

# BACTERIAS DEL GÉNERO *Bacillus* DEGRADADORAS DE N-HEXADECANO AISLADAS DEL SEDIMENTO MARINO: PARÁMETROS CINÉTICOS

Yoania Cabranes Campos <sup>1\*</sup>, Roberto Rafael Núñez Moreira <sup>1</sup>, Jorge Martínez Silva <sup>2</sup> y Eudalys Ortiz Guilarte <sup>1</sup>

(1) Centro de Bioproductos Marinos. Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Loma y 37, Municipio Plaza, CP 10600, Ciudad Habana, Cuba.

(2) Facultad de Biología, Universidad de La Habana, Calle 25 y J, Municipio Plaza, Cuba.

(\*) Autor correspondiente : Email: [cabranes75@yahoo.es](mailto:cabranes75@yahoo.es)

## RESUMEN

La contaminación del ambiente marino por hidrocarburos del petróleo, es cada vez más alarmante por los nefastos daños que ocasiona. El bioproducto BIOIL-FC, diseñado para combatir los derrames de petróleo, está formado por bacterias degradadoras de hidrocarburos, tales como *Bacillus alcalophilus* cepa CBM-225 y *Bacillus licheniformis* cepa CBM-60. El presente trabajo está dirigido a determinar y comparar los parámetros cinéticos del crecimiento de las cepas CBM-225 y CBM-60 en n-hexadecano mediante el conteo en cámara de Neubauer y el método de Lineweaver-Burk, así como definir los nuevos modelos de inhibición del crecimiento. La cepa CBM-60 presentó mayor velocidad específica de crecimiento máxima ( $0,302 \pm 0,096 \text{ h}^{-1}$ ) y afinidad ( $4,040 \pm 0,096 \text{ gL}^{-1}$ ) por el n-hexadecano con respecto a la cepa CBM-225 ( $0,217 \pm 0,116 \text{ h}^{-1}$  y  $11,670 \pm 0,116 \text{ gL}^{-1}$  respectivamente), no reflejando inhibición de su crecimiento hasta los  $60 \text{ gL}^{-1}$  de concentración del hidrocarburo. Sin embargo, el crecimiento de la cepa CBM-225 se inhibió a partir de los  $23 \text{ gL}^{-1}$  de concentración de éste, con un comportamiento distinto al expresado por Monod, por lo que se determinaron modelos de inhibición y de saturación nuevos.

Palabras clave: hexadecano; parámetros cinéticos del crecimiento; velocidad; afinidad; inhibición; saturación; *Bacillus alcalophilus*; *Bacillus licheniformis*.

## ABSTRACT

The marine environment contamination by hydrocarbons of the petroleum is very alarming for the disastrous damages that it causes. BIOIL-FC bioproduct, designed to combat the oil spills, is formed by degradators bacterias of hydrocarbons, such as *Bacillus alcalophilus* CBM-225 strain and *Bacillus licheniformis* CBM-60 strain. The present work had been developed to determine and to compare the growth kinetic parameters of the CBM-225 and CBM-60 strain in n-hexadecane for the count in Neubauer camera and Lineweaver-Burk method, as well as to define the new growth inhibition models. The CBM-60 strain presented bigger specific speed of growth maxim ( $0,302 \pm 0,096 \text{ h}^{-1}$ ) and affinity ( $4,040 \pm 0,096 \text{ gL}^{-1}$ ) by n-hexadecane respect CBM-225 strain ( $0,217 \pm 0,116 \text{ h}^{-1}$  and  $11,670 \pm 0,116 \text{ gL}^{-1}$  respectively), and this strain did not reflect inhibition of its growth until  $60 \text{ gL}^{-1}$  of hydrocarbon concentration. However, growth CBM-225 strain was inhibited since  $23 \text{ gL}^{-1}$  of concentration, with a different behaviour to the express by Monod, that's why a new inhibition and saturation model was determined.

Key words: hexadecane, growth kinetic parameters; affinity; inhibition; saturation; *Bacillus alcalophilus*; *Bacillus licheniformis*.

La contaminación ambiental por hidrocarburos del petróleo y en particular del ambiente marino, es cada vez más alarmante por los nefastos daños que ocasiona. El océano constituye un ecosistema muy dinámico y complejo, que el hombre está destruyendo con contaminantes químicos, entre ellos el petróleo y sus derivados, llegando a comprometer la trama alimentaria del medio marino (Margesin y Schinner, 2001).

La posición geográfica de nuestro archipiélago y el tráfico marítimo en torno al mismo, así como la

creciente explotación y perforación de pozos de petróleo en nuestra plataforma, aumentan considerablemente la posible contaminación de las costas.

Desde finales de la década del 80 del siglo pasado, el departamento de Microbiología Aplicada del Centro de Bioproductos Marinos (CEBIMAR) perteneciente al Ministerio de Ciencia Tecnología y Medio Ambiente, ha trabajado en el aislamiento y conservación de bacterias aisladas de ecosistemas marinos capaces de degradar petróleo (Joseph *et*

*al.*, 1994; Núñez, 2003; Ortiz, 2004), las cuales forman parte de la Colección de Bacterias Marinas (CBM) del centro en la actualidad.

A partir de una selección de estas cepas se formuló el bioproducto BIOIL-FC. La efectividad de este bioproducto se ha comprobado durante los tratamientos de derrames de petróleo ocurridos en la Bahía de Cienfuegos y de Matanzas, en el recalo accidental de petróleo que contaminó la Playa Arroyo Bermejo en Jibacoa y en la Ensenada de Arroyo Blanco en Holguín (Núñez, 2003) con resultados satisfactorios.

El BIOIL-FC está formado por cinco bacterias degradadoras de hidrocarburos, Dentro de éstas se encuentran *Bacillus alcalophilus* cepa CBM-225 y *Bacillus licheniformis* cepa CBM-60 como las más importantes y las escogidas para desarrollar el siguiente estudio. La cepa CBM-225 fue seleccionada, pues se demostró por Cromatografía Gaseosa de Alta Resolución que es la responsable de un alto porcentaje de la actividad del bioproducto en los derrames de petróleo (Joseph, 1996) y la cepa CBM-60, además de pertenecer al mismo género la cepa CBM-225, produce tensioactivos en sustratos hidrosolubles. El objetivo del presente trabajo fue determinar y comparar los parámetros cinéticos del crecimiento de *Bacillus alcalophilus* cepa CBM-225 y *Bacillus licheniformis* cepa CBM-60 en presencia n-hexadecano, uno de los hidrocarburos predominantes del petróleo cubano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Microorganismos empleados

El trabajo fue realizado con *Bacillus alcalophilus* cepa CBM-225 (Núñez, 2003) y *Bacillus licheniformis* cepa CBM-60 (Ortiz *et al.*, 2002) aislados de los sedimentos de la Bahía de Cárdenas, Matanzas y pertenecientes a la CBM del CEBIMAR.

### Medios de Cultivo

Para la conservación de las cepas CBM-225 y cepa CBM-60 se utilizó el medio 6 agarizado para bacterias marinas heterótrofas según Gorbienko (1961), la fermentación para la obtención de la biomasa microbiana de la cepa CBM-225 se realizó según Núñez (2003) y para la cepa CBM-60 se llevó a cabo según Ortiz (2004). Los estudios cinéticos del crecimiento se desarrollaron en el medio de degradación de hidrocarburos propuesto por Núñez (2003), estos medios contenían concentraciones de n-hexadecano (Merck-

Schuchardt, 99% de pureza) de 5, 10, 20, 30, 40 y 60 g. L<sup>-1</sup>,

### Condiciones de cultivo en zaranda

Todos los experimentos desarrollados a escala de zaranda fueron realizados a partir de cultivos de 24 horas en cuñas de medio #6 agarizado (Gorvienko, 1961). Con este cultivo se obtuvo el preinóculo en el medio de obtención de biomasa (Núñez, 2003; Ortiz, 2004). Luego de 24 horas, el cultivo fue inoculado a una concentración inicial de 10<sup>6</sup> cel/mL<sup>-1</sup> en los medios de degradación (Núñez, 2003), de los cuales fueron tomadas muestras cada cuatro horas. Todos los experimentos fueron desarrollados a escala de zaranda orbital rotatoria Infors a 125 r.min<sup>-1</sup> y 30°C.

Los medios de cultivo fueron esterilizados a 121°C por 15 minutos y fue utilizado como control un medio de cultivo estéril en las mismas condiciones.

### Crecimiento microbiano en medio de degradación de hidrocarburos

La determinación del crecimiento microbiano en el medio de degradación de hidrocarburos se realizó mediante el conteo total de células en cámara de Neubauer (Martínez *et al.*, 1989).

### Velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ )

La  $\mu$  fue determinada en la fase exponencial del crecimiento, mediante el modelo de crecimiento no restringido (López y Gódiá, 1998).

### Determinación de los parámetros cinéticos del crecimiento de las cepas CBM-225 y CBM-60

Para cada una de las concentraciones de sustrato fue calculada en la fase exponencial la velocidad específica de crecimiento de las cepas CBM-225 y CBM-60. A partir de ellas fueron estimados los valores de velocidad específica de crecimiento máxima ( $\mu_{max}$ ) y de la constante de disociación o constante de afinidad ( $K_s$ ) mediante la transformación lineal de Lineweaver-Burk (Chávez *et al.*, 1990). Además, fue determinada la constante de inhibición ( $K_i$ ) de ambas cepas con n-hexadecano según la expresión de Andrews linealizada (Chávez *et al.*, 1909; Boyer, 1999).

### Determinación del modelo cinético de las cepas CBM-225 y CBM-60

La determinación de los nuevos modelos cinéticos y los valores de  $K_i$  en la zona de inhibición del crecimiento de ambas cepas se realizó mediante la ecuación modificada de Andrews según Cabranes, 2005.

**Tratamiento estadístico de los resultados**

En todos los casos una vez que fue verificado el cumplimiento de la distribución normal de los datos según Kolmogorov Smirnov y la homogeneidad de varianzas por el método de Bartlett, se realizó el análisis de varianza de clasificación simple (Lerch, 1977) y la prueba de comparación de medias de rangos múltiples de Duncan (Duncan, 1965). Todos los experimentos se llevaron a cabo por triplicado.

Todos los resultados fueron procesados con el paquete estadístico Statistica 4.0 y/o Excel 7.0 para Windows.

**RESULTADOS**

**Inhibición del crecimiento de la cepa CBM-225 con n-hexadecano**

En la Fig. 1 se muestra el comportamiento de los valores de la velocidad específica de crecimiento para la cepa CBM-225 obtenidos experimentalmente y los valores de  $\mu$  determinados por el modelo de Monod en relación a la concentración de n-hexadecano.

En esta figura se puede apreciar en el comportamiento de los valores de  $\mu$  obtenidos experimentalmente (color azul) para esta cepa, donde se observan tres zonas bien delimitadas. Una zona donde a valores entre cero y 20 gL<sup>-1</sup> de concentración de n-hexadecano, la dependencia del valor de  $\mu$  con la concentración del hidrocarburo, fue lineal hasta 0,160 h<sup>-1</sup> y que concuerda con el modelo de Monod (color rojo). A valores entre 18 y 22 gL<sup>-1</sup> de concentración del hidrocarburo, a pesar de disminuir los valores de  $\mu$ , las diferencias entre estos valores no fueron estadísticamente significativas indicado con la misma letra, por tanto, la zona de no inhibición del crecimiento del microorganismo está representada desde cero hasta los 22 gL<sup>-1</sup> de concentración de n-hexadecano.

También se refleja una zona con una desviación del modelo de Monod e inhibición del crecimiento por exceso de n-hexadecano, entre los 23 y 32 gL<sup>-1</sup> de concentración del mismo, al haber una disminución significativa de los valores de  $\mu$  de

0,160 a 0,088 h<sup>-1</sup>, casi a la mitad de su valor. Posteriormente entre los 33 y 40 gL<sup>-1</sup>, se evidencia una saturación de los procesos degradativos del microorganismo.

Los parámetros cinéticos determinados en la zona de no inhibición del crecimiento de la cepa CBM-225 fueron de una  $\mu_{max}$  de  $0,217 \pm 0,116$  h<sup>-1</sup> y una  $K_s$  de  $11,670 \pm 0,116$  gL<sup>-1</sup>. En la zona de inhibición del crecimiento el valor de  $K_i$  obtenido fue de  $8,031 \pm 0,109$  gL<sup>-1</sup>.

En la zona de inhibición del crecimiento el modelo de Monod (Fig. 1), al igual que los modelos de inhibición por exceso de sustrato encontrados en la literatura (Harder y Roels, 1982; Stryer, 1995), no se ajustaron a los datos experimentales para esta cepa, por lo tanto, el valor de  $K_i$  obtenido anteriormente para la cepa CBM-225 es un valor aparente.

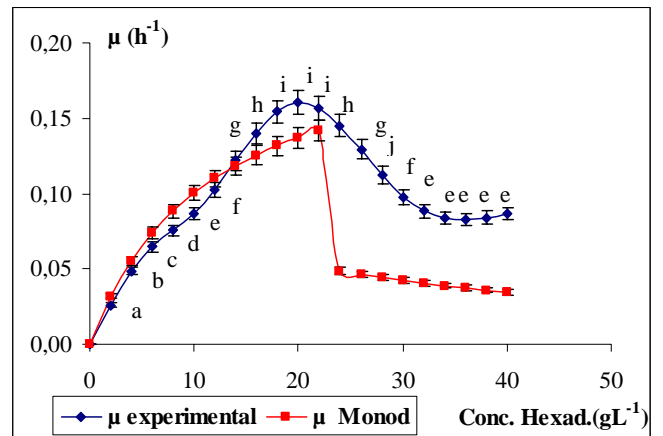


Fig. 1. Comportamiento dinámico de los valores de  $\mu$  experimentales y los valores de  $\mu$  calculados por el modelo de Monod con respecto a la concentración de n-hexadecano en el medio de degradación para la cepa CBM-225 a 30°C y 125 r.min<sup>-1</sup> (P<0,05, n=3).

Por tal motivo se determinó un modelo no estructurado con sus respectivos coeficientes de determinación, que representa matemática y fisiológicamente el comportamiento de los valores de  $\mu$  con respecto a la concentración de n-hexadecano bajo nuestras condiciones experimentales y el valor real de la constante de inhibición, mostrados a continuación:

Modelo Nuevo en la zona entre 23 y 32 gL<sup>-1</sup> de concentración de n-hexadecano:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + (S^{6,603} / K_i)} ;$$

R<sup>2</sup>=0,986;

Ki real=4,100x10<sup>-9</sup> ± 2,643x10<sup>-8</sup> gL<sup>-1</sup>

Modelo Nuevo en la zona entre 33 y 40 gL<sup>-1</sup> de concentración de n-hexadecano:

$$\mu = \frac{\mu_{\max} S}{K_s + S + (S^{0,826} / K_i)} ;$$

R<sup>2</sup>=0,971;

Ki real= 2,35 ± 0,231 gL<sup>-1</sup>

Los valores de las  $\mu$  teóricas calculadas por los nuevos modelos obtenidos en la zona de inhibición y saturación del crecimiento para la cepa CBM-225, no presentaron diferencias significativas con los valores de las  $\mu$  experimentales, por tanto, los modelos propuestos ajustaron matemáticamente con los datos experimentales obtenidos en dicha zona de concentración de n-hexadecano.

### Inhibición del crecimiento de la cepa CBM-60 con n-hexadecano

En la Fig. 2 se observa un aumento lineal de la velocidad específica de crecimiento de la cepa CBM-60 entre cero y 7 gL<sup>-1</sup> de concentración del hidrocarburo, donde alcanza un valor de 0,210 h<sup>-1</sup>. Luego continúa aumentando hasta valores de 0,280 h<sup>-1</sup> a los 27,5 gL<sup>-1</sup>, lo cual concuerda con el modelo de Monod (color rojo).

Posteriormente los valores de  $\mu$  se mantienen prácticamente constantes, sin presentar diferencias estadísticamente significativas hasta los 60 gL<sup>-1</sup> de n-hexadecano, por tanto, muestra una zona de saturación de los procesos de degradación del hidrocarburo en el microorganismo.

En la zona de no saturación del perfil de crecimiento de la cepa CBM-60 se determinaron los parámetros cinéticos de  $\mu_{\max}$  y  $K_s$  siendo estos 0,302 ± 0,096 h<sup>-1</sup> y 4,040 ± 0,096 gL<sup>-1</sup> respectivamente.

Luego de evaluar los parámetros cinéticos en la expresión que representa el modelo de Monod (Fig. 2), se corroboró que dicho modelo se ajustó matemática y fisiológicamente a los datos experimentales en la zona entre cero y 60 gL<sup>-1</sup> de concentración de n-hexadecano sin haber

diferencias significativas, al presentar un comportamiento de hipérbolo rectangular, al igual que la ecuación deducida por Michaelis y Menten para una reacción enzimática monosustrato.

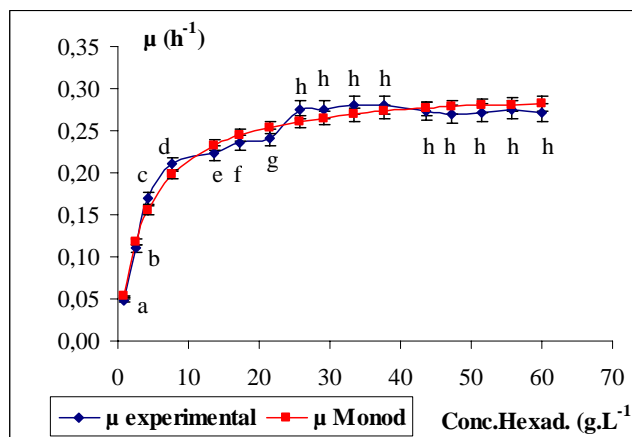


Fig. 2. Comportamiento dinámico de los valores de  $\mu$  experimentales y los valores de  $\mu$  calculados por el modelo de Monod con respecto a la concentración de n-hexadecano en el medio de degradación para la cepa CBM-60 a 30 C y 125 r.min<sup>-1</sup> (P<0,05, n=3).

Los parámetros cinéticos obtenidos por el método de Lineweaver-Burk en la zona de no inhibición para las cepas CBM-225 y CBM-60 se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Parámetros cinéticos del crecimiento de las cepas CBM-225 y CBM-60 consumiendo n-hexadecano en la zona de no inhibición del crecimiento (P<0,05, n=3).

MICROORGANISMOS	$\mu_{\max}$ (h <sup>-1</sup> )	$K_s$ (gL <sup>-1</sup> )
cepa CBM-225	0,217 b ± 0,116	11,670 a ± 0,116
cepa CBM-60	0,302 a ± 0,096	4,040 b ± 0,096

Los resultados estadísticos arrojaron que existen diferencias significativas entre la velocidad específica de crecimiento máxima y las constantes de disociación de las cepas en estudio representado por diferentes letras.

### DISCUSIÓN

En estudios fisiológicos y nutricionales de la cepa CBM-60 se evidenció la producción extracelular de compuestos con actividad superficial en presencia de fuentes hidrosolubles como los azúcares

(Almazán, 2000; Ortiz, 2004). En el caso de la cepa CBM-225, no se ha demostrado la producción de tensioactivos en fuentes hidrosolubles (Núñez, 2003), a pesar de ser del mismo género que la cepa CBM-60. Las fuentes de carbono estimulan o inhiben la producción de compuestos tensioactivos en bacterias de un mismo género, incluso en una misma cepa (Babu *et al.*, 1996; Lugioyo *et al.*, 1996).

Sin embargo, la cepa CBM-225, al igual que la cepa CBM-60, producen compuestos con actividad superficial en medios de degradación con agua de mar con n-hexadecano como fuente de carbono y de energía (Núñez, 2003; Ortiz, 2004), lo cual constituye una respuesta adaptativa de éstas a condiciones extremas, debido a que son bacterias aisladas del ambiente natural de los sedimentos de la Bahía de Cárdenas. La presencia de elevadas concentraciones de petróleo asfáltico en la matriz sedimento, ha favorecido el crecimiento de microorganismos degradadores de hidrocarburos, así como la capacidad de producir compuestos tensioactivos (Núñez, 2003).

Los compuestos tensioactivos producidos por las cepas en estudio en el medio de degradación tienen como objetivo facilitar los procesos de oxidación de los hidrocarburos hasta formas atóxicas y no contaminantes al favorecer la formación de emulsiones de éste, modular la hidrofobicidad de la superficie celular facilitando la adhesión y colonización de la interfase (Madigan *et al.*, 2000; Rojas *et al.*, 2003). Esto permite la incorporación del hidrocarburo a la célula, acelerando el transporte a través de la membrana para llevar a cabo los procesos metabólicos que conduzcan a la multiplicación celular, a partir de los hidrocarburos como única fuente de carbono y energía (Ábalos, 2001; Jacobucci *et al.*, 2001).

En la Tabla 1 se observa que la cepa CBM-60 presentó una mayor  $\mu_{max}$  y un menor valor de  $K_s$ , o sea, una mayor afinidad por el hexadecano que la cepa CBM-225. Esto significa que la primera creció más rápido en el medio de degradación con bajas concentraciones del hidrocarburo, alcanzando mayor valor de  $\mu$  a la misma concentración de este (Figs. 1 y 2), por lo tanto, esta cepa fue capaz de aprovechar en mayor cuantía la energía proveniente de este sustrato.

La superioridad del valor de  $\mu_{max}$  de la cepa CBM-60 sobre la de la cepa CBM-225, pudiera estar dada a que el compuesto tensioactivo que produce la primera, posee mayor actividad superficial o es producido en mayor concentración que la segunda.

Además, el mecanismo de transporte del hidrocarburo al interior celular es el paso determinante en la degradación de hidrocarburos alifáticos para algunas bacterias (Goswami y Singh, 1991). Este paso pudiera ser más eficiente, o sea más rápido, para la cepa CBM-60 y se facilitaría la incorporación del n-hexadecano y también su crecimiento con respecto a la cepa CBM-225.

El comportamiento cinético reflejado por la cepa CBM-225 utilizando n-hexadecano es típico de otras cepas de *Bacillus* de origen marino en sustratos hidrosolubles como la sacarosa, con la producción de sustancias mucoides (Núñez, 2003).

Los valores de los parámetros cinéticos del crecimiento obtenidos durante la degradación de n-hexadecano por las cepas CBM-225 y CBM-60, no contradicen el hecho de que la primera sea la de mayor capacidad degradadora de petróleo del bioproducto BIOIL-FC (Joseph, 1996). Los parámetros calculados caracterizan el crecimiento individual de estas cepas en cultivos con un hidrocarburo tipo del petróleo como única fuente de carbono y energía, los cuales pueden discrepar de los valores de los parámetros cinéticos de los microorganismos durante su crecimiento en mezclas de hidrocarburos.

Como se observó en la Fig. 1 para la cepa CBM-225, hubo una primera etapa concordante con una cinética clásica de Monod y una segunda etapa, que no se relacionó con dicho modelo, ya que en los sistemas cerrados la fase exponencial del crecimiento no puede desarrollarse indefinidamente, debido a que la actividad metabólica de los microorganismos disminuye la concentración de sustrato. Así disminuye la velocidad de los procesos enzimáticos del metabolismo celular y por ende disminuye la velocidad de crecimiento del microorganismo.

Los valores de las constantes de inhibición reales obtenidos para los nuevos modelos determinados en la zona de inhibición de la cepa CBM-225, fueron menores que el valor de  $K_i$  aparente obtenido por el modelo de inhibición de Monod, el cual subestima la inhibición presente.

La explicación fisiológica y bioquímica de la disminución de la velocidad de crecimiento de la población microbiana en la segunda etapa del crecimiento de la cepa CBM-225 consumiendo el hidrocarburo en cuestión (Fig. 1), pudiera estar asociada a la inhibición por exceso de sustrato, pero también a la presencia o acumulación de

algún intermediario de la degradación del sustrato que sea tóxico al microorganismo e inhiba enzimas claves de las rutas metabólicas centrales de su crecimiento, de la degradación o transporte al interior celular del hidrocarburo.

Como ocurre para la cepa CBM-225 a concentraciones moderadas de sacarosa, donde se inhibe su crecimiento (Batista, 2003), al inhibirse sus dos mecanismos de transporte y metabolismo, el sistema PEP-PTS (Saier *et al.*, 1993) y la exoenzima Lvs, codificada por el gen *sacB* (Steinmetz, 1993).

Es posible que en el caso del n-hexadecano para la cepa CBM-225 (Fig. 1), las altas concentraciones de éste, alteren o inhiban la producción y síntesis de los tensioactivos por esta cepa, imposibilitando la accesibilidad del sustrato al microorganismo (Jacobucci *et al.*, 2001) y por ende disminuye el crecimiento celular. También, pudiera suceder que la elevada concentración de los compuestos con actividad superficial producidos para emulsionar al hidrocarburo, inhiban el crecimiento microbiano al afectar la capacidad de adhesión de los microorganismos al sustrato (Ábalos, 2001). De esta forma provocan cambios negativos en la permeabilidad de la membrana celular y así la velocidad de muerte celular es mayor que la velocidad de crecimiento, lo que se ve reflejado en la disminución de los valores de  $\mu$  en la Fig. 1.

En la zona de saturación de la población enzimática participante en los procesos metabólicos y de degradación del hidrocarburo de la cepa CBM-225 (Fig. 1), la inhibición se encuentra disminuida, ya que el valor de  $K_i$  fue mayor que el de la zona de inhibición anterior. En dicha zona, una vez que el microorganismo fue capaz de consumir el o los intermediarios que inhiben los procesos y mecanismos antes mencionados, o que encuentra otra vía alternativa de crecimiento, puede continuar su desarrollo, aunque a un bajo y constante valor de  $\mu$ , debido a la marcada inhibición anterior.

Sin embargo, la cepa CBM-60 entre los 27,5 y 60  $\text{gL}^{-1}$  de concentración de n-hexadecano (Fig. 2), no manifestó inhibición de su crecimiento como la cepa CBM-225 (Fig. 1). Los procesos metabólicos, de transporte de hidrocarburos y metabolitos y de producción y síntesis de los tensioactivos que ella produce, no se inhibieron por ningún intermediario de la degradación del hidrocarburo. Es posible que esta cepa sea menos sensible a la influencia negativa de las altas concentraciones de dicho sustrato o que el proceso de degradación del

hidrocarburo sea diferente que el de la cepa CBM-225 y no haya producción de ese intermediario. Incluso, el mecanismo de transporte del hidrocarburo puede ser distinto para ambas cepas y solo encontrarse inhibido para la cepa CBM-225.

## CONCLUSIONES

*Bacillus licheniformis* cepa CBM-60 degrada el n-hexadecano a mayor velocidad que *Bacillus alcalophilus* cepa CBM-225, no reflejando inhibición de su crecimiento en las condiciones estudiadas. Por lo tanto, la composición bacteriana del bioproducto BIOIL-FC puede ser enriquecida con una mayor proporción de la cepa CBM-60 para combatir derrames de petróleo con altas concentraciones en n-hexadecano.

## REFERENCIAS

- Ábalos, A. (2001): Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* AT10 aplicando la Metodología de Superficie de Respuesta. Caracterización y aplicación del producto. España, Universidad de Barcelona, *Tesis de Doctorado*, 107 pp.
- Almazán, V. (2000): Aislamiento, caracterización y purificación de biotensioactivos de origen marinos. Cuba, Universidad de La Habana, *Tesis de Maestría*, 65 pp.
- Babu, P., A. Vaidya, A. Bal, R. Kapur, A. Juwarkar y P. Khanna (1996): Kinetics of biosurfactant on production by *Pseudomonas aeruginosa* strain BS2 from industrial wastes. *Biotechnol Lett.* 18: 263-268.
- Batista, C. (2003): Optimización de la producción de tensioactivos a partir de una cepa marina. Cuba, Instituto Superior Politécnico "José Antonio Echeverría", *Tesis de Grado*, 45 pp.
- Boyer, R. (1999): *Concepts in Biochemistry*. Chapter 4. Amino acids, peptides, and proteins, pp:78-110, Chapter 6. Enzymes as biological catalysts, pp: 142-170 and Chapter 15. Metabolism of carbohydrates, pp:445-483 (Keith Dodson, *ed.*).
- Cabranes, Y.C. (2005). Cinética de degradación de hidrocarburos del petróleo por *Bacillus alcalophilus* cepa CBM-225. Universidad de La Habana, *Tesis de Maestría*, 49 pp.

- Chavez, P.M., D.J. Díaz, L.V. Pérez y G.J. Delfin (1990): *Temas de Enzimología*. Universidad de La Habana, Facultad de Biología, Tomo I, 87 pp.
- Duncan, D.R. (1965): Multiple range multiple F-Test biometrics. 11:1-42.
- Gorvienko, Y.A. (1961): Sobre las ventajas cualitativas del agar nutriente en medios de cultivos para microorganismos heterótrofos. *Mikrobiol.* 30(1):168-172.
- Goswami, P. y D. Singh (1991): Different Modes of Hydrocarbon uptake by two *Pseudomonas* species. *Biotechnology and Bioengineering*. 37:1-11.
- Harder, A. y J.A. Roels (1982):; Application of simple structured models in bioengineering. *Adv. Bichem. Eng. Journal*. 21:55 -107.
- Jacobucci, D., C. Vasconcelos, A. Matsuura, F. Falcon y L. Durrant (2001): Degradation of diesel oil by biosurfactant-producing bacterial strains. <http://www.dotincsolution.com>.
- Joseph, N., M.C. Capó, M. Bellota, Y. Ramos y M. Fuentes (1994): Aislamiento y selección de microorganismos degradadores de hidrocarburos en la plataforma cubana. *Ciencias Biológicas. Microbiología*. 27:137-148.
- Joseph, N.I. (1996). Microorganismos marinos degradadores de hidrocarburos y sus aplicaciones en la industria petrolera. Cuba, Universidad de La Habana, *Tesis de maestría*, 38 pp.
- Lerch, G. (1977): *La experimentación en las ciencias biológicas y agrícolas*. Editorial Científico Técnica. La Habana. Capítulo 16: Análisis de Varianza, Clasificación triple, pp: 251-277.
- López, J. y C.F. Gódia (1998): *Ingeniería Bioquímica*. 1<sup>ra</sup> Edición. Ed. Síntesis, S.A., pp:9-45.
- Lugioyo, G.M., M. Villaverde, J.M. González, T. García y F.T. Acosta (1996): Producción de tensioactivo por *Bacillus cereus* CBM-503. *Rev. CNIC Ciencias Biológicas*, 27(1, 2, 3):78-82.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker (2000): *Brock Biology of microorganisms*. 8<sup>th</sup> edition Prentice-Hall, Upper Saddle River, New Jersey. pp: 25-84.
- Margesin, R. y F. Schinner (2001): Biodegradation and bioremediation of hydrocarbons in extreme environments. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56(6):650-663.
- Martínez, J., A.I. Sánchez, M. Quintana, V. Pazos y G. del Barrio (1989): *Microbiología General*. Editorial Pueblo y Educación. 3: 31-55, 100-101.
- Núñez, R. (2003): Obtención, caracterización y aplicación de un bioproducto bacteriano para la bioremediación de derrames de hidrocarburos. Cuba, Universidad de La Habana, *Tesis de Doctorado*. Universidad de La Habana, 93 pp.
- Ortiz, E., M. Morales, L. Graña, D. Enríquez, R. Núñez, L. Núñez, S. Coya, S. Sánchez, E. Fonseca, R. Pizarro, C. Martínez, Y. Díaz y L. González (2002): *Colección de microorganismos marinos del Instituto de Oceanología*. Informe Final del Proyecto de investigación. Presentado ante el Comité de Expertos del Programa "Sistemática y Colecciones Biológicas, su Conservación, Mantenimiento y Exhibición", Agencia de Medio Ambiente, pp:6-19.
- Ortiz, E. (2004): Obtención de un tensioactivo a partir de una bacteria marina para la biorremediación de la contaminación con hidrocarburos. Cuba, Universidad de la Habana, *Tesis de Doctorado*, 92 pp.
- Rojas, A.G., V.R. Rodríguez, C.J. Martínez y E.L. Zermeno (2003): Levels of polychlorinated biphenyls in mexican soils and their biodegradation by bioaugmentation. *Bulletin of Toxicology and Contamination* 70: 63-70.
- Saier, M., J. Matthew, C. Hoischen y J. Reizel (1993): Cap. 10 Transport Mechanisms En: *Bacillus subtilis* and other Gram positive bacteria. Biochemistry, Physiology and molecular genetics.
- Steinmetz, M. (1993): Carbohydrate catabolism: Pathways, Enzymes, genetic Regulation and Evolution. En *Bacillus subtilis* and other Gram-positive bacteria. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- Stryer, L. (1995): Biochemistry. 4<sup>th</sup> Edition, W.H. Freeman, San Francisco, pp:23-56.

Acceptado : 9 de marzo del 2006