

# Aislamiento y caracterización de bacterias endémicas colombianas con capacidad de degradar tolueno

## Isolation and characterization of Colombian endemic bacteria capable of degrading toluene

Roxana Andrea Lozano-Mahecha\*, Karina López-López\*\*

DOI: 10.15446/rev.colomb.biote.v24n1.98613

### RESUMEN

Los hidrocarburos aromáticos monocíclicos: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (BTEX), presentes en crudo y refinados de petróleo, hacen parte de los compuestos con más impacto en el medio ambiente y la salud humana, debido a su naturaleza cancerígena, mutagénica y altamente tóxica. Esta investigación tuvo como objetivo obtener y caracterizar bacterias capaces de degradar tolueno. Se realizaron tres muestreos de suelo contaminado con hidrocarburos del Valle del Cauca en tres condiciones: gasolinería, derrame accidental y taller mecánico. Se aislaron bacterias capaces de crecer en tolueno fase vapor como única fuente de carbono y se caracterizaron a nivel morfológico, bioquímico y molecular. Para la caracterización molecular se amplificó, secuenció y analizó con herramientas bioinformáticas el gen ribosomal 16S. Se evaluó la utilización de tolueno directo con concentración al 1% como única fuente de carbono. Se logró aislar 29 bacterias con capacidad de metabolizar tolueno. La caracterización bioquímica y molecular identificó a las bacterias aisladas de suelo contaminado como *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas*. Las bacterias aisladas en el taller mecánico resultaron ser los microorganismos con mejor crecimiento en tolueno como fuente de carbono, poseen un gran potencial para ser utilizadas para fines de biorremediación de suelos y aguas contaminadas con tolueno.

**Palabras Claves:** biodegradación, biorremediación, compuesto xenobiótico, crecimiento, *Pseudomonas*.

### ABSTRACT

Monocyclic aromatic hydrocarbons: benzene, toluene, ethylbenzene, and xylene (BTEX), present in crude oil and refined petroleum products, they are the compounds with a big impact on the environment and human health, due to their carcinogenic, mutagenic, and highly toxic. This research aimed to obtain and characterize bacteria capable of degrading toluene. Three samples of soil contaminated with hydrocarbons were carried out in three different conditions: oil station, accidental oil spill, and mechanical workshop. Bacteria capable of growing in toluene vapor as the unique carbon source were isolated and characterized at a morphological, biochemical, and molecular level. For molecular characterization, the 16S ribosomal gene was amplified, sequenced, and analyzed with bioinformatic tools. The use of direct toluene with 1% concentration as the sole carbon source was evaluated. It was possible to isolate 29 bacteria with the capacity to metabolize toluene. Biochemical and molecular characterization identified bacteria isolated from contaminated soil as *Pseudomonas* and *Stenotrophomonas*. The isolated strains in the mechanical workshop were the mi-

\* Ingeniera ambiental, Magister en Ciencias Biológicas, Grupo IPMA Interacción Planta Microorganismo Ambiente, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, Carrera 32 No. 12 - 00, Palmira, Valle, Colombia. Email: roalozanoma@unal.edu.co. ORCID: 0000-0001-9837-151X

\*\* Ingeniera bioquímica, Doctora en Ciencias en Biotecnología de plantas, Grupo IPMA Interacción Planta Microorganismo Ambiente, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia sede Palmira, Carrera 32 No. 12 - 00, Palmira, Valle, Colombia. Email: klopezl@unal.edu.co. ORCID: 0000-0003-3623-4725

microorganismos con el mejor crecimiento en tolueno como fuente de carbono, tienen un gran potencial para ser utilizados en la biorremediación de suelos y aguas con contaminación por tolueno.

**Keywords:** biodegradación, biorremediación, crecimiento, *Pseudomonas*, compuestos xenobióticos.

**Recibido:** septiembre 9 de 2021      **Aprobado:** abril 18 de 2022

## INTRODUCCIÓN

Entre los hidrocarburos aromáticos, los hidrocarburos monocíclicos: benceno, tolueno, etilbenceno y xileno (comúnmente denominados BTEX) se han considerado como los principales contribuyentes en el deterioro del agua y el aire (El-Naas, Acio, & El Telib, 2014). En comparación con otros hidrocarburos, los BTEX tienen una solubilidad en agua considerablemente mayor (Faizal *et al.*, 2005). La solubilidad en agua es un factor esencial que determina el destino y el transporte de estos compuestos en el subsuelo; en el caso de los BTEX, su solubilidad les permite viajar fácilmente desde derrames o filtración de tanques de almacenamiento a aguas subterráneas mediante procesos de advección y dispersión, y de ahí a fuentes de agua potable (Ahmed, Sik Ok, Jeon, & Ra, 2019; Hazrati *et al.*, 2016). De acuerdo con la OMS, estos compuestos son considerados neurotóxicos y mutagénicos en la salud humana (Baghania *et al.*, 2017); y la Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA, por sus siglas en inglés) los ha categorizado como uno de los contaminantes prioritarios para la salud humana y medio ambiente (Na, Moon, & Kim, 2005).

En condiciones favorables, algunos microorganismos presentes en los ecosistemas contaminados tienen la capacidad de utilizar ciertos compuestos orgánicos tóxicos, incluyendo los BTEX, 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; Kuhad & Gupta, 2009). Actualmente, se ha identificado gran variedad de bacterias que pueden degradar BTEX bajo condiciones aerobias, bacterias del género *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Auriginosus*, *Comamonas*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Terrimonas*, *Rhodococcus*, *Candida* (Dellagnezze, Gomes, & Maia de Oliveira, 2018; Claro *et al.*, 2018; Khodaei *et al.*, 2017).

Para la degradación aerobia de BTEX, se usa como compuesto modelo al tolueno, ya que es el compuesto de más fácil transformación debido a la presencia de su grupo sustituyente en el anillo, lo cual ofrece una ruta alternativa de ataque en la cadena lateral u oxidación del anillo aromático (El-Naas, Acio, & El Telib, 2014). Existen cinco rutas metabólicas aeróbicas encontradas en bacterias para la degradación de tolueno, estas rutas son TOD, TOL, TOM, TBU y TMO (Ramos *et al.*, 2004). La mayoría de las vías enzimáticas tienen la capacidad de transformar no solo tolueno, sino entre tres a cinco compuestos hidrocarbonados diferentes (Nagarajan & Loh, 2015).

Con el propósito de obtener microorganismos con capacidad de degradar compuestos xenobióticos peligrosos como el tolueno, en este estudio, se aislaron y caracterizaron bacterias endémicas colombianas con capacidad de utilizar este compuesto como única fuente de carbono.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Reactivos químicos y medios de cultivo*

La fuente de carbono principal de este estudio fue tolueno (Merk, USA). Los medios de cultivo utilizados fueron; Medio mineral Caldo Bushnell-Haas (BH) (Bushnell & Haas, 1941) compuesto por  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1g/L,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  1 g L<sup>-1</sup>,  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  1 g/L,  $\text{MgSO}_4$  0,2 g/L,  $\text{FeCl}_3$  0,05 g/L y  $\text{CaCl}_2$  0,02 g/L de la marca Himedia. Para la preparación de medio sólido para crecimiento de bacterias en cajas Petri se le añadió agar-bacto a una concentración de 15 g/L al medio BH; Medio Luria Bertani (LB) compuesto por triptona 10 g/L, extracto de levadura 5 g/L y cloruro de sodio 5 g/L de la marca Pronadisa. Adicionalmente, se usó medio LB agar, con la misma composición más 15 g/L de agar de la marca BF Biosciences.

### *Muestreo de suelos contaminados con hidrocarburos*

Las muestras de suelo contaminado fueron obtenidas en tres lugares contaminados con hidrocarburos del departa-

tamento Valle del Cauca, Colombia, estos muestreos fueron realizados entre los meses noviembre 2018 a febrero 2019. Muestreo en el municipio de San Pedro (3°59'N, 76°13'W), realizado en las riberas de la quebrada Arrieta donde en el año 2012, se derramó más de 25.000 galones de gasolina a causa de un atentado terrorista a un poliducto de la empresa Ecopetrol; muestreo realizado en Palmira, Vía Candelaria (3° 30'N, 76° 18'W), en una estación de servicio con venta de gasolina, Diesel y ACPM; muestreo realizado en Cali (3° 28'N, 76° 30'W), en taller mecánico informal que repara los automóviles en el andén y jardín contiguo. En cada lugar de muestreo se tomaron 15 g de suelo superficial a 10 cm de profundidad. La colecta contó con el permiso Otrósí No.16 (17 de septiembre de 2018) al Marco del Contrato de Acceso a Recursos Genéticos y sus Productos Derivados No. 121 del 22 de enero de 2016.

Las muestras se almacenaron en bolsas plásticas estériles y fueron transportadas al laboratorio de Sanidad y Microbiología Agrícola de la Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, donde fueron tamizadas para retirar piedras, animales y material orgánico. Posteriormente, las muestras fueron correctamente rotuladas y almacenadas en tubos falcón estériles de 50 mL a 4°C, hasta su utilización.

#### *Aislamiento de bacterias con capacidad de degradar tolueno*

Las muestras de suelo fueron puestas a aclimatación disponiéndose en matraz de 250 mL, con tolueno fase vapor, se adicionó 1 mL del hidrocarburo en una burbuja de vidrio al interior del matraz, el tolueno se evapora y entra en contacto con la muestra (ver Figura 1). Las muestras, se llevaron a incubación con agitación orbital por 8 días, a una temperatura de 28 °C. Después de la aclimatación, se tomaron 4 g de cada muestra de suelo y se mezclaron homogéneamente con 8 mL de agua destilada estéril. A partir de esta solución se tomó 3 mL de sobrenadante para una dilución del 10% en 27 mL del medio Bushnell-Hass (BH), en matraz de 250 mL con tolueno fase vapor y se llevó a incubación con agitación durante 5 días, a una temperatura promedio de 28 °C. Posteriormente, se realizó transferencia de 3 mL de cultivo a 27 mL de medio fresco de BH con tolueno fase vapor, dispuesto en burbujas dentro del matraz, se llevó a incubar a temperatura de 28 °C, con agitación durante dos días. Pasadas las 48 horas, nuevamente 3 mL de

cultivo se pasaron a 27 mL de medio BH fresco con tolueno fase vapor, y se llevó a incubar a las mismas condiciones, otras 48 h (Figura 1). Finalmente, diluciones seriadas del segundo cultivo se sembraron en placas de agar BH y se incubaron en un desecador de tapa hermética con un vaso de precipitado que contenía tolueno líquido, a una temperatura de 28 °C durante 48 h. Las colonias seleccionadas fueron sembradas nuevamente en medio líquido para confirmar la utilización de tolueno. Las bacterias con capacidad de utilizar tolueno fueron almacenadas en glicerol al 30% a -20 °C. Se utilizó como control negativo, una inoculación en matraz que contenía medio fresco BH sin tolueno fase vapor.

#### *Ensayos de crecimiento de bacterias en tolueno directo*

Las bacterias aisladas de cada lugar de muestreo: Palmira, San Pedro, Cali, se colocaron en matraces con caldo BH y tolueno fase vapor, durante 48 h, con agitación y a una temperatura de 28 °C. Pasados las 48 horas, se tomaron de este cultivo 300 µL para cada réplica, y se realizó una dilución de 1/100 en 3 mL de medio BH con tolueno directo, a una concentración del 1%, en tubos



**Figura 1.** Matraz Erlenmeyer con burbuja de vidrio incrustada en la tapa de plástico, utilizado en los experimentos de tolueno fase vapor como fuente de carbono. El tolueno se adiciona a la burbuja que porta un hueco por donde el tolueno se evapora y entra en contacto con el medio de cultivo /suelo, dependiendo del ensayo a realizar.

de vidrio capacidad 15 mL. Los cultivos fueron incubados en un equipo con agitación orbital, a 28 °C por 48 h. El crecimiento se analizó por la aparición de turbidez, medida a una densidad óptica OD a 600 nm empleando el equipo espectrofotómetro Spectroquant Pharo 300 de Merck. Los cultivos se realizaron en triplicado y con control negativo sin inóculo. El nivel alto de absorbancia fue el criterio de evaluación para el crecimiento de los microorganismos en el medio BH usando tolueno como única fuente de carbono.

#### *Caracterización fenotípica*

Se evaluaron las características morfológicas y bioquímicas de las bacterias aisladas en medio LB después de 48 h de incubación a 28°C. Para la evaluación de las bacterias se tomó de base el Manual de Bergey's® (Palleroni, 2015; Garrity, Bell, & Lilburn, 2005). En cuanto a morfología de colonias, se detalla forma, tamaño, color, consistencia. Se realizaron pruebas bioquímicas como: tinción de Gram, catalasa, motilidad, agar lisina-hierro (LIA), urea, gelatina, utilización de carbohidratos (glucosa, sacarosa, lactosa, manitol), crecimiento en medio salino (1%, 5%, 20%) y medio King B (KB) (Al-Dhabaan, 2019).

#### **Caracterización genotípica**

##### *Amplificación, secuenciación y análisis bioinformático del gen ribosomal 16S*

Inicialmente se extrajo el DNA mediante una lisis rápida (Green & Sambrook, 2001). Para la caracterización molecular, se utilizó el análisis del gen ribosomal 16S, donde se amplificó por PCR un fragmento de 1.5 kb empleando los siguientes cebadores: 16S-1492R (5'-GGY-TAC-CTT-GTT-ACG-AC-TT-3') y 16S-27F (5'-AGA-GTT-TGA-TCM-TGG-CTC-AG-3'). La mezcla de reacción del PCR se realizó en 25 µl, cada compuesto tuvo la siguiente concentración final: 1X de tampón de amplificación Taq, 5mM de mezcla de dNTP, 5 mM de cebador directo 16S-1492R, 5 mM de cebador inverso 16S-27F y 1 U de ADN polimerasa Taq. Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 96°C, 3 min; y 25 ciclos de amplificación de desnaturalización a 96°C, 30 s; alineamiento 65°C, 1 min; extensión 72°C, 2 min; extensión final 72°C durante 10 min (Faizal *et al.*, 2005). Los productos de PCR se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% con buffer TAE 1X (Tris- Acetato-EDTA), y tinción

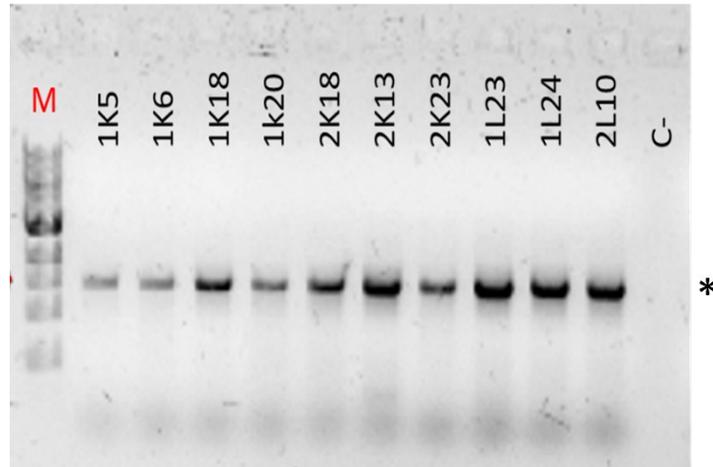
de bromuro de etidio (10 ng/µL) y se purificaron con el Kit Promega Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System empleando el protocolo del fabricante. Posteriormente, se enviaron a secuenciar por el método de Sanger a la empresa Macrogen en Corea del Sur. Para el envío de las muestras se obtuvo el Permiso de Exportación de Especímenes de Diversidad Biológica No. 01649 de la Autoridad Nacional de Licencias Ambientales (ANLA).

Las lecturas de secuenciación del gen ribosomal 16S de cada bacteria fueron ensambladas en el programa CLC Main Workbench v7.0 (Qiagen®). Las secuencias de nucleótidos obtenidas se analizaron contra las secuencias depositadas en la base de datos 16S ribosomal RNA (Bacteria and Archaea) de GenBank empleando el programa *Nucleotide Blast* (Blastn) disponible a través del Centro Nacional de Biotecnología (NCBI). Para encontrar las relaciones filogenéticas de las bacterias aisladas, se realizó un árbol filogenético utilizando el método del vecino más cercano (Neighbor Joining-NJ) mediante el software MEGA X (Kumar, Stecher, & Tamura, 2016). La validez de las relaciones filogenéticas representadas en los árboles obtenidos fue analizada estadísticamente utilizando el método del Bootstrap con 1000 repeticiones.

## **RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### *Aislamiento de bacterias con capacidad de metabolizar tolueno*

Las bacterias aisladas se cultivaron en medios con tolueno fase vapor como única fuente de carbono para su crecimiento, replicación y supervivencia. Se aislaron 35 cepas en cada lugar de muestreo; derrame por atentado -San Pedro, Gasolinera- Palmira, Taller mecánico-Cali. De las colonias crecidas en las placas suplementadas con tolueno, se eligieron 9 o 10 colonias individuales por cada lugar de muestreo, basados en su crecimiento en BH agar con tolueno vapor, se lograron aislar un total de 29 colonias. Las colonias fueron nombradas como: 3A16, 1B12, 3A8, 1A4, 1A17, 3B4, 3A21, 3B8, 2X16 y 1X3 para las aisladas del lugar de derrame; 1K6, 2K23, 1K20, 2L10, 2K12, 2K13, 1K18, 1K5, 1L24, 1L23 para las aisladas en la gasolinera y 2D13, 6V1R, 6V5R, 6V13, 6V14R, 2V25, 6V10, 6V25, 6V7 para las aisladas en el Taller mecánico.



**Figura 2.** Amplificación del gen ribosomal 16S en 10 bacterias que metabolizan tolueno aisladas en Gasolinería. Se amplificó un fragmento de 1,5 kb empleando los cebadores universales 16S-1492R / 16S-27F y se visualizó en un gel de agarosa al 0,8%. M, marcador de peso molecular Ladder de Biolabs New England. C- representa el control negativo. El asterisco indica el tamaño de 1,5 kb.

#### *Identificación morfológica y bioquímica de las bacterias aisladas*

Las bacterias aisladas fueron agrupadas en G1, G2 y G3 de acuerdo con sus diferencias morfológicas y bioquímicas (Tabla 1).

El grupo G3, donde se agruparon las diez aisladas de la gasolinería, las diez aisladas del lugar del atentado y la cepa 2D13 aislada del taller mecánico, se identificaron como bacilos Gram-negativos. Las colonias en la placa de agar LB fueron medias, circulares irregulares, planas, de bordes regulares, consistencia cremosa, color amarillo tenue. Las pruebas bioquímicas mostraron que son móviles, aerobias estrictas, con resultado positivo para catalasa, motilidad y descarboxilación de la lisina, crecimiento en medio salino (1% y 5% NaCl), utilización del carbohidrato glucosa, lactosa y sacarosa y capacidad de producir pigmentos en medio King B. Este medio es selectivo para *Pseudomonas*, pues esta especie tiene la capacidad de producir pigmentos como pioverdina (fluoresceína) y piocianina. La capacidad de hidrolizar gelatina, ureasa y la producción de sulfuro resultó negativa. El grupo G1, donde se dispuso a la bacteria 6V25 y 2V25 del muestreo del taller, fueron identificadas como bacilo Gram-negativos, colonias circulares irregulares, planas, circulares de bordes regulares, consistencia cre-

mosa y color blanco. Las pruebas bioquímicas mostraron que a diferencia del grupo G3, las bacterias del G1 tuvieron un resultado positivo para producción de ureasa. Finalmente, el grupo G2 compuesto por las cepas 6V5R, 6V7, 6V1R y 6V1R de taller mecánico, presentaron diferencias bioquímicas al no utilizar el carbohidrato lactosa y sacarosa y no tener crecimiento en medio salino 5% NaCl.

#### *Identificación molecular de bacterias aisladas*

Para conocer la identidad de cada bacteria previamente aislada de suelos contaminados con hidrocarburos, se realizó la amplificación y secuenciación de un fragmento de 1,5 kb del gen ribosomal 16S (Figura 2).

Se obtuvieron secuencias de nucleótidos del gen ribosomal 16S entre 1337 - 1417 bp de longitud. El análisis de la secuencia genética con Blastn mostró que todas las bacterias aisladas de la gasolinería presentaron la mayor identidad (99,7%) con *Pseudomonas taiwanensis* DSM 21245 (NR\_116172) (Wang *et al.*, 2010). Del lugar de derrame se identificaron bacterias con porcentajes de identidad altos a tres especies diferentes de *Pseudomonas*: 3A16 y 3B8 con porcentajes de identidad superior a 99,9% a *Pseudomonas plecoglossicida* NBR 103162 (Nakagawa *et al.*, 2013); las cepas 1A4, 1A17, 3A8,

**Tabla 1.** Caracterización morfológica y bioquímica de aislamientos bacterianos que utilizan tolueno como fuente de carbono.

PRUEBA		G1	G2	G3
Forma de la Colonia		Circular de borde regular	Circular de borde regular	Circular de borde regular
Elevación de la Colonia		Plana	Plana	Plana
Consistencia		Cremosa	Cremosa	Cremosa
Color		Blanca mate	Ligeramente Amarilla	Ligeramente Amarilla
Crecimiento a 28 °C		+	+	+
Crecimiento a 37 °C		+	+	+
Crecimiento a 42 °C		+	+	+
Forma		Bacilos	Bacilos	Bacilos
Tinción de Gram		-	-	-
KOH		+	+	+
Oxido Fermentación	Oxidación (O)	+	+	+
	Fermentación (F)	-	-	-
Motilidad		+	+	+
Catalasa		+	+	+
NaCl	1%	+	+	+
	5%	+	-	+
	20%	-	-	-
Voges Proskauer		-	-	-
Descarboxilación Lisina		+	+	+
King A		-	-	-
King B		*+	+	+
Gelatinasa		-	-	-
Ureasa		+	-	-
Utilización de glucosa/gas		+/-	+/-	+/-
Utilización de Sacarosa/gas		+ <sup>p</sup> /-	-/-	+ <sup>p</sup> /-
Utilización de lactosa/gas		+ <sup>p</sup> /-	-/-	+ <sup>p</sup> /-
Utilización de manitol/gas		-/-	-/-	-/-
Utilización de galactosa/gas		-/-	-/-	-/-
Producción de H <sub>2</sub> S (LIA)		-	-	-

+, crecimiento; -, no crecimiento: +<sub>p</sub>, crecimiento ligero

3A21, 1B12, 1X3 y 2X16 con porcentajes de 99,4% con *Pseudomonas taiwanensis* DSM 21245, y finalmente, la cepa 3B4 tuvo una identidad de 98,99% a *Pseudomonas resinovorans* strain\_ATCC\_14235 (NR\_112062) (Anzai et al., 2000). Para las bacterias aisladas del taller mecánico, se encontraron porcentajes altos de identidad, 99,35%, con *Pseudomonas plecoglossicida* NBR 103162, para las cepas 6V13, 6V5R, 6V7 y 6V1R; identidades de 99,2% con *Pseudomonas taiwanensis* DSM 21245 para las cepas 6V10, 6V14 y 2D13; y por último, identidades

de 99,64% con *Stenotrophomonas maltophilia* strain lam 12423 (Tanaka, Miyazaki, & Sugawara, 2011) para las cepas 6V25 y 2V25.

El análisis de la secuencia de nucleótidos del gen ribosomal 16S no permitió la identificación a nivel de especie de las bacterias aisladas en este trabajo, por lo que fueron denominadas *Pseudomonas* sp. y *Stenotrophomonas* sp. Las secuencias del gen ribosomal 16S obtenidas de cada bacteria fueron subidas a la base de datos Gen-

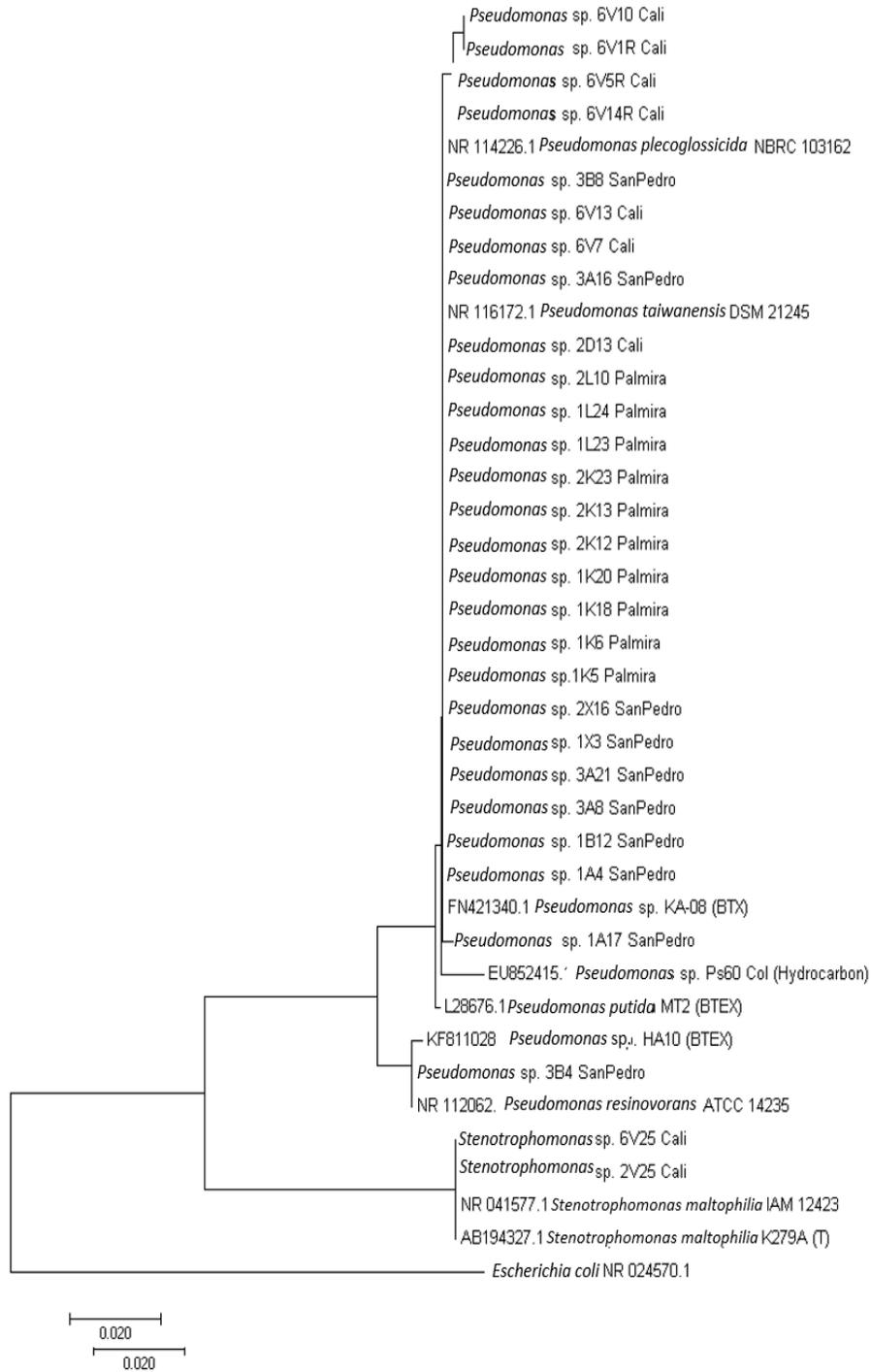
Bank con los siguientes números de accesoión: *Pseudomonas* sp. 2K12 (GenBank OM757847), *Pseudomonas* sp. 2K18 (OM757848), *Pseudomonas* sp. 1K20 (OM757849), *Pseudomonas* sp. 1K5 (OM757850), *Pseudomonas* sp. 1K6 (OM757851), *Pseudomonas* sp. 1L23 (OM757852), *Pseudomonas* sp. 1L24 (OM757853), *Pseudomonas* sp. 2K13 (OM757854), *Pseudomonas* sp. 2K23 (OM757855), *Pseudomonas* sp. 2L10 (OM757856), *Pseudomonas* sp. 1A17 (OM757857), *Pseudomonas* sp. 1A4 (OM757858), *Pseudomonas* sp. 1B12 (OM757859), *Pseudomonas* sp. 1X3 (OM757860), *Pseudomonas* sp. 2X16 (OM757861), *Pseudomonas* sp. 3A16 (OM757862), *Pseudomonas* sp. 3A21 (OM757863), *Pseudomonas* sp. 3A8 (OM757864), *Pseudomonas* sp. 3B4 (OM757865), *Pseudomonas* sp. 3B8 (OM757866), *Pseudomonas* sp. 2D13 (OM757867), *Stenotrophomonas* sp. 2V25 (OM757868), *Pseudomonas* sp. 6V10 (OM757869), *Pseudomonas* sp. 6V13 (OM757870), *Pseudomonas* sp. 6V14R (OM757871), *Pseudomonas* sp. 6V1R (OM757872), *Stenotrophomonas* sp. 6V25 (OM757873) *Pseudomonas* sp. 6V5R (OM757874) y *Pseudomonas* sp. 6V7 (OM757875).

El resultado arrojado por el análisis molecular del gen ribosomal 16S está relacionado con el resultado obtenido de las pruebas bioquímicas. Las bacterias aisladas que fueron agrupadas con el grupo G3 en la caracterización bioquímica, estuvieron relacionadas con *P. taiwanensis* en la identificación molecular, también la cepa 3B4 relacionada con *P. resinovorans* se agrupó en G3 de acuerdo con su respuesta a las pruebas bioquímicas. Las cepas 6V25 y 2V25, obtuvieron una identidad del 100% entre ellas y 99,636% de identidad con *S. maltophilia*, tuvieron diferencias bioquímicas y por eso se agruparon en G1 en su análisis. Todas las bacterias relacionadas con *P. plecoglossicida* del taller mecánico, se agruparon en el grupo G2, sin embargo, las cepas relacionadas con esta misma especie en el lugar de derrame no presentaron el mismo comportamiento bioquímico, se puede inferir entonces que a pesar de su alta identidad en el gen ribosomal 16S, los demás genes que codifican sus rutas metabólicas son diferentes. Esto indica que se requiere analizar a nivel molecular las rutas metabólicas de degradación de tolueno de cada bacteria, así como su capacidad de metabolizar otros compuestos xenobióticos (BTEX).

Se han reportado cepas de *P. taiwanensis* que contienen un gen que codifica para una proteína de la familia de proteínas de membrana de transporte de la membrana externa (OMPP1 / FadL / TodX), que participan en el catabolismo del tolueno y la degradación de hidrocarburos aromáticos (WP\_013971392.1), esta secuencia genética se ha observado en varias cepas de *Pseudomonas* como *P. monteilii*, *P. plecoglossicida*, *P. putida* entre otras. Hasta la fecha, se conoce que *P. taiwanensis*, puede utilizar una amplia gama de fuentes de carbono, en los que se incluyen alcoholes de cadena corta y media y tolerancia a solventes como octanol, estireno y tolueno (Park, Bühler, Panke, Witholt, & Schmid, 2007). La información genética disponible sugiere un espectro de tolerancia aún más amplio al poseer proteínas de membrana homólogas a dos proteínas bombas de eflujo de solvente orgánico bien caracterizadas, TtgABC y TtgGHI (Köhler et al., 2013), estas proteínas también han sido encontradas en el genoma de algunas cepas de *P. plecoglossicida* y *P. resinovorans* (QLB53749.1; AJG15514.1; AXM96879.1).

Para evaluar las relaciones filogenéticas de las bacterias aisladas, se construyó un árbol filogenético (Figura 3), mediante el método Neighbor-Joining, incluyéndose varias especies degradadoras de hidrocarburos, especialmente BTEX, reportadas en la literatura. Las bacterias cercanas a *P. plecoglossicida* y *P. taiwanensis* estuvieron estrechamente relacionadas a *Pseudomonas* sp. KA-08, esta bacteria que probó ser capaz de degradar benceno, tolueno y xileno, y tolerar dichos compuestos en altas concentraciones (Di Martino, López, & Raiger lustman, 2012). También tuvieron relación con *Pseudomonas* sp. PS60, una bacteria aislada en Casanare- Colombia, con capacidad de degradar hidrocarburos en consorcios bacterianos (Lozano et al., 2008).

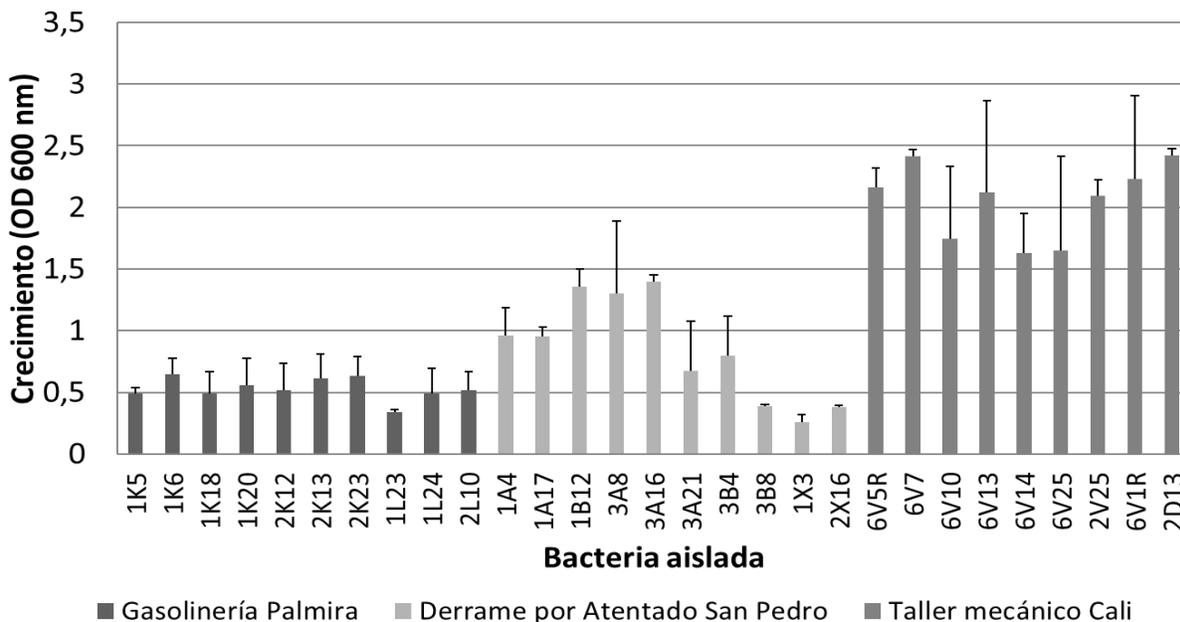
En el árbol filogenético, la bacteria *Pseudomonas* sp. 3B4 cercana a *P. resinovorans* ATCC 14235 (identidad 99,9%), se ubicó en una rama diferente a las bacterias aisladas identificadas como cercanas a *P. taiwanensis* y *P. plecoglossicida*. Este resultado va de acuerdo con lo reportado en el manual de Bergey's, ya que *P. resinovorans* pertenece al grupo de *P. aeruginosa* (Garrity, Bell, & Lilburn, 2005) diferente a las demás aisladas pertenecientes al grupo de *P. putida*. La bacteria *Pseudomonas*



**Figura 3.** Árbol filogenético obtenido a partir de las secuencias del gen que codifica para el RNA ribosomal 16S, mediante el método Neighbor-Joining. La bacteria *Escherichia coli* (Número de accesoión NR 024570) se usa como grupo externo.

sp. 3B4 mostró cercanía con la cepa reportada en la literatura, *Pseudomonas* sp. HA10 con un porcentaje de identidad del 97%, esta cepa tiene la capacidad de de-

gradar BTEX (Hassan & Aly, 2018). Adicionalmente se ha encontrado que *P. resinovorans*, tiene capacidad de degradar eugenol, un miembro de los compuestos de la



**Figura 4.** Crecimiento de bacterias aisladas con tolueno directo como fuente de carbono 1%. Las barras muestran el promedio obtenido para cada bacteria y la línea la desviación estándar.

clase alilbencenos, para producir vainilla y ácido vanílico (Ashengroph *et al.*, 2011; Hong *et al.*, 2017).

*Stenotrophomonas maltophilia* y las bacterias de este estudio cercanas a esta especie, *Stenotrophomonas sp.* 2V25 y *Stenotrophomonas sp.* 6V25, se encuentran en una rama distinta a la de las demás bacterias, identificadas como *Pseudomonas*. *S. maltophilia* es capaz de degradar compuestos aromáticos sulfónicos, herbicidas (ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico), compuestos BTEX y benzoatos (Palleroni, 2015). *S. maltophilia* K279A reportada en la literatura cercana a *Stenotrophomonas sp.* 2V25 y *Stenotrophomonas sp.* 6V25, con un porcentaje de identidad del 99,9% mostró capacidad para degradar tolueno, benceno y otros hidrocarburos (Mukherjee & Roy, 2013).

#### Crecimientos de bacterias en medio suplementado con tolueno directo 1%

Al analizar el comportamiento de las bacterias aisladas en tolueno directo como fuente de carbono, todas las bacterias aisladas en el taller mecánico obtuvieron valores superiores a las aisladas del lugar del derrame por

atentado y la gasolinería. Se obtuvo un crecimiento mayor al 1,600 de absorbancia (densidad óptica 600 nm) para todas las aisladas del taller, siendo *Pseudomonas sp.* 2D13, *Pseudomonas sp.* 6V7 y *Pseudomonas sp.* 6V1R las bacterias que obtuvieron mayor crecimiento: 2,419, 2,418 y 2,227 respectivamente. Mientras que, para las aisladas en el lugar de atentado, se presentaron densidades ópticas entre 1,390 a 0,240, siendo el mayor crecimiento de *Pseudomonas sp.* 3A16, *Pseudomonas sp.* 1B12 y *Pseudomonas sp.* 3A8; *Pseudomonas sp.* 1,396, *Pseudomonas sp.* 1,359 y 1,303. Las aisladas de la gasolinería tuvieron los crecimientos más bajos, inferiores a 0,650, siendo *Pseudomonas sp.* 1K6 la que mostró mayor crecimiento (0,648) (Figura 4).

El género *Pseudomonas* se ha reportado en la literatura como uno de los géneros con mayor adaptación genética para la metabolización de tolueno (Hendrickx *et al.*, 2006; Tan, Tang, & Joannou, 1993). Bacterias del género *Stenotrophomonas* como las cepas *Stenotrophomonas sp.* 6V25 y *Stenotrophomonas sp.* 2V25, ya han sido reportadas como capaces de crecer en un medio de sal

mineral que contenga tolueno y benceno como únicas fuentes de carbono (Mukherjee & Roy, 2013; Bashandy, Abd-Alla, & Dawood, 2020). También se ha reportado su capacidad para degradar fenol, cloroformo, tricloroetileno (TCE) (Patel & Patel, 2020).

Es probable que este crecimiento de las bacterias del taller mecánico se deba a que es el sitio de muestreo con mayor probabilidad de contaminación por hidrocarburos proveniente de gasolina, aceite de motor y lubricantes usados por el personal del lugar. El montallantas es informal, no cuenta con las regulaciones y normativas apropiadas para el uso y manejo de estos compuestos y sus desechos, como si lo tiene la gasolinera de la ciudad de Palmira. El suelo del muestreo ha estado expuesto a estos hidrocarburos en forma de vapor y líquidos alrededor de varios años, mismo tiempo que lleva en funcionamiento el taller mecánico, adicionalmente frente al taller mecánico, situada a pocos metros se encuentra una bomba de gasolina que lleva en funcionamiento más de 8 años (información suministrada por la comunidad del sector). Estos resultados confirman que la exposición repetida o constante a productos derivados del petróleo en un lugar, generalmente aumenta la capacidades y posibilidad adaptativa de los microorganismos y, a su vez aumenta la tasa de degradación al ser expuestos nuevamente un compuesto (Martinez *et al.*, 2015). Los talleres automotriz y cambio de aceite, son ampliamente utilizados para el aislamiento de microorganismos con capacidades de degradar hidrocarburos (Delgadillo-Ordoñez *et al.*, 2017).

Si bien las cepas aisladas del derrame en San Pedro, no obtuvieron resultados tan altos como los reportados en las aisladas del taller mecánico, se pudieron observar densidades ópticas superiores a 1,000 (OD 600 nm). Es importante resaltar que la emergencia por contaminación en este lugar fue un evento fortuito ocurrido en el año 2012, siete años antes de la fecha de muestreo, en fechas posteriores no se reportó en este municipio otro incidente de tal magnitud. Sin embargo, se encontraron en este ensayo, valores de crecimiento altos para algunas bacterias, se infiere que, a pesar del paso de los años, los microorganismos que lograron sobrevivir y

adaptarse a la emergencia, replicaron en su descendencia la información genética requerida para la metabolización del tolueno, quedando así a disposición de las bacterias en el momento que las condiciones ambientales pudieran repetirse. Se conoce que la adición de hidrocarburos en un ecosistema da lugar a cambios en el tamaño y la composición de la comunidad microbiana. Además, en los lugares con derrames de hidrocarburos en donde no se realiza extracción o mitigación física del hidrocarburo contaminante, el proceso de degradación microbiana es el mecanismo principal para la eliminación de hidrocarburos derramados (Benka-Coker & Ekundayo, 1997). Chaerun *et al.*, 2004, estudiaron el comportamiento de bacterias con capacidad de degradar hidrocarburos en lugares donde ha habido eventos accidentales de derrame de hidrocarburos, 5 años después del acontecimiento, encontrando que la morfología, la población de las bacterias y su capacidad para degradar los hidrocarburos no presentaba diferencias significativas al compararlos con los datos iniciales en el año del derrame.

## CONCLUSIÓN

En este estudio, se han aislado y caracterizado bacterias de los géneros *Pseudomonas* y *Stenotrophomonas* con capacidad de crecer y metabolizar tolueno, compuesto xenobiótico modelo para la degradación de los BTEX. Presentándose los mayores crecimientos en las bacterias aisladas de un taller mecánico informal, lugar donde las aisladas están en constante exposición a la contaminación de hidrocarburos, dado por la manipulación humana de aceites, gasolina y lubricantes. Las bacterias encontradas en este estudio pueden ser utilizadas en un futuro en consorcios bacterianos para procesos de remediación en suelos y aguas contaminadas.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional de Colombia sede Palmira por la financiación parcial de este trabajo de investigación con el proyecto código Hermes 39623, a Colciencias por el apoyo y financiación bajo la convocatoria Jóvenes Investigadores por la Paz 2017 (código Hermes 38721). Al Mi-

nisterio de Medio Ambiente de Colombia por el permiso ambiental para la colecta de muestras "otroSf No.16" y a la autoridad ambiental ANLA por el permiso de exportación de especímenes de diversidad biológica.

## BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, N., Sik Ok, Y., Jeon, B.-H., & Ra, J. (2019). Assessment of benzene, toluene, ethyl-benzene, and xylene (BTEX) toxicity in soil using sulfur-oxidizing bacterial (SOB) bioassay. *Chemosphere*, 220, 651-657. doi:doi.org/10.1016/j.chemosphere.2018.12.102.
- Al-Dhabaan, F. A. (2019). Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saud Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1247-1252.
- Al-Khalid, T., & El-Naas, M. (2012). Aerobic Biodegradation of Phenols: A Comprehensive Review. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 42(16), 1631-1690. doi:doi/abs/10.1080/10643389.2011.569872.
- Allouch, A., Le Calvé, S., & Serra, C. (2013). Portable, miniature, fast and high sensitive real-time analyzers: BTEX detection. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 182, 446-452. doi:10.1016/j.snb.2013.03.010.
- Anzai, Y., Kim, H., Park, J. Y., Wakabayashi, H., & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 1563-1589.
- Baghania, A., Sorooshianbc, A., Heydaria, M., Sheikha, R., Golbaza, S., Ashournejadd, Q., Shamsavani, A. (2017). A case study of BTEX characteristics and health effects by major point sources of pollution during winter in Iran. *Environmental Pollution*, 247, 607-617. doi:10.1016/j.envpol.2019.01.070.
- Benka-Coker, M. O., & Ekundayo, J. A. (1997). Applicability of evaluating the ability of microbes isolated from an oil spill site to degrade oil. *Environmental Monitoring and Assessment*, 45(3), 259-272. doi:10.1023/a:1005774602112.
- Chicca, I., Becarelli, S., Dartiahl, C., La China, S., De Kievit, T., Petroni, G., Levin, D. (2020). Degradation of BTEX mixture by a new *Pseudomonas putida* strain: role of the quorum sensing in the modulation of the upper BTEX oxidative pathway. *Environmental Science and Pollution Research*, 27, 36203-36214. doi:10.1007/s11356-020-09650-y.
- Claro, E., Cruz, J., Montagnolli, R., Lopes, P., Júnior, J., & Bidoia, E. (2018). Microbial Degradation of Petroleum Hydrocarbons: Technology and Mechanism. En V. Kumar, M. Kumar, & R. Prasad, *Microbial Action on Hydrocarbons* (págs. 125-141). Singapore: Springer.
- de Lorenzo, V. (2006). Blueprint of an oil-eating bacterium. *Nature Biotechnology*, 24(8), 952-953. doi:10.1038/nbt0806-952.
- Delgadillo-Ordoñez, N. C., Posada-Suárez, L., Marcelo, E., Cepeda-Hernández, M. L., & Sánchez-Nieves, J. (2017). Aislamiento e identificación de levaduras degradadoras de hidrocarburos aromáticos, presentes en tanques de gasolina de vehículos urbanos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 19(1), 141 - 151.
- Dellagnezze, B. M., Gomes, M. B., & Maia de Oliveira, V. (2018). Microbes and Petroleum Bioremediation. En V. Kumar, M. Kumar, & R. Prasad, *Microbial Action on Hydrocarbons* (págs. 97-123). Gateway East, Singapore: Springer.
- Di Martino, C. (2015). Estudio de bacterias del género *Pseudomonas* en la degradación de hidrocarburos y síntesis de biosurfactantes: análisis del efecto de los polihidroxialcanoatos (Tesis Doctorado). Buenos Aires, Argentina: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires.
- Di Martino, C., López, N., & Raiger lustman, L. (2012). Isolation and characterization of benzene, toluene and xylene degrading *Pseudomonas* sp. selected as candidates for bioremediation. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 67, 15-20. doi:10.1016/j.ibiod.2011.11.004.
- Donald, J., Hooper, K., & Hopenhayn-Rich, C. (1991). Reproductive and developmental toxicity of toluene: a review. *Environmental Health Perspectives*, 94, 237-244.
- El-Naas, M., Acio, J., & El Telib, A. (2014). Aerobic biodegradation of BTEX: Progresses and Prospects. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 2(2), 1104-1122. doi:10.1016/j.jece.2014.04.009.
- Faizal, I., Dozen, K., Hong, C., Kuroda, A., Takiguchi, N., Ohtake, H., Kato, J. (2005). Isolation and characterization of solvent-tolerant *Pseudomonas putida* strain

- T-57, and its application to biotransformation of toluene to cresol in a two-phase (organic-aqueous) system. *Environmental Biotechnology*, 32, 542–547.
- Farhadian, M., Vachelard, C., & Duchez, D. (2008). In situ bioremediation of monoaromatic pollutants in groundwater: A review. *Bioresource Technology*, 99 (13), 5296-5308.
- Garrity, G., Bell, J., & Lilburn, T. (2005). Class II. Betaproteobacteria class. nov.. En D. Brenner, N. Krieg, & J. Staley, *Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology*. Boston: Springer. doi:10.1007/978-0-387-29298-4\_2.
- Hassan, H. A., & Aly, A. (2018). Isolation and characterization of three novel catechol 2,3-dioxygenase from three novel haloalkaliphilic BTEX-degrading *Pseudomonas* strains. 108, 1107-1114.
- Hazrati, S., Rostami, R., Fazlzadeh, M., & Pourfarzi, F. (2016). Benzene, Toluene, Ethylbenzene and Xylene Concentrations in Atmospheric Ambient Air of Gasoline and CNG Refueling Stations. *Air Quality, Atmosphere and Health*, 9, 403-409.
- Kasahara, Y., Morimoto, H., Kuwano, M., & Kadoya, R. (2012). Genome-wide analytical approaches using semi-quantitative expression proteomics for aromatic hydrocarbon metabolism in *Pseudomonas putida* F1. *Journal of Microbiological Methods*, 91(3), 434-442. doi:10.1016/j.mimet.2012.09.017.
- Khodaei, K., Nassery, H. R., Asadi, M. M., Mohammadzadeh, H., & Mahmoodlu, M. (2017). BTEX biodegradation in contaminated groundwater using a novel strain (*Pseudomonas* sp. BTEX-30). *International Biodeterioration & Biodegradation*, 116, 234-242. doi:10.1016/j.ibiod.2016.11.001.
- Kuhad, R., & Gupta, R. (2009). Biological Remediation of Petroleum Contaminants. En R. Kuhad, & R. Gupta, *Advances in Applied Bioremediation, Soil Biology* (Vol. 17, págs. 173-187). Berlin, Heidelberg: Springer. doi:10.1007/978-3-540-89621-0\_9.
- Kwapisz, E., Wszelaka, J., Marchut, O., & Bieleck, S. (2008). The effect of nitrate and ammonium ions on kinetics of diesel oil degradation by *Gordonia alkaniivorans* S7. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 61(3), 214-222.
- Lacal Romero, J. (2008). Caracterización bioquímica y molecular del sistema de dos componentes TodS/TodT de *Pseudomonas Putida* DOT-T1E. (Tesis de Doctorado). Universidad de Granada, Granada, España.
- Li, Y., Li, F., Ho, C., & Hsiu-Chuan Liao, V. (2008). Construction and comparison of fluorescence and bioluminescence bacterial biosensors for the detection of bioavailable toluene and related compounds. *Environmental Pollution*, 152(1), 123-129.
- Logar, R., & Vodovnik, M. (2007). Techniques: the applications of microbes in environmental monitoring. En A. Méndez-Vilas, *Microbiology: communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology* (págs. 577-585).
- Martinez, J., Jimenez, M., Soto, D., Lomas, M., & Sanchez, S. (2015). Aislamiento y caracterización de bacterias hidrocarburofílicas degradadoras de gasolina y diésel. *Revista de Ciencias Naturales y Agropecuarias*, 2(2), 155-161.
- Martínez-Blanco, H., Reglero, A., Rodríguez-Aparicio, L., & Luengo, J. (1990). Purification and biochemical characterization of phenylacetyl-CoA ligase from *Pseudomonas putida*. *The Journal Biological Chemistry*, 265, 7084-7090.
- Morlett Chavez, J. (2009). Análisis microbiológico y molecular de un consorcio y una cepa bacteriana presente en la biodegradación de los BTEX. Tesis de doctorado. Nuevo León: Universidad Autónoma De Nuevo León.
- Mukherjee, P., & Roy, P. (2013). Persistent Organic Pollutants Induced Protein Expression and Immunocrossreactivity by *Stenotrophomonas maltophilia* PM102: A Prospective Bioremediating Candidate. *BioMed Research International*, 714232. doi:10.1155/2013/714232.
- Na, K., Moon, K., & Kim, Y. (2005). Source contribution to aromatic VOC concentration and ozone formation potential in the atmosphere of Seoul. *Atmospheric Environment*, 39, 5517–5524. doi:10.1016/j.atmosenv.2005.06.005.
- Nagarajan, K., & Loh, K.-C. (2015). Formulation of microbial cocktails for BTEX biodegradation. *Biodegradation*, 26(1), 51–63. doi:10.1007/s10532-014-9715-0.
- Nakagawa, Y., Muramatsu, Y., Miyashita, M., Sugimoto, M., & Yoshino, M. (2013). [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR\\_114226](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_114226). Obtenido de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR\\_114226](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_114226).
- Njobuenwu, D., Amadi, S., & Ukpaka, P. (2005). Dissolution Rate of BTEX Contaminants in Water. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, 83(6), 985-989. doi:doi.org/10.1002/cjce.5450830608.

- Ossai, I. C., Ahmed, A., Hassan, A., & Hamid, F. S. (2020). Remediation of soil and water contaminated with petroleum hydrocarbon: Review. *Environmental Technology & Innovation*, 100526. doi:10.1016/j.eti.2019.100526.
- Palanisamy, N., Ramya, J., Kumar, S., Vasanthi, N., Chandran, P., & Khan, S. (2014). Diesel biodegradation capacities of indigenous bacterial species isolated from diesel contaminated soil. *Journal of Environmental Health Science and Engineering*, 12(142). doi:10.1186/s40201-014-0142-2.
- Palleroni, N. (2015). *Stenotrophomonas*. En Palleroni, & Bradbury, *Bergey's Manual of Systematics of Archaea and Bacteria* (págs. 1–20). doi:10.1002/9781118960608.gbm01237.
- Palleroni, N., & Bradbury, J. (1993). *Stenotrophomonas*, a new bacterial genus for *Xanthomonas maltophilia* (Hugh 1980) Swings *et al.* 1983. *Int J Syst Bacteriol*, 43(3), 606-608. doi:10.1099/00207713-43-3.
- Palomino Felices, S. H. (2009). Microorganismos con capacidad degradativa de aceites Microorganismos con capacidad degradativa de aceites lubricantes usados, aislados de estratos superficiales de suelos contaminados y optimización de condiciones de crecimiento (Tesis Maestría). Ayacucho, Perú: Universidad Nacional de San Cristobal de Huamanga.
- Park, J.-B., Bühler, B., Panke, S., Witholt, B., & Schmid, A. (2007). Carbon metabolism and product inhibition determine the epoxidation efficiency of solvent-tolerant *Pseudomonas* sp. strain VLB120ΔC. *Biotechnology and Bioengineering*, 98, 1219-1229.
- Ramos, J., & Marqués, S. (1997). Transcriptional control of the *Pseudomonas tol* plasmid catabolic operons is achieved through an interplay of host factors and plasmid-encoded regulators. *Journal Annual Review of Microbiology*, 51, 341-372.
- Ramos, J., Duque, E., Gallegos, M., Segura, A., & Marqués, S. (2004). Chapter 12 Regulation of toluene catabolic pathways and toluene efflux pump expression in bacteria of the genus *Pseudomonas*. En R. Vazquez-Duhalt, & R. Quintero-Ramirez, *Studies in Surface Science and Catalysis* (Vol. 151, págs. 341-372). Amsterdam, Netherlands: Elsevier.
- Santos, P. (2001). Degradation of aromatic compounds in *Pseudomonas* physiological and molecular characterization. Universidad Do Porto. Porto, Portugal: (Tesis Doctoral).
- Shourian, M., Noghabi, K., Zahiri, S., Bagheri, T., Karbalaee, R., Mollaei, M., . . . Abbasi, H. (2009). Efficient phenol degradation by a newly characterized *Pseudomonas* sp. SA01 isolated from pharmaceutical wastewaters. *Desalination*, 246(1-3), 577-594.
- Suzuki-Minakuchi, C., Hirotani, R., Shintani, M., Takeda, T., Takahashi, Y., Matsui, K., . . . Nojiri, H. (2015). Effects of three different nucleoid-associated proteins encoded on IncP-7 plasmid pCAR1 on host *Pseudomonas putida* KT2440. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2869–2880. doi:10.1128/AEM.00023-15.
- Tanaka, N., Miyazaki, S., & Sugawara, H. (2011). *Stenotrophomonas maltophilia* strain IAM 12423 16S ribosomal RNA, partial sequence. Obtenido de [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR\\_041577](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NR_041577).
- Tecon, R., & van der Meer, J. (2008). Bacterial Biosensors for Measuring Availability of Environmental Pollutants. *Sensors*, 8(7), 4062–4080.
- Top, E. M. (2003). The role of mobile genetic elements in bacterial adaptation to xenobiotic organic compounds. *Current Opinion in Biotechnology*, 14(3), 262–269. doi:10.1016/s0958-1669(03)00066-1.
- Ugochukwu, U., & Fialips, C. (2017). Crude oil polycyclic aromatic hydrocarbons removal via clay-microbeoil. *Chemosphere*, 178, 65-72. doi:10.1016/j.chemosphere.2017.03.035.
- Volmer, J., Neumann, C., Bühler, B., & Schmid, A. (2014). Engineering of *Pseudomonas taiwanensis* VLB120 for Constitutive Solvent Tolerance and Increased Specific Styrene Epoxidation Activity. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(20), 6539-6548.
- Wang, L., Tai, C., Wu, Y., Chen, Y., Lee, F., & Wang, S. (2010). *Pseudomonas taiwanensis* sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 20, 2094–2098. doi:10.1099/ijs.0.014779-0.
- Wongsa, P., Tanaka, M., Ueno, A., Hasanuzzaman, M., Yumoto, I., & Okuyama, H. (2004). Isolation and characterization of novel strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Serratia marcescens* possessing high efficiency to degrade gasoline, kerosene, diesel oil, and lubricating oil. *Current Microbiology*, 49(6), 415-422. doi:10.1007/s00284-004-4347-y.