

## PRODUCCION DE TENSIOACTIVO POR *BACILLUS CEREUS* IDO-503: ESTUDIOS FISIOLÓGICOS

M. Lugioyo Gallardo, M. Villaverde Fernández\*, J. M. González Santos, T. García Díaz y F. Acosta.

Instituto de Oceanología, Ministerio Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Avenida 1ra, No. 18406 e/ 184 y 186, Reparto "Flores", Playa y \* Facultad de Biología, Universidad de la Habana, 25 y J, Vedado, Ciudad de La Habana, Cuba.

Recibido: 22 de marzo de 1996.

**RESUMEN.** Se reporta la influencia de algunos nutrientes en el crecimiento microbiano y la producción de tensioactivo de la cepa *Bacillus cereus* IDO-503 de origen marino. Se realizaron experimentos utilizando diferentes fuentes y concentraciones de carbohidratos y sales de nitrógeno, con el fin de seleccionar las condiciones en las cuales el microorganismo presentaba el mejor crecimiento y producción de tensioactivo. Los mejores crecimientos microbianos se verificaron cuando la cepa fue cultivada en sacarosa, glucosa y trehalosa. Sin embargo, las disminuciones de tensiones superficiales e interfaciales (TS y TI) en todas las fuentes ensayadas fueron notables en relación con los controles. Se realizaron curvas de crecimiento utilizando un medio basal suplementado con sacarosa 3 %, determinándose crecimiento, TS, TI, inverso de la concentración micelar crítica y concentración de lípidos totales. Se verificó que la cepa IDO-503 crece rápidamente en el medio de cultivo base sacarosa 3% ( $\mu = 0,723 \text{ h}^{-1}$ ) produciendo concentraciones elevadas de tensioactivos. La síntesis del tensioactivo comienza desde el inicio del crecimiento microbiano, por lo que se infiere que la producción del tensioactivo está asociada a su crecimiento.

**ABSTRACT.** The influence of some nutrients on microbial growth and biosurfactant production by a strain of *Bacillus cereus* IDO-503 is reported. Different sources of carbohydrates and nitrogen were tested in order to choose the optimum conditions for the best growth and biosurfactant production. The best microbial growth was observed when the strain was cultured on sucrose, glucose and trehalose. All tested sources showed remarkable surface and interfacial decrease in relation to that measured against the controls. The effect of different concentrations of the selected carbon and nitrogen sources was estimated during growth and synthesis of the surface-active agents. The growth, the surface and interfacial tensions, inverse of critical micellar concentration and the total concentration of lipids are studied. This strain grows rapidly on a culture medium with 3 % sucrose ( $\mu = 0,723 \text{ h}^{-1}$ ) yielding high concentrations of tensides. The results of the fermentation indicated that the microbial tenside synthesis starts at the beginning of microbial growth, so this fermentation belongs to type I according to Gaden's classification.

### INTRODUCCION

Las investigaciones sobre la síntesis de tensioactivos por microorganismos se han incrementado en los últimos años, debido principalmente a las aplicaciones que reciben los biosurfactantes en diversas industrias.<sup>1-3</sup>

Los biotensioactivos resultan de interés porque son biodegradables y mantienen su efectividad a temperaturas extremas, pH y alta salinidad,<sup>4,5</sup> estas características les confieren alta competitividad en relación con los tensioactivos sintéticos.

En las investigaciones relacionadas con la producción de tensioactivos de origen microbiano, se destaca el estudio de la influencia que ejercen los nutrientes del medio de cultivo sobre los rendimientos de aquella.<sup>3,6,7</sup> Por ello, es imprescindible estudiar los medios de cultivo a emplear con cada microorganismo productor.

La fuente de carbono es uno de los componentes del medio de cultivo que influye de forma decisiva en la producción de tensioactivos.

Algunos microorganismos, según la fuente utilizada (hidrofóbica o hidrofílica) sintetizan determinada biomolécula. En otros casos, sólo son capaces de producir el tensioactivo con una fuente determinada de carbono.

Además de la fuente de carbono, la naturaleza de la fuente de nitrógeno posee un papel importante en la regulación de la producción de biotensioactivos.

Se ha descrito que en algunos géneros microbianos la síntesis de tensioactivos se incrementa cuando se utiliza de-

terminada fuente de nitrógeno. Tal es el caso del género *Pseudomonas* que con la presencia de  $\text{NaNO}_3$  en el medio de cultivo se obtienen elevadas concentraciones de tensioactivos, no así con otras sales.<sup>7</sup>

No sólo es importante el tipo de fuente de carbono y nitrógeno empleado, sino también, la interacción C-N y las proporciones entre ellas.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la influencia de algunas fuentes de carbono hidrofílicas y de nitrógeno inorgánico en la producción de tensioactivos de la cepa IDO-503 de origen marino.

### MATERIALES Y METODOS

La cepa IDO-503, perteneciente a la colección de microorganismos del Instituto de Oceanología del Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente de Cuba, se aisló del sedimento de la Bahía de Cárdenas en la costa N de Cuba.<sup>8</sup> Dicha cepa se identificó como *Bacillus cereus*, familia *Bacillaceae*.<sup>9</sup>

Para la selección de la fuente de carbono, el microorganismo se cultivó en el medio basal recomendado para la selección de cepas productoras de tensioactivos,<sup>10</sup> cuya composición fue:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  (5,3 g);  $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (0,2 g);  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g);  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,01 g); EDTA NaOH (0,0014 g);  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (4 g);  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (6 g); extracto de levadura (1 g) y agua destilada (1 L). Las fuentes de carbono empleadas fueron: almidón, arabinosa, galactosa, glucosa, lactosa, maltosa, rafinosa, sacarosa y trehalosa al 3%.

El estudio de las fuentes de nitrógeno se realizó utilizando el mismo medio basal suplementado con sacarosa al 3 %, como fuente de carbono y energía. Las fuentes de nitrógeno ensayadas fueron:  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{N H}_4\text{Cl}$ ,  $\text{NaNO}_3$  y  $\text{KNO}_3$  a la concentración de 5,3 g/L.

Todos los experimentos de selección de fuentes se realizaron por duplicado y con tres repeticiones cada muestra.

Una vez seleccionadas las mejores fuentes de carbono de las ensayadas, se realizaron dos experimentos utilizando diferentes concentraciones (2, 3 y 4 %), para escoger la concentración a la cual se producía más tensioactivo. La concentración de la fuente de nitrógeno en el medio de cultivo fue 5,3 g/L.

A partir de los resultados de las fuentes de nitrógeno, se seleccionó la sal donde se obtuvieron las mayores concentraciones de tensioactivo y se realizaron dos experimentos empleando diferentes concentraciones: 3 y 4 %.

Se realizaron curvas de crecimiento utilizando el medio basal suplementado con sacarosa 3 %. La toma de muestras se efectuó cada 2h.

La incubación se realizó en una zaranda termostataada a 30 °C y una agitación de 125 r/min.

#### Métodos analíticos

La concentración celular se determinó por turbidimetría a 670nm y se expresó en g/L mediante la curva de calibración D.O. vs. peso seco, utilizando el factor de la curva<sup>11</sup> y adeterminación de la concentración de proteínas, utilizando la técnica de Bradford.<sup>12</sup>

Las mediciones de las tensiones superficiales e interfaciales se realizaron por el método del anillo de du Nouy,<sup>13</sup> utilizando un tensiómetro Kruss K 10T. La fase oleosa empleada en las determinaciones de tensiones interfaciales fue diesel.

La concentración de tensioactivo producida se determinó por dos métodos: concentración micelar crítica (CMC) y concentración de lípidos totales.

La CMC se determinó midiendo la tensión superficial (TS) de las diferentes diluciones del caldo fermentado. El cambio de pendiente de la curva de TS frente a las diluciones efectuadas, proporciona el valor de CMC.<sup>13,17</sup> Las diluciones realizadas fueron: 0 ; 0,25; 0,5; 1 ; 2 ; 5; 10 ; 20 ; 50 y 100%.

El caldo de cultivo de la cepa estudiada se centrifugó a 75 00g durante 30min. El producto obtenido se extrajo del sobrenadante con una mezcla de cloroformo/metanol (2:1, w/v). Los extractos orgánicos se reunieron, se evaporaron en evaporador rotatorio a 30 °C y se les determinó la concentración de lípidos totales según el método de la sulfofosfovainilina.<sup>14</sup> Para facilitar la detección colorimétrica, se modificó el método en cuanto a los volúmenes de la muestra, del  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y del alicuota añadida al reactivo de color.

#### Tratamiento estadístico

Los resultados de los estudios de selección de las fuentes de carbono y nitrógeno fueron procesados estadísticamente utilizando la dócima de ANOVA de clasificación simple y la de rangos múltiples de Duncan.<sup>15</sup>

## RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados muestran que la cepa IDO-503, es un microorganismo con amplias capacidades para utilizar una variada gama de fuentes de carbono, pero además de producir tensioactivos (Tabla I).

Como se puede observar, los mejores crecimientos se obtuvieron en sacarosa, glucosa y trehalosa; seguida de rafinosa y arabinosa. Los menores crecimientos se observaron en lactosa, maltosa y almidón (Tabla I). El menor crecimiento se obtuvo cuando el microorganismo fue cultivado en almidón, lo que sugiere que este sustrato es de lenta metabolización.

Los valores de tensión superficial (TS) e interfacial (TI) de los diferentes caldos fermentados disminuyeron significativamente con relación a los controles, esto demuestra que la cepa en cuestión es capaz de producir tensioactivo a partir de una amplia gama de fuentes de carbono (Tabla I).

**TABLA I**  
Comportamiento del crecimiento y de las tensiones superficial e interfacial de la cepa IDO-503 frente a diferentes fuentes de carbono

Fuente (3 %)	Crecimiento (g/L)	TS		TI	
		(mN/m)			
		Control	Muestra	Control	Muestra
Almidón	0,54 g	47,0	30,5	20,9	1,9
Arabinosa	3,09 d	47,7	34,7	24,3	5,8
Galactosa	2,00 e	44,7	32,0	21,6	4,3
Glucosa	4,18 b	43,2	29,5	17,9	2,8
Lactosa	1,21 f	44,6	29,4	24,5	2,3
Maltosa	1,12 f	44,2	29,9	20,8	2,4
Rafinosasa	3,66 c	44,1	29,7	20,7	2,1
Sacarosa	4,85 a	46,4	29,5	21,3	1,3
Trehalosa	4,10 b	40,6	29,8	18,1	2,6

Nivel de significación: 0,05. Las letras indican diferencias entre los grupos.

Al analizar las TS y TI, se puede observar que aunque no existen diferencias significativas entre las fuentes de carbono utilizadas, cuando el microorganismo se cultivó sobre sacarosa como fuente de carbono y energía, se obtuvieron

las mayores disminuciones de la actividad superficial (TS: 29,5 mN/m; TI: 1,3 mN/m) (Tabla I).

Este resultado resultó muy alentador, ya que en Cuba la producción de sacarosa está difundida, pero además resulta

un nutriente relativamente barato en comparación con el resto de los ensayados, lo que presupone una ventaja en el momento de la realización de una producción industrial de este biotensioactivo.

Robert y col.<sup>7</sup> realizaron una investigación sobre el efecto de la fuente de carbono en la producción de tensioactivo en *Pseudomonas aeruginosa* 44T1 y encontraron que en todos los sustratos hidrofílicos ensayados el crecimiento microbiano fue elevado y los valores de TS resultaron bajos, variando entre 28,5 y 32,9 mN/m; sin embargo, cuando se cultivaba el microorganismo sobre hidrocarburo en todos los casos el crecimiento fue notable, ni se observaron disminuciones sensibles de las tensiones superficiales e interfaciales.

Estudios realizados con microorganismos productores de tensioactivos del género *Pseudomonas* aislados de aguas marinas cubanas, demostraron que los mejores valores de tensiones se obtenían cuando se cultivaban las cepas en glucosa al 2%, seguido de miel 2% y por último en sacarosa 2%.<sup>16</sup>

En la Tabla II se muestran los resultados obtenidos del crecimiento bacteriano, la TS y la TI, de la cepa IDO-503 al ser cultivada en glucosa y sacarosa a tres niveles de concentración.

Como se puede observar, no se obtuvieron diferencias significativas ni entre los niveles dentro de una misma fuente, ni entre ambos sustratos (Tabla II).

**TABLA II**  
Comportamiento del crecimiento y de las tensiones superficial e interfacial, utilizando glucosa y sacarosa como fuentes de carbono a diferentes concentraciones de la cepa IDO-503

Fuente (%)	Crecimiento (g/L)	TS		TI	
		(mN/m)			
Glucosa					
22	,06 ± 0,405 <sup>a</sup>	29,8 ± 1,769 <sup>b</sup>	2,0 ± 1,213 <sup>b</sup>		
31	,86 ± 0,225 <sup>a</sup>	29,7 ± 1,577 <sup>b</sup>	2,1 ± 0,640 <sup>b</sup>		
41	,77 ± 0,149 <sup>a</sup>	30,8 ± 0,771 <sup>a</sup>	3,4 ± 0,271 <sup>a</sup>		
Sacarosa					
22	,04 ± 0,105 <sup>a</sup>	30,3 ± 2,064 <sup>a</sup>	2,2 ± 0,801 <sup>a</sup>		
31	,97 ± 0,098 <sup>a</sup>	29,1 ± 0,864 <sup>b</sup>	1,8 ± 0,662 <sup>a</sup>		
42	,00 ± 0,144 <sup>a</sup>	29,4 ± 0,926 <sup>b</sup>	1,9 ± 0,665 <sup>a</sup>		

Nivel de significación: 0,05. Las letras indican diferencias entre los grupos.

Como resultado de estas corridas, se puede concluir que la cepa IDO-503 puede cultivarse a las concentraciones de glucosa y sacarosa ensayadas, sin que se afecte su crecimiento, ni la síntesis del tensioactivo.

Villaverde y col.<sup>17</sup> al cultivar la cepa IDO-503 en un medio basal, suplementado con sacarosa 3,5 % encontraron que el crecimiento del microorganismo resulta superior al logrado cuando era fermentado en el mismo medio de cultivo utilizando sacarosa al 5 %. Por otro lado, la CMC<sup>-1</sup> obtenida con sacarosa 3,5 % fue el doble que con sacarosa 5 %, lo cual indica que la inadecuada selección de la concentración de la fuente de carbono influye de forma determinante en la síntesis del tensioactivo.

Se ha reportado que *Pseudomonas* 44T1 es capaz de crecer bien y producir ramnolipidos cuando es cultivada en un medio basal cuyas fuentes de carbono sean glucosa, manitol y glicerol al 2 %, sin embargo cuando se cultiva en fructosa los resultados no son buenos.<sup>7</sup>

En la Tabla III se muestran los resultados de las corridas experimentales para conocer la influencia que ejercen diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento y las características tensiométricas de la cepa bajo estudio.

Como se puede observar, los mejores resultados se obtuvieron cuando el microorganismo se cultivó en un medio de cultivo cuya fuente de nitrógeno eran las sales de amonio. Sin embargo, cuando se probaron los nitratos, los resultados no fueron tan notables, en el crecimiento microbiano ni en las tensiones superficiales e interfaciales.

Se describen<sup>18-20</sup> múltiples ejemplos en los que la naturaleza de la fuente de nitrógeno ejerce un decisivo papel so-

bre el crecimiento de los microorganismos y la producción de tensioactivos.

Investigaciones realizadas sobre el efecto de diferentes fuentes de nitrógeno en el crecimiento y síntesis de tensioactivo en *Rhodococcus*, mostraron que el mayor crecimiento se obtenía cuando se empleaba nitrato de sodio. Con relación a la concentración de tensioactivo, se encontró que los valores de CMD<sup>-1</sup> eran similares tanto para los nitratos, como para las sales de amonio ensayadas, sin embargo, la mejor actividad emulsionante (E24) se obtenía cuando se utilizaba nitrato de sodio en el medio de cultivo como fuente de nitrógeno, por lo que se concluyó que esta fuente era la más eficiente.<sup>6</sup> Similares resultados han sido reportados para otros géneros bacterianos productores de tensioactivos.<sup>21,22</sup>

Una vez demostrado que para esta cepa de *Bacillus cereus* la fuente de nitrógeno más adecuada tanto para el crecimiento como para la síntesis de tensioactivo era la sal de amonio, fue seleccionado el NH<sub>4</sub>Cl y se realizó un experimento utilizando diferentes concentraciones de él (Tabla IV).

Como se puede observar, el crecimiento microbiano a todas las concentraciones ensayadas fue alto; no obstante, en las correspondientes a 3 y 4 g/L, los valores fueron superiores (Tabla IV).

Con relación a las características tensiométricas no se obtuvieron diferencias significativas entre las diferentes concentraciones de NH<sub>4</sub>Cl. Además, se observó una importante disminución de las TS y TI (Tabla IV).

No sólo el tipo de fuente de nitrógeno, sino también, la concentración óptima para la producción de tensioactivo, varían según el género microbiano empleado e incluso dentro de un mismo género.<sup>13,22,23</sup>

**TABLA III**  
Influencia de diferentes fuentes de nitrógeno sobre el crecimiento microbiano y las tensiones superficial e interfacial de la cepa IDO-503

Fuente (5,3 g/L)	Crecimiento (g/L)	TS		TI
		(mN/m)		
NaNO <sub>3</sub>	1,21 ± 0,180 <sup>a</sup>	32,3 ± 3,110 <sup>a</sup>		
KNO <sub>3</sub>	1,41 ± 0,05 <sup>a</sup>	32,2 ± 2,960 <sup>a</sup>		
NH <sub>4</sub> Cl	4,36 ± 0,846 <sup>b</sup>	29,0 ± 0,605 <sup>b</sup>		
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4,29 ± 0,739 <sup>b</sup>	29,4 ± 0,491 <sup>b</sup>		

Nivel de significación: 0,05. Las letras indican diferencias entre los grupos.

**TABLA IV**  
Influencia de diferentes concentraciones de NH<sub>4</sub>Cl sobre el crecimiento y las tensiones superficial e interfacial de la cepa *Bacillus cereus* IDO-503

Concentración (g/L)	Crecimiento	TS		TI
		(mN/m)		
35	,38 ± 0,435 <sup>a</sup>	28,3 ± 0,230 <sup>a</sup>		
45	,96 ± 0,152 <sup>a</sup>	28,2 ± 0,380 <sup>a</sup>		
5,3	4,38 ± 0,115 <sup>b</sup>	28,3 ± 0,626 <sup>a</sup>		
63	,64 ± 0,152 <sup>b</sup>	28,3 ± 0,878 <sup>a</sup>		

Nivel de significación: 0,05. Las letras indican diferencias entre los grupos.

Estudios realizados con una cepa de *Bacillus cereus* productora de tensioactivo muestran que utilizando sacarosa 1% y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1% el microorganismo crece bien y las TS disminuyen hasta 28 mN/m.<sup>23</sup>

En la Tabla V se presentan los perfiles de crecimiento (D.O. y concentración de proteínas), TS, CMC<sup>-1</sup> y concentración de lípidos totales, empleando el medio basal y sacarosa al 3% como fuente de carbono.

**TABLA V**  
Perfiles de crecimiento, tensión superficial y concentración de lípidos totales de la cepa *B. cereus* IDO-503, utilizando un medio basal con sacarosa 3%

Tiempo (h)	D.O. (670 nm)	Proteínas (µg/mL)	TS (mN/m)	CMC <sup>-1</sup>	Lípidos totales (µg/mL)
0	0,25	—	40,3	23,0	24,0
2	0,41	36,47	33,8	25,6	121,83
4	0,95	60,05	30,4	32,0	145,84
6	1,45	75,8	30,2	43,6	243,07
8	1,55	71,05	30,1	45,0	437,52
10	1,55	—	29,8	—	486,3
24	1,45	70,15	29,3	62,0	631,98

El microorganismo mostró un crecimiento rápido, ya que a las 6 h de iniciado el experimento la absorbancia se había incrementado en 5,8 veces con relación al valor inicial (0,25). El tiempo de duplicación (TD) del microorganismo resultó de 0,95 h<sup>-1</sup>.

Se observó una disminución apreciable de la TS a las 2 h de comenzada la fermentación. A las 24 h su valor resultó igual a 29,3 mN/m (Tabla V).

Se conoce que la cepa de *Bacillus cereus* IDO-503 produce mayoritariamente un tensioactivo aniónico de naturaleza glicolípida.

Muchos autores<sup>24,25</sup> utilizan la CMC<sup>-1</sup> como una medida de la concentración de biotensioactivos, lo que permite conocer el grado en que el cultivo, células en suspensión o extrac-

tos purificados pueden diluirse antes de alcanzar la CMC. Aunque es universal el uso de la CMC, esta no constituye un indicador exacto, sino una medida indirecta de la concentración de tensioactivos liberados al medio. Es por ello que conociendo la naturaleza química del tensioactivo mayoritario de la cepa IDO-503, se decidió determinar la concentración de lípidos totales como un posible indicador más próximo a la concentración real del glicolípido que se produce extracelularmente en el cultivo en estudio para su comparación posterior con la CMC<sup>-1</sup>.

Como se puede observar en la figura 1, existe una evidente relación entre la CMC<sup>-1</sup> y la concentración de lípidos totales durante el tiempo de fermentación.

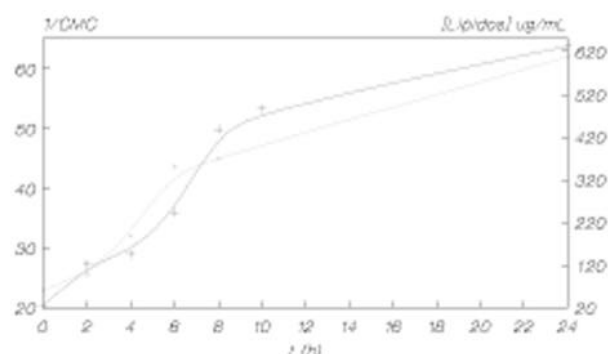


Fig. 1. Relación entre la  $CMC^{-1}$  y la concentración de lípidos totales durante la fermentación de IDO-503.  
 •  $1/CMC$  + [Lípidos]

El análisis estadístico arrojó una elevada correlación positiva ( $r = 0,96$ ). Este resultado permitió recurrir a una medida diferente de la  $CMC^{-1}$ , para evaluar la producción de un biotensioactivo de naturaleza lipídica. Por otro lado, la determinación de lípidos totales es un acercamiento inicial a esta cuestión, pero sería valioso encontrar en este campo medidas directas y exactas.

En la figura 2 se muestra la curva de crecimiento de la cepa *B. cereus* IDO-503 y la producción de lípidos totales como medida de la concentración de tensioactivo.

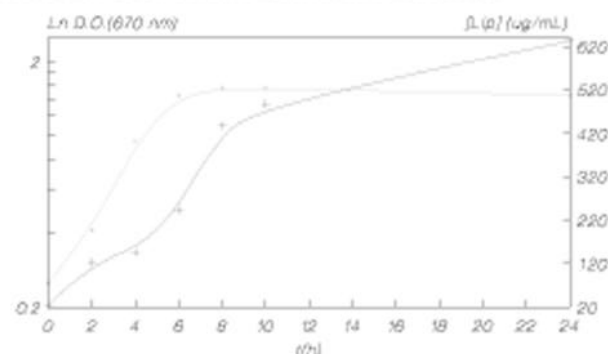


Fig. 2. Perfil de crecimiento y producción de tensioactivo de la cepa *Bacillus cereus* IDO-503.  
 • Ln D.O. + Lípidos

Como se puede observar, la fase de latencia no se aprecia, lo cual demuestra que fue muy corta. La fase exponencial tuvo una duración de aproximadamente 6 h, obteniéndose valores de  $D.O. = 1,45$ . A partir de este tiempo, comenzó la fase estacionaria.

La velocidad específica de crecimiento fue de  $0,723 h^{-1}$ .

La concentración de lípidos totales se eleva más de 18 veces durante la fase exponencial. En la fase estacionaria, se observa un discreto incremento de la concentración de lípidos totales, lo que pudiera deberse a otros lípidos que son también sintetizados por el microorganismo y que no poseen actividad superficial.

El glicolípido en cuestión parece sintetizarse durante todo el ciclo de crecimiento de la cepa IDO-503, verificándose su mayor producción en la fase exponencial. Estos resultados indican que la producción del tensioactivo de esta cepa marina está asociada al crecimiento, por lo que esta fermentación debe ser del tipo I según la clasificación de Gaden.<sup>26</sup>

## CONCLUSIONES

La producción de tensioactivo por *Bacillus cereus* IDO-503, se verificó en todas las fuentes de carbono ensayadas, atendiendo a las notables disminuciones de las tensiones superficiales e interfaciales. Los mejores crecimientos se verificaron en glucosa, sacarosa y trehalosa.

El microorganismo creció mejor y sintetizó más tensioactivo cuando fue cultivado en un medio cuya fuente de nitrógeno eran sales de amonio.

Se verificó que utilizando  $NH_4Cl$  4 g/L, el crecimiento fue el mayor con respecto a las otras concentraciones de nitrógeno ensayadas; sin embargo, no se apreciaron diferencias entre las características superficiales entre las distintas concentraciones de nitrógeno.

## BIBLIOGRAFIA

1. Finnerty W.R. *Biotechnol.*, **5**, 291, 1994.
2. Kosaric N., Gray N.C. and W.I. Cairns. *Biotechnology and the surfactant industry*. In: *Biosurfactand and Biotechnology* N. Kosaric, W.I.Cairns and N.C.Gray (Ed.), Marcel Dekker Inc. New York., 1-19, 1987.
3. Mercadé M.E., Manresa M.A., Robert M., Espuny M.J., De Andres C. and Guinea J. *Bioresource Technol.*, **43**, 1, 1993.
4. Kretschmer A., Bock H. and Wagner F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **4**, 864, 1982.
5. Passari A., Schmidt M., Halfner T., Wray V., Lang S. and Wagner F. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **37**, 281, 1992.
6. Abu-Ruwaida A.S., Banat I.M., Hadjirto S. and A. Khamis *Word J. Microbiol. and Biotechnol.*, **7**, 53, 1991.
7. Robert M., Mercadé M.E., Bosch M., Parra J.L., Espuny M.J., Manresa M.A. and Guinea J. *Biotechnol. Letters*, **11**, 871, 1989.
8. Joseph I.N., Bellota M., Capó M.C., Fonseca E., Ramos I. y Fuentes M. *Biodegradación de hidrocarburos por microorganismos marinos*. Inf. Final Tema. Instituto de Oceanología, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Ciudad de La Habana, Cuba, 1989.
9. Pérez G., Enriquez D. y Montes R.J. *Identificación de una cepa bacteriana perteneciente al género Bacillus*. Informe Interno, Instituto de Oceanología, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Ciudad de La Habana, Cuba, 1992.
10. Mulligan O.N., Cooper D.G. and Neufeld J. *J.Fermentation Technol.*, **62**, 311, 1984.
11. García A., Ortiz E., Nuñez R. y Hernández G.M. *Correlación de técnicas para evaluar el crecimiento microbiano en Bacillus cereus IDO-503*. Informe Interno, Instituto Oceanología, Ministerio de Ciencia, Tecnología y Medio Ambiente, Ciudad de La Habana, Cuba, 1994.
12. Bradford, M.H. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248, 1976.
13. Duvnjak Z. and Kosaric N. *Biotechnol. Lett.*, **7**, 793, 1985.
14. Zollner N. and Kirsch K. *Z. Ges. Exp. Med.*, **135**, 545, 1962.
15. Sigarrosa A. *Biometría y Diseño Experimental*. Ed. Pueblo y Educación, Ministerio de Educación Superior, Ciudad de La Habana, 354-359, 1985.
16. Joseph I.N., Lugojo M., Villavede M., Bellota M., Riveón L. y Rodríguez F. *IDO-84 Bacteria marina productora de tensioactivo: taxonomía e influencia de diferentes fuentes de carbono*. Memorias III Congreso de Ciencias del Mar, Ciudad de La Habana, Cuba, enero, 1994.
17. Villaverde M., Riverón L., Bellota M., Lugojo M., García A., Ortiz E., Joseph N., Pérez G., Enriquez D., Nuñez R. y Diéguez F. *Producción de un biotensioactivo por una bacteria marina aislada de los sedimentos de la Bahía de Cárdenas*. Memorias III Congreso de Ciencias del Mar, Ciudad de La Habana, Cuba, enero, 1994.
18. Syldalk C. and I. Wagner. *Production of biosurfactant*. In: *Biosurfactants and Biotechnology*. N. Kosaric, W.I. Cairns and N.C.C. Gray (Ed.), Marcel Dekker Inc. New York., 89-120, 1987.
19. Sutherland I. *Adv. Microbiol. Physiol.*, **23**, 79, 1982.
20. Person A., Molin G. and Weibull C. *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1, 1990.
21. Guerra-Santos L., Kappeli O. and Fiechter A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **48**, 301, 1984.
22. Robert M., Mercadé E., Andres C., Espuny M.J., Manresa M.A. and Guinea J. *Optimización de la producción de biotensioactivos por Pseudomonas aeruginosa 44T1*. *Investigación*, **42**, 1, 1991.
23. Cooper, D. and B.G. Goldenberg *Appl. Environ. Microbiol.*, **5**, 3, 224, 1987.
24. McInerney M., Javaheri M. and Nagle D. *J. Industrial Microbiol.*, **5**, 95, 1990.
25. Cooper D.G., Zajic J.E. and Gerson D.F. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 4, 1979.
26. Gaden E.L. *Fermentation kinetics and productivity*. *Chem. Ind.*, 154-156, 1955.