

# OPTIMIZACIÓN DE IONES DE FIERRO PARA LA ELIMINACIÓN DE PIROCIANINA EN LA REACCIÓN DE DEGRADACIÓN DE TOLUENO, BENCENO Y FENOL POR *Pseudomonas aeruginosa*

## OPTIMIZATION OF IRON IONS TO ELIMINATE PYOCYANINE IN THE DEGRADATION REACTION OF TOLUENE, BENZENE AND PHENOL BY *Pseudomonas aeruginosa*

María de L. Rangel-García\*, Jesús Rodríguez-Martínez, Yolanda Garza-García, José L. Martínez-Hernández

Departamento de Biotecnología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Coahuila. 25280. Boulevard Venustiano Carranza y José Cárdenas Valdez. Saltillo, Coahuila. (maluraga@hotmail.com).

### RESUMEN

Una amplia gama de sustancias xenobióticas representan un serio problema como contaminantes ambientales por su toxicidad; entre ellos los compuestos aromáticos pueden ser biodegradados por microorganismos que los usan como fuente de carbono y energía. El género *Pseudomonas* destaca por sus múltiples aplicaciones biotecnológicas debido a su gran versatilidad metabólica; puede producir metabolitos útiles, transformaciones enzimáticas, biodegradación y biorremediación de suelos, y en aguas contaminadas con petróleo y plaguicidas. En esta investigación se usaron células de *P. aeruginosa* para degradar tolueno, benceno y fenol. La cepa fue cultivada en medio mineral sólido y se establecieron las concentraciones óptimas para el desarrollo de células viables: 0.31, 0.19 y 0.13 M para tolueno, benceno y fenol. Los ambientes con concentraciones limitadas de Fe(III) favorecen la producción de piocianina, pigmento que puede interferir en el método analítico de biodegradación de compuestos aromáticos. Este efecto fue eliminado aumentando la concentración de iones de hierro en el medio. Con base en lo anterior, se optimizó y estableció el medio de cultivo mineral con 0.04 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> en presencia de tolueno (0.03 M) y con esta concentración inicial la tasa de biodegradación fue 75 %. Las pruebas de degradación específicas para los compuestos aromáticos mostraron que la cepa de *P. aeruginosa* usada puede degradar tolueno, benceno y fenol. Las tasas de degradación fueron mayores para tolueno (58.4 %) y benceno (70.11 %) con concentraciones iniciales de 0.14 M y 0.16 M, y la degradación fue menor para fenol (24.65 %) con una concentración inicial 0.10 M. La capacidad degradadora de *P. aeruginosa* tuvo proporción directa con su crecimiento en presencia de los xenobióticos

\*Autor responsable ❖ Author for correspondence.

Recibido: Diciembre, 2008. Aprobado: Noviembre 2009.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 44: 235-247. 2010.

### ABSTRACT

A wide range of xenobiotic substances represent a serious problem as environmental pollutants because of their toxicity, among them are found aromatic compounds that can be biodegraded by microorganisms, which use them as their source of carbon and energy. The genus *Pseudomonas* is outstanding for its multiple biotechnological applications due to its remarkable metabolic versatility. It is capable of producing useful metabolites, enzymatic transformations, biodegradation and bioremediation in soil, as well as in water polluted with oil and pesticides. In this study, cells of *P. aeruginosa* were used to degrade toluene, benzene and phenol. The strain was cultivated in a solid mineral medium, and the following optimal concentrations were established for the development of viable cells: 0.31, 0.19, and 0.13 M for toluene, benzene and phenol. The environments with limited concentrations of Fe(III) favored the production of pyocyanine, a pigment that can interfere in the analytical method of aromatic compound biodegradation. This effect was eliminated by increasing the concentration of iron ions in the medium. On this basis, the mineral culture medium was optimized and established at 0.04 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> in presence of toluene (0.03 M). With this initial concentration, a rate of biodegradation of 75 % was obtained. The specific degradation tests for the aromatic compounds showed that the *P. aeruginosa* strain used can degrade toluene, benzene and phenol. The rates of degradation were higher for toluene (58.4 %) and benzene (70.11 %) with the initial concentrations of 0.14 M and 0.16 M. Degradation was less for phenol (24.65 %) with an initial concentration of 0.10 M. The degrading capacity of *P. aeruginosa* was directly proportional to its growth in the presence of the xenobiotic substances studied. A larger amount of cell protein was exhibited in cultures with benzene (1.4982 mg mL<sup>-1</sup>) and toluene (0.8629 mg mL<sup>-1</sup>), and less in the cultures grown

estudiados, mostrando una mayor cantidad de proteína celular en los cultivos con benceno ( $1.4982 \text{ mg mL}^{-1}$ ), tolueno ( $0.8629 \text{ mg mL}^{-1}$ ) y menor en los cultivos desarrollados en presencia de fenol ( $0.4431 \text{ mg mL}^{-1}$ ); lo cual muestra que un deficiente desarrollo bacteriano (biomasa) influye en una subóptima biodegradación.

**Palabras clave:** *Pseudomonas aeruginosa*, degradación,  $\text{FeSO}_4$ , piocianina, xenobióticos.

## INTRODUCCIÓN

Un gran problema actual es la contaminación ambiental, donde el hombre genera desechos que alteran la calidad del aire, tierra, agua y su entorno; muchos desechos industriales se vierten en el agua de arroyos, manantiales, ríos y mares (Brock *et al.*, 1987). La contaminación con químicos peligrosos es uno de los mayores problemas generados por el mundo industrializado (Boopathy, 2000); entre estos contaminantes destacan los compuestos xenobióticos por su alta toxicidad y dificultad para ser degradados (Brock *et al.*, 1987).

Los hidrocarburos son algunos de los principales contaminantes del ambiente (Abalos *et al.*, 2004) y en particular los compuestos aromáticos (CA); las formas sustituidas representan un mayor riesgo de contaminación (Khan *et al.*, 2005). La contaminación con hidrocarburos derivados del petróleo ha ocasionado defectos ambientales y de salud, y también ha aumentado el interés por desarrollar e implementar tecnología para limpiar esta contaminación. El benceno y sus derivados representan la mayor parte de los contaminantes orgánicos en los efluentes de la industria química, petroquímica, farmacéutica, metalúrgica y productos plaguicidas (Banerjee *et al.*, 2001; Siedlecka and Stepnowski, 2005). Estas aguas residuales requieren tratamientos apropiados antes de ser descargadas al ambiente. Entre las técnicas disponibles para remover fenol y sus derivados, la biodegradación es una tecnología alternativa (Banerjee *et al.*, 2001).

Los componentes con anillos aromáticos como benceno, tolueno, fenol y xileno son de gran interés debido a su toxicidad y baja solubilidad, representando una fuente potencial a largo plazo de contaminación de aguas residuales o subterráneas (Cavalca, 2004) y su remoción por los tratamientos

in presence of phenol ( $0.4431 \text{ mg mL}^{-1}$ ), indicating that deficient bacterial development (biomass) can result in suboptimal biodegradation.

**Key words:** *Pseudomonas aeruginosa*, degradation,  $\text{FeSO}_4$ , pyocyanine, xenobiotics.

## INTRODUCTION

Currently, a serious problem is environmental pollution caused by man-made waste that alters the quality of the air, land, and water in his surroundings. Many industrial wastes are dumped into streams, springs, rivers and seas (Brock *et al.*, 1987). Pollution by dangerous chemicals is one of the greatest problems generated by today's industrialized world (Boopathy, 2000). Of these pollutants, xenobiotic compounds are prominent because they are highly toxic and difficult to degrade (Brock *et al.*, 1987).

Hydrocarbons are some of the principal environmental pollutants (Abalos *et al.*, 2004); particularly, aromatic compounds (AC), being substituted forms, represent greater environmental risk (Khan *et al.*, 2005). Pollution by hydrocarbons derived from oil has caused environmental and health defects and has also increased interest in developing and implementing technology to eliminate this pollution. Benzene and its derivatives account for the greater part of the organic pollutants in the effluents from the chemical, petrochemical, pharmaceutical, metallurgical and pesticide industries (Banerjee *et al.*, 2001; Siedlecka and Stepnowski, 2005). This sewage water requires appropriate treatment before being discharged into the environment. Among the available techniques used to remove phenol and its derivatives, biodegradation is an alternative technology (Banerjee *et al.*, 2001).

Components with aromatic rings, such as benzene, toluene, phenol and xylene, are of great interest; due to their toxicity and low solubility, they are a potential source of long-term pollution of residual or underground water (Cavalca, 2004), and their removal through common biological treatments has not had the expected success. Thus, the introduction of new technologies for degrading these recalcitrant molecules into smaller molecules is imperative (Siedlecka and Stepnowski, 2005). Degradation by microorganisms is the main process

biológicos comunes no ha tenido el éxito esperado. Así, la introducción de nuevas tecnologías para degradar estas moléculas recalcitrantes en moléculas más pequeñas es imperativo (Siedlecka y Stepnowski, 2005). La degradación por microorganismos es el principal proceso de eliminación de contaminantes en el ambiente, proceso que puede ser usado para remover los contaminantes del suelo y agua (Abalos *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2005). *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp. y *Trichosporon cutaneum* han sido usados para degradar fenol y sus derivados a bajas concentraciones (0.002-12.7 mM) (Hinteregger *et al.*, 1992).

Varias especies del género *Pseudomonas* contienen plásmidos con enzimas codificadas que pueden biotransformar compuestos orgánicos derivados del petróleo o compuestos organoclorados u organofosforados. Estas enzimas son inducibles y la selección de las cepas adecuadas puede reducir la contaminación por los compuestos xenobióticos (Conesa, 1997; Sutton y Harmon, 1997). Los microorganismos de la especie *P. aeruginosa* son muy comunes en la naturaleza y pueden ser aislados de una gran variedad de fuentes naturales. *Pseudomonas* puede multiplicarse en muchos sustratos, incluyendo los xenobióticos, y crecer con nutrientes derivados de materiales usados en la construcción de sistemas de distribución de agua e instalaciones de tuberías domésticas (Tsoraeva y Rodríguez, 2000).

*Pseudomonas aeruginosa* genera numerosos exoproductos, incluyendo proteasas, hemolisinas, rhamnolípidos y derivados de fenazina (Lau, 2004), factores potencialmente citotóxicos que aumentan su competitividad y supervivencia (Britigan *et al.*, 1999; Norman *et al.*, 2004). Por ejemplo, el metabolito secundario soluble en agua piocianina (1-hidroxi-5-metil-fenazina) ha mostrado actividad antimicrobiana contra una gran variedad de microorganismos (Norman *et al.*, 2004). La piocianina se sintetiza en cantidades importantes por *P. aeruginosa* en ciertas condiciones desfavorables de crecimiento como las condiciones limitantes de hierro. El estrés por nutrientes induce en *Pseudomonas* algunos cambios morfológicos y bioquímicos; además, en condiciones limitantes de crecimiento, la bacteria expresa mecanismos de protección, permitiendo a las células sobrevivir a desafíos ambientales (Fernández y Pizarro, 1999; Reardon *et al.*, 2000).

of elimination of pollutants in the environment; this process can be used to remove pollutants from soil and water (Abalos *et al.*, 2004; Khan *et al.*, 2005). *Alcaligenes eutrophus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp., and *Trichosporon cutaneum* have been used to degrade phenol and its derivatives at low concentrations (0.002-12.7 mM) (Hinteregger *et al.*, 1992).

Several species of the genus *Pseudomonas* contain plasmids with codified enzymes that can bio-transform organic compounds derived from oil and organochloride or organophosphate compounds. These enzymes are inducible, and the selection and use of appropriate strains can reduce pollution by xenobiotic compounds (Conesa, 1997; Sutton and Harmon, 1997). Microorganisms of the species *P. aeruginosa* are very common in nature and can be isolated from a large variety of natural sources. *Pseudomonas* can multiply in many substrates, including xenobiotics, and grow by absorbing nutrients derived from materials used in the construction of water distribution systems and domestic piping installations (Tsoraeva and Rodríguez, 2000).

*Pseudomonas aeruginosa* generates a large number of exo-products, including proteases, hemolysins, rhamnolipids and derivatives of phenazine (Lau, 2004), potentially cytotoxic factors that increase their competitiveness and survival (Britigan *et al.*, 1999; Norman *et al.*, 2004). For example, the water-soluble secondary metabolite pyocyanine (1-hydroxi-5-methyl-phenazine) has exhibited antimicrobial activity against a large variety of microorganisms (Norman *et al.*, 2004). Pyocyanine is synthesized in important quantities by *P. aeruginosa* under certain conditions unfavorable to growth, for example, where iron is limited. Stress from nutrient deficiency induces morphological and biochemical changes in *Pseudomonas*, and, moreover, in limiting growth conditions, the bacteria express protection mechanisms which allow the cells to survive environmental challenges (Fernández and Pizarro, 1999; Reardon *et al.*, 2000).

Thus, the objective of this study was to optimize the concentration of iron ions and prevent the production and interference of the pigment pyocyanine in *P. aeruginosa* cultures for more effective application in degrading toluene, benzene and phenol.

Por tanto, el objetivo de este trabajo fue optimizar la concentración de iones de hierro y evitar la producción e interferencia del pigmento piocianina en cultivos de *P. aeruginosa* para su aplicación efectiva en la degradación de tolueno, benceno y fenol.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepa bacteriana y condiciones de cultivo

La cepa de *P. aeruginosa* se aisló de muestras de agua obtenidas de la red de suministro local en la zona carbonífera de Coahuila, en el norte de México. Se cultivó en agar nutritivo a 37 °C, por 24 h en condiciones aerobias y se transfirió al medio selectivo agar *Pseudomonas* (Sigma) para su identificación mediante la producción de pigmento (Pichardo *et al.*, 1981) y se conservó en un medio mineral sólido:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (7 g L<sup>-1</sup>),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g L<sup>-1</sup>),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1 g L<sup>-1</sup>),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g L<sup>-1</sup>),  $\text{CaCl}_2$  (0.02 g L<sup>-1</sup>),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0.1 g L<sup>-1</sup>),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.01 g L<sup>-1</sup>),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.01 g L<sup>-1</sup>) y  $\text{CuSO}_4$  (0.01 g L<sup>-1</sup>) a pH 7.

### Inducción para la biodegradación de xenobióticos

La inducción de *P. aeruginosa* para degradar benceno, tolueno y fenol se realizó adicionando concentraciones diferentes de cada uno de los xenobióticos usados en el medio mineral sólido. En el estudio se usó un intervalo de concentración 0.001 M-0.5 M para cada xenobiótico. La adición de cada xenobiótico se hizo progresiva y paulatinamente para detectar cambios en el desarrollo de los cultivos, iniciando con concentraciones bajas y manejando una sola variable en cada caso.

Los cultivos de prueba se inocularon con 125  $\mu\text{L}$  de *Pseudomonas* previamente desarrolladas en el medio mineral líquido con las condiciones de cultivo descritas. Se cuantificó el crecimiento microbiano en las placas de agar y se realizó la re-siembra en el medio mineral sólido sin xenobiótico para determinar la viabilidad de las células.

### Métodos analíticos

El crecimiento de la cepa *P. aeruginosa* fue determinado directamente por turbidimetría a 590 nm con intervalos de 24 h, usando un espectrofotómetro Cintra 10 UV-Visible. El medio mineral líquido fue la base para verificar el desarrollo del cultivo donde se usó glucosa como fuente primaria de carbono (cometabolito) y tolueno, benceno y fenol como fuente secundaria.

Cada variable se evaluó por triplicado y los resultados experimentales se graficaron considerando el número de repeticiones, su promedio (media aritmética) y las desviaciones estándar.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacterial strain and culture conditions

The *P. aeruginosa* strain was isolated from water samples obtained from the local water supply network in the coal-mining region of Coahuila in northern México. The strain was cultured in nutritive agar at 37 °C for 24 h under aerobic conditions and transferred to *Pseudomonas* selective agar medium (Sigma) for its identification through its production of pigment (Pichardo *et al.*, 1981) and preserved in a solid mineral medium:  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (7 g L<sup>-1</sup>),  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (2 g L<sup>-1</sup>),  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (1 g L<sup>-1</sup>),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.1 g L<sup>-1</sup>),  $\text{CaCl}_2$  (0.02 g L<sup>-1</sup>),  $\text{K}_2\text{SO}_4$  (0.1 g L<sup>-1</sup>),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.01 g L<sup>-1</sup>),  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0.01 g L<sup>-1</sup>) and  $\text{CuSO}_4$  (0.01 g L<sup>-1</sup>) at pH 7.

### Induction for xenobiotic biodegradation

Induction of *P. aeruginosa* to degrade benzene, toluene and phenol was done by adding different concentrations of each of the xenobiotics used to the solid mineral medium. In the study a concentration interval of 0.001 M-0.5 M was used for each xenobiotic. Each xenobiotic compound was added progressively and gradually to detect changes in the development of the cultures, beginning with low concentrations and with a single variable in each case.

Test cultures were inoculated with 125  $\mu\text{L}$  of *Pseudomonas* previously grown in a liquid mineral medium with the culture conditions described above. Microbial growth was quantified on the agar plates and the microbes were re-seeded in the solid mineral medium without xenobiotics to determine the viability of the cells.

### Analytical methods

Growth of the *P. aeruginosa* strain was determined directly with turbidimetry at 590 nm with intervals of 24 h, using a Cintra 10 UV-Visible spectrophotometer. The liquid mineral medium was the base to verify the development of the culture; glucose was used as the primary source of carbon (cometabolite) and toluene, benzene and phenol as secondary sources.

Each variable was assessed in triplicate and the experimental results were graphed considering the number of replications, their average (arithmetic mean) and the standard deviations.

### Protein determination

After the period of incubation, the propagated cells were separated by centrifugation at 7000 rpm for 30 min at 4 °C.

### Determinación de proteína

Después de la incubación, las células propagadas se separaron por centrifugación a 7000 rpm, por 30 min a 4 °C; la biomasa obtenida se lavó dos veces con solución amortiguadora de fosfatos 0.01 M de pH 7, en las mismas condiciones por 15 min. El paquete celular se suspendió en 3 mL de la misma solución amortiguadora y se cuantificó la concentración de proteína según el método de Lowry modificado por Peterson (Gorina y Yakovleva, 1980).

### Degradación de xenobióticos

El análisis de la degradación progresiva de los xenobióticos se realizó por espectrofotometría, determinando el consumo de sustrato a 270 nm, 254 nm y 271 nm para tolueno, benceno y fenol. Las muestras fueron analizadas a intervalos de 24 h, determinando las tasas de degradación con cada uno de los compuestos aromáticos.

### Optimización de iones de fierro

El efecto de los iones de fierro en la producción de pirocianina se estudió variando la concentración de FeSO<sub>4</sub> (0.01, 0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 g L<sup>-1</sup>) en el caldo de cultivo mineral (pH 7). Se tomó como referencia las concentraciones usadas por Zache y Rehm (1989), Belhaj *et al.* (2002), Meenal y Ambalal (2005) y Fortunato *et al.* (2005). Los medios líquidos fueron inoculados con 0.5 mL de una suspensión de células obtenida de agar inclinado, con una concentración inicial de tolueno 0.03 M e incubados en condiciones aerobias con agitación de 250 rpm (Lab-Line incubator shaker) a 37 °C por 144 h y monitoreados a intervalos de 0, 24, 48, 72, 96, 120 y 144 h, cuantificando el crecimiento y la degradación de tolueno.

Los caldos inoculados con *P. aeruginosa* se colocaron en matraces erlenmeyer de 1 L adicionando tolueno, benceno y fenol en cultivos independientes, según Khan *et al.* (2005). Las concentraciones iniciales para los experimentos de degradación fueron: 0.14 M, 0.16 M y 0.10 M para tolueno, benceno y fenol; los matraces se incubaron con agitación (250 rpm) y a 37 °C. Las muestras fueron analizadas por el método espectrofotométrico a intervalos de 0, 24, 48, 72, 96 y 120 h, determinando el crecimiento microbiano y la tasa de biodegradación (TB) de cada compuesto.

El diseño experimental fue monofactorial, evaluando independientemente la influencia de los iones de hierro en cinco niveles (0.01, 0.02, 0.04, 0.06 y 0.08 g L<sup>-1</sup>), la bioconversión en tres niveles (tolueno 0.14 M, benceno 0.16 M y fenol 0.10 M) y el desarrollo microbiano por 144 h. Los resultados se procesaron

The biomass obtained was washed twice with a 0.01 M buffer solution of phosphates with pH 7 under the same conditions for 15 min. The cell packet was suspended in 3 mL of the same buffer solution, and protein was quantified following the method of Lowry modified by Peterson (Gorina and Yakovleva, 1980).

### Xenobiotic degradation

Analysis of progressive degradation of the xenobiotics was conducted by spectrophotometry, determining the consumption of substrate at 270 nm, 254 nm, and 271 nm for toluene, benzene and phenol. The samples were analyzed at intervals of 24 h to determine the degradation rates of each of the aromatic compounds.

### Optimization of iron ions

The effect of iron ions on the production of pyocyanine was studied by varying the concentration of FeSO<sub>4</sub> (0.01, 0.02, 0.04, 0.06 and 0.08 g L<sup>-1</sup>) in the liquid mineral culture medium (pH 7). Concentrations used by Zache and Rehm (1989), Belhaj *et al.* (2002), Meenal and Ambalal (2005) and Fortunato *et al.* (2005) were used as references. The liquid media were inoculated with 0.5 mL of a suspension of cells obtained from inclined agar with an initial concentration of toluene of 0.03 M incubated under aerobic conditions and shaken at 250 rpm (Lab-Line incubator shaker) at 37 °C for 144 h and monitored at intervals of 0, 24, 48, 72, 96, 120 and 144 h, when microbial growth and toluene degradation were quantified.

The liquid media inoculated with *P. aeruginosa* were placed in 1 L Erlenmeyer flasks, and toluene, benzene and phenol were added in independent cultures, following Khan *et al.* (2005). The initial concentrations for the degradation experiments were 0.14 M, 0.16 M and 0.10 M for toluene, benzene and phenol. The flasks were incubated with shaking (250 rpm) at 37 °C. The samples were analyzed by the spectrophotometric method at intervals of 0, 24, 28, 72, 96 and 120 h to determine microbial growth and the rate of biodegradation (RB) of each of the compounds.

The experimental design was monofactorial, evaluating independently the effect of the iron ions at five levels (0.01, 0.02, 0.04, 0.06 and 0.08 g L<sup>-1</sup>), bioconversion at three levels (toluene 0.14 M, benzene 0.16 M and phenol 0.10 M), and microbial development during 144 h. The results were processed statistically using Microsoft® Office Excel® 2003, considering the error bars or standard deviation ( $\sigma=2$ ) in the Figures ( $p \leq 0.05$ ;  $n=3$ ) (Castro, 1979; Walpole *et al.*, 1999; Triola, 2004).

estadísticamente usando Microsoft® Office Excel® 2003, considerando las barras de error o desviación estándar ( $\sigma=2$ ) en las Figuras ( $p\leq 0.05$ ;  $n=3$ ) (Castro, 1979; Walpole *et al.*, 1999; Triola, 2004).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La cepa desarrollada en agar nutritivo presentó las características y morfología celular de *P. aeruginosa* y el crecimiento en agar Pseudomonas mostró la presencia de pigmento verde correspondiente a la piocianina.

### Inducción para biodegradación de xenobióticos

Los cultivos desarrollados en placas de medio mineral adicionadas con diferentes concentraciones de tolueno, benceno y fenol (0.001-0.5 M) mostraron que *P. aeruginosa* creció en presencia de los tres xenobióticos estudiados separadamente. El crecimiento no se inhibió totalmente, pero sí disminuyó considerable y significativamente ( $p\leq 0.05$ ) a altas concentraciones. Con fenol se apreció menor tolerancia de *P. aeruginosa* a los xenobióticos, aún a bajas concentraciones. Las pruebas de viabilidad fueron positivas con las concentraciones máximas de 0.31 M para tolueno, 0.19 M para benceno y 0.13 M para fenol. A concentraciones superiores, el número de células decreció en relación directa al aumento de la concentración del xenobiótico. *Pseudomonas aeruginosa* mostró una mayor tolerancia a altas concentraciones de tolueno, concentraciones menores de benceno y aun menores de fenol.

### Biodegradación de los xenobióticos

La optimización del proceso de la degradación de los xenobióticos se logró determinando el efecto de la concentración de iones de fierro en la producción de piocianina. Después del período de incubación de *P. aeruginosa* en medio mineral líquido con diferentes concentraciones de  $\text{FeSO}_4$  (0.01 a 0.08  $\text{g L}^{-1}$ ) y con una concentración inicial (0.03 M) de tolueno, se observó crecimiento microbiano por turbidimetría en todos los matraces. En la cinética de consumo de sustrato (Figura 1), la producción de piocianina se detectó en el medio con 0.01  $\text{g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$ , observándose una considerable disminución en la concentración de tolueno hasta las 72 h, producto

## RESULTS AND DISCUSSION

The strain developed in nutritive agar exhibited the characteristics and cell morphology of *P. aeruginosa*, and growth in Pseudomonas agar showed the green pigment indicating the presence of pyocyanine.

### Induction for xenobiotic biodegradation

The cultures developed on plates of mineral medium to which different concentrations of toluene, benzene and phenol (0.001-0.5 M) were added showed that *P. aeruginosa* grew in the presence of the three xenobiotics studied separately. Growth was not totally inhibited, but it did decrease considerably and significantly ( $p\leq 0.05$ ) at high concentrations. With phenol, a lower tolerance of *P. aeruginosa* to xenobiotics could be observed, even at low concentrations. The viability tests were positive with the maximum concentrations of 0.31 M for toluene, 0.19 M for benzene and 0.13 M for phenol. At higher concentrations, the number of cells decreased in direct proportion to the increase in xenobiotic concentration. *Pseudomonas aeruginosa* exhibited greater tolerance to high concentrations of toluene, to lower concentrations of benzene, and to even lower concentrations of phenol.

### Xenobiotic biodegradation

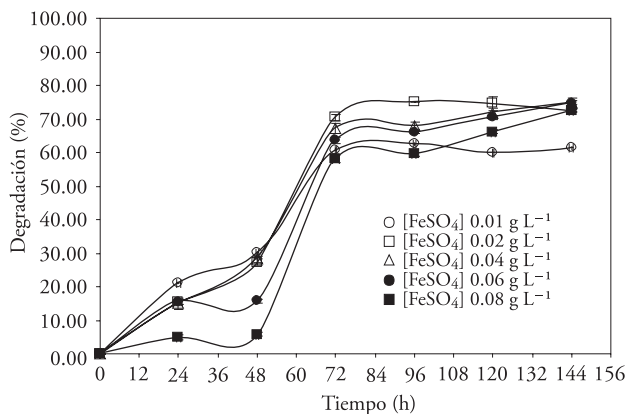
Optimization of the xenobiotic degradation process was achieved by determining the effect of the iron ion concentration in the production of pyocyanine. After the *P. aeruginosa* incubation period in the liquid mineral medium with different concentrations of  $\text{FeSO}_4$  (0.01 to 0.08  $\text{g L}^{-1}$ ) and with an initial concentration (0.03 M) of toluene, microbial growth was observed by turbidimetry in all of the flasks. In the kinetics of substrate consumption (Figure 1), pyocyanine production was detected in the medium with 0.01  $\text{g L}^{-1}$  of  $\text{FeSO}_4$ , and a considerable reduction in the concentration of toluene was observed until 72 h, product of the biodegradation process and a later increase in absorbancy readings due to accumulation of the compounds, coinciding with the presence of a blue-green color in the culture medium caused by the production of pyocyanine, a pigment that absorbs in the UV region, as do the aromatic compounds (Fernández and Pizarro, 1999).

del proceso de biodegradación y un posterior aumento en las lecturas de absorbancia por acumulación de compuestos, lo cual coincide con la presencia de un color azul-verde en el medio de cultivo provocado por la producción de piocianina, pigmento que absorbe en la región UV, al igual que los compuestos aromáticos (Fernández y Pizarro, 1999).

El aumento en los valores de absorbancia sobre la lectura inicial, indica el doble efecto dado por el remanente del xenobiótico en el reactor y el pigmento producido. A concentraciones mayores de hierro (0.02 a 0.08 g L<sup>-1</sup>) no se observó la interferencia de piocianina (Figura 1).

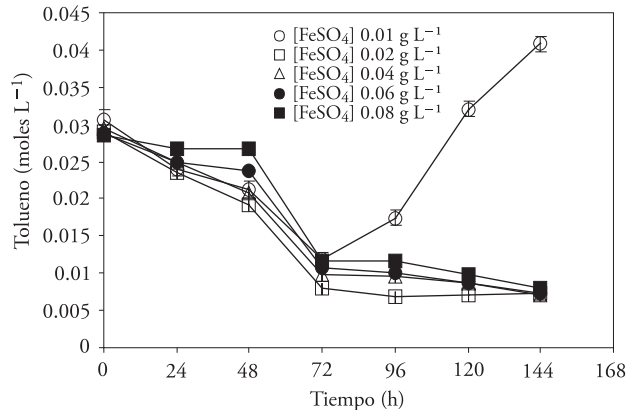
En la Figura 2 se presentan las tasas de degradación del tolueno 0.03 M. La mayor velocidad de degradación del tolueno (3.00E-04 M h<sup>-1</sup>) se presentó a una concentración de 0.04 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub>, y la menor (2.00E-04 M h<sup>-1</sup>) en las otras concentraciones probadas (p≤0.05). La mayor remoción de tolueno ocurrió al usar concentraciones de 0.02 y 0.04 g L<sup>-1</sup> cuya tasa de biodegradación (TB) fue 75 % para ambas. Durante el estudio de degradación de xenobióticos, se decidió utilizar la concentración de 0.04 g L<sup>-1</sup> de FeSO<sub>4</sub> en el medio de cultivo, debido a que las cinéticas de degradación del tolueno ocurrieron a mayor velocidad en comparación con las otras concentraciones de FeSO<sub>4</sub>.

Una vez optimizada la concentración de FeSO<sub>4</sub> en el medio mineral, se desarrollaron cultivos de *P.*



**Figura 2. Tasas de biodegradación de tolueno (0.03M) en cultivos desarrollados con diferentes concentraciones de FeSO<sub>4</sub>. Condiciones: 37 °C, pH 7, 144 h. (n=3; desviación estándar=2σ).**

**Figure 2. Rates of biodegradation of toluene (0.03 M) in cultures grown with different concentrations of FeSO<sub>4</sub>. Conditions: 37 °C, pH 7, 144 h (n=3; standard deviation=2σ).**



**Figura 1. Cinéticas de degradación de tolueno (0.03 M) con diferentes concentraciones de FeSO<sub>4</sub> en el medio mineral líquido. Condiciones: 37 °C, pH 7, 144 h. (n=3; desviación estándar=2σ).**

**Figure 1. Kinetics of toluene (0.03 M) degradation with different concentrations of FeSO<sub>4</sub> in liquid mineral medium. Conditions: 37 °C, pH 7, 144 h (n=3; standard deviation=2σ).**

The increase in absorbance values compared with the initial reading indicates the double effect of the remanent of the xenobiotic on the reactor and the produced pigment. At higher concentrations of iron (0.02 to 0.08 g L<sup>-1</sup>) no interference from pyocyanine was observed (Figure 1).

The rates of 0.03 M toluene degradation are shown in Figure 2. The highest rate of degradation of toluene (3.00E-04 M h<sup>-1</sup>) occurred with a concentration of 0.04 g L<sup>-1</sup> of FeSO<sub>4</sub>, and the lowest (2.00E-04 M h<sup>-1</sup>) in the other tested concentrations (p≤0.05). The most toluene was removed using concentrations of 0.02 and 0.04 g L<sup>-1</sup>, with a biodegradation rate (BR) of 75 % for both concentrations. During the study of xenobiotic degradation, we decided to use the concentration of 0.04 g L<sup>-1</sup> FeSO<sub>4</sub> in the culture medium since the degradation kinetics of toluene occurred at a faster speed than with the other concentrations of FeSO<sub>4</sub>.

Once the concentration of FeSO<sub>4</sub> was optimized in the mineral medium, cultures of *P. aeruginosa* grew in the presence of a concentration of toluene above 0.03 M (0.14 M).

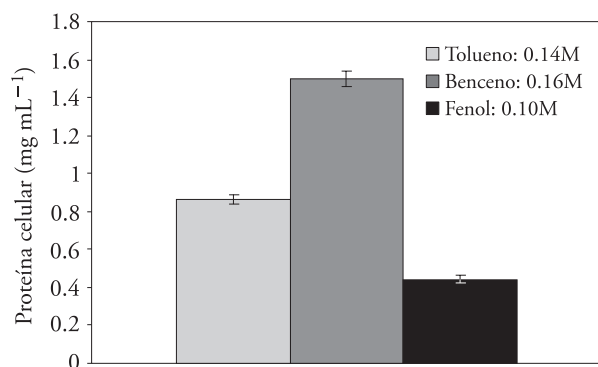
In addition, the effect of benzene and phenol was studied in concentrations of 0.16 and 0.10 M. After 5 d of incubation, *P. aeruginosa* exhibited good growth in the presence of toluene and benzene, but not of phenol. In Figure 3 it is shown that *P. aeruginosa* growth in the presence of toluene and

*aeruginosa* en presencia de una concentración superior a 0.03 M de tolueno (0.14 M).

Además se estudió la influencia del benceno y de fenol en concentraciones de 0.16 M y 0.10 M. Después de una incubación de 5 d *P. aeruginosa* mostró un buen crecimiento en presencia de tolueno y benceno, pero no con fenol. En la Figura 3 se observa que el crecimiento de *P. aeruginosa* en presencia de tolueno y benceno inició después de 48 h de adaptación; en ambos cultivos hubo una fase exponencial hasta las 96 h. La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ) fue significativamente mayor ( $p \leq 0.05$ ) en los cultivos con 0.16 M de benceno ( $\mu = 3.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) y menor en los cultivos con 0.10 M de fenol ( $\mu = 4.0 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ), donde también la fase exponencial tuvo una menor duración (hasta las 72 h) (marca con la línea de mayor grosor en la Figura 3).

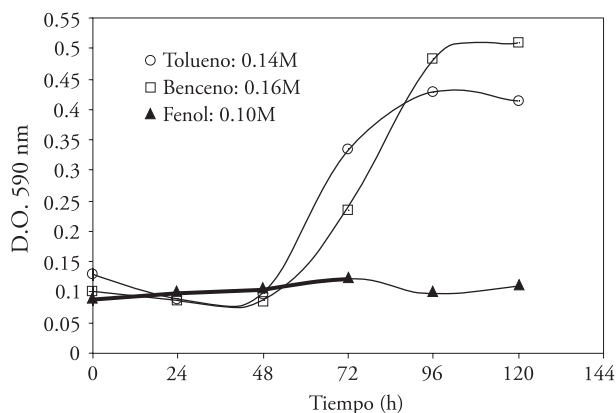
El crecimiento microbiano de *P. aeruginosa* en presencia de los xenobióticos fue diferente ( $p \leq 0.05$ ; Figura 4): una mayor cantidad de proteína celular ( $1.498 \text{ mg mL}^{-1}$ ) en los cultivos con 0.16 M benceno,  $0.863 \text{ mg mL}^{-1}$  con 0.14 M tolueno y  $0.443 \text{ mg mL}^{-1}$  con 0.10 M fenol.

La tasa de biodegradación (TB) de los compuestos se graficó en función del tiempo (Figura 5). Los cultivos de *P. aeruginosa* en presencia de benceno (0.16 M) mostraron 70.11 % de biodegradación, 58.14 % con tolueno (0.14 M) a las 72 h, y 24.65 % con fenol (0.10 M) en 96 h. Con



**Figura 4.** Contenido de proteína celular en cultivos de *P. aeruginosa* desarrollados en presencia de tolueno (0.14M), benceno (0.16M) y fenol (0.10M). Condiciones: 37 °C, pH 7, 120 h. (n=3; desviación estándar=2σ).

**Figure 4.** Cell protein content in cultures of *P. aeruginosa* grown in presence of toluene (0.14 M), benzene (0.16 M) and phenol (0.10 M). Conditions: 37 °C, pH 7, 120 h (n=3; standard deviation=2σ).



**Figura 3.** Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* en medio mineral con tolueno (0.14 M), benceno (0.16 M) y fenol (0.10 M). Condiciones: 37°C, pH 7, 120 h. (n=3; desviación estándar=2σ).

**Figure 3.** Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in mineral medium with toluene (0.14 M), benzene (0.16 M) and phenol (0.10 M). Conditions: 37 °C, pH 7, 120 h (n=3; standard deviation=2σ).

benzene began after 48 h of adaptation; in both cultures there was an exponential phase up to 96 h. The specific growth rate ( $\mu$ ) was significantly higher ( $p \leq 0.05$ ) in cultures with 0.16 M benzene ( $\mu = 3.8 \times 10^{-3} \text{ h}^{-1}$ ) and lower in the cultures with 0.10 M phenol ( $\mu = 4.0 \times 10^{-4} \text{ h}^{-1}$ ), where the exponential phase also had a shorter duration (up to 72 h) (period marked with the thickest line in Figure 3).

*Pseudomonas aeruginosa* microbial growth in the presence of the xenobiotics was different ( $p \leq 0.05$ ; Figure 4): a larger quantity of cell protein ( $1.498 \text{ mg mL}^{-1}$ ) in the cultures with 0.16 M benzene,  $0.863 \text{ mg mL}^{-1}$  with 0.14 M toluene, and  $0.443 \text{ mg mL}^{-1}$  with 0.10 M phenol.

The rate of biodegradation (BR) of the compounds was graphed in function of time (Figure 5). The *P. aeruginosa* cultures in the presence of benzene (0.16 M) showed 70.11 % biodegradation, 58.14 % with toluene (0.14 M) after 72 h, and 24.65 % with phenol (0.10 M) after 96 h. With these results, it can be stated that the BR were directly related to the amount of biomass produced; the greatest bioconversion was observed with 0.16 M benzene (70.11 %), coinciding with the highest production of cell protein ( $1.4982 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Likewise, the low BR of phenol (0.10 M) was obtained with the lowest amount of biomass ( $0.4431 \text{ mg mL}^{-1}$ ).



lo anterior se puede afirmar que las TB estuvieron directamente relacionadas con la cantidad de biomasa producida, observándose la mayor bioconversión con benceno 0.16 M (70.11 %), que coincide con la mayor producción de proteína celular ( $1.4982 \text{ mg mL}^{-1}$ ). Asimismo, la TB baja del fenol (0.10 M) se obtuvo con la menor cantidad de biomasa ( $0.4431 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

Los componentes químicos específicos de los medios de cultivo determinan el crecimiento del microorganismo, la síntesis de sus componentes celulares y la finalidad de su aplicación (Sánchez *et al.*, 2003). Considerar la finalidad de aplicación de los microorganismos es un aspecto importante que requiere varios factores metabólicos y fisiológicos, como ocurre en los procesos de degradación de diferentes compuestos (Menezes *et al.*, 2005). Un nivel inadecuado de componentes químicos en el medio de cultivo puede resultar en un pobre desarrollo bacteriano y realizar una biodegradación subóptima; de ahí la importancia de determinar la cantidad de proteína celular de la biomasa obtenida en el desarrollo de los cultivos (Kwok *et al.*, 2003).

En la mayoría de los trabajos de biorremediación es importante la producción de una buena cantidad de proteína celular (biomasa), el tipo de población bacteriana y sus actividades enzimáticas. Si no se produce suficiente biomasa de las bacterias degradadoras y la concentración de los contaminantes es muy alta, no se realizará una degradación rápida o eficiente (Norman *et al.*, 2004).

Cavalca *et al.* (2004) y Reardon *et al.* (2000) reportan degradación de tolueno ( $2.7 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) y benceno ( $5.5 \times 10^{-4}$ - $3.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) por *Pseudomonas* sp., concentraciones inferiores a las usadas en esta investigación. Además, no obstante la baja biotransformación obtenida con el fenol, esta cepa de *P. aeruginosa* degradó el compuesto aromático a concentraciones iniciales superiores (0.10 M) a las reportadas por Hinteregger *et al.* (1992), Banerjee *et al.* (2001) y Siedlecka y Stepnowski (2005) de 0.002 a 0.012 M.

Un aspecto importante en los procesos de biodegradación es la adaptación de los microorganismos a los compuestos que se degradarán. En esta investigación *P. aeruginosa* fue inducida con diferentes concentraciones de los xenobióticos de prueba adicionados a placas de medio mineral. Esta cepa de *P. aeruginosa* pudo usar los xenobióticos como sustratos de crecimiento con 0.31 M de tolueno, 0.19 M de

The specific chemical components of the culture media determine microorganism growth, synthesis of its cell components, and the end goal of its application (Sánchez *et al.*, 2003). Consideration of the end goal of microorganism application is an important aspect that requires knowledge of several metabolic and physiological factors, such as those that occur in degradation processes of different compounds (Menezes *et al.*, 2005). An inadequate level of chemical components in the culture medium may result in poor bacterial development, resulting in suboptimal biodegradation. It is thus important to determine the quantity of cell protein of the obtained biomass in the development of the cultures (Kwok *et al.*, 2003).

In most bio-remedial work, production of a good amount of cell protein (biomass), type of bacterial population and knowledge of its enzymatic activities are important. If the biomass of the degrading bacteria is not produced in sufficient quantity and the concentration of the pollutants is very high, rapid or efficient degradation will not be possible (Norman *et al.*, 2004).

Cavalca *et al.* (2004) and Reardon *et al.* (2000) report toluene ( $2.7 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) and benzene degradation ( $5.5 \times 10^{-4}$ - $3.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ) for *Pseudomonas* sp., with concentrations lower than those used in our study. Moreover, in spite of the low bio-transformation obtained with phenol, this strain

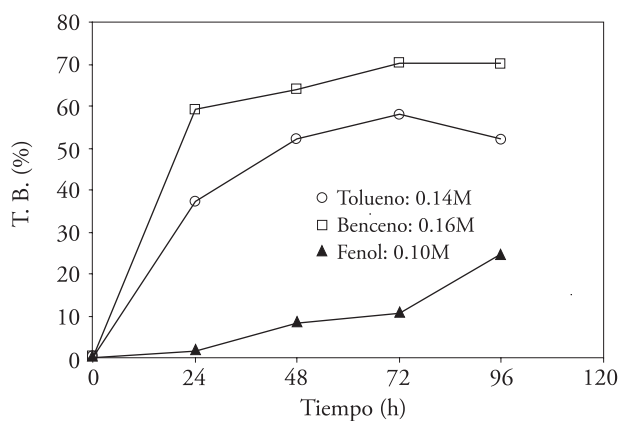


Figura 5. Tasa de biodegradación de tolueno, benceno y fenol por células de *Pseudomonas aeruginosa*. Condiciones: 37 °C, pH 7, 120 h. (n=3; desviación estándar=2σ).

Figure 5. Rate of biodegradation of toluene, benzene and phenol by cells of *Pseudomonas aeruginosa*. Conditions 37 °C, pH 7, 120 h (n=3; standard deviation=2σ).

benceno y 0.13 M de fenol, que permitieron un buen desarrollo de los cultivos en medio sólido.

Considerando que la biosíntesis y secreción de sideróforos como la piocianina es estrictamente regulada en relación inversa por la concentración del hierro en el medio de crecimiento de las bacterias (Díaz de Villegas *et al.*, 2002), se optimizó la cantidad de  $\text{FeSO}_4$  adicionando concentraciones crecientes al medio mineral, lo que evitó la producción del pigmento, como lo reportan Díaz y Villa (2002). Así se eliminó la interferencia en el estudio de la reacción de biodegradación de tolueno (0.03M) donde se obtuvo una alta TB (75 %).

En presencia de  $0.01 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$  *P. aeruginosa* mostró un buen crecimiento, con un efecto colateral que favoreció la producción de piocianina, aumentando las lecturas de absorbancia que interfieren en el monitoreo real de la reacción de biodegradación del tolueno. La eliminación de la producción del sideróforo se logró usando concentraciones superiores a  $0.01 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$ . La concentración óptima para este caso fue  $0.04 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$  que permitió monitorear la biotransformación. Esta concentración de sulfato de hierro coincide con la usada por Belhaj *et al.* (2002) con *P. aeruginosa*.

En el presente estudio se mostró que los efectos de la concentración de iones de hierro en la producción de fenazinas, como la piocianina, deben ser considerados para mejorar el diseño de cultivo de bacterias con capacidad de producir este tipo de pigmentos y que puedan ser aplicados confiablemente en los métodos de biodegradación de CA. Las pruebas de degradación individual de CA mostraron que la cepa de *P. aeruginosa* usada degrada tolueno, benceno y fenol. Las concentraciones iniciales de los tres CA disminuyeron y el proceso de degradación estuvo en relación directa con el crecimiento bacteriano. Con las concentraciones iniciales de 0.14 M de tolueno y 0.16 M de benceno se logró 58.14 % y 70.11 % de degradación. Estas concentraciones fueron superiores a las reportadas por Reardon *et al.* (2000) con *P. putida* (tolueno  $2.7 \times 10^{-3}$  M y benceno  $5.5 \times 10^{-4} - 3.2 \times 10^{-3}$  M).

La biodegradación de tolueno y benceno fueron mayores que la biodegradación de fenol, mostrando que la máxima tasa de degradación de tolueno (0.14M) y benceno (0.16M) ocurrió a las 72 h (durante la fase exponencial), siendo la TB mayor para el benceno (70.11 %). Colateralmente, la mayor

de *P. aeruginosa* degradó el compuesto aromático en concentraciones iniciales más altas (0.10 M) que las reportadas (0.002 a 0.012 M) por Hinteregger *et al.* (1992), Banerjee *et al.* (1991) y Siedlecka and Stepnowski (2005).

Un aspecto importante en los procesos de biodegradación es la adaptación de los microorganismos a los compuestos a degradar. En nuestro estudio *P. aeruginosa* fue inducida con diferentes concentraciones de los xenobioticos añadidos a las placas de medio mineral. Esta *P. aeruginosa* cepa fue capaz de utilizar los xenobioticos como sustratos de crecimiento con 0.31 M de tolueno, 0.19 M de benceno y 0.13 M de fenol, lo que permitió un buen desarrollo de los cultivos en medio sólido.

Considerando que la biosíntesis y secreción de sideróforos como la piocianina es estrictamente regulada en proporción inversa por la concentración de hierro en el medio de crecimiento de la bacteria (Díaz de Villegas *et al.*, 2002), la cantidad de  $\text{FeSO}_4$  fue optimizada al agregar concentraciones crecientes al medio mineral, evitando la producción del pigmento, como lo reportan Díaz y Villa (2002). De esta manera, se eliminó la interferencia en el estudio de la reacción de biodegradación de tolueno (0.03 M), obteniendo una alta RB (75 %).

En presencia de  $0.01 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$ , *P. aeruginosa* exhibió un buen crecimiento, con un efecto colateral que favoreció la producción de piocianina, lo que aumentó las lecturas de absorbancia e interfirió en el monitoreo de la reacción de biodegradación de tolueno. La eliminación de la producción del sideróforo se logró usando concentraciones más altas que  $0.01 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$ . La concentración óptima para este caso fue  $0.04 \text{ g L}^{-1}$  de  $\text{FeSO}_4$ , lo que permitió monitorear la biotransformación. Esta concentración de sulfato de hierro coincide con la usada por Belhaj *et al.* (2002) con *P. aeruginosa*.

En nuestro estudio, los efectos de la concentración de hierro en la producción de fenazinas, como la piocianina, fueron mostrados. Estos efectos deben ser considerados para mejorar el diseño de cultivo de bacterias capaces de producir este tipo de pigmentos y que puedan ser aplicados confiablemente en los métodos de biodegradación de AC. Los tests de biodegradación en AC mostraron que la *P. aeruginosa* cepa utilizada degrada tolueno, benceno y fenol. Las concentraciones iniciales de los tres AC disminuyeron y el proceso de degradación estuvo en proporción directa con el crecimiento bacteriano. Con las concentraciones iniciales de 0.14 M de tolueno y 0.16 M de benceno se logró 58.14 % y 70.11 % de degradación. Estas concentraciones fueron superiores a las reportadas por Reardon *et al.* (2000) con *P. putida* (tolueno  $2.7 \times 10^{-3}$  M y benceno  $5.5 \times 10^{-4} - 3.2 \times 10^{-3}$  M).

concentración de proteína fue encontrada en las células desarrolladas en presencia de este CA.

Tolueno y benceno fueron mejores sustratos que el fenol, resultando en un mejor crecimiento de *P. aeruginosa*; además fueron degradados más rápido que el fenol. La baja tasa de degradación de 0.10 M de fenol (24.65 %) correspondió con una baja velocidad de crecimiento de *P. aeruginosa* y una baja concentración de proteína celular. Según Hinteregger *et al.* (1992) los compuestos fenólicos pueden inhibir el crecimiento microbiano aún a concentraciones relativamente bajas ( $>200 \text{ mg L}^{-1}$ ). En el presente trabajo se reporta una cepa de *P. aeruginosa* que degrada fenol a una concentración inicial de 0.10 M, superior a la reportada por Hinteregger *et al.* (1992) con *P. putida* y por Zache y Rehm (1989) con un cultivo mixto de *P. putida* y *Cryptococcus elinovii*. Esta capacidad degradativa de algunas cepas es de gran interés para los procesos de bioremediación (Ma y Herson, 2000).

## CONCLUSIONES

Se mostró la capacidad de *P. aeruginosa* para degradar compuestos aromáticos, y debido a esta característica metabólica la cepa creció en presencia de concentraciones elevadas de tolueno (0.31 M), benceno (0.19 M) y fenol (0.13 M), lo que permite su aplicación en procesos de biotecnología ambiental.

Tolueno y benceno fueron mejores sustratos que el fenol, efecto observado determinantemente en las mayores tasas de biodegradación obtenidas con los dos primeros compuestos y las bajas TB con fenol. Hubo un efecto similar con la cantidad de biomasa: mayor crecimiento y una consecuentemente mayor cantidad de proteína celular en presencia de tolueno y benceno; no así con fenol. Así, la capacidad degradadora de *P. aeruginosa* estuvo en proporción directa con su crecimiento en presencia de los xenobióticos estudiados. Esto confirma que un deficiente desarrollo bacteriano (biomasa) converge en una deficiente biodegradación, factor importante en el diseño de este tipo de tecnologías.

Con la optimización de los iones de  $\text{FeSO}_4$  ( $0.04 \text{ g L}^{-1}$ ) en los estudios de biotransformación de 0.03 M tolueno se logró eliminar la producción e interferencia de la piocianina en los biorreactores utilizados, obteniendo una alta tasa de biodegradación. Esto mejora el diseño de cultivo de bacterias productoras

initial concentrations of 0.14 M toluene and 0.16 M benzene, 58.14 % and 70.11 % degradation was achieved. These concentrations were higher than those reported by Reardon *et al.* (2000) with *P. putida* (toluene  $2.7 \times 10^{-3} \text{ M}$  and benzene  $5.5 \times 10^{-4}$ - $3.2 \times 10^{-3} \text{ M}$ ).

Biodegradation of toluene and benzene was greater than that of phenol; the maximum rate of degradation of toluene (0.14 M) and benzene (0.16 M) occurred at 72 h (during the exponential phase), and BR was higher for benzene (70.11 %). Collaterally, the highest concentration of protein was found in cells developed in the presence of this AC.

Toluene and benzene were better substrates than phenol, resulted in better *P. aeruginosa* growth, and also degraded faster than phenol. The low rate of degradation of 0.10 M phenol (24.65 %) corresponded to a low growth rate of *P. aeruginosa* and a low concentration of cell protein. According to Hinteregger *et al.* (1992), phenolic compounds can inhibit microbial growth even at relatively low concentrations ( $>200 \text{ mg L}^{-1}$ ). In our study, a strain of *P. aeruginosa* degraded phenol at an initial concentration of 0.10 M, higher than that reported by Hinteregger *et al.* (1992) with *P. putida* and by Zache and Rehm (1989) with a mixed culture of *P. putida* and *Cryptococcus elinovii*. The degrading capacity of some strains is of great interest for bioremediation processes (Ma and Herson, 2000).

## CONCLUSIONS

The ability of *P. aeruginosa* to degrade aromatic compounds was demonstrated, and because of this metabolic characteristic, the strain grew in presence of elevated concentrations of toluene (0.31 M), benzene (0.19 M) and phenol (0.13 M), making its application in environmental biotechnological processes possible.

Toluene and benzene were better substrates than phenol, definitely evidenced in the higher rates of biodegradation obtained with the first two compounds and the low BR with phenol. A similar effect occurred with the quantity of biomass: greater growth and, consequently, a larger quantity of cell protein in the presence of toluene and benzene, but not in the presence of phenol. The degrading ability of *P. aeruginosa* was directly proportional to its growth in presence of the xenobiotics studied.

de pigmentos y permite proponer métodos de biodegradación de compuestos aromáticos con mayor eficiencia y confiabilidad.

El presente trabajo proporciona información útil para el tratamiento exitoso de aguas contaminadas con tolueno, benceno y fenol, lo que permite entender mejor la capacidad y la función de *P. aeruginosa* en aplicaciones biotecnológicas, lo que dará una mayor eficiencia en procesos de biorremediación.

## LITERATURA CITADA

- Abalos A., Viñas M., J. Sabaté, M. A. Manresa, and A. M. Solanas. 2004. Enhanced biodegradation of Casablanca crude oil by a microbial consortium in presence of rhamnolipid produced by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Biodegradation* 15: 249-260.
- Banerjee I., J. M. Modak, K. Bandopadhyay, D. Das, and B. R. Maiti. 2001. Mathematical model for evaluation of mass transfer limitations in phenol biodegradation by immobilized *P. putida*. *J. Biotechnol.* 87: 211-223.
- Belhaj A., N. Desnoves, and C. Elmerich. 2002. Alkane biodegradation in *Pseudomonas aeruginosa* strain isolated from a pollute zone: Identification of alk B and alk B-related genes. *Res. Microbiol.* 153: 339-344.
- Boopathy, R. 2000. Factors limiting bioremediation technologies. *Bioresource Technol.* 74: 63-67.
- Britigan B. E., M. A. Railsback, and CH. D. Cox. 1999. The *Pseudomonas aeruginosa* secretory product pyocyanin inactivates a1 protease inhibitor: Implications for the pathogenesis of cystic fibrosis lung disease. *Infection and Immunity* 67: 1207-1212.
- Brock, T. D., D. W. Smith, y M. T. Madigan. 1987. *Microbiología*. 4a edición. Prentice-Hall Hispanoamericana. México. pp: 163, 164, 737.
- Castro, L. 1979. *Diseño Experimental sin Estadística*. 1ª edición. Editorial Trillas. México. pp: 59-62.
- Cavalca L., E. Dell'Amico, and V. Andreoni. 2004. Intrinsic bioremediability of an aromatic hydrocarbon-polluted groundwater: diversity of bacterial population and toluene monooxygenase genes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 64: 576-587.
- Conesa, F. V. 1997. *Guía Metodológica para la Evaluación del Impacto Ambiental*. 3ª Edición. Ediciones Mundi-Prensa. España. pp: 200-201.
- Díaz de Villegas, M. E., P. Villa, and A. Frías. 2002. Evaluation of the siderophores production by *Pseudomonas aeruginosa* PSS. *Rev. Latin. Microbiol.* 44: 3-4, 112-117.
- Fernández, R. O., and R. A. Pizarro. 1999. *Pseudomonas aeruginosa* UV-A-induced lethal effect: influence of salts, nutritional stress and pyocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B: Biology* 50: 59-65.
- Fortunato, R., J. G. Crespo, and M. A. M. Reis. 2005. Biodegradation of thiomersal containing effluents by a mercury resistant *Pseudomonas putida* strain. *Water Res.* 39: 3511-3522.
- Gorina I. A., and I. V. Yakovleva. 1980. Rapid method for measuring protein content in microbial cells. *Appl. Biochem. Microbiol.* XVI: 936-939.
- This confirms that deficient bacterial development (biomass) converges with deficient biodegradation, an important factor in the design of this type of technology.
- By optimizing  $\text{FeSO}_4$  ions ( $0.04 \text{ g L}^{-1}$ ) in the studies of biotransformation of 0.03 M toluene, elimination of the production and interference of pyocyanine in the bioreactors was achieved, obtaining a high rate of biodegradation. This step improves the design of the culture of pigment-producing bacteria and makes it possible to propose methods of biodegradation of aromatic compounds that are more efficient and reliable.
- The present study provides useful information for the successful treatment of water polluted with toluene, benzene and phenol and for better understanding of the capacity and function of *P. aeruginosa* in biotechnological applications, contributing to greater efficiency in bioremediation processes.

—End of the English version—



- Hinteregger Ch., R. Leitner, M. Loidl, A. Ferschl, and F. Streichsbier. 1992. Degradation of phenol and phenolic compounds by *Pseudomonas putida* EKII. *Appl. Microbiol. and Biotechnol.* 37: 252-259.
- Jacques, P., M. Ongena, F. Bernard, R. Fuchs, H. Budzikiewicz, and P. Thonart. 2003. Fluorescent *Pseudomonas* mainly produce the dihydroform of pyoverdine at low specific growth rate. *Letters Appl. Microbiol.* 36: 259-262.
- Khan, S. A., M. Hamayun, and S. Ahmed. 2005. Degradation of 4-aminophenol by newly isolated *Pseudomonas* sp. Strain ST-4. *Enzyme and Microbial Technol.* 31: 10-13.
- Kwok, Chen-Ko, and Loh Kai-Chee. 2003. Effects of Singapore soil type on bioavailability of nutrients in soil bioremediation. *Adv. Environ. Res.* 7: 889-900.
- Lau G. W., Huimin Ran, F. Kong, D. J. Hassett, and D. Mavrodi. 2004. *Pseudomonas aeruginosa* pyocyanin is critical for lung infection in mice. *Infection and Immunity* 72: 4275-4278.
- Ma Y., and D. S. Herson. 2000. The catechol 2,3-dioxygenase gene and toluene monooxygenase genes from *Burkholderia* sp. AA1, an isolate capable of degrading aliphatic hydrocarbons and toluene. *J. Industrial Biotechnol.* 25: 127-131.
- Meenal, K., and Ch. Ambalal. 2005. Biodegradation of p-nitrophenol by *P. putida*. *Bioresource Technol.* 97: 982-988.
- Menezes, B. F., C. F. A. de Oliveira, B. C. Okeke, and W. T. Frankenberger Jr. 2005. Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. *Microbiol. Res.* 160: 249-255.

- Norman R. S., P. Moeller, T. J. McDonald, and P. J. Morris. 2004. Effect of pyocyanin on a crude-oil-degrading microbial community. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 4004-4011.
- Pichardo, R. E. A., M. J. Bale, W. H. Cannon, and J. M. Matsen. 1981. Identificación of *Pseudomonas aeruginosa* by pyocyanin production on agar tech. *J. Clinical Microbiol.* 13: 456-458.
- Reardon, K. F., D. C. Mosteller, and J. D. Bull Rogers. 2000. Biodegradation kinetics of benzene, Toluene and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1. *Biotechnol. Bioeng.* 69: 386-400.
- Sánchez, L., S. Ortiz, y A. Hernández. 2003. Obtención de sideróforos a partir de *Burkholderia cepacia* y optimización del medio de cultivo para su producción. *Rev. Salud Anim.* 25: 27-33.
- Siedlecka, E. M., and P. Stepnowski. 2005. Phenols degradation by Fenton reaction in the presence of chlorides and sulfates. *Polish J. Environ. Studies.* 16: 823-828.
- Sutton, D. B., y P. Harmon. 1997. *Fundamentos de Ecología*. Ed. Limusa, México, 19ª impresión, pp: 132-133.
- Triola, M. F. 2004. *Probabilidad y Estadística*. 9ª edición. Pearson Educación. México. 648 p.
- Tsoraeva, A., and M. C. Rodríguez. 2000. Comparison of two culture media for selective isolation and membrana filter enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in water. *Rev. Latin. Microbiol.* 42: 149-154.
- Walpole, R. E., R. H. Myers, y S. L. Myers. 1999. *Probabilidad y Estadística para Ingenieros*. 6ª edición. Pearson Prentice-Hall. México. 752 p.
- Zache, G., and H. J. Rehm. 1989. Degradation of phenol by a coimmobilized entrapped mixed culture. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 30: 426-432.