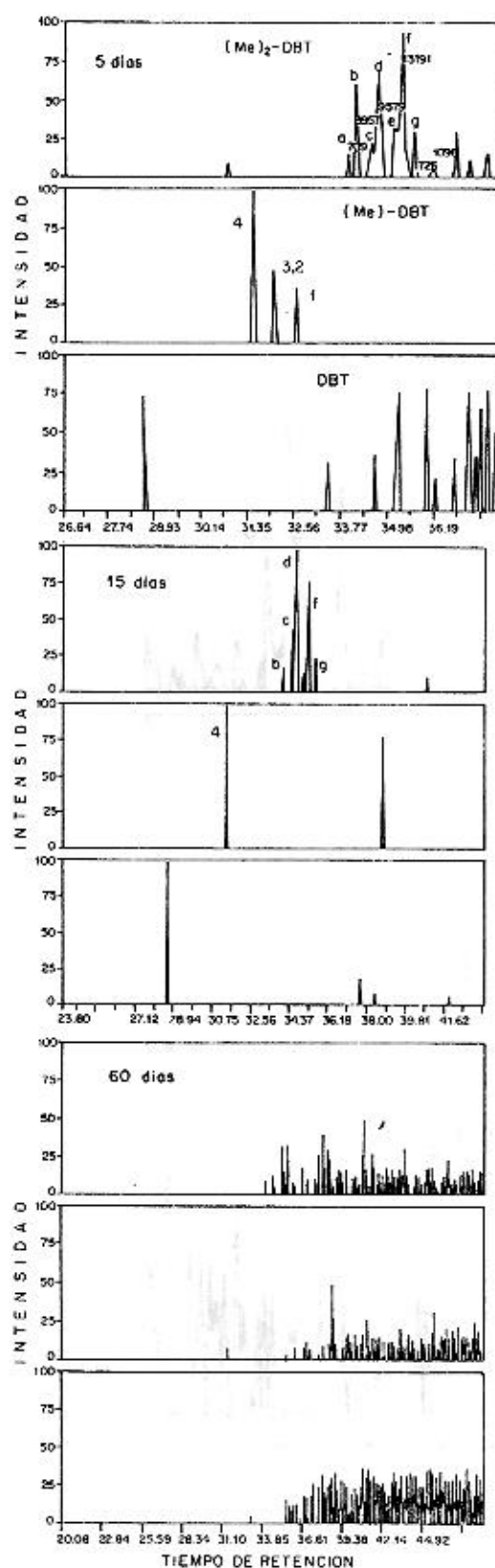


Figura 4. Fragmentogramas de los compuestos organosulfurados, inoculados con *Aspergillus* (5, 15 y 60 días).

por el pool de cepas, se nota un grado de alteración mayor específicamente en los isómeros denotados con las letras a, c, d, f y g (Tabla 1).

DISCUSION

El patrón de reducción de señales en los distintos experimentos (Figs. 4, 5 y 6) en comparación con las del control (Fig. 3) revelan en principio dos hechos interesantes. El primero es que cada una de las cepas tiene un modo de acción diferente frente a los compuestos azufrados de la fracción aromática. El segundo es que la interacción de estas cepas en el pool da como resultado un patrón diferente a la suma de sus patrones individuales.

Considerando la reducción o desaparición de señales como una medida del grado de ataque a los diferentes compuestos, encontramos que *Penicillium* sp1 tiene un patrón con el siguiente orden: DBT > MeDBT > (Me)2DBT, patrón muy similar al reportado por Fedorak y Westlake (1984), para un cultivo mixto de bacterias, pudiéndose inferir mecanismos similares, con la diferencia que en este caso se trata de un solo organismo y en el otro es un conjunto de ellos. Esto implica una mayor eficacia de *Penicillium* sp1 en la biodegradación de estos compuestos.

Por su parte *Aspergillus* sp1 muestra una degradación secuencial y total de todos los compuestos examinados, esto lo hace mucho más eficaz individualmente comparado con *Penicillium* sp1 en relación a la degradación de compuestos sulfurados. Es interesante analizar el comportamiento de estas dos cepas frente a la fracción aromática, tal como lo reporta Márquez (1992), *Penicillium* sp1 es la cepa más eficiente en degradar los compuestos de la fracción, en especial los poliaromáticos lo cual le confiere una ventaja competitiva, sin embargo la dominancia de *Aspergillus* sp1 en el caso concreto de los compuestos azufrados le permitiría en algún grado asegurar su subsistencia en presencia de *Penicillium* sp1.

Las consideraciones anteriores respecto a *Penicillium* sp1 y *Aspergillus* sp1 parecen corroborarse cuando analizamos lo ocurrido en el pool. En este caso de siete cepas que conformaron el

Tabla 1. a) Identificación de Compuestos Heterocíclicos de Azufre en la Fracción aromática del Crudo MFB-14 por Cromatografía de Gases con Detector tipo FPD (CG-FPD), b) Identificación de cada Familia de Compuestos Presentes en la Fracción Aromática del Crudo MFB-14, por sus Iones o Fragmentos Principales.

a)

Picos (Señales)	Identificación
A	C ₂ - Benzotiofenos
B, C	C ₃ - Benzotiofenos
D	Dibenzotiofeno (DBT)
E, F, G	C ₁ - Dibenzotiofenos (Me)DBT
H, I, J, K, L, M, N, O	C ₂ - Dibenzotiofenos (Me) ₂ DBT
P	C ₃ - Dibenzotiofenos (Me) ₃ DBT

b)

Picos	Fragmentos	Identificación
D	m/z 184	DBT
4; (3,2); 1	m/z 198	C ₁ -DBT, C ₁ = CH ₃
a, b, c, d, e, f, g	m/z 212	C ₂ - DBT, C ₁ y C ₂ = CH ₃
		a = (4,6) y (2,4) (Me) ₂ DBT
		b = (2,6) y (3,6) (Me) ₂ DBT
		c = (2,8), (2,7) y (3,7) (Me) ₂ DBT
		d = (1,4), (1,6) y (1,8) (Me) ₂ DBT
		e = (1,3) y (3,4) (Me) ₂ DBT
		f = (1,7) (Me) ₂ DBT
		g = (2,3) (Me) ₂ DBT

pool, solo estas dos se expresaron, notándose un crecimiento sostenido de *Penicillium* sp1 hasta 15×10^5 (UFC/ml) a los sesenta días, mientras que *Aspergillus* sp1 se estabilizó en 3×10^3 (UFC/ml) a los 20 días (Ramos y Col., 1997). Así ambas cepas tienen ventajas competitivas sobre las otras cinco que no se expresaron, aunque en experimentos individuales habían demostrado su capacidad de crecer en esta fracción aromática (Márquez, 1992). Como resultado de la interacción de los dos organismos el patrón de degradación en el caso del *pool*, si bien es removido el DBT, las reducciones de los MeDBT y (Me)₂DBT fueron menores que en el caso del experimento individual de *Aspergillus* sp1, quizás debido a la predominancia de *Penicillium* sp1 en el *pool*.

Para investigar el grado de biodesulfuración de los compuestos organo sulfurados se determinó la generación de los productos metabólicos bifenilos

(M/z 150) e hidroxibifenilos (M/z 174) y además se determinó el nivel de producción de sulfato en solución acuosa mediante la técnica de cromatografía iónica como resultado de la ruptura del elemento azufre en los compuestos de interés. Los análisis realizados en cada experimento no mostraron concentraciones apreciables de los compuestos bifenilos ni tampoco del ion sulfato, lo cual hace poco probable que la biodesulfuración de los compuestos hubiese ocurrido por la vía propuesta por Gallager y Col. (1994), (figs. 7-b).

Por lo contrario los resultados obtenidos apoyan que la ruta metabólica más probable se lleva a cabo a través de oxidaciones parciales, originando así una serie de metabolitos secundarios con alto contenido de oxígeno (Fig. 7-a), tal como es propuesto por Kodama y Col. (1973).

Dado que la única fuente de azufre disponible residía en los compuestos azufrados de la fracción

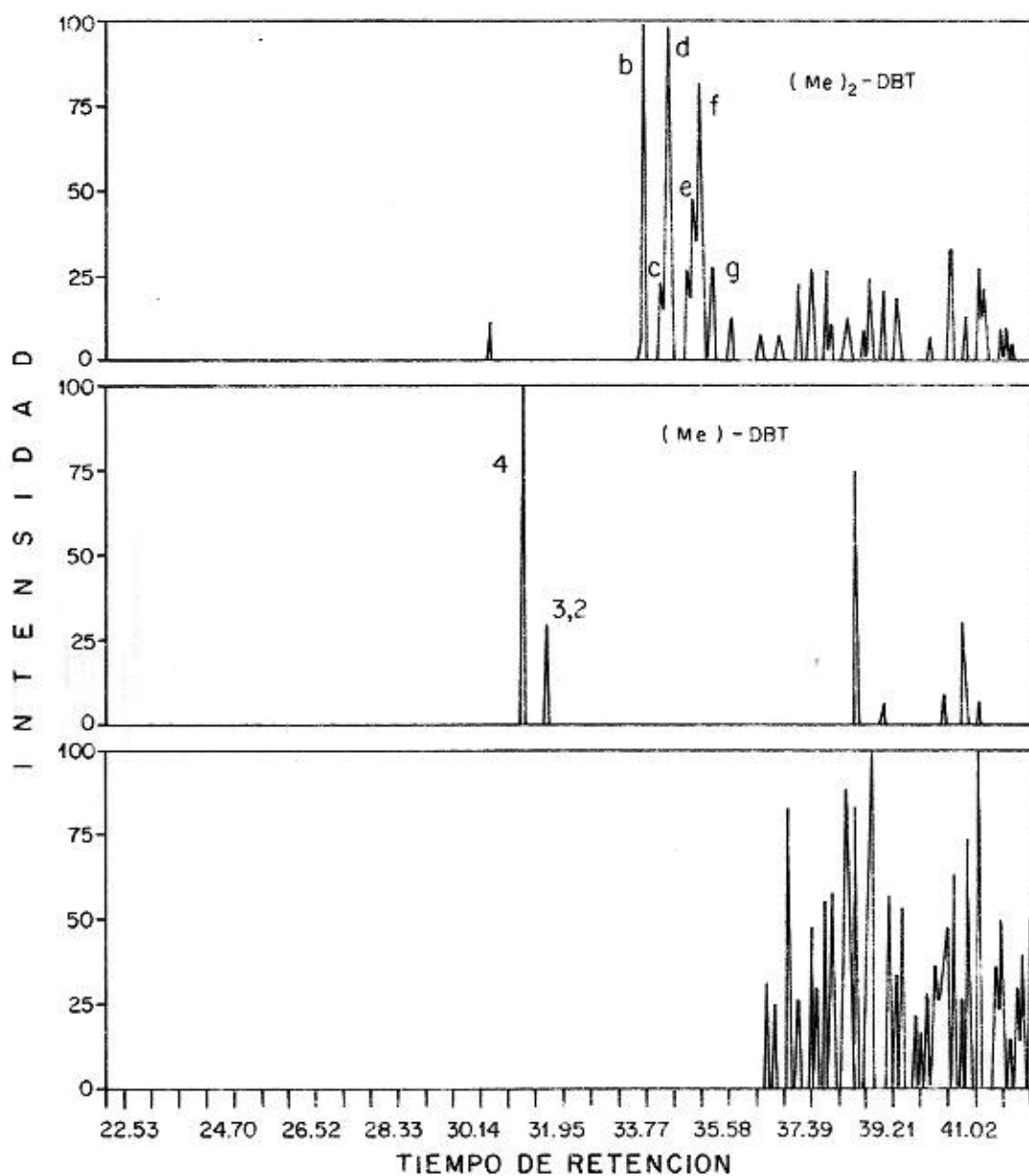


Figura 5. Fragmentograma del experimento con Cepa de *Penicillium* (60 días).

aromática, aunado al hecho de no haberse encontrado la producción de bifenilos, hacen que esta sea la explicación más viable, pudiendo haber pasado estos compuestos altamente polares a la fase acuosa donde necesariamente deben haber sido los teóricamente degradados por los hongos para la obtención del azufre necesario. Esto podría explicar porque no se detectó la presencia de sulfato en la fase acuosa, puesto que el obtenido por la biodegradación de estos metabolitos secundarios (Fig. 7a) fue utilizado por los hongos totalmente y el resto permaneció bajo la forma de compuestos

altamente polares solubles un agua, que no fueron motivo de estudio en el presente trabajo.

CONCLUSIONES

* Las cepas de hongos *Aspergillus* sp1 y *Penicillium* sp1 presentan individualmente una acción diferencial sobre los compuestos organo sulfurados de la fracción aromática, siendo el primero de ellos el más eficaz en la biodegradación de estos compuestos.

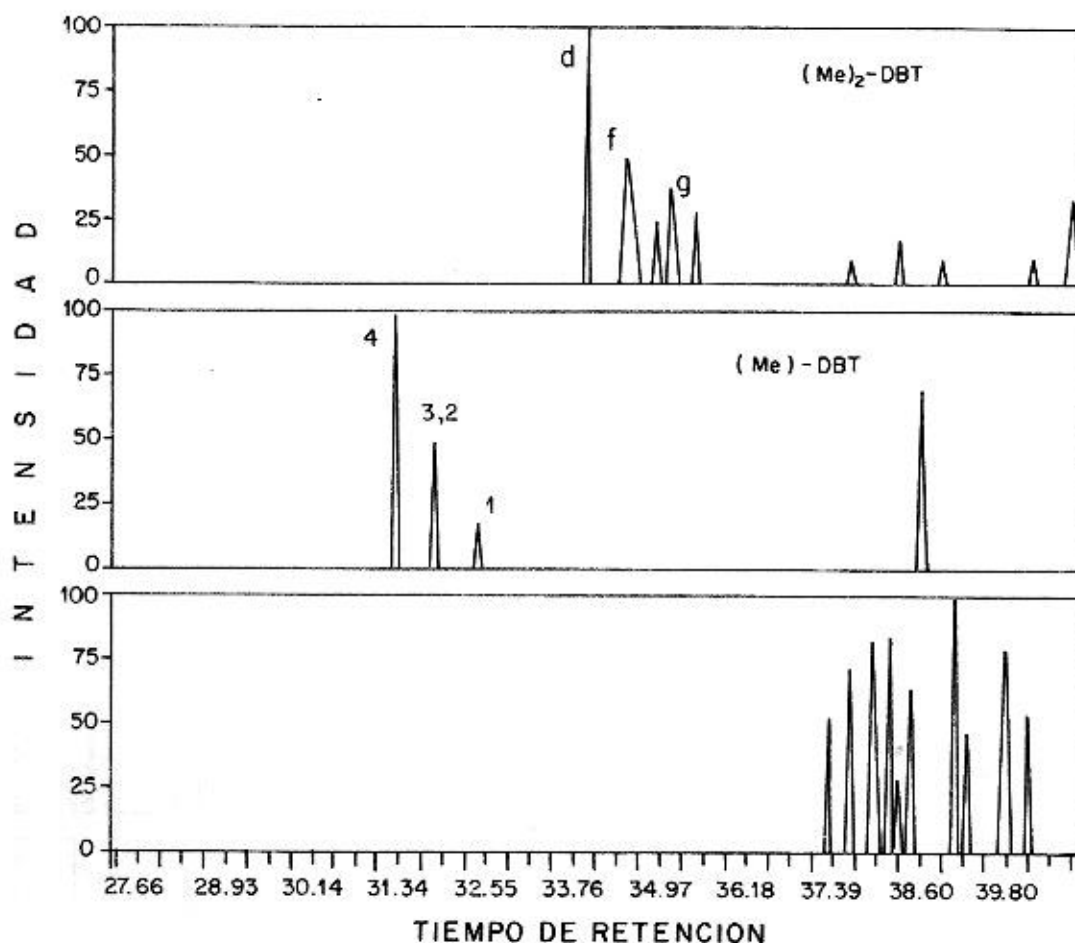


Figura 6. Fragmentograma $m/z=184, 198$ y 212 del experimento con *pool* de cepas (60 días)

* *Aspergillus* sp1 y *Penicillium* sp1 tienen ventajas competitivas que hacen que sean los únicos organismos que se expresan en el *pool* de cepas. Su coexistencia puede estar relacionada a la mayor habilidad de *Penicillium* sp1 de degradar otros compuestos aromáticos en especial los poliaromáticos, y la mayor eficiencia de *Aspergillus* sp1 para degradar algunos compuestos organo sulfurados.

* Como producto de las interacciones biológicas el patrón de degradación en el *pool* es diferente a cualquiera de los patrones observados para las cepas en su acción individual.

* La complejidad química de los organo sulfurados influye sobre su biodegradación por parte de los hongos, estableciéndose el orden de degradación DBT > MeDBT > (Me)2DBT.

* El no haber detectado la producción de sulfato y la de compuestos bifenilos hacen suponer que la biodesulfuración ocurrió mediante la producción de compuestos polares que deben haber pasado a la fase acuosa para su posterior degradación.

* La cepa de *Aspergillus* sp1 pudiese tener un valor potencial de uso biotecnológico por su acción sobre compuestos organo sulfurados y por su acción menor sobre compuestos aromáticos. Sin embargo son necesarios otros experimentos para investigar si su capacidad biodegradativa no desmejoraría la calidad del crudo como combustible.

AGRADECIMIENTOS

Al CONICIT, Proyecto N° S1-2245 por su aporte financiero.

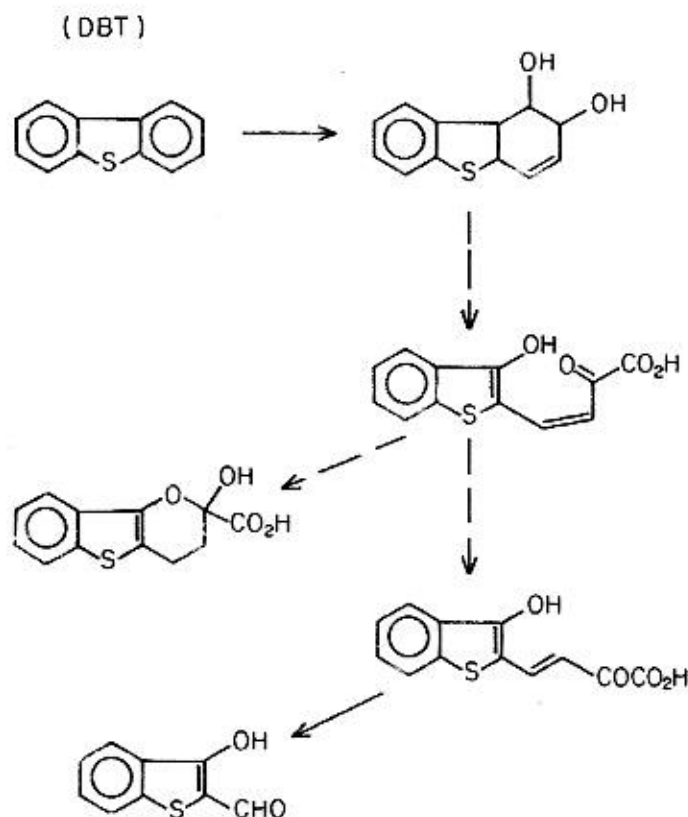


Figura 7a. Ruta metabólica con formación de metabolitos altamente oxidados. (Kodama y Col. 1973).

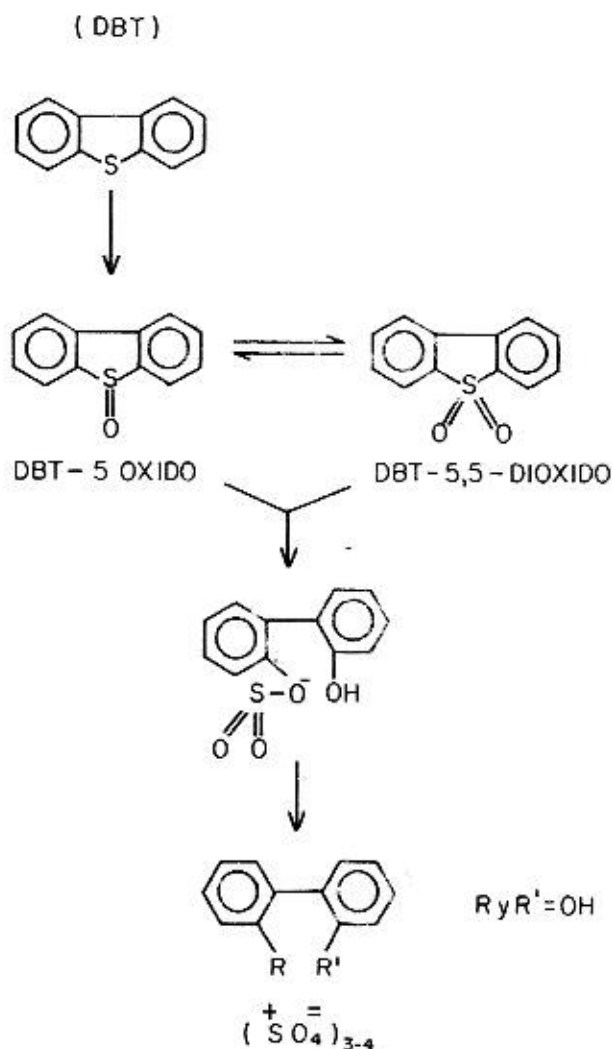


Figura 7b. Ruta metabólica propuesta por Gallager y Col. 1994, con formación de bifenilos y del ión sulfato (SO₄)₃₋₄

LITERATURA CITADA

- CONSTANTI, M., J. GIRALT Y A. BORDONS
1996. Degradation and Desulfuration of Dibenzothiophene Sulphone and Other Sulfur Compounds by *Agrobacterium* MC501 and Mixed Culture. *Enzyme and Microbial Technology*, 19: 214-219.
- FEDORAK, P. Y D.- WESTLAKE
1984. Degradation of Sulfur Hetrocycles in Prudhoe Bay Crude Oil by Soil Enrichments. *Water, Air and Soil Pollution*, 21. 225-230.
- FOGHT, J., P. FEDORAK, M. GRAY Y D. WESTLAKE
1988. *Microbial Desulfuration of Petroleum*, En *Microbial Mineral Recovery*. Briety, K.; Briety, J.; Ehlich, M. Eds, Mac Graw - Hill. New York 1988, 379 pp.
- GALLAGER, J.R., E.S. OLSON, R.K. SHARMA Y D. STANLEY
1994. I.G.T., 7th. International Symposium on gas, oil and Enviromental Technology, USA.
- HO, T., M. ROGERS, H. DRUSHEL Y C. KOONS
1978. Evolution of Sulfur Compounds in Crude Oils. *Am. Assoc. Petrol. Geol. Bull.*, 58: 2338-2348.
- KODAMA, K., K. UMEHARA, K. SHIMIZU, S. NAKATANI Y K. YAMADA
1973. Identification of Microbial Products From Dibenzothiophene and its Proposed Oxidation Pathway. *Agric. Biol. Chem.*, 37 (1): 45-50.

KODAMA, K.

1977. Induction of Dibenzothiophene Oxidation by *Pseudomonas Jiani*. *Agric. Biol. Chem.*, 41 (7): 1193-1196.

KROPP, K., J. GONCALVES, J. ANDERSON Y P. FEDORAK

1994. Microbially Mediated Formation of Benzonaphthothiophenes from Benzo[β]thiophenes. *Appl. Environ. Microb.*, 60 (10):3624-3631.

MARQUEZ, O.

1992. Aislamiento y Utilización de Hongos en la Degradación de la Fracción Aromática de un Crudo Venezolano. Trabajo Especial de Grado. Fac. de Ciencias. UCV. Caracas.

OSHIRO, T., T. HIRATA Y Y. IZUMI

1995. Microbial Desulfuration of Dibenzothiophene in the Presence of Hydrocarbon. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 44: 249-252.

RAMOS, J., F. GALARRAGA, O. MARQUEZ, A. GIORDANO Y N. MALAVER,

1997. Biotransformación de una Fracción aromática mediante el uso de Pool de Cepas de Hongos. *Act. Biol. Venez.*, 17, (4): 47-57.

WANG, P. Y. C. KRAMIEC

1994. Desulfuration of Dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by Some Newly Isolated Bacterial Strains. *Arch. Microbiol.*, 61: 266-271.

STEPHANIE, M., M. LOPEZ, J. SANDER Y W. STEPHEN

1998. Gas Chromatographic Retention Behavior of Polycyclic Aromatic Sulfur Heterocyclic Compounds on Stationary Phases of Different Selectivity. *Journal of Chromatography A*, 841: 207-228.