

Exo-actividad sulfo-reductora liberada por termófilas degradadoras de dibenzotiofeno

Jeff Wilkesman^{1,*}, Angelina Hernández¹, Oscar Valbuena² y Liliana Kurz³

¹Departamento de Química; ²Departamento de Biología, Facultad de Ciencias y Tecnología,
³Escuela de Ingeniería Química, Facultad de Ingeniería
Universidad de Carabobo, Apartado Postal 3433, Trigal (2001), Valencia, Venezuela.

Recibido: 25-04-09 Aceptado: 15-02-11

Resumen

Los termófilos viven entre 40 y 70 °C y sus actividades enzimáticas son generalmente termorresistentes. Una cepa de termófilas degradadoras de dibenzotiofeno (DBT) como única fuente de C y S fue aislada y tras la obtención de biomasa en medio completo a 55°C, se cultivó en medio mineral suplementado con 0,36 o 10 µM de DBT. La sulfo-reducción se evidenció al adicionar 0,1 M FeSO₄ a muestras del cultivo, observándose un precipitado pardo de FeS. El DBT remanente de los cultivos fue extraído con tolueno y cuantificado por cromatografía de gas (GC). Para comprobar si las enzimas encargadas de la sulfo-reducción eran liberadas al medio, el contenido de DBT presente en filtrados libres de células (FLC), extraídos con tolueno a 0 y 72 h de incubación, fue cuantificado por GC. Los resultados indicaron una degradación total de DBT luego de 72 h de incubación, tanto en los extractos a 0, 24 y 72 h, como en los extractos de los FLC a 0 y 72 h de cultivo, evidenciándose que la actividad enzimática es extracelular. El estudio de esta actividad resulta de interés para la biorremediación de áreas contaminadas con DBT, por ser éste un componente presente en crudos de petróleo.

Palabras clave: biodegradación, termófilos, dibenzotiofeno.

Sulfur reduction exo-activity released by dibenzothiophene degrading thermophiles

Abstract

Thermophiles thrive at 40-70°C, and their enzymatic activities are generally thermostable. A bacterial strain able to degrade dibenzothiophene (DBT) as sole C and S source was isolated and after biomass production in complete medium at 55°C, aliquots were transferred to mineral medium supplemented with 0.36 or 10 µM DBT. Sulfur reduction was evidenced after addition of 0.1 M FeSO₄ to culture samples with the formation of a brownish FeS precipitate. The remaining DBT in supernatants was extracted with toluene and quantified by gas chromatography (GC). To prove if the enzymatic activity, responsible for sulfur reduction, was released to the medium, the DBT content present in cell-free supernatants was extracted with toluene at 0 and 72 h incubation, and quantified by GC. Results indicate that DBT was totally degraded after 72 h employing the 0, 24 and 72 h supernatants, as well as the cell-free supernatants at 0 and 72 h culture, demonstrating that sulfur-reducing activity is extra-cellular. This study is of in-

* Autor para la correspondencia: jwilkesm@uc.edu.ve

terest for applications concerning bioremediation of areas contaminated with DBT, a main component present in crude oil and petroleum.

Key words: biodegradation, thermophiles, dibenzothiophene.

Introducción

En la naturaleza, el azufre se encuentra como sulfato, y usualmente se puede encontrar unido a una serie de hidrocarburos, muchos de ellos heterocíclicos, que forman parte de lo que constituye la fracción pesada del petróleo, compuesta principalmente por asfaltenos (1). Los tiofenos, benzotiofenos y dibenzotiofenos representan la forma molecular predominante en las fracciones pesadas de los crudos, y son de particular relevancia en los crudos pesados, en especial el dibenzotiofeno (DBT). El DBT ha sido ampliamente estudiado, disponiéndose de una base referencial importante para establecer la eficiencia de nuevos sistemas biocatalíticos (2). Las vías metabólicas involucradas en el proceso de degradación del DBT, así como los genes implicados en la expresión de enzimas ya han sido reportados (3, 4).

La remoción de azufre de los hidrocarburos representa un reto de impacto ambiental, que posiciona a los combustibles fósiles como una opción energética con emisiones limpias. El uso de bacterias termófilas ha surgido como una opción para la utilización de azufre. Se ha demostrado que las bacterias termófilas tienen la capacidad de utilizar DBT como fuente única de carbono y azufre (5). Esta capacidad pudiera extrapolarse para eliminar el azufre que se encuentra, en diversas combinaciones químicas, en los crudos de la fracción pesada del petróleo.

Onodera-Yamada y col. (6) aislaron bacterias reductoras de sulfato, degradadoras de DBT para remover componentes de azufre en petróleo. Entre las 19 cepas aisladas, algunas crecieron en presencia de 10% (v/v) de queroseno, de las cuales dos cepas fueron identificadas como *Desulfomicrobium escambium* y *Desulfovibrio logreachii*. Por cromatografía de gas (GC) se obtuvieron

máximos desconocidos, productos de degradación de DBT, por lo que propusieron un camino de degradación, donde el bifenilo era el principal producto de degradación. Por otra parte, Oda y Ohta (7), estudiaron la biodesulfurización del DBT con bacterias del género *Rhodococcus erythropolis* ATCC53968 y su mutante, en un biorreactor de interfase, y concluyeron que estas bacterias degradan eficientemente el DBT.

Como objetivo principal de esta investigación se planteó fraccionar la actividad sulfo-reductora de bacterias termófilas degradadoras de DBT. Por tal motivo, se cultivaron cepas termófilas en presencia de DBT, se prepararon filtrados libres de células (FLC) con actividad sulfo-reductora, se fraccionaron los FLC por cromatografía de intercambio iónico, y posteriormente se detectó la actividad sulfo-reductora en las fracciones aisladas. Adicionalmente, se desarrollaron técnicas zimográficas para la detección de la actividad sulfo-reductora en las fracciones aisladas.

Materiales y métodos

Reactivos y equipos

Agar cuenta estándar (HiMedia M091), acrilamida (Alfa AESAR), $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, MgCl_2 (Golf Chemical Co.), caldo nutritivo (HiMedia M088), DEAE-celulosa (SIGMA), DBT (Aldrich), FeSO_4 (Chempure), tolueno, Tris-base, TEMED, ácido tricloroacético, HCl (Riedel-de-Haën), KH_2PO_4 (AnalR BDH Chemicals Ltd), NaCl (Merck), SDS, persulfato de amonio (Promega). Todos los demás reactivos usados fueron de alta pureza. La cámara de electroforesis era BIO-RAD, la centrifuga, SERVALL SUPERSPEED 8S-1, y el cromatógrafo VARIAN 3800 se acopló a un detector de azufre o a un detector de ionización a la llama (FID).

Material biológico

Se emplearon como material biológico las cepas bacterianas sulfo-reductoras provenientes del Centro Termal Las Trincheras, aisladas y cultivadas previamente por Daza (5). El proceso de identificación de la(s) colonia(s) se encuentra en ejecución. La proliferación bacteriana se realizó en dos medios distintos. La proliferación en caldo nutritivo (CN) se realizó a pH 6,8 con el fin de obtener suficiente biomasa. Inóculos de 1 mL de cepas previamente aisladas y crecidas en cuñas fueron transferidos a 100 mL de medio, sin agitación a 55°C por 72 h. La proliferación se siguió a 540 nm. Alícuotas de 1 mL fueron retiradas a intervalos de 24 h.

Para la preparación de medios DBT, se tomaron alícuotas provenientes de los cultivos en CN y se transfirieron a medio DBT [por cada 250 mL: 3,25 mg $MgCl_2$, 15 mg $CaCl_2 \cdot 2H_2O$, 125 mg KH_2PO_4 , 250 mg NaCl y 2 mg de DBT (concentración final 0,36 μM) o 55 mg (concentración final 10 μM)].

Proliferación en medio DBT

Para la preparación de cultivos destinados a obtener biomasa y determinar posibles cambios de pH, alícuotas de 2,5 mL de cultivos en CN se transfirieron a 250 mL de medio DBT 10 μM , a pH 7,8. El Erlenmeyer fue tapado con un tapón de gasa-algodón impregnado con pirogalol al 1%, para establecer condiciones de anaerobiosis; y se incubó sin agitación a 55°C por 240 h. Diariamente, se adicionó solución de pirogalol al tapón de gasa-algodón.

Para la determinación de la actividad sulfo-reductora, se tomaron alícuotas de 1 mL de cultivos en CN y se transfirieron a tubos que contenían 12 mL de medio DBT 0,36 μM , los cuales se taparon con algodón-gasa impregnados en 1% pirogalol y fueron cerrados herméticamente con tapa de rosca, estableciendo condiciones anaeróbicas. Los tubos se incubaron sin agitación a 55°C.

Determinación de la actividad sulfo-reductora

Para la determinación cualitativa de la sulfo-reducción, a la muestra problema se le adicionó 1 mL de $FeSO_4$ 0,1 M, se tapó y se incubó hasta la aparición de un precipitado oscuro, indicativo de la formación del FeS. Este ensayo comprobó la capacidad de las bacterias en reducir el azufre del medio.

Determinación de DBT remanente en los cultivos por GC acoplado al detector de azufre

Se retiraron alícuotas de 4 mL de los cultivos a evaluar a las 0, 24 y 72 h de incubación. Se filtraron al vacío utilizando una membrana microbiológica de 0,45 micras de diámetro de poro, y el FLC obtenido se procesó de acuerdo a los siguientes protocolos: a) alícuotas de 4 mL del filtrado fueron extraídas con 4 mL de tolueno; luego 0,5 μL de los extractos orgánicos fueron inyectados en el cromatógrafo de gas VARIAN 3800, empleando un detector de azufre a 150°C, con una presión de 7 psi/min durante 5 min de corrida; o b) para la comprobación del sistema enzimático en el FLC, alícuotas de 1 mL de FLC, provenientes de un cultivo de 72 h de incubación, fueron adicionados a 10 mL de medio DBT fresco. Se incubó por 72 h y se tomaron alícuotas a 0 y 72 h para luego ser tratadas como en la parte a) de esta sección.

Determinación de DBT remanente en los cultivos por GC acoplado a FID

Alícuotas de 4 mL provenientes de cultivos en medio DBT 10 μM fueron extraídas con tolueno y analizadas por GC empleando un equipo acoplado al FID, con una columna Capillary Chrompack CP-sil5CB, 25 m longitud, diámetro externo 0,25 mm y 0,25 μm de diámetro interno, con nitrógeno como gas de arrastre y con un tiempo de análisis de 15 min. Se realizó una curva de calibración preparando soluciones patrones de acetona-DBT, de 0 a 10 μM DBT.

Cromatografía de intercambio aniónico

Para el fraccionamiento de los FLC, se empleó una columna de intercambio aniónico, utilizando como resina DEAE-celulosa. A la columna empacada y lavada con solución tampón Tris-HCl 50 μM a pH 8, se le aplicaron 20 mL de FLC de medio DBT concentrado a 72 h de incubación, luego se adicionaron secuencialmente solución tampón con NaCl a 0; 0,25; 0,50; 0,75 y 1 M. Se recolectaron 35 fracciones de 2 mL, a un flujo constante de 0,25 mL*min⁻¹ y se midió la absorbancia a 280 nm. Para la detección de sulfuro en las fracciones colectadas, a alícuotas de 100 μL de cada fracción se adicionaron 100 μL de FeSO₄ 0,1 M.

Análisis de perfiles polipeptídicos de los FLC por SDS-PAGE y zimografía

A las fracciones provenientes de la columna de DEAE-celulosa, en las cuales se detectó sulfuros, se les determinó la cantidad de proteínas totales, según el método de Bradford (8). Luego, se realizó la electroforesis en geles de poliacrilamida (10%) con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE). La electroforesis se corrió por 1 h a 100 V. Se analizaron las muestras seleccionadas por carril y paralelamente se corrió una mezcla de marcadores de masas molares (SIGMA). Después de la corrida, el gel se reveló por el método de tinción con plata.

Para concentrar las proteínas se realizó una precipitación con TCA. Se adicionaron 250 μL de 20% TCA a las fracciones estudiadas, se agitaron y se incubaron a 0°C por 10 min. Luego se centrifugaron a 5000 \times g por 5 min. Se descartó el sobrenadante y el precipitado se disolvió en 20 μL de tampón muestra 4x.

Con la finalidad de obtener muestras sólidas y para tratar de minimizar la posible acción proteolítica, se procedió a concentrar los FLC por liofilización. Volúmenes de 20 mL, provenientes de FLC de 72 h de incubación se congelaron haciendo uso de una

mezcla refrigerante NaCl-hielo (2:1), luego fueron acopladas a un liofilizador marca Labconco, por 5 h, hasta obtener un residuo sólido. El material sólido proveniente de 40 mL de FLC se disolvió en 3 mL de agua desionizada, y alícuotas de 20 μL fueron analizadas por SDS-PAGE.

Para visualizar la actividad enzimática correspondiente al efecto sulfo-reductor se analizaron las muestras de FLC por zimografía. Se concentraron 200 mL de FLC hasta la mitad de su volumen inicial, para luego tomar 20 mL de la muestra concentrada y someterla a un protocolo semejante al descrito anteriormente.

De las fracciones que presentaron la mayor absorbancia y la presencia de sulfuros, se dividió su volumen, y una alícuota fue precipitada con 20% TCA. Las fracciones precipitadas con TCA y las originales, se corrieron en geles de poliacrilamida al 10%, en ausencia de β -mercaptoetanol y sin calentamiento previo. Finalmente, los geles se coloraron en 0,1 M de solución ferrosa mezclada con DBT 20 μM .

Resultados y discusión

Proliferación bacteriana

Se determinó una fase exponencial de la proliferación bacteriana en caldo nutritivo entre las 5 y 21 h. Alícuotas fueron tomadas y sembradas en medio DBT. La proliferación de las bacterias en medio DBT (0,36 o 10 μM), y la actividad sulfo-reductora se evidenciaron en cultivos en medio líquido y en medio sólido. La aparición en los cultivos de una coloración oscura, debida a la formación de FeS, evidenció la actividad sulfo-reductora. La proliferación de bacterias, previamente cultivadas en medio DBT, también se pudo evidenciar en placas de agar cuenta estándar. Las colonias aisladas eran amarillentas, redondas, con borde difuso, de tamaño variable, y tras observación microscópica mostraron ser bacilos Gram positivos.

A las 24 h se estimó una población de 288×10^4 unidades formadoras de colonias por mL (UFC*mL⁻¹).

La baja solubilidad del DBT en agua ($\sim 2 \times 10^{-3}$ g*L⁻¹) proporcionó una concentración factible de 0,36 µM en solución, pero limitaba la proliferación microbiana, evidenciado esto por la baja tasa de proliferación y la disminución de DBT en los medios de cultivo después de 72 h de incubación. Por ello, se incorporó DBT adicional al cultivo bacteriano a las 72 y 168 h (figura 1). Se observó que tras 72 h de incubación, la proliferación bacteriana disminuía, pero se obtenía nuevamente proliferación después de la adición de DBT. Este mismo comportamiento se observó a las 168 h de cultivo.

Mediciones de pH fueron efectuadas paralelamente. Se comprobó un valor de pH 8 constante durante las 240 h de cultivo. La presencia de KH₂PO₄ en el medio de cultivo ejerce un efecto tampón, impidiendo observar cualquier cambio del pH causado por la proliferación bacteriana.

Determinación de DBT remanente en cultivos bacterianos por GC

Los extractos orgánicos tratados fueron analizados por GC utilizando un detector de azufre acoplado al equipo. El tolueno empleado en el proceso de extracción de las muestras fue analizado, mostrando muchas irregularidades en la línea base. A pesar del empleo del detector de azufre acoplado al equipo, no se obtuvo una línea base limpia. Problemas de impurezas contenidas en la columna o en el solvente pudieran explicar este hecho, aun cuando la columna fue exhaustivamente limpiada y el tolueno era de pureza 99,5%, libre de compuestos azufrados. La figura 2a representa el análisis de una muestra control que contenía tolueno y DBT. La señal correspondiente a DBT aparece a un tiempo de retención de 2,990 min.

La figura 2b corresponde al análisis de los extractos orgánicos a 0 h de incubación, en la cual se puede observar una señal de

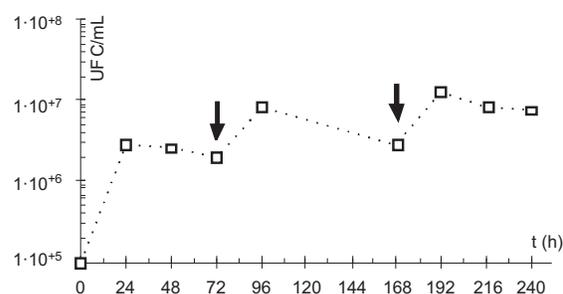


Figura 1. Proliferación bacteriana en medio mineral suplementado con 10 µM DBT. Las flechas indican los momentos de adición de 10 µM DBT al medio de cultivo.

DBT con un tiempo de retención de 2,990 min y con un área de 276.855 unidades. La figura 2c muestra el análisis del extracto a las 24 h de incubación, observándose una señal a los 3,070 min y con un área de 21.885 unidades. Es evidente la constancia en el tiempo de retención y la disminución del área de la señal desde un valor inicial de 276.855 hasta 21.885 unidades, lo que representa una disminución aproximada del 92% de la cantidad inicial de DBT. A 72 h de incubación, se observó la ausencia de la señal correspondiente al DBT en el cromatograma, indicando la degradación total del sustrato por parte de la población bacteriana. Se determinó que entre 3,5 y 4 min de elución, no existe cuantitativamente ningún tipo de señal relevante originada por el solvente que pueda interferir con el analito. Sin embargo, en los cromatogramas de la figura 2b y 2c, se detectaron una serie de señales con intensidades equivalentes al DBT a tiempos de retención mayores, las cuales pudieran corresponder a compuestos no identificados co-extraídos de los cultivos.

Los resultados obtenidos muestran la degradación del DBT por los termófilos. No obstante, estos experimentos no demuestran que el DBT sea degradado de manera intra- o extracelular. Por ello, se planteó incorporar FLC de 72 h de incubación a me-

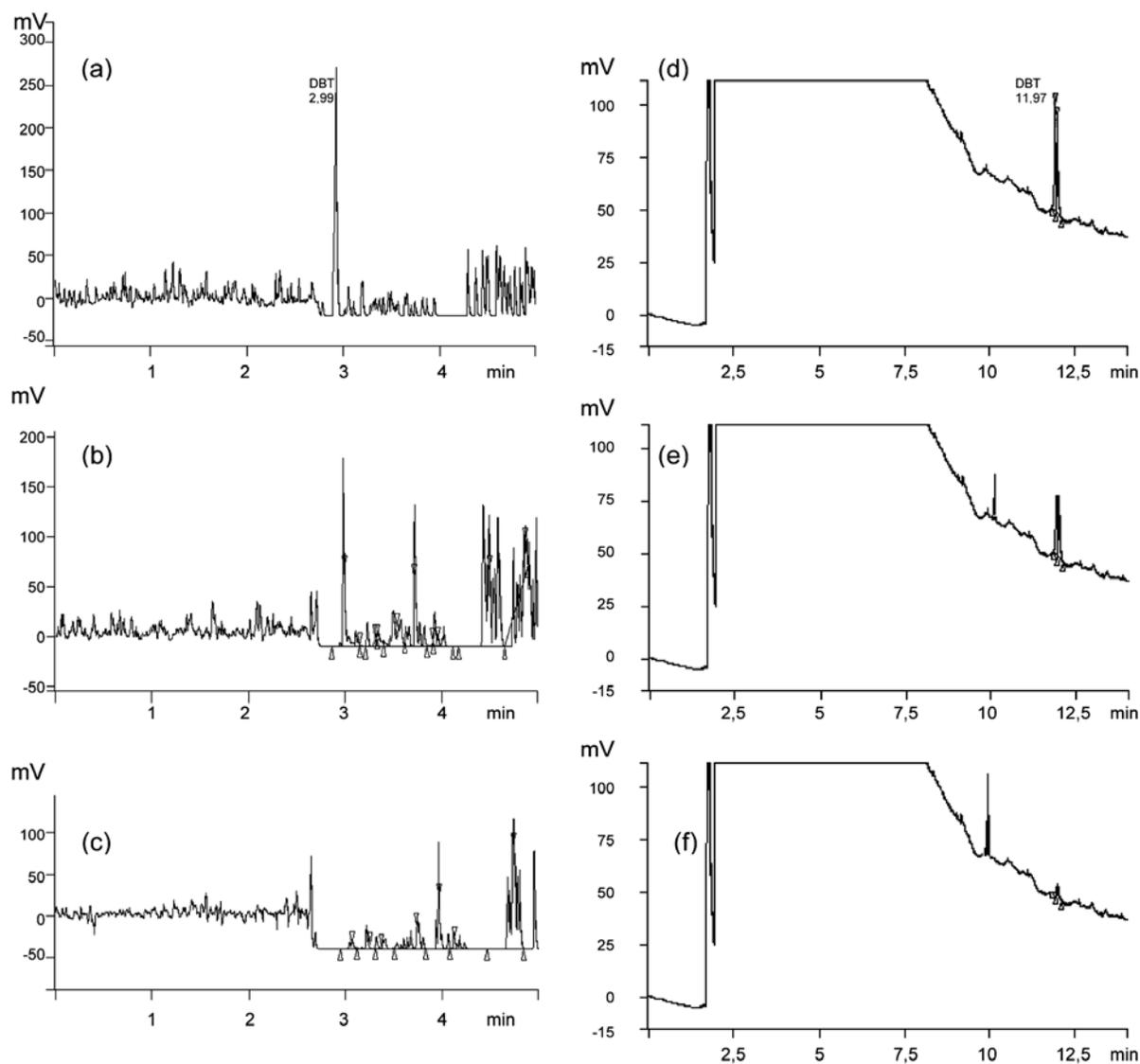


Figura 2. Perfil cromatográfico de muestras extraídas con tolueno en cromatógrafo de gas (a-c) con detector de azufre. (a) DBT control; (b) extracto de cultivo con DBT a 0 h; (c) extracto de cultivo con DBT a 24 h; (d-f) Cromatogramas de cultivos con DBT extraídas con tolueno analizadas con cromatógrafo de gas con detector FID, (d) muestra extraída a 0 h, (e) muestra extraída a 24 h y (f) muestra extraída a 72 h de cultivo.

dios de cultivo conteniendo DBT, y así observar su efecto sobre el sustrato, en ausencia de células. Una muestra del FLC de un cultivo de 0 h originó una señal correspondiente al DBT con tiempo de retención de 2,999 min y un área de 380.350, mientras

que el análisis de una muestra de FLC de un cultivo de 72 h no originó señal correspondiente al sustrato (resultados no mostrados), implicando que la degradación del DBT involucra un sistema enzimático liberado al medio. Dada la complejidad de la molécula

de DBT (heterociclo que comprende dos anillos bencénicos fusionados a un anillo de tiofeno), su masa molar relativa, y su baja solubilidad en agua, disminuye la posibilidad de ser transportada a través de la membrana celular. En consecuencia, disminuye la posibilidad de ser degradada dentro de la célula y se acumula en el exterior (9, 10). Para aumentar la solubilidad del sustrato, se ha recomendado la adición de un solvente (etanol) y un surfactante al medio de cultivo, para que el sustrato esté más disponible ante la maquinaria enzimática (9), esta variante debe ser estudiada con cuidado para analizar los efectos de estos aditivos sobre la proliferación bacteriana.

Mediante este análisis, no se puede descartar que el sistema enzimático detectado en los FLC pueda provenir de una lisis de bacterias durante el período de incubación. Adicionalmente, se conoce la existencia de enzimas ancladas a la membrana celular con su centro activo ubicado en la región extracelular (11), así como también existe la posibilidad de que las bacterias exporten la batería enzimática al medio de cultivo y degraden así el sustrato (4, 12). Un mecanismo detallado de todo el proceso metabólico aún no ha sido reportado completamente.

Debido a las señales de ruido detectadas en los cromatogramas, se procedió a realizar un estudio cromatográfico empleando un equipo acoplado a un FID. Para la cuantificación de DBT, inicialmente se realizó una curva de calibración a diferentes concentraciones del sustrato, obteniéndose un tiempo de retención constante de 11,968 min para todas las muestras (figura 2d-f). Luego, se procedió a inyectar los extractos orgánicos provenientes de cultivos bacterianos en presencia de DBT y correspondientes a diferentes tiempos de incubación. Se observó que las áreas de los máximos correspondientes a la señal del DBT disminuían a medida que el tiempo de incubación aumentaba. Se registró una degradación de 70 y 95% en las muestras de 24 y 72 h de cultivo, respectivamente.

Este análisis suministró mejores datos respecto a los obtenidos con el detector de azufre, debido a que los cromatogramas tienen menor cantidad de señales provenientes de sustancias desconocidas. Se puede observar (figura 2d-f) la disminución de la señal correspondiente a DBT, además de observarse el crecimiento de una señal desconocida -probablemente 2-hidroxibifenilo (3, 13), con un tiempo de retención de aprox. 10 min. Mediante la curva de calibración y los datos obtenidos en el ensayo cromatográfico, se determinó la variación de la concentración del sustrato en el transcurrir del tiempo de incubación. De una concentración inicial de 10 μM DBT, se determinó a las 24 h una concentración de 3 μM , a las 48 h de 1 μM y a las 96 h ya no se pudo determinar la concentración con el método empleado. Se comprobó así la actividad degradadora de las bacterias termófilas sulfo-reductoras sobre el sustrato.

Fraccionamiento y purificación de la actividad enzimática

Para proceder con la purificación enzimática, volúmenes de FLC de 96 h de incubación en presencia de DBT, se aplicaron a una columna de DEAE-celulosa. Las fracciones fueron eluidas a diferentes concentraciones de NaCl (figura 3). Se detectaron 6 máximos de absorción (figura 3, enumerados del 1 al 6); de los cuales sólo los máximos 5 y 6 presentaron reacción ante FeSO_4 , indicativo de presencia de actividad sulfo-reductora en las fracciones.

El contenido de proteínas totales de estas fracciones, determinado por el método de Bradford (8), indicó valores 15,2 y 8,8 μg para los máximos 5 y 6, respectivamente. Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE y los geles teñidos con plata para visualizar los perfiles polipeptídicos. El máximo 5 evidenció un polipéptido con una masa molar estimada en 55 kDa, las demás fracciones no presentaron señales correspondientes a polipéptidos. Para incrementar la cantidad de proteína a ser analizada en los

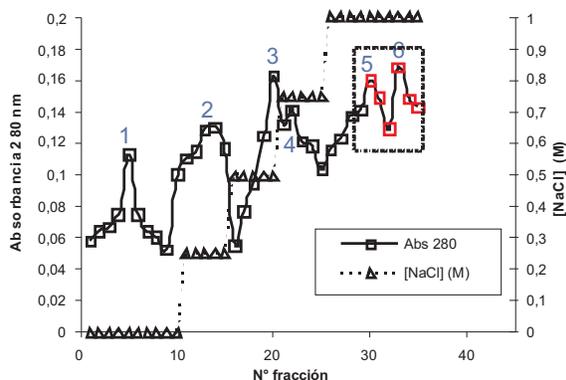


Figura 3. Perfil de elución de la columna de intercambio DEAE-celulosa. El FLC fue aplicado a la columna y eluido discontinuamente con NaCl 0-1 M. Los números indican los máximos de absorbancia. Las fracciones de los máximos 5 y 6 presentaron propiedades sulfo-reductoras, determinadas con FeSO_4 (se indica en el recuadro segmentado).

geles de poliacrilamida, se procedió a liofilizar el FLC. El residuo seco se disolvió en H_2O desmineralizada y se sometió a electroforesis en geles de poliacrilamida. Se detectaron polipéptidos con masas molares de 34,5; 47,8 y 200 kDa (resultados no mostrados). Estos polipéptidos podrían corresponder a las actividades enzimáticas involucradas en la degradación de DBT por la cepa bacteriana estudiada.

Los intentos efectuados para caracterizar la actividad enzimática por zimografía resultaron negativos. Igualmente, no se encontraron referencias bibliográficas en relación a la degradación de estas actividades en geles de poliacrilamida, zimografía, ni masas molares de enzimas implicadas en tal degradación.

Conclusiones

La degradación del DBT por cepas termófilas se evidenció por GC, obteniéndose un 100% de degradación a las 72 h de incu-

bación. Se demostró la presencia de una actividad sulfo-reductora liberada al medio capaz de degradar DBT. Tras la aplicación del FLC en la cromatografía de intercambio aniónico se eluyó una fracción con la presencia de un polipéptido con una M_r de 55 kDa. Por SDS-PAGE del FLC se mostró la presencia de 3 polipéptidos con M_r de 34,5; 47,8 y 200 kDa. La actividad sulfo-reductora no pudo ser evidenciada por zimografía, bajo las condiciones experimentales establecidas.

Abreviaturas

CN, caldo nutritivo; DBT, dibenzotiofeno; DEAE, dietil-amino-etil; FID, detector de ionización a la llama; FLC, filtrados libres de células; GC, cromatografía de gas; M_r , masa molar relativa; SDS, dodecil sulfato de sodio; PAGE, electroforesis en geles de poliacrilamida; TCA, ácido tricloroacético; UFC, unidades formadoras de colonias.

Agradecimientos

Este trabajo fue subvencionado parcialmente por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH-1014-04 y 2010-0885) y el Fondo Nacional de Ciencias y Tecnología (FONACIT-Pem2001002268). Agradecemos a la Facultad de Ciencias y Tecnología de la Universidad de Carabobo y al Prof. L. Medina (Unidad de Microbiología Ambiental, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Carabobo) por el uso de sus instalaciones y equipos.

Referencias bibliográficas

1. PINEDA-FLORES G., MESTA-HOWARD, A. *Rev Latinoam Microbiol*, 43(3): 143-150. 2001.
2. RANSON I., RIVAS C. *Visión Tecnológica* 7: 15-22. 1999.
3. LI F., XU P., FENG J., MENG L., ZHENG Y., LUO L., MA C. *Appl Envir Microbiol* 71(1): 276-281. 2005.

4. VAN HAMME J., SINGH A., WARD O. ***Microbiol Mol Biol Rev*** 67(4): 503-549. 2003.
5. DAZA R. Aislamiento y caracterización de bacterias termófilas sulforreductoras, capaces de utilizar DBT como fuente única de carbono y azufre. (Trabajo Especial de Grado para obtener el título de Lic. en Química). Facultad de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia (Venezuela), pp. 30-54. 2003.
6. ONODERA-YAMADA K., MORIMOTO M., TANI Y. ***J Biosci Bioeng*** 91(1): 91-93. 2001.
7. ODA S., OHTA, H. ***J Biosci Bioeng*** 94(5): 474-477. 2002.
8. BRADFORD M. ***Anal Biochem*** 72: 248-254. 1976.
9. ALONSO DEL AGUILA J., BOLTES K., LETON P., RODRÍGUEZ A., ROSAL R., PERDIGÓN J., GARCIA-CALVO, E. ***Proceedings of European Congress of Chemical Engineering (ECCE-6)***. 1-6. Copenhagen (Dinamarca). 2007. http://www.nt.ntnu.no/users/skoge/prost/proceedings/ecce6_sep07/upload/902.pdf. Fecha de consulta: 20/12/2010.
10. BEZALEL L., HADAR Y., FU P., FREEMAN J., CERNIGLIA C. ***Appl Environ Microbiol*** 62(7): 2554-2559. 1996.
11. KLETZIN A., URICH T., MÜLLER F., BANDEIRAS T., GOMES C. ***J Bioenerg Biomembr*** 36(1): 77-91. 2004.
12. MONTICELLO D. ***Curr Opin Biotechnol*** 11(6): 540-546. 2000.
13. BALDI F., PEPI M., FAVA F. ***Appl Environ Microbiol*** 69(8): 4689-4696. 2003.