



Géneros bacterianos presentes en el efluente con anilina de una curtiembre del Distrito de Florencia de Mora, Trujillo (Perú)

Bacterial genera present in the effluent with aniline a tannery of the Florencia de Mora district (Trujillo, Peru)

Dara Atilano¹, Sandy Benites¹, Roberth Cabrera¹, Marly Flores¹, Irvin Gutiérrez¹, Katherine Sánchez¹ y Luis Llenque²

¹Escuela AP de Microbiología y Parasitología de la Universidad Nacional de Trujillo (UNT). Trujillo. Perú.

²Departamento de Microbiología y Parasitología. UNT

RESUMEN

El presente trabajo tuvo como objetivo el aislamiento e identificación de géneros bacterianos presentes en el efluente con anilina de una curtiembre del Distrito de Florencia de Mora (Trujillo, Perú). Se realizó una inoculación de 20 mL de efluente con anilina filtrado en 180 mL de caldo medio mínimo de sales (CMMS) en un recipiente con un sistema de aireación estéril a 0,5 VVM por cinco días a temperatura ambiental (23-25 °C). El aislamiento bacteriano se realizó en agar medio mínimo de sales más anilinas (0,3%), incubándose a 26 °C por 3 días. Para demostrar que los géneros aislados tienen la capacidad de degradar el colorante; se realizó una prueba cualitativa empleando caldo medio mínimo de sales con anilina a 50 ppm y 100 ppm; con una suspensión bacteriana al tubo N° 3 del Nefelómetro de Macfarlán y se incubó a 26 °C por 14 días. Se logró aislar a tres géneros bacterianos (*Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*), que presentaron la capacidad de degradar el colorante anilina. Las bacterias lograron un desarrollo y crecimiento en el medio mínimo de sales con anilina y produciendo un aclaramiento del medio de cultivo con el paso del tiempo. Por lo tanto de un efluente con anilina de una curtiembre del distrito de Florencia de Mora se aislaron e identificaron: *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*.

Palabras clave: Anilina, prueba cualitativa, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*.

ABSTRACT

The present work had as objective the isolation and identification of bacterial genera present in the effluent with aniline from a tannery of the District of Florence de Mora. An inoculation of 20 mL of filtered aniline effluent in 180 mL of minimal salt broth (CMMS) was performed in a vessel with a sterile aeration system at 0.5 VVM for 5 days at room temperature (23-25 °C). The bacterial isolation was performed on minimal medium agar of salts plus anilines (0.3%), incubating at 26 °C for 3 days. To demonstrate that the isolated genera have the ability to degrade the dye; A qualitative test was carried out using minimum average broth of salts with aniline at 50 ppm and 100 ppm; With a bacterial suspension to tube No. 3 of the Macfarlane Nephelometer and incubated at 26 °C for 14 days. It was possible to isolate three bacterial genera (*Enterobacter*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*), which presented the ability to degrade the dye aniline. The bacteria achieved a development and growth in the minimal medium of salts with aniline and producing a clearance of the culture medium with the passage of time. Therefore, an effluent with aniline from a tannery in the Florence district of Mora was isolated and identified: *Enterobacter*, *Acinetobacter* and *Pseudomonas*.

Keywords: Aniline, qualitative test, *Enterobacter*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*.

INTRODUCCIÓN

La anilina es una amina aromática simple de origen orgánico y, junto a sus derivados, son sustancias químicas cuya presencia en el ambiente es el resultado de diversos efluentes que la originan; estos compuestos son ampliamente utilizados como materias primas o en etapas intermedias en la fabricación de productos químicos industriales, tales como pesticidas, medicamentos, colorantes, polímeros, agentes tensoactivos, cosméticos e inhibidores de corrosión, especialmente en fábricas de colorantes¹. Sin embargo, estos compuestos tienen propiedades tóxicas, mutagénicas, carcinogénicas, y se descargan a la atmósfera, agua y suelo, constituyendo una clase importante de contaminantes del medio ambiente².

La mayor parte de los tratamientos utilizados para reducir el impacto negativo de los colorantes al ambiente se concentra en la sustitución de sustancias químicas menos tóxicas, que en la aplicación de alternativas más seguras que erradiquen el problema. A pesar de que las sustancias utilizadas son de baja toxicidad, debido a la masificación de su uso estamos expuestos a altas dosis. Lo señalado exige buscar un tratamiento biológico que elimine el problema de una manera segura tanto para el ambiente como para los seres humanos³.

Existe un gran número de microorganismos con la capacidad de eliminar el color de las aguas residuales mediante la biosorción, la biodegradación aeróbica o anaeróbica y la producción de enzimas que catalizan la decoloración; por ello, la biodegradación con enzimas producidas por algunos microorganismos es utilizado cada vez con más frecuencia, debido a su capacidad de catalizar la oxidación de compuestos fenólicos, no fenólicos y otros compuestos aromáticos⁴.

Las bacterias que metabolizan la anilina inician la degradación mediante la formación de catecol a través de la vía meta-escisión, tales como: *Pseudomonas putida* UCC22, *Acinetobacter* sp. YAA, *Pseudomonas* sp. AW-2, y *Delftia tsuruhatensis* AD9; mientras que, *Frateuria* sp. ANA-18 y *Delftia* sp. XYJ6 degradan anilina través de la vía orto-escisión⁵. El mecanismo general de desestabilización del anillo aromático desarrollado por los microorganismos aerobios implica una oxidación progresiva de la estructura resonante; al respecto, se tiene conocimiento, a nivel molecular, de algunas rutas catabólicas microbianas de compuestos aromáticos, especialmente de las pertenecientes al género *Pseudomonas* sp.⁶. Una comparación detallada de estas rutas metabólicas indica que el primer paso consiste en la incorporación de dos grupos hidroxilo en el anillo bencénico para lo cual los microorganismos han desarrollado una serie de rutas periféricas de oxidación, deshalogenación, desnitración o desulfuración, que dan lugar a un intermediario dihidroxilado susceptible a la acción de dioxigenasas específicas que provocarán la apertura del anillo. Estos derivados dihidroxilados serán canalizados por dos rutas generales: por la ruta del catecol, en la que los intermediarios catecólicos pueden ser metabolizados a su vez mediante la ruta meta o la ruta orto dependiendo de la posición en la que se efectúe la apertura del anillo, o por la ruta del gentisato. Los metabolitos finales de ambas rutas entran directamente en el metabolismo intermediario de la célula⁷.

La conversión inicial de anilina a catecol es una reacción de múltiples etapas catalizada por tres enzimas; la glutamina sintetasa (GS), una amidotransferasa y un dioxigenasa anilina. La GS es una enzima dependiente de ATP y de L-glutamato, que transforma la anilina en gamma-glutamylanilamida, y la dioxigenasa anilina hace la conversión de gamma-glutamylanilina en catecol⁵.

Se sabe que *Nocardia* sp, *Alcaligenes faecalis*, *Achromobacter* sp⁸, *Dietzia notronolimnaea*, *Dietzia papilomatosis* sp., *Rhodococcus koreensis* sp, como degradadores de anilina⁹. *Enterobacter* sp. EC3 también mostró una fuerte capacidad para decolorar diversos colorantes textiles, refiriéndose que la decoloración se debe a la biodegradación y no a una adsorción superficial inactiva¹⁰. Por otro lado al agruparse el consorcio bacteriano que contiene *Enterobacter dissolvens* AGYP1 y *Pseudomonas aeruginosa* AGYP2 representan una eliminación del 96% de colorante (100 mg / l) dentro de 6 h cuando se inmoviliza en agar-agar¹¹.

Diversos microorganismos han sido usados en la degradación de colorantes. Se ha reportado una nueva cepa bacteriana aislada de las aguas subterráneas, designada *Pseudomonas migulae* AN1 demostrando que era capaz de degradar la anilina en un intervalo de 72 horas a 10°C a una concentración de 135 a 2202 mg L (-1)¹². Por otro lado la formación y la actividad de las biopelículas de *Pseudomonas migulae* AN-1, fueron estudiadas para la remediación in situ de un acuífero contaminado. Las biopelículas cultivadas en medio de sal mineral con anilina exhibieron tolerancia a

altas concentraciones de anilina. En la tasa de degradación de la anilina, las biopelículas de *Pseudomonas migulae* AN-1 muestran diferentes niveles en comparación con las células planctónicas. Los resultados demuestran que las biopelículas de *Pseudomonas migulae* AN-1 sobrevivieron el proceso con una alta eficiencia de degradantes de la anilina¹³. También se ha registrado el metabolismo aerobio de colorantes azo utilizando diferentes cepas de bacterias, como; *Aeromonas* sp., *Bacillus subtilis*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas luteola*¹⁴.

Debido a que los efluentes con anilina procedentes de curtiembres, son eliminados por sus alcantarillas a medios acuático, provocando bioacumulación y disminución del poder absorbente de agua, por ende, una disminución de la actividad fotosintética de los organismos presentes en el ecosistema, disminución del oxígeno disuelto en el agua, no contando con un tratamiento adecuado; es importante realizar este proyecto con la finalidad de proponer un método biológico para el tratamiento de estos efluentes que contaminan el agua tanto de la superficie como la subterránea. Por tal motivo el presente trabajo tiene como objetivo aislar e identificar géneros bacterianos procedente de un efluente con anilina de una curtiembre del Distrito de Florencia de Mora, en condiciones de laboratorio

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de las muestras de anilina

La muestra fue obtenida de una curtiembre del Distrito de Florencia de Mora, provincia de Trujillo, Región La Libertad (Perú) a partir de un pozo reservorio de efluente con anilina, de donde se recolectaron submuestras de los cuatro extremos y del centro del pozo a 30 cm debajo de la superficie. Las submuestras fueron depositadas en un recipiente plástico de 4 litros en donde se mezcló homogéneamente y del cual se separó un litro aproximadamente en un envase de plástico de primer uso, para luego ser transportado al laboratorio.

Aislamiento e identificación de géneros bacterianos

En el laboratorio, la muestra fue filtrada en 5 capas de gasa de primer uso, en un recipiente estéril. Luego se realizó un enriquecimiento en 180 mL de medio mínimo de sales con anilina al 0.3%, con 20 mL de muestra filtrada colocando en un recipiente, conectado a un sistema de aireación esterial a 0.5 VVM, por 5 días a temperatura ambiental (23-25°C). Luego de la etapa de enriquecimiento de la muestra, se procedió a realizar diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁶; a partir de estas, se realizó la siembra en superficie en placa por duplicado en agar medio mínimo de sales con anilina al 0,3%, incubándose por 3 días a 26°C. Posteriormente, se seleccionaron las colonias en base a sus características macroscópicas y microscópicas (coloración Gram). De las colonias seleccionadas se sembraron en agar medio mínimo de sales con anilina al 0,3% para su conservación y posteriores pruebas. Para su identificación se realizaron las pruebas bioquímicas de TSI, LIA, CITRATO, SIM y OXIDASA.

Prueba cualitativa:

Se realizó una estandarización de las colonias seleccionadas en solución salina fisiológica estéril comparándose la turbidez con el tubo N° 3 (9x10⁸ UFC/mL) del nefelómetro de Mac Farland, luego se prepararon 10 tubos por cada cultivo, conteniendo cada tubo 4,5 mL de medio mínimo de sales y anilina a distintas concentraciones (50 ppm a 1000 ppm). Además del control positivo (medio mínimo de sales más anilina a distinta concentración) y del control negativo (medio mínimo de sales más suspensión bacteriana). Se inoculó a cada tubo 0,5mL de la suspensión bacteriana estandarizada anteriormente y se incubó a 26 °C por 14 días.

RESULTADOS

Se aislaron e identificaron a los géneros: *Enterobacter*, *Acinetobacter* y *Pseudomonas*, cuyos criterios de identificación aparecen en las Tablas 1, 2 y 3. Se observó el cambio del color del caldo medio mínimo de sales combinado con anilina cuando se cultivaron a los tres géneros (Figs, 1 y 2) en cambio ello no ocurrió cuando el medio carecía de anilina (control negativo), como se observa en la Fig. 3.

Tabla 1. Características bioquímicas y microscópicas de *Enterobacter* aislado de una curtiembre con anilina del distrito de Florencia de Mora (Trujillo, Perú).

Prueba	Lectura
¹ TSI	⁴ A/A
² LIA	Negativo
CITRATO	Positivo
³ SIM	⁵ S(-) ⁶ I(-) ⁷ M(+)
Producción de gas	+++
Coloración GRAM	Gram negativo

¹TSI: Agar hierro triple azúcar. ²LIA: Agar lisina hierro. ³SIM: Sulfuro, indol, movilidad. ⁴A/A = acidez del medio por degradación de lactosa, sacarosa y glucosa. ⁵S = producción de ácido sulfhídrico. ⁶I = producción de Indol. ⁷M = movilidad.

Tabla 2. Características bioquímicas y microscópicas de *Acinetobacter* aislado de una curtiembre con anilina del distrito de Florencia de Mora.

Prueba	Lectura
¹ TSI	⁴ K/K
² LIA	Negativo
CITRATO	Positivo
³ SIM	⁵ S(-) ⁶ I(-) ⁷ M(-)
OXIDASA	Negativo
Coloración GRAM	Gram negativo

¹TSI: Agar hierro triple azúcar. ²LIA: Agar lisina hierro. ³SIM: Sulfuro, indol, movilidad. ⁴K/K = no fermenta glucosa, sacarosa ni lactosa. ⁵S = producción de ácido sulfhídrico. ⁶I = producción de Indol. ⁷M = movilidad.

Tabla 3. Características bioquímicas y microscópicas de *Pseudomonas* aislado de una curtiembre con anilina del distrito de Florencia de Mora.

Prueba	Lectura
¹ TSI	⁴ K/K
² LIA	Positivo
CITRATO	Positivo
³ SIM	⁵ S(-) ⁶ I(-) ⁷ M(+)
OXIDASA	Positivo
Producción de gas	Negativo
Coloración GRAM	Gram negativo

¹TSI: Agar hierro triple azúcar. ²LIA: Agar lisina hierro. ³SIM: Sulfuro, indol, movilidad. ⁴K/K = no fermenta glucosa, sacarosa ni lactosa. ⁵S = producción de ácido sulfhídrico. ⁶I = producción de Indol. ⁷M = movilidad.

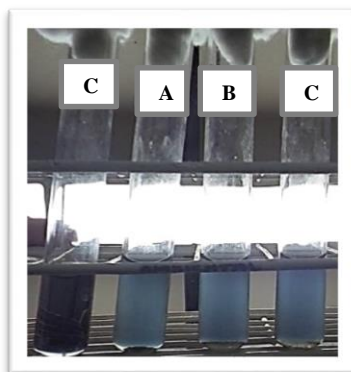


Fig. 1. Tubos de ensayo con caldo medio mínimo de sales (MMS) y anilina; a una concentración de 50 ppm del colorante, inoculados con 1mL de suspensión de cada cultivo bacteriano equivalente al tubo N°3 (9×10^8 UFC/mL) del nefelómetro de Mac Farland, menos el CP; después de 14 días de incubación a 26 °C. (CP: control positivo, que contiene MMS y anilina. **A:** MMS y anilina, inoculado con *Pseudomonas*. **B:** MMS y anilina, inoculado con *Acinetobacter*. **C:** MMS y anilina, inoculado con *Enterobacter*)

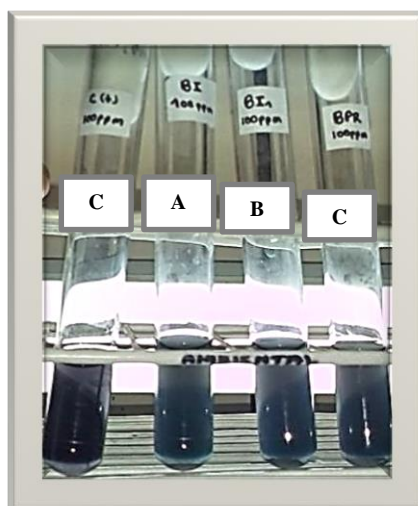


Fig. 2. Tubos de ensayo con caldo medio mínimo de sales (MMS) y anilina; a una concentración de 100 ppm del colorante, inoculados con 1mL de suspensión de cada cultivo bacteriano equivalente al tubo N°3 (9×10^8 UFC/mL) del nefelómetro de Mac Farland, menos el CP; después de 14 días de incubación a 26 °C. (CP: control positivo, que contiene MMS y anilina. **A:** MMS y anilina, inoculado con *Pseudomonas*. **B:** MMS y anilina, inoculado con *Acinetobacter*. **C:** MMS y anilina, inoculado con *Enterobacter*).

DISCUSIÓN

Según la literatura revisada, indica que las bacterias degradadores de anilina reportadas en su mayoría son Gram negativas, coherente con los géneros bacterianos encontrados en este estudio; además de reportar a los géneros de *Pseudomonas* y *Acinetobacter* como buenos degradadores de anilina y al género *Enterobacter* reportado en trabajos relacionados con otros colorantes que pertenecen a los hidrocarburos aromáticos.

No hay muchos trabajos que permitan realizar una comparación más detallada con nuestros resultados, debido a que la mayoría de trabajos existentes realizan pruebas con bacterias ya aisladas y conocidas que no son nativas.

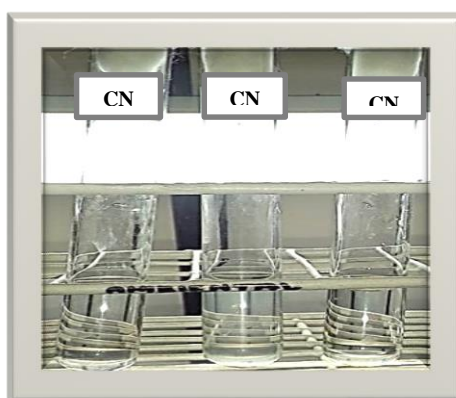


Fig. 3. Tubos de ensayo con caldo medio mínimo de sales (MMS) inoculados con 1mL de suspensión de cada cultivo bacteriano equivalente al tubo N°3 (9×10^8 UFC/mL) del nefelómetro de Mac Farland; estos tubos vendrán hacer los controles negativos. (CN-A: control negativo inoculado con *Pseudomonas*. CN-B: control negativo inoculado con *Acinetobacter*. CN-C: control negativo inoculado con *Enterobacter*).

Para demostrar la degradación de la anilina por los tres géneros bacterianos identificados de forma indirecta, se realizó un método cualitativo. La evaluación de la degradación del colorante se realizó mediante la observación de un aclaramiento de color, a comparación del control, aprovechando la capacidad de las colonias de utilizar el colorante como fuente de carbono; como menciona la literatura, debido a las enzimas que producen.

En los tres cultivos se observó este aclaramiento del medio a diferencia del control (ver fig. 1 y 2); además que en un control negativo realizado con solo la suspensión bacteriana y el caldo medio mínimo de sales no se observó turbidez (crecimiento) en el medio. Por lo tanto nos permite decir que las bacterias utilizan el colorante para su metabolismo como fuente de carbono ya que al no agregar el colorante en el control negativo no se observa turbidez (crecimiento)

Se ha descrito que las bacterias que degradan anilina lo asimilan mediante vías catabólicas; empleando dos tipos de procesos en condiciones aerobias, el cual consiste en la hidroxilación del anillo aromático y la escisión del anillo bencénico catalizado por enzimas que requieren oxígeno denominados monooxigenasas o hidroxilasas y dioxigenasas respectivamente. Generalmente, los productos de rotura son metabolizados hasta compuestos intermediarios como el catecol y otros¹⁵.

Estudios realizados con los género *Pseudomonas* y *Acinetobacter*, se ha encontrado que realizan una conversión inicial de anilina a catecol la cual es una reacción de varios pasos catalizada por tres enzimas, una glutamina sintetasa (GS), glutamina amidotransferasa y una dioxigenasa anilina (una grande y pequeñas subunidades de un componente de la oxigenasa y un componente de ferredoxina reductasa). En el primer paso, catalizado por gamma-glutamylanilina. El siguiente paso, catalizado por dioxigenasa anilina implica conversión de gamma-glutamylanilina en catecol. Altas concentraciones de gamma-glutamylanilina son citotóxicas, pero la acción de otra enzima, glutamina amidotransferasa, previene su acumulación por conversión de anilina. En el caso del género *Enterobacter* no hay información referente al metabolismo de anilina¹⁶.

Los catecoles son un grupo de compuestos intermediarios representativos centrales en el metabolismo de compuestos aromáticos por bacterias. Las bacterias lo degradan principalmente a través de dos vías: la vía de orto-escisión y la vía de meta-escisión, en el que los primeros pasos son reacciones de escisión de anillos mediada por catecol 1,2-dioxigenasa (C12O) y catecol 2,3-dioxigenasa (C23O), respectivamente¹⁷. La degradación del catecol mediada por estas enzimas ha sido reportada en los metabolismos de muchos compuestos aromáticos por bacterias del medio ambiente. Por lo tanto, estas enzimas juegan un papel importante y esencial en la degradación aeróbica de los productos químicos con los anillos aromáticos¹⁸.

En un efluente con anilina de una curtiembre del distrito de Florencia de Mora se aislaron e identificaron *Acinetobacter*, *Enterobacter* y *Pseudomonas*, que tienen la capacidad de metabolizar y degradar la anilina, que pueden ser empleados en los tratamientos de estas aguas antes de ser vertidas a los ríos y reducir la contaminación de estos ambientes por estos efluentes.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bhunia F, Saha NC, Kaviraj A. Effects of aniline an aromatic amine to some freshwater organisms. *Ecotoxicology*, 2003; 12(5): 397-404.
2. Takeo M, Ohara A, Sakae S, Okamoto Y, Kitamura C, Kato DI, et all. Function of a glutamine synthetase-like protein in bacterial aniline oxidation via γ -glutamylanilide. *J Bacteriol*, 2013; 195(19):4406-4414.
3. Garzón R. “Cinética de degradación de colorantes textiles de diferentes clases químicas por hongos y bacterias inmovilizados sobre fibra de Agave tequilana Webber var. Azul”. [Tesis doctoral]. Bogotá: Servicio de Publicaciones e Intercambio Científico, Universidad Javeriana de Bogotá; 2009; p. 37-41.
4. Mayer A, Staples R. Laccase: new functions for an old enzyme. United States of America. *Phytochemistry*, 2002; 60 (6): 551-565.
5. Arora P. Bacterial degradation of monocyclic aromatic amines. *Frontiers in Microbiology*, 2015; 6:820. doi:10.3389/fmicb.2015.00820.
6. Harayama S, Timmis K. Aerobic biodegradation of aromatics hydrocarbons by bacteria. Sigel and Dekker Inc. New York, 1992; p. 99-156.
7. Frantz B, Chakrabarty M. The biology of *Pseudomonas*. Ed. J.R. Sokatch. New York: Academic Press; 1996. p. 295-323.
8. Aoki K, Ohtsuka K, Shinke R, Nishira H. Rapid biodegradation of aniline by *Frateria* species ANA-18 and its aniline metabolism. *Agricultural and biological chemistry*, 1984; 48(4):865-872.
9. Jin Q, Hu Z, Jin Z, Qiu L, Zhong W, y Pan Z. Biodegradation of aniline in an alkaline environment by a novel strain of the halophilic bacterium, *Dietzia natronolimnaea* JQ-AN. *Bioresource technology*, 2012; 117, 148-154.
10. Wang H, Zheng X, Su J, Tian Y, Xiong X y Zheng T. Decoloración biológica de los reactivos colorantes reactivos Negro 5 por una novedosa cepa bacteriana aislada *Enterobacter* sp. EC3, 2009; 15(3):9-65.
11. Patel Y, Gupte A. Biological treatment of textile dyes by agar-agar immobilized consortium in a packed bed reactor. *Water Environ Res*, 2015; 87(3):242-251.
12. Liu Y, Qu D, Wen Y, Ren H. Biorremediación de *Pseudomonas migulae* AN-1 a baja temperatura de anilina suspendido libremente y magnético. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2015; 99(12):26-53
13. Zhao Y, Qu D, Zhou R, Yang S, Ren H. Efficacy of forming biofilms by *Pseudomonas migulae* AN-1 toward in situ bioremediation of aniline-contaminated aquifer by groundwater circulation wells. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 2016; 23(12):73-115
14. Cortázar A, González C, Coronel C, Escalante J, Castro J, Villagómez J. Biotecnología aplicada a la degradación de colorantes de la industria textil. *Universidad y ciencia*; 2012; 28(2): 186-2979.
15. Cristovao R, Tavares A, Ribeiro A, Loureiro J, Boaventura R, Macedo E. Kinetic modeling and simulation of laccase catalyzed degradation of reactive textile dyes. *Bioresource Technol*, 2008; 99: 4768 - 4774.
16. Carrasco D. Aislamiento e identificación de bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, comprobando su actividad enzimática. [Tesis Doctoral]. Quito-Ecuador: Universidad San Francisco de Quito, Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales; 2007.
17. Suarez M. Degradación de los ácidos 3- y 4- Hidroxibenzoico en *Klebsiella pneumoniae*: Purificación, caracterización y propiedades de las hidroxilasas. [Tesis Doctoral]. Madrid: Universidad Complutense de Madrid; 1993.
18. Takeo M, Nishimura M, Shirai M, Takahashi H, Negoro S. Purification and characterization of catechol 2, 3-dioxygenase from the aniline degradation pathway of *Acinetobacter* sp. YAA and its mutant enzyme, which resists substrate inhibition. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 2007; 71(7), 1668-1675.