

Efecto de la concentración de surfactante y de la temperatura en la biodegradación de naftaleno, antraceno y fenantreno por *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Stenotrophomonas sp.* aislados de un consorcio degradador de HAP

Natalia González, Luis Fernando Bautista, Carmen Molina, Raquel Simarro, Carolina Vargas, Raquel Flores

Resumen: La contaminación ambiental por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) es actualmente un problema muy extendido. Los HAP son generados por la combustión incompleta de combustibles fósiles entre otros y, además de sus propiedades tóxicas, son poco solubles en agua. Para abordar este problema, se utilizan surfactantes ya que favorecen la solubilidad de dichos compuestos hidrófobos. La temperatura también influye en las propiedades de los HAP y en el metabolismo de los microorganismos involucrados en su degradación. *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* y *Stenotrophomonas sp.*, tienen una capacidad degradadora de naftaleno, fenantreno y antraceno eficiente a 15 y 25 °C.

Palabras clave: Hidrocarburos aromáticos policíclicos, surfactantes, microorganismos.

Abstract: Environmental contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) is currently a widespread problem. PAHs are produced by incomplete combustion of fossil fuels and other materials. Moreover, PAHs are poorly soluble in water and they present toxic properties. In order to address this problem, surfactants are often used due to they favor the solubility of these hydrophobic compounds. Temperature influences both on the properties of PAHs and the metabolism of microorganisms involved in this process. *Enterobacter sp.*, *Pseudomonas sp.* and *Stenotrophomonas sp.*, have an efficient degrading capacity of naphthalene, phenanthrene and anthracene at 15 and 25 °C.

Keywords: Polycyclic aromatic hydrocarbons, surfactants, microorganisms.



N. González¹



L. F. Bautista²



C. Molina¹



R. Simarro³



C. Vargas²



R. Flores⁴

¹ Departamento de Biología y Geología, ESCET, Universidad Rey Juan Carlos, Móstoles (Madrid).
C-e: natalia.gonzalez@urjc.es, carmen.molina@urjc.es

² Departamento de Tecnología Química y Ambiental, ESCET, Universidad Rey Juan Carlos, Móstoles (Madrid).
C-e: fernando.bautista@urjc.es, carolina.vargas@urjc.es

³ Facultad de Ciencias Ambientales, Universidad Internacional SEK, Quito (Ecuador).
C-e: raquel.simarro@urjc.es

⁴ Departamento de Botánica, Facultad de Biología, Universidad de Valencia (España).
C-e: raquel.flores@uv.es

Recibido: 16/05/2013. Aceptado: 30/09/2013.

Introducción

La contaminación ambiental por hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) es actualmente un problema muy extendido. Los HAP son generados por la combustión incompleta de combustibles fósiles y otros materiales orgánicos y, además de sus propiedades tóxicas, mutagénicas y carcinogénicas,¹ son muy poco solubles en agua.² Para abordar este problema en biorremediación y permitir una mayor biodisponibilidad a los microorganismos, se suelen utilizar agentes surfactantes debido a que favorecen la solubilidad de dichos compuestos hidrófobos.³ Sin embargo, hay resultados contradictorios acerca de los efectos del surfactante sobre el proceso de biodegradación.^{4,5} Hay muchos factores, tales como el tipo y la concentración del surfactante o la mezcla de sustrato y microorganismo implicado, que afectan a dicha biodegradación. Por ello se hace necesario un estudio de optimización previo en base a ciertos factores implicados en el proceso que permitirá obtener en mayor medida resultados positivos.

La temperatura es otro factor de gran influencia en las propiedades de los HAP y en el metabolismo de los microorganismos involucrados en este proceso. Aunque se ha demostrado que la biodegradación de HAP es posible a temperaturas bajas,⁶ con temperaturas moderadas (entre 20 °C y 30 °C), el proceso es más eficiente. También se conoce que a temperaturas por debajo de 20 °C, se ralentiza el crecimiento bacteriano debido al retraso en el metabolismo de las bacterias.⁷

Con el fin de eliminar estos contaminantes de suelos y entornos de agua, se han probado varias tecnologías de remediación diferentes demostrándose que la biorremediación es la práctica más eficaz, siendo la degradación bacteriana⁸ una de las más estudiadas y aplicadas. Diversos géneros

de bacterias gram-positivas y gram-negativas han sido aislados y caracterizados por su capacidad para degradar los HAP de 2 ó 3 anillos aromáticos, entre los cuales destacan: *Pseudomonas* sp.,⁹ *Mycobacterium* sp.,¹⁰ *Sphingomonas* sp.¹¹ y *Achromobacter* sp.¹² Sin embargo, hay otros géneros como *Enterobacter* sp.¹³ y *Stenotrophomonas* sp.¹⁴ mucho menos descritos en la bibliografía, que han demostrado un potencial papel degradador de hidrocarburos aromáticos policíclicos en un consorcio microbiano extraído de suelos contaminados. En este artículo se pretende analizar la capacidad degradadora de estas cepas de forma individual y la eficacia de un consorcio artificial formado por estas mismas cepas, ya que según las relaciones que se establecen entre las especies pueden tener efectos positivos o negativos en el proceso de biodegradación.

El objetivo del presente estudio consiste en examinar el efecto de la concentración del surfactante biodegradable no iónico Tween-80 (T80) y de la temperatura (15 y 25 °C) sobre la capacidad degradadora de tres cepas bacterianas, cuando éstas son inoculadas de forma independiente y cuando se forma un consorcio artificial con las mismas. Para el estudio del proceso de biodegradación, se seleccionaron tres HAP de bajo peso molecular (naftaleno, fenantreno y antraceno).

Diseño experimental

Para evaluar la influencia de la temperatura y de la concentración de surfactante en la capacidad degradadora de las cepas, se llevaron a cabo un total de 20 experimentos, cada uno por triplicado, en matraces erlenmeyer de 100 mL con un volumen total de 50 mL de BHB (Bushnell Haas Broth, composición: 0,2 g L⁻¹ MgSO₄ · 7H₂O, 0,02 g L⁻¹ CaCl₂ 2H₂O, 1 g L⁻¹ KH₂PO₄, 1 g L⁻¹ K₂HPO₄, 1 g L⁻¹ NH₄NO₃, 0,05 g L⁻¹ FeCl₃) con Tween-80 como surfactante en las concentraciones correspondientes a cada experimento (Tabla 1), naftaleno, fenantreno y antraceno (500 mg/L) como fuente de carbono y las cepas bacterianas de *Pseudomonas* sp., de *Enterobacter* sp. y de *Stenotrophomonas* sp. inoculadas individualmente o formando un consorcio (7,5 % v/v). Las réplicas se incubaron en un agitador orbital (Innova 40; New Brunswick Scientific; Edison, NJ, EE.UU.) a 150 rpm, bajo condiciones de oscuridad a 15 y 25 °C. Antes de inocular el consorcio, los erlenmeyers con el medio y los HAP se agitaron durante toda la noche para permitir la solubilización de la mayoría de los HAP.

Los factores utilizados para estudiar la capacidad de degradación de HAP de las cepas fueron, la temperatura (15 y 25 °C), la concentración del surfactante Tween-80 (0,015 mM, y 0,15 mM, teniendo en cuenta que la concentración micelar crítica (CMC) es 0,012 mM) y el tipo de inóculo (cepas por separado o cepas juntas). En el tratamiento con las tres cepas juntas se estudió el efecto de dos concentraciones de surfactante más (0,006 mM y 40,60 mM). El surfactante Tween-80 fue seleccionado en base a un artículo previo¹⁴ en el que se establecía este surfactante como óptimo para las condiciones establecidas. Las cepas bacterianas utilizadas en este estudio (de *Enterobacter* sp., de *Pseudomonas* sp. y de *Stenotrophomonas* sp.) se aislaron de un consorcio degradador de HAP (consorcio C2PL05)¹³ extraído de un suelo permanentemente contaminado de una refinería en Puertollano (Ciudad Real, España). Las condiciones de incubación de cada uno de los 20 experimentos se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Condiciones experimentales.

Experimento	T(°C)	Concentración Tween-80 (mM)	Bacteria
1	25	0,015	<i>Pseudomonas</i> sp.
2	25	0,015	<i>Enterobacter</i> sp.
3	25	0,015	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
4	25	0,015	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.
5	25	0,15	<i>Pseudomonas</i> sp.
6	25	0,15	<i>Enterobacter</i> sp.
7	25	0,15	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
8	25	0,15	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.
9	25	0,006	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.
10	25	40,60	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.
11	15	0,015	<i>Pseudomonas</i> sp.
12	15	0,015	<i>Enterobacter</i> sp.
13	15	0,015	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
14	15	0,015	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.
15	15	0,15	<i>Pseudomonas</i> sp.
16	15	0,15	<i>Enterobacter</i> sp.
17	15	0,15	<i>Stenotrophomonas</i> sp.
18	15	0,15	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.
19	15	0,006	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.
20	15	40,60	<i>Pseudomonas</i> sp. <i>Enterobacter</i> sp. <i>Stenotrophomonas</i> sp.

Crecimiento de las células

La densidad bacteriana durante el proceso de degradación de HAP se determinó mediante cambios en la absorbancia de los cultivos por espectrofotometría a 600 nm (espectrofotómetro Spectronic Genesys TM). Las mediciones se realizaron a las 0, 24, 48, 72, 96 y 168 h del periodo de incubación.

Análisis de HAP

Las concentraciones de naftaleno, fenantreno y antraceno durante el proceso de biodegradación se analizaron mediante un sistema de HPLC ProStar 230 (Varian) con una columna de fase inversa C18 siguiendo el método descrito en un trabajo previo.¹⁴ La concentración de cada uno de ellos se calculó a partir de una curva patrón a longitud de onda de 254 nm.

La tasa de agotamiento de cada HAP ($-r_i$) durante los experimentos fue equiparada con un modelo de cinética de primer orden (Ecuación 1),

$$-r_i = dC_i/dt = K_{Ai} \cdot C_i + K_{Bi} \cdot C_i \quad (1)$$

donde C es la concentración de HAP medido por análisis de HPLC, K_A es la constante cinética aparente de primer orden debida a procesos abióticos, K_B es la constante cinética aparente de primer orden debida a procesos biológicos, t es el tiempo y el subíndice i corresponde a cada HAP. A partir de los experimentos de control realizados previamente, se observó que la degradación de los hidrocarburos de tres anillos no está asociada a ningún proceso abiótico.¹³ Sin embargo, en el caso de naftaleno se midió durante los controles un cierto grado de agotamiento abiótico ($K_A = 2,7 \cdot 10^{-3} \pm 7,0 \cdot 10^{-5} \text{ h}^{-1}$).

Análisis estadístico

Con el objetivo de analizar los efectos de los diferentes factores considerados sobre la K_B de cada uno de los tres HAP, se realizaron análisis multifactoriales de las varianzas (ANOVA). En los experimentos inoculados con las cepas por separado se evaluó la influencia en la K_B de la temperatura (15 °C y 25 °C), la concentración de surfactante (0,015 mM y 0,15 mM) y el tipo de cepa (de *Pseudomonas* sp., de *Enterobacter* sp. y de

Stenotrophomonas sp.). Cuando las cepas se inocularon en conjunto formando un consorcio artificial, sólo se evaluó la influencia de la temperatura (15 °C y 25 °C) y la concentración de surfactante (0,006 mM; 0,015 mM; 0,15 mM y 40,60 mM). La homogeneidad de las varianzas fue evaluada en cada caso mediante el test de Cochran, logaritmizando los datos en caso de que resultaran heterogéneos. Finalmente, los datos se consideraron estadísticamente significativos cuando la $p < 0,05$.

Resultados

Las curvas de crecimiento de las bacterias a diferentes concentraciones y temperaturas (Figura 1) mostraron fase de retardo, fase exponencial y en algunos casos, la parte inicial de la fase estacionaria. Cuando el proceso de biodegradación se desarrolló a 25 °C, en todas las cepas se alcanzó la fase exponencial, mientras que, a 15 °C la fase de retardo se extendió hasta el final de los experimentos (168 horas). A esta temperatura, sólo las cepas de *Pseudomonas* sp. alcanzaron la fase exponencial.

En los experimentos inoculados con las tres cepas formando un consorcio (Figura 1 C, F), tan sólo el experimento con una concentración de surfactante de 40,60 mM alcanzó la fase de crecimiento exponencial. El resto de los experimentos a ambas temperaturas, se mantuvieron en fase de retardo.

En la Figura 2, se muestra la influencia de la temperatura y de la concentración de surfactante Tween-80 en la K_B de las tres cepas individualmente. Para un mismo hidrocarburo, los valores de K_B son similares a ambas temperaturas. Sin embargo, los valores de K_B del naftaleno (Figura 1 A, D) fueron un orden de magnitud mayor, a ambas temperaturas y

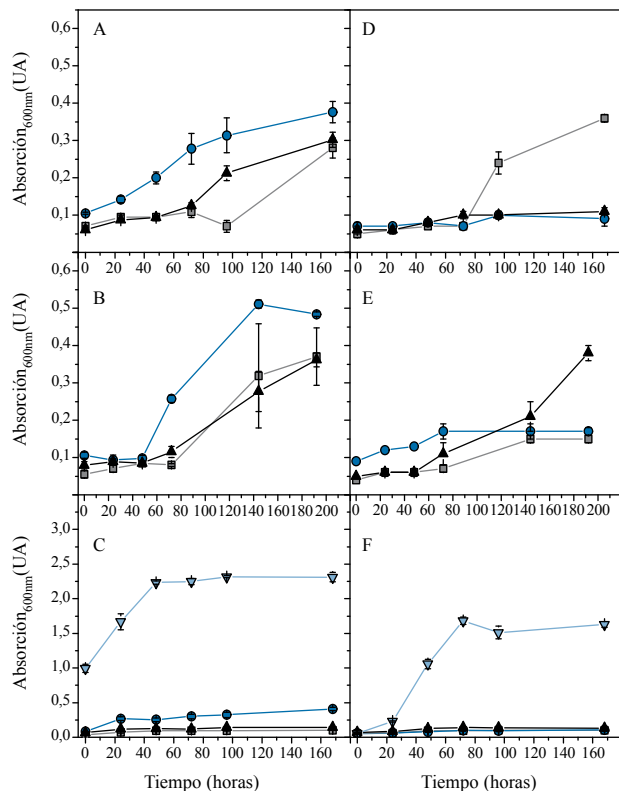


Figura 1. Absorbancia a 25 °C (A,B,C) y 15 °C (D,E,F) de los experimentos inoculados con las cepas por separado (de *Pseudomonas* (■), de *Enterobacter* (●) y de *Stenotrophomonas* (▲)) y concentración de surfactante 0,015 mM (A,B) y 0,15 mM (D,E). C y F muestran la absorbancia de los experimentos inoculados con las cepas formando un consorcio y las concentraciones de surfactante de 0,006 mM (■), 0,015 mM (●), 0,15 mM (▲) y 40,60 mM (▼).

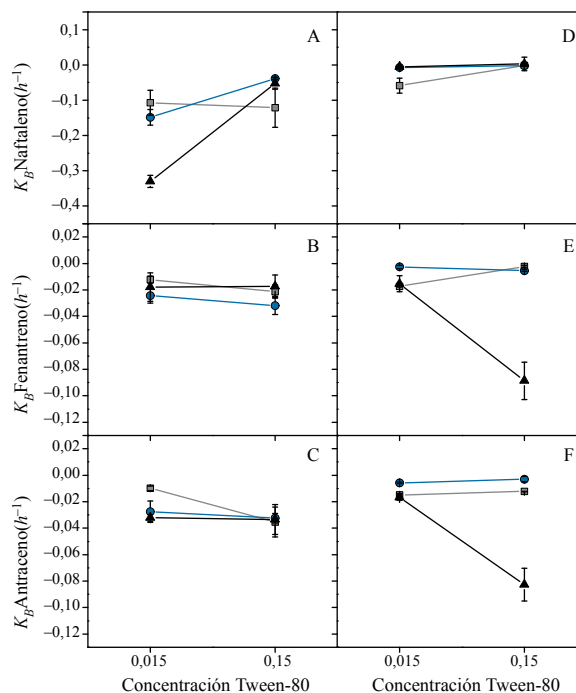


Figura 2. Influencia de la temperatura (25 °C: A, B, C; 15 °C: D, E, F) y de la concentración de surfactante en la K_B del naftaleno, fenantreno y antraceno de los experimentos inoculados con las cepas de *Pseudomonas* (■), de *Enterobacter* (●) y de *Stenotrophomonas* (▲) por separado.

concentraciones de surfactante, que los valores de K_B para el fenantreno y antraceno (Figura 1 B, E y C, F respectivamente). Cabe destacar que los valores obtenidos de K_B del naftaleno correspondientes a *Stenotrophomonas* sp. incubada a 25 °C (Figura 1 A) son mayores que los de *Enterobacter* sp. y *Pseudomonas* sp., cuando la concentración de surfactante es de 0,015 mM. Los patrones de K_B de fenantreno y antraceno son similares a ambas temperaturas y concentraciones de surfactante (Figura 2 B, C, E, F). Sin embargo, y a diferencia de lo que ocurre con el naftaleno, en el caso de *Stenotrophomonas* sp., la K_B es mayor cuando la concentración de surfactante es 0,015 mM y la temperatura 15 °C.

Tabla 2. Análisis estadístico de la K_B de naftaleno, fenantreno y antraceno en los experimentos donde las cepas fueron inoculadas por separado.

K_B Naftaleno				
Factor	<i>d.f.</i>	<i>M.S.</i>	<i>F</i>	<i>p</i>
Intercepción	1	89,04	1707,84	***
T	1	10,58	202,96	***
Conc. Tween-80	1	1,54	29,56	***
Cepa	2	0,71	13,76	***
T x Conc. Tween-80	1	0,17	3,44	<i>n.s.</i>
T x Cepa	2	0,31	6,09	**
Conc. Tween-80 x Cepa	2	1,41	27,10	***
T x Conc. Tween-80 x Cepa	2	2,36	45,27	***
Error	24	0,05		
K_B Fenantreno				
Intercepción	1	0,021	441,52	***
T	1	$1,9 \cdot 10^{-5}$	0,39	<i>n.s.</i>
Conc. Tween-80	1	$1,62 \cdot 10^{-3}$	33,25	***
Cepa	2	$3,13 \cdot 10^{-3}$	64,22	***
T x Conc. Tween-80	1	$8,73 \cdot 10^{-4}$	17,89	***
T x Cepa	2	$2,88 \cdot 10^{-3}$	59,02	***
Conc. Tween-80 x Cepa	2	$1,66 \cdot 10^{-6}$	34,11	***
T x Conc. Tween-80 x Cepa	2	$2,53 \cdot 10^{-3}$	51,84	***
Error	24	$4,9 \cdot 10^{-5}$		
K_B Antraceno				
Intercepción	1	0,023	189,64	***
T	1	$3,21 \cdot 10^{-4}$	2,54	<i>n.s.</i>
Conc. Tween-80	1	$2,16 \cdot 10^{-3}$	16,78	***
Cepa	2	$2,16 \cdot 10^{-3}$	17,14	***
T x Conc. Tween-80	1	$2,54 \cdot 10^{-4}$	2,02	<i>n.s.</i>
T x Cepa	2	$1,35 \cdot 10^{-3}$	10,72	***
Conc. Tween-80 x Cepa	2	$8,15 \cdot 10^{-4}$	6,47	**
T x Conc. Tween-80 x Cepa	2	$1,72 \cdot 10^{-3}$	13,7	***
Error	24	$1,26 \cdot 10^{-4}$		

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

El análisis estadístico de la influencia de los factores considerados (temperatura, concentración de surfactante y cepa) en la K_B de cada HAP (Tabla 2), muestra que la interacción entre los tres factores fue estadísticamente significativa para los tres HAP ($p < 0,001$; Tabla 2). Esto significa que los cambios en el valor de uno de estos factores, afectará de manera significativa a K_B . En el caso del naftaleno y antraceno, la temperatura de incubación no fue un factor significativamente influyente cuando es analizada individualmente.

En la Figura 3 se muestra la influencia de la temperatura y de la concentración de surfactante en la K_B de cada HAP en los experimentos inoculados con las tres cepas formando un consorcio. De forma generalizada se puede decir que los valores de K_B de los tres HAP a bajas concentraciones de Tween-80 (0,006; 0,015 mM) fueron mayores a 25 °C. Sin embargo, a concentraciones de surfactante más elevadas (0,15 mM y 40,60 mM) las K_B fueron ligeramente superiores a 15 °C. Para cada temperatura, salvo alguna excepción (Figura 2C, 15 °C), la K_B de los hidrocarburos disminuyó progresivamente conforme aumenta la concentración de Tween-80.

Los análisis estadísticos referentes al proceso de degradación con las tres cepas formando un consorcio, muestran que la interacción entre los dos factores (temperatura y concentración de Tween-80) fue estadísticamente significativa en el caso de los tres hidrocarburos ($p < 0,001$ en todos los casos). Esto significa que los cambios en el valor de uno de estos factores, afectará de manera significativa a K_B . Individualmente, la temperatura y la concentración de surfactante fueron factores significativamente influyentes en la K_B del naftaleno y fenantreno, no lo fue sin embargo la temperatura en la K_B del antraceno.

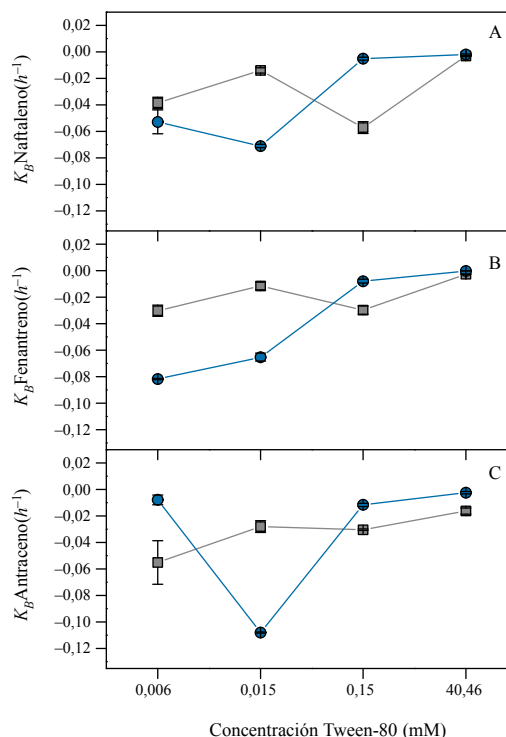


Figura 3. Influencia de la temperatura (25 °C (●) y 15 °C (■)) y de la concentración de surfactante en la K_B del naftaleno (A), fenantreno (B) y antraceno (C) de los experimentos inoculados con las tres cepas formando un consorcio.

Discusión

A pesar de que los factores estudiados en este trabajo han sido muy discutidos, hay muy pocos artículos¹⁵ que estudien la eficiencia del proceso teniendo en cuenta las interacciones entre los factores. Con este objetivo, se analizan estadísticamente los datos de K_B para obtener la influencia de los factores de forma individual y teniendo en cuenta su interacción. De acuerdo con un artículo previo,¹⁶ los resultados obtenidos demuestran que es importante considerar las interacciones entre factores en estudios de biorremediación previa aplicación, debido a que en el medio ambiente existen múltiples interacciones de factores bióticos y abióticos.

Los datos obtenidos sobre el porcentaje total de agotamiento, confirman que las tres cepas son capaces de degradar los HAP para todas las combinaciones de factores¹⁴ (porcentaje de agotamiento HAP > 99% en todos los experimentos). La temperatura es uno de los factores ambientales más determinantes en la biodegradación de HAP. Los resultados obtenidos en este estudio, sugieren de acuerdo a estudios previos¹⁶, que cuando las fluctuaciones en la temperatura son moderadas (en un rango de temperatura comprendido entre los 20-30 °C¹⁷), las tasas de crecimiento pueden verse afectadas pero no impide que la población sea capaz de degradar HAP eficientemente. Sin embargo, los análisis estadísticos muestran que la combinación de los tres factores conlleva ciertas diferencias significativas en la K_B .

Los surfactantes se utilizan comúnmente en la biorremediación para mejorar la solubilidad de HAP, sin embargo, su efecto para cada proceso depende de varios factores como son el tipo microorganismo, el tipo de sustrato o tipo y concentración del surfactante utilizado.³ Algunos autores defienden que los surfactantes tienen efectos negativos en la biorremediación debido a su toxicidad.¹⁴ Sin embargo, otros consideran que los surfactantes no iónicos no son nocivos y en concentraciones por encima de la CMC mejoran el proceso de biodegradación.¹⁸ En este sentido, en un estudio previo confirmamos que el surfactante Tween-80 es óptimo para el tipo de cepas y HAP utilizados en este trabajo¹⁴. Por otro lado, un aspecto negativo de este surfactante es que puede ser utilizado como fuente de carbono por algunos microorganismos,³ pero hemos probado que las cepas bacterianas utilizadas en este estudio también utilizan HAP como fuente de carbono.¹⁴ Este hecho, podría explicar que el mayor crecimiento celular se consigue con las mayores concentraciones de Tween-80 (0,15 mM y 40,60 mM).

Tal y como ya se ha comentado, todos los experimentos y combinaciones de factores resultaron efectivos en la degradación de HAP. Sin embargo, los análisis estadísticos confirmaron que la variación de alguno de los tres factores considerados cuando las cepas son inoculadas independientemente (temperatura, concentración de Tween-80 y cepa, Tabla 2) y la variación en alguno de los dos factores considerados con las cepas en consorcio (temperatura y concentración de Tween-80, Tabla 3), influye significativamente en la K_B de los tres HAP. De acuerdo con nuestros resultados, a 15 °C *Stenotrophomonas* sp. fue la cepa más eficiente en la biodegradación de los HAP de mayor peso molecular (antraceno y fenantreno), significativamente mejor cuando la concentración de Tween-80 fue 0,15 mM. Estos resultados, confirman estudios previos en los cuales la biodegradación a

bajas temperaturas (10 °C) se ve favorecida notablemente por la presencia de surfactante.¹⁷ Se ha encontrado que la solubilidad de los HAP aumenta proporcionalmente con el incremento de la concentración de surfactante por encima de la CMC, aumentando así la disponibilidad de los hidrocarburos por microorganismo.³ Son pocas las publicaciones que han identificado *Stenotrophomonas* sp. como bacteria degradadora³. Sin embargo, en un artículo previo, se ha encontrado que una cepa perteneciente al caldo tipo de *Stenotrophomonas maltophilia*¹⁴ fue capaz de degradar HAP de alto peso molecular en presencia de diferentes surfactantes no iónicos. Recientemente, se ha aislado una cepa de *Stenotrophomonas* sp. de un suelo contaminado, que fue capaz de degradar naftaleno, fenantreno y antraceno de forma más eficaz con Tween-80 como surfactante.¹⁴ Es importante destacar el hecho de que a 15 °C, la capacidad degradadora de *Stenotrophomonas* sp. es mayor que la de *Enterobacter* sp. o *Pseudomonas* sp. (Figura 2). Algunas publicaciones¹⁹ han identificado cepas de *Stenotrophomonas maltophilia* en aguas procedentes del deshielo de glaciares, clasificándola por tanto en el grupo de las bacterias psicrotolerantes y psicrófilas. La aceptable capacidad degradadora de HAP que muestran algunas cepas de *Stenotrophomonas* sp. junto con su capacidad para sobrevivir en ambientes fríos, goza de especial importancia desde el punto de vista aplicado en la biorremediación de ambientes fríos.

Cuando se realizó el proceso de biodegradación a 25 °C, los valores obtenidos de K_B para los tres HAP estudiados fueron superiores que los encontrados a 15 °C. De acuerdo con algunos autores,⁶ por debajo del rango óptimo de temperaturas (20-35 °C), se puede ralentizar la tasa de bio-

Tabla 3. Análisis estadístico de la K_B del naftaleno, fenantreno y antraceno de los experimentos inoculados con las cepas formando un consorcio.

K_B Naftaleno				
Factor	d.f	M.S	F	p
Intercepción	1	72,67	6052,96	***
T	1	0,92	77,45	***
Conc. Tween-80	3	0,80	67,28	***
T x Conc. Tween-80	3	0,78	65,40	***
Error	16	0,012		
K_B Fenantreno				
Intercepción	1	0,022	1949,60	***
T	1	$3 \cdot 10^{-3}$	283,31	***
Conc. Tween-80	3	$3 \cdot 10^{-3}$	333,99	***
T x Conc. Tween-80	3	$2 \cdot 10^{-3}$	240,43	***
Error	16	$1,2 \cdot 10^{-5}$		
K_B Antraceno				
Intercepción	1	0,022	210,11	***
T	1	$1 \cdot 10^{-3}$	1,25	n.s
Conc. Tween-80	3	$2 \cdot 10^{-3}$	21,37	***
T x Conc. Tween-80	3	$3 \cdot 10^{-3}$	28,46	***
Error	16	$1 \cdot 10^{-4}$		

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$

degradación. Nuestros resultados muestran que a 25 °C, *Pseudomonas* sp. fue la cepa bacteriana más efectiva en la degradación de naftaleno, con una concentración de Tween-80 de 0,015 mM de forma óptima. La capacidad de género *Pseudomonas* sp. (*Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*) para degradar los HAP a temperaturas moderadas, ha sido ampliamente estudiada y descrita por numerosos autores.^{3,4,20} Muchas especies de este género, como *Pseudomonas aeruginosa* son capaces de producir biosurfactantes.^{20,21} Esto explica que *Pseudomonas* sp. sea mucho más eficiente con la menor concentración de Tween-80 0,015 mM que el resto de las cepas utilizadas. A esta temperatura, es importante destacar que la cepa de *Enterobacter* sp. tiene un comportamiento de degradación similar a las cepas de las otras dos especies, confirmando por tanto, resultados de estudios previos^{13,22} que describen que la cepa de *Enterobacter* sp. es capaz de degradar naftaleno, fenantreno y antraceno tanto o más eficientemente que *Pseudomonas* sp. y *Stenotrophomonas* sp.

Conclusiones

En ocasiones se sugiere que las tasas de biodegradación son muy altas cuando en el medio contaminado se inocula un consorcio degradador natural extraído de un suelo permanentemente contaminado, en lugar de cepas independientes. Sin embargo y de acuerdo con los resultados aquí presentados, la biodegradación no se ve favorecida cuando el consorcio se forma artificialmente a partir de cepas procedentes de un suelo contaminado (Figura 2). De acuerdo con estos resultados y apoyándonos en publicaciones previas,²³ es posible que la asociación de especies, haya generado relaciones de competencia entre ellas, afectando negativamente a las tasas de biodegradación.

A la vista de los resultados obtenidos se puede concluir que *Pseudomonas* sp., *Enterobacter* sp. y *Stenotrophomonas* sp., cepas utilizadas en este trabajo, tienen una capacidad degradadora de naftaleno, fenantreno y antraceno eficiente a 15 y 25 °C. Sin embargo, a 25 °C la constante de degradación biótica fue mayor, independientemente de la concentración de Tween-80. Es importante destacar que *Stenotrophomonas* sp. fue el género que mostró una mayor tasa de degradación cuando el proceso de biodegradación se desarrolló a 15 °C, por lo que su actividad podría ser apropiada en el medio ambiente con temperaturas por debajo del rango óptimo. Además en este trabajo se confirma de nuevo la capacidad del género *Enterobacter* sp., perteneciente habitualmente a la flora intestinal en el tracto digestivo de los mamíferos, para degradar los HAP.

Bibliografía

1. I. S. Kim, J. S. Park, K. W. Kim, *Appl. Geochem.* **2001**, *16*, 1419–1428.
2. D. J. Luning Prak, P. H. Pritchard, *Water Res.* **2002**, *36*, 3463–3472.
3. S. Boochan, M. L. Britz, G. A. Stanley *Biotechn. Bioengin.* **1998**, *59*, 482–494.
4. D. Jin, J. Xia, J. Xin, Z. Ou, *J. Hazard. Mater.* **2007**, *144*, 215–221.
5. S. Laha, R. G. Luthy, *Biotechn. Bioengin.* **1992**, *40*, 1367–1380.
6. W. Mohn, R. G. Stewart, *Soil Biol. Biochem.* **2000**, *32*, 1161–1172.
7. M. Ericksson, K. Jong, W. Mohn, *Appl. Environ. Microbiol.* **2001**, *67*, 5107–5112.
8. W. Ulric, H. J. Rehm, G. Reed, A. Pühler, P. Stadler, *Biotechnology: Environmental Process II*, Wiley-VCH, **2000**, Vol. 11 b, 5–42.
9. Y. Prabhu, P. S. Phale, *Appl. Microbiol. Biotechn.* **2003**, *61*, 342–351.
10. C. D. Miller, K. Hall, Y. N. Liang, K. Nieman, D. Sorensen, B. Issa, A. J. Anderson, R. C. Sims, *Microbial Ecology* **2004**, *48*, 230–238.
11. Y. Xia, H. Min, G. Rao, J. Liu, Y. F. Ye, X. J. Duan, *Biodegradation* **2005**, *16*, 393–402.
12. A. Chauhan, J. Fazlurrahman, J. G. Oakeshot, R. K. Jain, *Indian J. Microbiol.* **2008**, *48*, 95–113.
13. M. C. Molina, N. González, L. F. Bautista, R. Sanz, R. Simarro, I. Sánchez, L. Sanz, *Biodegradation* **2009**, *20*, 789–800.
14. L. F. Bautista, R. Sanz, M. C. Molina, N. González, D. Sánchez, *International Biodeterioration Biodegradation* **2009**, *63*, 913–922.
15. J. Chen, M. H. Wong, N. Tam, *Marine Pollution Bulletin* **2008**, *57*, 695–702.
16. R. Simarro, N. González, L. F. Bautista, M. C. Molina, *Water Air Soil Pollution* **2012**, *223*, 3437–3444.
17. C. Sartoros, L. Yerushalmi, L. Berón, S. Guiot, *Chemosphere* **2005**, *61*, 1042–1050.
18. F. Volkering, A. M. Breure, J. G. van Andel, W. H. Rulkens, *Appl. Environ. Microbiol.* **1995**, *61*, 1699–1705.
19. Y. Liu, T. Yao, N. Jiao, S. Kang, S. Huang, Q. Li, K. Wang, X. Liu, *Extremophiles* **2009**, *13*, 89–99.
20. M. Dhote, A. Juwarhar, A. Kumar, G. S. Kanade, T. Chakrabarti *World J. Microbiol. Biotechnol.* **2010**, *26*, 329–335.
21. S. Lladó, N. Jiménez, M. Viñas, A. M. Solanas, *Biodegradation* **2009**, *20*, 593–601.
22. F. L. Toledo, C. Calvo, B. Rodelas, J. González-López, *System Appl. Microbiol.* **2006**, *29*, 244–252.
23. N. González, R. Simarro, M. C. Molina, L. F. Bautista, L. Delgado, J.A. Villa, *Bioresource Technol.* **2011**, *102*, 9438–9446.