

## AISLAMIENTO DE *Pseudomonas spp* DESULFURIZADORAS DE DIBENZOTIOFENO

Edelberto Silva\*, Julián Pino\*\*, Ana C. Acosta, Tilse Salazar, Martha I. Saboya

Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Farmacia, A.A. 14490, Bogotá D. C., Colombia.

\*Departamento de Farmacia. E-mail: esilva@ciencias.ciencias.unal.edu.co

\*\*Departamento de Química.

### RESUMEN

Se implementó una metodología para el aislamiento de *Pseudomonas spp.* de muestras contaminadas con petróleo y sus derivados, el enriquecimiento en caldo BHI -Tween 80 permitió obtener el 43, 15% de los aislados, el enriquecimiento en caldo BHI el 29.45% y la siembra directa el 27.40%. El 36.3% de los aislados degradan solamente DBT de los cuales el 27.4% proviene de aislamientos por enriquecimiento en BHI-Tween 80. Se seleccionaron ocho para evaluar el grado de desulfurización, encontrándose que se presentan mineralización a sulfatos del DBT entre el 0.5 y el 11%, pero al desarrollar el proceso mediante cometabolismo este porcentaje aumentó hasta el 25%.

**Palabras claves:** BIODESULFURIZACIÓN – *Pseudomonas* – AISLAMIENTO – DIBENZOTIOFENO – DBT

### SUMMARY

#### ISOLATION OF DESULFURIZATING *Pseudomonas spp* OF DIBENZOTHIOPHENE

An appropriate methodology was implemented to isolate *Pseudomonas spp.* Starting from polluted samples with petroleum and their derivatives. The enrichment method in broth BHI -Tween 80 allowed to obtain the 43, 15% of

the isolated, the enrichment in broth BHI 29.45% and the direct sows 27.40%. The 36.3% of the isolated ones degrade only DBT of which 27.4% comes from enrichment in BHI-Tween 80 isolations. Eight isolates were selected to evaluate the desulfurization degree, The DBT desulfurization to sulfates was ranged between the 0.5 and 11%, but when the process was developed by means of cometabolism this percentage was increased until 25%.

**Key words:** BIODESULFURIZATION – *Pseudomonas* – ISOLATION – DIBENZOTHIOPHENE - DBT.

### INTRODUCCIÓN

Actualmente, en el ámbito ambiental uno de los problemas es la llamada "lluvia ácida" producida principalmente por la emisión de azufre proveniente de la combustión del carbón, petróleo y sus derivados (1,2). La remoción de este azufre puede llevarse a cabo por procesos químicos y microbiológicos; este último proceso llamó la atención porque además de ser más económico que el químico, es altamente selectivo y se puede llevar a cabo a condiciones normales de presión y temperatura, y es una eliminación real del problema (1,2,3,4).

Dentro de los diferentes tipos de compuestos azufrados, los más recalcitrantes son los que corresponden a los compuestos aromáticos azufrados, los cuales no pueden ser removidos por los actuales procesos de desulfurización química (5,6). Adicionalmente, las políticas internacionales de protección ambiental están

Recibido para evaluación:

Enero de 2000

Aprobado para publicación:

Abril de 2000

dirigidas hacia la producción de combustibles con los más bajos contenidos posibles de azufre, lo cual se puede lograr a través de bioprocesos, en donde la meta es reducir el contenido de azufre de 1.000 ppm a 100 ppm (7).

Uno de las primeras etapas es el aislamiento de microorganismos que ataquen selectivamente los compuestos azufrados, y en especial los de carácter orgánico. En el caso de los compuestos orgánicos azufrados se requiere de microorganismos que remuevan el azufre sin atacar la estructura orgánica con el fin de mantener las características de los combustibles. De estos se han reportado unas pocas especies, principalmente *Rhodococcus*, *Bacillus*, *Corynebacterium*, and *Arthrobacter* (1, 8-10). Otro grupo importante que hace desulfurización es el de *Pseudomonas*, que adicionalmente tienen la capacidad de producir sustancias fuertemente tensioactivas, lo cual permitiría incrementar los fenómenos de transferencia de masa y energía dando lugar a una mayor actividad desulfurizadora (11, 12). Por esta razón, este trabajo se desarrolló con el objeto de obtener aislados nativos de *Pseudomonas* desulfurizadoras empleando el dibenzotiofeno como compuesto modelo de moléculas orgánicas azufradas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos

*Pseudomonas spp.* ATCC 39327. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Aislados nativos del Complejo Industrial de Barrancabermeja.

### Recolección de las muestras

Las muestras fueron recolectadas del Complejo Industrial de Barrancabermeja (Santander): Piscina del centro de producción del CIB (LA1), ciénaga de recuperación de suelos (LA2), Ciénaga 6 de residuos petroleros (LA4), petróleo crudo (LA5), Piscina planta de gases (LA6), Área planta de gases (S8), área aledaña - ciénaga en recuperación (SA9), área cercana a la ciénaga 6 (SA10). Fundación de Asesorías para el Sector Rural (FUNDASES) de la Organización Minuto

de Dios (L7) y Estación de Servicios en Santafé de Bogotá D.C. (LA3). Las siglas son: LA (Líquida Aceitosa), L (Líquida), SA (Sólida Aceitosa) y S (Sólida)

### Aislamiento

**Siembra con enriquecimiento:** Se diluyeron las muestras L, S, LA y SA al 10% (p/v o v/v) en caldo BHI, y las muestras LA y SA en caldo BHI que contiene 5% de Tween 40 (LATw y SATw). Luego se incubaron a 30° y 37°C de 24 a 48 horas. Después se repicaron en agar cetrimide e incubaron a 30° y 37°C de 24 a 48 horas.

**Siembra por diluciones:** Se realizaron diluciones al 10% (p/v o v/v) de cada muestra en caldo BHI de  $10^{-1}$  a  $10^{-6}$  y luego se sembraron 0.1 mL las diluciones por triplicado en agar Cetrimide, e incubaron de 30 y 37°C.

### Caracterización de los aislados

Las colonias aisladas se caracterizan de acuerdo con el crecimiento (tipo, color, pigmento de la colonia y excretado al medio, olor), coloración de Gram y observación microscópica para determinar la morfología de los aislados. Luego se sometieron a pruebas bioquímicas preliminares (hemólisis en sangre, oxidasa y agar MacConkey) con el fin de establecer si pertenecen al género *Pseudomonas*.

### Prueba para la degradación de antraceno y fenantreno (13)

Los aislados se repican sobre agar sales minerales ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1  $\mu\text{M}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  18 mM,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  100  $\mu\text{M}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  1 mM, NaCl 8.5 mM, buffer  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH 7.0 10 mM y agar 1.5% p/v) en forma puntual con palillos. Luego se asperja la superficie con una solución etérea de DBT, antraceno o fenantreno al 10% p/v con un atomizador. Se incubó a 30°C durante 7 días después de los cuales se evaluó el crecimiento y la desaparición de la fluorescencia observada a la luz UV (260 nm). Como control positivo del ensayo se emplea la cepa *Pseudomonas spp.* ATCC 39327 (degradadora de

compuestos organosulfurados) y como control negativo la *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. El control de crecimiento es el medio MM2 con glucosa (10 mM).

#### **Prueba cualitativa para la degradación de dbt (14)**

Se realizó una siembra puntual de los aislados en medio LB pH 7.2 incubando 4 h. a 30°C, luego se aplicó por atomización una solución etérea al 10% p/v de DBT, incubando nuevamente a 30°C durante 5h. Observando a la luz UV (260 nm), la desaparición de la fluorescencia y luego la formación de halos alrededor de las colonias. Se empleó como control de crecimiento medio inoculado sin solución de DBT, como control positivo de degradación de DBT *Pseudomonas spp.* ATCC 39327 y como control negativo de degradación de DBT *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145.

#### **Prueba cuantitativa para la degradación de dbt (15)**

Se realizó con los aislados L2Tw-1, L4Tw-5, L3-3, L4-2, L5-4 L6-2, S9-6, L1-1, L7-A, S10-B, y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC10145, *Pseudomonas sp.* ATCC 39327.

#### **Degradación Directa de DBT:**

En matraz de 250 ml se colocan 99 ml de medio mínimo de sales (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 %, NaCl 0.1 %, NH<sub>4</sub>Cl 0.2%, CaCl<sub>2</sub> 0.001 g/L, FeCl<sub>3</sub> 7.5 ppm), con DBT (500 ppm concentración final) disuelto en eter/dimetilformamida (1:1) y 1 mL de suspensión bacteriana (10<sup>8</sup> u.f.c./mL), y se incuba a 37°C durante 7 días. Luego se centrifuga la muestra y se determina el contenido de sulfatos (técnica 528.33 del AOAC).

#### **Co-Metabolismo del DBT (16):**

Igual que en la degradación directa, pero el medio es enriquecido con extracto de levadura, 0.5 g/L.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **Aislamiento**

Con relación al periodo de incubación se observó que si se dejaba por 48 horas se presentaba la confluencia de colonias y no se lograba obtener fácilmente colonias aisladas. Este mismo fenómeno se presentó durante la incubación a 37°C durante 24 horas. Por lo tanto se trabajó con incubación a 30°C durante 24 horas.

Del método por enriquecimiento se destaca que de la muestra L1 no se pudo obtener aislados, probablemente por la presencia de agentes altamente tóxicos que han impedido el desarrollo de la flora microbiana. En la muestra LA2 solo se evidencia crecimiento con la adición del Tween. Es de resaltar que la totalidad de los aislados de L7 no producen pigmento y algunos procedentes de la muestra SA9. En general, la adición de Tween afecta notablemente las características y el número de los aislados obtenidos, Este se puede deber a que el tensioactivo ayuda a remover o emulsionar las sustancias oleosas presentes y facilita de alguna forma el contacto entre el medio y los microorganismos, permitiendo que estos se desarrollen, sin embargo, en la muestra SA10 los aislados obtenidos en ambos tratamientos son de características similares.

Con el método por diluciones se disminuyó el número de aislados recuperados. Es de resaltar que mediante este procedimiento se pudo obtener crecimiento a partir de la muestra LA1, que no se había logrado por otros métodos, probablemente el impacto de inhibidores del crecimiento bacteriano presentes en la muestra es minimizado al realizar las diluciones, por lo cual el método es recomendable para aquellas muestras en las cuales es difícil la obtención de aislados. Las características de los aislados son diferentes (Tabla 1), pero no podemos afirmar si estos cambios son producto de favorecimiento de unos aislados con respecto a otros o de cambios de la expresión metabólica de aislados similares que crecen bajo condiciones disimiles.

Tabla 1. Descripción de los aislados obtenidos por enriquecimiento

Muestra	Enriquecimiento sin Tween				Enriquecimiento con Tween				Diluciones			
	Pig-mento	Color	Morfología	%	Pig-mento	Color	Morfología	%	Pig-mento	Color	Morfología	%
LA1	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	0	AV	A	BG- y CBG-	1.37
LA2	ND	ND	ND	0	A	A	BG- y CBG-	5.48	ND	A y BI	BG- y CBG-	1.37
LA3	A	BI	BG-	2.74	A	A	BG-	3.42	ND	BI	BG- y CBG-	5.48
LA4	V	V	BG- y CBG-	4.11	AV	AV	BG- y CBG-	5.48	AV	A	CBG-	2.05
LA5	AV	V	BG- y CBG-	4.11	AV	AV y BI	BG- y CBG-	6.85	SP	BI	CBG-	1.37
LA6	AV	A	BG- y CBG-	4.11	AV	AV	BG- y CBG-	6.85	AV	A y AV	BG- y CBG-	3.42
L7	NP	BI	BG-	3.42	NA	NA	NA	0	SP	BI	CBG-	2.06
S8	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	0	ND	ND	ND	0
SA9	H	H	H	4.11	Az	Az	BG- y CBG-	8.22	Az	Az	CBG-	3.42
SA10	V	V	BG- y CBG-	6.85	V	V	BG- y CBG-	6.85	A	A	CBG-	6.86

ND: No detectable

A: Amarillo

AV: Amarillo verdoso

Az: Azul

BI: blanco

V: Verde

H : Heterogéneo

B: Bacilo

CB: Cocobacilo

G-: Gram Negativo

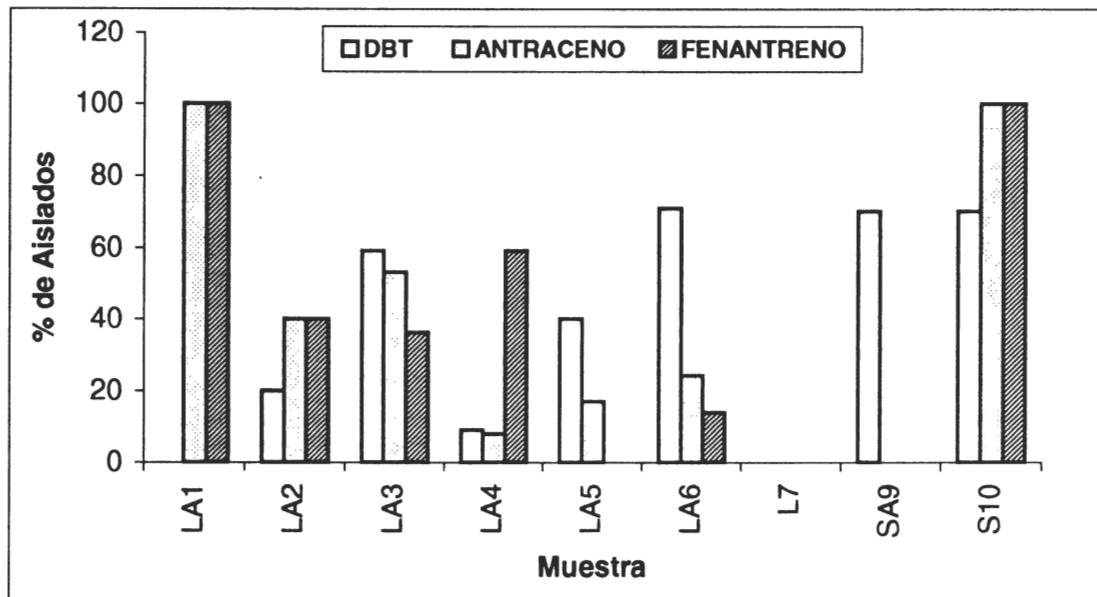
%: Porcentaje de aislados del total de aislados obtenidos

De esta labor se lograron recuperar 146 aislados que presentan las características preliminares de *Pseudomonas*, crecer en agar cetrimide, ser bacilos o cocobacilos gram negativos, y producir pigmento. La muestra con mayor número de aislados recuperados fue la SA10 seguida de la SA 9, y en su orden LA6, LA5, LA 3 y LA4, LA2, L7, LA1 (Tabla 2). Extrañamente, de la muestra S8 no se pudo obtener aislados en alguno de los tratamientos aplicados. Además, la muestra SA9 nos dio únicamente aislados con pigmento y color azul, mientras que las otras son muy similares. Examinando los resultados obtenidos de acuerdo con el tipo de tratamiento empleado (Tabla 1) es evidente que el enriquecimiento con Tween favorece el procedimiento, dando como resultado casi el doble de aislados. En cuanto a enriquecimiento o siembra directa, no se encontró una diferencia apreciable. En consecuencia, se recomienda en el caso de las muestras oleosas la adición de Tween.

### *Ensayo cualitativo de degradación de antraceno fenantreno y DBT.*

El ensayo de degradación de antraceno y fenantreno se realizó con el objeto de encontrar aislados que solo degradaran DBT mas no hidrocarburos lo cual implicaría que su uso en la remoción de azufre aromático de un combustible, no acarrea una degradación de hidrocarburos con la consecuente disminución de su poder calorífico. Sin embargo queda la duda de sí estos aislados pueden degradar o no hidrocarburos alifáticos, que probablemente son menos resistentes al ataque microbiano. Lo que sí es seguro es que si estos aislados degradan hidrocarburos aromáticos también pueden degradar hidrocarburos alifáticos. El desarrollo de la prueba cualitativa sobre los aislados indicó que los aislados provenientes de las muestras L7 no degrada ninguno de los compuestos, los de la muestra LA1 no degradan DBT, el 74% de los aislados de la muestra SA9 solamente degradan DBT, y los aislados de las demás muestran actividad variable en cuanto degradación de los tres compuestos (Figura 1).

Figura 1. Degradación de DBT, antraceno y fenantreno por los aislados nativos.



Algo importante de resaltar es que la muestra L7, que es un cultivo mixto para la recuperación de suelos, no mostró actividad contra los compuestos examinados, lo cual indicaría que si queremos aislar microorganismos con capacidades de degradación de un compuesto determinado debemos buscarlos en ambientes en donde se encuentre presente y que esta presencia sea de tiempo atrás, evento que permite la

supervivencia de individuos adaptados a ese medio ambiente. En el consolidado de los aislados que degradan DBT, antraceno o fenantreno, el método de enriquecimiento con Tween genera el mayor número de aislados, seguido del enriquecimiento sin Tween y por último las diluciones, en donde ningún aislado degrada únicamente DBT (Tabla 2).

Tabla 2. Degradación de DBT Antraceno y Fenantreno según el método de aislamiento.

COMPUESTO			METODO DE AISLAMIENTO		
Antraceno	Fenantreno	DBT	Enriquecimiento Sin Tween (%)	Enriquecimiento Mas Tween (%)	Diluciones (%)
-	-	+	8.9	27.4	0
-	+	+	2.1	0	0
+	+	+	17.8	24.9	10.9
+	-	-	4.8	4.5	0
+	-	+	2.7	0	0
+	+	-	6.1	9.5	14.3
-	+	-	0	0	0

En la Tabla 2 se puede ver que hay aislados que degradan solo DBT o antraceno y fenantreno o solo antraceno, lo que indicaría en primera instancia que debe producir una enzima por tipo de compuesto, una para DBT, una para antraceno y una modificada de la anterior que ataque antraceno y fenantreno. Lo cual se tendría que demostrar aislando las enzimas implicadas en los ataques a los compuestos y determinando si la afinidad a sustrato implica enzimas únicas o una enzima con múltiples actividades.

### **Evaluación de la degradación de DBT**

En esta parte se seleccionaron los aislados LA4-tw5, SA10-B (DBT+, Ant+, Fen+), LA1-1 (Ant+, Fen+), , LA4-2 (DBT+, Fen+), LA5-4, LA6-2 y SA9-6 (DBT+), L7-A (DBT-, Ant-, Fen-), *Pseudomonas* sp ATCC 39327 (DBT+, Ant+)

### **Degradación directa**

En la Figura 2 se aprecia que los aislados presentan diverso grado de actividad. El aislado LA6-2 es el que muestra la mayor actividad de desulfurización medida como mineralización de DBT, (11%). Puesto que la mineralización del DBT a sulfatos implica una serie de transformaciones que dan lugar a compuestos solubles en agua pensamos que la remoción del azufre orgánico puede ser más profunda, por lo tanto es necesario hacer un trabajo que implique el análisis de los intermediarios que se generen en cada aislado evaluado.

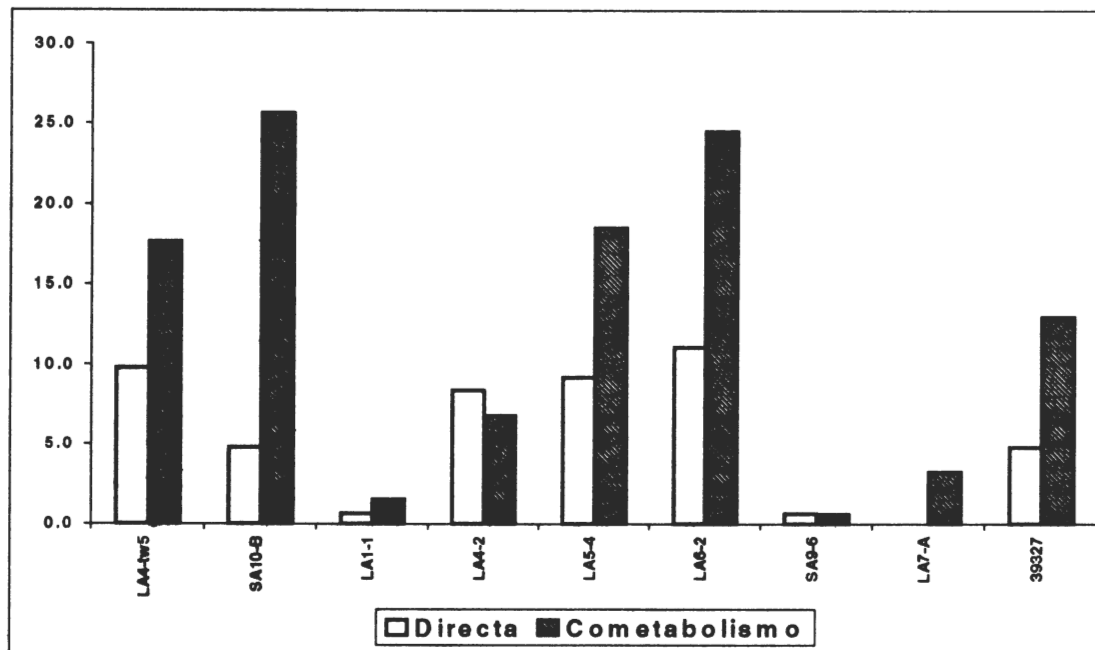
Para resaltar, el aislado LA1-1 presenta una pequeña actividad desulfurizadora, cosa que no se había manifestado con anterioridad en la prueba cualitativa. Podríamos pensar que esta actividad puede ser de carácter residual o de inespecificidad de las enzimas que degradan antraceno y fenantreno, hecho que ya ha sido reportado(14), con cepas de *Pseudomonas* aislando los genes codificantes de enzimas degradadoras de DBT (genes de la ruta DOX), enzimas que transformaban naftaleno a salicilato

y fenantreno a ácido 1-hidroxi-2-naftoico. También, es posible que la actividad de este aislado sobre el DBT sea muy lenta y requeriría un mayor tiempo de contacto con el producto para poder ejercer su acción, entonces con la prueba diseñada para efectos de evaluación preliminar no sería posible detectar esta actividad, y por lo tanto el ensayo tendría que modificarse para detectar estas bajas actividades. Por lo demás, no se ve una correlación entre la capacidad de degradación de DBT asociada a las otras actividades (degradación de antraceno y fenantreno) pues como se ve en la Figura 2, el porcentaje de DBT mineralizado cambia entre aislados independientemente de sus características metabólicas adicionales, ya que los aislados DBT+ (LA5-4, LA6-2 y SA4-9) mineralizan el DBT en grado distinto, (9.2%, 11.1% y 0.6% respectivamente).

### **Degradación del DBT con cometabolismo**

La mayoría de los aislados reportan un aumento considerable de la desulfurización (Figura 2), fenómeno que puede ser explicado con base en la cantidad de energía que puede derivar del cosustrato que le ayudaría a mantener sus procesos metabólicos de manera más dinámica, facilitando la utilización del DBT como donador de electrones y de esta manera poder oxidarlo hasta sulfato de manera más acelerada. Sin embargo en el caso del aislado SA9-6 no hubo efecto manifiesto, mientras que en el LA4-2 se redujo en una pequeña fracción el porcentaje de azufre mineralizado. La explicación podría deberse a que el azufre en estos aislados no tienen una maquinaria metabólica que le permita utilizar el DBT como donador de electrones y por tanto no se vea oxidado como sulfatos o que este azufre esta siendo incorporado a la célula. Para demostrar esto se debe hacer un seguimiento de la utilización del DBT con métodos que nos permitan medir directamente el DBT.

Figura 2. Porcentaje de DBT mineralizado por degradación directa y cometabolismo



### Identificación de los aislados

Los aislados empleados para el ensayo cuantitativo de dibenzotiofeno se identificaron por API para no fermentadores, con pruebas preliminares como hemólisis en agar sangre, oxidasa y crecimiento en Agar MacConkey, obteniéndose *Pseudomonas aeruginosa* en su totalidad. Dos de estos aislados presentaron gamma hemólisis (LA5-4 y LA1-1), crecimiento en agar MacConkey negativo y oxidasa positivo débil, características que aunque no son propias de esta especie, codifica para ella por el sistema API, y presenta la misma morfología macro y microscópicamente. Esta característica podría deberse a que al cambiar las condiciones de supervivencia se vea el microorganismo obligado a variar la expresión de algunas características, o simplemente corresponda a variedades no identificadas dentro de la especie ya mencionada.

Para finalizar podemos decir de manera general que en este trabajo se logró implementar una metodología adecuada que permitió el aislamiento de *Pseudomonas spp.* desulfurizadoras de Dibenzotiofeno (DBT), a partir de muestras contaminadas con petróleo y sus derivados. Adicionalmente, la capacidad desulfurizadora de los microorganismos no depende la capacidad de los mismos para degradar hidrocarburos, que los microorganismos capaces de degradar hidrocarburos aromáticos complejos como el fenantreno pueden degradar hidrocarburos aromáticos sencillos como el antraceno y no lo contrario. Por último, la capacidad desulfurizadora puede utilizarse para tipificar variedades de un género - especie, ya que siendo todas *Pseudomonas aeruginosa* degradan en diferente proporción el compuesto patrón utilizado.

**Agradecimientos**

Este trabajo fue desarrollado con fondos aportados por el **FODESEP** a través de la financiación del proyecto "Articulación de la formación de pregrado y post-grado a la prestación de servicio de apoyo científico y tecnológico al sector productivo nacional mediante la actualización del Laboratorio de Estudios Microbiológicos del Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional de Colombia".

**BIBLIOGRAFÍA**

1. J.J. Kilbane. Desulfurization of coal: the microbial solution. *Trends Biotechnol.* **7**, 97. (1989)
2. T. Ohshiro and Y. Izumi. Microbial desulfurization of organic sulfur compounds in petroleum. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **63** (1) 1. (1999)
3. C.P. Grady. Biodegradation: Its measurement and biological basis. *Biotechnology and Bioengineering.* **27**.660 (1985).
4. D.J. Monticello and W.R. Finnerty. Plasmid mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* strains. *Applied and Environmental Microbiology.* **49** (4). 756 (1985)
5. P. M. Fedorak and W. S. Westlake. Microbial degradation of organic sulfur compounds in Prudhoe Bay crude oil. *Can. J. of Microbiology.* **29**. 291. (1983)
6. Finnerty, W.R., and Martyn, R. Microbial desulfurization of fossil fuels: a review. Department of Microbiology. Atlanta, Georgia. *Biotechnology and Bioengineering Symp.* (16) (1986).
7. United States. Energy Department. Office of Industrial Technologies and Energy Efficiency and Renewable Energy. Washington D. C. "Gasoline Biodesulfurization". (1999).
8. L. M. Soto, H. Ledo, Y. Calderon, J. Marin and F. Galarraga. Bacterial sulfate production by biodesulfurization of aromatic hydrocarbons, determined by ion chromatography. *J. Chromatography.* **824** (1) 45. (1998)
9. B. L. Macfarland. Biodesulfurization. *AADE Ed. Journal.* **2** (3) 257. (1999).
10. J.J. Kilbane and K. Jackowski. Biodesulfurization of water-soluble coal-derived material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8. *Biotechnol. Bioeng.* **40**, 1107. (1992).
11. M. E. Gallardo, A. Ferrandez, V. de Lorenzo, J. L. Garcia and E. Diaz. Design recombinant *Pseudomonas* Strains to Enhance Biodesulfurization, *Journal of Bacteriology.* **179** (22) 7156. (1997).
12. K. Kodama. Induction of dibenzothiophene oxidation by *Pseudomonas jianii*. *Agric. Biol. Chem.* **41** (7). 1193. (1977).
13. H. Kiyohara, K. Nagao, and K. Yana. Rapid screen for bacteria degrading water-insoluble, solid hydrocarbons on agar plates. *Applied and Environmental Microbiology.* **43**(2). 454. (1982).
14. S. Denome, D. Stanley and D. Young. Metabolism of dibenzothiophene and naphthalene in *Pseudomonas* strains: complete DNA sequence of an upper naphthalene catabolic pathway. *Journal of Bacteriology.* (21)175. (1993).
15. M. Constantini, A. Bordons and J. Giralt. Degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas putida* *Applied Microbiology.* **18**. 107. (1994).
16. P. M. Fedorak, and Grbic-G. Aerobic microbial cometabolism of benzothiophene and 3-methylbenzothiophene. *Applied and Environmental Microbiology.* **57** (4). 932. (1991).