



Efecto de la temperatura y del pH sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBLA-04 en solución mínima de sales con detergente Ace

Effect of temperature and pH on *Pseudomonas aeruginosa* growth in minima-salt solution with Ace detergent

Juan J. Guevara González, Irma N. Castañeda Carrión, Jaime Juárez Alcántara y Arturo Mendoza Fernández

Departamento de Microbiología y Parasitología. Universidad Nacional de Trujillo. Trujillo. Perú.

RESUMEN

Entre los diversos contaminantes de naturaleza orgánica de mayor trascendencia a nivel mundial se menciona a los detergentes que ocasionan variado impacto sobre el medio ambiente, provocando así un daño severo a la fauna y flora del sistema acuático; sin embargo, existen en el ambiente acuático ciertos microorganismos que degradan eficazmente dichos detergentes cuando predominan condiciones adecuadas de temperatura, pH, salinidad, oxígeno disuelto y otros; por consiguiente, en el presente trabajo se determinó el efecto de la de temperatura y el pH sobre el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBLA-04 en una solución mínima de sales (caldo base) con detergente Ace a la concentración de 500 ppm. Se realizó un muestreo de las aguas residuales de pozas de oxidación de las lagunas de oxidación del sector Covicorti, que fueron sembradas en placas con agar cetrimide; luego, se realizó el aislamiento e identificación respectiva. Se construyó diez sistemas de biorreactores aireados y agitados, en donde se agregó el caldo base más detergente y la suspensión de *P. aeruginosa* MBLA-04 para lo cual se utilizó las temperaturas de 15, 25 y 35 °C en combinación con los pH 6, 7 y 8 según diseño factorial de 3x3. El crecimiento evaluado a los 3, 8 y 12 días fue constante mostrando ciertas diferencias no significativas en los tratamientos ($p > 0.05$).

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, biorreactores, temperatura, pH, salinidad

ABSTRACT

Among the various organic pollutants in nature greater global significance are mentioned detergents that cause varied impact on the environment, causing severe damage to the flora and fauna of the aquatic system, however, exist in the aquatic environment some effectively degrading microorganisms such detergents when appropriate temperature conditions prevail, pH, salinity, dissolved oxygen and others, therefore, in the present work was to determine the effect of temperature and pH on the growth of *Pseudomonas aeruginosa*-04 MBLA minimal salts solution (soup base) Ace detergent concentration to 500 ppm. A sampling of wastewater oxidation ponds to oxidation ponds Covicorti sector, which were seeded in cetrimide agar, then performed the isolation and identification respectively. Ten sets built aerated and agitated bioreactors, where the broth added detergent base and suspension of *P. aeruginosa* MBLA-04 which was used for temperatures of 15, 25 and 35 ° C in combination with pH 6, 7 and 8 as 3x3 factorial design. The growth evaluated at 3, 8 and 12 days was constant showing no significant differences in certain treatments ($p > 0.05$).

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*, bioreactors, temperaturea, pH, salinity



INTRODUCCION

El incremento en el desarrollo urbano, agrícola e industrial incrementa la contaminación de los ecosistemas acuáticos; las zonas costeras del mar, así como los ríos, bahías, y lagunas, se han visto amenazados por la introducción de sustancias dañinas como son los jabones y detergentes, para la fauna, flora y microbiota acuática¹; dichos compuestos son los contaminantes orgánicos de mayor trascendencia a nivel mundial. El impacto desfavorable al ambiente por detergentes se debe principalmente al aporte continuo de aguas residuales que contienen altas concentraciones de jabones y detergentes; y esto, es debido a la ausencia de un eficiente tratamiento de aguas las residuales que deterioran la calidad del agua de los cuerpos receptores, ocasionando daño severo a la microfauna y microflora del sistema acuático que recibe la descarga^{2,3,4}.

La mayoría de detergentes contienen surfactantes, estos compuestos actúan en procesos biológicos de tratamiento de aguas residuales y son la causa de problemas en la aireación debido a su potencial de alta formación de espuma y baja oxigenación, produciendo la muerte de organismos acuáticos; la relación que existe entre los surfactantes y microorganismos es compleja e involucra otros factores distintos de la biodegradación y que, en condiciones adecuadas, los surfactantes pueden actuar como bactericidas y bacteriostáticos. Las bacterias Gram positivas son notablemente afectadas por 10 a 20 ppm de surfactantes; mientras que, mil ppm puede no tener efecto en muchas Gram negativas. Por tanto, los microorganismos Gram negativos son mucho más tolerantes a las concentraciones de surfactantes presentes en los medios de aislamientos que los organismos Gram positivos^{2,4,8}.

En Nigeria (2008) se aisló bacterias del río Otamiri, las que fueron experimentalmente confrontadas con los detergentes Omo®, Jet® y de Persil®. Las bacterias pertenecieron a los géneros *Bacillus*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas*, *Actinomyces*, *Corynebacterium*, *Serratia* y *Staphylococcus*. La utilización de los detergentes estudiados reveló un crecimiento progresivo de bacterias con relación al tiempo desde las cero hasta las 192 horas. Solamente las especies de los géneros *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Actinomyces*, *Corynebacterium* y *Staphylococcus* sobrevivieron más tiempo y utilizaron los detergentes de prueba en el agua. La evaluación específica de utilización de detergente reveló que pueden utilizar los detergentes de forma sola o combinada; *Pseudomonas* presentó la capacidad más alta, mientras que *Staphylococcus* presentó menos capacidad de utilizar dichos detergentes. El análisis estadístico reveló cambios significativos en la densidad óptica del caldo detergente con los organismos probados, demostrándose más capacidad de utilizar los detergentes Omo® y Jet® que el Persil®. El resultado revela la capacidad de las bacterias naturales acuáticas de degradar detergentes en ecosistema acuático⁷.

En otro trabajo realizado en el mismo año, también en Nigeria, se estudió la biodegradación de componentes principales de los productos del detergente sintético conocido como lineal alquilbenceno sulfonato (LAS) por bacterias propias de aguas residuales; las bacterias aisladas fueron *Enterococcus majadoratus*, *Klebsiella liquefaciens*, *Enterobacter liquefaciens*, *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli*, *Enterobacter agglomerans*, *Staphylococcus albus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus sp.*, *Klebsiella oxytoca*, *Brevibacterium sp.*, aquí se observó que el pH alcalino y el rango de temperaturas mesofílicas (33,9-34,3°C) resultaron ser muy favorables en las actividades metabólicas de degradadores de detergentes en el ecosistema de aguas tropicales⁸.

De acuerdo con la literatura consultada a nuestro alcance, no se reportan trabajos que se hayan realizado en el Perú acerca de la degradación de los detergentes comunes por bacterias aisladas de aguas residuales o de río, probadas a diferentes temperaturas y diferentes pH; es por esta razón que, con la finalidad de obtener e incrementar conocimientos que puedan aplicarse la utilización, ya sea de lagunas o de biorreactores para el tratamiento a temperatura y pH correctos, de aguas contaminadas con detergentes, la presente investigación tiene por finalidad conocer: ¿Cuál es el efecto de las temperaturas de 15, 25 y 35°C en combinación con los pH 6, 7 y 8 sobre *P. aeruginosa* MBLA-04 aislada de aguas residuales de una laguna de oxidación del sector Covicorti (Trujillo, Perú), en su crecimiento utilizando el dodecibenceno sulfonato de sodio (Ace)?



MATERIAL Y METODOS

Muestra:

Pseudomonas aeruginosa MbLA-04, aislada de aguas residuales de una Laguna de Oxidación de Covicorti, Trujillo - La Libertad, e identificada en el Laboratorio de Microbiología ambiental del Dpto. de Microbiología y Parasitología de la UNT.

Detergente Ace (bolsa de 500 g) adquirida en los puestos de expendio del mercado Mayorista de Trujillo-La Libertad-Perú entre Mayo y Junio del 2012. El principio activo del detergente Ace es el dodecilbenceno sulfonato de sodio (DDBSNa).

Colección de la muestra

La muestra para el aislamiento de *P. aeruginosa* se obtuvo de las aguas residuales de tres pozas de oxidación de Covicorti, donde se recolectó en tres frascos estériles de 500 mL, los cuales fueron llenados hasta el cuello; posteriormente se tapó, selló y se guardó en un cooler para su traslado al laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional De Trujillo.

Aislamiento de *P. aeruginosa*

Las tres muestras de agua fueron homogeneizadas y sembradas en la superficie de Agar Cetrimide, que es un medio selectivo para especies de pseudomonas; Luego, se incubó a 35°C por 24 y 48 horas. Las colonias compatibles con pseudomonas fueron resembradas en Agar Glutamato para diferenciar características de la especie, este medio de cultivo se incubó a 42°C.

Pruebas bioquímicas para identificación de *P. aeruginosa*

Se realizaron las siguientes pruebas bioquímicas:

Oxidasa, Catalasa, VP-RM, Hidrólisis de la gelatina, Actividad de ureasa y crecimiento en caldo glutamato.

Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron comparados teniendo una cepa control (cultivo puro de *P. aeruginosa* CPTP) los cuales nos llevaron a confirmar que la bacteria aislada fue *P. aeruginosa*,⁽⁹⁾ asignándole el código MBLA-04.

Obtención de Cultivo Puro *P. aeruginosa* MBLA-04.

A partir de las colonias desarrolladas que se obtuvieron en agar cetrimide, se realizó frotises y coloraciones para observación microscópica y comprobación de pureza, luego se preparó cultivos puros sembrándolos en agar común de preservación para ser trabajadas posteriormente.

Preparación del inóculo

Se procedió a preparar una suspensión de *P. aeruginosa* MBLA-04 en solución salina fisiológica y se tomó como referencia al tubo N° 3 del nefelómetro de Mac Farland (aproximadamente 9×10^8 UFC/mL). Luego, se sembró por duplicado las diluciones 10^{-6} y 10^{-7} para estandarización del inóculo.

Construcción de biorreactores aireados y agitados

Con botellas grandes de vidrio transparente se confeccionaron frascos de 1L de capacidad, luego, con jebe microporoso se construyeron las tapas con orificios para inoculación y toma de muestras, y para adaptar motorcitos de 6 voltios que hacen girar pequeñas hélices hechos de rayitos de bicicletas; así, se fabricó 10 biorreactores aireados y agitados, los cuales fueron probados en su funcionamiento. Luego, se esterilizó en autoclave y algunas partes en cámara de luz ultravioleta, para ser utilizados en la experiencia.



Preparación del caldo base con detergente

El caldo de cultivo para la experiencia consistió en 500 mL/ biorreactor de una solución de sales: K_2HPO_4 1%, NaH_2PO_4 1%, NaCl 0.5%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 1% y $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 2%, y como fuente estimuladora asparragina al 0.2%; a esta solución se le adicionó 500 ppm del detergente Ace. Se esterilizaron por separados las soluciones, luego se mezclaron, se homogeneizó y se repartió en todos los biorreactores, cada uno tuvo los mismos volúmenes^{4,10,11,12,13,14}

Inoculación de *P. aeruginosa* en los biorreactores

A cada uno de los diez biorreactores (uno control y nueve experimentales) se agregó 1mL de la suspensión bacteriana estandarizada mediante recuento en placa, siendo de 1.06×10^{10} UFC/mL. El pH de los biorreactores fue de 6, 7 y 8 (según diseño factorial). Para incrementar el pH se utilizó HCl 0.1 N y para disminuir el pH se utilizó NaOH al 1%. Luego, se llevó a incubar a 15°C, 25°C y 35°C (según el diseño factorial).

Monitoreo de la estabilidad del pH y la temperatura

Se monitoreó el pH y la temperatura todos los días para corregir cualquier variación. Durante 12 días se realizó el monitoreo del crecimiento de *P. aeruginosa* MBLA-04 extrayendo cada 3 días 0.5 mL del caldo base con el detergente; luego, se realizó diluciones de 10^{-6} y 10^{-7} y se sembraron en superficie de agar nutritivo y se incubó a 35°C por 24 horas^{3,15,16,17,18}.

Análisis Estadístico

Los resultados obtenidos del crecimiento de *P. aeruginosa* MBLA-04 en los diez biorreactores (las nueve combinaciones de tres valores de temperatura con tres valores de pH y un grupo control), fueron sometidos a la prueba estadística de análisis de varianza (ANAVA) para determinar si encontraban diferencias significativas entre dichas combinaciones.

RESULTADOS

Al término de las experiencias realizadas, se encontró que el crecimiento de *P. aeruginosa* MBLA-04 fue muy pobre en el biorreactor control (sin el detergente Ace, a 35°C, a pH 7 y sólo con asparragina al 0.2%) desde los cero a los tres días; luego, desde los tres hasta los ocho y 12 días de evaluación no hubo crecimiento, por el contrario el número de células bacterianas disminuyó ligeramente (Tabla 1).

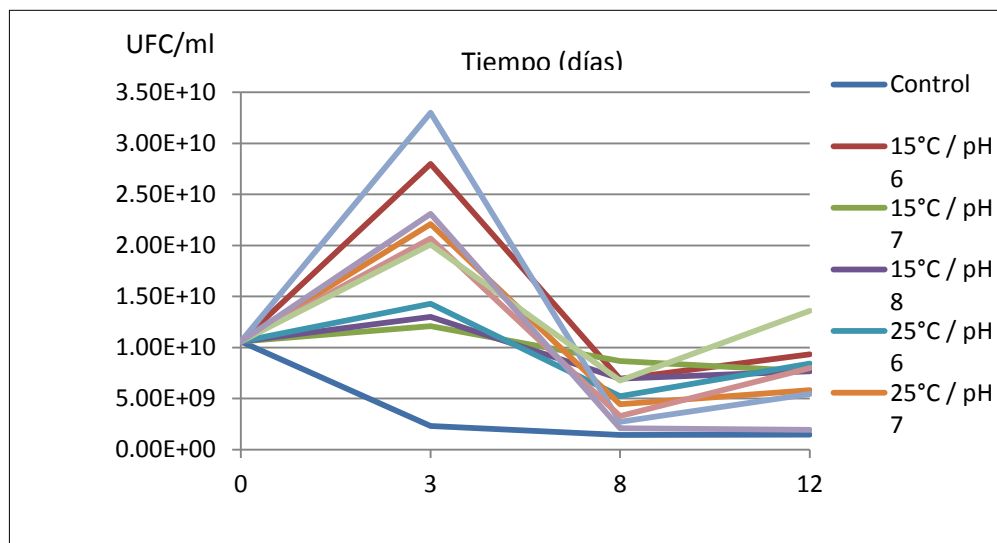
En los nueve tratamientos experimentales, expuestos a 15°C, 25°C y 35°C en combinación con los pH 6, 7 y 8 en solución mínima de sales con detergente Ace, el crecimiento fue alto desde los cero hasta los tres días, luego sufrió una baja hasta los 8 días; sin embargo, empezó a aumentar hasta los doce días en que terminó la evaluación (Tabla 1 y Fig. 2).

En general, el mayor crecimiento se produjo a los 35°C y al pH 7.0 (Fig. 3); pero, las diferencias con las otras temperaturas en combinación con cada pH no fueron significativas.



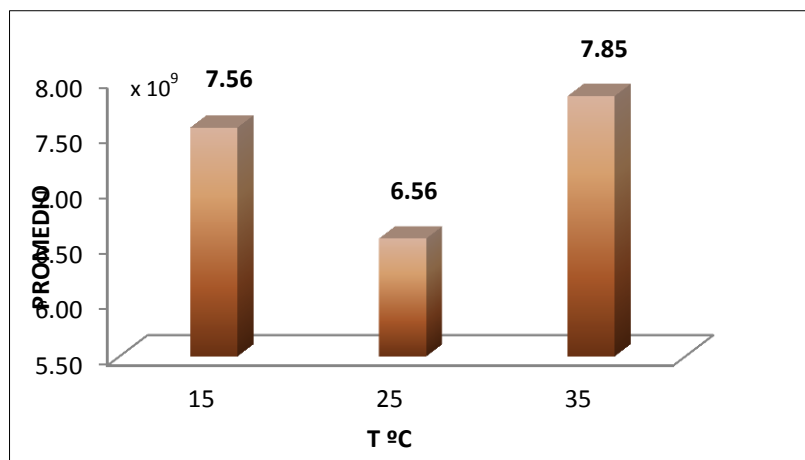
Tabla1. Recuento de colonias de *P. aeruginosa* MBLA-04 a 15, 25 y 35°C en combinación con pH: 6, 7 y 8 en solución mínima de sales con dodecilbenzeno sulfonato de sodio, a los 3, 8 y 12 días de incubación.

T°C	pH	Días		
		3	8	12
		UFC/ml		
15	6	2.80x10 ¹⁰	6.91x10 ⁹	9.35x10 ⁹
	7	1.21x10 ¹⁰	8.69x10 ⁹	7.67x10 ⁹
	8	1.30x10 ¹⁰	6.97x10 ⁹	7.67x10 ⁹
25	6	1.43x10 ¹⁰	5.22x10 ⁹	8.43x10 ⁹
	7	2.21x10 ¹⁰	4.44x10 ⁹	5.82x10 ⁹
	8	3.30x10 ¹⁰	2.72x10 ⁹	5.44x10 ⁹
35	6	2.07x10 ¹⁰	3.30x10 ⁹	8.00x10 ⁹
	7	2.01x10 ¹⁰	6.77x10 ⁹	1.36x10 ¹⁰
	8	2.31x10 ¹⁰	2.10x10 ⁹	1.94x10 ⁹
Control		2.31x10 ⁹	1.45x10 ⁹	1.48x10 ⁹



p > 0.05

Fig 1. Crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBLA-04 a 15, 25 y 35°C en combinación con los pH 6, 7 y 8 en solución mínima de sales con dodecilbenzeno sulfonato de sodio, a los 3, 8 y 12 días de incubación.



$p > 0.05$

Fig 2. Promedio de crecimiento de *P. aeruginosa* MBLA-04 a 15, 25 y 35°C en combinación con los pH 6, 7 y 8 en solución mínima de sales con dodecilbenzeno sulfonato de sodio, a los 12 días de incubación.

DISCUSIÓN

Según Campos-García, el dodecilbenzeno sulfonato de sodio (DDBSNa) se degrada completamente en las plantas de tratamiento de aguas residuales, participando diferentes grupos de organismos en su mineralización completa. Un consorcio de cuatro miembros fue identificado como responsable de la mineralización del dodecilbenzeno sulfonato de sodio, y otro más grande se encontró participando en la mineralización de un ambiente marino; en estos consorcios, algunos de los miembros degradaron la cadena lateral, mientras que otros degradaron la mitad del anillo aromático¹⁹. *P. aeruginosa* MBLA-04, aislada de la planta de tratamientos de lagunas de oxidación de Covicorti, Trujillo-Perú, por su capacidad de crecer en el medio conteniendo dodecilbenzeno sulfonato de sodio, es capaz de utilizar dicho compuesto como fuente de carbono para la síntesis de su material celular y para la obtención de energía química.

Según Horvath y Koft, determinaron que *Pseudomonas sp.* HK-1 mostró una relación directa entre la concentración del alquilbenzeno sulfonato (ABS) proporcionado y el rendimiento de la célula, cuando se le adiciona un compuesto orgánico como la glucosa que se suministra en una concentración limitante²⁰. Para estimular que *P. aeruginosa* degrade al detergente se le adiciona asparragina en pequeñas cantidades (0.2%), este compuesto orgánico le sirve como sustrato inicial mientras prepara las enzimas para la degradación del principio activo DDBSNa. El crecimiento fue mayor en el día tres del monitoreo, pues es probable que para ese día las bacterias ya modificaron su batería enzimática para poder usar el detergente como fuente carbonada; al contrastar el gráfico de los ensayos se observa que el ensayo control no presenta crecimiento hacia el día tres de monitoreo, debido que el cultivo bacteriano tuvo que haber consumido primero la fuente nitrogenada procedente de la asparragina y al agotarse la fuente carbonada ya no fue posible seguir con su desarrollo, el crecimiento se habría inhibido, entonces empieza la fase de muerte que se muestra mucho más marcada hacia el día octavo, que se mantiene casi igual hacia el día decimosegundo.

Según Williams y Payne, las enzimas inducidas en un cultivo bacteriano cuando crece en presencia de dodecil sulfato de sodio, son las *alquilo sulfatasas* que son inducidas para el crecimiento en caldo nutritivo más dodecil sulfato sódico (SDS) en un cultivo bacteriano que se denominó *Pseudomonas* C12B²¹. *P. aeruginosa* es una especie bacteriana con un sistema metabólico oxidativo muy versátil, y además, muestra resistencia a una gran variedad de agentes físicos y sustancias químicas; esto es debido a que posee una



carga genética muy amplia, que le permite sintetizar diversas enzimas con capacidad para descomponer dichos compuestos y poder metabolizarlos, para usar algunos productos como fuente de carbono y de energía.

La utilización del DDBSNa por *P. aeruginosa* MBLA-04 fue confirmada por el crecimiento constante en los nueve biorreactores (experimentales), lo que fue medido mediante el recuento de colonias desarrolladas en agar nutritivo e incubadas a 35°C. Los pH se midieron con cintas de pH graduadas y las variaciones del pH en los biorreactores aireados y agitados fueron corregidas y ajustados con NaOH 1N para alcalinizar y con HCl 0.1N para acidificar; las temperaturas ensayadas fueron establecidas en rangos de 15°C (+/-1), 25°C (+/-1) y 35°C (+/-1).

El número de células de *P. aeruginosa* MBLA-04 correspondientes al inóculo en el día cero tuvieron valores de $1,06 \times 10^{10}$ UFC/mL; desde el recuento inicial al 3, luego a los 8 y finalmente a los 12 días, el recuento mostró variación en los nueve tratamientos, esto fue producto del impacto del DDBSNa y de los diferentes pH y diferentes temperaturas. Arkin y Anderson encontraron una inhibición moderada de crecimiento de las células, como lo demuestra la fase de latencia alargada y un bajo número de células en la fase estacionaria, en medios que contenían el dodecibenceno sulfonato de sodio²².

La solución mínima de Davis que contenía sólo sales inorgánicas (medio basal) suplementado con el principio activo del detergente Ace (DDBSNa), fue enriquecido con el aminoácido asparragina al 0.2% con el fin de evitar el impacto negativo sobre las bacterias y la inhibición temporal de su crecimiento. El medio se esterilizó en autoclave, pero sin conseguir eliminar el surfactante, que en gran parte dificulta la aireación necesaria para el metabolismo bacteriano⁴. El medio mínimo de sales que fue descrito por Payne y Feisal (1963) se ajustó a pH 7,5²¹. La determinación experimental del pH, donde mejor crecimiento tiene *P. aeruginosa* dependió de la temperatura a la que se incubó, siendo el mayor crecimiento al pH 8 en combinación con una temperatura de 25°C, con un recuento de $3,30 \times 10^{10}$ UFC/mL a los 12 días de iniciado el tratamiento. Pero, en relación con el inóculo el cual fue de $1,06 \times 10^{10}$ UFC/mL el mayor crecimiento se produjo en el pH de 7.0 en combinación con la temperatura de 35°C, con un recuento de $1,36 \times 10^{10}$ UFC/mL a los 12 días de finalizado el tratamiento.

El promedio de los recuentos celulares de *P. aeruginosa* MBLA-04 en el grupo control fue siempre inferior a los promedios de los grupos experimentales, puesto que dicho grupo no tuvo como fuente de carbono al detergente Ace, por esto mismo su crecimiento se detuvo desde antes de los tres días. El dodecibenceno sulfonato de sodio se presenta como única fuente aprovechable de carbono y de energía para el crecimiento del microorganismo evaluado^{21., 22, 23, 24}.

CONCLUSIONES

- Las temperaturas de 15, 25 y 35°C en combinación con los pH 6, 7 y 8 usando biorreactores aireados y agitados de 1L de capacidad, permiten el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* MBLA-04, utilizando una solución de sales básicas suplementadas con 500 ppm del detergente Ace, cuyo principio activo el dodecibenceno sulfonato de sodio, le sirve como fuente de carbono para su crecimiento y como fuente de energía para sus actividades metabólicas.
- El crecimiento bacteriano que fue evaluado a los tres, ocho y doce días, presentó algunas diferencias; sin embargo, tales diferencias no llegaron a ser significativas. La temperatura y el pH óptimos que presentaron un mayor crecimiento de *P. aeruginosa* MBLA-04 teniendo como fuente carbonada el dodecibenceno sulfonato de sodio, en solución mínima de sales, fue de 35°C y pH de 7; sin embargo, no se alcanzó diferencias significativas.



REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Sigoillot JC, Nguyen MH. Complete oxidation of linear alkylbenzene sulfonate by bacterial communities selected from coastal seawater. *Appl Environ Microbiol* 1992; 58 (4): 1308-1312.
2. Goodnow RA, Harrison AP. Bacterial Degradation of Detergent Compounds. *Appl Microbiol* 1972; 24 (4): 555-560.
3. Kertesz MA, Kölbener P, Stockinger H, Beil S, Cook AM. Desulfonation of linear alkylbenzenesulfonate surfactants and related compounds by bacteria. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60 (7): 2296-2303.
4. Willetts AJ, Cain RB. Microbial metabolism of alkylbenzene sulphonates. Bacterial metabolism of undecylbenzene-p-sulphonate and dodecylbenzene-p-sulphonate. *Biochem J* 1972; 129 (2): 389-402.
5. Amirmozafari N, Malekzadeh F, Hosseini F, Ghaemi N. Isolation and identification of anionic surfactant degrading bacteria from activated sludge. *Iran Biomed J* 2007; 11 (2): 81- 86.
6. Ojo OA, Oso BA. Biodegradation of synthetic detergents in wastewater. *Afr J Biotechnol* 2009; 8 (6): 1090-1109
7. Ogbulie TE., Ogbulie JN, Umezuruike I. Biodegradation of detergents by aquatic bacterial flora from Otamiri River, Nigeria. *Afr J Biotechnol* 2008; 7 (6): 824-830.
8. Ojo OA, Oso BA. Isolation and characterization of synthetic detergent-degraders from wastewater. *Afr J Biotechnol* 2008; 7 (20): 3753-3760.
9. Langsrud, S, Sundheim G. Factors contributing to the survival of poultry associated *Pseudomonas* spp. exposed to a quaternary ammonium compound. *Appl Microbiol* 1997; 82: 705-712.
10. Stelmack PL, Gray MR, Pickard MA. Bacterial Adhesion to Soil Contaminants in the Presence of Surfactants. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65 (1): 163-168.
11. Hosseini, F, Malekzadeh F, Amirmozafari N, Ghaemi N. Biodegradation of anionic surfactants by isolated bacteria from activated sludge. *Int J Environ Sci Tech* 2007; 4 (1): 127-132.
12. Fall RR, Brown JL, Schaeffer TL. Enzyme recruitment allows the biodegradation of recalcitrant branched hydrocarbons by *Pseudomonas citronellolis*. *Appl Environ Microbiol* 1979; 38 (4): 715-722.
13. Gledhill WE. Screening test for assessment of ultimate biodegradability: linear alkylbenzene sulfonates. *Appl Microbiol* 1975; 30 (6): 922-929.
14. Pineda Flores G, Monterrubio Badillo C, Hernández Cortázar M, Nolasco Hipólito C, Sánchez Pérez R, García Sánchez I. toxic effects of linear alkylbenzene sulfonate, anthracene and their mixture on growth of a microbial consortium isolated from polluted sediment. *Rev Int Contam Ambie* 2010; 26 (1): 39-46.
15. Schleheck D, Dong W, Denger K, Heinzle E, Cook AM. An alpha-proteobacterium converts linear alkylbenzenesulfonate surfactants into sulfophenylcarboxylates and linear alkyldiphenyletherdisulfonate surfactants into sulfodiphenylethercarboxylates. *Appl Environ Microbiol* 2000; 66 (5): 1911-1916.
16. Soberón-Chávez G, Campos J, Haïdour A, Ramos JL, Ortigoza J. Selection and preliminary characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain mineralizing selected isomers in a branched chain dodecylbenzenesulphonate mixture. *World J Microbiol Biotechnol* 1996; 12(4): 367-372.
17. Tanghe T, Dhooge W, Verstraete W. Isolation of a Bacterial Strain Able to Degrade Branched Nonylphenol. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65 (2): 746-751.
18. Langsrud, S, Sundheim G, Borgmann-Strahsen R. Intrinsic and acquired resistance to quaternary ammonium compounds in food-related *Pseudomonas* spp. *Appl Microbiol* 2003; 95: 874-882.
19. Campos-García J, Esteve A, Vásquez-Duhalt R, Ramos JL, Soberón-Chavez G. The Branched-Chain Dodecylbenzene Sulfonate Degradation Pathway of *Pseudomonas aeruginosa* W51D Involves a Novel Route for Degradation of the Surfactant Lateral Alkyl Chain. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65 (8): 3730-3734.
20. Horvath RS, Koft BW. Degradation of Alkyl Benzene Sulfonate by *Pseudomonas* Species. *Appl Microbiol* 1972; 23 (2): 407-414.
21. Williams J, Payne WJ. Enzymes Induced in a Bacterium by Growth on Sodium Dodecyl Sulfate. *Appl Microbiol* 1964; 12 (4): 360-362.
22. Pollack VA, Anderson DA. Growth Responses of *Escherichia coli* to the surfactant dodecyl benzene sulfonate: *Appl Microbiol* 1970; 20 (5): 727-733.
23. Takenaka S, Tonoki, T, Taira K, Murakami S, Aoki K. Adaptation of *Pseudomonas* sp. Strain 7-6 to Quaternary Ammonium Compounds and Their Degradation via Dual Pathways. *Appl Environ Microbiol*. 2007; 73 (6): 1797-1802.
24. Hales SG, Dodgson KS, White GF, Jones N, Watson GK. Initial Stages in the Biodegradation of the Surfactant Sodium Dodecyltriethoxy Sulfate by *Pseudomonas* sp. Strain DES1. *Appl Environ Microbiol* 1982; 44 (4): 790-800.