

Artículo original

Uso de *Pseudomonas sp* y bacterias Gram positivas en el tratamiento biológico para la biodegradación del tolueno en suelos y aguas contaminadas

Use of Pseudomonas sp and Gram-positive bacteria in biological treatment for the biodegradation of toluene in contaminated soils and waters

Karina A. Cuello, Marcelo J. Mignone, Angel M. Zapata, Delfina Garbo Aguilera, Matías Carrol González y Magalí Tamara Orbaj

Escuela Superior de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Morón. Machado 854, (1708) Morón, Prov. de Buenos Aires, Argentina.

Manuscrito recibido: 29 de mayo de 2024; aceptado para publicación: 5 de octubre de 2024

Autor de Contacto: Lic. Karina A. Cuello. Escuela Superior de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Morón. Machado 854, (1708) Morón, Prov. de Buenos Aires, Argentina. E-mail: karina190776@gmail.com

Resumen

El tolueno es un componente de varios productos industriales: naftas, pinturas, quitamanchas y esmalte de uñas, entre otros. Desde el punto de vista toxicológico este hidrocarburo aromático es un inhibidor neuronal asociado con daño progresivo del sistema nervioso central y periférico; su toxicidad puede ocurrir por inhalación involuntaria o deliberada. En las mencionadas industrias, se presenta como un residuo que se incorpora a las plantas de efluentes para su tratamiento, siendo casi inmisible en agua. Dadas estas características de toxicidad, casi inmiscibilidad en agua y dificultosa biodegradación por el consorcio microbiano estándar de las plantas de tratamiento de efluentes; se hace compleja su degradación para reducir su concentración en línea con los límites especificados para el vertido en los diferentes cuerpos receptores. Este trabajo tuvo como objetivo obtener y caracterizar bacterias capaces de degradar tolueno para ser luego utilizadas para fines de biorremediación de suelos y aguas contaminadas con el hidrocarburo. Se procesaron dos muestras de líquidos residuales y tres recipientes vacíos que contenían residuos de tolueno. Se aislaron 9 cepas bacterianas capaces de crecer en tolueno como única fuente de carbono. La caracterización morfológica y bioquímica de los bacilos cortos Gram negativos hallados, los identificó como microorganismos del género *Pseudomonas*. Para la determinación de especie se utilizaron las galerías API® 20 NE. Se determinó que las *Pseudomonas* aisladas correspondían a las especies *P. aeruginosa*, *P. luteola*, *P. putida* y *P. fluorescens*. De los gérmenes Gram positivos encontrados, solo se determinó la morfología, hallándose en todos los casos bacilos largos y cocos Gram positivos.

Palabras clave: bacterias, biodegradación, tolueno, biorremediación.

Abstract

Toluene is a component of several industrial products: gasoline, paints, stain removers and nail polish, among others. From a toxicological point of view, this aromatic hydrocarbon is a neuronal inhibitor associated with progressive damage

to the central and peripheral nervous system. Its toxicity can occur through involuntary or deliberate inhalation. In the aforementioned industries, it occurs as a waste that is incorporated into effluent plants for treatment, being almost immiscible in water. Given these characteristics of toxicity, almost immiscibility in water and difficult biodegradation by the standard microbial consortium of effluent treatment plants, its degradation becomes complex to reduce its concentration in line with the limits specified for discharge into the different receiving bodies. This work aimed to obtain and characterize bacteria capable of degrading toluene to be later used for bioremediation of soils and waters contaminated with hydrocarbon. Two waste liquid samples and three empty containers containing toluene waste were processed. Nine bacterial strains capable of growing in toluene as the only carbon source were isolated. The morphological and biochemical characterization of the short Gram-negative bacilli found identified them as microorganisms of the genus *Pseudomonas*. For species determination, API® 20 NE galleries were used. It was determined that the isolated *Pseudomonas* corresponded to the species *P. aeruginosa*, *P. luteola*, *P. putida* y *P. fluorescens*. Of the Gram positive germs found, only the morphology was determined, with long bacilli and Gram positive cocci being found in all cases.

Keywords: bacteria, biodegradation, toluene, bioremediation

DOI: <http://doi.org/10.34073/391>

Introducción

La liberación de productos tóxicos provenientes de diversas industrias, ocasiona serios problemas de contaminación de los recursos naturales, en particular en suelo y agua. Los hidrocarburos aromáticos monocíclicos tales como el benceno, tolueno, etilbenceno y xileno, presentes en variados productos industriales forman parte de los compuestos con más impacto en el medio ambiente y en la salud humana debido a su naturaleza cancerígena, mutagénica y altamente tóxica (Rodríguez-Gonzales et al., 2022; Eweis, 1999). La ley 24.051 de Residuos Peligrosos establece límites de descarga para una serie de compuestos entre los que se encuentra el tolueno, con un nivel guía de 1000 microgramos/l para fuentes de agua de bebida humana con tratamiento convencional. En condiciones favorables, algunos microorganismos presentes en los ecosistemas contaminados tienen la capacidad de utilizar ciertos compuestos orgánicos tóxicos, incluyendo tolueno, como fuente de energía y de carbono, llegando a mineralizar estos contaminantes a compuestos orgánicos simples como dióxido de carbono y agua (Ugochukwu & Fialips, 2017). Una herramienta para solucionar este problema ambiental es el uso de microorganismos naturales para degradar o descomponer sustancias que son contaminantes y convertirlas en otras menos tóxicas o inocuas para el medio

ambiente. Esta herramienta biotecnológica denominada biorremediación es una tecnología emergente que utiliza organismos vivos (hongos y bacterias; entre otros) para absorber, degradar o transformar los contaminantes y retirarlos, inactivarlos o atenuar su efecto en el suelo, el agua y el aire (Vandera & Koukkou, 2017; Brutti et al., 2018). Actualmente, se han identificado gran variedad de bacterias que pueden degradar tolueno bajo condiciones aerobias, entre ellas bacterias del género *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Bacillus* y *Burkholderia* (Lozano-Mahecha et al., 2022; Di Martino et al., 2012; Woolrich Zavaleta, 2016; Loera-Valenzuela et al., 2016).

Estudios previos sobre biorremediación de hidrocarburos en aguas residuales con cultivos mixtos de microorganismos demostraron que aplicando un tratamiento consistente en una mezcla de bacterias de los géneros *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Mycobacterium* lograron remociones del contaminante en porcentajes superiores al 86% (González et al., 2019).

El objetivo del presente trabajo es obtener, aislar y caracterizar bacterias capaces de degradar tolueno, utilizando este compuesto como única fuente de carbono; para ser luego utilizadas para fines de biorremediación de suelos y aguas contaminadas con el hidrocarburo.

Material y Método

Aislamiento y caracterización inicial de flora microbiana

Se procesaron dos muestras de líquidos residuales y tres recipientes vacíos que contenían residuos de tolueno con el objeto de aislar flora microbiana con potencialidad biodegradadora. Para ello, se realizaron siembras de cada muestra en tripteína soya agar en superficie por estría. Luego de un

período de incubación de 48 horas a 28 °C, se observaron en las placas de Petri desarrollos de numerosas colonias bacterianas. Se realizaron nuevos repiques para obtener cultivos monobacterianos. En tal sentido, se aislaron 20 cepas, las cuales fueron identificadas como E1 a E7 (provenientes de efluentes) y T1 a T13 (provenientes de recipientes). La caracterización inicial de dicha flora microbiana se muestra en la **Tabla I**.

Tabla I. Caracterización morfológica, tinción de Gram y características de las colonias.

Muestra	Tinción de Gram, morfología y agrupación	Características de las colonias (en agar tripton de soya)					
		Forma	Elevación	Borde	Superficie	Cromogénesis	Tamaño
E1	Bacilos cortos, Gram negativos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Brillante	Amarronada	Mediano
E2	Cocos, Gram positivos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Seca, mate	Amarilla	Mediano
E3	Bacilos cortos, Gram negativos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Brillante, aspecto de vidrio esmerilado	Verdosa	Grande
E4	Bacilos cortos, Gram negativos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Brillante	Crema, amarronada	Mediano
E5	Bacilos cortos, Gram negativos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Lisa, brillante	Crema, amarronada	Mediano
E6	Bacilos cortos, Gram negativos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Lisa, brillante	Crema, amarronada	Grande
E7	Cocos, Gram positivos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Seca, mate	Amarilla	Mediano
T1	Bacilos, Gram positivos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Brillante	Beige	Mediano
T2	Cocos, Gram positivos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Brillante	Amarilla	Pequeño
T3	Bacilos, Gram positivos.	Irregular	Plana	Ondulado	Seca, mate	Crema	Grande

T4	Cocos, Gram positivos.	Circular	Elevada	Entero	Lisa, brillante	Amarilla	Mediano
T5	Bacilos, Gram positivos.	Irregular	Plana	Ondulado	Seca, mate	Crema	Grande
T6	Bacilos, Gram positivos.	Irregular	Plana	Ondulado	Seca, mate	Crema	Grande
T7	Cocos, Gram positivos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Seca	Crema, amarilla	Mediano
T8	Cocos, Gram positivos.	Irregular	Plana	Ondulado	Seca, mate	Naranja	Mediano
T9	Bacilos, Gram positivos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Brillante	Crema	Mediano
T10	Bacilos, Gram positivos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Brillante	Crema	Mediano
T11	Cocos, Gram positivos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Rugosa, mate	Amarilla	Mediano
T12	Cocos, Gram positivos.	Circular	Convexa	Entero	Lisa, brillante	Naranja	Mediano
T13	Cocos, Gram positivos.	Irregular	Elevada	Ondulado	Brillante	Crema	Mediano

Análisis de susceptibilidad a tolueno

Para realizar la prueba de susceptibilidad, se empleó la técnica de difusión en agar. Considerando como limitante de esta metodología que el tolueno es muy poco soluble en agua (0,53 g/l a 20-25°C), fue necesario adicionar al medio de cultivo empleado Tween 20 (40 ml/l de medio) y ajustar el pH final a 7,3. Se prepararon suspensiones bacterianas equivalentes en turbidez a la turbidez estándar de 1 de McFarland y se realizaron sembrados masivos en placas de Petri con medio tripteína soya agar. Luego de realizar los tapizados,

se colocaron sobre la superficie del medio de cultivo, dos discos impregnados con 5 μ l de tolueno cada uno (uno al 10% y el otro con el hidrocarburo puro). Tras un período de incubación de 48 horas a 28 °C, se retiraron las placas de la estufa y se midieron con una regla las zonas (halos) de inhibición de crecimiento alrededor de los discos. Fue considerada como negativa a la resistencia (sensible) la presencia de halos mayores a 10 mm. Los resultados de la prueba de susceptibilidad son resumidos en la **Tabla II**.

Tabla II. Análisis de tolerancia al tolueno. Fue considerada como sensible la presencia de halos mayores a 10 mm.

Muestra	Diámetros de halos de inhibición de crecimiento (mm)		Interpretación / susceptibilidad
	Puro	10 %	
E1	10	6	Resistente
E2	6	6	Resistente
E3	6	6	Resistente
E4	8	7	Resistente
E5	7	6	Resistente
E6	6	6	Resistente
E7	7	6	Resistente
T1	23	20	Sensible
T2	30	25	Sensible
T3	6	6	Resistente
T4	6	6	Resistente
T5	6	6	Resistente
T6	7	6	Resistente
T7	9	6	Resistente
T8	6	6	Resistente
T9	22	20	Sensible
T10	6	6	Resistente
T11	8	6	Resistente
T12	8	7	Resistente
T13	9	6	Resistente

Investigación de bacterias con capacidad de degradar tolueno

La investigación se centró en aquellas cepas microbianas que demostraron ser tolerantes al hidrocarburo. La fuente de carbono principal de este estudio fue el tolueno. Se utilizó como medio de cultivo Bushnell Haas Agar (Bushnell & Haas, 1941); compuesto por KH_2PO_4 1,00 g/l, K_2HPO_4 1,00 g/l, NH_4NO_3 1,00 g/l, MgSO_4 0,20 g/l, FeCl_3 0,05 g/l, CaCl_2 0,02 g/l y agar 20,00 g/l (pH final a 25°C 7,0 ± 0,2). Adicionalmente, se usó Bushnell Haas Agar con la misma composición más 40 ml/l de Tween 20. El medio de cultivo BHA es el más recomendado para investigar degradación de hidrocarburos por microorganismos. Este medio contiene todos los nutrientes excepto hidrocarburos (fuentes de carbono), necesarios para el crecimiento de las bacterias. Para testear hidrocarburos volátiles, como el tolueno, las placas de Petri conteniendo el medio son invertidas y el hidrocarburo es colocado en la tapa, embebido en un papel de filtro estéril. Se prepararon suspensiones bacterianas equivalentes en turbidez a la turbidez estándar de 1 de McFarland y se realizaron sembrados masivos en placas de Petri según el siguiente esquema:

Placa 1: Tripteína soya agar. Para control de viabilidad del microorganismo.

Placa 2: BHA s/T y s/Tw. Bushnell Haas Agar, sin tolueno, sin Tween 20.

Placa 3: BHA + Tw s/T. Bushnell Haas Agar con Tween 20, sin tolueno.

Placa 4: BHA c/T y s/Tw. Bushnell Haas Agar, con tolueno, sin Tween 20.

Placa 5: BHA + Tw c/T. Bushnell Haas Agar con Tween 20, con tolueno.

Las colonias bacterianas utilizadas para realizar las suspensiones fueron tomadas de las zonas más cercanas a los discos. Tras un período de incubación de 7 días a 28 °C, se retiraron las placas de la estufa para su evaluación, en búsqueda de crecimiento microbiano. Los resultados son resumidos en la Tabla III. Luego de la interpretación de los resultados se concluye que, de las 20 cepas recuperadas, solo 9 demostraron tener capacidad para degradar tolueno.

Tabla III. Investigación de bacterias con capacidad de degradar tolueno.

MUESTRA	Evaluación de crecimiento microbiano				
	Tripteína soya agar	BHA s/T y s/Tw	BHA + Tw s/T	BHA c/T y s/Tw	BHA + Tw c/T
E1	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo
E2	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo
E3	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Con desarrollo
E4	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Con desarrollo
E5	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Con desarrollo
E6	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Con desarrollo
E7	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo
T3	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Con desarrollo
T4	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo
T5	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Con desarrollo
T6	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Con desarrollo
T7	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Con desarrollo
T8	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo
T10	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Con desarrollo
T11	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo
T12	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo
T13	Con desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo	Sin desarrollo

Resultados

Identificación morfológica y bioquímica de los microorganismos biodegradadores

Se evaluaron nuevamente las características morfológicas de las bacterias degradadoras del hidrocarburo mediante la coloración de Gram (Madigan, 2015). Las bacterias aisladas fueron agrupadas en grupos (G1 y G2) de acuerdo con sus diferencias morfológicas y reacción a la mencionada coloración. El grupo G1 fue conformado por bacilos cortos Gram negativos mientras que el grupo G2 por bacilos largos y cocos Gram positivos. Se realizaron pruebas bioquímicas a ambos grupos tales como reducción de nitratos, utilización de carbohidratos, producción de ureasa, catalasa y oxidasa, entre

otras (Collins & Lyne, 1989; Mac Faddin, 1984). La catalasa es una enzima que descompone el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno. Está presente en la mayoría de las bacterias aerobias y anaerobias facultativas, con la excepción de los géneros *Streptococcus*, *Enterococcus* y algunos otros. Esta prueba bioquímica también se puede utilizar para diferenciar el género *Bacillus*, el cuales da positivo para la presencia de la enzima; del género *Clostridium* el cual es catalasa negativo. La prueba de oxidasa es una prueba bioquímica que permite la detección de la enzima citocromo-c-oxidasa presente en los géneros *Pseudomonas*, *Neisseria*, *Moraxella*, *Vibrio* y *Aeromonas*, entre otros (Murray et al., 1999). Los tests y resultados son resumidos en las Tablas IV, V y VI.

Tabla IV. Caracterización bioquímica de aislamientos bacterianos que utilizan tolueno como fuente de carbono – Grupo G2.

Tests	Componentes Activos	Reacciones/enzimas	Resultados				
			T3	T5	T6	T7	T10
GLU	D-glucosa	Acidificación (D-Glucosa)	+	+	+	+	+
FRU	D-fructosa	Acidificación (D-fructosa)	+	+	-	+	+
MNE	D-manosa	Acidificación (D-Manosa)	+	+	+	-	+
MAL	D-maltosa	Acidificación (Maltosa)	+	-	+	-	-
LAC	D-lactosa	Acidificación (Lactosa)	+	+	-	-	-
TRE	D-trehalosa	Acidificación (D-trehalosa)	+	-	-	-	+
MAN	D-manitol	Acidificación (D-Manitol)	+	-	-	-	+
XLT	Xilitol	Acidificación (Xilitol)	-	-	+	-	-
MEL	D-Melibiosa	Acidificación (D-Melibiosa)	-	+	+	-	-
NIT	Nitrato potásico	Reducción de nitratos en nitritos	+	+	+	-	+
VP	Piruvato de sodio	Producción de Acetil-metil-carbinol (Voges Proskauer)	+	+	-	-	+
RAF	D-Rafinosa	Acidificación (Rafinosa)	-	-	+	-	-
XYL	D-xilosa	Acidificación (xilosa)	-	+	+	-	+
SAC	D-sacarosa	Acidificación (sacarosa)	-	+	-	+	+
MDG	Metil- α D-glucopiranosido	Acidificación (Metil- α D-glucopiranosido)	-	+	-	-	+
NAG	N-acetil-glucosamina	Acidificación (N-Acetil-Glucosamina)	-	+	-	-	+
ADH	L-arginina	Arginina Dihidrolasa	+	-	+	+	+
URE	Urea	Ureasa	+	-	+	+	-
OX	Ensayo de oxidasa	Citocromo-oxidasa	+	+	+	+	
CAT	Ensayo de catalasa	Catalasa	+	+	+	+	+

Tabla V. Características de las colonias del grupo G1 en medios de cultivo selectivos y diferenciales.

Muestra	Características de las colonias en medios de cultivo selectivos y diferenciales		
	Agar Cetrimide	Agar Pseudo F	Agar Pseudo P
E3	Producción de pigmento verdoso. Fluorescente bajo luz ultravioleta. Crecimiento satisfactorio.	Producción de pigmento verdoso. Fluorescente bajo luz ultravioleta.	Producción de pigmentos azul/rojizo.
E4	Crecimiento escaso, colonias sin color característico.	Colonias sin color característico.	Producción de pigmento amarillo anaranjado.
E5	Producción de pigmento verdoso. Fluorescente bajo luz ultravioleta. Crecimiento parcialmente inhibido.	Producción de pigmento verdoso. Fluorescente bajo luz ultravioleta.	Colonias sin color característico.
E6	Producción de pigmento verdoso. Fluorescente bajo luz ultravioleta. Crecimiento parcialmente inhibido.	Producción de pigmento verdoso. Fluorescente bajo luz ultravioleta.	Colonias sin color característico.

Tabla VI. Caracterización bioquímica de aislamientos bacterianos que utilizan tolueno como fuente de carbono – Grupo G1.

Tests (API® 20 NE)	Componentes Activos	Reacciones/enzimas	Resultados			
			E3	E4	E5	E6
NO3	Nitrato potásico	Reducción de nitratos en nitritos	+	+	-	+
TRP	L-triptófano	Formación de indol (Tryptófano)	-	-	-	-
GLU	D-glucosa	Fermentación (Glucosa)	-	-	-	-
ADH	L-arginina	Arginina Dihidrolasa	+	+	+	+
URE	Urea	Ureasa	-	-	-	-
ESC	Esculina/citrato férrico	Hidrólisis (β -glucosidasa) (Esculina)	-	+	-	-
GEL	gelatina/(origen bovino)	Hidrólisis (proteasa) (Gelatina)	+	+	-	+

PNPG	4-nitrofenil- β D-galactopiranosida	β -galactosidasa (para-nitrofenil- β D-galactopiranosidasa)	-	+	-	-
GLU	D-glucosa	Asimilación (Glucosa)	+	+	+	+
ARA	L-arabinosa	Asimilación (Arabinosa)	-	+	-	+
MNE	D-manosa	Asimilación (Manosa)	-	+	-	+
MAN	D-manitol	Asimilación (Manitol)	+	+	-	+
NAG	N-acetil-glucosamina	Asimilación (N-Acetil-Glucosamina)	+	-	-	+
MAL	D-maltosa	Asimilación (Maltosa)	-	+	-	-
GNT	Gluconato potásico	Asimilación (Gluconato potásico)	+	+	+	+
CAP	Ácido cáprico	Asimilación (ácido Cáprico)	+	+	+	+
ADI	Ácido adípico	Asimilación (ácido Adípico)	+	-	-	-
MLT	Ácido málico	Asimilación (Malato)	+	+	+	+
CIT	Citrato trisódico	Asimilación (Citrato trisódico)	+	+	+	+
PAC	Ácido fenilacético	Asimilación (ácido fenilacético)	-	-	+	-
OX	Ensayo de oxidasa	Citocromo-oxidasa	+	+	+	+
CAT	Ensayo de catalasa	Catalasa	+	+	+	+

Para determinar el género y la especie de los microorganismos del grupo G1, se utilizaron las galerías API® 20 NE. La galería del sistema API 20 NE incluye 20 microtubos que contienen sustratos deshidratados y combina 8 ensayos convencionales y 12 ensayos de asimilación. Los ensayos convencionales se inoculan con una suspensión bacteriana salina que reconstituye los medios. Las reacciones que se producen durante la incubación se traducen en cambios de color, bien espontáneos o bien provocados mediante la adición de reactivos. Los ensayos de asimilación se inoculan con un medio mínimo y las bacterias crecen solamente si

son capaces de utilizar el correspondiente sustrato. La lectura de estas reacciones se lleva a cabo utilizando la tabla de lectura y la identificación se obtiene con la ayuda de un catálogo analítico o de un software. Este sistema estandarizado es utilizado para la tipificación de bacilos Gram negativos no enterobacterias y no fastidiosos (por ejemplo: *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*, etc.). Se determinó que la muestra E3 correspondía a *Pseudomonas aeruginosa*, la muestra E4 a *Pseudomonas luteola*, la E5 a *Pseudomonas putida* y la E6 a *Pseudomonas fluorescens*.

Discusión y Conclusiones

En este trabajo se lograron recuperar un total de 20 cepas bacterianas a partir de 5 muestras procesadas. De ellas, 17 manifestaron ser tolerantes al tolueno y solo 9 demostraron tener capacidad para biodegradarlo. Además, en este estudio, se han caracterizado bacterias del género *Pseudomonas* con capacidad de crecer y metabolizar tolueno (todas ellas recuperadas de las muestras de líquidos residuales). Diversos estudios indican la efectividad de *Pseudomonas sp* en la degradación de hidrocarburos (García & Aguirre, 2014). *P. aeruginosa*, ha demostrado la capacidad de degradar no solo tolueno sino también petróleo crudo, gasolina, diésel, benceno, xileno, naftaleno, fenantreno y pireno (del Refugio Castañeda et al., 2022). De los hidrocarburos que conforman el BTEX (Benceno – Tolueno – Etilbenceno y Xilenos), el tolueno es el de mayor consumo bajo condiciones aerobias, sin embargo, dependiendo de las bacterias presentes en las zonas contaminadas, estas moléculas pueden seguir diferentes rutas metabólicas. Se han descrito cinco vías distintas para la degradación aeróbica del tolueno. Todas las vías se inician con la oxidación del hidrocarburo aromático, pero se forman cinco productos de oxidación diferentes. *P. putida F1*, por ejemplo, contiene tolueno 2,3-dioxigenasa, una enzima que oxida el anillo aromático del tolueno, incorporando ambos átomos de oxígeno molecular. Después de un paso de deshidrogenación, se forma 3-metilcatecol. Este compuesto se degrada aún más mediante la fisión del anillo meta (Finette et al., 1984). *P. putida PaW15* inicia la degradación en el grupo metilo del tolueno, formando finalmente benzoato. El benzoato se convierte en catecol, que también se degrada mediante una ruta de escisión meta. También se han descrito cepas que mono oxigenan el anillo aromático del tolueno (Perales et al., 2000). *Burkholderia cepacia G4* (anteriormente *Pseudomonas cepacia*) utiliza una tolueno 2-monooxigenasa que oxida secuencialmente el anillo aromático en las posiciones 2 y 3 para formar o-cresol y luego 3-metilcatecol (Shields et al., 1989). *Ralstonia pickettii PKO1* (anteriormente *Burkholderia pickettii PKO1*, tiene una tolueno 3-monooxigenasa que ataca inicialmente en la posición 3 del tolueno, formando m-cresol, y una segunda monooxigenasa ataca en la posición 2 del m-cresol, para formar 3-metilcatecol. El 3-metilcatecol se degrada por una vía de escisión meta en las cepas *G4* y *PKO1* (Olsen et al., 1994). Final-

mente, *Pseudomonas mendocina KR1* tiene una tolueno 4-monooxigenasa que oxida el tolueno para formar p-cresol. El grupo metilo de p-cresol se oxida secuencialmente para formar 4-hidroxibenzoato, que se degrada aún más por la vía β -cetoacido (Whited & Gibson, 1991; Salleh et al., 2003). Por otro lado, los microorganismos biodegradadores aislados de los recipientes vacíos que contenían residuos de tolueno resultaron ser todos gérmenes Gram positivos, no pudiendo llegar a caracterizarlos en género y especie.

Cabe destacar que para que el proceso de biorremediación sea efectivo, se deben tener en cuenta varios factores importantes, además de la presencia de microorganismos con las capacidades metabólicas adecuadas. Entre ellos, los factores abióticos de la zona (pH, temperatura, salinidad, nutrientes, disponibilidad de oxígeno, etc.).

En cuanto a la temperatura, no solo afecta el crecimiento microbiano sino también afecta la solubilidad de los hidrocarburos. Aunque la biodegradación de hidrocarburos puede ocurrir en un amplio rango de temperaturas, la tasa de biodegradación generalmente disminuye con la disminución de la temperatura. Las tasas de degradación más altas generalmente ocurren en el rango de 30-40 °C en ambientes de suelo, 20-30 °C en algunos ambientes de agua dulce y 15-20 °C en ambientes marinos (Das & Chandran, 2011).

Los nutrientes son ingredientes muy importantes para la biodegradación exitosa de contaminantes de hidrocarburos, especialmente nitrógeno, fósforo y, en algunos casos, hierro. Algunos de estos nutrientes podrían convertirse en un factor limitante, afectando así los procesos de biodegradación.

El pH no solo afecta el desarrollo bacteriano sino también las estrategias de biorremediación. La producción y acumulación de productos de desecho bacteriano puede cambiar el pH de los efluentes contaminados con hidrocarburos y, en consecuencia, influir en la disponibilidad de nutrientes, la solubilidad del contaminante, la biodisponibilidad y las actividades microbianas. Estudios realizados han mostraron que los hidrocarburos se pueden degradar mínimamente con un rango de pH de 2 a 5,5 y un pH alcalino de 7,5 a 10; mientras que la degradación efectiva de los mismos se obtiene a un pH casi neutro (5,6 a 7,4) (Sihag et al., 2014).

Para finalizar, se puede concluir que las bacterias encontradas en este estudio podrían ser utilizadas en consorcios bacterianos para procesos de biorremediación de suelos y aguas

contaminadas. Estudios previos han demostrado que muchas de las cepas que degradan tolueno y/o xileno pertenecen al género *Pseudomonas*, género versátil metabólicamente por lo cual se considera de gran importancia en procesos de biorremediación (Suárez, 2004; Lozano & López, 2022). Dentro de los escenarios donde podrían emplearse estos microorganismos, se pueden mencionar: derrames accidentales o industriales de hidrocarburos y sus derivados (incluyendo combustible, gasolina y diésel), contaminación de aguas portuarias y entornos marinos, contaminación de suelos y aguas subterráneas, entre otros.

Agradecimientos

El presente trabajo fue realizado con fondos del Subsidio PID 2023 (código 80020220100022UM) de la Universidad de Morón.

Referencias bibliográficas

- Brutti, L. N., Beltran, M. J., & García de Salamone, I. (2018). Biorremediación de los recursos naturales. Ediciones INTA. Buenos Aires, Argentina.
- Bushnell, L. D., & Haas, H. F. (1941). The utilization of certain hydrocarbons by microorganisms. *Journal of bacteriology*, 41(5), 653-673.
- Collins, C. H., & Lyne, P. M. (1989). Métodos microbiológicos. In *Métodos microbiológicos* (pp. 524-524). España: Acribia, Editorial, S.A.
- Das, N., & Chandran, P. (2011). Microbial degradation of petroleum hydrocarbon contaminants: an overview. *Biotechnology research international*, 2011(1), 941810.
- del Refugio Castañeda-Chávez, M., López-Sánchez, B. Y., Reyes-Velázquez, C., Lango-Reynoso, F., & Lizardi-Jiménez, M. A. (2022). Identificación de especies dominantes en un consorcio microbiano eficiente en la degradación de diésel. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 38, 155-167.
- Di Martino, C., López, N. I., & lustman, L. J. R. (2012). Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 67, 15-20.
- Eweis, J. B. (1999). Principios de biorrecuperación, tratamientos para la descontaminación y regeneración de suelos y

aguas subterráneas mediante procesos biológicos y físico químicos.

- Finette, B. A., Subramanian, V., & Gibson, D. T. (1984). Isolation and characterization of *Pseudomonas putida* PpF1 mutants defective in the toluene dioxygenase enzyme system. *Journal of bacteriology*, 160(3), 1003-1009.
- García-Cruz, N. U., & Aguirre-Macedo, M. L. (2014). Biodegradación de petróleo por bacterias: algunos casos de estudio en el Golfo de México. Golfo de México: Contaminación e Impacto Ambiental, Diagnóstico y Tendencias; Botello, AV, Rendón von Osten, J., Benítez, JA, Gold-Bouchot, G., Eds, 641-652.
- González, J. G., Heredia, D. P., & Rodríguez, R. (2019). Biorremediación de hidrocarburos en aguas residuales con cultivo mixto de microorganismos: caso Lubricadora Puyango. *Enfoque UTE*, 10(1), 185-196.
- Loera-Valenzuela, P. B., Pérez-Flores, S., López-Ortiz, C. E., Balagurusamy, N., & Luévanos-Escareño, M. P. (2016). Biodegradación de compuestos aromáticos. *Rev. Iberoamericana de Ciencias*, 3(7), 39-51.
- Lozano-Mahecha, R. A., & López-López, K. (2022). Aislamiento y caracterización de bacterias endémicas colombianas con capacidad de degradar tolueno. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 24(1), 6-18.
- Mac Faddin, J. F. (1984). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 2a ed. México: Médica Panamericana.
- Madigan, M. T. (2015). Brock: biología de los microorganismos. España: Pearson Educación.
- Murray P.R., Baron, Pfaller, Tenover and Tenover. (1999). Manual of clinical microbiology, 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- Olsen, R. H., Kukor, J. J., & Kaphammer, B. (1994). A novel toluene-3-monoxygenase pathway cloned from *Pseudomonas pickettii* PKO1. *Journal of bacteriology*, 176(12), 3749-3756.
- Parales, R. E., Ditty, J. L., & Harwood, C. S. (2000). Toluene-degrading bacteria are chemotactic towards the environmental pollutants benzene, toluene, and trichloroethylene. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(9), 4098-4104.
- Rodríguez-Gonzales, A., Zárate-Villarroe, S. G., & Bastida-Codina, A. (2022). Biodiversidad bacteriana presente en suelos contaminados con hidrocarburos para realizar bio-

rremediación. *Revista de Ciencias Ambientales*, 56(1), 178-208.

- Salleh, A. B., Ghazali, F. M., Rahman, R. N. Z. A., & Basri, M. (2003). Bioremediation of petroleum hydrocarbon pollution.
- Shields, M. S., Montgomery, S. O., Chapman, P. J., Cuskey, S. M., & Pritchard, P. H. (1989). Novel pathway of toluene catabolism in the trichloroethylene-degrading bacterium G4. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(6), 1624-1629.
- Sihag, Shallu, Hardik Pathak, and D. P. Jaroli. «Factors affecting the rate of biodegradation of polyaromatic hydrocarbons.» *International Journal of Pure & Applied Bioscience* 2.3 (2014): 185-202.
- Suárez Medellín, L. P. (2004). Degradación de Tolueno y Xileno por bacterias nativas colombianas y detección de los genes todA y xylB.
- Ugochukwu, U. C., & Fialips, C. I. (2017). Crude oil polycyclic aromatic hydrocarbons removal via clay-microbe-oil interactions: Effect of acid activated clay minerals. *Chemosphere*, 178, 65-72.
- Vandera, E., & Koukkou, A. I. (2017). Bacterial community response to hydrocarbon contamination in soils and marine sediments: a critical review of case studies. *Microbial ecotoxicology*, 185-226.
- Whited, G. M., & Gibson, D. (1991). Separation and partial characterization of the enzymes of the toluene-4-monooxygenase catabolic pathway in *Pseudomonas mendocina* KR1. *Journal of bacteriology*, 173(9), 3017-3020.
- Woolrich Zavaleta, S. L. (2016). *Caracterización de bacterias tolerantes a hidrocarburos aromáticos monocíclicos, BTX (benceno, tolueno y xilol) en la laguna de Mecoacan, Paraiso Tabasco* (Bachelor's thesis).