

Identificación y caracterización de una bacteria degradadora de parafinas

Melissa Vivas Jiménez, Mónica Shakti Martínez Benítez,
Fernando García Gil de Muñoz y Rosa Salgado Brito
Universidad Simón Bolívar

Resumen

*La degradación de parafinas derivadas de petróleo es de interés para la industria petrolera mexicana, ya que la concentración de hidrocarburos saturados e insaturados, lineales o ramificados, en los diferentes tipos de petróleo mexicano es cercano al 35%. Por otra parte, de la degradación de parafinas lineales se pueden obtener productos de interés industrial y farmacéutico como el ácido palmítico, ácidos dicarboxílicos, derivados de imidazoles, etcétera. Debido a que las bacterias se asocian a infecciones, es necesario identificar y caracterizar microorganismos útiles en procesos biotecnológicos para garantizar la seguridad. Se aisló una bacteria gram positiva capaz de utilizar como única fuente de carbono y energía una mezcla de parafinas; la identificación de la cepa se realizó mediante la caracterización bioquímica y fisiológica siguiendo el Criterio de Cowan y de Norris. La caracterización molecular se realizó mediante ITS-PCR. De acuerdo con la caracterización bioquímica, fisiológica y molecular, la cepa aislada fue *Bacillus licheniformis*.*

Palabras clave: *Bacillus licheniformis*, parafinas, oxidación de alcanos, hidrocarburos.

Abstract

*The paraffin degradation from petroleum is of interest for the Mexican oil industry since the concentration of saturated and unsaturated hydrocarbons, linear or branched in the different Mexican types of petroleum is near 35%; on the other hand products of industrial and pharmaceutical interest like as palmitic, dicarboxylic acid derivatives of imidazols, etc. can be obtained from the linear paraffin degradation. As bacteria are frequently related to infections, it is necessary to identify and to characterize microorganisms that are useful in biotechnological processes to guarantee security. A gram positive bacterium capable of using only a paraffin mixture as a carbon source and energy was isolated. The identification of the strain was made through a biochemical and physiological characterization, following the Criterion of Cowan and Norris. The molecular characterization was made by ITS-PCR. According to the biochemical, physiological and molecular characterization the isolated strain was *Bacillus licheniformis*.*

Keywords: *Bacillus licheniformis*, paraffin, alkanes oxidation, hydrocarbons.

Introducción

Las bacterias pueden usar alcanos de cadena media como fuentes de carbono y energía (Marín et al., 2000; Salgado-Brito, 1998). La oxidación bacteriana de los alcanos es un fenómeno común en suelo y agua, y es un proceso muy importante en términos de los ciclos geoquímicos. La cantidad de alcanos que se pueden encontrar en el ambiente por año se estima en varios millones de toneladas, debido a fugas y a derrames de petróleo, sin ser menos relevantes los alcanos producidos por plantas, algas y otros organismos, ya que éstos se encuentran disponibles para las bacterias en toda la biosfera (Smits et al., 2003; Salgado-Brito et al., 2007).

Los alcanos comprendidos entre 13 y 20 C han sido oxidados por bacterias de los géneros *Pseudomonas* (Singer y Finnerty, 1984; Salgado-Brito et al., 2007), *Acinetobacter* (Singer y Finnerty, 1984; Maeng et al., 1996; Geißdörfer et al., 1999), *Arthrobacter* (Radwan et al., 1996) y *Bacillus* (Klug y Markovetz, 1971 y Kachholz y Rehm, 1977). Los géneros bacterianos que oxidan parafinas con más de 20 átomos de carbono reportados son muy pocos. Entre ellos están *Acinetobacter sp.* cepa H01-N (*Micococcus cerificans*) (Klug y Markovetz, 1971), *Acinetobacter sp.* cepa M-1 (Maeng et al., 1996), *Arthrobacter nicotianae* cepa KCCB35 (Radwan et al., 1996), *Rhodococcus sp.* cepa Q15 (Whyte et al., 1998) y *Pseudomonas aeruginosa* cepa MGP-1 (Cuellar et al., 2004; Salgado-Brito et al., 2007).

Una de las industrias más importantes de México es la petrolera; el petróleo mexicano crudo posee un alto contenido de parafinas, las cuales ocasionan problemas en el taponamiento de tuberías al extraer y transportar el crudo, debido a que el equilibrio natural con el aceite de la formación puede perderse por cambios de presión y temperatura. Por otra parte, la extracción y refinación del petróleo en muchos casos trae como consecuencia la contaminación del ambiente y, en este sentido, diversos grupos de investigadores han demostrado que los sitios contaminados con petróleo o derivados del mismo pueden recuperarse con la ayuda de microorganismos, en procesos de bioremediación o biorestauración (Salgado-Brito, 1998).

En los últimos años ha surgido un gran interés en la utilización de microorganismos para aumentar

la recuperación terciaria de petróleo crudo, debido a las potencialidades que diversas especies bacterianas presentan, como son i) la producción de gas (CO₂, H₂, CH₄ y N₂) que incrementa la presión y reduce la viscosidad del petróleo; ii) producción de ácidos orgánicos que disuelven la roca, incrementando la permeabilidad absoluta; iii) producción de agentes que disminuyen la tensión superficial interfacial y iv) el rompimiento de hidrocarburos por acción enzimática, con lo que se reduce la viscosidad del petróleo (Anderson et al., 1986).

En el laboratorio de microbiología de la Universidad Simón Bolívar se aisló una cepa gram positiva a partir del cultivo de una cepa degradadora de parafinas. El aislamiento y caracterización de microorganismos de interés biotecnológico es de suma importancia porque se ha demostrado que bacterias aisladas del ambiente pueden ser patógenas para el hombre, animales y plantas. La identificación de los microorganismos puede permitir evaluar la patogenicidad y virulencia de una cepa, así como su uso y aplicación en procesos biotecnológicos; si la cepa es un patógeno verdadero, se deberá reconsiderar su uso en procesos biotecnológicos.

Objetivo

Identificar y caracterizar una bacteria aislada de un cultivo, cuya única fuente de carbono es una mezcla de parafinas, para determinar su inocuidad.

Método

Aislamiento

La bacteria fue aislada mediante la técnica de aislamiento cuantitativo por dilución y sembrado, en placas de agar soya y tripticaseína, por dispersión con varilla de vidrio, a partir de un cultivo de *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1 en medio M9 (Cuellar et al., 2004), cuya única fuente de carbono fue una mezcla de parafinas denominada PI (punto de fusión 56-61 °C). Posteriormente se obtuvo el cultivo puro, por estría cruzada, en agar soya y tripticaseína y agar gelosa sangre al 5%. La cepa fue identificada como BDP.

Se determinó la morfología colonial de la cepa, en medios de cultivo en placas de petri y en cultivos líquidos. Los medios en los que se determinó la morfología colonial se presentan en la tabla 1. En estos medios se sembró la cepa por estría cruzada; los caldos de cultivo se inocularon con una asada de la cepa (ver tabla 2) y la morfología microscópica se determinó mediante las tinciones de Gram y de Schaeffer-Fulton.

Identificación bioquímica y fisiológica

La identificación del género bacteriano se hizo siguiendo el criterio de Cowan (Salgado-Brito, 1998) y para identificar la especie se siguieron las pruebas sugeridas por Norris et. al. (1981).

Además de las pruebas sugeridas por Cowan (Salgado-Brito, 1998) y Norris (Norris et. al., 1981), se realizaron las pruebas de la tabla 6 con la finalidad de conocer y caracterizar la fisiología de la cepa. Cada una de las pruebas fue realizada según Koneman (1999).

Extracción y purificación del DNA genómico

A partir de 12 ml de un cultivo de la cepa en Caldo Soya Tripticaseína, con una absorbancia de 0.8 a 600nm, se obtuvieron las células centrifugando el cultivo a 4500 rpm durante 15 min. El sobrenadante fue desechado y las células se lavaron tres veces con Tris-HCl 10mM a pH de 8, EDTA 1mM y NaCl 100mM; después del tercer enjuague, las células se resuspendieron con 500 µl de la misma solución y se centrifugó nuevamente a 4500 rpm por 5 min. Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 µl de una solución amortiguadora TES (Tris-HCl 35mM a pH de 8; sacarosa 25 mM EDTA 25 mM). Los lisados fueron incubados con 100 µl de lisozima (1mg/ml) a 37°C por una hora. Pasado el tiempo se agregó a cada uno de los tubos 100 µl de Dodecil sulfato de sodio (SDS) al 2%; las mezclas fueron agitadas mecánicamente y se incubaron a 50°C por 15 min. Después de este tiempo se agregaron 100 µl de NaCl 1 M; la mezcla se incubó nuevamente a 50 °C durante 5 min, para posteriormente incubar durante toda la noche a 4 °C.

Las muestras fueron descongeladas y el DNA se precipitó adicionando 500µl de etanol absoluto frío; la mezcla se centrifugó a 14000 rpm durante

20 min. Se eliminó el sobrenadante y la pastilla se resuspendió en 500µl de amortiguador TE (Tris-HCl 10 mM pH 8 y EDTA 1 mM). Después de una completa disolución de las pastillas, las muestras fueron sometidas a tres extracciones fenólicas [fenol – cloroformo- alcohol isoamílico (25:24:1) pH 8.0] volumen a volumen. Para eliminar los restos de fenol, se realizó una extracción con cloroformo volumen a volumen. Se recuperó la fase acuosa y el DNA se precipitó con 600 µl de etanol absoluto a -20°C toda la noche. Al siguiente día las muestras se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 min. A cada una de las pastillas se les adicionó 1 ml de etanol al 70% e inmediatamente después se centrifugaron a 14 000 rpm por 5 min. El sobrenadante fue desechado y el DNA fue resuspendido en 60µl de agua estéril (Kalman et. al., 1993).

Electroforesis en geles de agarosa

Para analizar las moléculas de ácidos nucleicos, éstas se separaron por electroforesis en geles de agarosa (Sigma-Co) al 1.0% en amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE 1X: tris-acetatos 40 mM, EDTA 1 mM pH 8.0); como marcador de tamaño molecular se utilizó una escalera de moléculas de DNA en múltiplos de 500 pares de bases (pb). Los ácidos nucleicos se tiñeron con bromuro de etidio (EtBr 0.5 µg/ml); se visualizaron bajo luz ultravioleta y se fotografiaron y digitalizaron las imágenes con un equipo EDAS-Kodak, durante ½ seg de exposición (Ausubel et. al., 1989).

Identificación molecular por ITS-PCR

Para la identificación de la cepa *Bacillus* se empleó la técnica de ITS-PCR (Polimerasa Chain Reaction - Inintergenetic 16S-23S Transcribed Spacer) para lo cual se utilizaron los iniciadores específicos de regiones espaciadoras intergénicas para la especie *B. liqueniformis*, S-D-Bact-1494-a-S-20 (5'- GTCGTA-ACAAGGTAGCCGTA- 3') y L-D-Bact-0035-a-A-15 (5'-CAAGGCATCCACCGT- 3') (Daffonchio et. al., 1998).

El ensayo de PCR se llevó a cabo en un termociclador Touchgene Gradient, Techne Duxford (Cambridge, U.K.). La reacción incluyó una alícuota de 4 µl de DNA genómico como molde y los siguientes componentes: 4 µl de amortiguador de PCR 10X, 3 µl de 1.5 mM de MgCl₂, 0.5 µl de d'NTPs 25 mM, 0.5 µl de cada uno de los iniciadores y 2 U de TaqPolimerasa (*Applied Biosystems^{MR}*), por cada

reacción completando con agua estéril para un volumen de 50 µl. Las condiciones de la reacción fueron: desnaturalización a 94° C por 1 min; 35 ciclos de 94° C por 4 min; 52°C por 1 min, respectivamente, y 72° C por 2 min, finalizando por un período de extensión adicional de 8 min a 72° C.

Los productos amplificados fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1.5% en amortiguador Tris-acetato-EDTA (TAE 1X: tris-acetatos 40 mM, EDTA 1 mM pH 8.0); como marcador de tamaño molecular se utilizó una escalera de moléculas de DNA en múltiplos de 100 pb.

Resultados

Aislamiento

En la tabla 1 se muestra la morfología colonial de la cepa BDP, en los medios de cultivo en los cuales pudo crecer y aislarse.

En la mayoría de medios de cultivo simples, con fuente de carbono, nitrógeno y fósforo, pueden crecer sencillas y pequeñas cantidades de sales, como en el agar cuenta estándar (ACE); en medios enriquecidos como el AST o el AGS, donde bacterias gram positivas y negativas crecen muy bien, también la cepa lo hace eficientemente. En el medio AGS se observa que la cepa produce hemolisinas, ya que existe un halo de hemólisis alrededor de las colonias. También puede utilizarse ASM como medio de cultivo específico para los estafilococos, donde se pudo ver que la cepa es fermentadora de manitol y resistente al 7.5% de NaCl. En el MAC específico para bacterias gram negativas no creció; por lo tanto puede ser sensible a las sales biliares, inhibidor de gram positivas en este medio.

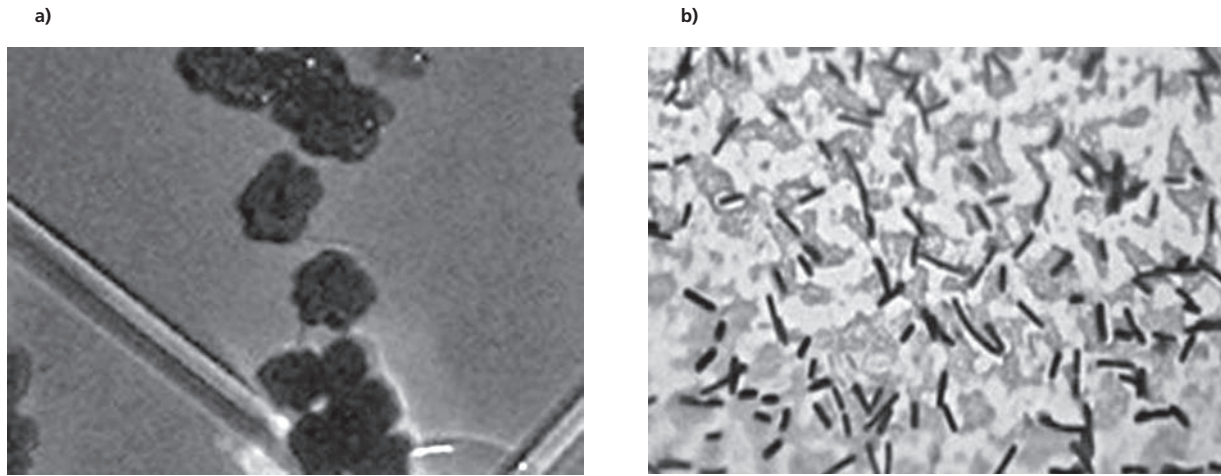
Tabla 1. Crecimiento de la cepa BDP en diferentes medios de cultivo en placa.

Medio	Crecimiento	Morfología Colonial
Agar Soya y Trypticaseína (AST)	+	Colonias grandes, color beige, arrugadas, de bordes irregulares, de aspecto seco.
Agar Cuenta Estándar (ACE)	+	Colonias grandes, color beige, arrugadas, de bordes irregulares, de aspecto seco.
Agar gelosa sangre al 5% (AGS)	+	Colonias grandes, color beige, arrugadas, de bordes irregulares, de aspecto seco, producen hemólisis.
Agar sal y manitol (ASM)	+	Colonias grandes, brillantes, lisas de color amarillo y aspecto húmedo; fermentan el manitol y resisten 7.5% NaCl.
Agar MaConkey (MAC)	-	

+ crecimiento, - no crecimiento

La figura 1 muestra la morfología colonial típica y microscópica de la cepa BDP. Gracias a la tinción de Gram se determinó que es un bacilo gram positivo; produce un material extracelular en abundancia que permite ver el campo naranja, ya que el polímero producido retiene la safranina.

Figura 1 a) Morfología colonial b) Morfología microscópica de la cepa BDP.



En la tabla 2 se describe el crecimiento de la cepa en algunos de los caldos en los que se sembró; como puede verse nuevamente, el microorganismo no es exigente en cuanto a requerimientos nutricionales, ya que es capaz de crecer en medios simples como el caldo nutritivo y caldos más nutritivos como el caldo soya y triptica-seína. Es importante señalar que en caldos simples y en medios de cultivo medianamente selectivos, como los caldos rojos de fenol, la cepa crece sólo en la superficie del tubo, mientras que en caldos enriquecidos como el soya y tripticaseína o infusión cerebro corazón, BDP crece homogéneamente en todo el tubo, lo cual fue importante para escoger en qué medio se cultivaría la cepa para la extracción del ADN genómico y obtener un buen rendimiento para los estudios de identificación molecular.

Tabla 2. Crecimiento de la cepa BDP en diferentes caldos de cultivo y a diferente tiempo.

Caldo de cultivo	Descripción a 24 hrs.	Descripción a 48 hrs.
Rojo de Fenol con glucosa	Poco crecimiento superficial, sin turbidez	Poco crecimiento superficial y fermenta la glucosa
Nutritivo	Poco crecimiento superficial y en las paredes del tubo, sin turbidez	Crecimiento superficial
Soya Tripticaseína	Poco crecimiento superficial con mucha turbidez	Mayor crecimiento superficial y mayor turbidez

Identificación bioquímica y fisiológica

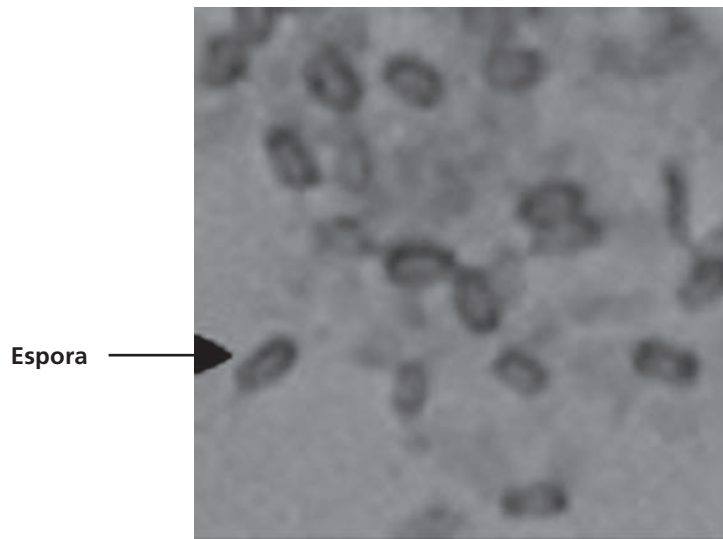
La tabla 3 muestra los resultados obtenidos realizando las pruebas bioquímicas del Criterio de Cowan. La cepa BDP es un bacilo gram positivo formador de esporas (ver figura 2) que crece en condiciones aerobias y anaerobias; es catalasa y oxidasa positiva; fermenta la glucosa produciendo ácido y gas y tiene un metabolismo catabólico fermentativo. Por lo tanto, la cepa BDP pertenece al género *Bacillus*.

En la tabla 4 se muestran las pruebas sugeridas por Norris et. al. (1981) para identificar diferentes especies de *Bacillus*. Las pruebas importantes para la identificación de la especie del Bacilo fueron el crecimiento a 50 °C pero no a 65 °C, la reducción de nitratos a nitritos y las hidrólisis de almidón y caseína. La tabla 5 muestra la tabla llave con la cual se determinó que la cepa corresponde a *Bacillus liqueniformis* y la tabla 6 muestra otras pruebas bioquímicas y fisiológicas que se realizaron a la cepa BDP. Estas pruebas apoyaron la identificación; sin embargo, no fueron las pruebas más importantes para identificar la cepa.

Tabla 3. Comparación de los resultados obtenidos de las pruebas sugeridas por Cowan y la cepa BDP. + Positivo; - Negativo v Variable dependiendo de la especie.

Prueba	Género: <i>Bacillus</i>	Cepa BDP
Tinción de Gram	gram positivo	gram +
Forma	Bacilo	Bacilo
Ácido Resistencia	-	-
Esporas	+	+
Movilidad	V	+
Crecimiento Aerobio	+	+
Crecimiento Anaerobio	V	-
Catalasa	+	+
Oxidasa	+	+
Producción de Ácido a partir de Glucosa	+	+
O/F	F	F

Figura 2. Producción de esporas de la cepa *Bacillus*.



Tinción de gram sólo de las esporas; no se observan los bacilos gram positivos característicos de este género.

Tabla 4. Identificación bioquímica de *Bacillus licheniformis*.

PRUEBAS BIOQUÍMICAS Y FISIOLÓGICAS	Catalasa	Voges Proskauer	Crecimiento en agar anaeróbico	Crecimiento a 50°C	Crecimiento en NaCl al 7%	Producción de ácido y gas a partir de Glucosa	Reducción de NO ₃ a NO ₂	Hidrólisis de almidón	Crecimiento a 65 °C	Bacilos 1.0µm de largo o más	pH < a 6.0 en medio V-P	Producción de ácido a partir de glucosa	Hidrólisis de caseína	Cuerpos paraesporales
B. licheniformis	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	V	+	+	-
B. licheniformis cepa BDP	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	?

Tabla 5. Llave para identificar a *Bacillus licheniformis* de acuerdo con Norris et. al. (1981).

RUTA BIOQUÍMICA DE IDENTIFICACIÓN
1.- Catalasa: positivo.....2 negativo.....
2.- Prueba Voges-Proskauer: positivo.....3 negativo.....
3.- Crecimiento en Agar Anaerobio: positivo.....4 negativo....
4.- Crecimiento a 50°C: positivo.....5 negativo.....
5.- Crecimiento en NaCl a 7%: positivo..... <i>B. licheniformis</i> negativo.....

Identificación molecular por ITS-PCR

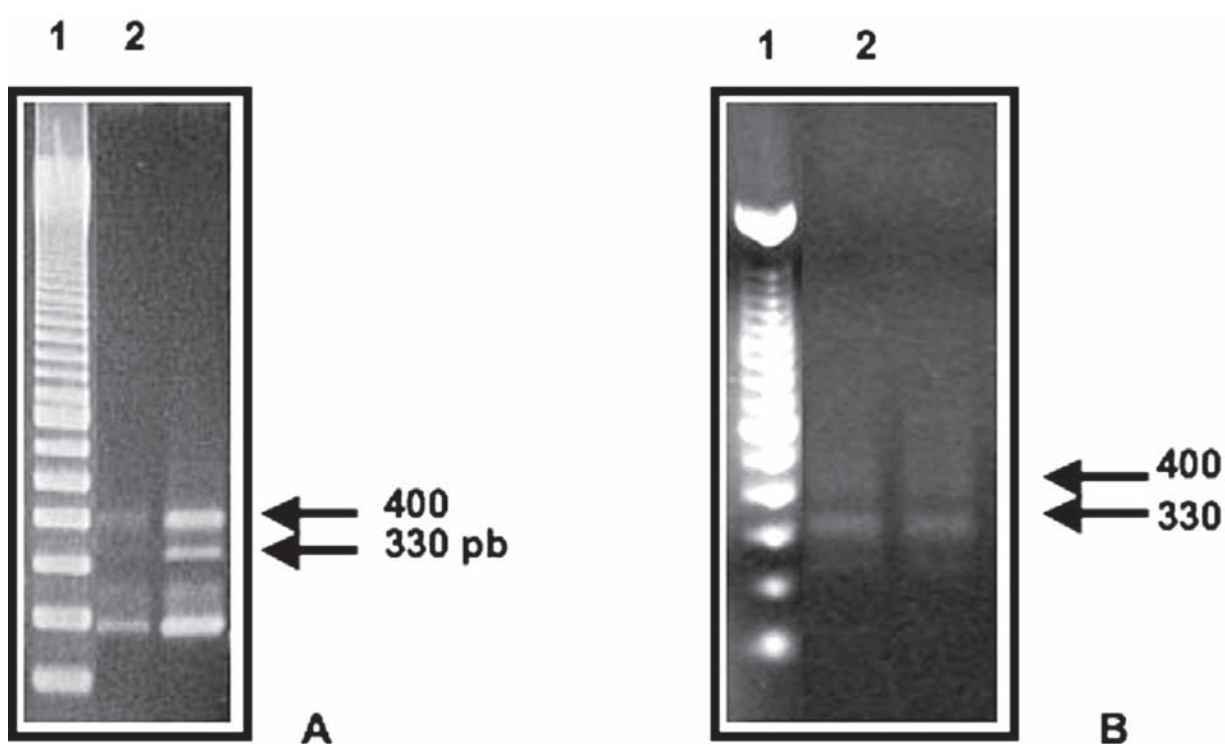
A partir del DNA genómico bacteriano se amplificaron dos fragmentos de 360 y 400 pb que corresponden a las regiones intergénicas de los genes 16S y el 23S del RNA ribosomal (RNAr) (ver figura 3). Los fragmentos identifican a la especie *B. liqueniformis*, presentando el mismo patrón electroforético que las especies reportadas por Daffonchio et. al. (1998).

Tabla 6. Pruebas bioquímicas y fisiológicas realizadas a la cepa BDP.

Prueba	Resultados
Utilización de Citrato (Medio de cultivo citrato de Simona)	-
Fermentación de Glucosa y Lactosa (Medio Kliger)	Glucosa +
	Lactosa -
Fermentación de Glucosa, Sacarosa y Lactosa (Medio de TSI)	Glucosa +
	Sacarosa +
Indol	-
Movilidad	+
Descarboxilación de Lisina	+

Catalasa al 3%	+
Catalasa al 8%	+
Producción de ácido a partir de sacarosa	+
Producción de ácido a partir de xilosa	+
Reducción de Nitratos	+
Licuefacción de Gelatina	-
Hidrólisis de la caseína	+
Crecimiento a 4° C-----	+

Figura 3. Amplificación por PCR de las regiones intergénicas espaciadoras del 16 y 23S del RNA ribosomal (RNAr) de *B. licheniformis* BDP.



Panel (A) - Carril 1.- escalera de moléculas de DNA en múltiplos de 100 pb utilizada como marcador de tamaño molecular. Carriles 2 y 3.- amplificación en la cual se usó como molde DNA de *Bacillus licheniformis* de las cepas 14580^T, 3.2. 61.1, 75.2, F14 y MP3, obtenidas por Daffonchio et. al. (1998). Panel (B) - Carril 1.- escalera de moléculas de DNA en múltiplos de 100 pb utilizada como marcador de tamaño molecular. Carriles 2 y 3.- amplificación en la cual se usó como molde DNA de *Bacillus licheniformis* de la cepa BDP. Las muestras fueron analizadas en geles de agarosa al 1.5% preparados en amortiguador TAE 1X.

Discusión

La identificación de las cepas de interés biotecnológico es de suma importancia para garantizar la seguridad del ser humano, animales, plantas y ecosistemas; algunas bacterias utilizadas en procesos biotecnológicos han sido identificadas como patógenos oportunistas, por lo que aún se cuestiona su utilidad (Salgado-Brito et. al., 2007).

Las pruebas del criterio de Cowan ayudaron a identificar el género de la cepa BDP, estableciendo así que pertenece al género de *Bacillus*. La identificación hasta este nivel resultó ser muy sencilla, ya que no existe otro género de bacterias en forma de bacilo que produzcan esporas y puedan crecer en condiciones de aerobias (ver tabla 3).

El género *Bacillus* se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza. Por ejemplo, el manual Bergey's de bacteriología sistemática reconoce 40 especies bien caracterizadas, aun cuando se reconoce que puedan existir más de 200 especies no caracterizadas (Slepecky y Hemphill, 2006).


Algunos de los géneros bacterianos que degradan productos derivados del petróleo y pueden ser patógenos oportunistas son *Pseudomonas* (Ambrosi et. al., 2005; Usher, 2002; Salgado-Brito et. al., 2007), *Klebsiella*, *Serratia*, *Acinetobacter* (Salgado-Brito, 1998), *Corynebacterium*, *Clostridium*, *Mycobacterium*, *Nocardia* y *Bacillus*, por mencionar algunos (van der Linden y Thijssse, 1965; Klug y Marcovetz, 1971; Radwan y Sorkhoh, 1993).

Dentro del género de *Bacillus* sólo dos especies se consideran patógenos para el hombre: *B. cereus* y *B. anthracis*. Esta última especie es reconocida como patógena de ganado vacuno; por tanto, fue necesario identificar la especie de *Bacillus* BDP para garantizar que la utilización de la cepa es segura. La identificación de esta especie requirió realizar diversas pruebas bioquímicas y fisiológicas; siguiendo el criterio de Norris et. al. (1981) se logró la identificación de la cepa BDP como *Bacillus licheniformis* (ver tablas 4 y 5). La identificación molecular fue igual a la identificación bioquímica y fisiológica. Los resultados de la amplificación de los fragmentos de 360 y 400 pb que corresponden a las regiones intergénicas de los genes 16S y el 23S del RNA ribosomal (RNAr), obtenidos en este trabajo, son similares a los obtenidos por Daffonchio et. al. (1988) para las seis cepas de *B. licheniformis* que él y sus colaboradores identificaron.

Bacillus licheniformis es reconocido al igual que otras especies más de *Bacillus* como bacteria de interés biotecnológico ya que a partir de esta especie se obtiene el antibiótico bacitracina (Slepecky y Hemphill, 2006).

La heterogeneidad fisiológica del metabolismo del género *Bacillus* es bien conocida; sin embargo, hasta la fecha el género de *B. licheniformis* no se ha reportado como degradador de parafinas, por lo cual es de suma importancia caracterizar su capacidad para degradar compuestos derivados del petróleo y no sólo de parafinas sino también de otros compuestos que puedan estar contaminando el ambiente, ya que otras especies de *Bacillus* como *B. thermoleovorans*, *B. benzoovorans* y *B. gordonae* han sido reportados como degradadores de hidrocarburos y compuestos aromáticos hidroxilados, incluido el fenol (Slepecky y Hemphill, 2006). Las pruebas bioquímicas y fisiológicas de las tablas 1, 2 y 6 nos ayudan a caracterizar la fisiología de la cepa *Bacillus licheniformis* BDP y a determinar bajo qué condiciones podremos utilizar la cepa para degradar parafina o bien para obtener productos de interés industrial o farmacéutico (Ishige et. al., 2002; Mikolasch et. al., 2003; Gao et. al., 2005; Salgado-Brito et. al., 2007).

Conclusión

La cepa BDP fue identificada como *Bacillus licheniformis*; hasta ahora esta bacteria no ha sido reportada como patógena y, por lo tanto, puede ser utilizada para procesos biotecnológicos de degradación de parafinas. 

Referencias

- Ambrosi C., Tiburzi F., Imperi F., Putignani L., Visca P. (2005). Involvement of AlgQ in transcriptional regulation of pyoverdine genes in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *J. Bacteriol.*, 87: 5097-5107.
- Anderson D. L., Sarver A. Q., Chin Y. H. (1986). *Preliminary studies leading to microbial enhanced oil recovery*. Society of Petroleum Engineers. SPE15155. p. 81-83.
- Ausubel, F.M. Brent, R. Kingston, R.E. Moore, D.D. Seldman, J.G. Smith, J.A. y Struhl, K. (1989). *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley Interscience. Vol 2. Part 10.
- Cuellar Orozco G., Mesta-Howard A. Pineda F. G. y Salgado-Brito. R. (2004) Degradación de parafinas por *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. *Revista de Investigación Universitaria Multidisciplinaria*. Universidad Simón Bolívar. Vol. 6. P. 41-46.

- Daffonchio D., Borin S., Frova G., Luigi M. P. and Sorlini C. (1998). PCR fingerprinting of whole genomes: the spacers between the 16S and 23S rRNA genes and of intergenic tRNA gene regions reveal a different intraspecific genomic variability of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis*, *International Journal of Systematic Bacteriology*, 48, 107-116.
- Gao H., Zhang J., Hua Y.T., Li C, Cao Z.A. (2005). Effects of carnitine acetyltransferase gene knockout on long chain dicarboxylic acid production and metabolism of *Candida tropicalis*. *Wei Sheng Wu Xue Bao*, 45: 102-105. (Article in Chinese, Abstract in English).
- Gei dörfer W., Kok G. R., Ratajczak A., Hellingwerf J. K. y Hillen Wolfgan. (1999). The Genes *rubA* y *rubB* for Alkane degradation in *Acinetobacter* sp. ADP1 Are in an Operon with *estB*, Encoding an Esterase, and *oxyR*. *Journal of Bacteriology* Vol. 181. No. 14. p 4292-4298.
- Ishige T., Tani A., Takabe K., Kawasaki K., Sakai Y., Kato N. (2002). Wax ester production from n-alkanes by *Acinetobacter* sp. strain M-1: ultrastructure of cellular inclusions and role of acyl coenzyme A reductase. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 1192-1195.
- Kachholz T. y Rehm J. H. (1977) Degradation of Long Chain Alkanes by Bacilli. II. Metabolic Pathways. *European Journal of Applied Microbiology*. 6:39-54.
- Kalman Sue, Kristine L. Kiehne, John L. Libs y Takashi Yamamoto, (1993). Cloning of a Novel *cryI*C-Type Gene from a Strain of *Bacillus thuringiensis* subsp. *galleriae*. *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1131-1137.
- Klug, M. J. y Markovetz A. J. (1971). Utilization of aliphatic hydrocarbons by microorganisms. *Adv. Microbial Physiol.* 5:1-43.
- Koneman E.W., Allen S.D., Janda W.M., Schreckenberger P.C. y Winn W.C. (1999). *Diagnóstico Microbiológico*. Editorial Medica Panamericana. Argentina. p. 631-644.
- Maeg J. H., Sakai Y, Tani Y. y Kato N. (1996). Isolation and characterization of a novel oxygenase that catalyzes the first step of n-alkane oxidation in *Acinetobacter* sp. strain M-1. *Journal Bacteriology*. Vol. 178. No. 13 p. 3695-3700.
- Mikolasch A., Hammer E., Schauer F. (2003). Synthesis of imidazol-2-yl amino acids by using cells from alkane-oxidizing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 1670-1679.
- Radwan S.S., Sorkhoh N.A., Felzmann H., El-Desouky A.F. (1996). Uptake and utilization of n-octacosane and n-nonacosane by *Arthrobacter nicotianae* KCC B35. *J. Appl. Bacteriol.*, 80: 370-374.
- Radwan S. Samir y Sorkhoh.N. A. (1993). N-alkane-utilizing microorganisms. *Advances in applied Microbiology*. Vol. 39 p. 28-90. *Research Communications*. Vol. 57, No. 4, p.1017.
- Salgado-Brito, R. (1998). *Consortio Microbiano Degradador de petróleo maya*, tesis maestría en ciencias, ENCB-IPN.
- Salgado-Brito R. Neria M. I., Mesta-Howard A. M., Díaz Cedillo F., Wang E. T. (2007) Oxidation of solid paraffin (C₁₁₋₄₀) by *Pseudomonas aeruginosa* MGP-1. *Ann. Microbiol.* Vol. 57 N. 3 p. 321-328.
- Singer M.E. y Finnerty W.R. (1984). Microbial metabolism of straight-chain and branched alkanes. In: Atlas R.M., Ed., *Petroleum Microbiology*, Mcmillan Publishing Co, USA, pp. 2-32.
- Slepecky R. y Hemphill H. (2006). The Genus *Bacillus*-No-medical. Recuperado el 9 de mayo del 2006 de <http://141.150.157.117:8080/prokPUB/index.htm>.
- Smits C.A., O'Reilly K.T., Hyman M.R. 2003. Cometabolism of methyl tertiary butyl ether and gaseous n-alkanes by *Pseudomonas mendocina* KR-1 grown on C5 to C8 n-alkanes. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:7385-7394.
- Usher L.R., Lawson R.A., Geary I., Taylor C.J., Bingle C.D., Taylor G.W., Whyte M.K. (2002). Induction of neutrophil apoptosis by the *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin pyocyanin: a potential mechanism of persistent infection. *J. Immunol.*, 168: 1861-1868.
- van der Linder, A. C. y Thijssse, G. J. E. (1965). The mechanisms of microbial oxidations of petroleum hydrocarbons. *Adv. Enzymol.* No. 27 p. 469-546.
- Whyte L.G., Hawari J., Zhou E., Bourbonnière L., Inniss W.E., Greer C.W. (1998). Biodegradation of variable-chain-length alkanes at low temperatures by a psychrotrophic *Rhodococcus* sp. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 2578-2584.