



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

Caracterización de *Pseudomonas* sp productoras de biosurfactantes aisladas de Cuatro Ciénegas Coahuila, México.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACÁDEMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

M en C. JEIRY TORIBIO JIMÉNEZ

DIRECTORA DE TESIS: DRA. GLORIA SOBERÓN CHÁVEZ



MÉXICO, D.F.

2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

a Dios, por haber guiado mis pasos hasta aquí

A la UNAM, al Instituto de Investigaciones Biomédicas, gracias porque me he formado en la investigación biológica.

A la Dra. Gloria Soberón Chávez, por su infinito apoyo incondicional, cariño sincero y su incansable forma de enseñarme.

A la Dra. Valeria Souza, por su apoyo, cariño y el empuje de seguir adelante a pesar de las circunstancias.

Al Dr. Jesús Caballero Mellado†, que aunque ya físicamente no esta, se que esta feliz por este logro, con mucho cariño, respeto y admiración. Descanse en paz.

Al Dr. Sergio Sánchez Esquivel, gracias por su paciencia y sus consejos en todo el transcurso de mi estancia aquí.

A la Dra. Rosa Navarro, Dr. Manuel Jiménez, por el apoyo técnico y profesional en el desarrollo de esta tesis.

A mis sinodales, Dra. Esperanza Martínez, Dra. Guadalupe Espín, Dr. Arturo Becerra y al Dr. Joaquín Sánchez, por sus consejos y observaciones, gracias por todo!!!!

Dra. Ana E. Escalante, gracias por todo el apoyo brindado!!!!

A mi Familia (Ricardo y Karla) por aguantar mis ausencias, que a pesar de todo gracias por estar siempre conmigo, los AMO!!!!

A todos mis amigos, Moni, Chayo, Andrea, Abis, Jimena, Maris, Mayte, Sergio, Vale, Ángela, Miriam, Jess...todos los que han caminado a mi lado, gracias por su apoyo., también a todos los que de alguna manera contribuyeron a la culminación de este proyecto.

Agradezco al CONACYT, por la beca otorgada durante todo este proceso, a la coordinación del Doctorado en Ciencias Biomédicas por el apoyo de hacer mas tranquilo tantos tramites.

Este proyecto fue realizado en el laboratorio de la Dra. Gloria Soberón Chávez en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del IIB-UNAM, y financiado por el proyecto DGPA-UNAM PAPIIT IN202510, además representa parte de la estancia sabática de la Dra. Valeria Souza, en E.U. y también financiado por DGAPA.

Gracias a todos los que de una forma u otra contribuyeron en la realización de este proyecto.

Artículo 1:

Jeiry Toribio, M. in Sc.; Ana E Escalante, PhD; Jesús Caballero-Mellado, PhD; Andrea González-González, M in Sc.; Sergio Zavala, M. in Sc.; Valeria Souza, PhD; Gloria Soberón-Chávez, PhD. **“Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin”**. Elsevier Editorial System(tm) for Systematic and Applied Microbiology, accepted. Manuscript Number: SAM 3335R2.

Artículo 2:

Jeiry Toribio, Ana E. Escalante and Gloria Soberón-Chávez. **“Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*”** European Journal of Lipid Science and Technology. 112 (10);1082–1087, October 2010.

Artículo 3:

Juan Carlos Velázquez-Aradillas, Jeiry Toribio-Jiménez, Ma. del Carmen Ángeles González-Chávez, Francisco Bautista, Mariano E. Cebrián, Fernando José Esparza-García and Refugio Rodríguez-Vázquez. **“Characterisation of a biosurfactant produced by a *Bacillus cereus* strain tolerant to cadmium and isolated from green coffee grain”**. World Journal of Microbiology and Biotechnology. DOI 10.1007/s11274-010-0533-1. Published online: 01 september 2010.

Artículo 4:

Ana E. Escalante, Jesús Caballero-Mellado, Lourdes Martínez-Aguilar, Alejandra Rodríguez-Verdugo, Andrea González-González, Jeiry Toribio-Jiménez and Valeria Souza. **“*Pseudomonas quadricaenicaensis* sp. nov. a novel species isolated from an evaporating lagoon in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, México”**. Int J Syst Evol Microbiol **59** (2009), 1416-1420.

Artículo 5:

Rev Lationoam Microbiol 2006; 48(2):91-98. **“La síntesis de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*”** Gloria Soberón Chávez, Humberto García, Marisela Aguirre, Luz María Delgado, Abigail González, Jeiry Toribio y Alsino Villarreal.

ÍNDICE DE FIGURAS

	<i>Pág.</i>
Fig. 1. Estructura de los principales glicolípidos (mono-diramrólpidos).	4
Fig. 2. Biosíntesis de los ramrólpidos.	6
Fig. 3. Estructura de la viscosina	11
Fig. 4. Estructura de la viscosinamida	12
Fig. 5. Estructura de la lokisina	13
Fig. 6. Estructura de la putisolvina I y II	16
Fig. 7. Mapa del área de Cuatro Ciénegas Coahuila en México	29
Fig. 8. Producción de ramrólpidos por <i>Pseudomonas</i> sp CCC77	41
Fig. 9. Filogenia del gen 16S rRNA para la cepa de <i>Pseudomonas</i> sp CCC77 colectada en el sistema Churince de CCC en México.	42
Fig. 10. Filogenia del gen <i>gyrB</i> para la cepa de <i>Pseudomonas</i> sp CCC77 colectada en el sistema Churince de CCC en México.	43
Fig. 11. Cromatografía de los extractos de ramrólpidos en el banco de cepas de <i>P. mosselli</i>	44
Fig. 12. Cromatografía de las fracciones purificadas de los ramrólpidos de la <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	45
Fig. 13. Clonas de la cepa <i>P. mosselli</i> CCC77 aisladas en medio PSVW	46
Fig. 14. Análisis del TLC de las cepas CCC77B y PAO1.	47
Fig. 15. Digestión del DNA cromosomal de las clonas obtenidas en agar PSVW con respecto a la cepa CCC77.	49
Fig. 16. Medición los autoinductores C ₄ -HSL y C ₁₂ -HSL de las cepas de <i>P. aeruginosa</i> PAO1, <i>P. aeruginosa</i> M10 y <i>Pseudomonas</i> sp CCC77, CCC77A y CCC77B crecidas en PPGAS a 37° y 30°C.	53
Fig. 17. Cromatografía de la curva de inducción con 10µM de C ₁₂ -HSL en diferentes etapas de crecimiento, en medio PPGAS extraídos a las 24 y 48h de inducción.	55
Fig. 18. Ensayo de parálisis de <i>C.elegans</i> N2 por <i>P. aeruginosa</i> PAO1, CCC77, CCC77A y CCC77B.	56
Fig. 19. Pruebas de screening de la cepa M9b donde se muestra la producción de biosurfactante.	67

Fig. 20. Desarrollo de la cepa M9b en diversas fuentes de carbono.	68
Fig. 21. Efecto de la temperatura y la acción de la proteasa E sobre el biosurfactante producido por <i>Pseudomonas</i> sp M9b.	69
Fig. 22. Filogenia de los genes 16S rRNA, <i>recA</i> y <i>gyrB</i> de las cepas de <i>Pseudomonas</i> sp aisladas en el sistema Churince en CCC.	70
Fig. 23. Perfil electroforético de proteínas totales de las diferentes <i>Pseudomonas</i> sp incluidas en este estudio.	72
Fig. 24. Producción de espuma en PPGly de las diferentes <i>P. koreensis</i> .	76
Fig. 25. Comparación del ensayo de competencia entre las <i>P. koreensis</i> M9b + <i>E. aerianticum</i> m5G 1:1 y <i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T + <i>E. aerianticum</i> m5G 1:1.	82
Fig. 26. Concentración del biosurfactante medidos por E ₂₄ en las cepas de <i>P. koreensis</i> s/c <i>E. aerianticum</i> m5G 1:1	83
Fig. 27. Concentración de las E ₂₄ en las diferentes proporciones de <i>P. koreensis</i> M9b: <i>E. aerianticum</i> m5G.	85
Fig. 28. Cromatografía del Extracto crudo (EACSE) de los aislamientos de <i>P. koreensis</i> aisladas de CCB.	86
Fig. 29. Formación de biofilms después de 24h por las especies de <i>P. koreensis</i> teñidas con cristal violeta al 1%.	89

ÍNDICE DE GRAFICAS

	<i>Pág.</i>
Grafica 1. Cuantificación de azúcares reductores en las clonas de las cepas CCC77, transformadas con pUO94.	51
Grafica 2. Cuantificación de azúcares reductores en las clonas de las cepas CCC77, transformadas con pINC94	52
Grafica 3. Curva de inducción con 10 μ M de C ₁₂ -HSL en diferentes etapas de crecimiento.	54
Grafica 4. Ensayo de parálisis de <i>C. elegans</i> N2 por <i>P. aeruginosa</i> PAO1, CCC77, CCC77A y CCC77B.	56
Grafica 5. Cuantificación de la producción de biosurfactante por el índice de Emulsificación (E ₂₄) en PPGly a 30°C, por 24h en las <i>P. koreensis</i> .	76
Grafica 6. Curvas de crecimiento de las <i>P. koreensis</i> y <i>E. aurianticum</i> m5G en PPGly.	78
Grafica 7. Producción de biosurfactante en PPGly en base a la curva de crecimiento de las <i>P. koreensis</i> .	79
Grafica 8. Determinación de la patogenicidad en ratón BALB/C ANn de las <i>P. koreensis</i> .	89

ÍNDICE DE TABLAS

	<i>Pág</i>
Tabla 1. Coordenadas geográficas y medidas fisicoquímicas del agua del sitio de muestreo en el sistema Churince en Cuatro Ciénegas Coahuila.	30
Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación y la secuenciación del gene 16S rDNA.	35
Tabla 3. Secuencia de los primers usados para amplificar las secuencias de los genes de la Exotoxina A (<i>toxA</i>) y la ramnosiltransferasas (<i>rhlA</i> y <i>rhlB</i> .)	38
Tabla 4. Perfil de resistencia de las clonas <i>P. mosselli</i> CCC77.	50
Tabla 5. Secuencia de los primers usados para la amplificación de los genes <i>gyrB</i> , <i>recA</i> y 16S rRNA.	61
Tabla 6. Resultados de la hibridación DNA: DNA de <i>P. koreensis</i> M9b vs <i>Pseudomonas</i> sp y además se muestra el tamaño del genoma en Kb.	73
Tabla 7. Características metabólicas de las cepas aisladas de las <i>P. koreensis</i> aisladas de CCB con respecto a la <i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T .	74
Tabla 8. Perfil y proporción de ácidos grasos de las cepas aisladas de las <i>P. koreensis</i> aisladas de CCB con respecto a la <i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T .	75
Tabla 9. Ensayo de competencia en PPGly de las cepas <i>P. koreensis</i> vs <i>E. aurianticum</i> m5G.	81
Tabla 10. Efecto del ensayo de competencia en base a la frecuencia de <i>P. koreensis</i> M9b vs <i>E. aurianticum</i> m5G.	84
Tabla 11. Efecto del EACSE sobre el crecimiento de las diferentes bacterias ATCC en caldo LB.	87
Tabla 12. Efecto del EACSE de las diferentes <i>P. koreensis</i> M9b, M9c, CCB10 y LMG 21318 ^T sobre el crecimiento de <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 y <i>E. aurianticum</i> m5G en caldo LB.	88

ÍNDICE

<i>Contenido</i>	<i>Pág.</i>
Agradecimientos	i
1. Resumen	ii
2. Abstract	iii
3. CAPITULO I: <i>Pseudomonas</i> sp PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES	
3.1 Especies de <i>Pseudomonas</i> productoras de biosurfactantes	1
3.2 Ramnolípidos producidos por <i>Pseudomonas</i> sp	2
3.3 Aplicación y Biosíntesis de los ramnolípidos.	3
3.4 Características, aplicaciones y Biosíntesis de los lipopéptidos cíclicos	4
3.5 Características y Biosíntesis de algunos lipopéptidos cíclicos.	7
3.5.1 Artrofactina	9
3.5.2 Viscosina	9
3.5.3 Viscosinamida	10
3.5.4 Amfisina	11
3.5.5 Lokisina	12
3.5.6 Siringomicina	13
3.5.7 Tolasina	13
3.5.8 Putisolvina	14
3.5.9 Entolisina	15
3.6 Producción de lipopéptidos cíclicos.	17
3.7 Métodos usados para la detección de bacterias productoras de BS	17
3.7 Conclusiones	18
4. CAPITULO II: ZONA DE ESTUDIO	
4.1 Cuatro Ciénegas Coahuila (CCC).	25
4.1.1. Ubicación geográfica	26
4.1.2 Clima	27
4.1.3 Hidrología	27
4.1.4 Sistema Churince	28

1. ETAPA I: AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE <i>Pseudomonas sp</i> PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES AISLADAS DEL VALLE DE CUATROCIENEGAS COAHUILA.	32
1.1 Introducción	32
1.2 Objetivo general	32
1.3 Objetivos particulares	32
1.4 Antecedentes del proyecto.	33
1.5 Materiales y Métodos: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE <i>Pseudomonas sp</i> CCB77.	33
1.5.1 Aislamiento de las muestras.	33
1.5.2 Siembra y extracción de DNA	33
1.5.3 Identificación de las especies bacterianas	34
1.5.4 Pruebas bioquímicas	36
1.5.5 Detección de metabolitos secundarios	36
1.5.5.1 Determinación de ramnolípidos.	36
1.5.5.2 Cuantificación de piocianina	36
1.5.5.3 Determinación de acylhomoserina lactona (C ₁₂ -HSL, C ₄ -HSL).	36
1.5.6 Amplificación de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactante y exotoxina A.	
5.5.6.1. Amplificación de los genes <i>rhlA</i> , <i>rhlB</i> y <i>toxA</i> .	37
5.5.7. Complementación de las <i>Pseudomonas sp</i> CCC77.	37
5.5.7.1 Transformación con los plásmidos pUO94 y pINC94 de la <i>Pseudomonas sp</i> CCC77.	38
5.5.8. Purificación de ramnolípidos de <i>P. aeruginosa</i> PAO1.	
5.5.9. Modelo de virulencia en <i>C. elegans</i> N2 de CCC77.	38
5.5.9.1 Ensayo de parálisis.	39
5.5.9.2 Ensayo de muerte rápida	39
5.5.10 Resultados y Discusión.	40
5.5.11. Conclusión.	40
	57

2. ETAPA II: AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES POR <i>Pseudomonas</i> sp M9b, M9c y CCB10.	
2.1 Objetivo general	58
2.2 Objetivos particulares	58
2.3 Materiales y Métodos: Aislamiento de las muestras.	58
2.3.1 Determinación de la producción de biosurfactante	59
6.3.1.1 Extracción de Biosurfactante	59
6.3.1.2 Fraccionamiento de la placa preparativa	60
6.3.2 Identificación filogenética: Amplificación de genes y secuenciación.	60
6.3.2.1 Ensamble y edición de datos de secuencias	61
6.3.2.2 Relaciones filogenéticos	62
6.3.2.3 Perfil de proteínas totales	62
6.3.2.4 Hibridación DNA: DNA	62
6.3.2.5 Análisis de ácidos grasos	63
6.3.2.6 Tamaño del genoma	63
6.3.3 Evaluación de la toxicidad del extracto crudo y ensayos de competencia.	64
6.3.3.1 Determinación de la toxicidad o antibiótica del extracto crudo.	64
6.3.3.2 Ensayos de competencia: Procedimiento microbiológico.	65
6.3.3.3 Formación de biofilms	66
6.3. 4 Prueba de patogenicidad.	
6.3.4.1 Ensayo para medir la dosis mínima letal de <i>P. koorensis</i> LMG 21318 ^T , <i>P. koreensis</i> M9b, M9c y CCB10 en ratones BALB/C ANn.	66
6.4 Resultados y Discusión	67
6.5. Conclusión	91
6.6 Perspectivas	93
7. Referencias	93

RESUMEN

En este trabajo se estudio la producción de biosurfactantes en cepas de *Pseudomonas* sp, aisladas del sistema Churince del sistema acuático del valle de Cuatro Ciénegas Coahuila, México, D.F. En primer lugar, se describe la producción de biosurfactes por parte del género *Pseudomonas* sp, en lo cual se describe la producción, síntesis, y aplicación biológica de los diferentes biosurfactantes. En segundo lugar, se describe la zona de estudio. En tercer lugar, se muestra un screening de una colección de cepas de *Pseudomonas* sp del Laboratorio de Evolución Molecular del Instituto de Ecología, los resultados obtenidos de aproximadamente 240 aislamientos, en la cual se presenta la caracterización de *Pseudomonas mosselii* CCC77 con capacidad de producir ramnolípido, la cual fue genéticamente inestable. En la cuarta parte, se muestra la caracterización taxonómica de tres bacterias productoras de biosurfactantes, en la cual se muestra un posible papel del biosurfactante ecológico. Los resultados obtenidos muestran un nuevo linaje endémico en el valle de *Pseudomonas koreensis*, en el cual se usaron técnica taxonómicas estándares, análisis filogenético de genes DNAr 16S, *recA* y *gyrB*. El nuevo linaje se distingue por la capacidad de producir biosurfactante comparado con *Pseudomonas koreensis*, aislada previamente de suelos agrícolas en Korea. Además se muestra la evidencia que sugiere que el biosurfactante secretado por las cepas de *P. koreensis* aisladas de CCC, tiene la capacidad de competir con *E. auranticum* m5G6 usado como modelo en los experimentos de competencia. Por otro lado el extracto crudo extraído con acetato de etilo de las *P. koreensis* del linaje de CCC inhiben el crecimiento de *E. aurantiacum* m5-G6 y de *B. subtilis* ATCC 6633. Basado en estos resultados proponemos que la producción del biosurfactante por este nuevo linaje, podría ser tener gran importancia ecológica y además podría jugar un papel en la separación del linaje de *P. koreensis* en las aguas de CCC.

ABSTRACT

In this work we, study the production of biosurfactants in strains of *Pseudomonas* sp, isolated from the aquatic system Churince the Cuatro Ciénegas valley Coahuila, Mexico, DF. First, it describes the production of gender biosurfactans by *Pseudomonas* sp, which is described in the production, synthesis and biological application of different biosurfactants. Second, describes the study area. Third, it shows a screening a collection of strains of *Pseudomonas* sp of the Laboratory of Molecular Evolution, Institute of Ecology, the results of approximately 240 isolates. We present the characterization of *Pseudomonas mosselii* CCC77, a rhamnolipid producing bacterium which was found to be genetically unstable. Four, is the taxonomic characterization of three biosurfactant-producing bacterial isolates from the Churince system at Cuatro Ciénegas Basin (CCB) in the Mexican State of Coahuila, and the study of the possible role of biosurfactant production in their ecology and evolution. We determined that these isolates belong to a *Pseudomonas koreensis* lineage endemic to CCB, using standard taxonomical techniques, phylogenetic analysis of three chromosomal loci and phenotypic characterization. This new lineage has the distinct capacity to produce a biosurfactant when compared with previously reported *P. koreensis* isolates recovered from agricultural soils in Korea. We present evidence suggesting that the biosurfactant secreted by CCB *P. koreensis* strains is involved in their ability to compete with a CCB *E. aurantiacum* strain (m5G) used as a model organism in competition experiments. Furthermore, the ethyl acetate extract of culture supernatant of CCB *P. koreensis* CCB lineage. *P. koreensis* strains results in growth inhibition not only of *E. aurantiacum* m5G, but also of a *Bacillus subtilis* type strain (ATCC6633). Based on these results we propose that the production of biosurfactant could be of ecological importance and could play a role in the separation of the *P. koreensis* CCB lineage.

3. CAPITULO I

Pseudomonas sp PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES

INTRODUCCIÓN: Los biosurfactantes (BS) son moléculas anfifílicas que reducen la tensión superficial del agua en la interfase y son producidos por una gran variedad de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) (Gautam and Tyagi 2006). Debido a esta propiedad, las moléculas de los tenso-activos se ubican en la interfase de fluidos como son los sistemas aceite-agua y aire-agua (Stoyanov *et al.* 2003). Además, la presencia de biosurfactantes en un medio acuoso incrementa la solubilidad en agua y la disponibilidad de compuestos orgánicos, siendo ésta una de sus principales propiedades para su aplicación en el área de la biotecnología ambiental para la remoción y biodegradación de contaminantes (Liu *et al.* 1991). Además se ha reportado también que poseen actividad antibacterial, anti-fúngicas, anti-tumor, anti-micoplasmicas y anti-virales (Makkar and Cameotra, 2002; Singh and Cameotra, 2004). Estas moléculas son halladas en la naturaleza con una amplia variedad de estructuras químicas, las cuales incluyen: glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, ácidos grasos, fosfolípidos, lípidos particulados y poliméricos. Los BS difieren de los surfactantes químicos (generalmente derivados del petróleo) por sus propiedades de no ser tóxicos, son más efectivos y compatibles con el ambiente (Nitschke *et al.* 2005ab, Gautam and Tiagy 2006, Mukherjee *et al.* 2006). Estos BS pueden ser producidos usando una amplia variedad de materiales a bajo costo o materias primas de base agrícola, son estables en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad a diferencia de los sintetizados químicamente (Jiménez D. I. 2010). El interés en los biosurfactantes se ha incrementado considerablemente en años recientes por sus aplicaciones en la industria y el ambiente. Por ello, el registro en el número de patentes internacionales para la aplicación de biotensoactivos en los sectores de alimentos, limpieza doméstica, cosméticos, recuperación de crudo, remediación de sitios contaminados y aplicaciones en agricultura, crece de manera significativa año con año (Hung and Shreve 2001). No obstante, uno de los factores que limita la comercialización de BS en algunos casos, son los elevados costos asociados a su producción a gran escala (Jiménez D. I. 2010). Por esta razón, las investigaciones recientes se han enfocado tanto a la optimización

de los procesos de producción como a la búsqueda de sustratos económicos, con la finalidad de disminuir los costos.

Existe una amplia variedad de microorganismos que tienen la capacidad de producir biosurfactantes dentro de estos se haya el género *Pseudomonas*. Este género es uno de los géneros más diversos, y su taxonomía ha sufrido varios cambios desde su descripción temprana (Palleroni, 1984). Los miembros de este género son *sensu stricto* según Palleroni's al grupo I RNA, dentro del grupo de las *Gammaproteobacterias* (Mulet M, *et al* 2010). Se han reportado diversas especies de este género con capacidad de producir biosurfactantes y sus diversas aplicaciones biotecnológicas. Es por ello que en este capítulo se plantea un panorama actual de las *Pseudomonas* sp productoras de biosurfactantes, sus propiedades, condiciones de producción, biosíntesis, estructura química y sus aplicaciones biológicas. Con la finalidad de tener información actual de los diferentes biosurfactantes producidos por este género.

3.1 ESPECIES DE *Pseudomonas* PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES:

Las especies de *Pseudomonas* forman un gran grupo de bacterias productoras de BS. Muchos de los aislamientos de *Pseudomonas* han sido reportados por su capacidad de producir glicolípidos, especialmente ramnolípidos. Además se han reportado cepas de *Pseudomonas*, como *Pseudomonas* sp MIS38 ([Roongsawang N. et al 2003](#), [Lim SP et al 2007 and 2009](#)) con capacidad de producir artrofactina del grupo de los lipopéptidos (Roongsawan *et al* 2003; Balibar *et al* 2005; Lim *et al* 2007), Biosur-PM, producido por *P. maltophila* (Phale *et al* 1995), Corrugatina producido por *P. corrugate* (Risse *et al* 1998), lipopéptidos cíclicos (Nielsen *et al* 2005) Lipodepsipéptidos (Laycock, M. V. *et al* 199, Monti *et al* 2001), particulados producidos por *Pseudomonas* sp (Burd and Ward 1997), Pseudomicina A producida por *P. syringae* MSU 16H (Coiro *et al* 1998) otros de ellos incluyen a la viscosina y el depsipéptido viscosinamina producida por *P. fluorescens* DR54 (Hiramoto, M *et al* 1970, Braun *et al* 2001, Nielsen T.H *et al* 1999,), putisolvina I y II producidos por *P. putida* PCL1445 (Kuiper *et al* 2001, 2004, Dubern *et al* 2005, Jean-Frederic *et al* 2006), Polipeptina (Ui *et al* 1997), Siringomicina y Siringopéptina

producidas por *P. syringae* pv. *syringae* B301D (Scholz-Schoeder *et al* 2001, Carpaneto *et al* 2002,), Amphisina producida por *Pseudomonas* sp DSS73 (Sørensen, D., T *et al* 2001, Birgit Koch *et al* 2002), Lokisina producida por *P. koreensis* 2.74 (Hultberg M *et al* 2010) y entolisina producida por *P. entomophila* (Vallet-Gely I *et al* 2010). A continuación se describe una breve discusión de los tipos de biosurfactantes producidos por las diferentes especies de *Pseudomonas*.

3.2 RAMNOLÍPIDOS PRODUCIDOS POR *Pseudomonas* sp.

Diversas especies de *Pseudomonas* destacan por su capacidad para producir ramnolípidos (Guerra-Santos *et al.* 1984, Cooper *et al.* 1989, Cameotra and Singh 1990, Deziel *et al.* 1996, Maier R.M and Soberón-Chávez, 2000). Los primeros en reportar la estructura de un glicolípido fue Bergström *et al.* 1946, sintetizado por *P. pyocyanea* (ahora *P. aeruginosa*), conformado por ramnosa y ácido β -hidroxidecanoico. Tres años después, Jarvis y Johnson (1949), empleando medios de cultivo con 3% de glicerol, también aislaron ramnolípidos provenientes de *P. aeruginosa*, y determinaron que estos compuestos estaban formados por un glucósido de β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato y dos moléculas de ramnosa. Cabe mencionar que antes de elucidar con certeza la estructura de los ramnolípidos, en la década de 1950 ya eran usados en procesos de biorremediación de suelos contaminados con aceites y metales pesados (Hemminger, 2005).

La primera estructura claramente elucidada de los ramnolípidos fue encontrada por Edwards y Hayashi (1965), quienes demostraron la unión glicosídica del disacárido de ramnosa al β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato y cuya estructura se ha denominado como R2 (ver figura 1). Esta misma estructura también fue observada por Hisatsuka *et al.* (1971), utilizando *P. aeruginosa* S7B1 cultivada en hexadecano y parafinas. Un año después, Itoh y Suzuki (1972) encontraron que *P. aeruginosa* KY 4025 cultivada con 10% de *n*-alcanos produce monoramnolípido correspondiente a L- α -ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, estructura a la cual se ha denominado R. Se han reportado otros aislamientos productores de ramnolípidos de *P. aeruginosa* EM1 (Chayabutra C *et al.* 2001), *P. aeruginosa* GS3 (Patel and Desai 1997), *P. aeruginosa* BS2 (Dubey and Juwarkar 2001), *P. aeruginosa* 44T1 (Robert *et al.* 1989), *P. aeruginosa* LBI

(Benincasa *et al.* 2002, Nitschke M *et al* 2009). *P. aeruginosa* (Costa SG *et al* 2006, Marsudi S *et al* 2008).

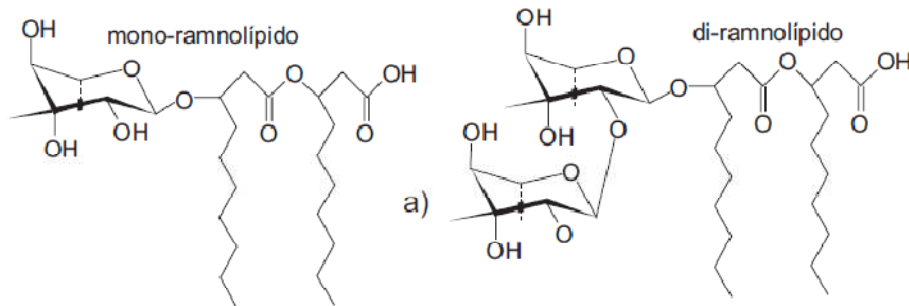


Figura 1: Estructuras de los principales glicolípidos (mono y di-ramnolípidos).

Por otro lado se han reportado otras especies de *Pseudomonas sp* con la capacidad de producir ramnolípido como se describe a continuación: *P. putida* 300-B mutante (obtenida de *P. putida* 33 silvestre), *Pseudomonas sp.* 47T2 NCIB 400044 (Mercade *et al.* 1993), *P. cepacea* (Onbasli and Aslim 2009), *P. chlororaphis* NRRL B-30761 (Gunther *et al.*, 2005, 2006), *P. clemancea* y *P. collierea* (Rahman *et al.* 2009), *P. fluorescens* 29L (Husain, 2008), *P. fluorescens* (Abouseoud *et al* 2008a,b), *P. fluorescens* (Wilson and Bradley 1996), *P. fluorescens* HW-6 (Vasileva-Tonkova *et al* 2006), *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. luteola* y *P. putida* (Onbaslis and Aslim 2009; Martinez-Toledo *et al* 2006; Tuleva *et al* 2002; Cuny *et al* 2004), *P. stutzeri* G11 (Celik *et al* 2008), *P. stutzeri* (Janiyani *et al* 1992), *P. teessidae* (Rahman *et al* 2009). *Pseudomonas sp* (Singh PB *et al* 2009), *P. lurida* NARs9 (Mishra PK, 2009) y *P. aeruginosa* NY3 también con la capacidad de producir un nuevo ramnolípido (Maiqian Nie *et al* 2010).

3.3 APLICACIÓN Y BIOSÍNTESIS DE RAMNOLÍPIDOS:

En particular, los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* han sido estudiados para su aplicación en distintas áreas, que incluyen la descontaminación de suelos contaminados con petróleo, la eliminación de metales tóxicos de suelos, recuperación terciaria de petróleo, cosmética, protección contra plagas y en la industria farmacéutica. Son también una fuente importante de L-ramnosa, que es usada en química fina y como materia prima para la síntesis de compuestos orgánicos. Aunque la función fisiológica de los ramnolípidos en

P. aeruginosa no ha sido completamente establecida, se les ha considerado como factores de virulencia y antimicrobianos, además, se les ha implicado en el establecimiento de la estructura y en la disgregación de las biopelículas, así como en la movilidad tipo “swarming” de esta bacteria.

En términos generales, los principales ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* son el ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidrodecanoato (mono-ramnolípido) y el ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidrodecanoato (di-ramnolípido). La biosíntesis de estos biosurfactantes fueron descritos por Burger *et al.*, 1963. La biosíntesis de los ramnolípidos en *P. aeruginosa* ocurre a través de tres etapas secuenciales (Soberón Chávez *et al.* 2005): (1) la enzima RhlA (codificada por el gene *rhlA*) es involucrada en la síntesis del dímero de ácido graso (HAAs) del ramnolípido (Déziel *et al.* 2003; Lépine *et al.* 2002; Zhu and Rock 2008); (2) la ramnosiltransferasa RhlB se encuentra unida a la membrana (codificada por el gene *rhlB*) usa dTDP-L-ramnosa y la molécula de HAA como precursores, el cual forman el monoramnolípido (Ochsner *et al.* 1994) y (3) estos monoramnolípidos a su vez son sustratos, junto con la dTDP-L- ramnosa, de la ramnosiltransferasa RhlC (codificada por el gene *rhlC*) para producir diramnolípido (Rahim *et al.* 2001) ver figura 2. En *P. aeruginosa*, un operón bicistrónico *rhlAB*, codifica para las primeras dos enzimas, mientras que *rhlC* se halla en otro operón en el genoma. La transcripción de las enzimas responsables de la biosíntesis de ramnolípidos es regulada por RhlR (codificado por el producto del gene *rhlR*), esta proteína actúa cuando está unido a su autoinductor C₄-HSL (sintetizado por el gene *rhlI*), activa la expresión y cuando no está unido al autoinductor la reprime. La transcripción de *rhlR* es activada por el regulador transcripcional LasR (codificado por *lasR*), unido a su autoinductor 3O-C₁₂-HSL (sintetizado por el producto del gene *lasI*).

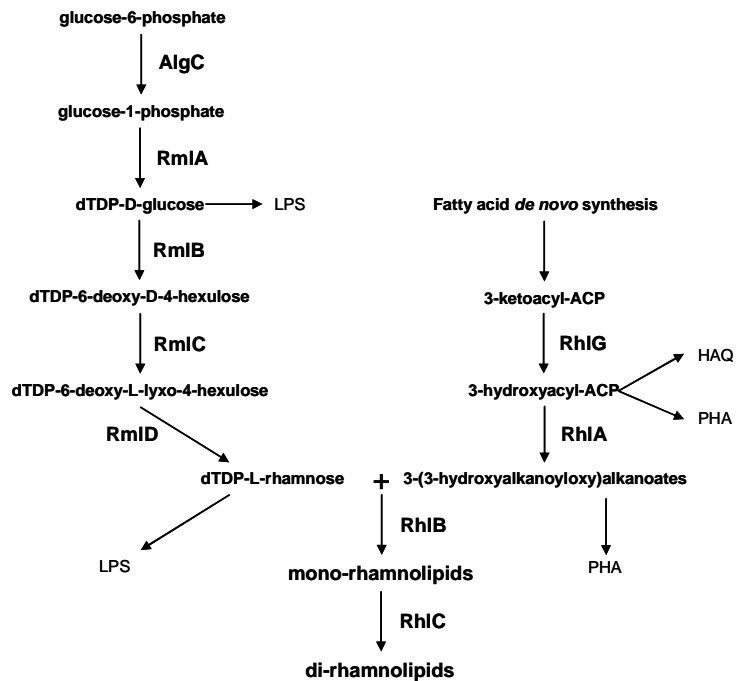


Figura 2. Biosíntesis de ramnolípidos (Soberón-Chávez, *et al.*, 2005).

La producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* depende de factores nutricionales y ambientales, incluyendo limitaciones de nitrógeno, pH, y temperatura. La biosíntesis ocurre durante la fase exponencial tardía y la fase estacionaria de crecimiento, típicamente bajo las condiciones de limitación de nitrógeno y fosfatos. (Soberón Chávez, *et al.*, 2005).

Los ramnolípidos reducen la tensión superficial del agua de 72 mN/m a 30 mN/m y la tensión interfacial del agua/aceite de 43 mN/m a valores por abajo de 1 mN/m. Las propiedades activas de superficie del extracto crudo, purificado y compuestos homólogos específicos de ramnolípidos producidos por *Pseudomonas* sp (Jiménez *et al* 2010). Las propiedades de los ramnolípidos depende de su composición y distribución que esta determinada por la cepa bacteriana, las condiciones de cultivo y la composición del medio, principalmente la fuente de carbono.

Los ramnolípidos muestran la capacidad de emulsificar hidrocarburos y estabilizar emulsiones. Haba *et al* 2000, reportaron que sobrenadantes obtenidos de diferentes aislamientos de *Pseudomonas* sp fueron capaces de emulsificar keroseno y esta emulsión fue estable hasta por tres meses. Las emulsiones de *n*-alcanos, compuestos aromáticos,

aceite crudo, keroseno, aceite de coco y de oliva fueron estabilizadas por los ramnolípidos, mostrando una estabilidad del 5-25% de estabilidad después de 24 horas dependiendo de la fuente de carbono.

3.4 CARACTERÍSTICAS, APLICACIONES Y BIOSINTESIS DE LIPOPEPTIDOS CICLICOS

Los lipopéptidos son compuestos por un péptido que puede ser ciclizado para formar un anillo lactona entre dos aminoácidos en la cadena peptídica y una cadena de ácido graso unidas por el N-terminal del aminoácido, ambos varían en tamaño, lo cual puede proporcionarle varias propiedades a los diferentes lipopéptidos, los cuales incluyen antifúngicos, fitotóxicos y regulan la formación del biofilms entre otras. (Nielsen *et al.*, 1999; Hutchinson *et al.*, 1995; Huber *et al.*, 2002).

Estos son producidos por diversas especies de *Pseudomonas*, en la cual se incluyen especies patogénicas y saprofitas, además juegan un papel importante en la virulencia y la motilidad (Nybroe and Sorensen, 2004; Raaijmakers *et al.*, 2006). Los CLP's producidos por *Pseudomonas sp* presentan actividad contra un amplio rango de microorganismos patógenos, la cual se incluyen virus, micoplasmas y bacterias grampositivas. Su amplio espectro antimicrobiano ha sido muy bien explotado en el control biológico de hongos patógenos de plantas (Nybroe and Sorensen, 2004). Por ello es importante determinar el espectro de actividad de los CLP's, el cual incluye el número, naturaleza, posición y configuración (L o D) de aminoácidos en el anillo del péptido macrocíclico y también conocer el tamaño del ácido graso.

Los CLP's son producidos por un péptido sintetasa no ribosomal (NRPS). Los cuales poseen una estructura modular y cada módulo está construido por bloques, resultado de la incorporación paso a paso de aminoácidos a la cadena peptídica. (Gewolb, 2002; Sieber and Marahiel, 2005). El orden y número de módulos de un NRPS son proteínas, en muchos casos, secuencias colineales de aminoácidos que corresponden a una fracción del CLP. Los módulos pueden ser subdivididos de iniciación y elongación. Un módulo típico de

elongación de NRPS consiste en un dominio de Adenilación (A), responsable de la selección y activación de aminoácidos, un dominio de Tiolación (T) responsable de la tioesterificación del aminoácido activado y por último un dominio de Condensación (C) sirve para la formación del enlace peptídico entre dos sustratos y así elongar la cadena peptídica. Los módulos de Iniciación proveen el primer aminoácido para la síntesis del péptido y típicamente pierden un dominio C terminal (Finking and Marahiel, 2004). El dominio catalítico genera un péptido lineal el cual se fracciona y al final se ensambla por un dominio de tioesterasa (TE), la cual resulta en la liberación de un producto lineal o péptido cíclico vía reacción ciclización intramolecular. (Kohli *et al.*, 2001; Sieber and Marahiel, 2005, Bruijn *et al* 2007).

Basados en el tamaño y composición de la cadena de ácido graso y el péptido, los CLP's de las especies de *Pseudomonas* fueron clasificados en 4 grupos mayoritarios: viscosina, amfisina, tolasina y sirringomicina. Los del grupo de la viscosina incluyen CLP's con nueve aminoácidos (viscosina, viscosinamida, masetolido A y D, pseudofomina A y B), esta clase son originados de diversos nichos ambientales; incluyen suelos, rizosfera, filosfera, así como ambientes marinos. Los CLP's del grupo de la amfisina, compuestos por tensina, amfisina, polipeptina A, lokisina y artrofactina (Henriksen *et al.*, 2000; Sørensen *et al.*, 2001), el péptido consta de 11 aminoácidos y se acopla con el ácido 3-hidrodecanoico (3-HDA). El grupo de la tolasina que incluyen tolasina, FP-B, corpeptina A, SP22 y SP25A, es un grupo muy diverso en cuanto a la composición y tamaño del péptido el cual varía de 19 a 25 aminoácidos, y el lípido puede ser 3-HDA o 3-hidrooctanoico (3-HOA). La parte del péptido en este grupo contiene aminoácidos inusuales, incluyen ácido 2,3-dihidro-2-aminobutírico (Dhb) y homoserina (Hse), el primer aminoácido puede estar siempre por delante de los residuos allo-Thr. La parte cíclica del péptido contiene cinco a ocho aminoácidos y el anillo de lactona es formado entre el C-terminal del aminoácido y el residuo de allo-Thr. Los lipopéptidos cíclicos del grupo de la tolasina son factores de virulencia producidos por *Pseudomonas* sp patógenas de plantas. Los CLP's del grupo de la sirringomicina (incluyen a la sirringomicina, sirringotastina, sirringotóxina, pseudomonicina A y cormicina A) estos muestran similitud estructural con el grupo de la viscosina, pero contienen aminoácidos inusuales; Dhb, o 2,4-ácido diamino butírico (Dab) y el anillo de

lactona es formado entre el N-terminal de la Ser y el C-terminal del 4-clorotreonina (Thr[4-Cl]), y el lípido puede estar compuesto por 3-hidroxi o 3,4-dihidroxi compuesto de 10 a 14 carbonos. Otro estudio reciente de estructuras de lipopéptidos cíclicos incluyen a la artrofactina producida por *Pseudomonas* sp MIS38, la cual contienen un péptido de once aminoácidos unido a una cadena de ácido graso β -hidroxidecanoil, y putisolvina I y II (Kuiper *et al.*, 2004), el cual consiste en un péptido de 12 aminoácidos unido a una cadena lipídica de hexanóico. La ciclización de la putisolvina es diferente a otros péptidos, el anillo de lactona se forma entre el C-terminal y los residuos del noveno aminoácido en lugar del primer o tercer aminoácido (Raaijmakers Jos M *et al* 2006). En otro estudio se demuestra la producción de un nuevo CLP's llamado entolisina, producido por *P. entomophila*, una bacteria entomapatogénica capaz de matar a *Drosophila melanogaster* después de su ingestión. Este nuevo CLP's contiene catorce aminoácidos unido a ácido 3-hidroxidecanoico (Vallet-Gely I *et al* 2010).

3.5 CARACTERÍSTICAS Y BIOSÍNTESIS DE ALGUNOS CLP's.

3.5.1 ARTROFACTINA: La artrofactina producida por *Pseudomonas* sp MIS38, es el lipopéptido cíclico más potente reportado. Este péptido contiene 11 aminoácidos unidos a un ácido graso de β -hidroxidecanoil. Basado en su estructura química, cae dentro del grupo de la amfisina y es muy similar a la lokisina (Raaijmakers, J.M *et al* 2006). Se han encontrado tres genes involucrados en la biosíntesis de la artrofactina sintetasa, *arfA*, *arfB* y *arfC*, en el cual forman el cluster y codifican para ArfA, ArfB y ArfC contiene dos, cuatro y cinco módulos funcionales respectivamente. (Un módulo es definido por una unidad que cataliza la incorporación de un aminoácido específico dentro del producto peptídico). Cada modulo presenta un dominio C de condensación (responsable de la formación del enlace peptídico entre dos aminoácidos consecutivos), un dominio A de adenilación y un dominio T de tioadenilación (es un sitio que sirve para unir el co-factor 4-fosfopanteteino y un acarreador de intermediarios de aminácidos tioesterificados). Sin embargo ninguno de los 11 módulos posee el dominio E de epimerización, responsable de la conversión de residuos de aminoácidos de la forma L a la forma D. Por lo tanto dos dominios tioesterasas son

localizadas en tandem en el C-terminal al final de ArfC. El gene *arfB* es absolutamente para la producción de artrofactina (Roongsawang *et al.* 2003).

3.5.2 VISCOSINA: La viscosina es compuesto por ácido hidroxidecanóico y fue aislado por vez primera por *P. viscosa* (Kochi *et al.*, 1951). Tiene una concentración micelar crítica (CMC) de 4µg/ml y reduce la tensión superficial del agua de 72 a 27 mN/m. Esta no afecta la membrana pero si lisa a los eritrocitos por su acción detergente a concentraciones por debajo de la CMC, y no es considerada por tener toxicidad membrana específica. La viscosina es similar en tamaño, estructura y composición a otros lipopéptidos (Ver **Figura 3**), como es el caso de la tolasina producida por *P. tolaasii*, surfactina producida por *B. subtilis*, siringomicina y siringopéptina producida por *P. syringae* pv *syringae* (Rainey *et al.*, 1991; Hutchison and Gross, 1997; Bernheimer and Avigad, 1970).

El control genético de la producción de la viscosina fue examinada en *P. fluorescens* PfA7B, esta bacteria causa perforaciones en las cabezas del brócoli. Es un potente BS y hace capaz a la bacteria de entrar en contacto íntimo con las cabezas de cera que son difíciles de mojar en el brócoli (ya que actúa como un agente humectante). En mutantes deficientes de producción de viscosina obtenidas por mutagénesis Tn5 y analizadas por HPLC. Las mutantes Vis⁻ conservan su capacidad pectolítica, pero carecen de la capacidad de hacer perforación en los brócolis sanos a diferencia de la cepa silvestre. En mutantes triparentales complementadas con sus clones silvestres correspondientes y transformadas en *E. coli* HB101 (plásmido pPK2013), resultaron tres transconjugantes con capacidad estable de producción de viscosina y causan decaimiento típico en el tejido del brócoli. Los mapas de estos clones y perfil de proteínas muestran una región de DNA cromosomal de 25 kb de *PfA7B* afectada en la producción de tres proteínas de alto peso molecular requeridas para su síntesis. Estas proteínas son de aproximadamente 218, 215 y 137 kDa respectivamente, y al parecer comprende un complejo sintetasa que se ensambla en un péptido de nueve aminoácidos de viscosina y subsecuentemente se une a un componente hidrofóbico (ácido graso), (Braun *et al* 2001).

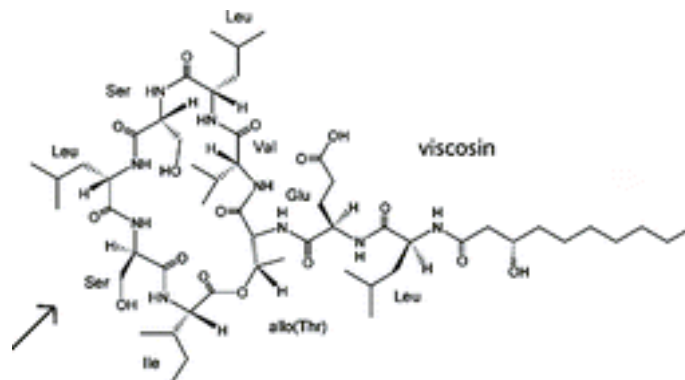


Figura 3: Estructura de la viscosina

3.5.3 VISCOSINAMIDA: La viscosamida es un nuevo antibiótico y BS, pertenece a la familia de los depsipéptidos cíclicos aislados de *Pseudomonas* sp. La estructura se asemeja a la viscosina (ver figura 4), aislada de *P. viscosa* y de *P. fluorescens* biovar II. La secuencia de (AA2) aminoácidos en este péptido es D-glutamico y D-glutamina en la viscosina y viscosamida respectivamente. Su producción por *P. fluorescens* DR54 se considera por ser un metabolito primario y no secundario, esto ha sido observado en otros BS, en donde la producción puede estar vinculada a la proliferación celular y al crecimiento en vez de condiciones de estrés (Nielsen T.H. *et al* 1999). Se ha identificado como un determinante antagónico producido por *P. fluorescens* DR54 y ha demostrado que induce cambios fisiológicos en *Pythium ultimatium in vitro*, la cual se ha detectado en muestras de la rizósfera. El impacto en el crecimiento y la actividad de *P. ultimatium* se estudió por microscopia directa después de la tinción fluorescente. *P. fluorescens* DR54 causa reducción en la densidad del micelio, la formación de oósporas y actividad intracelular. Los estudios *in vitro* confirman que la viscosinamida purificada induce el enquistamiento de las zoosporas de *P. ultimatium* (Thrane C *et al* 2000).

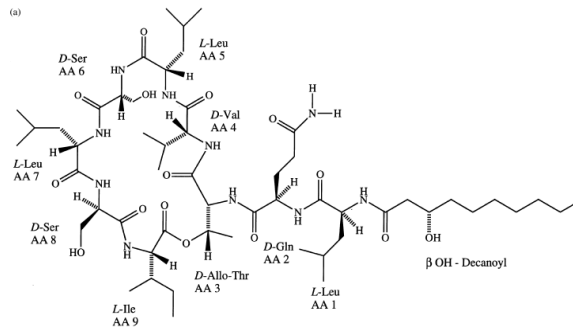


Figura 4: Estructura de la viscosinamida

3.5.4 AMFISINA: Es un nuevo miembro de un grupo dual de compuestos como es la tensina, viscosina y la viscosinamida que despliegan ambas propiedades biosurfactantes y antifúngicas. *Pseudomonas* sp. DSS73 fue aislada de la rizósfera de la caña de azúcar. Esta cepa presenta antagonismo contra hongos patógenos de plantas, *Phytium ultimatum* y *Rhizoctonia solani*. La producción de la amfisina en combinación con la expresión de flagelos permite al cultivo bacteriano moverse fácilmente sobre la superficie en los medios de laboratorio (Andersen *et al.* 2003).

El sistema regulatorio de dos componentes GacA/GacS (GacA es el regulador responsable y GacS es el sensor cinasa) controlan el gen amfisina sintetasa (*amsY*). La motilidad en superficie de esta bacteria requiere de la producción de este BS. Su síntesis es regulada por el gene *gacS*, esto se ha observado en mutantes *gacS* que pierden la motilidad en superficie y cuando se complementan con un plásmido que codifica el gene heterólogo *gacS* silvestre de *P. syringae* se recupera el fenotipo en la mutante (Andersen *et al.* 2003).

La estructura de cristal de la amfisina, se presenta en tetrahidrato $C_{66}H_{114}N_{12}O_{20} \cdot 4H_2O$, originado por la biosíntesis no-ribosomal en *Pseudomonas* sp DSS73. La estructura primaria de la amfisina es β -hidroxidecanoil-D-Leu-D-Asp-D-*allo*-Thr-D-Leu-D-Leu-D-Ser-L-Leu-D-Gln-L-Leu-L-Ile-L-Asp. El péptido es una lactona unido a Thr4 O γ al C-terminal. La estereoquímica del ácido β -hidroxi es R. El péptido es un análogo del lipopéptido cíclico tensina y polipéptina producida por *P. fluorescen* (Sørensen, D. *et al* 2001).

3.5.5 LOKISINA: La lokisina fue aislada de *Pseudomonas* sp DSS41 es un agente de biocontrol antifúngico. Basado en estudios de NMR y MS, la lokisina fue tentativamente identificada como polipeptina (ver figura 5). Sin embargo, análisis detallados de los constituyentes de aminoácidos determinado por cromatografía de gases reveló una diferencia de D-/L-leucina una tasa de 3:2 y el allo-isomero de treonina. Este BS representa una nueva variación estructural de lipoundecapéptido (Sørensen D *et al* 2002). Además se ha reportado a *P. koreensis* 2.74 con capacidad de producir lokisina, la eficacia de este biosurfactante fue determinado y el extracto crudo fue usado contra el oomiceto de *P. ultimum*, en cultivos hidropónicos de tomate. Este mostró reducción significativo de la enfermedad, la adición del BS no afecta la microflora de la raíz de la planta, esto se observo cuando solo se evaluó una fuente de carbono. Estos resultados confirman que los BS son importantes en el desarrollo de estrategias de control biológico contra oomicetos (Hultberg M *et al* 2010).

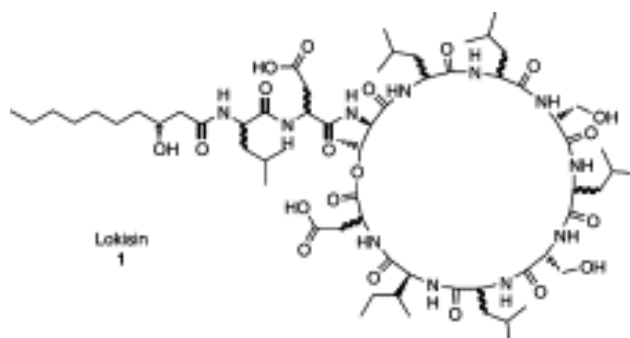


Figura 5. Estructura de la lokisina

3.5.6 SIRINGOMICINA: Muchos aislamientos fitopatógenos de *P. syringae* pv *syringae* secretan un lipodepsipéptido cíclico con propiedades de actividad de amplio espectro antimicrobiano y antifúngico. La siringomicina (*syr*) y siringopéptina (*syp*) son un determinante clave en la virulencia de *P. syringae* pv. *syringae* B301D y B728a (Sørensen D *et al* 2001 y 2002), contribuyen al desarrollo de la enfermedad. La siringomicina es un péptido compuesto con una cabeza polar, con una secuencia Ser-D-Ser1-D-Dab-Dab-Arg-Phe-Dhb-(3-OH) Asp-(4-Cl)Thr, unida a una cola de ácido 3-hidroxidecanoico y 3-hidroxitetradecanoico (Segre A *et al* 1989). Se han detectado y caracterizado cuatro genes

involucrados en la biosíntesis de la siringomicina *syrB*, *syrC*, *syrD*, y *syrP*, que abarcan aproximadamente una región de 7 Kb. El gene *syrB* muestra alta similaridad con dominios de unión de péptido síntetasa, *syrC* codifica para una enzima parecida a tioesterasa, *syrD* se transcribe en orientación opuesta con respecto a *syrB* y *syrC*, y codifica para una proteína similar a la superfamilia de proteínas involucradas en la secreción específica y puede estar involucrada en la secreción de la siringomicina a través de la membrana citoplasmática. Finalmente, *syrP*, la cual es localizado entre *syrB* y *syrD*, exhibe similaridad con la región de fosfotransferasa de histidina cinasa y pueden ser propuesto de participar en un mecanismo de fosforilación de transducción de señales que controla la síntesis de siringomicina e influencia la virulencia de *P. syringae* (Guenzi E. *et al* 1998, Wang N *et al* 2006). Los genes *syr-syp* son coordinados por SalA y SyrF en respuesta a las condiciones ambientales (Wang, N *et al* 2006).

3.5.7 TOLASINA: Es una toxina (péptido) formadora de poro ([Cho KH et al 2010](#)), esta consiste en 18 aminoácidos y su peso molecular es de 1,985 Da. Se han determinado dos isómeros de la tolasina, denominadas Tol I y Tol II, ambos isómeros tienen un ácido β -hidroxioctánoico unido covalentemente al N-terminal. Muchos isómeros fueron identificados en varios aislamientos de *P. tolaasii* y su estructura ha sido elucidada (Shirata *et al.*, 1995; Bassarello *et al.*, 2004). La tolasina tiene dos cargas positivas en el C-terminal, por lo cual es un péptido anfipático. Induce la disrupción de la membrana por la cual expresa ambas propiedades la formación de poros en la membrana y surfactante. (Hutchison and Johnstone, 1993). La mutagenesis por Tn5 en *P. tolaasii* NCPPB, de 5,000 inserciones cromosomales solo 35 (0.7%) fueron tolasina negativo y 12 (0.25%) producen una reducida producción de tolasina. El análisis de extractos de proteínas SDS-PAGE de la cepa silvestre, demuestra la presencia de tres proteínas de alto peso molecular designadas como TL1, TL2 y TL3. Alteraciones en estas proteínas aparentemente truncadas de 465 kDa (TL1), 440 kDa (TL2) y 435 kDa (TL3), fueron ausentes en algunas mutantes ([Rainey PB et al 1993](#)). Además, se ha identificado el gene *pheN* y su producto en *P. tolaasii* NCPPB1116, se incluye dentro del grupo de proteínas reguladoras. Se ha especulado que su producción es regulada positivamente por el producto de *pheN* a consecuencia al reconocimiento de condiciones ambientales. (Murata H *et al* 1996).

3.5.8 PUTISOLVINA: Es producida por *P. putida* PCL1445, crece en suelos contaminados con metales pesados y con hidrocarburos aromáticos (PAHs) (Kuiper *et al* 2001). *P. putida* PCL1445 es un colonizador eficiente de raíz y puede proliferar en productos de degradación del naftaleno y fenantreno. Es capaz de formar biofilms en la superficie de las raíces de plantas y en PVC (Kuiper *et al* 2001). Esta cepa produce dos lipodepsipéptidos cíclicos, llamados putisolvina I y II, cada uno contiene un lípido hexanóico unido al N-terminal del péptido de doce aminoácido, en el cual el C-terminal del grupo carboxilo forma un éster con el hidroxilo de la cadena de Ser-9 (Kuiper *et al.*, 2004). La diferencia entre las dos estructuras es localizada en el segundo aminoácido del C-terminal, el cual para la putisolvina I es Val y Leu/Ile para putisolvina II respectivamente (ver figura 6).

La producción del BS es iniciada al final de la fase exponencial, sugiriendo que la producción es regulada por un sistema similar al Quorum Sensing (QS). En mutantes Tn5 de la misma cepa, se aisló la cepa PCL1436, la cual no produce putisolvina I y II, se halló que es mutada en un marco de lectura abierto (ORF), el cual presenta homología con diversos lipopéptidos sintetasa. El gene de la putisolvina sintetasa de PCL1445 fue llamado *psoA* (Dubern *et al.*, 2005, this Ph.D Thesis, Chapter 2).

La putisolvina I y II representan un nuevo CLP's, la cual tienen la capacidad de reducir la tensión superficial y hace mejor las emulsiones del tolueno, e incrementan la dispersión de naftaleno y fenantreno (Kuiper *et al.*, 2004). Estas propiedades muestran un papel importante en el incremento de la disponibilidad de compuestos hidrofóbicos (Rosenberg *et al.*, 1993). Además, se muestra que la secreción de putisolvina I y II estimulan la motilidad en swarming de células, presumiblemente por la alteración de la hidrofobicidad de la superficie celular y juega un papel importante en la formación y degradación del biofilms.

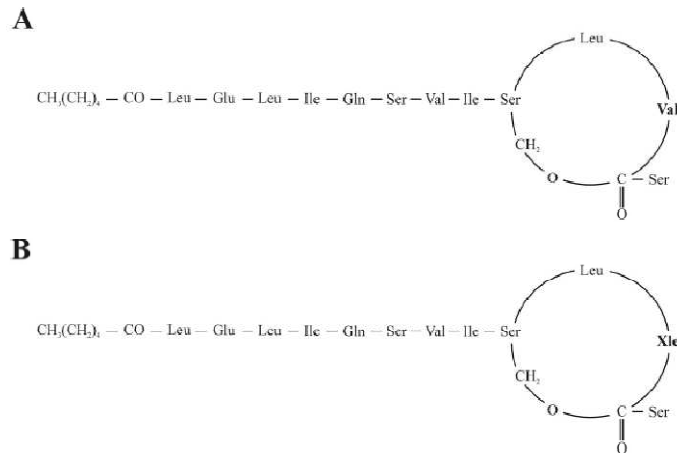


Figura 6. Estructura de la putisolvina; A) Putisolvina I; B) Putisolvina II.

Con el fin de identificar los genes y características involucradas en la regulación de la producción de la putisolvina por PCL1445, se generó una biblioteca de Tn5luxAB y las mutantes fueron seleccionadas por la pérdida de la producción de BS usando el método de la gota colapsada. El análisis de secuencias de las regiones flanqueantes del Tn5luxAB de una mutante PCL1627, muestra que la inserción del transposon fue insertada en una región homóloga al *dnaK*, la cual es localizada río abajo de *grpE* y río arriba de *dnaJ*. El análisis de la producción de la putisolvina y de expresión indican que *dnaK*, junto con *dnaJ* y *grpE* son genes de choque térmico, que participan de manera positiva en la regulación (directa o indirectamente) de la biosíntesis de putisolvina a nivel transcripcional. El crecimiento de PCL1445 a bajas temperaturas resulta en un incremento a los niveles de producción de putisolvina. Además, la biosíntesis de PCL1445 se demostró que depende del sistema de señalización de dos componentes GacA/GacS, ya que en los análisis de expresión indican que *dnaK* es regulado positivamente por GacA/GacS (Dubern J. F *et al* 2005).

Las moléculas de putisolvina I y II son secretadas al medio de cultivo durante la fase exponencial tardía de crecimiento, indicando que su producción probablemente sea regulada por QS, para comprobar esto se identificaron los genes del sistema de QS en *P. putida* PCL1445, los cuales incluye a *ppuI*, *rsaL* y *ppuR* lo cual muestran alta similaridad con un clúster de genes de *P. putida* aislamiento IsoF y WCS358. Las cepas con mutaciones en *ppuI* y *ppuR* muestran una reducción severa en la producción del BS. En el análisis de expresión de los genes biosintéticos, el gene *ppuI* muestra una

expresión deficiente, la cual se complementa con la adición sintética de 3-oxo-C₁₀-N-acilhomoserina lactona (3-oxo-C₁₀-AHL) o 3-oxo-C₁₂-AHL al medio. En mutantes *rsaL* sobreproductoras de AHLs, la producción de putisolvina es inducida durante la fase de crecimiento temprano. El análisis de formación de biofilms en PVC muestra que mutantes en *ppuI* y *ppuR* producen un biofilms denso a diferencia de la cepa silvestre, lo cual correlaciona con un decremento en la producción de putisolvina, y en mutantes *rsaL* existe un retraso en la formación del biofilms, lo cual correlaciona con la producción temprana de putisolvina. Estos resultados demuestran que las señales de QS inducen la producción de putisolvina I y II, y controlan la formación de biofilms por *P. putida* (Dubern *et al* 2006).

3.5.9 ENTOLISINA: Es un nuevo CLP's, producido por *P. entomophila* una bacteria entomapatogénica. Este nuevo CLP's contiene catorce aminoácidos unido a ácido 3-hidroxicaproico. Además se han identificado tres péptidos sintetasa no ribosomales (EtlA, EtlB y EtlC) involucrados en su biosíntesis y dos componentes más (EtlR, MacAB), son necesarios para su producción y secreción. El sistema de dos componentes en *P. entomophila* GacS/GacA regula la producción de entolisina, esta es requerida para la motilidad en swarming, pero no participa en la virulencia de *P. entomophila* a *Drosophila*, pero si adquiere una ventaja de biocontrol (Vallet-Gely I *et al* 2010).

3.6 PRODUCCIÓN DE LIPOPEPTIDOS CICLICOS

Existe un gran número de investigadores que demuestran que la sobreproducción de BS por *Pseudomonas sp.*, se lleva a cabo una vez que los cultivos llegan a fase estacionaria de crecimiento (Guerra-Santos *et al.* 1986; Mulligan and Gibbs, 1989; Venkataramana and Karanth, 1989). En *P. fluorescens*, la producción de BS generalmente requiere una baja concentración de oxígeno y nitrógeno en cultivos líquidos (Persson *et al.*, 1988). La limitación de cationes multivalentes también causa una sobreproducción de BS. Las limitaciones de hierro estimulan la producción de BS en *P. fluorescens* (Persson *et al.*, 1990a, 1990b). Las fuentes de carbono juegan un importante papel en el peso y la

estructura del BS. La producción de viscosina es óptima *in vitro* en un medio que contenga glicerol como fuente de carbono para su síntesis (Georgiou *et al.*, 1992). Tipos diferentes de BS pueden ser producidos por especies bacterianas dependiendo de la fuente de carbono y otros nutrientes disponibles (Desai *et al.*, 1988).

3.7 METODOS USADOS PARA LA DETECCIÓN DE BACTERIAS PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES:

Para estudiar la producción de BS, es necesario un método rápido, sensible y preciso para su detección. Una variedad de diferentes métodos han sido descritos para el screening de microorganismos potencialmente productores. (1). Van der Vegt *et al* (1991) desarrollaron un método asimétrico para el análisis de la gota colapsada (ADSA) para la evaluación de microorganismos productores de BS. En esta técnica, las gotas de medio de cultivo se colocan en una superficie de fluoroetileno-propileno. La tensión superficial es calculada a partir de los perfiles de las gotas colapsadas por ADSA. Solamente las bacterias productoras de BS en suspensión muestran reducción en la tensión superficial. (2) Siegmund and Wagner (1991), describen una estimación colorimétrica de BS basado en el hecho de que los tensoactivos aniónicos son capaces de reaccionar con el catión indicador y por consiguiente la formación de un complejo coloreado. Este método es semicuantitativo ya que aumenta el diámetro del halo en relación con la cantidad del BS. Ha sido desarrollado por Shulga *et al.* (1993) y Hansen *et al.* (1993) para el screening de bacterias que producen ramnolípidos y degradan hidrocarburos. (3). Una prueba rápida de la gota colapsada, desarrollada por Hildebrand (1989), en el cual la gota de agua se colapsa cuando es adicionada a las colonias de las bacterias que producen BS (o en suspensión bacteriana). Jain *et al* (1991), posteriormente siguieron desarrollando este método colocando una gota de suspensión bacteriana en una superficie cubierta de aceite. En este método, las gotas que contienen BS se colapsan y las que no contienen quedan estables. (4) Cromatografía directa en capa fina (TLC), es una técnica para la caracterización rápida de bacterias que producen biosurfactantes y fue descrito por Matsuyama *et al.* (1987). Con esta técnica, se identificaron los BS en *Serratia marscescens* mediante la aplicación de una sola colonia

bacteriana directamente en placa de TLC sin ninguna preparación de la muestra. (5) Prueba de la reducción de la tensión de la superficie de una solución, mediante la cuantificación exacta de la tensión superficial en presencia de BS. puede ser determinada midiendo los cambios en la tensión superficial e interfacial, estabilización o desestabilización de emulsiones, y su balance hidrofílico-lipofílico (HLB). La tensión superficial en la interface del aire/agua y aceite/agua pueden ser fácilmente medida con un tensiómetro. La tensión superficial del agua destilada es de 72 mN/m. Cuando un agente tensoactivo se añade al aire/agua o aceite/agua en concentraciones crecientes, se observa una reducción en la tensión superficial hasta un nivel crítico, por encima del cual las moléculas anfifílicas se asocian rápidamente hasta formar estructuras moleculares parecida a micelas, bicapas y vesículas. Este valor se conoce como Concentración Micelar Crítica (CMC) y se define como la concentración mínima de surfactante a partir del cual se forman micelas espontáneamente en una solución y es comúnmente usada para medir la eficiencia de un surfactante. (6) Bunster *et al.* (1989), estudiaron la actividad de superficie de las bacterias, mediante la medición de los ángulos de contacto obtenidos después de adición de las bacterias a una gota de agua. El ángulo de contacto es ubicado en la interface entre la gota y la superficie sólida. En ausencia de surfactante, las moléculas de agua se adhieren fuertemente entre si, por lo que la gota conserva una apariencia redonda con un ángulo de contacto de más de 90°, mientras que en la presencia de BS, las fuerzas de adherencia se reducen causando un colapso de la gota creando un ángulo de contacto de menos de 90°. (7) Detección de la actividad hemolítica, esta prueba de screening es cualitativa para la detección de microorganismos productores de BS, para esta se usa agar LB o nutritivo, suplementado con 5% de sangre de carnero fresca (Carrillo *et al.*, 1996; Banat, 1993). Los microorganismos son inoculados e incubados a temperatura óptima durante 48h. Una hemolisis se observa visualmente y puede ser indicativo de la lisis celular debido a la ruptura de la membrana, causada por la presencia de sustancias activa de superficie. (8) Método de dispersión en aceite: en este método se adicionan 20 µl de aceite crudo a 50 ml de agua destilada en una caja de petri. Posteriormente 10 µl de caldo de cultivo se agrega sobre la superficie cubierta de agua con aceite. Las colonias rodeadas de un halo emulsionado se consideran positivas para la producción de BS. Es un método sensible para detectar bacterias con esta capacidad (Morikawa, Hirata, and Imanaka, 2000). (9) Ensayo

de emulsificación (EA): En este método el medio de cultivo es centrifugado a 10,000 rpm/15 min, posteriormente se mezclan 3 ml del sobrenadante con 0.5 ml de aceite/hidrocarburo y se vortexea vigorosamente durante 2 min. Se deja reposar por 1 h, con la finalidad de que se separen las fases acuosa/aceite, se usa como blanco medio de cultivo no inoculado (Jagtap *et al.*, 2009). La absorbancia de la fase acuosa es obtenida de 0.1 unidades a 400 nm, y es multiplicada por el factor de dilución y se considera una unidad de actividad de emulsificación por mililitro (EU/ml) (Patil and Chopade, 2001a,b; 2003).

(10) Índice de emulsificación (IE): la actividad de emulsificación se mide mediante el cálculo del EI. En este método el keroseno o diesel es agregado al sobrenadante de un cultivo bacteriano (1:2 v/v), y se vortexea por 2 min, se deja reposar durante 24h. El EI es calculado midiendo la altura total de la fase acuosa entre la altura de la emulsión del keroseno o diesel y multiplicada por 100 (Ellaiah *et al* 2002 and Haba *et al.* 2000). La estabilidad del EI designa la fuerza del BS.

(11) Ensayo de turbidez, este método fue desarrollado por Rosenberg *et al* (1979) y posteriormente fue modificado por Neu and Porralla (1990). El caldo de cultivo es filtrado y el después es secado y agregado a un buffer. Se mide la DO a 446 nm. Para esto, se adiciona hidrocarburo y se vortexea por 2 min, se deja reposar por 10 min y se vuelve a medir la DO, se calcula midiendo las diferencias entre a DO inicial y la final.

(12) Métodos moleculares para identificar los genes involucrados en la biosíntesis de BS; las aplicaciones biotecnológicas se han extendido para las metodologías de evaluación. La búsqueda directa de genes involucrados en la producción de BS es rápida y menos laboriosa. Invenciones mas recientes como las de Whiteley, Lee y Greenberg (1999) pueden ser usados para identificar moduladores y genes involucrados en el sistema de QS en bacterias productoras de BS. Nuevas cepas y vectores han sido diseñados con éxito para evaluar la producción de BS.

(13) Recuperación o purificación de BS; la recuperación de productos biotecnológicos, los costos de procesamiento usualmente representa el 60% del costo total de producción lo cual hace que la producción comercial de BS sea muy caro. Para reducir los costos es necesario usar sustratos renovables y de bajo costo (Desai and Banat, 1997; Banat, *et al* 2000; Makkar and Cameotra, 1997). Sin embargo en los procesos de purificación se requiere gran cantidad de dinero. Durante todos estos procesos el riesgo de contaminación con compuestos no deseados del proceso de fermentación siempre existe. Carga iónica (cromatografía),

solubilidad (agua/solvente orgánico) y localización (intracelular, extracelular o pegada a la célula) determinan el procedimiento de purificación del BS para ser extraído. Generalmente, la purificación y precipitación de moléculas de alto peso molecular, por lo general se realiza usando sulfato de amonio, seguido por diálisis para remover pequeñas moléculas. Otros métodos también involucran el uso de ácido tricloroacético (TCA), precipitación con acetona, etanol y cloroformo/metanol. Diversos métodos convencionales conocidos para la recuperación de BS son mencionados más adelante. (14) Precipitación con acetona; los cultivos son crecidos en medio mínimo suplementado. El sobrenadante libre de células es mezclado con acetona fría para precipitar emulsionantes, el cual después es re-suspendido en un buffer de fosfatos. La mezcla es incubada a 4°C por 15 a 20h para el precipitado del emulsificador. El BS es analizado por su capacidad emulsificante, fracción proteica y polisacárido. Este método ha sido usado en diversos trabajos, para purificar BS (Rosenberg *et al.*, 1979; Patil and Chopade, 2001a,b; 2003). (15) Precipitación con etanol: es parecido a la acetona, el etanol es un solvente popular para obtener extracto crudo de bioemulsificadores del sobrenadante de *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Cyanobacterium* y especies de levaduras. El medio de cultivo es centrifugado a 11,000g/20min/4°C y el BS es precipitado del sobrenadante usando etanol frío. Phetrong *et al* (2008), hallaron que la precipitación del emulsificador de *A. calcoaceticus* subsp *anitrus* SM7 con este método fue mas eficiente comparado con otros. (16) Precipitación con sulfato de amonio; este sirve para precipitar BS de alto peso molecular como es el caso del emulsan. Este método fue introducido por Rosenberg *et al* (1979) para precipitación de BS de *Arthrobacter* RAG-1. Para este fin, se agrega 30% de (NH₄)₂SO₄ directamente al medio de cultivo sin remover las células y se deja reposar O/N. Después el precipitado es suspendido en 3% de (NH₄)₂SO₄ saturado y centrifugado hasta que el sobrenadante sea clarificado. Posteriormente se agrega (NH₄)₂SO₄ a una concentración final de 40%. El precipitado resultante es centrifugado y extraído con éter. Kaplan and Rosenberg, (1982) obtuvieron BS de *A. calcoaceticus* BD413 por incremento sucesivo de (NH₄)₂SO₄ agregado a extractos libre de células. (17) Precipitación ácida; este método es fácil, barato y rápidamente disponible para recuperar BS crudo como la surfactina, lipopéptidos, glicolípidos etc. La hidrólisis ácida usa HCl concentrado para bajar el pH hasta 2.0 de BS insolubles a pH bajos (Mukherjee, Das, and Sen, 2006), precipita proteína y lípidos

contenidos en los BS a 4°C O/N (Cooper *et al.*, 1981). Se centrifuga y el pellet es extraído usando varios solventes (Nitschke and Pastore, 2006; Thaniyavarn *et al.*, 2003). El material extraído es filtrado para remover residuos y evaporado hasta secar completamente en un rotavapor. Los lipopéptidos de microorganismos que desarrollan en medios simples o complejos son purificados también por este método. En el caso de los ramnolípidos el sobrenadante es hidrolizado con HCl para precipitar glicolípidos, lo cual son convertidos en insolubles en solución acuosa. Durante la acidificación, el BS presente es protonado, lo cual lo hace menos soluble en agua. La acidificación, centrifugación y extracción son similares a otros glicolípidos. Sin embargo, diferentes solventes, cloroformo, metanol, acetato de etilo son usados generalmente para purificar ramnolípidos. La fase orgánica es removida y se mezcla con Na₂SO₄ para remover el agua y puede ser concentrado en un rotavapor a 40°C para obtener el extracto crudo. Los residuos son disueltos en NaHCO₃ para purificar el BS. Se ha incrementado el número de publicaciones reportando la purificación de ramnolípidos por precipitación ácida (Haba *et al.*, 2000; Smyth *et al.*, 2009a). Soforolípidos (Nunez *et al.*, 2001), lípidos de trealosa, lípidos mannosylerytritol (MELs) (Rapp *et al.*, 1979), son extraídos de forma similar que los ramnolípidos. (18) La caracterización preliminar del BS se realiza mediante una cromatografía en capa fina (TLC), esta es una de las técnicas más comunes para detectar BS. Esta basada en el principio de competencia de solutos con el solvente en los sitios de superficie del adsorbente. Los compuestos son distribuidos en la superficie del adsorbente. Cada muestra es separada en la placa para evitar contaminación cruzada con otra. Para detectar BS, se utiliza un sistema de solventes dependiendo el tipo de compuesto de interés. Los solventes orgánicos e inorgánicos en los que puede ser disuelto y no volátiles son los que se prefieren. Los solventes que no pueden ser usados en HPLC, detección de UV por su interferencia pueden ser usados en el TLC. Algunos, ácido acético, diétil éter, acetato de etilo, n-hexano, pirimidina son necesarios para mover los grupos funcionales del BS. La detección de manchas de las muestras en las placas de TLC, pueden ser determinadas por técnicas destructivas y no destructivas, las no destructivas tenemos la iodina, métodos con agua y radiación UV, las destructivas involucra el uso de H₂SO₄, orcinol, y ninhidrina para la detección de carbohidratos, lípidos y proteínas. (19) Ensayos químicos; los BS de alto peso molecular son complejos. Estos son analizados por ensayos colorimétricos (Lowry's, Bradford), espectrometría de masas (MS) y técnicas de

secuenciación. El contenido de ácidos grasos y secuenciación del péptido es determinado con la ayuda de un equipo automatizado de degradación de Edman y espectrómetro de masas. La combinación de todas estas diferentes metodologías es importante para predecir la estructura completa del BS. (20) Determinación del contenido de proteína-lípidos; los BS de alto peso molecular por lo general contienen lipoproteínas, proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos o combinación de estas. Las proteínas son generalmente cuantificadas por el método de Lowry (Lowry *et al.*, 1951) y Bradford (1976) y es usado por varios investigadores. (21) uso de proteasas para la digestión de proteínas; la identificación de la secuencia de aminoácidos de la proteína, no siempre es posible debido a varios factores tales como la incapacidad de obtener mediciones precisas de proteínas más grandes, por lo que la degradación de Edman y la MS son más factibles para el análisis de estructura de péptidos pequeños. Es necesaria la digestión de la proteína en pequeños péptidos de 6 a 20 aminoácidos para ser analizadas por Edman y MS/MS con la finalidad de proporcionar información necesaria para identificar y reconstruir la estructura de la proteína completa. Las proteasas son usadas para la digestión, se usa tripsina por ejemplo que rompe las proteínas en los residuos de lisina y arginina en la dirección del C-terminal. Otras proteasas pueden ser usadas para ayudar a determinar el orden de secuencia de cada péptido (Strader *et al.*, 2006 and Smyth *et al.*, 2009b). (22) Electroforesis en geles de poliacrilamida-Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE); este método sirve para separar y determinar el peso molecular de la molécula del BS, involucra el uso de electroforesis, en el cual la muestra es aplicada en un buffer de carga que contiene un buffer y SDS. El papel del buffer de reducción es romper los enlaces de disulfuro para facilitar la disposición lineal de la proteína. Seguido por la unión del SDS a la proteína (dependiendo de la masa molecular) para crear una proteína cargada negativamente. Bajo la influencia de la corriente eléctrica, las proteínas (dependiendo de la masa molecular) son separadas. Cada proteína puede ser eludida, removida y extraída de la banda (Toren *et al.*, 2001). (23) Ensayo colorimétrico para detección y cuantificación de glicolípidos; los glicolípidos son cuantificados por el desarrollo de color usando la prueba de antrone u órcinol. Estos ensayos detectan y cuantifican los glicolípidos presentes después de la acidificación y calentamiento de la ramnosa, la cual forma un color con el reactivo, se usa una curva de calibración de ramnosa o ramnolípidos de 0-50 mg/dl (Hodge and Hofreiter, 1962). Las moléculas de ramnosa de

los ramnolípidos reaccionan con el H_2SO_4 y órcinol (1,3-dihidroxi-5-metilbenceno) a altas temperaturas (30 min/80°C) y es cuantificado a 421 nm (Koch *et al.*, 1991). (24)

Caracterización química de los BS; existen varios métodos llamados: TLC, HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Afinidad), IR (Infrarrojo), GC-MS (Cromatografía de Gases-Espectrómetro de Masas, NMR (Resonancia Magnética Nuclear) y FAB-MS (Bombardeo Atómico Rápido-Espectrómetro de Masas). la HPLC, consiste en una fase móvil, estacionaria y un detector. La fase móvil lleva la muestra en solución y es inyectada a través del inyector. La fase estacionaria es un sólido, sobre el cual la fase móvil fluye continuamente los componentes de la muestra. Los componentes migran acorde a las interacciones no covalentes de los compuestos de la columna. El detector emite respuesta a la elución de la muestra y subsecuentemente señales en picos en el cromatograma. GC-MS: La cromatografía de gases constituye un poderoso instrumento en la determinación de los componentes de una muestra, al permitir tanto la separación de éstos como su detección individual. El espectro de masas (MS) de un compuesto puro ofrece valiosa información para fines de identificación cualitativa, siendo la determinación del peso molecular lo más importante, si bien la fragmentación de la molécula puede ayudar en gran medida a la identificación del compuesto (Yakimov *et al.*, 1995); Análisis de Infrarrojo (IR): esta es una forma de radiación que puede viajar a través del vacío, mientras que el calor se asocia con el movimiento y energía cinética de las moléculas. El espectrómetro consiste en una fuente de radiación, y un detector monocromado. El término de infrarrojo cubre el rango del espectro entre 0.78 y 1000 nm. La absorción de IR es restringida a compuestos con pequeña energía en los estados vibracional y rotacional. Esta técnica determina los grupos funcionales de muestras; gases, líquidos y sólidos, y apoya a la elucidación de la estructura del compuesto. La surfactina, liquesina y ramnolípidos han sido caracterizados por esta técnica (Das, Mukherjee, and Sen, 2008). Análisis por NMR; este método es basado en la transición de átomos con un momento magnético cuando un campo magnético externo se aplica. La RMN proporciona información sobre los grupos funcionales, así como la posición de los vínculos dentro de las moléculas de carbohidratos y lípidos. La ubicación exacta de cada grupo funcional se puede obtener y la información sobre los isómeros estructurales también es posible con la ayuda de una serie de experimentos de RMN. FAB-MS; Este es un método de ionización suave que requiere una sonda de inserción directa

para la introducción de la muestra. La muestra del BS se disuelve en metanol, se mezcla con la matriz y se utiliza para el análisis. El grupo de investigación de Manso Pajarron *et al.* (1993) han identificado mezclas de ramnolípidos utilizando este método. Es importante mencionar que los requisitos de tiempo para llevar a cabo algunas de la extracción, purificación y análisis de algunos de los procedimientos descritos anteriormente pueden ser afectadas por varios factores tales como volumen de muestra, la presencia de carbono residual o la producción de otros sustratos como el petróleo, mezclas o complejas composiciones medio (Satpute Surekha K *et al* 2010).

3.8 CONCLUSIONES

Basados en el primer capítulo de la tesis, concluimos que los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* sp, principalmente asociadas a plantas son ampliamente diversos, en estructura, y en actividad biológica. Aunque se han identificado un gran número de genes involucrados en la biosíntesis de BS, aun en varios de ellos se desconoce la regulación de producción en este género. Se conoce mucho en cuanto a la producción, biosíntesis y aplicaciones de los ramnolípidos, y se desconoce algunos de estos puntos en los CLP's. Se debe dar mucho énfasis en las bacterias que tienen la capacidad de producir BS, aplicar los métodos correctos para su identificación y elucidación de la estructura, así como las posibles aplicaciones biotecnológicas (biocidas, biocontrol, biorremediación, etc) con la finalidad de usar estas tecnologías compatibles con el medio ambiente. Debemos de tener en cuenta el uso de fuentes de carbono de bajo costo y renovables, y sobre todo se debe de tener avances significativos en el análisis y explotación de la secuencia de los genomas de las bacterias con esta capacidad, lo cual permitirá la comprensión de la síntesis, regulación y actividad de los BS producidos por *Pseudomonas* sp.

4. CAPITULO II: ZONA DE ESTUDIO

4.1 CUATRO CIENEGAS COAHUILA (CCC)

El valle de Cuatro Ciénegas, localizado en la zona central de Coahuila, se considera el humedal más importante del Desierto Chihuahuense y uno de los más importantes en México. Es uno de los pocos humedales que quedan en el norte de América y ha sido comparado con las Islas Galápagos del Ecuador en cuanto a diversidad biológica y endemismos (National Public Radio, 2001). Debido a que un gran número de los organismos que se encuentran en el valle están en la lista de especies amenazadas, más de 70 especies son endémicas de la región (Desert Fishes Council Web, 2003) y a que todos ellos dependen de la permanencia de los sistemas acuáticos de la zona, desde 1994 el valle de Cuatro Ciénegas fue decretado Área Natural Protegida (ANP) por el gobierno de México y es también considerado como un sitio prioritario para la conservación (Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad (CONABIO), World Wildlife Fund (WWF), Ramsar convention on wetlands y más recientemente declarado como un sitio de interés por el proyecto del Hombre y la Biosfera (MAB/UNESCO).

Por otro lado, muchos de los habitats acuáticos del valle permiten la existencia de estromatolitos vivos, comunidades microbianas completas que son consideradas como un ejemplo de la vida en la Tierra de hace casi 3 mil millones de años (Madigan *et al.* 2000), esta situación es poco usual en la actualidad y en todo el mundo existen tan sólo unos cuantos sitios en donde encontramos estromatolitos vivos (Madigan *et al.* 2000).

Además de albergar muchas especies endémicas, el valle de Cuatro Ciénegas y los valles colindantes tienen particularidades que los hacen sumamente interesantes. Por una parte, se ha encontrado la presencia de bacterias que son características de ambientes marinos, a pesar de su ubicación a 700 km de la costa más cercana. Este tipo de bacterias se encuentra únicamente en zonas donde también existe un origen marino, como el desierto de Atacama o los lagos de la Antártida. Esto, junto con los datos geológicos de la zona, son elementos que sugieren un origen marino del agua subterránea de Cuatro Ciénegas, lo cual no es de extrañar, ya que la mayor parte del agua del norte de México es de origen fósil y proviene del Protogolfo de México. Por otra parte, lo que es más extraordinario es que esta señal del

mar en el área de Cuatro Ciénegas continúe presente desde hace 150 millones de años y que comunidades relictas complejas de microorganismos, estromatolitos, caracoles y peces, se mantengan vivas después de tanto tiempo. Asimismo, el hallazgo de bacterias marinas en el Desierto Chihuahuense realza la importancia de conservar no sólo el valle de Cuatro Ciénegas, sino los colindantes, en los que también se encuentran secuencias de origen marino. (Escalante 2008)

4.1.1 Ubicación geográfica

El valle de Cuatro Ciénegas está localizado en la zona central del estado de Coahuila, México (Figura 7) y forma parte del Desierto Chihuahuense (26° 59' N, 102° 04' W). La extensión del valle es de aproximadamente 40 kilómetros de este a oeste y de 30 km de norte a sur a una altitud de 740msnm (Escalante A, 2008). Este valle está localizado entre los dos macizos montañosos más grandes de México, la Sierra Madre Oriental y la Sierra Madre Occidental. La humedad que viene del océano Pacífico y del Golfo de México no logra llegar al valle por la barrera montañosa, lo que en parte explica las condiciones áridas del lugar. Rodeando al valle se encuentran montañas de más de 3000 msnm: la Sierra de la Madera, Sierra Purísima, Sierra Menchaca y Sierra la Fagua y es dividido en región este y oeste por la Sierra de San Marcos y Pinos (Figura7).

4.1.2 Clima

El clima de Cuatro Ciénegas es árido, con menos de 200 mm de precipitación anual y más de 2000 mm de evaporación potencial (SEMARNAT 2003). Las lluvias ocurren entre Mayo y Octubre, con la mayor parte de la precipitación durante Junio. Las temperaturas en Cuatro Ciénegas pueden llegar al congelamiento (0°C) durante el invierno, cuando se acumula nieve en las partes altas de las montañas. Las temperaturas de verano suben a más de 44°C (Minckley 1969). Se estima que un clima similar al actual ha existido en el valle por más de 30,000 años con vegetación similar inferida por datos de polen y radioisótopos de carbono (Meyer 1973, Escalante 2008).

4.1.3 Hidrología

La poca precipitación anual reportada para la zona no puede ser generadora de cuerpos de agua en el valle, por lo que la gran cantidad de agua subterránea es la causa de la existencia de manantiales en el valle. Dentro de Cuatro Ciénegas. Las pozas del valle presentan una variabilidad extrema en temperatura, salinidad, química del agua y descarga en escalas espaciales pequeñas o locales (Minckley 1969). Las aguas son duras y contienen gran cantidad de sales de calcio y magnesio; la elevada dureza de las aguas se incrementa a partir de los manantiales. Los cationes dominantes, en orden de abundancia descendente son calcio, magnesio, sodio y potasio; mientras que los aniones son fuertemente dominados por los sulfatos, carbonatos y cloruros. Presentan una composición química similar; el pH varía desde la neutralidad (7.0-7.2) en los manantiales hasta la alcalinidad (8.0-9.7) en lagos terminales en fase de desecación (Alcocer y Kato 1995; Calegari 1997). Los cuerpos de agua tienen, además, un contenido muy bajo de fósforo y la pobreza de nutrientes no permite el desarrollo importante de algas, por lo que se ha sugerido que la base trófica del ecosistema está formada por bacterias (Souza *et al.* 2006), sin embargo, estudios en donde se pruebe esto explícitamente aún no existen. El bajo contenido de fósforo ha sido sugerido también como una firma de condiciones ambientales del PreCámbrico (Elser *et al.* 2005, 2006) en donde organismos metazoarios estaban limitados en su desarrollo, esta característica de los sistemas acuáticos de Cuatro Ciénegas permite probar hipótesis sobre evolución temprana de la vida en un ambiente actual. (Escalante 2008 y Verdugo 2008).

Los cuerpos de agua permanentes en el valle se han clasificado, de acuerdo con Minckley (1969), en siete sistemas de flujo, estos son: Churince, Becerra/Garabatal, Río Mesquites, Río Puente Chiquito, Tío Cándido/Escobedo, Santa Tecla y Río Nadadores (Río Grande). Dentro de cada uno de los sistemas existen todos o algunos de los cuatro tipos principales de cuerpos de agua en el valle: manantiales (en donde surge el agua), pozas (alimentadas por flujos superficiales), ríos/canales y lagunas saladas.

4.1.4 Sistema Churince

El sistema Churince está compuesto por cuatro pozas/lagunas (Fig. 7). Estos incluyen Poza Churince y Poza Bonita como sus manantiales, Laguna Intermedia como un lago intermedio y Laguna Grande como el lago terminal o laguna salada de desecación. Se ha propuesto que conductos subterráneos mantienen conexión de este sistema con el Río Mesquites (Evans 2005) pero hasta ahora no hay evidencia para ello y se considera como un sistema aislado.

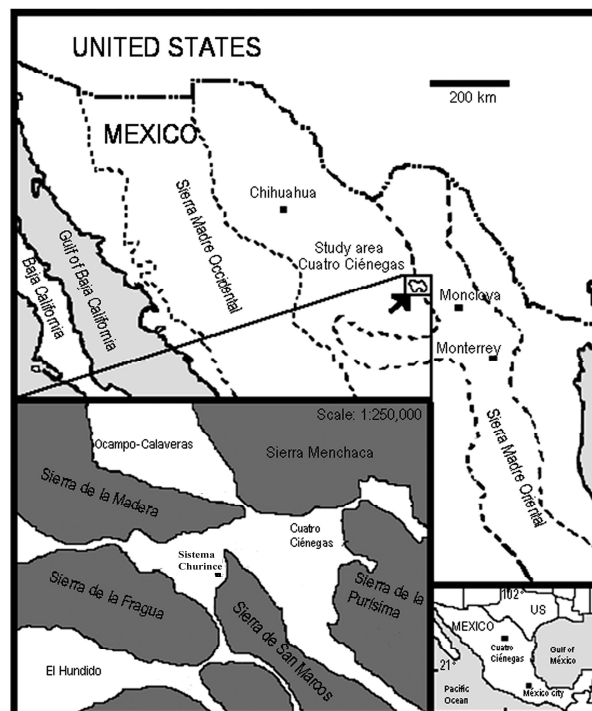


Figura. 7. Mapa del área de Cuatro Ciénegas en el estado de Coahuila en México. Los nombres de las Sierras que rodean el valle se encuentran sobre la representación gráfica de las mismas (modificada de Johannesson *et al.* 2004)

Tabla 1. Coordenadas geográficas y medidas fisicoquímicas del agua del sitio de muestreo en el sistema Churince en Cuatro Ciénegas Coahuila, México.

Sitio	Latitud (N)	Longitud (W)	°T (°C)	°T^a (°C)	pH	Do^b (%;?)	Cond.^c (mohms)
LG1	26°50.830′	102°09.335′	25.03	3.88	10	9.6	4.2
LG2	26°51.199′	102°09.009′	25.03	3.88	9.8	9.5	4.2
LG3	26°51.146′	102°08.964′	25.45	3.84	9.7	9	4.2
LI6	26°50.927′	102°08.539′	26.84	2.37	9.3	8	2.2
LI7	26°50.910′	102°08.438′	26.44	2.59	9.3	8	2
LI8	26°50.897′	102°08.558′	26.46	4.26	9.3	8	1.8
<u>MAN9</u>	<u>26°50.717′</u>	<u>102°08.295′</u>	<u>27.6</u>	<u>1.16</u>	<u>8.9</u>	<u>7.5</u>	<u>1.6</u>
<u>MAN10</u>	<u>26°50.421′</u>	<u>102°08.047′</u>	<u>28.82</u>	<u>0.47</u>	<u>8.7</u>	<u>6</u>	<u>1.4</u>

a. Oxígeno Disuelto y b. Conductividad

Hasta ahora no existen antecedentes de otros estudios con información sobre las comunidades bacterianas en ambientes acuáticos del valle de Cuatro Ciénegas y de los valles vecinos con respecto al aislamiento de bacterias productoras de BS. Muchos de los estudios de bacterias que han sentado las bases para el desarrollo de la microbiología han sido sobre cultivos puros, pero hoy sabemos que las bacterias cultivables son sólo una pequeña parte de las que existen en la naturaleza. Los métodos moleculares desarrollados en la última década han permitido el estudio de comunidades bacterianas no cultivables que han mostrado un asombroso número de linajes filogenéticos. Gran parte de estos trabajos se basan en la secuencia del gen 16S ribosomal, que ha sido elegido para clasificar distintos tipos de organismos gracias a que está presente en los tres dominios de la vida reconocidos actualmente. El ADN 16S es una molécula muy interesante ya que contiene información para ensamblar la maquinaria de producción de proteínas en el ribosoma. Sin embargo, su gran utilidad taxonómica se basa no sólo en su función esencial sino en que tiene regiones altamente conservadas y regiones con variación considerable en su secuencia, por lo que se pueden detectar grupos taxonómicos a diferentes niveles (reino, familia, género, especies etc.) con un mismo marcador para prácticamente todos los seres vivos. Hasta ahora la

clasificación de los microorganismos se ha basado principalmente en estas secuencias del gen 16S ribosomal.

La diversidad microbiana de este lugar ha sido escasamente estudiada (Souza *et al.* 2006, Elser *et al.* 2005, García-Pichel *et al.* 2002, Escalante A, 2008). Además, se han aislado e identificado con una alta frecuencia cepas relacionadas filogenéticamente con el género *Pseudomonas* sp es por ello, la importancia de aislar, identificar y caracterizar cepas que produzcan biosurfactantes, y que no sean patógenas para su uso a nivel industrial.

ETAPA I

5. AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN DE *Pseudomonas* sp PRODUCTORAS DE BIOSURFACTANTES AISLADAS DEL VALLE DE CUATROCIENEGAS COAHUILA.

5.1 Introducción: Existe una gran variedad de microorganismos que producen potentes agentes activos de superficie, denominados biosurfactantes, lo cual varían en su estructura química y peso molecular. El peso de los biosurfactantes depende de las condiciones ambientales y de crecimiento del microorganismo. La gran diversidad de los biosurfactantes hace de ellos un grupo interesante de moléculas para su aplicación en diversas áreas, en la agricultura, cuidado de la salud, alimentos, limpieza de aguas y control ambiental principalmente en la degradación de hidrocarburos presentes en el suelo y en la recuperación de aceites. Dentro de la gran variedad de microorganismos que producen biosurfactantes encontramos a *P. aeruginosa* que tiene la capacidad de producir un glicolípido, llamado ramnolípido, el cual tiene diversas aplicaciones industriales y una de las limitantes para usar esta bacteria en biotecnología es por ser un patógeno oportunista, por ello nos dimos a la tarea de explorar las aguas de CCC, con la finalidad de aislar *P. aeruginosa* que produjeran ramnolípido, que no fueron patógenas u otras *Pseudomonas* sp con esta misma capacidad para utilizarlas en alguna aplicación biotecnológica.

5.2 Objetivo general: Caracterizar los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* sp aislada de CCC.

5.3 Objetivos particulares:

1. Identificar filogenéticamente las cepas de *Pseudomonas* sp productora de biosurfactante.
2. Caracterizar fisicoquímicamente el biosurfactante producido por *Pseudomonas* sp.
3. Determinar la patogenicidad de la cepa productora de biosurfactante.

5.4 Antecedentes del proyecto:

En la primera etapa se analizaron aproximadamente 420 cepas de las cuales una de ellas producía biosurfactante determinado en las pruebas de screening (formación de halo en medio PSVW y la formación de espuma estable en medio PPGAS), la cepa que aislamos de esta colección fue la numero CCB77, que fue aislada del sitio 10 del manantial del sistema Churince de CCC. De la cepa se amplificó y analizó la secuencia del 16S rDNA, la cual se agrupó con *P. mosselli*. Posteriormente se hizo el análisis de cromatografía en capa fina para la detección de las moléculas de monoramnolípido y diramnolípido, revelando que esta cepa producía las dos moléculas que co-migraban a la misma altura que *P. aeruginosa* PAO1 y correspondían al mono y diramnolípido.

5.5 MATERIALES Y METODOS: AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE *Pseudomonas* sp CCB77

5.5.1 Aislamiento de las muestras:

Se tomaron muestras en cuatro puntos (m1, m2, m3, m4) de Laguna Grande en agosto del 2003, enero del 2004, enero del 2005 y agosto del 2005 (dos veranos y dos inviernos). En cada uno de los puntos de muestreo se tomaron 15 ml de agua de la superficie en tubos falcón estériles. Por sitio se tomaron tres réplicas independientes. Además se tomaron otros puntos en el Manantial (m9 y m10), cuatro en Laguna Intermedia (m5, m6, m7 y m8) y cuatro en Laguna Grande (m1, m2, m3, m4) (Verdugo, 2008)

5.5.2 Siembra y extracción de DNA.

Para aislar las cepas del género *Pseudomonas*, se sembraron en campo 100 µl de cada muestra en un medio de cultivo agar GSP (10 g/L de L (+) Glutamato de sodio, 20 g/L de Almidón hidrosoluble, 2 g/L de Fosfato de potasio dihidrogenado, 0.5 g/L de Sulfato de magnesio, 0.36 g/l de Rojo fenol y 12 g/L de agar; pH 7.3) selectivo para *Pseudomonas* y *Aeromonas* según Kielwein (1969, 1971). Debido a que la mayoría de los microorganismos acompañantes no pueden metabolizar ni el glutamato ni el almidón (únicos nutrientes del

medio), en principio sólo las especies de los géneros *Pseudomonas* y *Aeromonas* pueden crecer en el medio agar GSP. Al degradar el almidón las *Aeromonas* producen ácido tornando el color naranja del medio a amarillo. (Stanier *et. al.*, 1966). En cambio las colonias de *Pseudomonas* coloran el medio de rojo o violeta, propiedad gracias a la cual pudieron ser diferenciadas. Los aislados fueron guardados a -80 °C en 5% de medio de GSP con 15% (vol/vol) de glicerol. (Escalante 2008 y Verdugo 2008). Se extrajo DNA de las colonias con un kit de extracción DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden) siguiendo las instrucciones del fabricante.

5.5.3 Identificación de las especies bacterianas.

Se amplificó el gen 16S rRNA de los genotipos únicos. Se emplearon los primers universales para la mayoría de las eubacterias, 27F y 1492R (Lane, 1991). Cada reacción de PCR contenía buffer para PCR al 1X, 2 mM de MgCl₂, 0.8 mM de una mezcla de dNTP, 0.3 µM de cada primer, una unidad de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems) y 2 µl de DNA. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador (MJ Research) con el siguiente programa: un ciclo de 94°C por 4 min. Seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min., 52°C por 1 min., 72°C por 1 min. y 71°C por 3 min. El producto de PCR fue purificado en un gel de agarosa al 2 % utilizando el protocolo del kit QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden). Se emplearon siete primers (8F, 357R, 530R, 530F, 790F, 981R, 1492R) para obtener la secuencia completa (≈ 1450 pb del 16S rDNA (Tabla 2) (Sacchi *et al.*, 2002). La reacción de secuenciación se realizó en un volumen total de 15 µl, el cual contenía 2 µl de Big Dye Terminator Sequencing kit (Applied BioSystems), 1.6 µM de primers y 5 µl del producto amplificado. Las condiciones de secuenciación fueron: 1 ciclo de 5 min. a 95°C, 45 ciclos de 10 seg. A 95°C, 10 a 50°C y 4 min. A 60°C. La secuenciación se hizo en un secuenciador de capilar (ABI-Avant 100). Se ensamblaron las secuencias con los programas BioEdit y Consed. Finalmente se identificaron las cepas pertenecientes al género *Pseudomonas* comparando las secuencias con la base de datos del Ribosomal Database Project II (RDB, Maidak *et al.*, 2001).

Tabla 2. Primers utilizados para la amplificación y la secuenciación del gen 16S rDNA.

Primer usados para amplificar el gen 16S rRNA	
27F	5'-AGAGTTTGATCCCTCAG-3'
1492R	5'-ACCTTGTTACGACTT-3'
Primes usados para secuenciar el gen	
16S rRNA completo	
8F	5'-AGTTGATCCTGGCTAG-3'
357R	5'-CTGCTGCCTCCCGTA-3'
530R	5'-GTATTACCGCGGCTGCTG-3'
530F	5'-CAGCAGCCGCGGTAATAC-3'
790F	5'-ATTAGATACCCTGGTAG-3'
981R	5'-GGGTTGCGCTCGTTGCGGG-3'

En base a la metodología anterior, se partió de un banco de 420 cepas del género *Pseudomona* sp, en la cual se hizo un screening en medio PPSW (el cual consiste en caldo PPGAS (phosphate-limited peptone-glucose ammonium salts medium pH 7.2 por sus siglas en ingles) el cual contiene (NH₄Cl₂ (0.02 M), KCl (0.02 M), Tris-HCl (0.12 M), MgSO₄ (0.0016 M), glucosa (0.5%, w/v), y peptona (1%, w/v) y el medio PSVW contiene la base del medio PPGAS (Y Zhang, 2002) suplementado con 2.5 mg/l de azul de metileno y 200 mg/ml de CTAB (cetyl-thrimethyl-ammonium-bromide) y 1.5 % de agar (Marina Wild *et al.*1997). Las placas se incubaron a 30 °C hasta por 7 días, la aparición de un halo transparente alrededor de las colonias se tomaba como positivo. Se incluyo como control positivo a *P. aeruginosa* PAO1. Posteriormente las cepas que no daban ese fenómeno de halo se descartaron del estudio, y las que daban halo fueron candidatas para ver la producción y estabilidad de espuma en medio PPGAS en cultivos de 18-24 hrs a 30°C a 225 rpm, además se hicieron las pruebas de hemólisis en agar sangre (base de agar sangre + 5% de sangre de carnero), se aplico el método de la gota colapsada en el sobrenadante y la prueba de emulsificación en diesel E₂₄ (Ahmad Mohammad, 2010). Todas las pruebas antes mencionadas fueron esenciales para discriminar a las cepas de *Pseudomonas* sp productoras de biosurfactantes.

5.5.4 Pruebas bioquímicas.

Se determinó el perfil bioquímico de las cepas usando el API20NE y API50CH siguiendo las recomendaciones del fabricante. Además se determinó el crecimiento a diferente temperatura (4 a 42°C). También se hicieron pruebas de crecimiento en medios ácidos (pH 4.5) y básicos (pH 9). El crecimiento de las cepas fue registrado de forma cualitativa (+, crecen; - no crecen).

5.5.5 DETECCIÓN DE METABOLITOS SECUNDARIOS:

5.5.5.1 Determinación de ramnolípido:

Los sobrenadantes de los cultivos en PPGAS de 24 horas fueron usados para determinar la concentración de ramnolípido. La concentración total de ramnolípidos fue determinada midiendo la concentración de ramnosa después de la hidrólisis con H₂SO₄ usando el método de orcinol (Chandrasekaran, 1980). Posteriormente se hicieron las cromatografías en capa fina (TLC) la cual consiste en placas con sílica gel G (Baker Si250 TLC Plates, JT Baker, Phillipsburg, NJ, USA) (Matsuyama *et al.* 1986), se usó una mezcla de solventes cloroformo/metanol/agua (65: 15: 2) (Sim L *et al.*, 1997) durante 30 minutos, los ramnolípidos fueron revelados con 25 mg/ml de una solución de α -naftol.

5.5.5.2 Cuantificación de piocianina:

La piocianina fue extraída a partir del sobrenadante de un cultivo ON en caldo PPGAS, y cuantificada por el método descrito por Essar *et al.* 1990. En 5 ml del sobrenadante se agregaron 3 ml de cloroformo y mezclado en vortex por 1 min. La capa de cloroformo fue transferida a un nuevo tubo y mezclado con 1 ml de HCl 0.2M. Después se centrifugó la mezcla y la capa de HCl 0.2M fue removida y medida en el espectrofotómetro a 520 nm.

5.5.5.3 Determinación de acylhomoserina lactona:

Para detectar la producción de autoinductores, en las cepas productoras de biosurfactantes se realizó mediante un bioensayo. Para separar los autoinductores, se hizo la separación a partir de 10 ml del sobrenadante de medio de PPGAS después de 24 horas de incubación, los autoinductores fueron extraídos con acetato de etilo acidificado (100 ml de acetato de etilo/0.1ml de ácido acético). Estos extractos fueron evaporados y resuspendidos en un

volumen de metanol 1:100 del volumen de cultivo original. Estas muestras fueron aplicadas 10 µl de la suspensión en placas de sílica gel (60 F254 plate Merck) y corridas en metanol al 60% por 30 minutos aproximadamente. Después de este tiempo, las placas fueron cubiertas por un cultivo saturado en caldo LB diluido 1:4 en agar LB al 1% el cual contenía *Chromobacterium violaceum* CV026, con la finalidad de detectar la producción de violaceína C₄-HSL (McClellan, K. H., 1997) o *E. coli* JM109/pBS1075 para detectar 3O-C₁₂-HSL por emisión de luz (Winson, M. K. 1998). La detección de C₄-HSL por la formación de pigmento fue hecha después de 24 horas de incubación a 30°C y en el caso de la detección de 3O-C₁₂-HSL fue detectada por la emisión de luz por autorradiografía en las placas después de la exposición por 6 horas a 37°C. En los dos casos se usaron como control positivo el sobrenadante de la *P. aeruginosa* PAO1 o M10, y autoinductores puros. Las concentraciones usadas para las soluciones de autoinductores puros aplicados en las placas fueron 400 nM para C₄-HSL y 100 nM de 3O-C₁₂-HSL.

5.5.6. AMPLIFICACIÓN DE GENES INVOLUCRADOS EN LA BIOSINTESIS DE BIOSURFACTANTE Y EXOTOXINA A.

5.5.6.1 Amplificación de los genes *toxA*, *rhlA*, *rhlB*

Se amplificaron los genes *toxA*, *rhlA* y *rhlB*, de la cepa CCC77, usando los oligos de la tabla 3. Cada reacción de PCR contenía buffer para PCR al 1X, 2 mM de MgCl₂, 0.8 mM de una mezcla de dNTP, 0.3 µM de cada primer, una unidad de *Taq* polimerasa (Applied Biosystems) y 2 µl de DNA. Todas las reacciones se realizaron en un termociclador (MJ Research) con el siguiente programa: un ciclo de 94°C por 4 min. Seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 min., 68° (*toxA*) (Ashraf A. 1994), 56°C (*rhlA*) y 58°C (*rhlB*) por 40 seg, 72°C por 1 min y 72°C por 5 min. Se uso como marcador de peso a lambda 1kb. Los productos de PCR fueron visualizados en gel de agarosa al 1.5% teñido con bromuro de etidio, en cada experimento se uso como control positivo el DNA de *P. aeruginosa* PAO1.

Tabla 3: Secuencia de los primer usados para amplificar las secuencias de los genes de la Exotoxina A (ETA), Ramnosiltransferasas (*rhlA* y *rhlB*).

Primers	Secuencia 5'-3'	Tm °C	Referencia
ETA1	GACAACGCCCTCAGCATCACCAGC	73	Ashraf A. 1994
ETA2	CGCTGGCCCATTCGCTCCAGCGCT		
<i>rhlAR</i>	ATGGCCATCTCGTGAATC	56	Este estudio
<i>rhlAF</i>	GGCGCGAAAGTCTGTTGGTA		
<i>rhlBR</i>	GCTCGCCGCTTTCAGCCAGC	58	Este estudio
<i>rhlBF</i>	CCAGCTTTGGCGTGGCTGTGG		

5.5.7. Complementación de la cepa *Pseudomonas* sp CCC77 por transformación

5.5.7.1 Transformación con el plásmido pUO94 y pINC94.

Para poder transformar las células bacterianas, primero se tuvo que determinar su perfil de resistencia, dado que el pUO94 (U. A. Ochsner *et al.*, 1994) confiere resistencia a tetraciclina 200 µg/ml y para pINC94 (N. Cabrera, *et al.*, 2006) a cloramfenicol 200 µg/ml. Se prepararon células electrocompetentes de las cepas a transformar (1ml de cultivo a una D.O de 1.00 a 600 nm), usando 3 µl del plásmido, las células se plaquearon en medios que contenían los antibióticos antes mencionados. Se seleccionaron dos colonias por cada cepa, se comprobó la presencia del plásmido por lisis alcalina. Las clonas obtenidas, se probaron para la producción de ramnolípido en medio PPGAS, y se cuantificó mediante el método de orcinol ya descrito arriba.

5.5.8 Purificación de ramnolípidos de *P. aeruginosa* PAO1.

Se inocularon 9 litros de caldo PPGAS en un reactor de 14 litros con 1 litro de cultivo saturado en LB de la cepa PAO1. Las condiciones del reactor fueron; 225 rpm, 37°C, 15 Lb psi, 1 uvm. Se hizo una curva de crecimiento y producción de ramnolípido, la primera lectura se tomo al tiempo 0, 2, 4, 6 – 24 h se midió la densidad óptica 600 nm, en cuanto a la producción del ramnolípido se cuantificó mediante el método de orcinol. Después de transcurridas las 24h de cultivo, se centrifugaron los 10 litros de medio con la finalidad de

eliminar el pellet, el sobrenadante se concentró en un volumen de 1.5 L. Los ramnolípidos fueron extraídos siguiendo el protocolo ya mencionado. Posteriormente se empacó una columna de sílica gel (humedecida con cloroformo), se agregó la muestra extraída y se eluyó con 100 ml de cloroformo/metanol 50:3, cloroformo/metanol 50:50 y al final solo con cloroformo, se colectaron fracciones de 500 µl, se dejaron evaporar, se corrieron y tiñeron las TLC, las fracciones puras del mono y di-ramnolípido se concentraron en un mismo tubo para analizarlas en el HPLC y usarlas posteriormente como controles.

5.5.9 Modelo de virulencia en *C. elegans* N2 de *Pseudomonas* sp CCC77:

5.5.9.1 Ensayo de parálisis de *C. elegans* N2:

Se hizo el ensayo de parálisis en *C. elegans* N2, en el cual se dispersaron 150 µl de un cultivo de 5 a 7 días de crecimiento en agar BHI (infusión cerebro corazón), las cajas se incubaron de 30 a 37°C por 18 a 24h, posteriormente se hizo una suspensión bacteriana en caldo BHI hasta una concentración de 0.1 a 600 nm, a partir de esta suspensión se inocularon 150 µl en una placa de 3.5 cm de diámetro de agar BHI, las placas fueron incubadas de 30 a 37°C de acuerdo a la temperatura del microorganismo, durante 24h, los nematodos N2 fueron sincronizados y después del tercer día de haber sincronizados el cultivo del nematodo se colectaron en placas stock en buffer M9 (1X, pH 6.5) y se colocaron alícuotas de 50 µl (contiene aproximadamente 20-200 gusanos adultos) sobre el tapete microbiano. Las placas se incubaron a una temperatura de 21-23 °C por 4h. Los nematodos fueron considerados muertos cuando no se movían espontáneamente y no respondían a ningún estímulo. El experimento se hizo por triplicado y en tres experimentos independientes, se incluyó como control positivo a *P. aeruginosa* PAO1 y como negativo a *E. coli* OP50-1. (Larry A. Gallagher, *et al.*, 2001).

5.5.9.2 Ensayo de muerte rápida de *C. elegans* N2:

Se hicieron los experimentos de muerte rápida (Fast Killing), se parte de un cultivo en ON en caldo King's entre 5-10 µl del cultivo se disemina en una placa de 3.5 cm de diámetro la cual contiene 4 ml de medio PGS (1% peptona, 1% NaCl, 1% glucosa, 0.15M sorbitol y 1,7% de agar). Las placas fueron incubadas a 37°C durante 24 h, posteriormente cada placa fue inoculada con 40-50 gusanos N2 y en estadio L4 o adultos. Después estas placas se incubaron a temperatura entre 23 a 25°C entre 8 a 12h, las placas se revisaron a partir de las 4h de iniciado el experimento, transcurrido este tiempo se revisaron las cajas para documentar el resultado. Se incluye en cada experimento a *E. coli* OP50-1 como control negativo y *P. aeruginosa* PAO1 como control positivo. (Man-Wah Tan, *et al.*, 1999).

5.5.10 RESULTADOS Y DISCUSIÓN ETAPA I:

a) Aislamiento y caracterización de *Pseudomonas* sp, productoras de biosurfactantes:

Se analizaron aproximadamente 420 cepas de una colección de *Pseudomonas* sp del Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental del Instituto de Ecología de la Universidad Nacional Autónoma de México. De las cepas analizadas se seleccionó la cepa CCC77 con capacidad de producir el biosurfactante ramnolípido. La producción de biosurfactante se determinó con la presencia de espuma y por las moléculas que co-migran con el mono y di-ramnolípido de *P. aeruginosa* PAO1, (figura 8).

A)

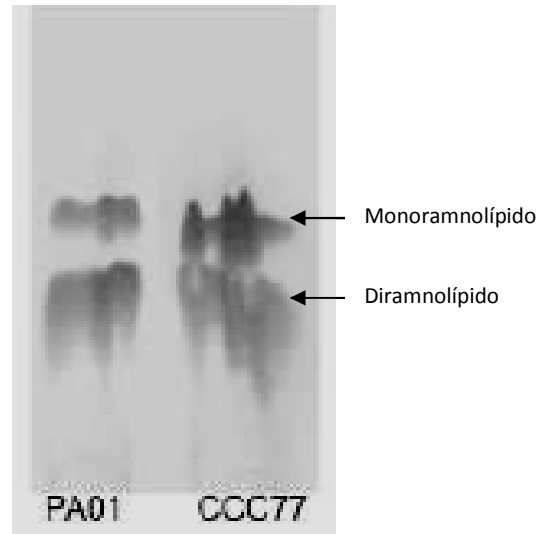


Figura 8: Producción de ramnolípido por *Pseudomonas* sp CCC77. A) Producción de espuma en medio PPGAS después de 24 h de incubación a 30°C, 225 rpm. B) Análisis de la cromatografía del ramnolípido extraído del sobrenadante del medio PPGAS con éter, a la izquierda el control positivo PA01.

Se cuantificó la producción de azúcares reductores como se describe en la metodología, en la cual se obtuvo: 454 $\mu\text{g/ml}$ de la cepa PA01, y 523 $\mu\text{g/ml}$ la CCC77 respectivamente.

En base al análisis de la secuencia del gene rDNA 16S se determinó la especie, la cual correspondía a *P. mosselii* con un 99.7% de identidad, como se muestra en el siguiente árbol filogenético (figura 9).

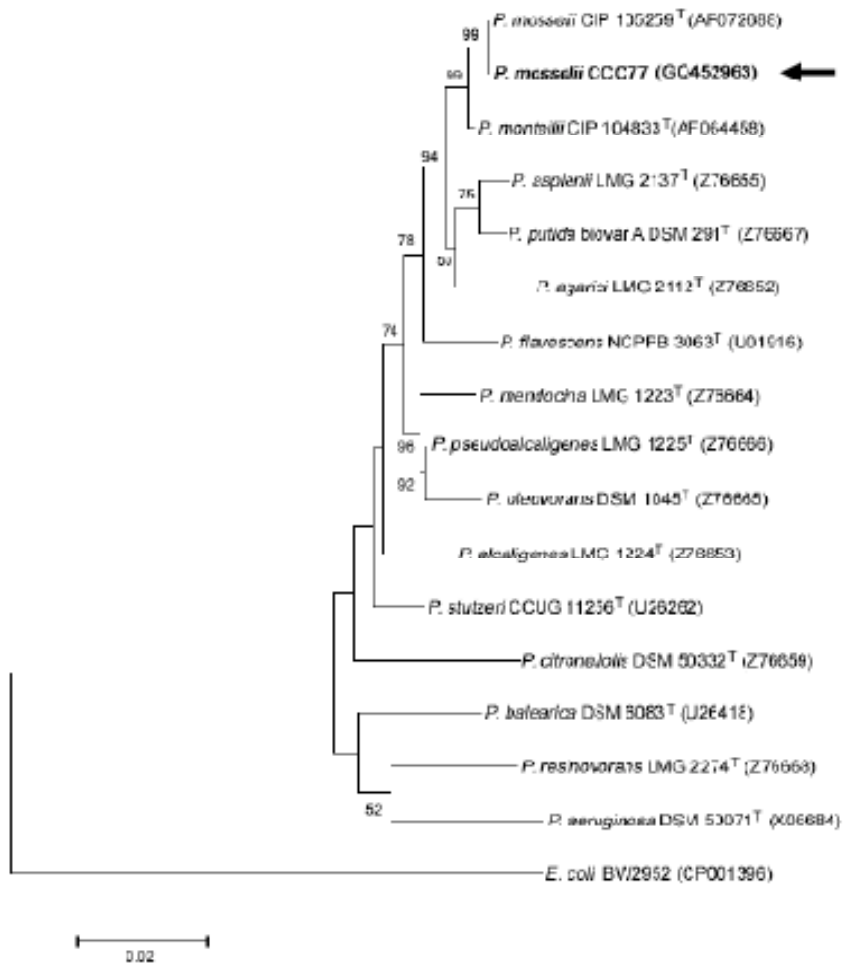


Figura 9. Filogenía del gen 16S rRNA para la cepa de *Pseudomonas* sp CCC77 colectada en el sistema Churince en Cuatro Ciéneas Coahuila, México. Se usaron secuencias de referencia de aislados tipo de distintas especies del género. El árbol presentado se construyó bajo un modelo de sustitución de Kimura de dos parámetros y algoritmo de distancia Neighbor-Joining con 1000 bootstrap. El tamaño de la barra representa el número de sustitución por sitio. En negritas se muestra la posición de la secuencia de la cepa CCC77.

En base a la secuencia del gen *gyrB*, la cepa CCC77 se agrupa con *P. putida* aunque la separación no es muy clara. Figura 3.

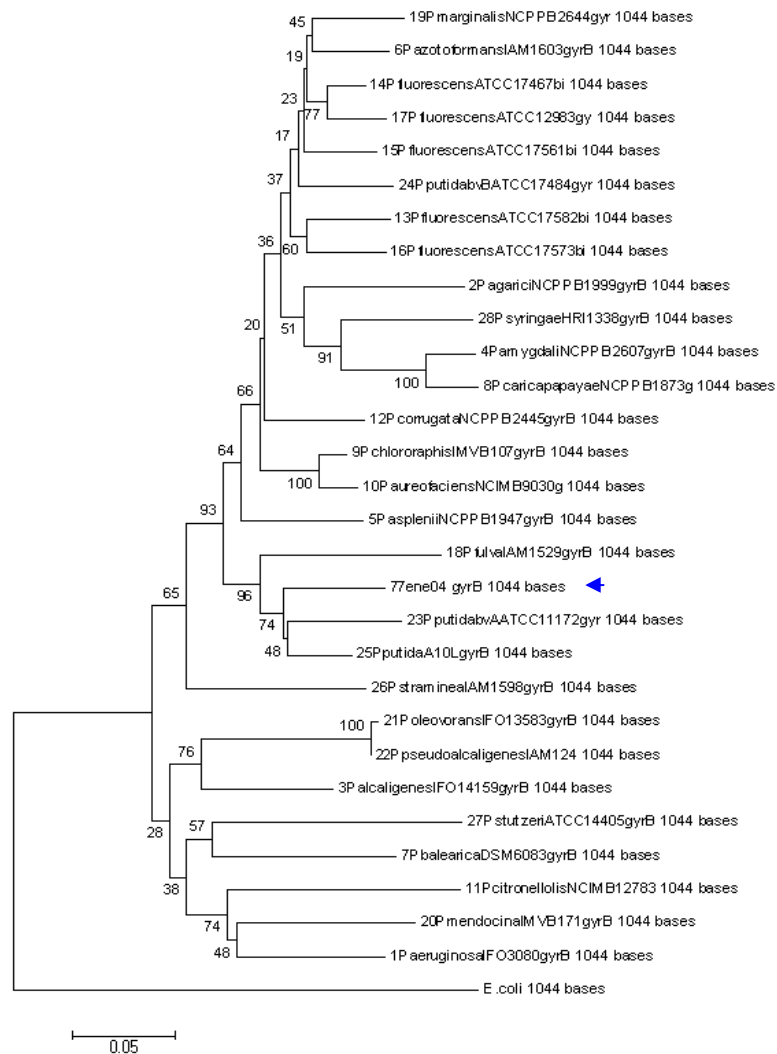


Figura 3. Filogenía del gen *gyrB* para la cepa de *Pseudomonas* sp CCC77 colectada en el sistema Churince en Cuatro Ciénegas Coahuila, México. Se usaron secuencias de referencia de aislados tipo de distintas especies del género. El árbol presentado se construyó bajo un modelo de sustitución de Kimura de dos parámetros y algoritmo de distancia Neighbor-Joining con 1000 bootstrap. El tamaño de la barra representa el número de sustitución por sitio. Con la flecha se muestra la posición de la secuencia de la cepa CCC77.

Posteriormente esta cepa fue enviada al laboratorio de Microbiología y Genética de la Universidad Louis Pasteur de Francia, para su análisis en base a los sideroforos e isoformas, la cual concluyeron que pertenece al grupo de las *Pseudomonas* pero no fluorescentes, por lo tanto para ellos no es *P. mosselii*. Lo cual nos indica que efectivamente la cepa CCC77 podría ser un mosaico, dado que por secuencia del gene ribosomal 16S corresponde a la especie, pero en cuanto a sideroforos no (comunicación personal Dr. Jeane Marie, Fouad Dabboussi, *et al.* 2002). Para determinar correctamente la especie se debían incluir otros análisis de secuencias principalmente de genes constitutivos (*recA*, *acnB*, etc) o en dado caso hacer las pruebas de hibridación DNA: DNA con la cepa tipo.

Con la finalidad de comprobar si esta especie tenía la capacidad de producir biosurfactante se solicitó el banco de cepas de 12 aislamientos de *P. mosselii*, se analizaron en nuestro laboratorio para la producción de ramnolípidos, se determinó la producción de espuma en medio PPGAS, la producción de halo en medio PSVW, cuantificación de azúcares reductores y cromatografía en capa fina. Los resultados obtenidos fue que no producían ningún biosurfactante como se muestra en la figura 11.

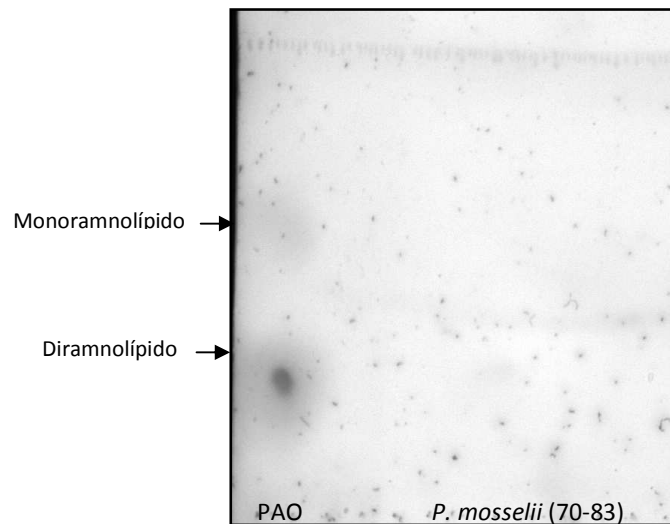


Figura 11. Cromatografía de los extractos para detectar ramnolípido en el banco de cepas de *P. mosselii*.

Además se escalo a 10L la producción de ramnolípido con la cepa de *P. aeruginosa* PAO1, las fracciones puras se concentraron para usarlas posteriormente como controles en el HPLC, para comparar posteriormente el ramnolípido producido por la *P. mosselii* CCC77 (ver figura 12).

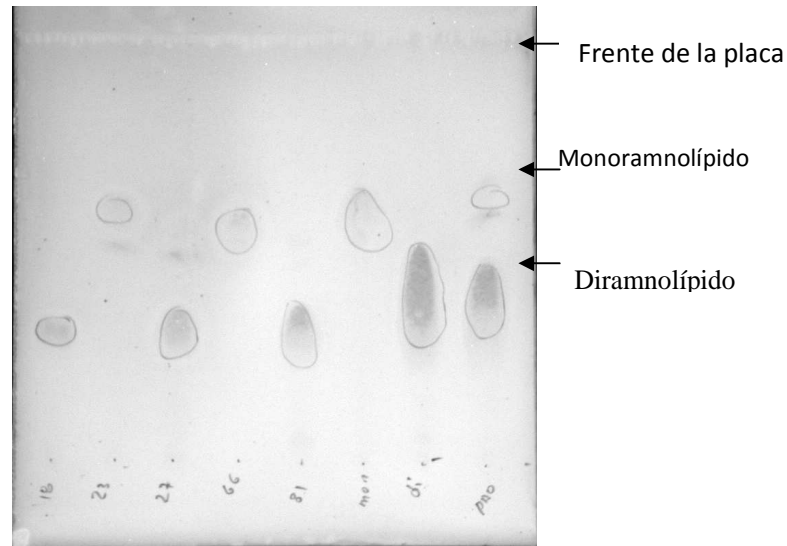


Figura 12. Cromatografía de las fracciones purificadas de los monoramnolípidos y diramnolípidos de *P. aeruginosa* PAO1, de un cultivo de 10L en PPGAS, 37°C, 24h.

Posteriormente se puso a crecer la cepa *P. mosselii* CCC77 en PPGAS con la finalidad de extraer ramnolípidos para purificarlo por HPLC y determinar el tipo de molécula con el espectro de masas. Lo que se obtuvo es que la cepa en las mismas condiciones probadas anteriormente no produjo ramnolípidos ni por el método de orcinol (detección de azúcares reductores), ni en placas de cromatografía.

Con los datos anteriores, creíamos que la cepa se pudo haber contaminado, entonces para resolver esto, se sacaron los gliceroles en medio mínimo (PPGAS/glucosa) y posteriormente se hicieron diluciones, esto con la finalidad de tener colonias aisladas, estas colonias fueron tomadas al azar con aplicadores de madera y se hicieron crecer en medio PSVW, con la finalidad de que hicieran halo como se muestra en la figura 13, después de una semana se analizaron las placas y se volvieron a sacar colonias (solo se incluyeron

aquellas con un halo bien definido) en caldo PPGAS y en PSVW. En el medio de PPGAS se incubaron a 30°C, 225 rpm durante 18-24 hrs, hasta obtener una D.O 600 nm de 1.5-1.8, se corrió a la par el control de la *P. aeruginosa* PAO1 (37°C). Estos cultivos se analizaron para ver la producción y estabilidad de la espuma (característica de los tensoactivos) y extraer y cuantificar azúcares reductores por el método de orcinol y además correr el extracto en placa de TLC. Los resultados obtenidos de este experimento fue que no hubo ramnolípidos en las clonas probadas.

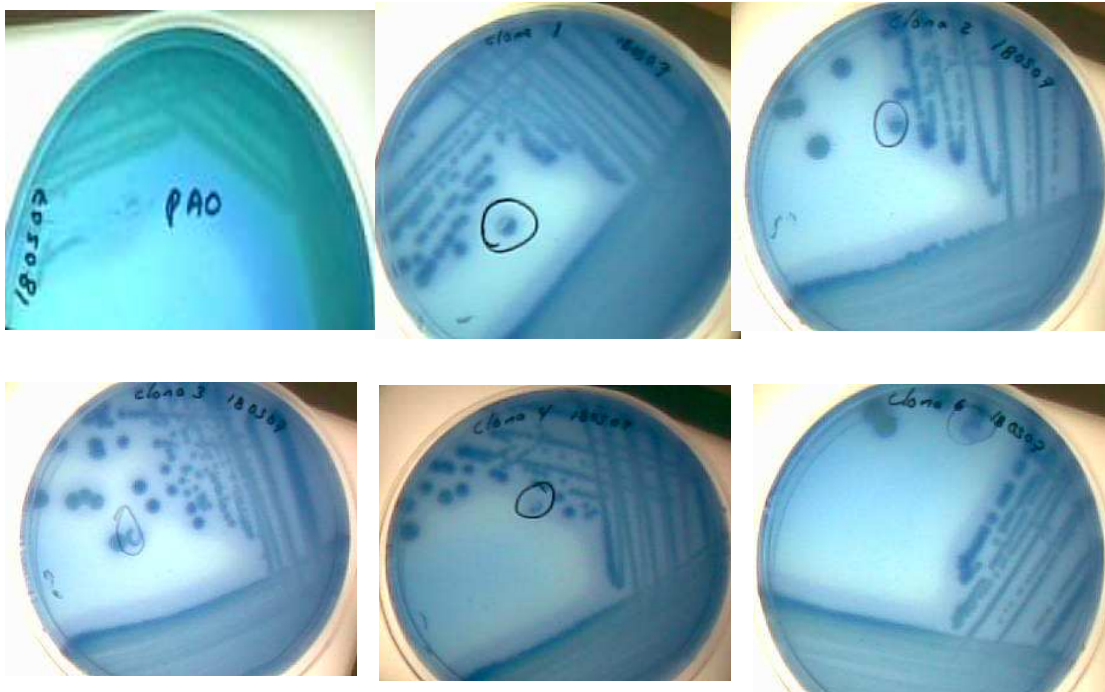


Figura 13. Clonas de la cepa CCC77, aisladas en medio PSVW.

Al tener estos resultados se fue a sacar la cepa del glicerol original (Laboratorio de Evolución Molecular y Experimental, Instituto de Ecología/UNAM) la sorpresa que nos llevamos fue que la cepa que desarrollo creció a 42°, produce pigmento verde (piocianina) esta cepa la denominamos CCC77B y por lo tanto produce ramnolípidos como se muestra en la figura 14, esto es porque se contaminó con *P. aeruginosa*. Además antes de volver a sacar esta cepa, la Dra. Ana Escalante, realizó un estudio de clonalidad en todo el banco, reportando a la cepa CCC77 como única en toda la colección en base a su patrón de restricción. Por lo tanto en la colección no se cuenta con otras cepas que compartan las mismas características.

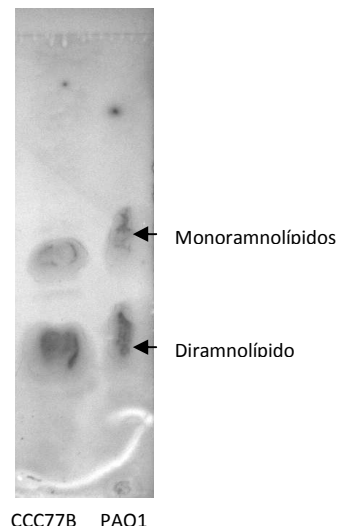


Figura 14; Análisis del TLC de las cepas CCC77B y PAO1, con las flechas se muestran la migración del mono y di-ramnolípidos.

Las clonas obtenidas en medio PSVW se hicieron crecer por separado en medio PPGAS y se observó producción de espuma con respecto al control, lo que nos sugiere que estas producen surfactante, entonces se volvieron a extraer y correr en placa de TLC, cambiando la fuente de carbono (manitol, glicerol), y no se observó ramnolípidos en las placas de TLC. Obteniendo estos datos optamos por cambiar el tiempo de cultivo de hasta las 48 horas, después de transcurrido este tiempo volvimos a hacer el mismo procedimiento de extracción y corrimiento de TLC y no se obtuvo ninguna banda que sugiriera la presencia del biosurfactante.

Al mismo tiempo se hicieron cultivos de la cepa CCC77, pero probando diversas condiciones de extracción partiendo de un volumen de 50 ml (cloroformo/metanol 1:1, cloroformo/ metanol 2:1, acidificando el sobrenadante hasta pH 2.0, y con éter). Los extractos se dejaron evaporar con aire en la campana de extracción. Después de que las muestras se evaporaron se resuspendieron en 500 µl de metanol. Se cargo, corrió y reveló la placa de TLC que contenía las muestras anteriores. Solo se observaron algunas manchas de color café que no migraron igual con respecto al control (manchas rosas), sugiriendo la ausencia del ramnolípido.

Por otro lado se cuantificaron los azúcares reductores de estas clonas, y obtuvimos alrededor de 120 µg/ml, cuando al inicio del proyecto se había obtenido aproximadamente 520 µg/ml.

Además nos enviaron una cepa de *P. aeruginosa* “marina” aislada de Chincholkhar del Laboratorio de Microbiología y Genética de la Universidad Louis Pasteur de Francia, para hacer la caracterización de los ramnolípidos. Esta cepa fue identificada por sus sideróforos (Fouad Dabboussi, *et al.* 2002), produce mono y di-ramnolípidos, produce el autoinductor 3-oxo-dodecanoil-homoserina lactona (C₁₂), y butanoil-homoserinalactona (C₄). En el laboratorio también se amplificó el gen de la exotoxina A, y se incluyeron en este estudio las 10 clonas de la cepa CCC77 con la finalidad de descartar aquellas que fueran positivas. Solo la *P. aeruginosa* “marina” y la PAO1 fueron las únicas positivas para el análisis de la exotoxina A.

Se amplificaron los genes *rhlA* y *rhlB* de *P. aeruginosa* PAO1 y las clonas de la cepa CCC77 y no amplificaron. Esto nos indica que la cepa es inestable para producir el biosurfactante, esto podría deberse a la transferencia horizontal de estos genes y que en el sistema acuático de CCC le confirió una ventaja sobre otros microorganismos, además como ya se comentó este metabolito secundario se produce en condiciones de estrés (bajo limitaciones de fósforo) (Souza V. *et al.* 2008), no en condiciones de laboratorio (donde se le dio una fuente abundante de carbono), quizás por ello la cepa perdió esa capacidad. Para poder demostrar la inestabilidad de la cepa se hizo un patrón de restricción de las clonas analizadas con la enzima EcoRI a 37°C durante una hora, se hizo la electroforesis en gel de agarosa al 1%, los datos obtenidos nos muestran que las clonas probadas tienen el mismo

patrón de corte, comparado con el DNA de la misma cepa CCC77 extraída al inicio de este proyecto, lo que demuestra que la cepa es inestable. Ver figura 15.

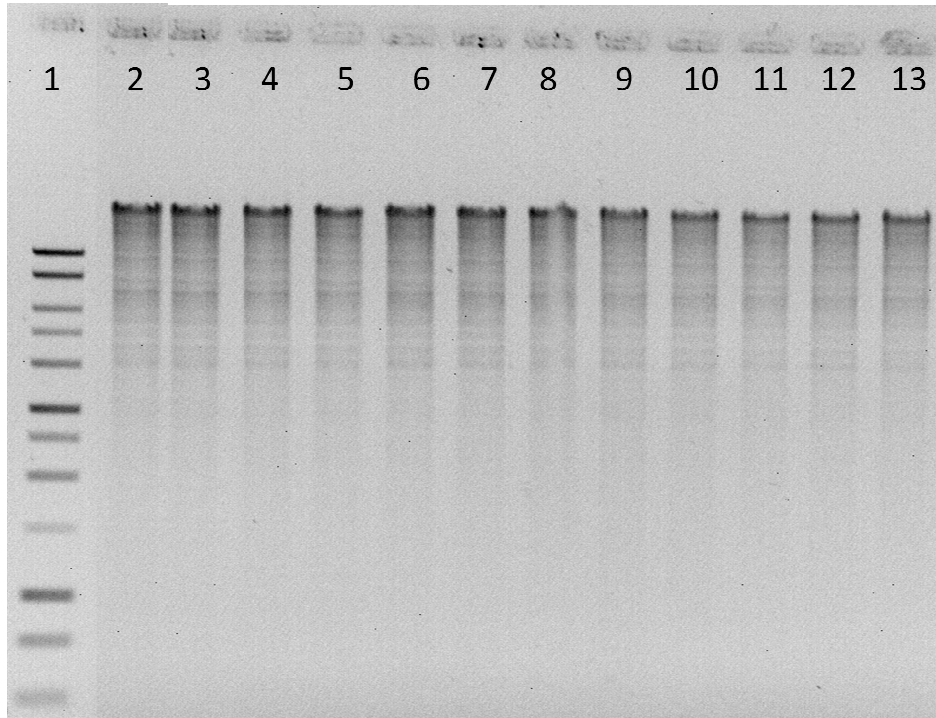


Figura 15: Digestión del DNA cromosomal de las clonas obtenidas en agar PSVW y la cepa CCC77, digeridas con 20U de EcoRI, y electroforesis en gel de agarosa 1.5%. Carril 1 Marcador de peso, carril 2.- 12 clonas y carril 15. Clona original CCC77.

Después de obtener los resultados anteriores; se hizo una curva de crecimiento y producción de tres clonas (77, 77A y 77B) en caldo PPGAS usando volúmenes grandes de 400 y 800 ml, incubados a 30°C, 225 rpm por 24 h. Las fracciones que se tomaron en diferentes tiempos de la curva, se extrajeron con éter y se cargaron en una placa para cromatografía. El resultado obtenido fue que ninguna de las clonas produjo el biosurfactante.

Se determinó el perfil de resistencia de las clonas, esto con la finalidad de hacer genética reversa, y así inducir la producción de ramnolípidos. (Tabla 4).

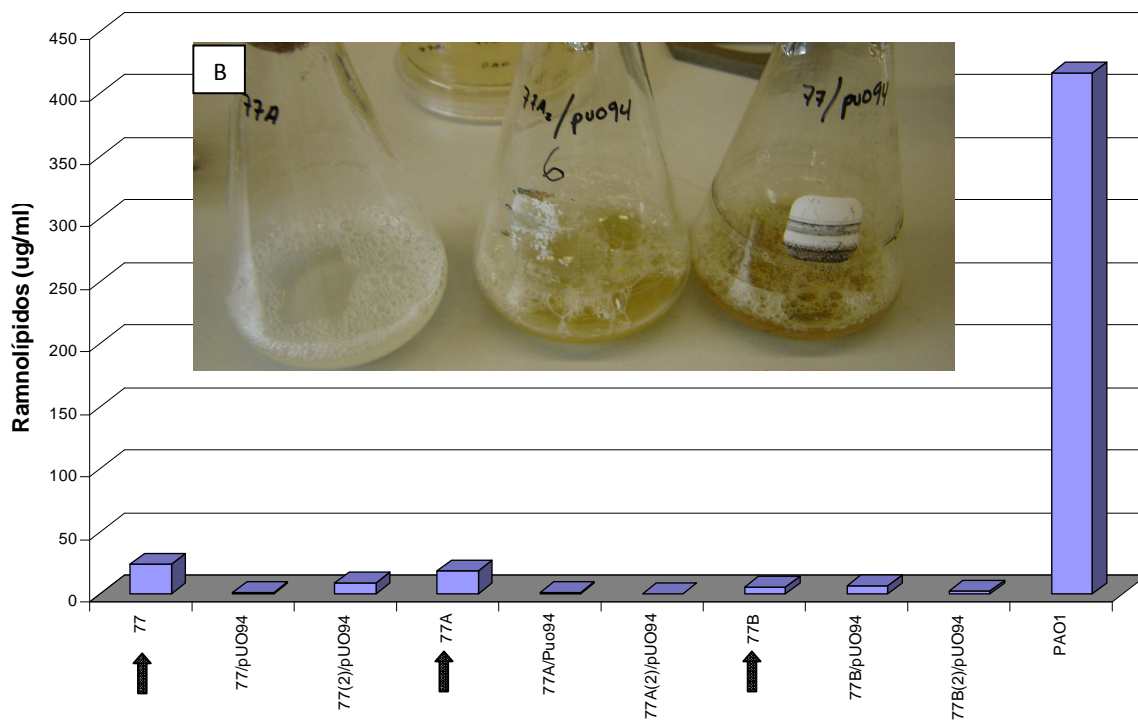
Tabla 4. Perfil de resistencia de las clonas CCC77.

Cepa	Tc ¹⁵⁰	Cb ⁶⁰⁰	C ⁵	C ¹⁰	C ²⁰	C ⁵⁰	C ¹⁰⁰	C ²⁰⁰
PAO1	R	S	R	S	S	S	S	S
CCC77	S	R	R	R	R	R	R	S
CCC77A	S	R	R	R	S	S	S	S
CCC77B	S	R	R	S	S	S	S	S

Tc, tetraciclina. Cb, carbenicilina. C, cloramfenicol. ($\mu\text{g/ml}$)

Con los datos de susceptibilidad, las cepas fueron transformadas con el plásmido pUO94 (Ochsner, U. A, *et al.* 1994) el cual contiene los genes del operón *rhlABR* responsables de la biosíntesis del ramnolípido y confiere resistencia a tetraciclina, en este experimento no fue posible usar a la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 como control por el inconveniente de la resistencia. Las clonas obtenidas se hicieron crecer en caldo PPGAS para cuantificar la producción de azúcares reductores (Ver grafica 1).

Grafica 1. ^aCuantificación de azúcares reductores en las clonas de la cepa CCC77 transformadas con pUO94.

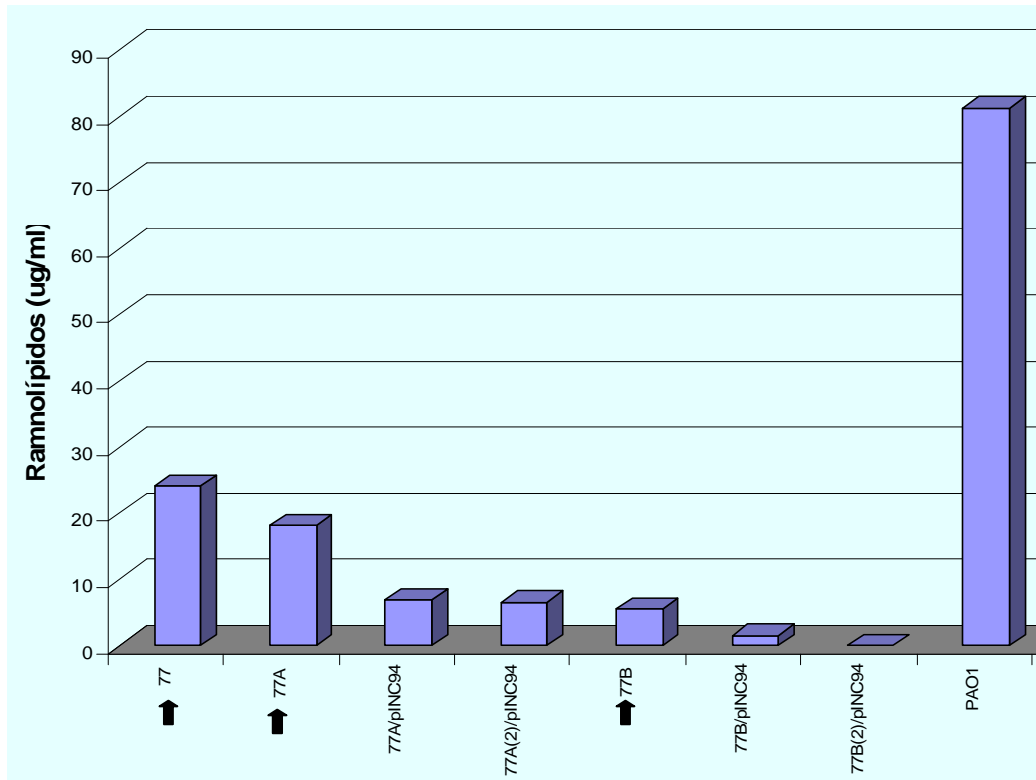


^aProducción de ramnolípidos (µg/ml) por la complementación con el plásmido pUO94 de las tres clonas de la cepa CCC77, clona CCC77, CCC77A y CCC77B con dos clonas transformadas cada una, se usó el extracto de la PAO como control positivo. Con las flechas se muestran las tres clonas usadas sin plásmido. B) Se muestra el cambio de fenotipo en la cepa sin y con el plásmido, además se observa la producción de espuma en las cepas complementadas.

Los resultados obtenidos del experimento anterior son los siguientes: a) No hubo incremento en la cuantificación de azúcares reductores de la cepa CCC77 silvestre con respecto a las clonas obtenidas, b) En las cromatografías realizadas no se observan las bandas que indican la presencia del ramnolípidos y c) Las clonas formaron biofilms alrededor del tubo.

Posteriormente se transformaron con el plásmido pINC94 (N. Cabrera *et al*, 2006) que también lleva los genes *rhlABR* y confiere resistencia a cloramfenicol. De las clonas obtenidas se cuantificaron los azúcares reductores y se corrieron las cromatografías. (Grafica 2).

Grafica 2. ^a Cuantificación de azúcares reductores en las clonas de la cepa CCC77 transformadas con pINC94.



^aProducción de ramnolípido (μg/ml) por la complementación con el plásmido pINC94 de las tres clonas de la cepa CCC77, clona CCC77, CCC77A y CCC77B con dos clonas transformadas (77A, 77B), se usó el extracto de la PAO como control positivo. Con las flechas se muestran las tres clonas usadas sin plásmido.

Los resultados obtenidos del experimento anterior son los siguientes: a) No aumento la concentración de azúcares reductores de la cepa CCC77 silvestre con respecto a las clonas obtenidas, b) En las cromatografías realizadas no se observan las bandas que indiquen la presencia del ramnolípido y c) Las clonas formaron biofilms.

Posterior a estos datos, se extrajeron los autoinductores para conocer la regulación de producción de biosurfactantes, se encontró que las tres clonas de la CCC77 no producen C_4 , pero si disminuyó la concentración de C_{12} como se muestra en la figura 16.

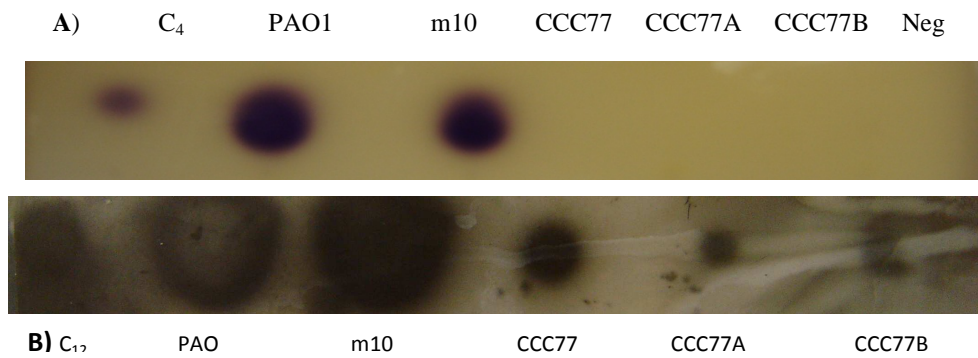
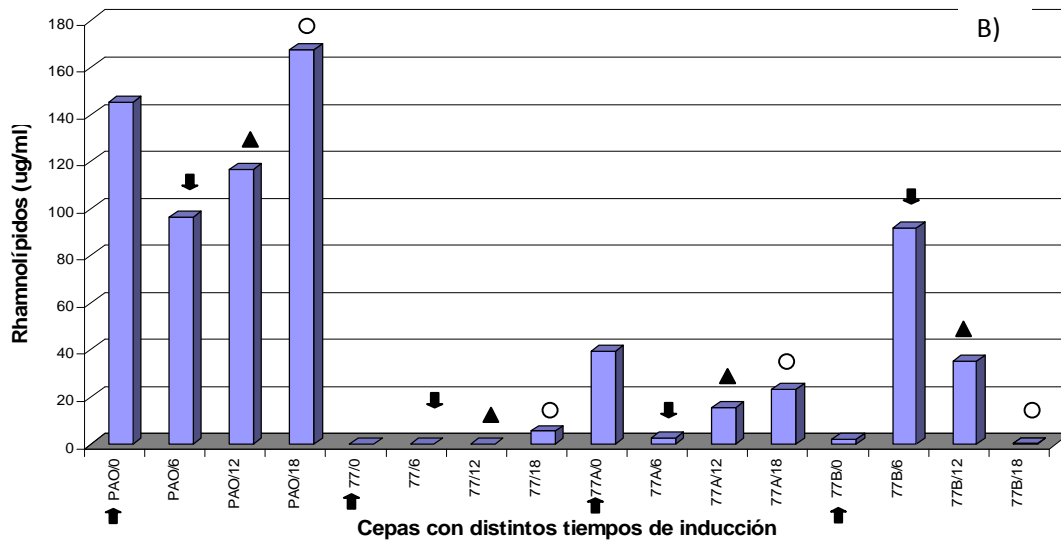
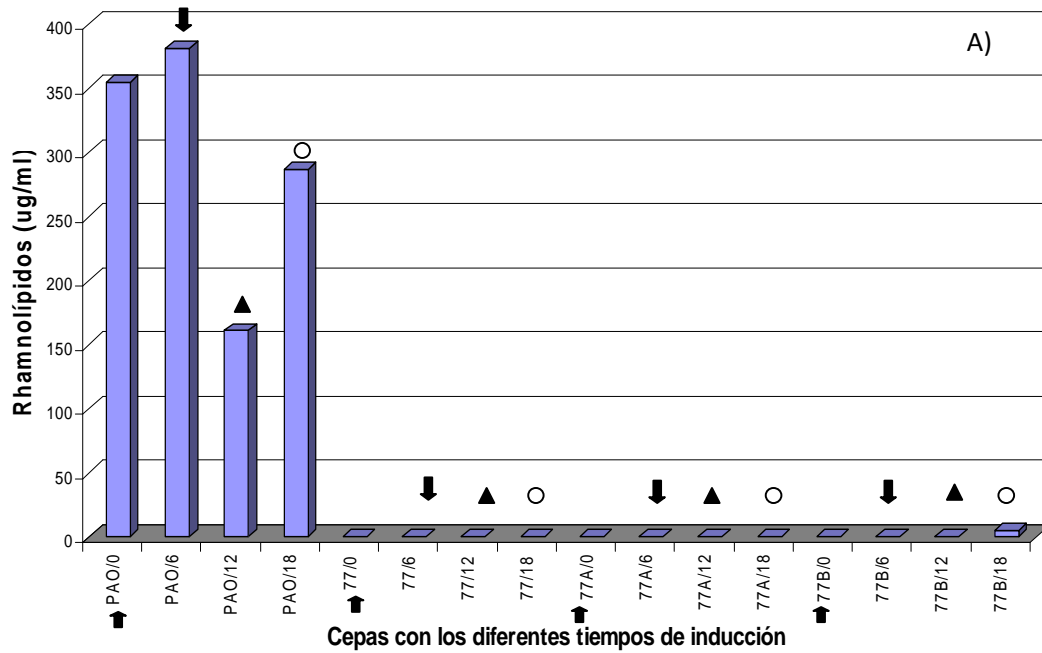


Figura 16. Extractos obtenido de las cepas *P. aeruginosa* PAO1, *P. aeruginosa* m10, CCC77, CCC77A y CCC77B, crecidas en PPGAS a 37° y 30°C, tomados a una DO_{600nm} de aprox. 1.5. Panel A) C_4 -HLS, usando *C. violacium* CV026, B) C_{12} -HSL, usando *E.coli* JM109/pSB1075

Después de obtener el dato de C_{12} , y sabemos que la regulación de QS depende del LasR + C_{12} para encender los genes involucrados en la biosíntesis de ramnolípidos. En base a esto, decidimos hacer una curva de crecimiento agregando 10 μ M de C_{12} en diferentes tiempos de cultivo; al tiempo 0, 6, 12 y 18 horas de cultivo. Después de transcurrido 24 y 48 horas se hicieron extractos y se cuantificaron azúcares reductores, se corrieron las cromatografías solo de aquellas muestras que resultaron positivas a la cuantificación. (Ver grafica 3, y figura 17).



Grafica 3. Curva de inducción con 10 μM de C_{12} en diferentes etapas de crecimiento, panel A) cuantificado a las 24 y panel B) cuantificado a las 48 h. Sobre la diagonal se muestra el tiempo de inducción de las tres clonas 77, 77 A y 77B. Se uso como control a la PAO1. Se muestra los t0 (\blacktriangledown), t6 (\blacktriangledown), t12 (\blacktriangle) y t18 (\circ).

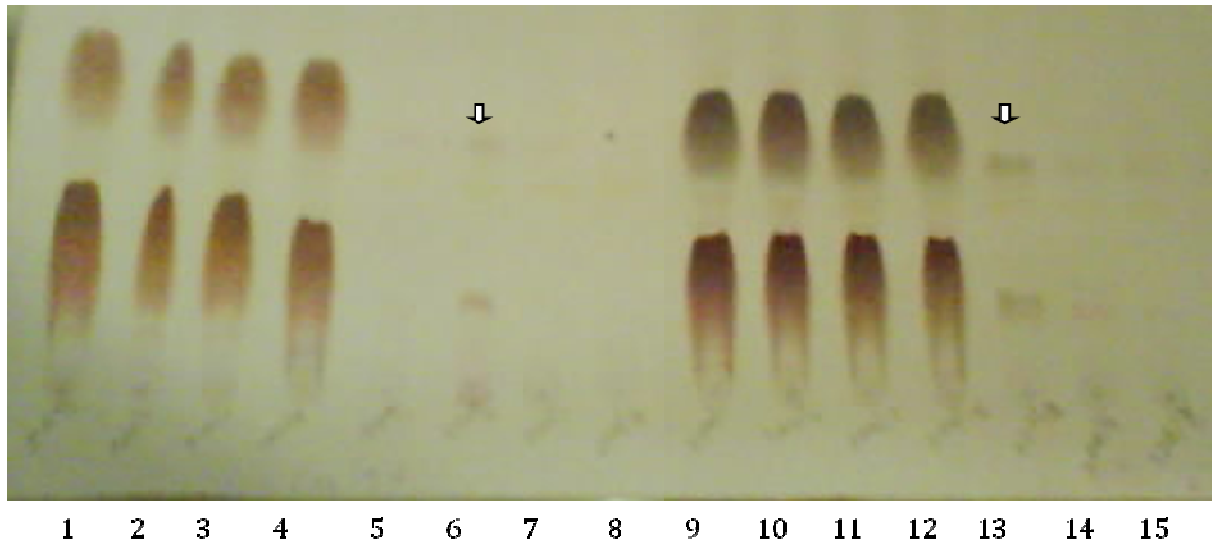


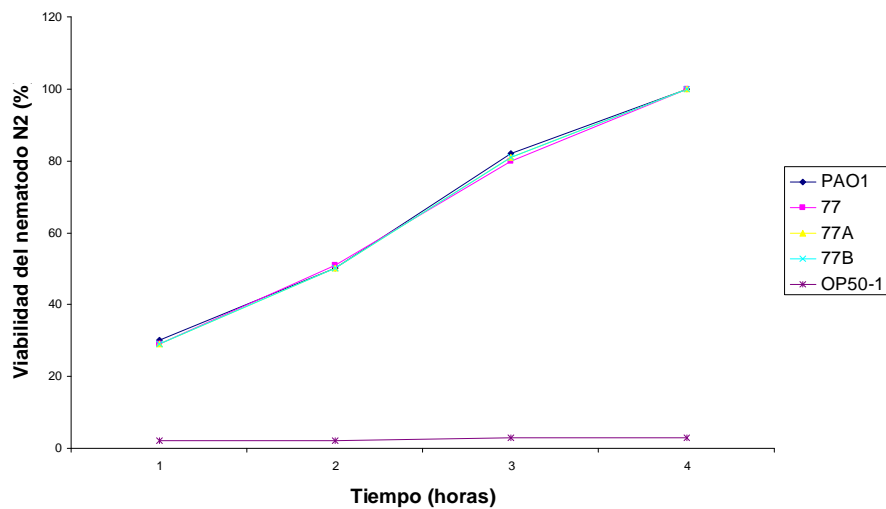
Figura 17. Cromatografía de la curva de inducción con $10 \mu\text{M}$ de C_{12} en diferentes etapas de crecimiento, en medio PPGAS extraído a las 24 y 48 horas. De izquierda a derecha (carril 1-4 representa el tiempo 0, 6, 12 y 18 PAO1; carril 5-8 incluye el tiempo 0, 6, 12 y 18 CCC77; carril 9-12 tiempo 0, 6, 12 y 18 PAO1 y carril 13-16 CCC77 tiempo 6, 12 y 18). en las flechas se marca la restauración del fenotipo después de 6 h de inducción en esta clona.

En este experimento se restaura el fenotipo de ramnolípidos a las 6 horas de inducción. Posteriormente se realizó otra curva de inducción a tiempos más cortos a 5, 6 y 8 horas, con diferentes concentraciones de C_{12} (10 , 20 y $40 \mu\text{M}$), midiendo el crecimiento bacteriano a 600 nm , se corrieron las cromatografías después de 24, 48, 72 h y hasta el día 7 de inducción. El resultado obtenido no fue favorable. En la cual se demostró de nuevo la inestabilidad en la producción de ramnolípido.

Al mismo tiempo se hicieron las pruebas de emulsificación en diesel para determinar la E_{24} . La PAO1 emulsifica el 60% del diesel y la cepa CCC77A solo el 25 %.

Además estas clonas se hicieron crecer en agar PPGAS + aceite mineral, glucosa y diesel. Las clonas CCC77 y CCC77B crecen en las tres fuentes de carbono. Solo la CCC77A no desarrolla en diesel como fuente de carbono. Además se aplicó el método de la gota colapsada y el resultado nos indica que la cepa produce un biosurfactante que reduce la tensión superficial, pero no ramnolípido como se había observado al inicio del estudio.

Por otro lado se hizo el ensayo de parálisis de *C. elegans* N2 con *P. aeruginosa* PAO1, y las clonas CCC77, CCC77A y CCC77B respectivamente, el resultado que se obtuvo fue que todas las cepas resultaron ser patógenas para el nemátodo por este método. (Ver grafica 4 y figura 18).



Grafica x. Ensayo de parálisis de *C. elegans* N2 por *P. aeruginosa* PAO1, CCC 77, CCC77A y CCC77B.

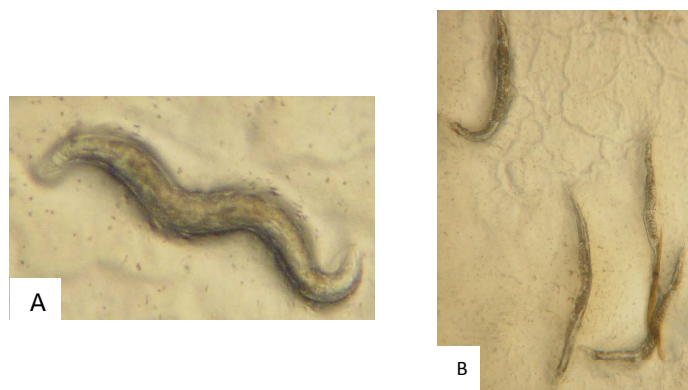


Figura 18. Ensayo de parálisis de *C. elegans* N2 por *P. aeruginosa* PAO1 y CCC77, CCC77A y CCC77B. panel A; *C. elegans* N2 no paralizado y panel B; *C. elegans* N2 paralizado.

El ensayo de parálisis del nemátodo, consiste en la acumulación de las bacterias en el intestino del gusano y por mecanismos de QS regulados por LasR o RhlR, el cual regulan la expresión de diversos factores de virulencia, donde el cianuro de hidrógeno (codificado por el operón *hcnABC*) es el principal responsable de la muerte del nemátodo por asfixia y así mismo causa la parálisis (Mahajan-Miklos *et al.*, 1999), por lo tanto suponemos que la cepa CCC77 también es capaz de producir HCN.

La muerte rápida del nemátodo es mediada por la producción también de factores de virulencia como son las fenacinas (Allison Adonizio *et al.*, 2008; Mahajan-Miklos *et al.*, 1999). En el cual observamos que solo el 25% de los gusanos se murieron en las primeras 4h, a diferencia del control que el 100% se reportaron muertos en la primera hora de transcurrido el experimento. Este resultado nos indica que la cepa CCC77 no produce fenacinas, y por lo tanto no se considera patógena en este modelo. La muerte del nemátodo mediada por fenacinas fue descrito en *P. aeruginosa* PA14 en la cual la patogenicidad de este microorganismo involucra la secreción de toxinas difusibles, dentro de estas toxinas se hayan las fenacinas, en el análisis molecular revelan que la asociación entre la producción de pigmentos y la patogénesis, es una regulación coordinada de producción de pigmentos y de toxinas por factores regulatorios globales. En otro experimento hallaron que mutaciones en los genes biosintéticos *phnAphnB*, los cuales codifican dos subunidades de antranilato sintetasas específicas de fenacinas, estas mutantes presentan reducida su virulencia en el nemátodo (Shalina Mahajan-Miklos *et al.* 1999).

5.5.11. CONCLUSIÓN ETAPA I:

La bacteria proveniente del banco de cepas del género *Pseudomonas* sp CCC77 del Laboratorio de Evolución Experimental del Instituto de Ecología, se identificó en base a su secuencia del 16S rDNA con una homología del 99.7% con *P. mosselli*, y que además tenía la capacidad de producir el biosurfactante ramnolípido como la cepa de *P. aeruginosa* PAO1 y en base a las pruebas de patogenicidad empleadas se determinó que la cepa no era patógena, y la producción de este ramnolípido quizás estaba regulado por LasR unido a su autoinductor el C₁₂, por lo tanto era una muy buena alternativa para usarla en ensayos y aplicaciones en biotecnología, pero resultó ser inestable en la producción, por lo cual creemos que los genes de producción de ramnolípidos probablemente se encontraban

codificados en un plásmido y que la cepa lo haya perdido y con ella su capacidad de producción, por lo cual decidimos volver a muestrear el punto en el cual fue aislada la cepa para ver si se podía recuperar o en su defecto cambiar de proyecto.

5. ETAPA II

AISLAMIENTO, IDENTIFICACIÓN Y PRODUCCIÓN DE BIOSURFACTANTES POR *Pseudomonas* sp M9b, M9c y CCB10 aisladas del Valle de Cuatro Ciénegas Coahuila.

6.1 Objetivo general: Caracterizar los biosurfactantes producidos por *Pseudomonas* sp M9b, M9c y CCB10 aisladas de CCC.

6.2 Objetivos particulares:

1. Caracterizar fisicoquímicamente el biosurfactante producido por *Pseudomonas* sp.
2. Identificar filogenéticamente las cepas de *Pseudomonas* sp M9b, M9c y CCB10 productora de biosurfactante.
3. Determinar la patogenicidad de la cepa productora de biosurfactante.

6.3. Material y Métodos: Aislamiento de las muestras:

En julio de 2007 se volvieron a tomar muestras de agua del manantial de los sitios MAN9 y MAN10 para recuperar la cepa CCB77, siguiendo las indicaciones antes mencionadas.

Para el aislamiento de las *Pseudomonas* de las muestras de agua de los dos sitios del manantial de CCB (Souza *et al.*, 2006) fueron plaqueadas en agar GSP. Las bacterias productoras de biosurfactantes fueron detectadas por un halo transparente alrededor de las colonias en medio PSVW (Marina Wild *et al.*, 1997).

6.3.1 Determinación de la actividad biosurfactante:

La producción de biosurfactante fue determinada por la capacidad de emulsificación (E_{24}) usando diesel como fase orgánica (Cooper and Goldenberg, 1987). En 3 ml de diesel fueron

añadidos 2 ml del sobrenadante de un cultivo de 24h en caldo PPGAS, esta prueba se hizo en un tubo falcón de 15 ml, el tubo fue vortexeado a alta velocidad por 2 min. La estabilidad de la emulsión se midió después de 24 h de reposo a temperatura ambiente y el E_{24} se estimó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$E_{24} = \frac{h}{h_T} (100)$$

h = altura de la fase emulsificada

h_T = altura total de las fases (hidrofóbica + emulsificada + acuosa)

Se realizó la prueba de hemólisis en agar sangre de carnero al 5% e interpretada después de las 24 h de incubación. El método de la gota colapsada también fue usado como una prueba rápida de producción de biosurfactante (Jain *et al.*, 1991). Se incluyó la prueba de producción y estabilidad de espuma en el medio PPGAS.

6.3.1.1 Extracción del biosurfactante:

El biosurfactante como extracto crudo, se obtuvo del sobrenadante a partir de un cultivo de 24h en PPGAS, se ajustó a un pH de 2.0 (Nielsen *et al.*, 1999; Sulbarán Mora *et al.*, 2005). El medio acidificado se puso en contacto con un volumen igual de acetato de etilo en un embudo de separación y se extrajo 2 veces. Después de la separación la fase orgánica fue evaporada a sequedad en un Rotavapor Buchi 461, a las condiciones especificadas para cada solvente. Se recuperó el extracto resuspendiendo en metanol y filtrando en algodón si presentaban precipitados insolubles. Para probar la eficacia de la extracción se realizaron pruebas de espumación y E_{24} al medio agotado después de la extracción y al extracto obtenido.

6.3.1.2 Fraccionamiento en placa preparativa: El extracto crudo o fracción del mismo se aplicó en placa preparativa de cromatografía (SIL G-200, Macherey –Nagel), para su fraccionamiento. La cantidad de muestra aplicada en la placa fue de 250 mg disueltos en aproximadamente 1 ml de metanol. Una vez aplicada la muestra en la placa se eluyó en una mezcla de solventes, la mezcla base inicial fue cloroformo/metanol/agua en proporción

65:15:2 y se reveló una porción de la misma con 4 -metoxibenzaldehído (Touchstone, 1983; Sim *et al*, 1997).

Las fracciones se obtuvieron raspando la placa preparativa y se re suspendieron en una mezcla de acetato de etilo/metanol (50:50). La mezcla se mantuvo en agitación suave y constante por toda la noche, posteriormente se separó la sílica mediante filtración. (Zavala, 2008). La mezcla de solventes correspondiente a cada fracción se evaporó en rotavapor a sequedad. Se recuperó cada fracción y se resuspendió en metanol y posteriormente se filtraron en algodón si presentaban precipitados insolubles.

6.3.2 Identificación filogenética: Amplificación de genes, y secuenciación:

Para estudiar la variación y estructura genética de las poblaciones de *Pseudomonas* se amplificaron, y secuenciaron dos genes: *gyrB* y *recA*, además de 16S rRNA para la asignación taxonómica de cada grupo.

Para la amplificación por PCR se realizaron reacciones (50 µl) que contenían, para el gen 16S rRNA: 1X de Buffer para PCR (Invitrogen), 2 mM MgCL₂, 0.8 mM dNTPs, 0.3 µM de cada oligonucleótido y una unidad de *Taq* polimerasa, y para los genes *gyrB* y *recA* 1X de Buffer para PCR (Invitrogen), 2 mM MgCL₂, 0.8 mM dNTPs, 1 µM de cada oligonucleótido y una unidad de *Taq* polimerasa. Utilizando un termociclador MJ Research (Watertown, MA, USA), se siguió el siguiente patrón de temperaturas para todas las amplificaciones: 10 min a 95°C, siguiendo con 30 ciclos de 1 min a 94°C seguido de 40 s – 1min a 60°C para *gyrB*, *recA* y 50°C para *rDNA 16S*, y 2 min de extensión a 72°C, por último un ciclo de extensión final a 72°C por 10 min. Las temperaturas de alineamiento y las secuencias de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los distintos genes se muestran en la tabla 5.

16S rDNA: Es un marcador molecular ampliamente utilizado para establecer relaciones filogenéticas especialmente en bacterias, e incluso en la delimitación de especies (Woese 1987, Woese *et al.* 1990, Stackebrandt and Goebel 1993). Corresponde a la parte del DNA que codifica a la subunidad pequeña del rRNA.

El uso de este marcador se ha difundido mucho pues aparentemente un valor de similitud del 97% en la secuencia completa de este gen correlaciona bien con un 70% de identidad en todo el genoma revelado por experimentos de reasociación de DNA-DNA, ambas medidas han sido establecidas como valores estándar para delimitar especies en bacterias (Wayne *et al.* 1987, Stackebrandt and Goebel 1993).

Todos los productos de PCR fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa, para cortar la banda de interés y limpiarla se utilizó el kit QIAquick gel extracción kit (Qiagen, Valencia, CA, USA). Los productos de PCR limpios fueron enviados para la secuenciación.

Las reacciones de secuenciación se realizaron utilizando reactivos de Applied Biosystems y corridos en un secuenciador ABI 3100- Avant Prism (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Para todos los genes se utilizaron los primers usados en el PCR, y para el gen 16SrRNA se utilizaron también los primers internos: 530F, 790F, 357R, 530R y 981R (tabla 2).

Tabla 5: Secuencia de los oligonucleótidos utilizados para la amplificación por PCR de los genes *gyrB*, *recA* y 16S rRNA.

Amplicón	Primer	Tm (°C)	Secuencia (5'-3')	pb	Tamaño amplicón	Referencia
<i>gyrB</i>	gyrB-F	60	ACCAYGSNNGGNGNAART TYRA	22	1000 pb	Modificado de Yamamoto <i>et al.</i> 2000
	gyrB-R	60	AGTGCNNGRTCYTTYTCY TGRCA	23		
<i>recA</i>	recA-F	60	CAGATCGAAMRNCARTTCGG	20	900pb	Escalante, 2008
	recA-R		YTTRCCCTGDCCGATCTT	18		
16S rRNA	27F	50	AGAGTTTGATCCCTCAG	17	1450	Sacchi <i>et al.</i> , 2002
	1492R		ACCTTGTTACGACTT	15		

6.3.2.1 Ensamble y edición de datos de secuencias:

Las secuencias completas de cada gen se ensamblaron y revisaron con la ayuda del software PhredPhrap y Consed (Gordon *et al.* 1998, Gordon *et al.* 2001, Escalante, 2008). Las secuencias del gen 16SrRNA se alinearon con las secuencias más parecidas

encontradas en la base de datos del gen ribosomal (Ribosomal Database Project II o RDPII <http://rdp.cme.msu.edu/>) con las secuencias más parecidas del GenBank (NCBI database). La alineación de las secuencias del gen 16SrRNA se hizo con MUSCLE (Edgar., 2004) y revisada con NAST (DeSantis *et al.* 2006). La alineación de las secuencias del resto de los genes se hizo con DAMBE 4.5.50 (Xia and Xie 2001) utilizando como base el alineamiento de aminoácidos para alinear sobre estas las secuencias de nucleótidos. Las secuencias alineadas automáticamente fueron revisadas manualmente. (Escalante, 2008).

6.3.2.2 Relaciones filogenéticas:

Con el objetivo de visualizar las relaciones filogenéticas entre las distintas cepas estudiadas, se evaluó el modelo de sustitución nucleotídica más adecuado para cada gen usando Modeltest implementado en el software 68 PAUP* (Swofford, 2002). Para cada gen, y bajo el modelo de sustitución correspondiente, se calcularon matrices de distancia genética. Con esta información, se generaron árboles por Neighbor-Joining (Saitou and Nei 1987) y análisis tipo Bootstrap (1000 réplicas) para representar las relaciones evolutivas moleculares entre las cepas analizadas para cada uno de los tres genes (16SrRNA, *gyrB* y *recA*), usando el software MEGA 3.1 (Kumar *et al.* 2004).

6.3.2.3 Perfil de proteínas totales:

La preparación de las proteínas totales de todos los aislamientos (M9b, M9c, CCB10, *P. koreensis* LMG 21318^T, *P. umsongensis* LMG 21317^T, *P. jessenii* CIP 105274 y *P. putida* F1), el ensayo de SDS-PAGE fue hecho descrito previamente (Estrada de los Santos *et al.*, 2001).

6.3.2.4 Hibridación DNA: DNA:

Para clarificar las relaciones taxonómicas a nivel de especie, se hicieron los experimentos de hibridación DNA: DNA descrita previamente (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001); el cual es basado en los niveles relativos de hibridación marcados el DNA con ³²P con *P. koreensis* M9b. El ensayo de hibridación DNA: DNA fueron hechas con otros dos aislamientos obtenidos del manantial del CCB (M9c y CCB10) y con el aislamiento tipo de *P. koreensis* LMG 21318^T, *P. umsongensis* LMG 21317^T, *P. jessenii* CIP 105274 y *P. putida* F1. La manipulación del DNA fue realizado por los estándares reportados por Sambrook *et al.*, 1989.

6.3.2.5 Análisis de ácidos grasos:

Para identificar cualitativa y cuantitativamente los ácidos grasos, los aislamientos M9b, M9c, CCB10 y *P. koreensis* LMG 21318^T, fueron cultivadas en LB por dos días a 30°C. La composición de ácidos grasos fue determinada usando cromatografía de gas y el análisis de ácido graso metil ester (FAME), fue determinada con Sherlock 4.5 Microbial Identification System (Microbial ID, Newark, DE, USA).

6.3.2.6 Tamaño del genoma:

Para determinar el tamaño del genoma de las cepas de *Pseudomonas* sp, (J S Hector and A R Johnson. 1990) se empleo el método de Electroforesis en Gel por Campos Pulsados (PFGE por sus siglas en ingles). La purificación de DNA se hizo a partir de un cultivo puro en caldo LB, las células se cosecharon por centrifugación a 13,000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Posteriormente se lavaron con solución salina-Tris (NaCl 1M, Tris 0.01M pH 8.0), y se resuspendieron en 440 µl de la misma solución. Posteriormente se mezcló la suspensión con un volumen igual de agarosa (Sea Plaque GTC, bajo punto de fusión, Bioproductos Rockland, Maine USA) en 1.5% de solución salina -Tris; con la mezcla obtenida se impregnaron discos (20µl) y se dejaron enfriar a temperatura ambiente, después se trataron con solución de lisis (Tris 6 mM pH 8.0, NaCl 1M, EDTA 0.1M pH 8.0, desoxicolato de Na 0.1%, Sarcosyl 0.5%, 50 µl/ml de RNAsa, 100 µg/ml de lisozima, 50 µg/ml de lisostafina) y se incubaron a 37°C durante 3 horas. Se decanto la solución de lisis y se agrego la solución ES (EDTA 0.5M pH 9.0, Sarcosyl 1%) mas 1.0 mg/ml de proteinasa K se incubó durante 18 horas. La solución ES se decantó y se lavaron los discos con solución amortiguadora TE (Tris 1M pH 7.5, EDTA 0.5M pH 8.0) en agitación suave durante 1 h a temperatura ambiente, por 4 veces continuas. Después se llevo a cabo la digestión del DNA con 30U de enzima *CeuI* (New England Biolabs, United Kingdom), durante 22 horas. Posteriormente se separaron los fragmentos del DNA por electroforesis de campos pulsados, en un sistema de electroforesis (Laboratorios BioRad CHEF-DR2, Ontario, Canadá), empleando geles de agarosa al 1.5% en amortiguador de TBE 0.5X (Tris base 45mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 1mM pH 8.0) a voltaje de 11 V/cm, con pulsos de cambio de linearidad de 5 a 40 segundos, a 16 °C, durante 12 horas y de 1 a 100 segundos

por 18 horas. Se uso como marcador de peso molecular el genoma de *E. coli* K12, *P. aeruginosa* PAO1, *P. putida* K2440. Posteriormente los geles se tiñeron con bromuro de etidio y se visualizaron con luz UV. Para determinar el peso molecular del genoma, se analizaron los perfiles de corte con respecto a las cepas tipo.

6.3.3 EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD DEL EXTRACTO CRUDO Y ENSAYOS DE COMPETENCIA.

6.3.3.1 Determinación de la toxicidad o antibiótica del extracto crudo:

El extracto crudo obtenido con acetato de etilo (EACSE), se obtuvo a partir de un cultivo de 24h de *Pseudomonas koreensis* M9b en PPGly (PPGAS con glicerol 0.5% v/v). La toxicidad o efecto antibiótico fue determinado midiendo el efecto del crecimiento de diferentes microorganismo en medio LB a 37°C, en la cual se incluyeron *Exiguobacterium aurantiacum* m5G, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Serratia liquefaciens* ATCC 27592, *Salmonella typhi* ATCC 19430 y *Escherichia coli* ATCC 25922. El EACSE fue adicionado a estos microorganismos cuando iniciaron la fase logarítmica de crecimiento a una concentración final igual a la producida por *P. koreensis* M9b después de 24h de crecimiento en medio PPGly a 30°C. El crecimiento fue monitoreado midiendo la densidad óptica a 600 nm, se hizo en presencia y ausencia del EACSE. Por triplicado en dos ensayos independientes.

6.3.3.2 ENSAYOS DE COMPETENCIA: Procedimiento microbiológico:

Las bacterias fueron cultivadas de rutina en medio 10ml de Luria Bertoni (LB), durante toda la noche a 30°C, 225 rpm. Después de transcurrido este tiempo se midió la DO a 600

nm, para después inocular otros 5 ml de LB, se incubaron a 30°C, 225 rpm hasta llegar a una densidad óptica de 0.4 – 0.5 a 600 nm (el cual contiene aproximadamente 50×10^6 de UFC/ml). El ensayo de competencia fue hecho en PPGly, los cultivos bacterianos fueron incubados en líquido a 30°C, 225 rpm durante 24h. Para determinar si la producción del BS representa una ventaja selectiva del linaje de *P. koreensis* aisladas de CCB, se puso a crecer las cepas aisladas de CCB (M9b, M9c, CCB10 y LMG 21318^T) con *E. aurantiacum* m5G como competidor. Se hicieron dos experimentos independientes.

Para validar la capacidad de establecer competencia-interferencia de los aislados de *P. koreensis* CCB, con *E. aurantiacum* m5G es su capacidad de producir biosurfactante, el cultivo de *P. koreensis* LMG 21318^T se suplemento con el extracto crudo EACSE de la *P. koreensis* M9b (a una concentración media de la que produce M9b después de 24h de crecimiento en PPGly, este extracto fue añadido después de las 10 h de crecimiento en medio PPGly y se determino su capacidad de establecer competición por interferencia contra *E. aurantiacum* m5G.

Para determinar si la habilidad para establecer una competencia – interferencia de *P. koreensis* M9b con *E. aurantiacum* m5G, es dependiente de la densidad celular o la frecuencia de células, se llevaron a cabo dos sets de experimentos descritos por Grieg and Travisano, 2008. En el cual el primero consistía fijando el tamaño del inóculo de la cepa M9b (aproximadamente 4×10^7 UFC/ml) y variando el número de células del *E. aurantiacum* m5G hasta alcanzar la proporción deseada. En el segundo experimento el número de células M9b al inicio del cultivo también fue modificada con respecto a la cepa m5G.

Se determino la capacidad antibiótica del EACSE de 24h de crecimiento en medio PPGAS de todas las *P. koreensis* sobre *E. aurantiacum* m5G y *B. subtilis* ATCC 6633, todos los cultivos partieron de una DO 600nm de aproximadamente 0.03 e medio LB crecidas a 30 y a 37°C respectivamente por 12 h.

6.3.3.3 Formación de biofilms:

Se determino la capacidad de formar biofilms en medio líquido (Cabellos Avelar T *et al* 2006), las cepas se hicieron crecer en caldo LB durante 18h a 30°C y en agitación

constante. Posteriormente, de los cultivos crecidos se inocularon alícuotas de 10 μL en 3 ml de medio LB, hasta llegar a una DO de 600 nm de aproximadamente 0.3, posteriormente se inocularon 130 μL ($\sim 3 \times 10^5$ UFC/ml) en pocillos de placas microtiter de polietileno no tratadas para cultivo celular y con fondo plano (Greiner Bio-one, Stuttgart, Alemania) que se incubaron en condiciones estáticas a 30°C durante 18 horas. Se utilizó en dos pocillos caldo LB no inoculado como control negativo y como control positivo se usó a la cepa PAO1.

Después de la incubación los caldos fueron aspirados, los pocillos lavados con 150 μL de agua destilada y las placas se secaron a 35,5°C durante 20 minutos. Las biopelículas adheridas en los pocillos fueron tenidas con 130 μL de cristal violeta al 1% durante 5 minutos, después el colorante fue retirado y los pocillos lavados 4 veces con 150 μL de agua destilada. Seguidamente las placas se dejaron secar a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se añadió 130 μL de etanol absoluto a cada pocillo y se realizaron lecturas de las $\text{DO}_{570\text{nm}}$ a los cinco minutos. Se calculó el % de formación de biofilms, en base a la concentración del colorante adherido al pocillo.

6.3. 4 PRUEBA DE PATOGENICIDAD:

6.3.4.1 Ensayo para medir la dosis mínima letal de *P. koorensis* LMG 21318^T, *P. korensis* M9b, M9c y CCB10 en ratones BALB/C ANn

Se sembraron las bacterias en medio LB toda la noche, se tomó una alícuota de este cultivo y se resembró en medio fresco, el tiempo de incubación dependió del crecimiento de cada bacteria (*P. koorensis* LMG21318^T 1 h, M9b, M9c y CCB10 2.5 h), posteriormente se midió la absorbancia y se hicieron los cálculos necesarios para administrar en el peritoneo del ratón 100 μL con 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5 UFC/ml, los ratones fueron pesados antes de la infección y diario durante 5 días y posteriormente cada 2 hasta 15 días.

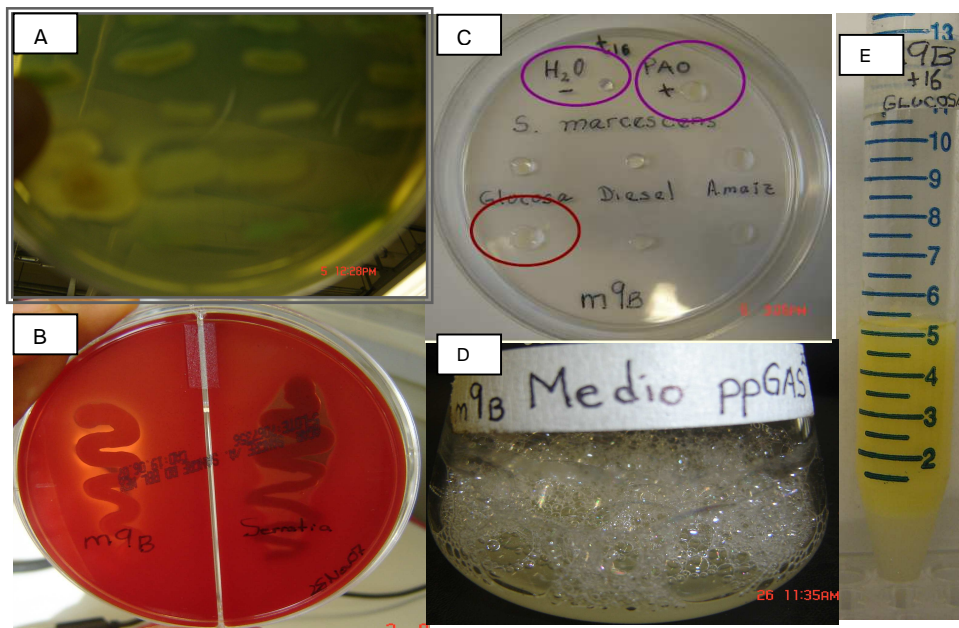
6.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN ETAPA II:

a) Caracterización taxonómica de las cepas de *Pseudomonas* sp M9b, M9c y CCB10:

Las cepas de *Pseudomonas sp* M9b y M9c se aislaron del sitio 9 del manantial (MAN9) del sistema Churince del Valle de CCC por su capacidad de producir biosurfactante en julio de 2007 (en este estudio se aislaron aproximadamente 230 *Pseudomonas*, de las cuales se les hizo el screening para la producción de biosurfactantes). Además el aislamiento CCB10 fue donado por la Biol. Alejandra Rodríguez (Rodríguez Verdugo 2008,) y fue aislado en la Laguna Grande del mismo sistema Churince en enero de 2004, y es parte del estudio de las especies más abundantes de *Pseudomonas sp* presentes en ese cuerpo de agua.

Estas bacterias desarrollan a 30°C. Las pruebas que se realizaron para determinar la producción de biosurfactantes fue: hemólisis en agar sangre, producción y estabilidad de la espuma, la gota colapsada y el índice de emulsificación del diesel después de las 24h (E₂₄), ver figura 19.

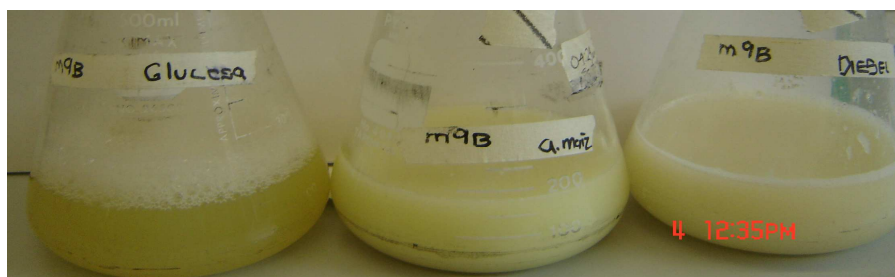
Figura 12. Pruebas de screening de la cepa M9b donde se muestra la producción de biosurfactante.



A) Producción de halo en medio PPSW, B) Hemólisis en agar sangre, C) Ensayo de la gota colapsada, D) Producción de espuma en medio PPGAS y E) E₂₄.

Además la cepa M9b tiene la capacidad de crecer en medio de PPGAS con glucosa, aceite mineral y diesel como fuente de carbono. Dentro de estos resultados la fuente más preferida de este microorganismo es glucosa, diesel y el aceite de maíz, como se muestra en la figura 20.

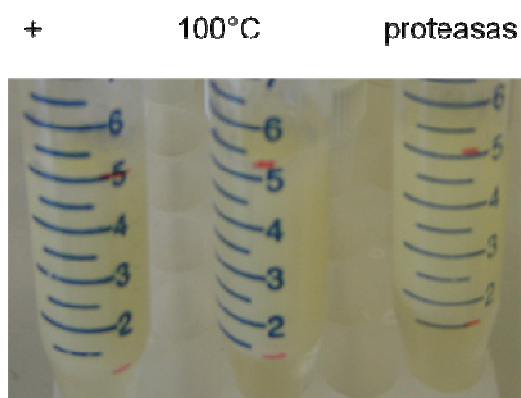
Figura 20. Desarrollo de la cepa M9b en diversas fuentes de carbono



En base a los datos obtenidos de hemólisis, gota colapsada, E₂₄ y la prueba de espuma positivas, se busco identificar el biosurfactante si pertenecía al grupo de los glicolípidos como es el caso del ramnolípido. Para detectar o determinar si era ramnolípido, se extrajo el sobrenadante con éter y se midieron azúcares reductores, y se buscó amplificar los genes involucrados en la biosíntesis de ramnolípido.

Las pruebas de azúcares reductores resultaron negativas, no amplificaron los genes *rhlABR*, ni los genes involucrados en la biosíntesis de ramnosa *rmlABCD*. Además la cromatografía no mostraba una o dos moléculas que migraran a la misma distancia y que se tiñera igual con α -naftol que el mono y el di-ramnolípido de la PAO1. Por lo cual nos indicaba que efectivamente no era ramnolípido. Para investigar la naturaleza del biosurfactante el sobrenadante se sometió a pruebas de fisicoquímicas usando una proteasa E durante 3 h, y además de sometió por 25 min a 121°C. Los resultados obtenidos se muestran en la figura 21.

Figura 21. Efectos de la proteasa E sobre el por *Pseudomonas* sp



temperatura y la acción de biosurfactante producido M9b.

E₂₄ = 60%

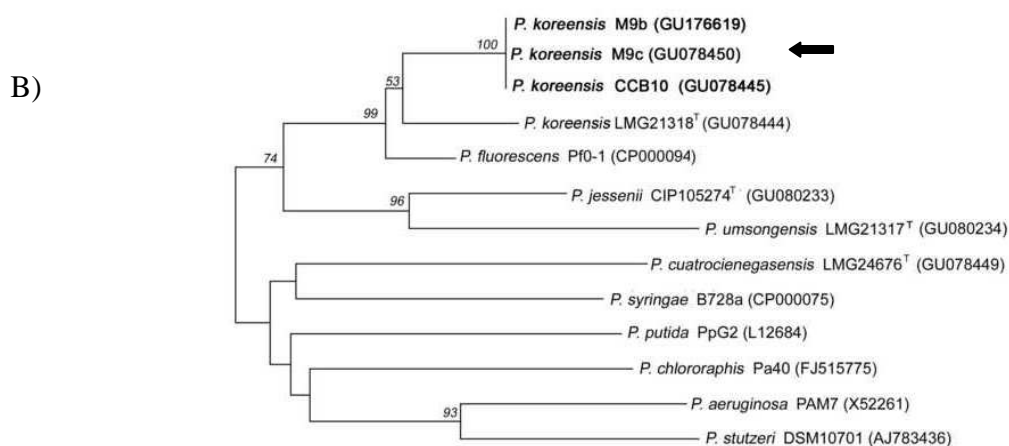
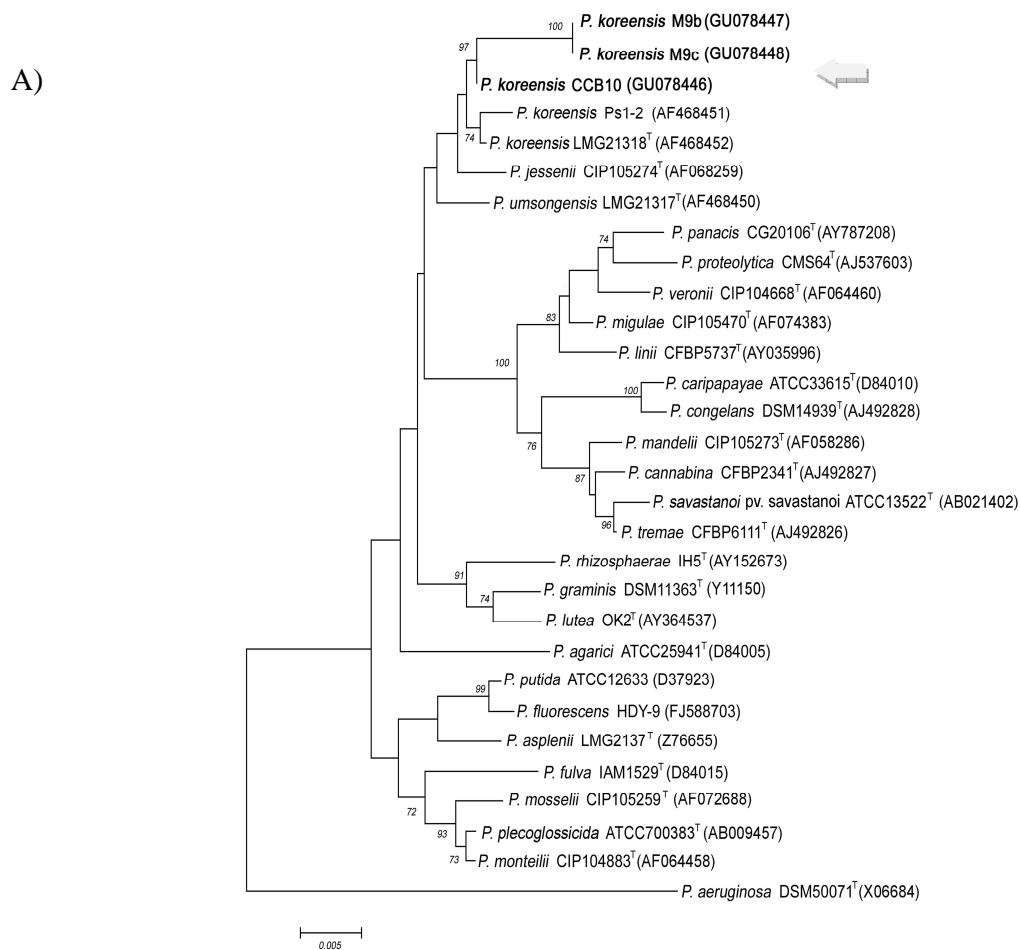
En la figura anterior se muestran las características del biosurfactante presente en el sobrenadante en medio PPGAS en 24h, 30°C y 225rpm. Concluimos que este metabolito, no era del grupo de los glicolípidos (ramnolípido) por las pruebas de azúcares reductores y el TLC, es termoestable y al menos no es digerido con la proteasa E. Por lo cual nos dimos a la tarea de identificar la o las bacterias que tenían esta capacidad usando métodos moleculares y bioquímicos.

Por lo cual se analizó la secuencia completa del 16S rDNA (1462 pb) de las cepas aisladas en CCB que producían biosurfactantes, fueron comparados con los datos disponibles de los genes 16S rDNA del genero *Pseudomonas* sp con nombres publicados y validados, usando el software Ribosomal Database Project (RDP) II. Disponible en la siguiente dirección electrónica <http://rdp.cme.msu.edu/>

El análisis obtenido indica una similaridad en la secuencia con *P. koreensis* Ps 9-14^T and Ps 1-2^T (98.9 and 98.7%, respectivamente), *P. umsongensis* Ps 3-10^T (98.6%) (**Soon Wo Kwon**, 2003) y *P. jessenii* CIP 105274 (97.9%) (Verhille S, 1999). Estas especies fueron originalmente aisladas de suelos agrícolas de Korea y *P.jessenii* fue aislada de agua mineral.

El árbol filogenético basado en las secuencias del gene 16S rRNA se muestra en la figura 22A, además se ilustra la posición de las *Pseudomonas* sp aisladas de CCB con otros miembros de las diferentes especies de *Pseudomonas* sp. En base a esta secuencia y a la posición en el árbol se agrupan con *P. koreensis* Ps1-2, y se nota claramente que forman un solo grupo, separada del clúster formado por los aislamientos tipos de *P. koreensis*.

Sugiriendo que probablemente se trate de una nueva especie, en base a esto se amplificaron y analizaron las secuencias de los genes *recA* y *gyrB* con la finalidad de establecer claramente la relación taxonómica con las especies de *P. koreensis*. (Figura 22B y C). Los datos mostrados en las filogenias son consistentes con los resultados obtenidos con la secuencia codificante del gene 16S rRNA en los tres aislamientos probados, CCB10, M9b y M9c, la cual se agruparon con *P. koreensis* LMG 21318^T (Ps9-14^T) pero en un clúster separado.



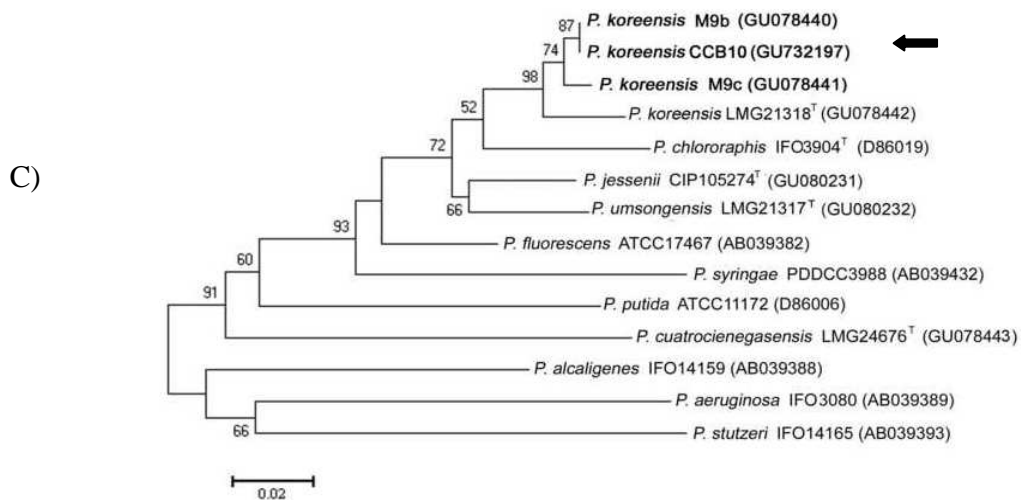


Figura 22. Filogenía del gen A) 16S rRNA, B) *recA* y C) *gyrB* para las cepas de *Pseudomonas* sp aisladas en el sistema Churince en Cuatro Ciénegas Coahuila, México. Se usaron secuencias de referencia de aislados tipo de distintas especies del género. El árbol presentado se construyó bajo un modelo de sustitución de Kimura de dos parámetros y algoritmo de distancia Neighbor-Joining con 1000 bootstrap. El tamaño de la barra representa el número de sustitución por sitio. Con la flecha se muestra la posición de la secuencia de las cepas M9b, M9c y CCB10.

Para describir la relación putativa entre las nuevas especies bacterianas representadas en CCB, se determinó el perfil de proteínas totales de estos aislamientos comparados con las cepas tipos de *P. koreensis*, *P. umsongensis* y *P. jessenii*. Inexplicablemente el resultado obtenido en el perfil de proteínas totales fue idéntico con la cepa tipo de *P. koreensis* LMG 21318^T. Estos datos sugieren que las cepas que se aislaron en CCB muestran un perfil de

proteínas idéntico (figura 23) y además poseen alta similitud en secuencia de los genes analizados como se mostró anteriormente.

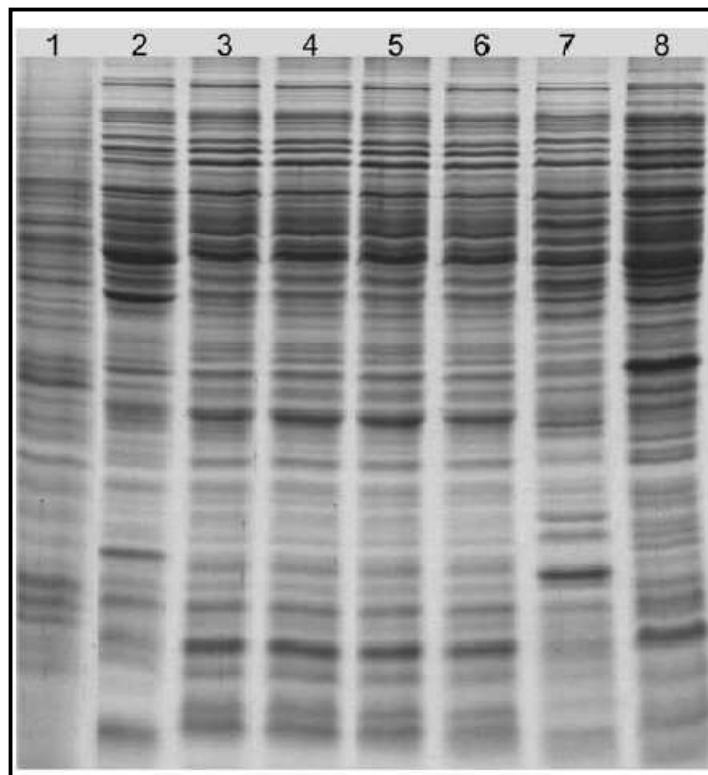


Figura 23:
de proteínas
diferentes
incluidas en
carriles
P. putida F1; 2)
105274; 3) *P.*
4) *P. koreensis* M9b; 5) *P.koreensis* M9c; 6) *P.koreensis* LMG 21318^T; 7) *P. umsongensis* LMG 21317^T; y
8) *P. fluorescens* LMG 1794^T.

Perfil electroforético
totales de las
Pseudomonas sp
este estudio. Los
corresponden a: 1)
P.jessenii CIP
koreensis CCB10;

Posteriormente se hicieron las pruebas de hibridación DNA:DNA entre las cepas, usando el DNA total de la cepa M9b con el DNA de *P.koreensis* LMG 21318^T para clarificar o confirmar el resultado anterior, en la tabla siguiente se muestran los porcentajes de

hibridación, la cual muestra una similitud de 83.2% con la cepa tipo, este resultado demuestra claramente más del 70% de los niveles establecidos por los miembros de la misma especie bacteriana, además se estableció el tamaño del genoma en todas las cepas como se muestra en la tabla 6. El tamaño del genoma como era de esperarse, las cepas aisladas de CCB, poseen un genoma más pequeño que los aislamientos tipo, esto se debe a las condiciones oligotróficas del medio en el cual fueron aisladas, solo la cepa CCB10 posee un tamaño del genoma casi idéntico con la cepa tipo de *P.koreensis*, esto se debe a la presencia de un plasmido (dato no mostrado).

Tabla 6: Resultados de la hibridación DNA:DNA de *P.koreensis* M9b vs *Pseudomonas* sp, y además se muestra el tamaño del genoma en Kb.

Aislamiento	% de hibridación DNA:DNA vs <i>P.koreensis</i> M9b	Tamaño del genoma (Kb)
<i>P.koreensis</i> M9b	100	4,453
<i>P.koreensis</i> M9c	94.9	4,605
<i>P.koreensis</i> CCB10	75.4	6,077
<i>P.koreensis</i> LMG 21318 [†]	83.2	5,914
<i>P. umsongensis</i> LMG 21317 [†]	39.4	6,858
<i>P. jessenii</i> CIP 105274	41.9	6,580
<i>P.putida</i> KT2440	12.37	6,181

La hibridación mostrada entre las cepas aisladas de CCB, muestran 94.9% de similaridad de la M9b con la M9c y 75.4% la M9b con la CCB10, lo cual demuestra que pertenecen a la misma especie bacteriana aunque su tamaño del genoma sea diferente. La característica que comparten estas tres especies bacterianas es la capacidad de producir un biosurfactante.

Por otro lado se hicieron las pruebas bioquímicas para determinar su capacidad metabólica de estas bacterias en relación a las cepas tipo y no hallamos gran diferencia entre la utilización de diferentes metabolitos. Ver tabla 7.

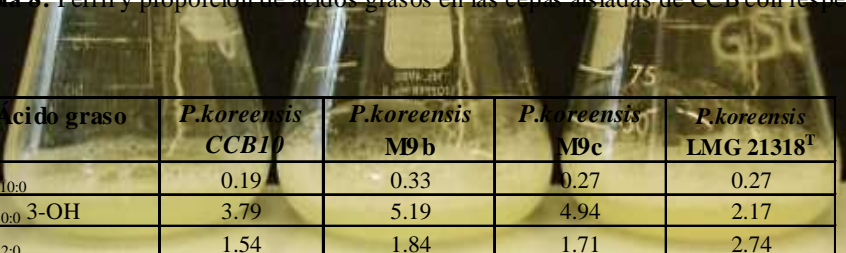
Tabla 7: Características metabólicas de las cepas aisladas de CCB con respecto a las cepas tipo.

Característica	M9b	M9c	CCB10	<i>P. koreensis</i> LMG 21318 ^T	<i>P. jessenii</i> CIP 05274 ^T	<i>P. umsongensis</i> LMG 21317 ^T	<i>P. putida</i> F1
Pigmentos fluorescens	-	-	-	+	+	+	+
Oxidasa	+	+	+	+	+	+	+
Actividad Enzimática:							
Reducción de nitrato	-	-	-	-	+	+	-
Arginina dihidrolasa	-	-	-	+	+	+	-
Gelatina	+	+	+	-	-	-	-
Asimilación de:							
D-manitol	+	+	+	-	-	-	-
D- fucosa	+	+	+	-	-	-	-
D-arabitol	+	+	-	-	-	-	-
D-GALactosa	+	+	+	+	-	-	+
D-GLUCosa	+	+	+	-	-	-	+
D-FRUCTosa	+	+	-	+	-	-	-
D-MANosa	+	+	+	+	-	-	+
L-arabinosa	+	+	+	+	-	-	+
D-xilosa	+	+	+	+	-	-	+
Glicerol	+	+	+	+	-	-	-
Ac. Adipico	-	-	-	-	-	+	-
Ac. fenilacético	-	-	-	-	+	+	-
Crecimiento a:							
4°C	+	+	+	+	+	+	ND
42°C	-	-	-	-	-	-	-
Tolerancia a NaCl:							
5%	+	+	+	+	-	+	+
7%	+	+	+	-	-	-	-

En las características metabólicas de las cepas probadas, evaluadas mediante el sistema API20NE y API50CH, hallamos que las cepas aisladas de CCB utilizan D-manitol, D-fucosa y D-glucosa (vía oxidativa) como fuente de carbono y toleran hasta 7% de NaCl a diferencia de la *P. koreensis* tipo.

En cuanto al perfil de ácidos grasos los datos que arrojaron demuestran también un alto parecido entre las cepas, ver tabla 8.

Tabla 8: Perfil y proporción de ácidos grasos en las cepas aisladas de CCB con respecto a la cepa tipo.



Ácido graso	<i>P.koreensis</i> CCB10	<i>P.koreensis</i> M9b	<i>P.koreensis</i> M9c	<i>P.koreensis</i> LMG 21318 ^T
C _{10:0}	0.19	0.33	0.27	0.27
C _{10:0} 3-OH	3.79	5.19	4.94	2.17
C _{12:0}	1.54	1.84	1.71	2.74
C _{12:0} 2-OH	6.14	6.61	6.85	5.43
C _{12:1} 3-OH	0.44	0.95	0.73	---
C _{12:0} 3-OH	5.13	6.14	6.06	5.10
C _{14:0}	0.34	0.36	0.37	0.48
C _{15:0}	---	0.19	0.18	---
C _{16:0}	28.19	27.51	27.39	28.44
C _{16:1w5c}	0.10	---	---	0.11
C _{16:1w7c/16:1 w6c}	35.53	33.08	34.73	33.52
Iso-C _{17:0}	0.16	0.21	0.18	0.16
C _{17:0} ciclo	0.93	1.17	1.23	3.68
C _{17:0}	0.17	---	0.21	0.31
C _{18:0}	0.61	0.65	0.63	0.50
C _{18:1 w7c 11-metil}	0.15	---	---	0.11
C _{18:1w7c}	16.41	14.83	13.89	16.58
C _{18:2w6,9c/18:0 ante}	---	---	---	0.19

-no detectado

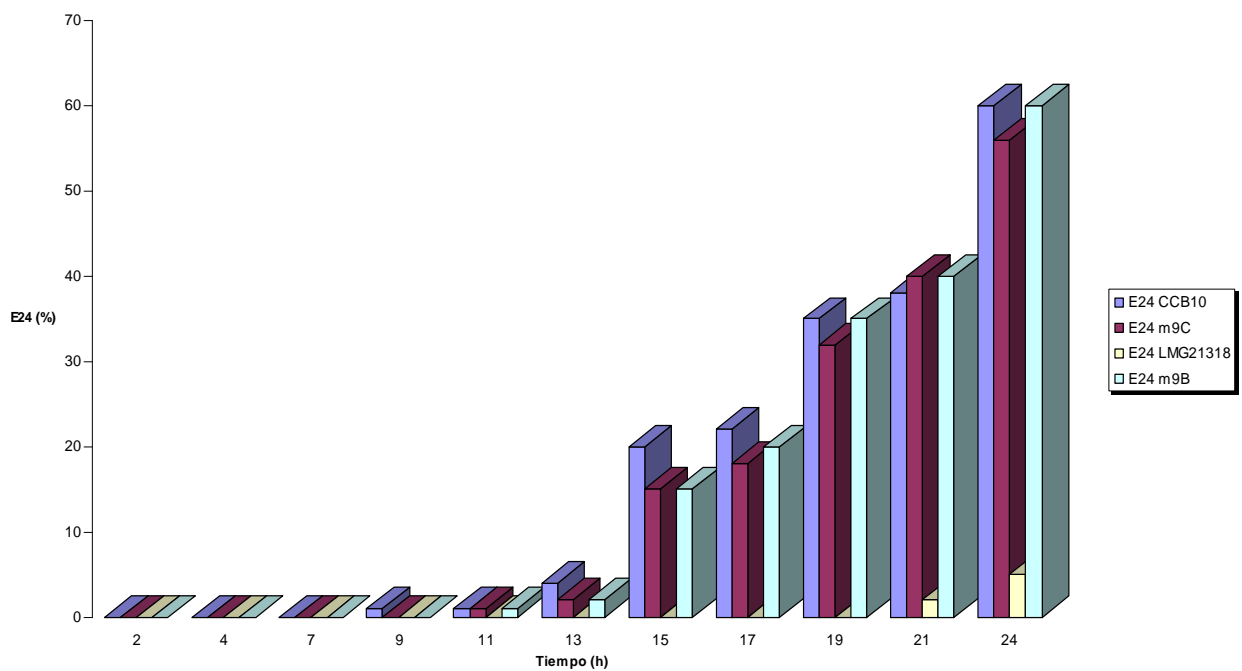
La caracterización de las cepas aisladas en el Valle de Cuatro Ciéneas, demuestran que se trata de un nuevo linaje endémico del sistema acuático Churince, lo cual ha divergido de su grupo taxonómico representado por el aislamiento tipo de Korea. Además con la característica que las cepas aisladas de CCB producen un biosurfactante a diferencia de la cepa tipo, esto probablemente se debe a las condiciones ambientales en la cual se han mantenido.

En cuanto a la producción del biosurfactante se realizó en PPGly a 225 rpm, 30°C durante 24h, después de transcurrido este tiempo se determinó la E₂₄, y se observó la producción de espuma en todas las cepas aisladas. Ver figuras 24 y grafica 5.

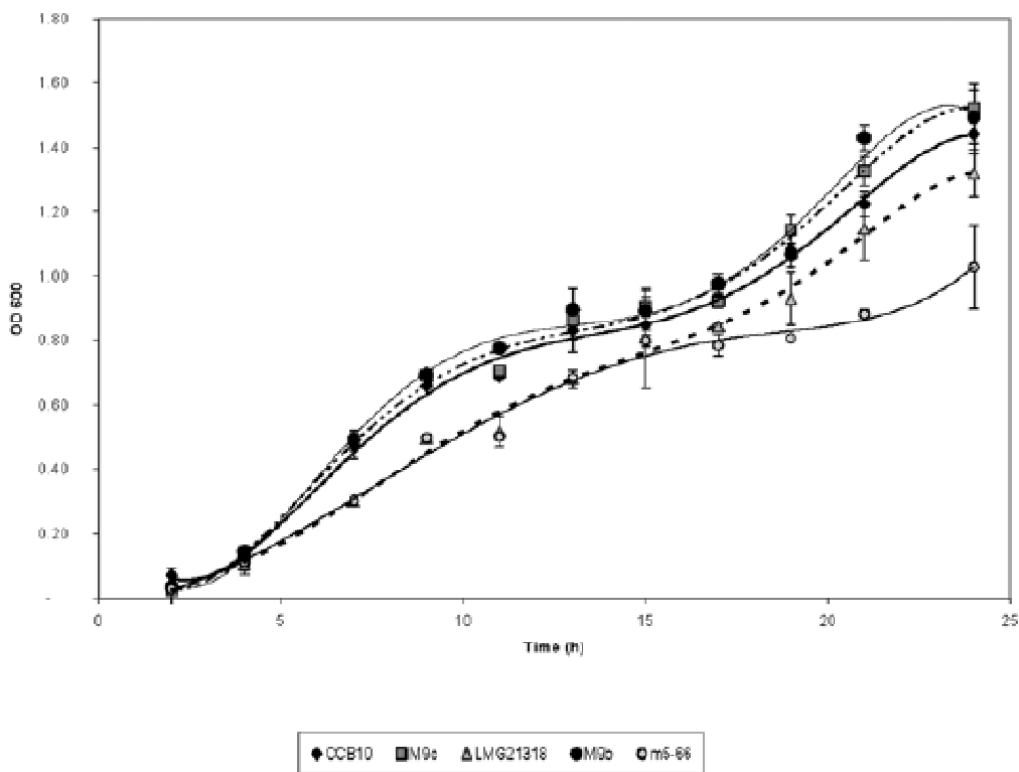
P. koreensis LMG 21318^T *P. koreensis* M9b *P. koreensis* CCB10

Figura 24: Producción de espuma en medio de PPGly de las diferentes cepas analizadas.

Grafica 5. Cuantificación de la producción del biosurfactante por E₂₄, en PPGly a 30°C, 225 rpm por 24h, en las *P. koreensis* aisladas de CCB y la tipo.



Posteriormente del análisis de la producción de espuma y de la E₂₄ de las diversas cepas de *P. koreensis* se establecieron las condiciones de extracción y de corrimiento de la cromatografía del biosurfactante, con la finalidad de detectar las o la molécula que le daba esta característica.



En el extracto o crudo extraído o con acetato de etilo (EACS E) se probó su capacidad de competir

ir con otras bacterias, dado que se ha mostrado en otros estudios que los biosurfactantes muestran actividad antimicrobiana (Bruijn, I. *et al* 2007), pero además pueden jugar un papel ecológico importante, dado que pueden desplazar a otros microorganismos para obtener alimento. Para determinar esta capacidad en las cepas aisladas de CCB, nosotros correlacionamos la característica de producción de biosurfactante como una capacidad de competir a *E.urianticum* m5G aislado también en CCB (Rebollar E, y Souza V. datos no publicados) se uso este microorganismo porque es grampositivo y además las colonias son amarillas y no usar antibiótico u otro compuesto para la selección. También se uso como control el extracto de la cepa tipo.

Para evaluar esta característica de competencia primero evaluamos la capacidad de crecer en PPGly por 24h a 30°C de todas cepas, incluyendo al *E.urianticum* m5G, con la finalidad de observar que el efecto de competencia sea debido a la presencia del biosurfactante y no a que la cepa que usamos para competir no desarrolle en PPGly. Ver grafica 6.

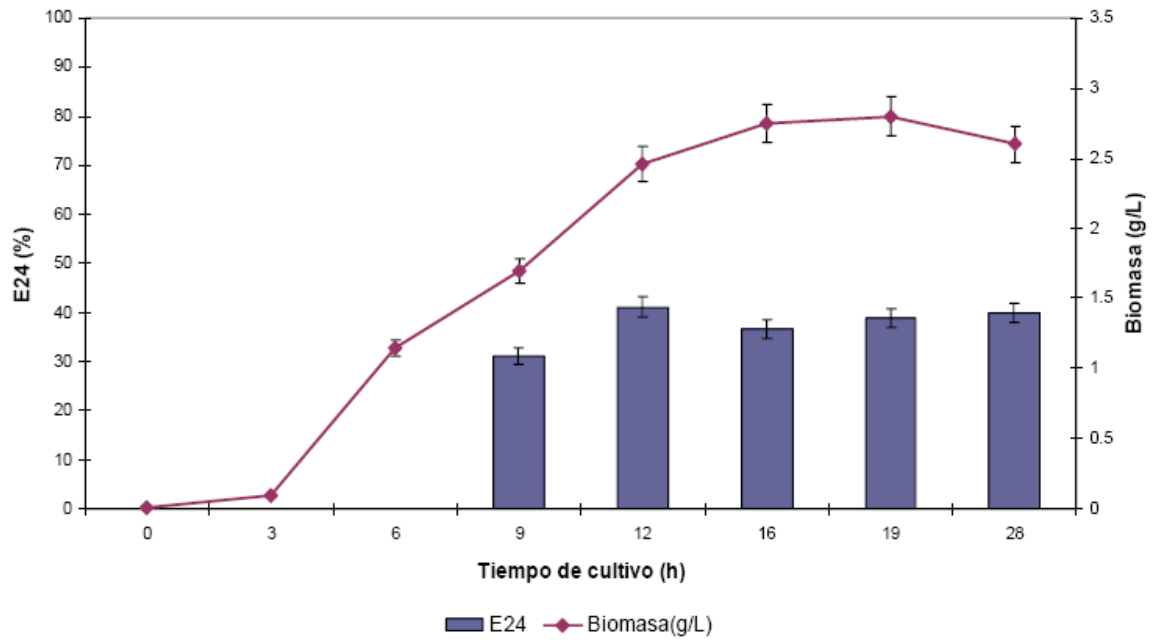
Grafica 6: Curvas de crecimiento de las *P. koreensis* y *E. urianticum* m5G en medio PPGly.

En la grafica 6 anterior observamos que todas cepas probadas incluyendo el *E. urianticum* m5G tienen la capacidad de incorporar al glicerol a su metabolismo y que además presentan una tasa de replicación muy similar. Con estos datos se procedió con los experimentos de competencia, estos se llevaron a cabo en el mismo medio PPGly con las condiciones anteriores probadas.

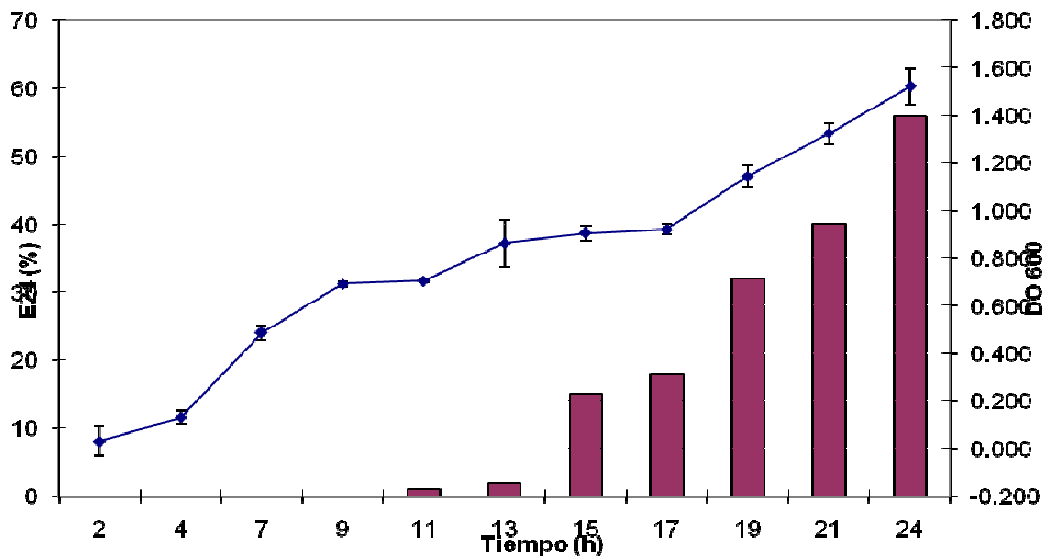
La producción de biosurfactante es relacionada con la curva de crecimiento en las cepas de *P.koreensis* M9b, CCB10, M9c y deficiente o nula en la cepa tipo como ya se había mostrado anteriormente. Ver grafica 7.

Grafica 7: ^aProducción de biosurfactante en PPGly en base a la curva de crecimiento.

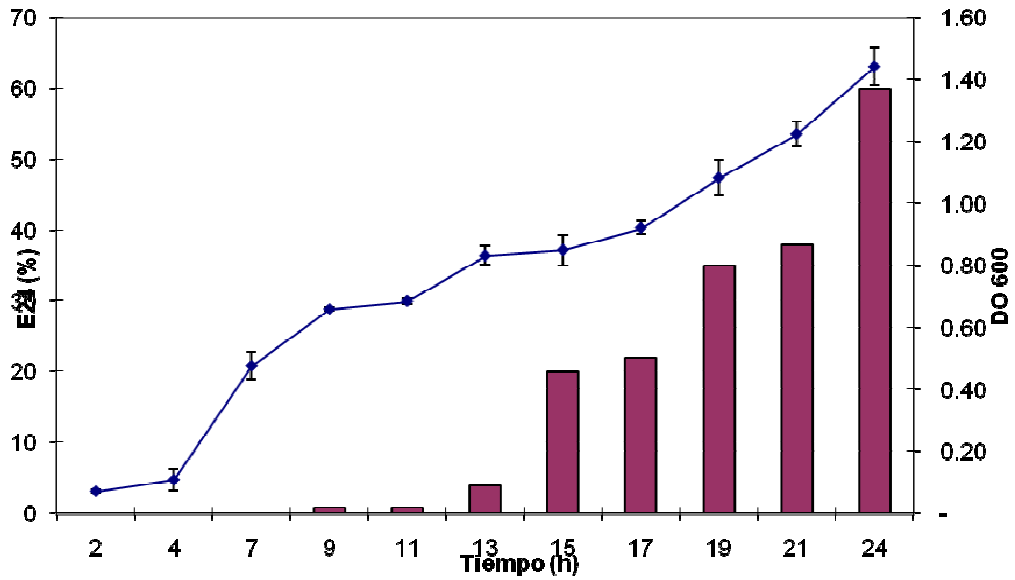
a) *P. koreensis* M9b



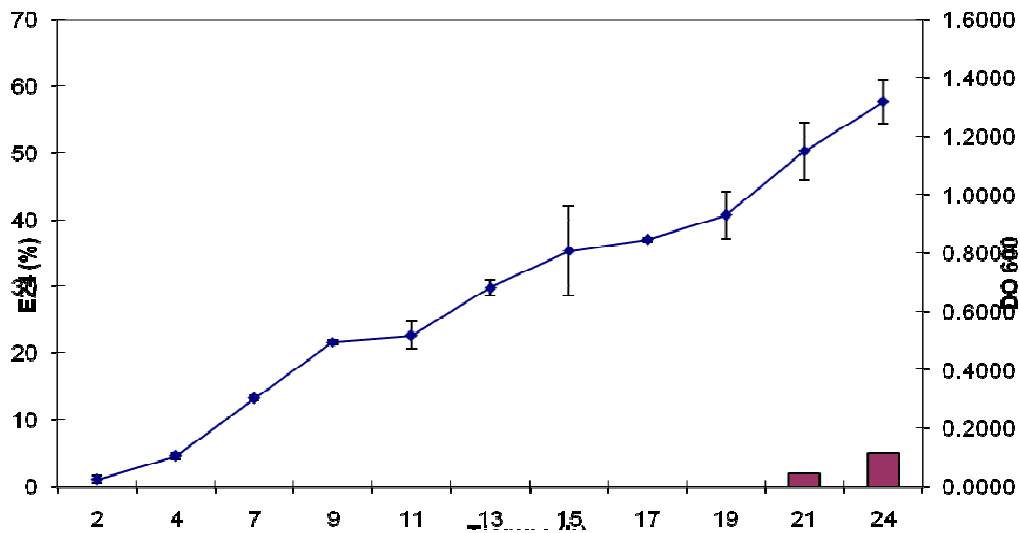
b) *P. koreensis* M9c



c) *P. koreensis* CCB10



c) *P. koreensis* LMG 21318^T



^aProducción de biosurfactante y curva de crecimiento en PPGly; panel a) *P. koreensis* M9b; panel b) M9c; c) CCB10, y d) LMG 21318^T. En el eje de las x se muestra el % de la E₂₄, en el eje de las y se refiere al tiempo en horas y en el eje de la biomasa (g/L). En las barras se representa la DE de al menos tres repeticiones independientes.

Las *P. koreensis* aisladas de CCB reducen significativamente el número de colonias de *E. auranticum* m5G, cuando estas son co-cultivadas en medio PPGly a una proporción 1:1 y la *P.koreensis* LMG 21318^T no muestra efecto significativo. Ver tabla 9, figura 25 y 26, esto se debe a la capacidad de producción de biosurfactante.

Tabla 9: Ensayo de competencia en PPGly de las cepas *P.koreensis* vs *E. uarianticum* m5G.

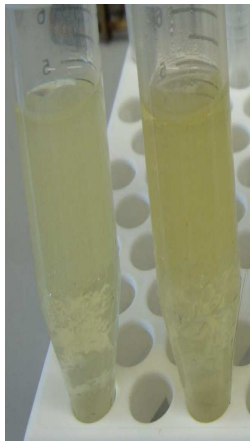
	<i>P. koreensis</i>		<i>E. aurantiacum</i> m5G		Competencia	E ₂₄
	CFU x 10 ⁷		CFU x 10 ⁷			
<i>P. koreensis</i>	Inicial	Final	Inicial	Final		
M9b	4.3	380±8	0		NA	60
M9b	4.3	448±19	4.8	3.5±0.2	+	60
M9c	4.5	318±9	0		NA	58
M9c	4.5	418±41	4.8	39±1	+	56
CCB10	4.7	338±17	0		NA	63
CCB10	4.7	355±12	4.8	4.2±1.7	+	63
LMG 21318 ^T	4.6	322±12	0		NA	5
LMG 21318 ^T	4.6	308±12	4.8	180±8	-	2
LMG 21318 ^T + EACSE	5.2	363±31	4.8	27+ 8	+	60
Ninguno	0		3	377±12	NA	
Ninguno + EACSE	0		3	<10	NA	60

En este ensayo se consideró como positivo (+) cuando en presencia de *P. koreensis* se reducía el número de UFC por mililitro de *E. aurantiacum* m5G en una o más ordenes de magnitud y negativo (-) cuando no se disminuyó significativamente las UFC. NA medida no aplica, E₂₄ medida cualitativa de la concentración de biosurfactante presente en el medio al final del experimento.



Figura 25. Comparación del ensayo de competencia entre las *P. koreensis* M9b + *E. uariaticum* m5G 1:1 izquierda y *P. koreensis* LMG 21318^T + *E. uariaticum* m5G 1:1 derecha respectivamente.

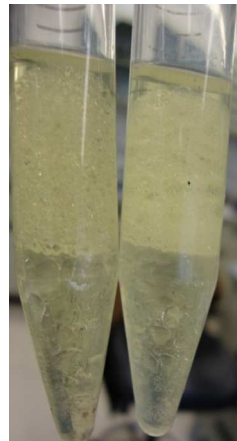
A) M9b 1:1 CCB10 1:1 M9c 1:1



60%



63%



58%

B) LMG 21318^T+EACSE LMG 21318^T 1:1+EACSE 1:1

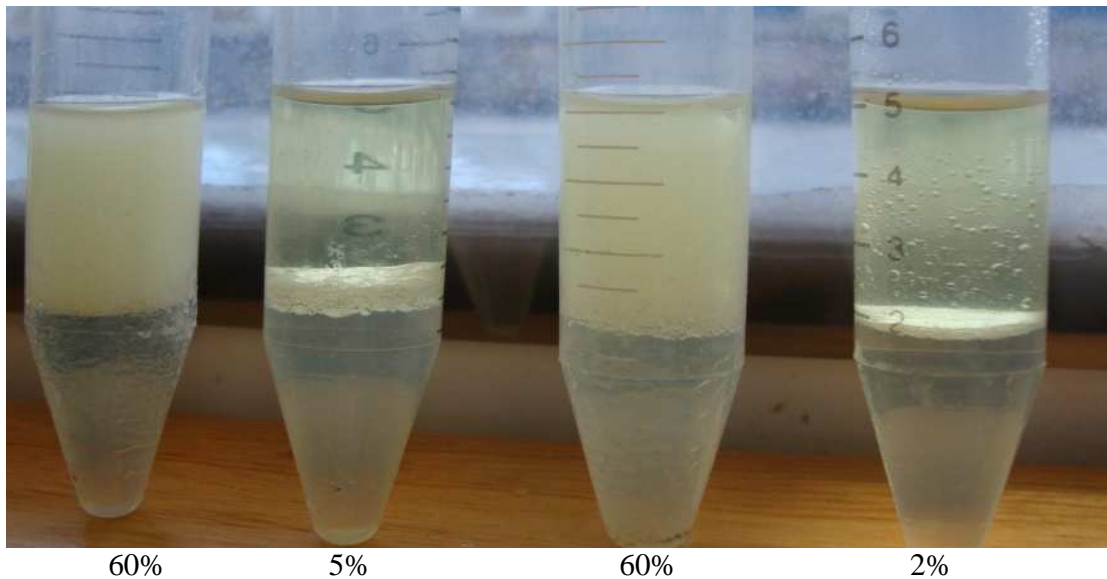


Figura 26. Concentraciones de biosurfactantes medidos por la E₂₄ en las cepas de *P. koreensis* s/c *E.aurianticum* m5G proporción 1:1. Panel A) E₂₄ de los aislamientos de CCB, M9b sin competidor, M9b + *E. aurianticum* m5G 1:1, CCB10 sin competidor, CCB10 + *E. aurianticum* m5G 1:1, y M9c sin competidor, M9c + *E. aurianticum* m5G 1:1; panel B) E₂₄ de la cepa LMG 21318^T + EACSE; LMG 21318^T; LMG 21318^T + EACSE + *E. aurianticum* m5G 1:1 y LMG 21318^T + *E. aurianticum* m5G 1:1.

Como lo observamos en la tabla 9 y en la figura 25, las *P. koreensis* M9b, M9c y la CCB10 desplazan o compiten a la bacteria *E. aurianticum* m5G cuando se colocan en una proporción 1:1, y la cepa tipo no compite. Cuando cambiamos las condiciones agregando el extracto crudo (ECSAE) de la cepa M9b después de 24h al cultivo de la cepa tipo esta restaura el efecto y desplaza al Exiguobacterium, este mismo fenómeno observamos cuando al cultivo de Exiguobacterium agregamos el mismo extracto y concuerda con las concentraciones de E₂₄ como se observa en la tabla 9. Por lo tanto el extracto tiene un efecto dramático en el crecimiento de esta bacteria grampositiva.

Para determinar la capacidad de *P. koreensis* M9b para establecer interferencia o competencia en relación con *E. aurianticum* m5G, depende de la densidad celular y por la frecuencia de células se diseñó un experimento con el protocolo por Greig y Travisano 2008. En la cual se uso un inóculo fijo de la cepa M9b (aproximadamente 4×10^7 UFC/ml) y

se varió el número de células *E. aurantiacum* m5G en diferentes proporciones. Además en otro experimento se varió el número de células de M9b la cual se modificó en proporciones de 1:10 o 10:1 como se muestra en la tabla 10 y figura 27.

Tabla 10. ^aEfecto del ensayo de competencia en base a la frecuencia de *P.koreensis* M9b vs *E. aurianticum* m5G.

Proporción Ps:Ex	<i>P. koreensis</i> M9b (UFC x 10 ⁷)		<i>E. urantiacum</i> (UFC x 10 ⁷)		Competencia	E ₂₄ (%)
	Inicial	Final	Inicial	Final		
1:0	4.3	380±8	0		NA	60
1:1	4.3	440±18	4.8	3.5±0.1	+	60
1:2	4.3	290±18	9.6	9±1.6	+	40
10:1	43	900±15	4.8	1±0.1	+	60
1:10	0.86	20±0.8	9.6	920±12	-	38

^aDiferentes proporciones de Ps: Ex; *P. koreensis* M9b: *E.aurianticum* m5G, inicial es la concentración al inicio del cultivo, final son las UFC/ml después de 24h, NA medida no aplicable, E₂₄ concentración cualitativa de biosurfactante después de 24h. Se muestran las medias y desviaciones estándar de 4 experimentos independientes.

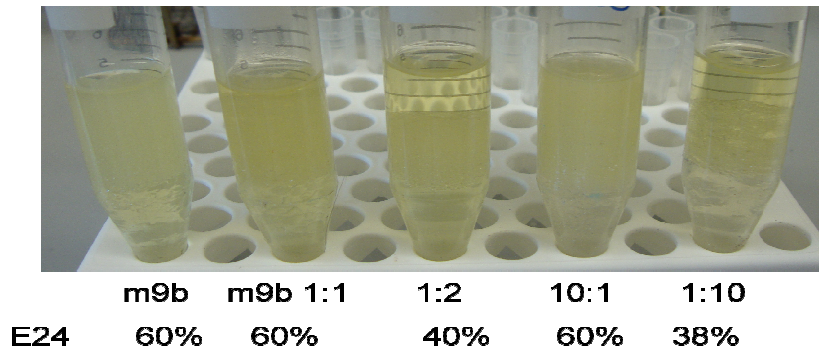


Figura 27. Concentraciones de las E₂₄ en las diferentes proporciones de M9b:m5G.

Lo que observamos en la proporción del experimento anterior es que la interacción o la competencia dependen de la frecuencia de los microorganismos, como se muestra en las concentraciones 1:2, cuando ponemos 2 veces más *Exiguobacterium* la cantidad de la E₂₄ baja en un 30%, y cuando tenemos 10 veces más exiguo la concentración de la E₂₄ baja un poco más que la anterior pero es más inestable.

En base a estos experimentos, nos dimos a la tarea de purificar la molécula responsable de la actividad biosurfactante, esto se realizó corriendo una placa preparativa del extracto crudo y cambiando la polaridad de la mezcla de solventes como se describe en la metodología. Esto fue con la finalidad de probar si el EACSE y la molécula responsable de la actividad biosurfactante, tienen actividad antibiótica o también pueden desplazar a otras bacterias grampositivas, como se muestra en la figura 28 y tabla 11.

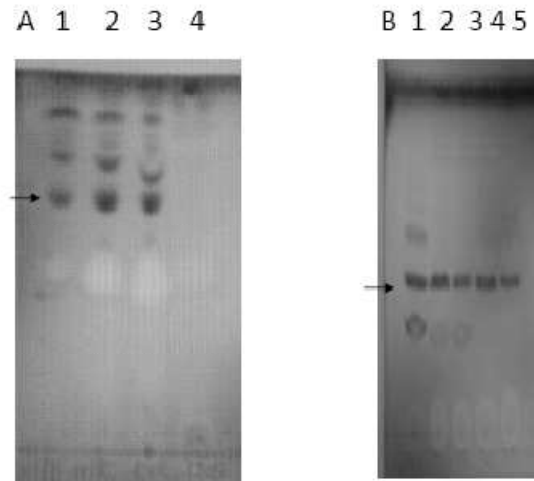


Figura 28. Análisis de la TLC del biosurfactante y otros compuestos secretados por los aislamientos de *P. koreensis* aisladas de CCB. Panel A; muestra los extractos de los sobrenadantes extraídos con acetato de etilo; 1) M9b, 2) M9c, 3) CCB10 y 4) LMG 21318^T. En el panel B se muestra una TLC de las diferentes fracciones que fueron removidas de las placas preparativas usadas para purificar el biosurfactante, las muestras 4 -5 fueron consideradas puras. La flecha muestra la banda que corresponde al biosurfactante.

Comparando los perfiles del TLC del EACSE de las tres *P. koreensis* aisladas de CCB (M9b, M9c y CCB10) y la cepa tipo LMG 21318^T se muestra una banda correspondiente al biosurfactante, el cual representa la molécula más abundante en el sobrenadante de las *P.koreensis* provenientes de CCB, cuando en la cepa tipo no está presente.

Las muestras mostradas como puras en la TLC preparativa se usaron para suplementar los cultivos de *E. aurianticum* m5G y otras bacterias grampositivas y gramnegativas para determinar sus propiedades antibióticas como se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. ^aEfecto del EACSE sobre el crecimiento de las diferentes bacterias en caldo LB.

Aislamiento	Sin EACSE	con EACSE
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	1.51	1.46
<i>S aureus</i> ATCC 29213	1.65	1.74
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	1.66	0.05
<i>E. aurianticum</i> m5G	0.95	0.04
<i>E coli</i> ATCC 25922	1.52	1.38
<i>S. tiphy</i> ATCC 19430	1.21	1.32
<i>S. liquefaciens</i> ATCC 27592	1.30	1.33

^aEl crecimiento bacteriano fue determinado a 600 nm de DO en cultivos de 24 h de crecimiento. El *E.aurianticum* m5G fue incubado a 30°C y los demás cultivos se incubaron a 37°C. Los valores presentados representan la media de tres experimentos independientes. Todos los cultivos presentaron una DO inicial de 0.03 a 600nm. El extracto usado fue obtenido de cultivos en PPGAS de *P.koreensis* M9b de 24h a 30°C.

Después de observar y analizar los datos anteriores se diseñó el mismo experimento pero solo probando las bacterias en la cual se observó mejor el efecto del EACSE, y además se probaron los EACSE de todas las cepas incluidas en este estudio. Con la finalidad de determinar la capacidad antibiótica de cada una de ellas. Ver tabla 12

Tabla 12. ^aEfecto del EACSE de las diferentes *P.koreensis* M9b, M9c, CCB10 y LMG 21318^T sobre el crecimiento de *B.subtillus* ATCC 6633 y *E. aurianticum* m5G en medio LB.

Bacteria	Sin EACSE	M9b	M9c	CCB10	LMG 21318 ^T	LMG 21318 ^T (2X)
<i>B.subtillus</i> ATCC 6633	1.58 ± 0.14	0.06± .03	0.17 ± .01	0.35± .09	1.09±0.1	1.19±0.1
<i>E.aurianticum</i> m5G	1.01±0.02	0.05±0.02	0.68±0.01	0.19±0.07	0.93±0.16	1.18±0.01

^aEl desarrollo bacteriano fue determinado a 600 nm de DO en cultivos de 12 h de crecimiento. El *E.aurianticum* m5G fue incubado a 30°C y *B.subtillus* ATCC 6633 a 37°C. Los valores presentados representan la media ± desviación estándar de tres experimentos independientes. Todos los cultivos presentaron una DO inicial de 0.03 aproximadamente. Todos los extractos usados fueron obtenidos de cultivos en PPGAS por 24h a 30°C.

Formación de biofilms:

La producción de biosurfactantes podría ser un medio para la competencia por los recursos sólo en algunos ambientes confinados, como son las biopelículas. Es importante destacar que los tres aislamientos de *P. koreensis* provenientes de CCB, así como la cepa tipo de Korea son capaces de formar biofilms después de 24 horas, el biofilms producido por M9b fue de 33%, 41,5% M9c, 48% CCB10 y LMG 21318^T solo 23% del biofilms producido por *P. aeruginosa* PAO1 utilizado como control positivo en estos experimentos (Figura 29). También se determinó la formación de biofilms en *E. aurianticum* m5G el cual fue negativo en las condiciones probadas. Se sabe que el biosurfactante (ramnolípido) producido por *P. aeruginosa* desempeña múltiples funciones estructurales en el desarrollo del biofilms, tales como la formación de microcolonias en la fase inicial de su formación, el mantenimiento de canales en estas estructuras, además facilita el desarrollo estructural de la migración en la última fase de la formación de biofilms y permite la dispersión de células.

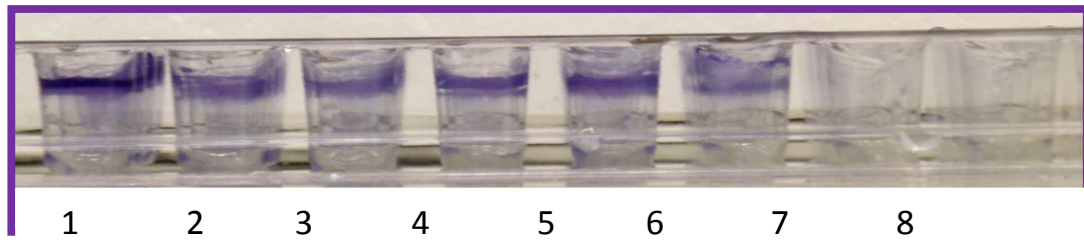
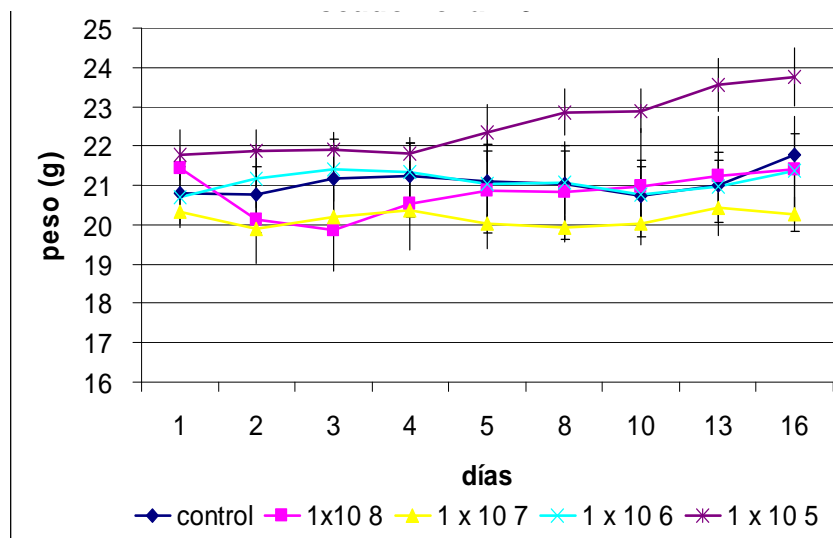


Figura 29. Formación de biofilms después de 24h por las especies de *P. koreensis*, teñidas con cristal violeta al 1%. Biofilms después de 24h de incubación a 30°C; pozo 1) *P. aeruginosa* PAO1, 2) M9b, 3) M9c, 4) CCB10, 5) LMG 21318^T, 6) *P. aeruginosa* M10, 7) *E. urianticum* m5G y 8) Control negativo.

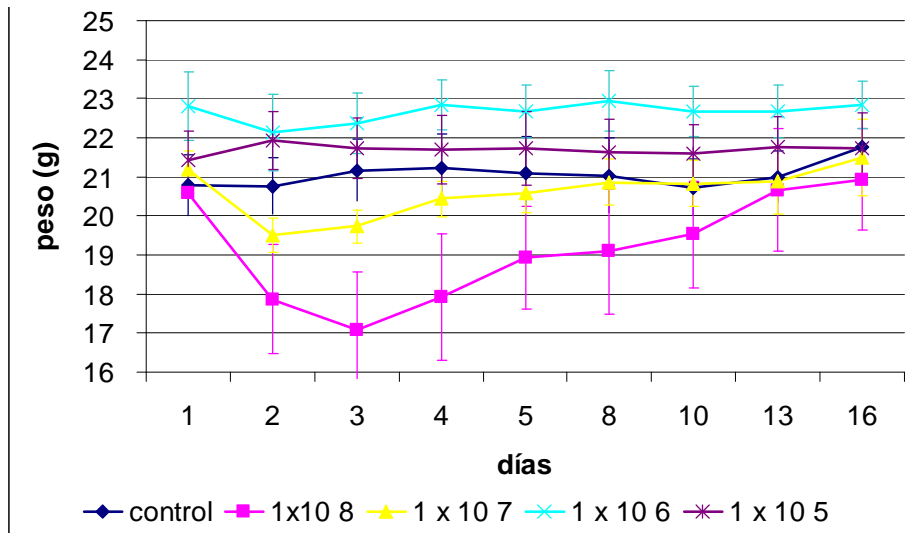
c) Ensayo de patogenicidad:

Se inocularon diferentes concentraciones de UFC/ml en ratón BALB/C ANn de las cepas *P. koreensis* M9b y LMG 21318^T con la finalidad de determinar su patogenicidad para el uso de estas cepas en aplicaciones biotecnológicas. Se uso como control la dosis de 1×10^8 UFC/ml de la *P.aeruginosa* PAO1. Se evaluó el peso y la viabilidad del ratón durante 16 días. Como se muestra en la grafica 8.

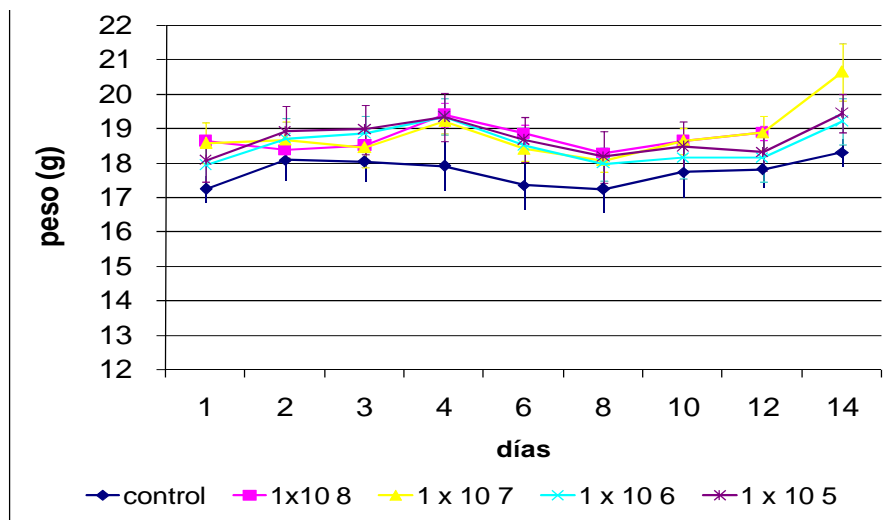


A) *P. koreensis* M9b

B) *P. koreensis* LMG 21318^T



C) *P. koreensis* CCB10



Grafica 8. Determinación de la patogenicidad en ratones BALB/C ANn de las cepas *P. koreensis* M9b, LMG 21318^T, y CCB10. Panel A, se muestra el curso de la infección de los ratones inoculados con *P. koreensis* M9b, en el eje de la X se muestra el peso (g) de los ratones y en el eje de la Y se muestra los días de postinfección y en color se observan las diferentes UFC/ml probadas. Panel B; *P. koreensis* LMG 21318^T y panel C;) *P. koreensis* CCB10.

En cuanto al experimento en ratón para determinar la patogenicidad de las cepas, hayamos que las cepas aisladas de CCB (M9b, M9c y CCB10) no son patógenas, dado que no bajan de peso o matan a ningún ratón aun cuando son inoculadas concentraciones de 1×10^8 UFC/ml. Una diferencia con la cepa tipo es que esta a la concentración 1×10^8 UFC/ml no los mata, pero si los enferma, ya que como se observa en la grafica, estos presentan una decaída de peso rápida a los tres días de la infección y posteriormente se recuperan, por lo tanto esto nos indica que las *P. koreensis* de CCC no son patógenas en el modelo en ratón.

6.5 CONCLUSIÓN ETAPA II:

En este trabajo describimos que las cepas aisladas de CCB, forman un grupo distinto que la cepa tipo. La única característica que las distingue es la capacidad de producir BS. Nuestros resultados sugieren que los compuestos tensoactivos muestran ser importantes de *P. koreensis* para competir con otras bacterias presentes en el mismo medio. Es posible que la producción de este biosurfactante sea una ventaja ecológica, dado que probablemente juegue un papel en la separación del linaje de *P. koreensis* en CCB.

La capacidad de producir un biosurfactante en las cepas de CCB solamente se da en condiciones limitantes de fosfatos, usando como fuente de carbono glucosa o glicerol, en fase estacionaria tardía de crecimiento cuando son crecidas a 30°C y además presentan una alta densidad celular, (grafica 7) lo que nos indica que los genes responsables de la biosíntesis y regulación de la producción de este metabolito son probablemente regulados por Quorum Sensing como se ha reportado en otras especies parecidas a *P. aeruginosa* y *Serratia marcescens*. (Jun-Rong Wei, *et al* 2006). La capacidad de producir el biosurfactante correlaciona con el número final de células como se muestran en los experimentos de competencia (Tabla 9). Además la regulación en la producción de biosurfactante podría ser regulada por fosfato, en medios ricos como es el caso de LB no se produce BS. Estos datos concuerdan con la hipótesis de que las cepas aisladas de CCB son capaces de establecer una interacción alelopática con otras bacterias a través del efecto tóxico del biosurfactante producido en condiciones oligotróficas (El fenómeno de la alelopatía, fue definido por Molish en 1937, como el proceso por el cual una planta u

organismo desprende al medio ambiente, uno o varios compuestos químicos; estos inhiben el crecimiento de otra planta que vive en el mismo hábitat, o en un hábitat cercano) La presión selectiva que impone la competencia ofrece la posibilidad de aparición de nuevas estrategias para sobrevivir o mantenerse en sus nichos ecológicos.

Por tanto las cepas del nuevo linaje de *P. koreensis* aisladas de CCB han desarrollado un mecanismo que utilizan para permanecer y obtener recursos en presencia de un competidor, esto puede definirse como competencia, interferencia o alelopatía. La estrategia de competencia se llevan a cabo en microorganismos que viven en ambientes estructurados o en alta densidad celular, en este caso los resultados mostrados en este trabajo se muestra que la producción del biosurfactante es dependiente de la densidad celular como se muestra en la tabla 10.

La clasificación taxonómica de bacterias es complicada, porque los conceptos fundamentales, como la definición de unidad ecológica o especie, son objeto de debate (Cohan. F. M and E. B. Perry. 2007). La definición operativa de especies bacterianas ha sido definida empíricamente y por lo tanto depende de los límites establecidos. En cuanto a la secuencia del 16S rDNA las bacterias deben tener una identidad en la secuencia del 97% o más y 70% o más en las pruebas de hibridación total del DNA:DNA. (Vandamme, B. *et al* 1996). La inclusión de las características ecológicas en la delimitación de especies se ha usado en diferentes grupos biológicos, especialmente en casos donde no puede haber ambigüedad a causa de una alta similitud fenotípica y/o genética, en el caso de las bacterias estas características no son usualmente tomadas en cuenta para su clasificación taxonómica.

La caracterización química del BS producido falta por determinar, pero muy probablemente concuerde con la lokisina producida por otro aislamiento de *P. koreensis* 2.74 y este presenta actividad anti fúngica, descrito por Hultberg M, 2010. Aquí demostramos otro papel adicional del biosurfactante producido por esta especie, es el desplazamiento por competencia y además la actividad antibiótica contra *B. subtilis* ATCC 6633.

6.6 PERSPECTIVAS

En el laboratorio el M en C. Sergio Zavala, está trabajando en la purificación del BS para posteriormente determinar la estructura química, además de determinar las condiciones de mejor producción del BS en matraz y escalarlo en reactor. También la Biol. Alma Cortez en el Instituto de Química, está probando el efecto del sobrenadante en diferentes tipos de suelos contaminados. Además falta por determinar los genes involucrados en la biosíntesis y en la regulación de producción del BS. Se debe ampliar el papel biológico del BS producido por esta especie, dado que en este trabajo el BS obtenido tiene efecto bacteriostático, ya que los microorganismos probados se recuperan posteriormente, es por esto que se necesita probarlos contra otros patógenos (ejm: hongos fitopatógenos) y se necesitan más estudios en cuanto a su patogenicidad contra plantas e insectos, y entender la interacción en el ambiente del cual fueron aisladas.

REFERENCIAS:

- Abouseoud M, Maachi R, Amrane A, Boudergua S, Nabi A.** 2008a. Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. Conference on Desalination and the Environment. Sani Resort, Halkidiki, Greece, pp 143-151.
- Abouseoud M, Yataghene A, Amrane A, Maachi R.** 2008b. Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of *Pseudomonas fluorescens*. *J Ind Microbiol Biotech* 35:1303-1308.
- Ahmad Mohammad Abdel-Mawgoud, Mohammad Mabrouk Aboulwafa and Nadia Abdel-Haleem Hassouna.** 2010. Characterization of Rhamnolipid Produced by *Pseudomonas aeruginosa* Isolate Bs20. *Applied Biochemistry and Biotechnology*; Volume 157, Number 2, 329-345.
- Alcocer, J y E. Kato.** 1995. Cuerpos acuáticos de Cuatro Ciénegas, Coahuila. En: G. de la Lanza y J.L. García C. (comps.), *Lagos y presas de México*. Centro de Ecología y Desarrollo, A.C. México, pp. 177-193.
- Allison Adonizio, Sixto M. Leal, Jr, Frederick M. Ausubel and Kalai Mathee.** 2008. Attenuation of *Pseudomonas aeruginosa* virulence by medicinal plants in a *Caenorhabditis elegans* model system. *Journal of Medical Microbiology*, 57, 809–813.
- Ashraf A. Khan and Carl E. Cerniglia.** 1994. Detection of *Pseudomonas aeruginosa* from Clinical and Environmental Samples by Amplification of the Exotoxin A Gene Using PCR. *Applied and Environmental Microbiology*. p. 3739-3745
- Badino, G., T. Bernabei, A. De Vivo, I. Giulivo y G. Savino.** 2004. Under the desert, the mysterious waters of Cuatro Ciénegas. *La Venta Esplorazioni Geografiche y Gobierno Coahuila*.
- Balibar CJ, Vaillancourt FH, Walsh CT.** 2005. Generation of D amino acids residues in assembly of arthorfactin by dual condensation/epimerization domains. *Chem Biol*; 12: 1189-200.
- Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS.** 2000. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol* 53: 495-508.
- Banat IM.** 1993. The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp.* *Biotechnol Lett* 15(6): 591-594.
- Bassarello, C., Lazzaroni, S., Bifulco, G., Cantore, P. L., Iacobellis, N. S., Riccio, R., Gomez-Paloma, L. and Evidente, A.** 2004. Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *J. Nat. Prod.* 67, 811-816.
- Benincasa M, Abalos A, Oliveira I, Manresa A.** 2004. Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol* 85:1-8.
- Benincasa M, Accorsini FR.** 2008. *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *Bioresour Technol*;99(9):3843-9.
- Bergström S., Theorell H. y Davide H.** 1946. On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*, pyolipic acid, active against Myobact. tuberculosis. *Ark. Kem. Mineral Geol.* 23A, 1-12.
- Birgit Koch, Tommy H. Nielsen, Dan Sørensen, Jens Bo Andersen, Carsten Christophersen, Søren Molin, Michael Givskov, Jan Sørensen, and Ole Nybroe.** 2002. Lipopeptide Production in *Pseudomonas sp.* Strain DSS73 Is Regulated by Components of Sugar Beet Seed Exudate via the Gac Two-Component Regulatory System. *Applied and Environmental Microbiology*; 68(9): 4509-4516.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ana Biochem* 76: 248-254.

Braun P. Gordon, Paul D. Hildebrand, Tim C. Ells, and Donald Y. Kobayashi. 2001. Evidence and characterization of a gene cluster required for the production of viscosin, a lipopeptide biosurfactant, by a strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Can. J. Microbiol.* 47(4): 294-301.

Braun PG., Hildebrand PD., Ells TC., Kobayashi DY. 2001. Evidence and Characterization of a gene cluster required for the production of viscosin, a lipopeptide biosurfactant, by a strain *Pseudomonas fluorescens*. *Can J Microbiol*; 47:294-300.

Bruijn I, Maarten J. D. de Kock, Meng Yang, Pieter de Waard, Teris A. van Beek and Jos M. Raaijmakers. 2007. Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Molecular Microbiology*; 63(2), 417-428.

Bunster L, Fokkema NJ and Schippers B.1989. Effect of surface-active *Pseudomonas spp.* on leaf produced by *Pseudomonas marginalis*. *Canadian Journal of Microbiology.* 42 (3): 243-251.

Burd G and Ward OP. 1997. Energy-dependent accumulation of particulate biosurfactant by *Pseudomonas marginalis*. *Can J Microbiol*; 43:391-94.

Cabellos-Avelar T, Souza V, Membrillo-Hernández J. 2006. Spent media from cultures of environmental isolates of *Escherichia coli* can suppress the deficiency of biofilm formation under anoxic conditions of laboratory *E. coli* strains. [FEMS Microbiol Ecol.](#)58(3):414-24.

Calegari, V. 1997. Environmental perceptions and local conservation efforts in Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico. The University of Texas- Austin Dissertation.

Cameotra S.S. y Bollag J.M. 2003. Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec.* 33, 111-126.

Carrillo PG, Mardaraz C, Pitta-Alvarez SI, Giuliatt A M. 1996. Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. *World J Microbiol Biotechnol* 12:82-84.

Celik GY, Aslim B, Beyatli Y. 2008. Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. *J Environ Biol* 29:867-870.

Chandrasekaran EV, Bemiller JN. 1980. Constituent Analysis of Glycosaminoglycans. In: Whistler RL, Wolfrom ML, editors. *Methods in Carbohydrate Chemistry*. New York: Academic Press; 89–96.

Chayabutra C., Wu J. y Lu-Kwang J. 2001. Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol. Bioeng.* 72, 25-33.

Cho KH, Wang HS, Kim YK. 2010. Temperature-dependent hemolytic activity of membrane pore-forming peptide toxin, tolaasin. *J Pept Sci.*; 16 (2):85-90.

Coiro VM., Segre AL., Di Nola A., Paci M., Grottesi A., Veglia G., Ballio A. 1998. Solution conformation of the *Pseudomonas syringae* MSU 16H phytotoxic lipodepsipeptide Pseudomicina A determined for computer simulations using distance geometry and molecular dynamics from NMR data. *Eur J. Biochem*;257:449-56.

Cohan. F. M., E. B. Perry. 2007. A systematic for discovering the fundamental units of bacterial diversity. *Curr. Biol.* 17 R373- R386.

Cooper D.G., Liss S.N., Longay R. y Zajic J.E. 1989. Surface activities of Mycobacterium and *Pseudomonas*. *J. Ferment. Technol.* 59, 97-101.

- Cooper DG, Macdonald CR, Duff SJ, Kosaric N.** 1981. Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cation Additions. *Appl Environ Microbiol* 42: 408-412.
- Cooper, D. G. and Goldenberg, B. G.** 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 224-229.
- Costa S.G., Nitschke M., Haddad R., Eberlin M.N. y Contiero J.** 2006. Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochem.* 41, 483-488.
- Costa SG, Lépine F, Milot S, Déziel E, Nitschke M, Contiero J.** 2009. Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ind Microbiol Biotechnol.*; 36(8):1063-72.
- Cuny P, Acquaviva M, Gilewicz M.** 2004. Phenanthrene degradation, emulsification and surface tension activities of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a coastal oil contaminated microbial mat. *Ophelia* 58:283-287.
- Das P, Mukherjee S, Sen R.** 2008. Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactante derived from a marine *Bacillus circulans*. *J Appl Microbiol* 104: 1675-1684.
- David A. D'Argenio, Larry A. Gallagher, Celeste A. Berg, and Colin Manoil.** 2001. *Drosophila* as a Model Host for *Pseudomonas aeruginosa* Infection. *Journal of Bacteriology.* p. 1466-1471.
- Desai AJ, Patel KM and Desai JD.** 1988. Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. *Current Science.* 57 (9): 500-501.
- Desai JD, Banat IM.** 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev* 61: 47-64.
- DeSantis, T.Z., P. Hugenholtz, K. Keller, E.L. Brodie, N. Larsen, Y.M. Piceno, R. Phan y G.L. Andersen.** 2006. NAST: a multiple sequence alignment server for comparative analysis of 16S rRNA genes. *Nucleic Acids Res* 2006 July 1; 34(Web Server issue): W394-W399.
- Desert Fishes Council Web.** 2003. <http://www.desertfishes.org>
- Déziel E, Lépine F, Milot S, Villemur R.** 2003. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol Sgm* 149:2005-2013
- Deziel E., Paquette G., Villemur R., Lepine F. y Bisailon J.** 1996. Biosurfactant production by a soil *Pseudomonas* strain growing on polycyclic aromatic hydrocarbons. *Appl. Environ. Microb.* 62, 1908-1912.
- Dubern Jean-Frederic, Ellen L. Lagendijk, Ben J. J. Lugtenberg, and Guido V. Bloemberg.** 2005. The Heat Shock Genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* Are Involved in Regulation of Putisolvin Biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *Journal of Bacteriology*, p. 5967-5976
- Dubern, J-F., Lugtenberg, B. J. J., and Bloemberg, G. V.** 2006. The *ppuI-rsaL-ppuR* quorum sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvin I and II. *J.Bacteriol.* 188:2898-2906.
- Dubey, K. and Juwarkar, A.** 2001. Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 17, 61-69
- Edgar, R.C.** 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5), 1792-97.

- Edwards J.R. y Hayashi J.A.** 1965. Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. Arch. Biochem. Biophys. 111, 415-421.
- Ellaiah P, Prabhakar T, Sreekanth M, Taleb AT, Raju PB, Saisha V.** 2002. Production of glycolipids containing biosurfactant by *Pseudomonas species*. Indian J Exp Biol 40: 1083-1086.
- Elser, J.J.** 2006. Biological Stoichiometry: A chemical bridge between ecosystem ecology and evolutionary biology. *Am Nat* 168: S25-S35.
- Elser, J.J., J.H. Schampel, F. García-Pichel, B.D. Wade, V.Souza, L. Eguiarte, A. Escalante y J.K. Farmer.** 2005. Effect of phosphorous enrichment and grazing snails on modern stromatolitic microbial communities. *Freshwater biology* 50: 1808-1825.
- Escalante A.** 2008. Tesis Doctoral; Ecología Evolutiva de Procariontes en Cuatro Ciénegas Coahuila, UNAM.
- Essar, D. W., Eberly, L., Hadero, A. & Crawford, I. P.** 1990. Identification and characterization of genes for a second anthranilate synthase in *Pseudomonas aeruginosa*: interchangeability of the two anthranilate synthases and evolutionary implications. *J Bacteriol* 172, 884–900.
- Evans, S.B.** 2005. Using chemical data to define flow systems in Cuatro Ciénegas, Coahuila México: The University of Texas – Austin Dissertation 114p.
- Finking Robert and Marahiel Mohamed A.** 2004. BIOSYNTHESIS OF NONRIBOSOMAL PEPTIDES. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:453-88
- Fouad Dabboussi, Monzer Hamze, Elisabeth Singer, Valerie Geoffroy, Jean-Marie Meyer and Daniel Izard.** 2002. *Pseudomonas mosselii* sp. nov., a novel species isolated from clinical specimens. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 52, 363–376.
- García-Pichel, F., W.D. Wade y J.D. Farmer.** 2002. Jet-suspended, calcite-ballasted cyanobacterial waterwarts in a desert spring. *J Phycol* 38: 420-428.
- Gautam K.K. y Tyagi V.K.** 2006. Microbial surfactants: a review. *J. Oleo Sci.* 55, 155-166.
- Georgiou G, Lin S-C and Sharma MM.** 1992. Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology.* 10: 60-65.
- Gewolb, J.** 2002. Bioengineering. Working outside the protein-synthesis rules. *Science* 295: 2205-2207.
- Gordon, D., C. Desmarais y P. Green.** 2001. [Automated finishing with Autofinish](#). *Genome Res* 11:614-625.
- Gordon, D., C. Abajian y P. Green.** 1998. [Consed: a graphical tool for sequence finishing](#). *Genome Res* 8:195-202.
- Guenzi E, Galli G, Grgurina I, Dennis C. Gross, and Grandi G.** 1998. Characterization of the Syringomycin Synthetase Gene Cluster. A LINK BETWEEN PROKARYOTIC AND EUKARYOTIC PEPTIDE SYNTHETASES. *Journal of Biological Chemistry*; 273 (49), p. 32857-32863.
- Guerra-Santos L., Käppeli O. y Fiechter A.** 1984. *Pseudomonas aeruginosa* biosurfactant production in continuous culture with glucose as carbon source. *Appl. Environ. Microb.* 48, 301-305.
- Gunther NW, Nunez A, Fett W, Solaiman DKY.** 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol* 71:2288-2293.
- Gunther NW, Nunez A, Fortis L, Solaiman DKY.** 2006. Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761. *J Ind Microbiol Biotech* 33:914-920.

Greig, D. M. Travisano. 2008. Density dependent effects on allelopathic interactions in yeast. *Evolution* 62 521-527.

Haba E., Espuny M.J. Busquets M. y Manresa A. 2000. Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 379-387.

Hall.T. A.1999. BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series.* 41;95-98.

Hansen KG, Desai JD and Desai AJ. 1993. A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology. Technology.* 7: 745-748.

Hector J S and A R Johnson. 1990. Determination of genome size of *Pseudomonas aeruginosa* by PFGE: analysis of restriction fragments. *Nucleic Acids Res:* 18(11): 3171–3174

Hemminger P. 2005. Bioremediation of contaminated soils. *Biocycle* 46, 35-38.

Henriksen, A., Anthoni, U., Nielsen, T. H., Sørensen, J., Christophersen, C., and Gajhede, M. 2000. Cyclic lipoundecapeptide tensin from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *Acta Crystal.* 56:113-115.

Hildebrand PD. 1989. Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology.* 11 (3): 205-224.

Hiramoto, M., Okada, K and Nagai, S. 1970. The revised structure of viscosin, a peptide antibiotic. *Tetrahedron Letters* 13; 1087-1090.

Hisatsuka K., Nakahara T., Sano N. y Yamada K. 1971. Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agr. Biol. Chem. Tokyo* 35, 686-692.

Hodge JD, Hofreiter BT. 1962. Determination of reducing sugars and carbohydrates. *Methods in Carbohydrate Chemistry* 1: 380-394.

Huber. B., Riedel, K., Kothe, M., Givskov, M., Molin, S., and Eberl, L. 2002. Genetic analysis of function involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* HIII. *Mol Microbiol.* 46:411-426.

Hultberg M, Alsberg T, Khalil S, Alsanus B. 2010. Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. *BioControl.* doi:10.1007/s10526-009-9261-6.

Hung H.C. y Shreve G.S. 2001. Effect of the hydrocarbon phase on interfacial and thermodynamic properties of two anionic glycolipid biosurfactants in hydrocarbon/water systems. *J. Phys. Chem.* 105, 12596-12600.

Husain S. 2008. Effect of surfactants on pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. *World J Microbiol Biotechnol.* 24:2411-2419.

Hutchinson, M. L., Tester, M. A., and Gross, D. C. 1995. Role of biosurfactants and ion-channel-forming activities of syringomycin in transmembrane ion flux - a model for the 150 mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Mol Plant Microbe Interact.* 8:610-620.

Hutchison, M. I. and Johnstone, K. 1993. Evidence for the involvement of the surface active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42, 373-384.

Itoh S. y Suzuki T. 1972. Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. Agric. Biol. Chem. Tokyo 36, 2233-2235.

Jagtap S, Yavankar S, Pardesi K, Chopade B. 2009. Production of bioemulsifier by *Acinetobacter sp.* from healthy human skin of tribal population. Ind J Expt Biol (in press).

Jain DK, Thompson DLC, Lee H and Trevors JT. 1991. A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. J. Microbiol. Methods. 13: 271-279.

Janiyani KL, Wate SR, Joshi SR. 1992. Surfactant production by *Pseudomonas stutzeri*. J Microb Biotechnol 7:18-21.

Jarvis FG, Johnson MJ. 1949. A Glycolipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. J Am Chem Soc 71:4124-4126

Jean-Frederic Dubern & Guido V. Bloemberg. 2006. Influence of environmental conditions on putisolvins I and II production in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. FEMS Microbiol Lett; 263:169-175.

Jean-Frédéric Dubern. 2005. this Ph.D Thesis, Chapter 2. Regulation of the biosynthesis of Novel cyclic lipopeptides from *Pseudomonas putida* strain PCL1445. ISBN number: 90-9020584-5.

Jean-Marie Meyer, Christelle Gruffaz, Vololoniaina Raharinosy, Irina Bezverbnaya, Mathias Schäfer and Herbert Budzikiewicz. 2008. Siderotyping of fluorescent *Pseudomonas*: molecular mass determination by mass spectrometry as a powerful pyoverdine siderotyping method; Biometals. 21(3):259-71.

Jiménez D. I, Medina S.A.M y Gracida J.N.2010. Propiedades, Aplicaciones y Producción de Biotensoactivos. Rev. Int. Contam. Ambient. 26 (1) 65-84.

Johannesson, K.H., A. Cortés y K.C. Kilroy. 2004. Reconnaissance isotopic and hydrochemical study of Cuatro Ciénegas groundwater, Coahuila, México. *South Am Earth Sci* 17:171-180.

Jun-Rong Wei, Yu-Huan Tsai, Yu-Tze Horng, Po-Chi Soo, Shang-Chen Hsieh, Po Ren Hsueh, Jim-Tong Horng, Paul Williams, and Hsin-Chih Lai. 2006. A Mobile Quorum-Sensing System in *Serratia marcescens*. Journal of Bacteriology; 188 (4) p. 1518-1525.

Kaplan N, Rosenberg E. 1982. Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. Appl Environ Microbiol 44: 1335-1341.

Kielwein, G. 1971. Die Isolierung und Differenzierung von *Pseudomonades* aus Lebensmitteln. - Arch. f. Lebensmittelhyg. 22: 29-37.

Koch AK, Käppeli O, Fiechter A, Reiser J. 1991. Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. J Bacteriol 173: 4212-4219.

Kochi, M., Weiss, D. W., Pugh, L. H. & Groupé, V. 1951. Viscosin, a new antibiotic. Bacteriol Proc 1, 29-30.

Kohli RM, Trauger JW, Schwarzer D, Marahiel MA, Walsh CT. 2001. Generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. Biochemistry. 40:7099-108

Kuiper I, Bloemberg GV & Lugtenberg BJJ. 2001. Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. Mol Plant-Microbe Interact 14: 1197-1205.

- Kuiper I, Lagendijk EL, Pickford R, Derrick JP, Lamers GEM, Thomas-Oates JE, Lugtenberg BJ & Bloemberg GV.** 2004. Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin II and I, which inhibit biofilms formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol* 51: 97-113.
- Kuiper, I., G. V. Bloemberg, and B. J. Lugtenberg.** 2001. Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:1197-1205.
- Kuiper, I., Lagendijk E.L., Bloemberg G.V., and Lugtenberg B.J.** 2004. Rhizoremediation: a beneficial plant-microbe interaction. *Mol Plant Microbe Interact.* 17:6-15.
- Kumar S., K. Tamura y M. Nei.** 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163.
- Kwang-Hyun Cho, Sung-Tae Kim and Young-Kee Kim.** 2007. Purification of a Pore-forming Peptide Toxin, Tolaasin, Produced by *Pseudomonas tolaasii* 6264. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40 (1), pp. 113-118.
- Lane, D.J.** 1991. 16S/23S rDNA sequencing. In E. Strackebrandt and M. Goodfellow (ed), *Bacterial systematics*. John Wiley and Sons, New York, N. Y. *Nucleic acid techniques*, p. 115-175.
- Larry A. Gallagher and Colin Manoil.** 2001. *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 Kills *Caenorhabditis elegans* by Cyanide Poisoning. *Journal of Bacteriology*, p 6207-6214.
- Laycock, M. V., Hildebrand, P.D., Thibault, P., Walter, J.A., and Wright, J.L.C.** 1991. Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 39:483-489.
- Lépine F, Déziel E, Milot S, Villemur R.** 2002. Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J Mass Spectrom* 37:41-46
- Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M.** 2007. Functional analysis of a pyoverdine synthetase from *Pseudomonas sp.* MIS38. *Biosci Biotechnol Biochem.* 71(8):2002-9.
- Lim SP, Roongsawang N, Washio K, Morikawa M.** 2009. Flexible exportation mechanisms of arthrofactin in *Pseudomonas sp.* MIS38. *J Appl Microbiol.* 107(1):157-66.
- Liu Z., Laha S. y Luthy R.G.** 1991. Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in soil-water suspensions. *Water Sci. Technol.* 23, 475-485.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-275.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko y J. Parker.** 2000. *Brock: Biology of Microorganisms*. Prentice Hall. USA.
- Mahajan-Miklos, S., Tan, M.-W., Rahme, L.G., Ausubel, F.M.** 1999. Molecular mechanisms of bacterial virulence elucidated using a *Pseudomonas aeruginosa*-*Caenorhabditis elegans* pathogenesis model. *Cell* 96: 47-56.
- Maidak, B.L., Cole, J.R., Lilburn, T.G., Parker, C.T., Jr, Saxman, P.R., Farris, R.J., Garrity, G.M., Olsen, G.J., Schmidt, T.M., Tiedj, J.M.** 2001. The RDP-II (Ribosomal Data Project), *Nucleic Acids Res.*, 29:173-174.
- Maier R.M. y Soberón-Chávez G.** 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biot.* 54, 625-633.

- Maiqian Nie, Xihou Yin, Chunyan Ren, Yang Wang, Feng Xu and Qirong Shen.** 2010. Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. *Biotechnology Advances*; 28(5), p 635-643.
- Makkar RM, Cameotra SS.** 1997. Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J Ind Microbiol Bioeng* 18: 37-42.
- Makkar RS, Cameotra SS.** 2002. An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 428-434.
- Manso Pajarron A, De Koster CG, Heerma W, Schmidt M, Haverkamp J.** 1993. Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast Atom Bombardment Tandem Mass Spectrometry. *Glycocon. J* 10: 219-226.
- Marina Wild, Alma Delia Caro, Ana Lilia Hernández, Raina M. Miller, and Gloria Soberón Chávez.** 1997. Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiology Letters*; 153: 279-285.
- Marsudi S, Unno H, Hori K.** 2008 Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol.*78(6):955-61.
- Martinez-Toledo A, Rios-Leal E, Vazquez-Duhalt R, Gonzalez-Chavez Mdel C, Esparza-Garcia JF, Rodriguez-Vazquez R.** 2006. Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *P. putida* in different media. *Environ Technol* 27:137-142
- Matsuyama T, Sogawa M and Yano I.** 1987. Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1186-1188.
- Matsuyama, T., T. Murakami, M. Fujita, S. Fujita, and I. Yano.** 1986. Extracellular vesicle formation and biosurfactant production by *Serratia marcescens*. *J. Gen. Microbiol.* 132:865-875.
- McClean, K.H., Winson, M.K., Fish, A., Taylor, A., Chhabra, S.R., Camara, M., Daykin, M., Swift, S., Lamb, J., Bycroft, B.W., Stewart, G.S.A.B. and Williams, P.** 1997. Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum*: exploitation of violacein production and inhibition for the detection of N-acylhomoserine lactones. *Microbiology* 143: 3703-3711.
- Mercade, M.E., Manresa, M.A., Robert, M., Espuny, M.J., de Andres. C. and Guinea, J.** 1993. Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology* 43, 1-6.
- Meyer, E. R.** 1973, Late-Quaternary paleoecology of the Cuatro Ciénegas Basin, Coahuila, Mexico. *Ecology* 54: 982-995.
- Minckley, W.L.** 1969, Environments of the Bolson of Cuatro Ciénegas, Coahuila, Mexico, With Special Reference to the Aquatic Biota: Texas Western Press, The University of Texas at El Paso, 65 pp.
- Mishra PK, Mishra S, Bisht SC, Selvakumar G, Kundu S, Bisht JK, Gupta HS.** 2009. Isolation, molecular characterization and growth-promotion activities of a cold tolerant bacterium *Pseudomonas sp.* NARs9 (MTCC9002) from the Indian Himalayas. *Biol Res.*; 42(3):305-13.
- Monti SM, Gallo M, Ferracane R, Borrelli RC, Ritieni A, Greco ML, Graniti A, Flogiano V.** 2001. Analysis of bacterial lipopeptides by matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight and high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. *Rap Commun Mass Spectrometry.* 15:623-8.

- Morikawa M, Hirata Y, Imanaka T.** 2000. A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim Biophys Acta* 1488: 211-218.
- Mukherjee S, Das P, Sen R.** 2006. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol* 24: 509-515.
- Mulet M., Lalucat J and Garcia-Valdés E.** 2010. DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*: doi:10.1111/j.1462-2920.2010.02181.x.
- Mulligan CN and Gibbs BF.** 1989. Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environment Microbiology* 55: 3016-3019.
- Murata, H. and Magae, Y.** 1996. Toxin production in a mushroom pathogenic bacterium, *Pseudomonas tolaasii* strain PT814 is activated by signals present in a host, *Pleurotus ostreatus*, and those accumulating in the medium in the course of bacterial growth. In: *Mushroom biology and mushroom products*, (ed. Royse, D.J.), pp. 483-494. Pennsylvania State Univ. Press, College Park, Penn.
- National Public Radio,** 2001, The Desert Springs of Mexico's Cuatro Ciénegas: <http://www.npr.org/programs/re/archivesdate/2001/aug/20010827.cienegas.html>, Archive files, August 27, 2001, Morning Edition with John Burnett.
- N Cabrera-Valladares, AP Richardson, C, Gloria Soberón Chávez.** 2006. Monorhamnolipids and 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs) production using *Escherichia coli* as a heterologous host.
- Neu TR, Hartner T, Poralla K.** 1990. Surface active properties of Viscosin a peptidolipid antibiotic. *Appl Microbiol Biotechnol* 32: 518-520.
- Nielsen T.H., Christophersen C, Anthoni U and Sorensen J.** 1999. Viscosinamide, a new cyclic depsipeptide with surfactant and antifungal properties by *P. fluorescens* DR54. *J. Appl Microbiol.* 86:80-90.
- Nielsen TH, Nybroe O, Koch B, Hansen M, Sorensen J.** 2005. Genes involved in cyclic lipopeptide productions are important for seed and straw colonization by *Pseudomonas sp* strain DSS73. *Appl Environ Microbiol*;71(7): 4121-6
- Nitschke M, Costa S, Contiero J.** 2009. Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. *Appl Biochem Biotechnol.* doi:10.1007/s12010-009-8707-8.
- Nitschke M, Costa SG, Contiero J.** 2010. Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. *Appl Biochem Biotechnol.* 160(7):2066-74.
- Nitschke M, Pastore GM.** 2006. Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour Technol* 97: 336-341.
- Nitschke M., Costa S.G.V. y Conteiro J.** 2005a. Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol. Prog.* 21, 1593-1600.
- Nitschke M., Costa S.G.V., Haddad R., Gonçalves L.A.G., Eberlin M.N. y Conteiro J.** 2005b. Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Biotechnol. Prog.* 21, 1562-1566.
- Nunez A, Ashby R, Foglia TA, Solaiman DKY.** 2001. Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. *Chromatographia* 53: 673-677.

- Ochsner, U. A., Fiechter, A. & Reiser, J.** (1994a). Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol Chem* 269,19787–19795.
- Onbasli D, Aslim B.** 2009. Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas spp.* *J Environ Biol* 30:161-163.
- Onbasli D, Aslim B.** 2009. Effects of some organic pollutants on the exopolysaccharides (EPSs) produced by some *Pseudomonas spp.* strains. *J Hazard Mater*;168(1):64-7.
- Palleroni, N.J.** 1984. Genus I *Pseudomonas* Migula 1894. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol.2. Kreig, N.R., and Holt, J.G. (eds). Baltimore, MD. USA: The Williams vs Wilkins Co., pp.323-379.
- Patel, R.M. and Desai, A.J.** 1997. Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology* 25, 91-94
- Patil JR, Chopade BA.** 2001a. Distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species on the skin of healthy humans. *Natl Med J India* 14: 204-208.
- Patil JR, Chopade BA.** 2001b. Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. *J Appl Microbiol* 91: 290-298.
- Persson A, Molin G and Weibull C.** 1990a. Physiological and morphological changes induced by nutrient limitation of *Pseudomonas fluorescens* 378 in continuous culture. *Applied Environment and Microbiology* 56: 686-692.
- Persson A, Molin G, Andersson N and Sjöholm J.** 1990b. Biosurfactant yields and nutrient consumption of *Pseudomonas fluorescens* 378 studied in a microcomputer controlled multifermentation system. *Biotechnology Bioengineer.* 36: 252-255.
- Persson, A., Osterberg, E. and Dostalek, M.** 1988. Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. *Applied Microbiology Biotechnology* 29, 1-4
- Phale PS, Savithri HS, Rao Na, Vaidyanathan CS.** 1995. Production of biosurfactan Biosur-pm by *Pseudomona maltophila* Csv89 Characteriation and Role in Hydrocarbon Uptake. *Arch Microbiol.* 163:424-31
- Phetrong K, H-Kittikun A, Maneerat S.** 2008. Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus subsp. anitratus* SM7. *Songklanakarin J Sci Technol* 30(3): 297-305.
- Raaijmakers Jos M., Irene de Bruijn, and Maarten J. D. de Kock.** 2006. Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated *Pseudomonas spp.* Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation. *MPMI*; 19 (7) pp. 699-710
- I Raaijmakers, J. M., de Kock, M., and de Bruijn.** Cyclic lipopeptide production by lantassoassociated *Pseudomonas species*: diversity, activity, biosynthesis and regulation. *Mol Plant-Microbe Interact Rev.* In press.
- Rahim R, Ochsner UA, Olvera C, Graninger M, Messner P, Lam JS, Soberón-Chávez G.** 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol* 40:708-718
- Rahman P, Lungut A, Idowu J, Olea M.** 2009. Biosurfactant production using novel bacteria from Northeast England. Building business on bioscience sustainable innovation conference. Heriot-Watt University, Edinburgh.

- Rainey PB, Brodey CL, Johnstone K.** 1993. Identification of a gene cluster encoding three high-molecular-weight proteins, which is required for synthesis of tolaasin by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Mol Microbiol*; 8(4):643-52.
- Rapp P, Bock H, Wray V, Wagner F.** 1979. Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *J Gen Microbiol* 115: 491-503.
- Risse D, Beiderbeck H, Taraz K, Budzikiewicz H, Gustine D.**1998. Bacterial constituents part LXXVII. Corrugatina, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugate*. *J. Biosci*; 10;869-80.
- Robert, M., Mercade, M.E., Bosch, M.P., Parra, J.L., Espuny, M.J., Manresa, M.A. and Guinea, J.** 1989. Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44Ti. *Biotechnology Letters* 11, 871-874
- Rodriguez-Verdugo A.** 2008. Variación estacional en la diversidad de *pseudomonas* asociadas a un sistema acuático fluctuante. Tesis de Licenciatura; Facultad de Ciencias. UNAM.
- Roongsawang N., Hase K., Haruki M., Imanaka T., Morikawa M., Kanaya S.** 2003. Cloning and characterization of the gene cluster encoding arthrofactin synthetase from *Pseudomonas sp* MIS38. *Chem. Biol.* 10:869-880.
- Rosenberg E, Zuckerberg A, Rubinovitz C, Gutnick DL.** 1979. Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol* 37: 402-408.
- Rosenberg, E.** 1993. Exploiting microbial growth on hydrocarbons- new markets. *Tibtech.* 11:419-424.
- Sacchi, C.T, A.M. Whitney, L.W. Mayer, R. Morey, A. Steigerwalt, A. Boras, R.S. Weyant y T. Popovic.** 2002. Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid tool for identification of *Bacillus anthracis*. *Emerg Infect Dis* 8: 1117- 1123.
- Shalina Mahajan-Miklos, Man-Wah Tan, Laurence G. Rahme, and Frederick M. Ausubel,** 1999. Molecular Mechanisms of Bacterial Virulence Elucidated Using a *Pseudomonas aeruginosa* -*Caenorhabditis elegans* Pathogenesis Model. *Cell*,(96), 47-56.
- Saitou, N. y M. Nei.** 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4(4): 406-425.
- Scholz-Schroeder, B. K., M. L. Hutchison, I. Grgurina, and D. C. Gross.** 2001. The contribution of syringopeptin and syringomycin to virulence of *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* strain B301D on the basis of *sypA* and *syrB1* biosynthesis mutant analysis. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14:336-348.
- Segre A, Bachmann RC, Ballio A, Bossa F, Grgurina I, Iacobellis NS, Marino G, Pucci P, Simmaco M, Takemoto JY.** 1989. The structure of syringomycins A1, E and G. *FEBS Lett.* 255(1):27-31.
- Shirata, A., Sugaya, K., Takasugi, M. and Monde, K.** (1995). Isolation and biological activity of toxins produced by a Japanese strain of *Pseudomonas tolaasii*, the pathogen of bacterial rot of cultivated oyster mushroom. *Ann. Phytopathol.Soc. Jpn* 61, 493-502.
- Shulga AN, Karpenko EV, Eliseev SA and Turovsky AA.** 1993. The method for determination of anionogenic bacterial surface-active peptidolipids. *Microbiol. J.* 55: 85-88.
- Sieber, S.A., and Marahiel, M.A.** 2005. Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev*; 105: 715-738.
- Siegmund I and Wagner F.** 1991. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas species* grown on mineral agar. *Biotechnology Technology.* 5:265- 268.

- Sim L, Ward OP, Li Z-Y.** 1997. Production and characterization of a biosurfactant isolated from *Pseudomonas aeruginosa* UW-1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 19:232–238.
- Singh PB, Sharma S, Saini HS, Chadha BS.** 2009. Biosurfactant production by *Pseudomonas sp.* and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. *Lett Appl Microbiol.*; 49(3):378-83
- Singh Pooja; Cameotra Swaranjit Singh.** 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in biotechnolog*; 22(3):142-6.
- Singh, P.B. Sharma S., Saini H.S and Chadha B.S.** 2009. Biosurfactant production by *Pseudomonas sp.* and its role in aqueous phase partitioning and biodegradation of chlorpyrifos. *Letters in Applied Microbiology*; 49(3), p 378-383
- Smyth TJP, Perfumo A, Marchant R, Banat IM.** 2009a. Isolation and analysis of low molecular weight microbial glycolipids: Microbiology of hydrocarbons, oils, lipids, and derived compounds. In: Kenneth N. Timmis ed. Springer, UK (in press).
- Smyth TJP, Perfumo A, Marchant R, Banat IM.** 2009b. Isolation and analysis of lipopeptides and high molecular weight biosurfactants: Microbiology of hydrocarbons, oils, lipids, and derived compounds. In Kenneth N. Timmis eds. Springer, UK (in press).
- Soberón-Chávez G, Lépine F, Déziel E.** 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:718-725.
- Sørensen D, Tommy H. Nielsen, Jan Sørensen and Carsten Christophersen.** 2002. Cyclic lipoundecapeptide lokisin from *Pseudomonas sp.* strain DSS41. *Tetrahedron Letters*; 43(25), 4421-4423.
- Sørensen D., T. H. Nielsen, C. Christophersen, J. Sørensen and M. Gajhede.** 2001. Cyclic lipoundecapeptide amphisin from *Pseudomonas sp.* strain DSS73. *Acta Cryst. C57*, 1123-1124
- Souza, V., L. Espinosa-Asuar, A.E. Escalante, L.E. Eguiarte, J. Farmer, L. Forney, L. Lloret, J.M. Rodríguez-Martínez, X. Soberón, R. Dirzo, y J.J. Elser.** 2006. An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the Chihuahuan desert. *Proc Natl Acad Sci* 103(17): 6565-6570.
- Souza, V., L.E. Eguiarte, J. Siefert y J.J. Elser.** 2008. Microbial endemism: does phosphorous limitation enhance speciation? *Nature Rev Microbiol* .10.1038.
- Stackebrandt E., W. Liesak y D.M. Goebel.** 1993. Bacterial diversity in a soil sample of a subtropical Australian environment as determined by 16S rDNA analysis. *FASEB J* 7: 232-236.
- Stanier, R.Y. N.J. Palleroni y M. Doudoroff.** 1966. The aerobic *Pseudomonas* a taxonomic study. - *J Gen Microbiol* 42; 159-271.
- Stoyanov S.D., Rehage H. y Paunov V.N.** 2003. Novel surface tension isotherm for surfactants based on local density functional theory. *Phys. Rev. Lett.* 91, 086102.1-086102.4.
- Strader MB, Tabb DL, Hervey WJ, Pan C, Hurst GB.** 2006. Efficient and specific trypsin digestion of microgram to nanogram quantities of proteins in organic-aqueous solvent systems. *Anal Chem* 78: 125-134.
- Surekha K. Satpute, Arun G. Banpurkar, Prashant K. Dhakephalkar, Ibrahim M. Banat, and Balu A. Chopade.** 2010. Methods for investigating biosurfactants and bioemulsifiers: a review. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1-18, Early Online
- Swofford, D.L.** 2002. PAUP*: Phylogenetic analysis using parsimony and other methods (software). Sunderland, MA: Sinauer Associates.

- Tan MW, Mahajan-Miklos S, Ausubel FM.** 1999. Killing of *Caenorhabditis elegans* by *Pseudomonas aeruginosa* used to model mammalian bacterial pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2:715-20.
- Thaniyavarn J, Roongsawang N, Kameyama T, Haruki M, Imanaka T, Morikawa M, Kanaya S.** 2003. Production and characterization of biosurfactants from *Bacillus licheniformis* F2.2. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 1239-1244.
- Thrane Charlotte, Tommy Harder Nielsen, Mette Neiendam Nielsen, Jan SÖrensen, Stefan Olsson.** 2000. Viscosinamide-producing *Pseudomonas fluorescens* DR54 exerts a biocontrol effect on *Pythium ultimum* in sugar beet rhizosphere. *FEMS Microbiology Ecology* 33;139-146.
- Toren A, Navon-Venezia S, Ron EZ, Rosenberg E.** 2001. Emulsifying activities of purified Alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Appl Environ Microbiol* 67: 1102-1106.
- Touchstone JC and MF Dobbins,** 1983. Eds., *Practice of Thin Layer Chromatography*, Wiley-Interscience, New York., 13.
- Tuleva BK, Ivanov GR, Christova NE.** 2002. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Z Nat Forsch C J Biosci* 57:356-360.
- Vallet-Gely Isabelle, Alexey Novikov, Luis Augusto, Peter Liehl, Ge´rard Bolbach, Maria Pe´chy-Tarr, Pierre Cosson, Christoph Keel, Martine Caroff and Bruno Lemaitre.** 2010. Association of Hemolytic Activity of *Pseudomonas entomophila*, a Versatile Soil Bacterium, with Cyclic Lipopeptide Production. *Applied and Environmental Microbiology*; p. 910-921.
- Van der Vegt W, Vander HC, Noordmans MJ and Busscher HJ.** 1991. Assessment of bacterial biosurfactant production through axisymmetric drop shape analysis by profile. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 35: 766-770
- Vandamme, B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, J. Swings.** 1996. Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev.* 60: 407–438.
- Vasileva-Tonkova E, Galabova D, Stoimenova E, Lalchev Z.**2006. Production and properties of biosurfactants from a newly isolated *Pseudomonas fluorescens* HW-6 growing on hexadecane. *Z Nat Forsch C J Biosci* 61:553-559.
- Venkataramana, K. and Karanth, N.G.** 1989. Factors affecting biosurfactante production using *Pseudomonas aeruginosa* CFTR-6 under submerged conditions. *Journal of Chemical Technology Biotechnology* 45, 249-257
- Wang N, Shi-En Lu, Qingwu Yang, Sing-Hoi Sze, and Dennis C. Gross.** 2006. Identification of the *syr-syp* Box in the Promoter Regions of Genes Dedicated to Syringomycin and Syringopeptin Production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* B301D. *Journal of Bacteriology*, p. 160-168.
- Wang, N., Lu, S.-E., Records, A. R., Gross, D. C.** 2006. Characterization of the Transcriptional Activators SalaA and SyrF, Which Are Required for Syringomycin and Syringopeptin Production by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *J. Bacteriol.* 188: 3290-3298.
- Wayne, L.G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O.Kandler, M.I. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murray, E.Stackebrandt, M.P. Starr y H.G. Trüper.** 1987. Report of the *ad hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 35: 463–464.
- Whiteley M, Lee KM, Greenberg EP.** 1999. Identification of genes controlled by quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 13904-13909.

Wilson NG, Bradley G .1996. The effect of immobilization on rhamnolipid production by *Pseudomonas fluorescens*. *J Appl Bacteriol* 81:525-530.

Winson, M.K., Swift, S., Fish, L., Throup, J.P., Jorgensen, F., Chhabra, S.R, B.W., Williams, P. and Stewart, G.S.A.B. 1998. Construction and analysis of *luxCDABE* based plasmid sensors for investigating N-acylhomoserine lactone mediated quorum sensing. *FEMS Microbiol. Lett.* 163: 185-192.

Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol Rev* 51: 221-271.

Woese, C.R., O. Kandler y M.L. Wheelis. 1990. Towards a natural system of organisms:proposal for the domains Archaea, Bacteria, and Eucarya. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 4576-4579.

Xia, X. y Z. Xie. 2001. DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *Journal of Heredity* 92: 371-373.

Y. Zhang, R. M. Miller. 2002. Enhancement of octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3276-3282.

Yakimov MM, Timmis KN, Wray V, Fredrickson HL. 1995. Characterization of a new lipopeptide surfactant produced by thermotolerant and halotolerant subsurface *Bacillus licheniformis* BAS50. *Appl Environ Microbiol* 61:1706-1713.

Zhu K, Rock CO. 2008. RhIA converts beta-hydroxyacyl-acyl carrier protein intermediates in fatty acid synthesis to the betahydroxydecanoyl-beta-hydroxydecanoate component of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 190:3147-3154

la la la

EscucharLeer fonéticamente

Elsevier Editorial System(tm) for Systematic and Applied Microbiology
Manuscript Draft

Manuscript Number: SAM 3335R3

Title: Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin

Article Type: Full Length Papers

Section/Category: Applied and Ecological Microbiology

Keywords: *Pseudomonas*; biosurfactants; bacterial taxonomy.

Corresponding Author: Dr. Gloria Soberón-Chávez, Ph. D.

Corresponding Author's Institution: Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México

First Author: Jeiry Toribio, M. in Sc.

Order of Authors: Jeiry Toribio, M. in Sc.; Ana E Escalante, PhD; Jesús Caballero-Mellado, PhD; Andrea González-González, M in Sc.; Sergio Zavala, M. in Sc.; Valeria Souza, PhD; Gloria Soberón-Chávez, PhD

Abstract: The aim of this work is the taxonomic characterization of three biosurfactant-producing bacterial isolates from the Churince system at Cuatro Ciénegas Basin (CCB) in the Mexican State of Coahuila, and the study of the possible role of biosurfactant production in their ecology and evolution. We determined that these isolates belong to a *Pseudomonas koreensis* lineage endemic to CCB, using standard taxonomical techniques, phylogenetic analysis of three chromosomal loci and phenotypic characterization. This new lineage has the distinct capacity to produce a biosurfactant when compared with previously reported *P. koreensis* isolates recovered from agricultural soils in Korea. We present evidence suggesting that the biosurfactant secreted by CCB *P. koreensis* strains is involved in their ability to compete with a CCB *Exiguobacterium aurantiacum* strain (m5-66) used as a model organism in competition experiments. Furthermore, the ethyl acetate extract of culture supernatant of CCB *P. koreensis* strains results in growth inhibition not only of *E. aurantiacum* m5-66, but also of a *Bacillus subtilis* type strain (ATCC6633). Based on these results we propose that the production of biosurfactant could be of ecological importance and could play a role in the separation of the *P. koreensis* CCB lineage.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Title: Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas*
2 *koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin.

3 Authors: Jeiry Toribio¹, Ana E. Escalante^{2a}, Jesús Caballero-Mellado^{1,3},
4 Andrea González-González², Sergio Zavala¹, Valeria Souza² and
5 Gloria Soberón-Chávez^{1*}

6 Addresses: ¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de
7 Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de
8 México, Apartado Postal 70228, DF, Mexico

9 ²Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología,
10 Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275,
11 México DF 04510, Mexico.

12 ³Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas,
13 Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A,
14 Cuernavaca, Morelos 62200, Mexico.

15
16 The authors dedicate this work to the memory of Jesus Caballero, our beloved
17 friend and colleague, who died on October 16th, 2010.

18
19 ^aPresent address: Department of Ecology Evolution and Behavior, University of
20 Minnesota, Saint Paul, MN 55108, USA.

21 Running title: Novel *Pseudomonas koreensis* lineage endemic to Cuatro Ciénegas

22 Key words: *Pseudomonas*; biosurfactants; bacterial taxonomy.

23 Section: Applied and Ecological Microbiology.

24
25
26

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 ABSTRACT

2 The aim of this work is the taxonomic characterization of three biosurfactant-
3 producing bacterial isolates from the Churince system at Cuatro Ciénegas Basin
4 (CCB) in the Mexican State of Coahuila, and the study of the possible role of
5 biosurfactant production in their ecology and evolution. We determined that these
6 isolates belong to a *Pseudomonas koreensis* lineage endemic to CCB, using
7 standard taxonomical techniques, phylogenetic analysis of three chromosomal loci
8 and phenotypic characterization. This new lineage has the distinct capacity to
9 produce a biosurfactant when compared with previously reported *P. koreensis*
10 isolates recovered from agricultural soils in Korea. We present evidence
11 suggesting that the biosurfactant secreted by CCB *P. koreensis* strains is involved
12 in their ability to compete with a CCB *Exiguobacterium aurantiacum* strain (m5-66)
13 used as a model organism in competition experiments. Furthermore, the ethyl
14 acetate extract of culture supernatant of CCB *P. koreensis* strains results in growth
15 inhibition not only of *E. aurantiacum* m5-66, but also of a *Bacillus subtilis* type
16 strain (ATCC6633). Based on these results we propose that the production of
17 biosurfactant could be of ecological importance and could play a role in the
18 separation of the *P. koreensis* CCB lineage.

19 INTRODUCTION

20 Biosurfactants are molecules produced by living cells that have the ability to reduce
21 interfacial and superficial tensions (tension-active properties). Their production by
22 bacteria has been studied mainly from the perspective of their biotechnological
23 potential [2], but their role in the adaptation of these organisms to different
24 environments has not been addressed. Biosurfactant-producing organisms are
25 very diverse and have been isolated from a wide variety of environments, including
26 soil, sea water, marine sediments, oil fields [3, 21] and even extreme environments
27 [4]. Several fluorescent *Pseudomonas* produce cyclic lipopeptides (CLPs) [15],
28 which have been found to possess antibiotic properties [6, 14]. Thus, CLPs
29 producing *Pseudomonas* have been used as biocontrol agents in agriculture [12,
30 15] and have different potential biotechnological applications.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 However, the role of CLPs in the ecology and evolution of the bacteria that produce
2 them has not been addressed, even though these compounds should play an
3 important role since it is known that competition for limiting resources can promote
4 antibiotic production [11] and maintain diversity in non homogeneous environments
5 [1, 17].

6 Cuatro Ciénegas basin (CCB) is an oasis in the heart of the Chihuahuan desert
7 located in the Mexican State of Coahuila, its water systems are known to be
8 among the most extreme oligotrophic sites on earth [8], and at the same time,
9 represents a hot spot of biodiversity [9, 19], including abundant living stromatolites
10 and extensive microbial mats [7, 8, 18, 19]. Thus, the study of the mechanisms that
11 bacteria use to compete for resources in this environment is of ecological and
12 evolutionary interest and could lead to relevant biotechnological discoveries.

13 In this work, we sampled two water bodies in the CCB Churince system, and
14 characterized three *P. koreensis* isolates that have the distinct capacity to produce
15 biosurfactant. The phylogenetic trees constructed with their sequence of 16S
16 rRNA, RecA and GyrB encoding genes shows that these three *P. koreensis* strains
17 constitute a separate lineage from *P. koreensis* strains originally isolated in Korea
18 [13]. We found that the three CCB *P. koreensis* isolates have very similar
19 phenotypic characteristics to the *P. koreensis* type strain LMG21318^T, but that they
20 can be distinguished from the type strain by their ability to produce biosurfactant,
21 possibly a cyclic lipopeptide (CLP). In addition, we report that the CCB *P.*
22 *koreensis* strains can limit the growth of an *Exiguobacterium aurantiacum* strain
23 (m5-66) by means of biosurfactant production, and that this tension-active
24 compound secreted by CCB *P. koreensis* strains also inhibits the growth of a
25 *Bacillus subtilis* type strain (ATCC6633).

26 The ability to inhibit bacterial growth could be of importance for the adaptation of *P.*
27 *koreensis* strains to the CCB oligotrophic environment, and could thus be involved
28 in the separation of this lineage from previously described *P. koreensis* isolates
29 inhabiting Korean agricultural soils. We propose that biosurfactant-production by
30 the three *Pseudomonas* CCB isolates described here is relevant for their

1 adaptation to an aquatic environment and thus have played a role in the evolution
2 of this particular taxonomic group.

3 4 MATERIALS AND METHODS

5 The detailed description of the materials and methods used in this work is
6 presented in the supplementary materials section. The methods described are
7 related to: microbiological procedures; determination of biofilm forming ability;
8 methods for taxonomical characterization of bacteria; bacterial competition
9 experiments; determination of growth inhibition by biosurfactant and extracellular
10 compounds; biosurfactant purification and activity determination.

11 GenBank accession numbers for CCB *P. koreensis* 16S rDNA sequences are:
12 M9b-GU078447; M9c-GU078448 and CCB10-GU078446. Those for *P. koreensis*
13 *recA* gene sequences are: M9b-GU176619; M9c-GU078450, CCB10-GU078445
14 and LMG21318^T-GU078444; and for *P. koreensis gyrB* gene sequences are: M9b-
15 GU078440; M9c-GU078441, CCB10- GU732197 and LMG21318^T-GU078442.

16 RESULTS AND DISCUSSION

17 **Taxonomical characterization of CCB *Pseudomonas koreensis* lineage.** The
18 three bacterial strains endemic to the Churince water system in CCB that are
19 described in this work were selected from a collection of ≈ 700 *Pseudomonas*
20 isolates. Strain CCB10 was isolated from the Churince “Laguna Grande” on
21 January 2004, as part of a study of the most abundant *Pseudomonas* species
22 present in this water body (Rodríguez-Verdugo *et al.*, unpublished). The other two
23 strains (M9b and M9c) studied, were isolated through a screening of biosurfactant
24 producing *Pseudomonas* on July 2007 from the Churince spring. The
25 microbiological characterization of these strains showed that they are non-
26 fluorescent Pseudomonads with an optimal growth temperature of 30° C.

27 An analysis based on 16S rDNA sequence similarities indicated that the closest
28 relatives of the CCB *Pseudomonas* isolates were *Pseudomonas koreensis*
29 LMG21318^T and Ps 1-2 (98.9 and 98.7% identity, respectively), *Pseudomonas*
30 *umsongensis* LMG21317^T (98.6% identity) and *Pseudomonas jessenii* CIP105274^T

1 (97.9% identity). These three species were originally isolated from agricultural soils
2 in Korea and were reported to be particular to that environment due to the soil
3 characteristics and the isolation of the Korean peninsula [13].

4 The phylogenetic tree based on 16S rDNA sequences (Fig. 1) illustrates the
5 position of the three CCB *Pseudomonas* studied relative to members of
6 *Pseudomonas* species. These strains clustered within a single group that was very
7 close, but clearly separated from the group formed by the closely related *P.*
8 *koreensis* type and reference strains. These data suggested that the isolates
9 analyzed in the present study could represent a novel *Pseudomonas* species. We
10 used the sequence of *recA* and *gyrB* genes to more clearly establish their
11 taxonomical relation with bacteria from the *P. koreensis* species. Results from the
12 phylogenetic analysis of *recA* and *gyrB* genes (Figs. S2 and S3, respectively) are
13 consistent with the results obtained with the 16S rDNA sequence, since the three
14 strains, CCB10, M9b and M9c, are grouped with *P. koreensis* type strain
15 LMG21318^T, but form a separate cluster.

16 A striking difference between strain CCB10 and both M9b and M9c isolates is the
17 size of its chromosome since it is considerably larger (Table 1). Additionally, *P.*
18 *koreensis* CCB10 contains a megaplasmid (data not shown).

19 As expected, the three individuals of the putative new bacterial species
20 represented by CCB *Pseudomonas* show a high degree of total DNA similarity
21 between them. This is, between strains M9b and M9c (94.9%) and between M9b
22 and CCB10 (75.4%). These results confirm that the three isolates belong to the
23 same bacterial species since the three of them have a high degree of similarity,
24 considering the size of their genomes (Table 1).

25 Unexpectedly, however, we found that these strains did not represent a new
26 bacterial species [20], but that they are members of *P. koreensis*, since the
27 percentage of DNA hybridization between M9 and the *P. koreensis* LMG21318^T
28 type strains (83.2) is clearly above the 70% level established for members of the
29 same bacterial species. This result makes apparent that nearly all the M9b 4.5 Mb
30 genome is conserved in the 5.9 Mb *P. koreensis* LMG21318^T genome (Table 1).

31 This experiment made also clear that M9b shared a low degree of genome

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 similarity with other *Pseudomonas*, even though it has a high 16S rDNA sequence
2 similarity with them (Table 1).

3 The fact that strains M9b, M9c and CCB10 belong to *P. koreensis* is confirmed by
4 the comparison of total protein electrophoretic profiles of these strains with those of
5 the *P. koreensis* type strain, and the phylogenetically closest *P. umsongensis* and
6 *P. jessenii* type strains. We found that the protein profiles of these CCB strains are
7 identical to that of *P. koreensis* LMG21318^T type strain (Fig. 2) which supports our
8 conclusions that these CCB strains belong to this bacterial species, as it has been
9 determined that bacteria with identical or similar protein patterns possess high
10 levels of genome similarity [20]. This conclusion was further supported by the
11 metabolic similarity between the three CCB isolates and the *P. koreensis* type
12 strain using API 20NE and API50CH biochemical tests (Table S1), and by the
13 analysis of their fatty acid composition (Table S2).

14 Indeed, the fatty acid composition of the four analyzed *P. koreensis* strains (three
15 CCB isolates and one Korean strain) is very similar, showing their close taxonomic
16 relation. However, a close analysis of this profile shows that the three CCB *P.*
17 *koreensis* strains present two times the concentration of C_{10:0} 3-OH as the Korean
18 type strain LMG21318^T; while the type strain contains three times the concentration
19 of C_{17:0 cyclo} than the CCB *P. koreensis* strains (Table S2). The relevance of these
20 differences is not known, but they reinforce the finding based on gene phylogeny
21 that the CCB *P. koreensis* constitute a separate lineage from the Korean *P.*
22 *koreensis* strains. This is, CCB strains belong to the same species (*P. koreensis*),
23 but to a different lineage.

24 The characterization of CCB10, M9b and M9c isolates led us to conclude that they
25 represent a distinct *P. koreensis* lineage (or subspecies) endemic to the Churince
26 CCB water system which has diverged from the taxonomic group represented by
27 the Korean *P. koreensis* type strain. A possible scenario is that this lineage
28 diverged from the Korean *P. koreensis* population due to their geographical
29 isolation since the separation of CCB from the ocean, possibly in the Cretaceous
30 period [19].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 **Role of biosurfactant production by CCB *P. koreensis* strains on their ability**

2 **to compete with other bacteria.** One of the phenotypic differences between the
3 CCB isolates M9b, M9c and CCB10 *P. koreensis* strains and the LMG21318^T type
4 strain is that the Korea-isolated type strain does not produce biosurfactant (Fig.
5 S6).

6 Some *Pseudomonas* CLPs have tension-active properties and all of the
7 biosurfactant lipopeptides have been shown to exhibit antibiotic activity [6, 12, 14].
8 We evaluated whether biosurfactant production by CCB *P. koreensis* strains
9 enable them to inhibit the growth of other bacteria. This capacity could play an
10 important ecological role when competing for scarce resources, and thus might be
11 relevant in the CCB environment.

12 It has been shown that biosurfactants have antimicrobial activity [6, 12, 14], but the
13 ecological role that they might play in the competition for resources in the
14 environment among microorganism, has not been addressed to our knowledge.

15 Biosurfactant activity is dependent on its concentration, thus their production could
16 be a mean for bacterial competition for resources only in confined environments
17 such as biofilms, where they are not diluted. It is important to highlight that the
18 three *P. koreensis* CCB isolates as well as the Korean *P. koreensis* type strain are
19 able to form biofilms. After 24 hr, strain M9b produced 33%, M9c 41.5% and
20 CCB10 48% of the biofilm produced by *P. aeruginosa* PAO1 used as a positive
21 control in these experiment, while strain LMG21318^T produced only 23%.

22 To determine whether biosurfactant production enables *P. koreensis* CCB strains
23 to compete with other bacteria, we analyzed the correlation between the production
24 of this tension-active compound, with the ability to compete with the Gram-positive
25 yellow-colored *E. aurantiacum* m5-66. Strain m5-66, a Churince CCB isolate
26 recovered at the intermediate lagoon (Rebollar, E. and Souza V., unpublished),
27 was used as a model organism to study the ability of *P. koreensis* to establish
28 allelopathic interactions. We use this bacterium because it has a characteristic
29 yellow pigmentation, so it is easy to detect without the use of antibiotics or other
30 selecting agents (Fig. S4), but we do not want to imply that the interaction between

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 these two bacterial genera is of ecological importance. The mean and standard
2 deviation of four independent competition experiments are shown on Table 2.

3 There is a positive correlation between biosurfactant production and the ability to
4 compete with *E. aurantiacum* m5-66 (Table 2). The three CCB *P. koreensis*
5 biosurfactant producers were observed to significantly reduce the numbers of the
6 *E. aurantiacum* m5-66 colonies when both bacteria were co-cultured at a 1:1
7 proportion (Table 2, Fig. S4). In contrast, *P. koreensis* LMG21318^T had a non-
8 significant effect on the growth of *E. aurantiacum* m5-66 (Table 2, Fig. S4). We
9 also found that the presence of an ethyl acetate culture supernatant extract
10 (EACSE) containing the biosurfactant produced by the CCB *P. koreensis* strains
11 (Fig. S5) had a dramatic effect on the growth of this Gram-positive bacterium
12 (Tables 2 and 3).

13 To further investigate whether the ability to inhibit the growth of CCB *P. koreensis*
14 strains was due to their biosurfactant production, LMG21318^T cultures were
15 supplemented with the EACSE of *P. koreensis* M9b cultures containing the
16 biosurfactant (Table 2). The addition of this extract clearly enhanced the ability of
17 the *P. koreensis* LMG21318^T type strain to compete with *E. aurantiacum* m5-66
18 (Table 2).

19 To examine if growth inhibition of *E. aurantiacum* m5-66 was due to the direct
20 effect of the biosurfactant, this compound was purified from TLC plates and added
21 to a culture of this bacterium (Fig. S5-B shows an example of a TLC plate where
22 the purity of the biosurfactant was determined). We could not determine the exact
23 concentration of the purified biosurfactant since the dried material that was
24 weighted after being scratched from the TLC plates probably contained some
25 silica. The culture of *E. aurantiacum* m5-66 grown for 10 hr on PPGAS in the
26 presence of the purified biosurfactant (150 µg of the weight precipitate containing
27 the pure biosurfactant per ml of culture medium) attained 25% of the colony
28 forming units of the untreated control (data not shown). This result shows that CCB
29 *P. koreensis* biosurfactant is able to inhibit the growth of bacteria and is in
30 agreement with previous reports [6, 12, 14]. However, we could not rule out the
31 possibility that other compounds with antibiotic activity, besides the biosurfactant,

1
2
3
4 1 are present in the culture supernatant of the CCB *P. koreensis* strains and absent
5
6 2 from the Korean type strain LMG21318^T. The chemical characterization of the
7
8 3 biosurfactant produced by CCB *P. koreensis* strains remains to be determined, but
9
10 4 based on preliminary characterization, it is much likely a cyclic lipopeptide, as that
11
12 5 produced by other *Pseudomonas* [6, 12, 14, 15].

13 6 The EACSE obtained from the three CCB *P. koreensis* strains studied here posses
14
15 7 the ability to inhibit growth of another Gram-positive bacterium, *Bacillus subtilis*
16
17 8 type strain ATCC6633 (Table 3), while that obtained from *P. koreensis* LMG21318^T
18
19 9 was unable to inhibit the growth of *B. subtilis* ATCC6633 and *E. aurantiacum* m5-
20
21 10 66 even using two times the concentration of its EACSE (Tables 2 and 3). Other
22
23 11 Gram-positive and Gram-negative bacteria (see Materials and Methods section)
24
25 12 were found to be resistant to the growth-inhibiting effect of CCB *P. koreensis*
26
27 13 strains (data not shown).

28 14 **Ecological and evolutionary considerations.** Using three genetic *loci* (16S
29
30 15 rDNA, *recA* and *gyrB*) we showed that the CCB *P. koreensis* strains form a distinct
31
32 16 evolutionary group within the *P. koreensis* species. However, the only phenotypic
33
34 17 traits that were clearly distinctive of the CCB *P. koreensis* lineage are their ability to
35
36 18 produce biosurfactant and their capacity to inhibit the growth of other bacteria
37
38 19 (such as *E. aurantiacum* m5-66 and *B. subtilis* ATCC6633). Our results suggest
39
40 20 that this tension-active compound could be implicated in the ability of *P. koreensis*
41
42 21 to compete with other bacteria present in the same environment. It is possible that
43
44 22 the production of this biosurfactant is of ecological importance, playing a role in the
45
46 23 separation of the CCB *P. koreensis* lineage. It will be of interest to further
47
48 24 investigate the details of the potential ecological role of this biosurfactant
49
50 25 production and the actual effect that interference competition interactions, such as
51
52 26 the one described here, plays in bacterial diversity.

53 27 The taxonomic classification of bacteria is difficult because fundamental concepts,
54
55 28 such as the definition of the ecologically meaningful unit or species, are under
56
57 29 debate [5, 10, 16]. The operative definition of a bacterial species has been defined
58
59 30 empirically and thus relies on established limits; i. e. bacteria having 97% or more
60
61 31 16S rDNA sequence identity and 70% or more total DNA:DNA hybridization [5, 20].

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 The inclusion of ecological traits in species delimitation has been used in different
2 biological groups, especially in cases where there can be ambiguity because of
3 high phenotypic and/or genetic similarity. However, in the case of bacteria these
4 traits are not usually taken into account for taxonomic classification. Here, the
5 inclusion of some phenotypic traits enabled us to hypothesize that biosurfactant
6 production might have a role in *P. koreensis* mode of life in the CCB conditions,
7 while it might not be of importance for the lineage or subspecies living in the
8 Korean peninsula. The approach that integrates phenotypic characterization of
9 bacteria might be of importance in the study of bacterial speciation and could link
10 this process with ecological significant concepts.

11
12 **ACKNOWLEDGEMENTS**

13 We are grateful to Lourdes Martínez-Aguilar for her technical assistance, to Arturo
14 Becerra for his critical comments on phylogenetic analysis and to Jessica
15 Hernández for standardization of TLC conditions. We also acknowledge Alejandra
16 Rodríguez-Verdugo and Eria Rebollar for providing *P. koreensis* strain CCB10 and
17 *E. aurantiacum* m5-66, respectively. Part of the work done in Gloria Soberón-
18 Chávez laboratory was supported by DGPA-UNAM PAPIIT IN202510. This
19 manuscript was done while Valeria Souza was on sabbatical in UCI with support of
20 DGAPA. This work represents Jeiry Toribio's PhD thesis done in Programa de
21 Doctorado en Ciencias Biomédicas, UNAM and she received a CONACYT
22 scholarship during her studies.

23
24 **REFERENCES**

25 1. P. Amarasekare, Interference competition and species coexistence. Proc.
26 Biol. Sci. 269 (2002) 2541-2550.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

- 1 2. I. M. Banat, R. S. Makkar, S. S. Cameotra. Potential commercial
2 applications of microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53 (2000)
3 495-508.
- 4 3. A. A. Bodour, K. P. Drees, R. M. Maier, Distribution of biosurfactant-
5 producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils.
6 *Appl. Environ. Microbiol.* 69 (2003) 3280-3287.
- 7 4. S. S. Cameotra, R. S. Makkar, Synthesis of biosurfactants in extreme
8 conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50 (1998) 520-529.
- 9 5. F. M. Cohan, E. B. Perry, A systematic for discovering the fundamental units
10 of bacterial diversity. *Curr. Biol.* 17 (2007) R373- R386.
- 11 6. P. Das, S. Mukherjee, R. Sen, Antimicrobial potential of lipopeptide
12 biosurfactant. *J. Appl. Microbiol.* 104 (2008) 1675-1684.
- 13 7. C. Desnues, B. Rodriguez-Brito, S. Rayhawk, S. Kelley, T. Tran, M. Haynes,
14 H. Liu, M. Furlan, L. Wegley, B. Chau, Y. Ruan, D. Hall, F. E. Angly, R. A.
15 Edwards, L. Li, R. V. Thurber, R. P. Reid, J. Siefert, V. Souza, D. L.
16 Valentine, B. K. Swan, M. Breitbart, F. Rohwer, Biodiversity and
17 biogeography of phages in modern stromatolites and thrombolites. *Nature*
18 54 (2008) 340-343
- 19 8. J. J. Elser, J. Watts, J. H. Schampel, J. D. Farmer, Early Cambrian food
20 webs on a trophic knife-edge? A hypothesis and preliminary data from a
21 modern stromatolite-based ecosystem. *Ecol. Lett.* 9 (2006) 295–303.
- 22 9. A. E. Escalante, L. E. Eguiarte, L. Espinosa-Asuar, L. J. Forney, A. M.
23 Noguez, V. Souza, Diversity of aquatic prokaryotic communities in the
24 Cuatro Ciénegas basin. *FEMS Microbiol. Ecol.* 65 (2008) 50-60.
- 25 10. C. Fraser, E. J. Alm, M. F. Polz, B. G. Spratt, W. P. Hanage, The bacterial
26 species challenge: Making sense of genetic and ecological diversity.
27 *Science* 323 (2009) 741-746.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 11.M. E. Hibbing, C. Fuqua, M. R. Parsek, S. B. Peterson, Bacterial
2 competition: survival and thriving in the microbial jungle. Nat. Rev. Microbiol.
3 8 (2010) 15-25.

4 12.M. Hultberg, K.-J. Bergstrand, S. Khalil, B. Alsanius, Characterization of
5 biosurfactant-producing strains of fluorescent *Pseudomonads* in a soilless
6 cultivation system. *Antonie van Leeuwenhoek* 94 (2008) 329–334.

7 13.S. W. Kwon, J. S. Kim, I. C. Park, S. H. Yoon, D. H. Park, C. K. Lim, S. J.
8 Go, *Pseudomonas koreensis* sp. nov., *Pseudomonas umsongensis* sp. nov.
9 and *Pseudomonas jinjuensis* sp. nov., novel species from farm soils in
10 Korea. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53 (2003) 21-27.

11 14.T. H. Nielsen, D. Sørensen, C. Tobiasen, J. B. Andersen, C. Christophersen,
12 M. Givskov, J. Sørensen, Antibiotic and biosurfactant properties of cyclic
13 lipopeptides produced by fluorescent *Pseudomonas* spp. from the sugar
14 beet rhizosphere. *Appl. Environ. Microbiol.* 68 (2002) 3416-3423.

15 15.J. M. Raaijmakers, I. de Bruijn, M. J. D. de Kock, Cyclic lipopeptide
16 production by plant-associated *Pseudomonas* spp.: Diversity, activity,
17 biosynthesis, and regulation. *Mol. Plant Microbe Int.* 19 (2006) 699-710.

18 16. A. C. Retchless, J. G. Lawrence, Temporal fragmentation of speciation in
19 bacteria. *Science* 317 (2007) 1093-1096.

20 17.T. W. Schoener, Field experiments on inter-specific competition. *Am. Nat.*
21 122 (1983) 240-285.

22 18.V. Souza, L. E. Eguiarte, J. Siefert, J. J. Elser, Microbial endemism: does
23 phosphorus limitation enhance speciation? *Nat. Rev. Microbiol.* 6 (2008)
24 559-564.

25 19.V. Souza, L. Espinosa-Asuar, A. E. Escalante, L. E. Eguiarte, J. Farmer, L.
26 Forney, L. Lloret, J. M. Rodríguez-Martínez, X. Soberón, R. Dirzo, J. J.
27 Elser, An endangered oasis of aquatic microbial biodiversity in the
28 Chihuahuan desert. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 103 (2006) 6565-6570.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 20.P. Vandamme, B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, J. Swings,
2 Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics.
3 Microbiol. Rev. 60 (1996) 407–438.

4 21.M. M. Yakimov, P. N. Golyshin, S. Lang, E. R. B. Moore, W. R. Abraham, H.
5 Lunsdorf, K. N. Timmis. *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new,
6 hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. *Int. J.*
7 *Syst. Bacteriol.* 48 (1998) 339-348.

8
9
10
11
12

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 Table 1. Genomic characteristics of different *Pseudomonas* strains.

Strain	% DNA hybridization vs. <i>P. koreensis</i> M9b	Genome size (kb)
<i>P. koreensis</i> M9b	100.00	4,453
<i>P. koreensis</i> M9c	94.9	4,605
<i>P. koreensis</i> CCB10	75.4	6,077
<i>P. koreensis</i> LMG21318 ^T	83.2	5,914
<i>P. umsongensis</i> LMG21317 ^T	39.4	6,858
<i>P. jessenii</i> CIP105274 ^T	41.9	6,580
<i>P. putida</i> KT2440	12.37	6,181

2
3
4

1 Table 2. Competition between different *P. koreensis* strains and *E. aurantiacum*
 2 m5-66^a.

<i>P. koreensis</i> strain	<i>P. koreensis</i> (CFU x 10 ⁷)		<i>E. aurantiacum</i> m5-66 (CFU x 10 ⁷)		Comp	E ₂₄ (%)
	Initial	Final	Initial	Final		
M9b	4.3	380 _± 8	0		NA	60
M9b	4.3	448 _± 19	4.8	3.5 _± 0.2	+	60
M9c	4.5	318 _± 9	0		NA	58
M9c	4.5	418 _± 41	4.8	39 _± 1	+	56
CCB10	4.7	338 _± 17	0		NA	63
CCB10	4.7	355 _± 12	4.8	4.2 _± 1.7	+	63
LMG21318 ^T	4.6	322 _± 12	0		NA	5
LMG21318 ^T	4.6	308 _± 12	4.8	180 _± 8	-	5
LMG21318 ^T + EACSE	5.2	463 _± 6	0		NA	59
LMG21318 ^T + EACSE	5.2	363 _± 31	4.8	27 _± 8	+	59
None	0		3	377 _± 12	NA	0
None + EACSE	0		3	<10	NA	ND

3
 4 ^aCompetition (Comp) was determined using a 1:1 proportion of each strain after 24
 5 hr of growth on PPGly medium. It was considered positive (+) when the presence
 6 of the *P. koreensis* strain reduced the final number of *E. aurantiacum* m5-66 colony
 7 forming units per milliliter (CFU) in approximately one order of magnitude or more,
 8 and negative (-) when a insignificant lower reduction was found. EACSE stands for
 9 ethyl acetate culture supernatant extract. NA means not applicable. The mean and
 10 standard deviation of four independent experiments are shown. The E₂₄ index is
 11 shown as a qualitative measure of biosurfactant concentration present in the
 12 medium at the end of the experiment.

1 Table 3. Effect of the addition of the ethyl acetate culture supernatant extract
 2 (EACSE) of different *P. koreensis* strains on growth of *E. aurantiacum* m5-66 and
 3 *B. subtilis* ATCC6633^a.

Bacteria	Without EACSE	EACSE M9b	EACSE M9c	EACSE CCB10	EACSE LMG21318 ^T	2X-EACSE LMG21318 ^T
<i>B. subtilis</i> ATCC6633	1.58 ± 0.14	0.06 ± .03	0.17 ± .01	0.35 ± .09	1.09 ± 0.1	1.19 ± 0.1
<i>E. aurantiacum</i> m5-66	1.01 ± 0.02	0.05 ± 0.02	0.68 ± 0.01	0.19 ± 0.07	0.93 ± 0.16	1.18 ± 0.01

4
 5 ^aGrowth was determined by measuring the optical density at 600 nm of the culture
 6 after 12 hr of growth. *E. aurantiacum* m5-66 was incubated at 30°C and *B. subtilis*
 7 ATCC6633 at 37°C. Both strains were cultivated on LB medium. Values represent
 8 the mean ± standard deviation of at least three independent experiments. EACSE
 9 of the culture on PPGAS for 24 hr of each *P. koreensis* strain was added at the
 10 onset of the cultures of the two Gram-positive strains tested. All cultures presented
 11 an initial optical density of approximately 0.03.

12 FIGURE LEGENDS

13
 14 Figure 1. Genealogy of the 16S rRNA gene of *P. koreensis* CCB (M9b, M9c and
 15 CCB10) and Korean (LMG21318^T type strain and Ps 1-2) strains, and the most
 16 closely related members of the genus *Pseudomonas*. GenBank accession
 17 numbers are shown in parenthesis. The correspondence of the size of bar to the
 18 number of substitutions per site is included. The *P. koreensis* sequences from CCB
 19 isolates are shown in bold characters.

20
 21 Figure 2. Total protein electrophoretic profile of different *Pseudomonas* strains.
 22 Lanes correspond to: 1) *P. putida* F1; 2) *P. jessenii* LMG21605^T; 3) *P. koorensis*
 23 CCB10; 4) *P. koreensis* M9b; 5) *P. koreensis* M9c; 6) *P. koorensis* LMG21318^T; 7)
 24 *P. umsongensis* LMG21317^T; 8) *P. fluorescens* LMG1794^T.

Figure

[Click here to download high resolution image](#)

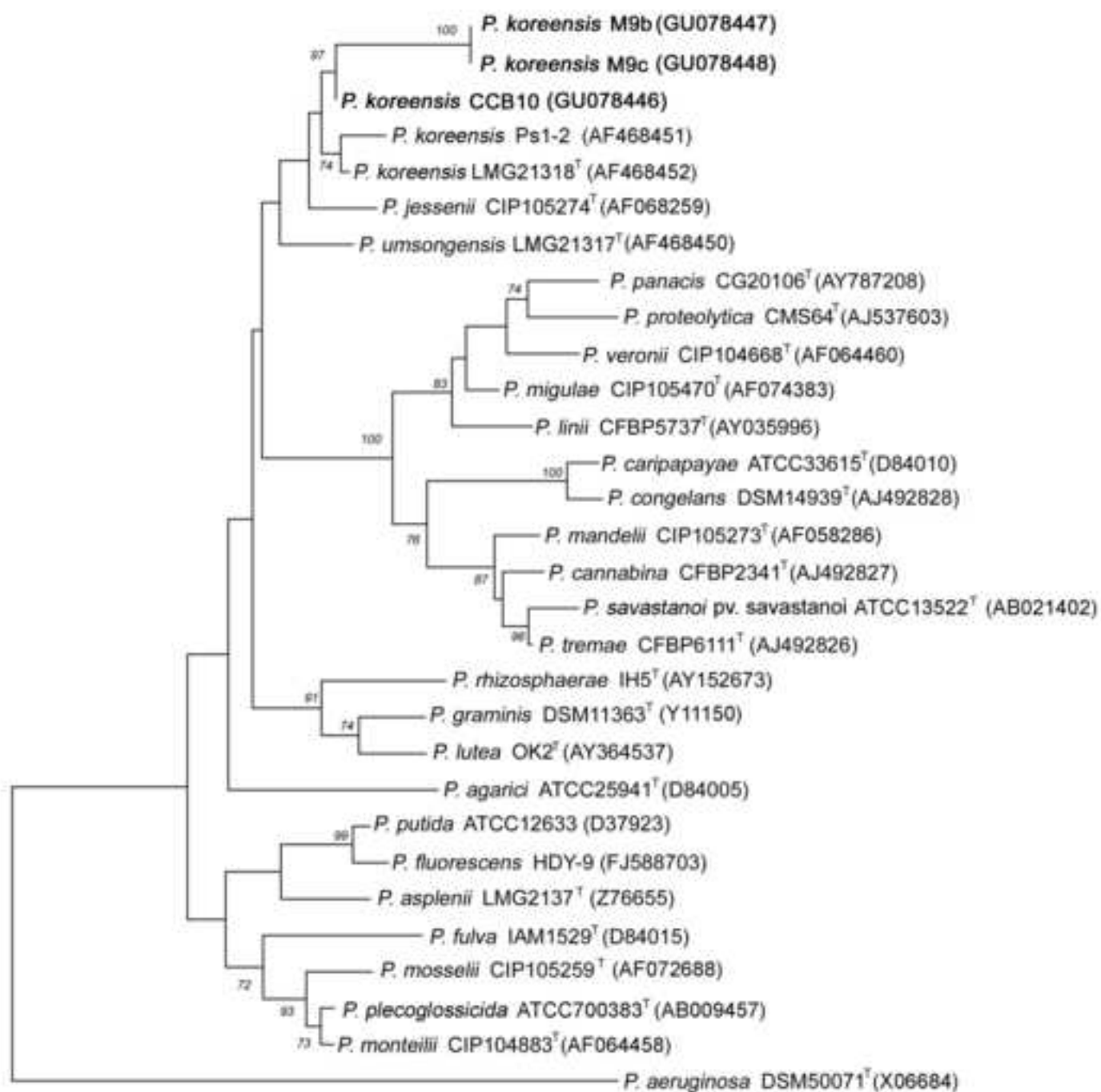


Figure
[Click here to download high resolution image](#)



1 Title: Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas*
2 *koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin.

3 Authors: Jeiry Toribio¹, Ana E. Escalante^{2a}, Jesús Caballero-Mellado⁺³,
4 Andrea González-González², Sergio Zavala¹, Valeria Souza² and
5 Gloria Soberón-Chávez^{1*}

6 Addresses: ¹Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de
7 Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de
8 México, Apartado Postal 70228, DF, Mexico

9 ²Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología,
10 Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275,
11 México DF 04510, Mexico.

12 ³Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas,
13 Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A,
14 Cuernavaca, Morelos 62200, Mexico.

15

16 The authors dedicate this work to the memory of Jesus Caballero, our beloved
17 friend and colleague, who died on October 16th, 2010.

18

19 ^aPresent address: Department of Ecology Evolution and Behavior, University of
20 Minnesota, Saint Paul, MN 55108, USA.

21 Running title: Novel *Pseudomonas koreensis* lineage endemic to Cuatro Ciénegas

22 Key words: *Pseudomonas*; biosurfactants; bacterial taxonomy.

23 Section: Applied and Ecological Microbiology.

24

25

26

1 Supplementary material

2 The detailed materials and methods used in this work are:

3 **Microbiological procedures.** Bacterial strains were routinely cultured on
4 phosphate-limited peptone-glucose-ammonium salts medium pH 7.2 (PPGAS) [26]
5 containing NH_4Cl_2 (0.02 M), KCl (0.02 M), Tris-HCl (0.12 M), MgSO_4 (0.0016 M),
6 glucose (0.5%, w/v), and peptone (1%, w/v). The bacterial competition experiments
7 were done in PPGly medium, which is the same as PPGAS but glycerol (0.5% v/v)
8 was used instead of glucose. In this medium glycerol was used because *P.*
9 *koreensis* LMG21318^T type strain did not grow with glucose as sole source of
10 carbon (data not shown), but all strains studied can use glycerol as carbon source
11 (Fig. S1). Bacterial cultures were incubated at 30°C and liquid cultures were
12 shaken at 225 rpm. Biochemical characterization of strains was carried out using
13 API 20NE and API50CH tests, according to manufacturer's instructions (Table S1).

14 For the isolation of *Pseudomonas* from water samples, the glucose-starch-phenol
15 red medium (GSP) [11] was used, as described by Escalante *et al.* [5]. The GSP
16 medium was designed to isolate *Pseudomonas* and *Aeromonas* and contains (g/l):
17 sodium-L-glutamate 10, soluble starch 20, potassium dihydrogen phosphate 2,
18 magnesium sulfate 0.5, phenol red 0.36, and agar 12. The screening of bacteria
19 able to produce biosurfactants was done by selecting those that produce a blue
20 halo around the colonies grown on PPSW plates [23] which consists of PPGAS
21 medium supplemented with 2.5 mg/ml of methylene blue, 200 mg/ml of the
22 surfactant cetyl-trimethyl-ammonium-bromide (CTAB) and 1.5% (w/v) agar.
23 Around 700 *Pseudomonas* isolates collected in different periods (August 2003,
24 January 2004, January and August 2005, and July 2007) were tested for
25 biosurfactant production on PPSW.

26 **Determination of biofilm forming ability.** Biofilm assays were carried out at 30°C
27 using 96-well, non-tissue culture-treated PVC dishes (COSTAR, Cambridge MA)
28 as previously reported [2]. All experiments were performed in triplicate. To prevent
29 evaporation microtitre dishes were covered with a plastic box. Visualization of cells
30 forming the biofilm was performed by removing the liquid from the wells and after

1 rising thoroughly, staining the remaining material with 1.0% (w/v) crystal violet for
2 20 min, and rinsing the wells three times with distilled water. Quantification was
3 carried out spectrophotometrically at OD₅₉₅ nm, eluting the attached crystal violet
4 with a solution of 80% ethanol and 20% acetone (v/v). Results presented here are
5 expressed as the amount of biofilm produced by different *P. koreensis* strains in
6 relation to that produced by *P. aeruginosa* PAO1.

7 **Methods for taxonomic characterization of bacteria.** In order to determine the
8 taxonomic position of the M9b, M9c and CCB10 strains, we analyzed sequences of
9 16S rDNA, *gyrB* and *recA* genes for these and reference *Pseudomonas* strains.
10 16S rDNA and *gyrB* sequences were amplified using previously described PCR
11 conditions. The primers used are 8F AGTTGATCCTGGCTCAG and 1492R
12 ACCTTGTTACGACTT for 16SrDNA [13]; and in the case of *gyrB* we used *gyrB*-F
13 ACCAYGSNGGNGGNAARTTYRA and *gyrB*-R
14 AGTGcNGGRTCYTTYTCYTGRCA [25]. The *recA* fragments corresponding to
15 positions 287-1156 of the *Escherichia coli* K-12 *recA* sequence [8] were amplified
16 using a new set of primers designed in this study based on available sequences in
17 GenBank [1]. The sequence of these primers is *recA*-F
18 CAGATCGAAMRNCARTTCGG and *recA*-R YTTRCCCTGDCCGATCTT; PCR
19 conditions were the same as for *gyrB* [25]. PCR products were purified using the
20 QIAquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). These fragments have the
21 following sizes: 16S rDNA-1500 bp, *gyrB*-1000 bp and *recA*-900 bp. For
22 sequencing reactions the same sets of primers were used as for PCR, for 16S
23 rDNA sequences additional internal primers were used as well [16]. The
24 sequencing reaction had a total volume of 15 µl consisting of 2 µl Big Dye
25 Terminator sequencing buffer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), 1.6 µM
26 primer and 5 µl purified amplified product. The amplification conditions were as
27 follows: one cycle of 5 min at 95 °C, and 45 cycles of 10 s at 95 °C, 10 s at 50 °C
28 and 4 min at 60 °C. Sequencing was done in a capillary sequencer (ABI-Avant
29 100). Sequences were assembled and revised using BioEdit software [7]. We
30 compared 16S rDNA sequences with all publicly available sequences of type
31 strains of *Pseudomonas* species in the Ribosomal Database Project (RDP) II

1 database [3], and we downloaded the best match sequences for further analyses.
2 We performed multiple sequence alignment of 16S rDNA for M9b, M9c and CCB10
3 strains and closest relatives using ClustalW [21] implemented in BioEdit 5.0 [7]. For
4 *recA* and *gyrB* analyses, we included reference *Pseudomonas* strains sequences
5 based on their close similarity to M9b, M9c and CCB10 strains using a BLAST
6 search [10]. Reference sequences were obtained from GenBank or by direct
7 sequencing of type strains. The *recA* and *gyrB* gene sequences were aligned using
8 ClustalW [21] implemented in DAMBE 4.5.50 [24], which allows alignment of
9 nucleotides based on amino acid alignment. Automatically aligned sequences were
10 manually checked in all cases using BioEdit [7].

11 All the sequences analyzed were partial. Alignments contained missing values in
12 the extremes to adjust for uneven length of sequences. Alignment gaps and
13 missing information sites were removed from the phylogenetic analysis and all the
14 remaining sites were included. The number of sites used for the analysis for each
15 gene was: 16S rDNA (1292), *gyrB* (363), and *recA* (429). Genealogies were
16 generated based on Neighbor-Joining clustering [17] using Kimura two-parameter
17 substitution model [12] and 1000 bootstrap replication implemented in MEGA 4.1
18 [20]. The unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) [19]
19 and the maximum-parsimony method were also used and gave approximately the
20 same results. The resulting phylogenetic trees are shown on Fig. 1 (16S rDNA)
21 and Figs. S2 and S3 (*recA* and *gyrB*, respectively). The alignments used to
22 construct *recA* and *gyrB* phylogenetic trees were submitted to Systematic and
23 Applied Microbiology, together with this manuscript.

24 The preparation of whole-cell proteins from all of the isolates and SDS-PAGE
25 assays were performed as described previously [6].

26 To clarify the taxonomic relationship at species level, DNA–DNA hybridization
27 experiments were performed as described previously [16]; the analysis was based
28 on relative levels of hybridization to ³²P-labelled DNA from strain *P. koreensis* M9b.
29 DNA–DNA relatedness assays were performed with the two other *P. koreensis*
30 strains (M9c and CCB10) recovered from the CCB Churince system, with the type

1 strains *P. koreensis* LMG21318^T, *P. jessenii* CIP105274^T, *P. umsongensis*
2 LMG21317^T and *P. putida* KT2440 (Table 1). DNA manipulations were performed
3 as reported by Sambrook *et al.* [18].

4 To estimate the genome size of *P. koreensis* and other *Pseudomonas* species
5 (Table 1), their total DNA was restricted with I-CeuI endonuclease and analyzed by
6 pulse field gel electrophoresis (PFGE). Genomic DNA preparation and digestion of
7 whole genomes were carried out as described by Liu *et al.* [14] and Matushek *et al.*
8 [15], but with some modifications in the DNA extraction procedure as described by
9 Escalante *et al.* [5]. Briefly, separation of DNA fragments by PFGE was done on a
10 0.5X TBE Buffer using two different programs. The first one was used to separate
11 bands ranging from 4000 kb's to 1400 kb's and was performed with the Bio-Rad
12 CHEF Mapper electrophoresis system as follows: For block 1, pulse time ramped
13 from 20 min to 29 min 45 s from 60 h; for block 2, pulse time ramped from 2.31 s to
14 2 min 25 s over 7 h. The device was set at 2 V/cm with a 53° angle at 12°C for the
15 first block and at 6 v/cm with 60° angle at 12 °C for the second block. The second
16 program was carried out in a Bio-Rad DRII electrophoresis system and was used
17 to separate bands ranging from 1400 kb's to 40 kb's as follows: For block 1 pulse
18 time ramped from 10 s to 2 min 30 min over 34 h and block 2 pulsed time ramped
19 from 3 s to 12 s over 7 h with the device set at 4 V/cm to both blocks. Gels were
20 stained with ethidium bromide and then photographed. Molecular size of the bands
21 was estimated using *in silico* I-CeuI restriction of *Pseudomonas aeruginosa* PAO1
22 and *Escherichia coli* K12 MG1665 genomes as molecular markers.

23 For qualitative and quantitative analysis of the cellular fatty acids (Table S2),
24 strains were cultivated on tryptic soy agar (Sigma-Aldrich) for 2 days at 28 °C. The
25 whole-cell fatty acid composition was determined by Microbial ID Inc. (Newark, DE)
26 using an Agilent 6850 gas chromatograph and the fatty acid methyl esters were
27 analyzed by using the Sherlock 4.5 Microbial Identification System.

28 **Experiments to determine bacterial competition.** To determine whether
29 biosurfactant production could represent a selective advantage to *P. koreensis* we
30 did growth competition experiments using one of the *P. koreensis* strains (M9b,

1 M9c, CCB10 or LMG21318^T) and *E. aurantiacum* strain m5-66 as the competitors
2 (Fig. S4).

3 To validate that the ability to establish an interference-competition of CCB isolated
4 *P. koreensis* strains with *E. aurantiacum* m5-66 was due to their biosurfactant
5 production ability we supplemented a co-culture on PPGly medium of *P. koreensis*
6 LMG21318^T and *E. aurantiacum* m5-66, with the ethyl acetate culture supernatant
7 extract (EACSE) of strain M9 obtained after 24 hr of growth on PPGAS medium.

8 **Determination of growth inhibition by biosurfactant and extracellular**
9 **compounds.** The growth inhibition activity of EACSE obtained from one of the *P.*
10 *koreensis* strains studied was determined by measuring the effect on the growth of
11 *E. aurantiacum* m5-66 on PPGly (Table 2) or on this and other bacteria on LB broth
12 (Table 3 and data not shown). Briefly, the effect on growth on liquid media was
13 done as follows: EACSE was added to each strain at the outset of the culture to a
14 final concentration equal to the half of that produced by each *P. koreensis* strains
15 after 24 hr of growth on PPGAS medium at 30°C. Growth of cultures shaken at 225
16 rpm, in the presence and absence of EACSE, was monitored by determining the
17 optical density at 600 nm or the number of colony forming units. Incubation
18 temperature was 30°C for *E. aurantiacum* or 37°C for other bacteria tested. All
19 determinations were done at least by triplicate. The bacterial strains that were used
20 to determine the antibiotic spectrum of the CCB *P. koreensis* strains EACSE were:
21 *Enterococcus faecalis* ATCC29212, *Staphylococcus aureus* ATCC29213,
22 *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus subtilis* ATCC6633, *Escherichia coli*
23 ATCC25922, *Salmonella typhi* ATCC19430 and *Serratia liquefaciens* ATCC27592.

24 **Biosurfactant purification and activity determination.** Biosurfactant production
25 was determined by emulsification capacity (E_{24}) using diesel as the organic phase
26 [4]. Briefly, 3 ml of diesel was added to 2 ml of the culture supernatant in a 15 ml
27 graduated screw cap test tube and vortexed at high speed for 2 min. The content
28 was left undisturbed and the emulsion stability was determined after 24 hr. The
29 emulsification index was calculated by dividing the measured height of the

1 emulsion layer by the mixture's total height and multiplying by 100. The collapse
2 drop method [9] was also used for rapid screening of biosurfactant production.

3 Thin layer chromatography (TLC) on analytical plates (HP-TLC Silica gel 60 F₂₅₄,
4 Merck) was used to visualize supernatant ethyl acetate extracted molecules (Fig,
5 S5). Total compounds present in the analyzed sample were revealed with 4
6 methoxybenzaldehyde diluted in acetic and sulfuric acids at a proportion of 0.5:50:1.
7 Biosurfactant was detected by its foaming ability after being scratched from
8 preparative TLC plates (SIL G-2000 Macherey–Nagel), after revealing an edge of
9 the plate with 4 methoxybenzaldehyde, as described. TLC mobile phase consisted of
10 a 35:21.5:5 chloroform/methanol/water mixture. Purified biosurfactant used to
11 determine antibiotic activity was purified from preparative TLC plates following the
12 same procedure. The purity of the fractions was determined by TLC using the
13 same conditions. Fig. S5-B shows an example of the determination of biosurfactant
14 purity in the samples. In this case we used the samples analyzed on lanes 4 and 5,
15 on the experiments where purified biosurfactant was added.

16

17 References:

- 18 1. D. A. Benson, I. Karsch-Mizrachi, D. J. Lipman, J. Ostell, E. W. Sayers.
19 GenBank. Nucleic Acids Res. 37 (2009) (Database issue): D26-D31. doi:
20 10.1093/nar/gkn723.
- 21 2. T. Cabellos-Avelar, V. Souza, J. Membrillo-Hernández, Spent media from
22 cultures of environmental isolates of *Escherichia coli* can suppress the
23 deficiency of biofilm formation under anoxic conditions of laboratory *E. coli*
24 strains. FEMS Microbiol. Ecol. 58 (2006) 414-424.
- 25 3. J. R. Cole, B. Chai, R. J. Farris, Q. Wang, A. S. Kulam-Syed-Mohideen, D.
26 M. McGarrell, A. M. Bandela, E. Cardenas, G. M. Garrity, J. M. Tiedje, The
27 ribosomal database project (RDP-II): introducing myRDP space and quality
28 controlled public data. Nucleic Acids Res. 35 (2007) (Database issue),
29 D169–D172.

- 1 4. D. G. Cooper, B. G. Goldenberg, Surface active agents from two *Bacillus*
2 species. Appl. Environ. Microbiol. 53 (1987) 224-229.
- 3 5. A. E. Escalante, J. Caballero-Mellado, L. Martínez-Aguilar, A. Rodríguez-
4 Verdugo, A. González-González, J. Toribio-Jiménez, V. Souza,
5 *Pseudomonas cuatrociénegasensis* sp. nov., isolated from an evaporating
6 lagoon in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, Mexico. Int. J. Syst. Evol.
7 Microbiol. 59 (2009) 1416-1420.
- 8 6. P. Estrada-de los Santos, R. Bustillos-Cristales, J. Caballero-Mellado,
9 *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide
10 environmental and geographic distribution. Appl. Environ. Microbiol. 67
11 (2001) 2790–2798.
- 12 7. T. A. Hall, BioEdit a user-friendly biological sequence alignment editor and
13 analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series.
14 41 (1999) 95-98.
- 15 8. Horii, T. Ogawa, H. Ogawa, Organization of the *recA* gene of *Escherichia*
16 *coli*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77 (1980) 313-317.
- 17 9. D. K. Jain, D. L. Collins-Thompson, H. Lee, J. T. Trevors, A drop-collapse
18 test for screening surfactant-producing microorganisms. J. Microbiol.
19 Methods. 13 (1991) 271-279.
- 20 10. M. Johnson, I. Zaretskaya, Y. Raytselis, Y. Merezuk, S. McGinnis, T. L.
21 Madden, NCBI BLAST: a better web interface. Nucleic Acids Res. (2008)
22 doi: 10.1093/nar/gkn201.
- 23 11. G. Kielwein, Die Isolierung und Differenzierung von Pseudomonaden aus
24 Lebensmitteln. Arch Lebensmittelhyg 22 (1971) 29-37.
- 25 12. M. Kimura. A simple method for estimating evolutionary rate of base
26 substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol.
27 Evol. 16 (1980) 110-120.

- 1 13. D. J. Lane, 16S/23S rDNA sequencing. Nucleic Acid Techniques. In E.
2 Strackebrant and M. Goodfellow (Eds) Bacterial systematic. John Wiley and
3 Sons, New York, N. Y. (1991) pp. 115-175.
- 4 14. S. L. Liu, A. Hessel, K. E. Sanderson, Genomic mapping with I-Ceu I, an
5 intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in
6 *Salmonella sp.*, *Escherichia coli*, and other bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci.
7 USA. 90 (1993) 6874–6878.
- 8 15. M. G. Matushek, M. J. Bonten, M. K. Hayden, Rapid preparation of bacterial
9 DNA for pulsed-field gel electrophoresis. J. Clin. Microbiol. 34 (1996) 2598–
10 2600.
- 11 16. C. T. Sacchi, A. M. Whitney, L. W. Mayer, R. Morey, A. Steigerwalt, A.
12 Boras, R.S. Weyant, T. Popovic T Sequencing of 16S rRNA gene: A rapid
13 tool for identification of *Bacillus anthracis*. Emerg. Infect. Dis. 8 (2002): 117-
14 1123.
- 15 17. N. Saitou, M. Nei. Neighbor-Joining method—a new method for
16 reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4 (1987) 406-425.
- 17 18. J. Sambrook, E. F. Fritsch, T. Maniatis, Molecular cloning: a laboratory
18 manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor,
19 N. Y. (1989).
- 20 19. P. H. A. Sneath, R. R. Sokal, Numerical Taxonomy. W.H. Freeman and
21 Company, San Francisco. (1973) pp 230-234.
- 22 20. K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar. MEGA4: Molecular Evolutionary
23 Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. 24(2008)
24 1596-1599.
- 25 21. J. D. Thompson, D. G. Higgins, T. J. Gibson, ClustalW—improving the
26 sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence

1 weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic*
2 *Acids Res.* 22 (1994) 4673-4680.

3 22.P. Vandamme, B. Pot, M. Gillis, P. de Vos, K. Kersters, J. Swings,
4 Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics.
5 *Microbiol. Rev.* 60 (1996) 407–438.

6 23.M. Wild, A. D. Caro, R. M. Miller, G. Soberón-Chávez, Selection and partial
7 characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient
8 mutant. *FEMS Microbiol. Lett.* 153 (1997) 279-285.

9 24.X. Xia, Z. Xia, DAMBE: Data analysis in molecular biology and evolution. *J.*
10 *Heredity.* 92 (2001) 371-373.

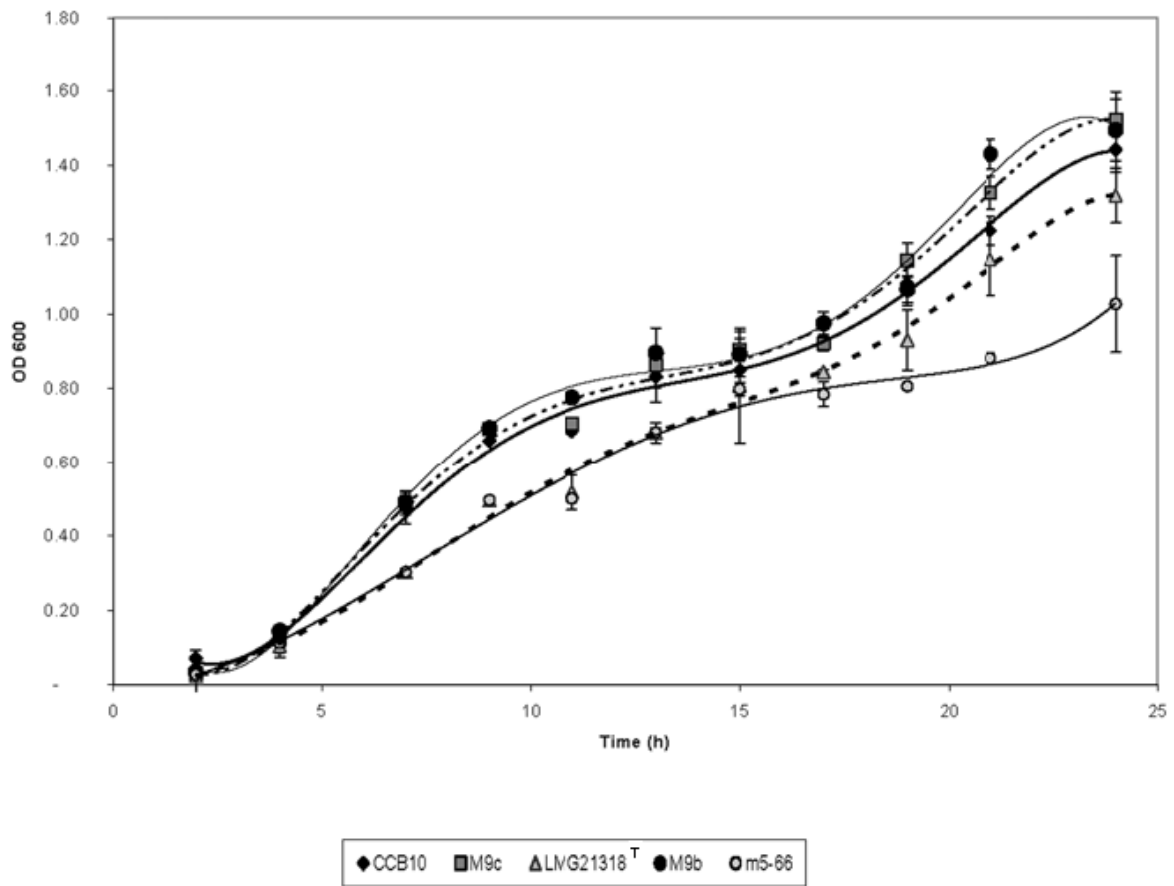
11 25.S. Yamamoto, S. Harayama. Phylogenetic relationships of *Pseudomonas*
12 *putida* deduced from the nucleotide sequences of *gyrB*, *rpoD* and 16S rRNA
13 genes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48 (1998) 813-819.

14 26.Y. Zhang, R. M. Miller, Enhancement of octadecane dispersion and
15 biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant).
16 *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (2002) 3276-3282.

17
18
19

1 Figures

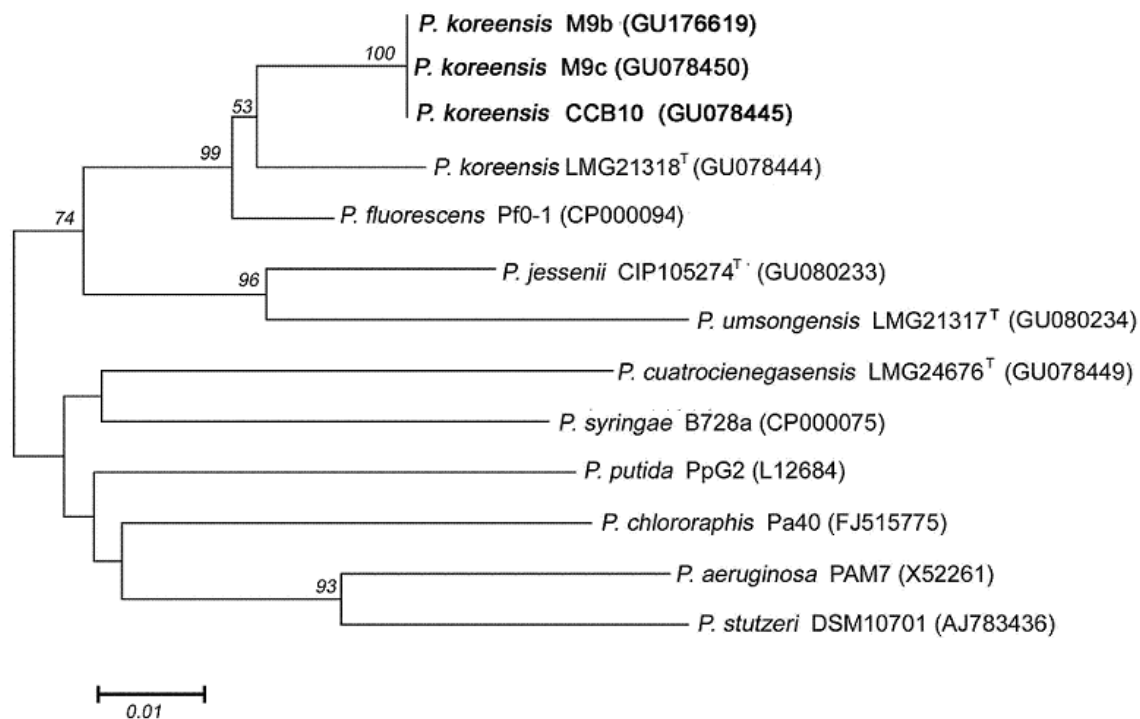
2



3

4 Figure S1. Growth curves of different bacterial strains on PPGly medium at 30°C.

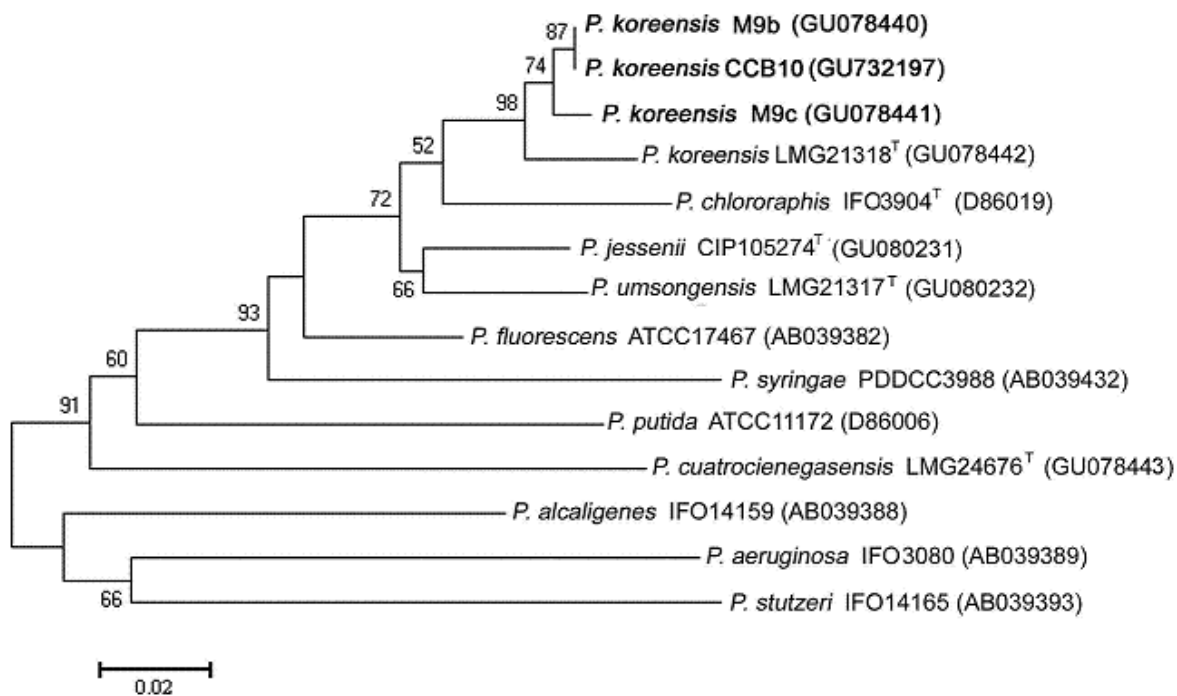
5



1
2
3
4
5
6
7
8
9

Figure S2. Genealogy of the *recA* *P. koreensis* gene of the CCB (M9b, M9c and CCB10) and Korean (LMG21318^T type strain and Ps 1-2) strains, and the most closely related members of the genus *Pseudomonas*. GenBank accession numbers are shown in parenthesis. The correspondence of the size of bar to the number of substitutions per site is included. The *P. koreensis* sequences from CCB isolates are shown in bold characters.

1

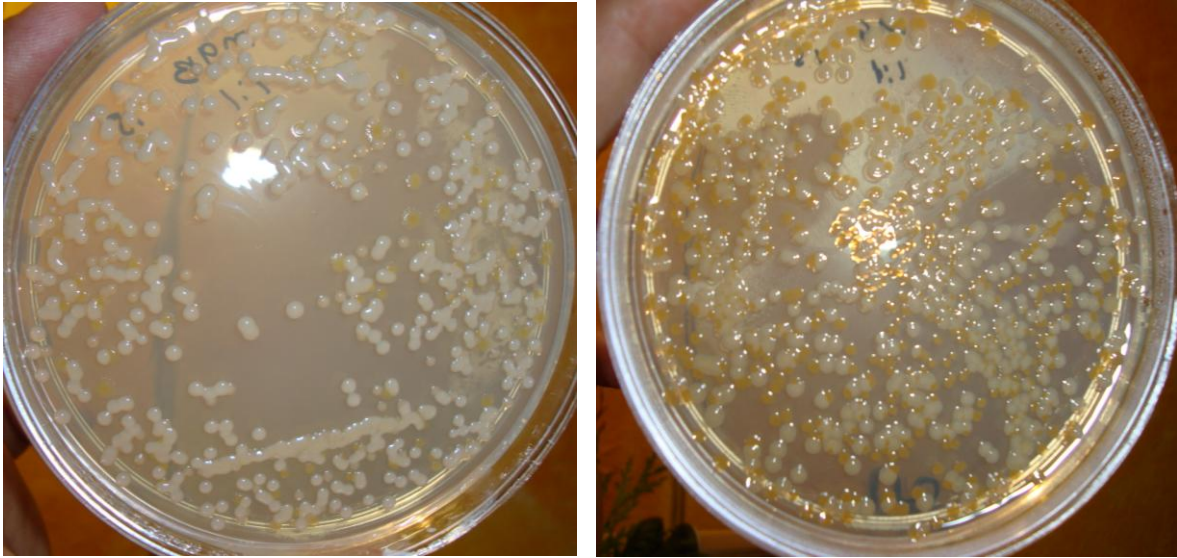


2

3 Figure S3. Genealogy of the *gyrB* gene of *P. koreensis* CCB (M9b, M9c and
4 CCB10) and Korean (LMG21318^T type strain and Ps 1-2) strains, and the most
5 closely related members of the genus *Pseudomonas*. GenBank accession
6 numbers are shown in parenthesis. The correspondence of the size of bar to the
7 number of substitutions per site is included. The *P. koreensis* sequences from CCB
8 isolates are shown in bold characters.

9

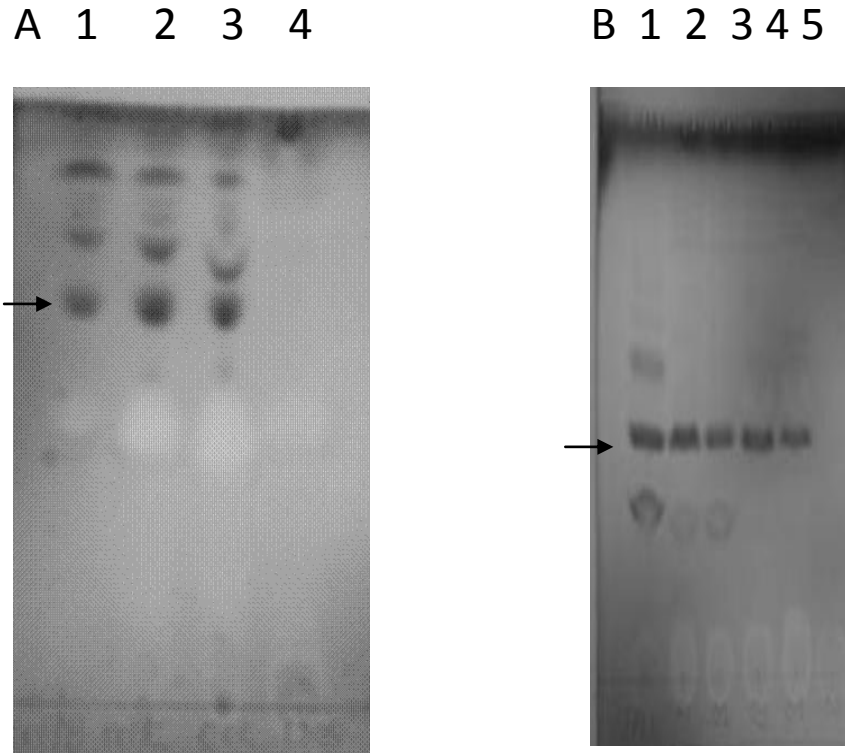
10



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19

Figure S4. Pictures of the colonies after the competition experiments described in Table 3. PPGAS plates showing colonies recovered from a flask inoculated with a 1:1 proportion of a *P. koreensis* strain (white) and *E. aurantiacum* m5-66 (yellow) after 24 hr of growth on PPGLY medium. Picture on the left is a competition experiment using *P. koreensis* M9b and that in the right shows an experiment using *P. koreensis* LMG21318^T.

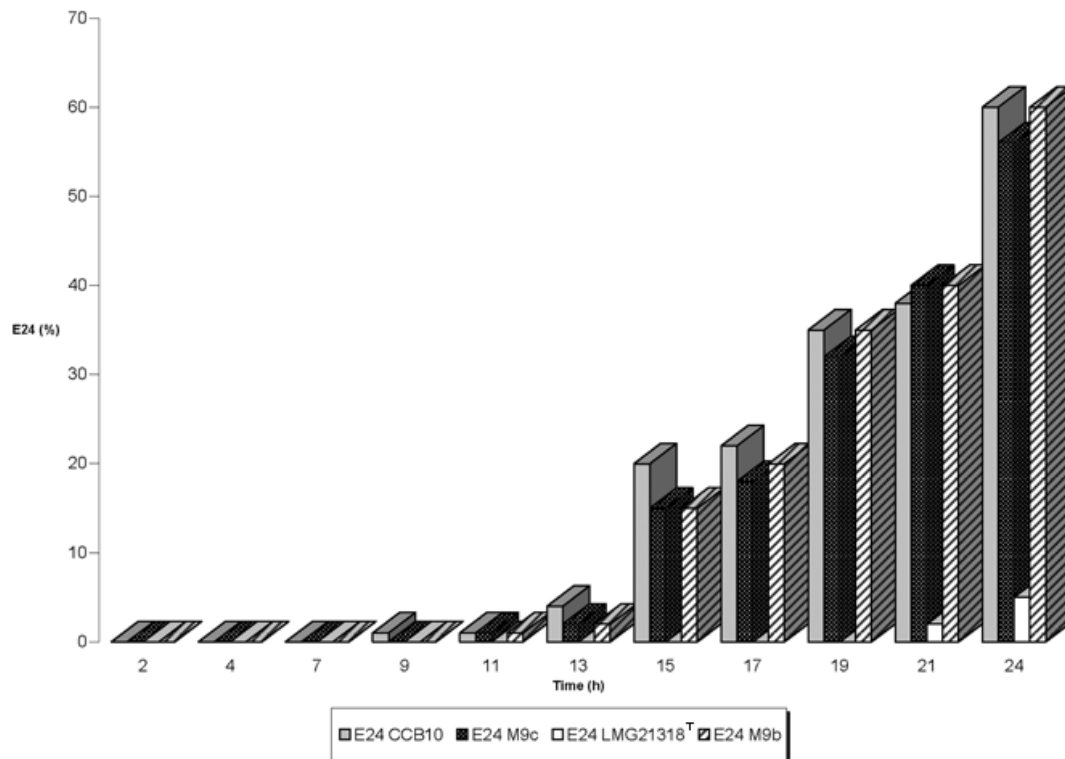
1



2

3 Figure S5. Thin layer chromatography analysis of biosurfactant and other secreted
4 compounds by CCB *P. koreensis* strains. Panel A shows the ethyl acetate culture
5 supernatant extracts of the following *P. koreensis* strains: 1) M9b, 2) M9c, 3)
6 CCB10, 4) LMG21318^T. Panel B shows a TLC plate were different fractions that
7 were scratched from preparative plates to purify the surfactant. Samples shown on
8 lanes 4 and 5 were considered to be pure and were used to supplement a culture
9 of *E. aurantiacum* m5-66 to determine its antibiotic properties. Arrows show the
10 band corresponding to the biosurfactant.

11



1
 2 Figure S6. Biosurfactant production, as determined by emulsification index, (E_{24}),
 3 along the growth curve of *P. koreensis* strains.
 4

1 Table S1. Biochemical characterization of *Pseudomonas* strains^a

Characteristic	M9b	M9c	CCB10	<i>P. koreensis</i> LMG21318 ^T	<i>P. jessenii</i> CIP05274	<i>P. umsongensis</i> LMG21317 ^T	<i>P. putida</i> F1
Fluorescent pigments	-	-	-	+	+	+	+
Oxidase	+	+	+	+	+	+	+
Enzymatic activity:							
Nitrate reduction	-	-	-	-	+	+	-
Arginine dihydrolase	-	-	-	+	+	+	-
Gelatine	+	+	+	-	-	-	-
Assimilation of:							
D-mannitol	+	+	+	-	-	-	-
D- fucose	+	+	+	-	-	-	-
D-arabitol	+	+	-	-	-	-	-
D-galactose	+	+	+	+	-	-	+
D-glucose	+	+	+	-	-	-	+
D-fructose	+	+	-	+	-	-	-
D-mannose	+	+	+	+	-	-	+
L-arabinose	+	+	+	+	-	-	+
D-xilose	+	+	+	+	-	-	+
Glycerol	+	+	+	+	-	-	-
Adipic acid	-	-	-	-	-	+	-
Phenylacetic acid	-	-	-	-	+	+	-
Growth at:							
4°C	+	+	+	+	+	+	ND
42°C	-	-	-	-	-	-	-
Tolerance to NaCl:							

5%/7%	+/+	+/+	+/+	+/-	-/-	+/-	+/-
-------	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

2 Strains were cultured on LB medium for 24–48 h at 29 °C. The production of fluorescent pigments
3 was tested on PAF media. Other phenotypic features were assayed with the API 20NE and API
4 50CH systems according to the instructions of the manufacturer (bioMérieux). The API 20NE
5 system was used to determine nitrate reduction, gelatine liquefaction, esculine hydrolysis, urease
6 activity, indole production, fermentative acid production from glucose, β-galactosidase activity
7 and arginine dihydrolase activity. All colonies were grown on LB agar plates to determine the
8 oxidase reaction as a complementary test in the API 20NE system. The utilization of various carbon
9 sources was tested by using the API 50CH system after incubation for 48 h at 29 °C. The
10 inoculation medium used for the API 50CH test strips was CHB/E [I21: ammonium sulfate (2 g),
11 yeast extract (0.5 g), tryptone (1 g), disodium phosphate (3.22 g), mono-potassium phosphate
12 (0.12 g), trace elements (10 ml), phenol red (0.17 g); pH 7.4–7.8]. Results of these tests showed
13 that the strains of *P. koreensis* differ from the most closely related species in terms of the
14 utilization of specific sources, e.g. arginine dihydrolase, gelatine, D-mannitol, D-fucose and D-
15 arabinol.

16

17

18

1 Table S2. Cellular fatty acid composition (%) of strains CCB10, M9b, M9c and *P.koreensis* LMG21318^T

Fatty acid	<i>P.koreensis</i> CCB10	<i>P.koreensis</i> M9b	<i>P.koreensis</i> M9c	<i>P.koreensis</i> LMG21318 ^T
C _{10:0}	0.19	0.33	0.27	0.27
C _{10:0} 3-OH	3.79	5.19	4.94	2.17
C _{12:0}	1.54	1.84	1.71	2.74
C _{12:0} 2-OH	6.14	6.61	6.85	5.43
C _{12:1} 3-OH	0.44	0.95	0.73	---
C _{12:0} 3-OH	5.13	6.14	6.06	5.10
C _{14:0}	0.34	0.36	0.37	0.48
C _{14:0} 3OH/16:1 isol	0.19	0.33	0.27	---
C _{15:0}	---	0.19	0.18	---
C _{16:0}	28.19	27.51	27.39	28.44
C _{16:1w5c}	0.10	---	---	0.11
C _{16:1w7c/16:1 w6c}	35.53	33.08	34.73	33.52
iso-C _{17:0}	0.16	0.21	0.18	0.16
C _{17:0} cyclo	0.93	1.17	1.23	3.68
C _{17:0}	0.17	0.18	0.21	0.31
C _{17:1 w8c}	---	---	---	0.21
C _{18:0}	0.61	0.65	0.63	0.50
C _{18:1 w7c 11-methyl}	0.15	---	---	0.11
C _{18:1 w7c}	16.41	14.83	13.89	16.58
C _{18:2w6,9c/18:0 ante}	---	---	---	0.19

26

27 -, not detected;

*Detailed Response to Reviewers

Ms. Ref. No.: SAM 3335R2

Title: Characterization of a novel biosurfactant producing *Pseudomonas koreensis* lineage that is endemic to Cuatro Ciénegas Basin
Systematic and Applied Microbiology

Dear Ramon Rossello-Mora,

The manuscript has been modified accordingly to your suggestions. It has been considerably shortened, it is now 3755 words from title to bibliography. Most of the materials and methods have been described in the supplementary material section.

The manuscript has been reviewed by a native English speaker.

I hope that this new version is acceptable for its publication in *Systematic and Applied Microbiology*.

Best regards.

Gloria Soberón-Chávez

Pseudomonas cuatrocienegasensis sp. nov., isolated from an evaporating lagoon in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, Mexico

Ana E. Escalante,¹ Jesús Caballero-Mellado,² Lourdes Martínez-Aguilar,²
Alejandra Rodríguez-Verdugo,¹ Andrea González-González,¹
Jeiry Toribio-Jiménez³ and Valeria Souza¹

Correspondence

Valeria Souza

souza@servidor.unam.mx

¹Departamento de Ecología Evolutiva, Instituto de Ecología, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, México DF 04510, Mexico

²Programa de Ecología Genómica, Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 565-A, Cuernavaca, Morelos, Mexico

³Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70-275, DF, Mexico

Nine Gram-negative, rod-shaped, non-spore-forming isolates with identical or very similar repetitive-sequence-based PCR profiles were recovered from an evaporative lagoon in Mexico. Two strains, designated 1N^T and 3N, had virtually identical 16S rRNA gene sequences and, on the basis of these sequences, were identified as members of the genus *Pseudomonas*, with *Pseudomonas peli* R-20805^T as the closest relative. All nine isolates had practically identical whole-cell protein profiles. The major fatty acids [C_{16:0}, C_{18:1ω7c} and summed feature a (C_{16:1ω7} and/or C_{16:1ω6c})] of strains 1N^T and 3N supported their affiliation with the genus *Pseudomonas*. The DNA–DNA reassociation values with respect to *P. peli* LMG 23201^T and other closely related *Pseudomonas* species were <15%. Physiological and biochemical tests allowed phenotypic differentiation of the strains analysed, including strain 1N^T, from the five phylogenetically closest *Pseudomonas* species. On the basis of the data obtained by using this polyphasic taxonomic approach, the nine strains represent a novel species, for which the name *Pseudomonas cuatrocienegasensis* sp. nov. is proposed. The type strain is 1N^T (=LMG 24676^T=CIP 109853^T).

The genus *Pseudomonas* was described by Migula (1894). Since then, there has been a steady increase in the rate of description of species belonging to the genus *Pseudomonas*; there are currently more than 191 species with validly published names (Anzai *et al.*, 2000; http://www.dsmz.de/microorganisms/bacterial_nomenclature.php). *Pseudomonas* species are ubiquitous in nature and can be isolated from humans, clinical samples, the plant rhizosphere, soil and water (including seawater) (Spiers *et al.*, 2000; Yamamoto *et al.*, 2000; Moore *et al.*, 2006).

In the present study, a polyphasic approach was undertaken to determine the taxonomic status of nine isolates recovered from an evaporative lagoon in the

Churince system, a hydrological system in the Cuatro Ciénegas valley in Coahuila, Mexico (26° 50.830' N 102° 09.335' W).

A large collection of bacterial isolates was obtained from surface water samples collected at two different points (10 m apart) in the lagoon referred to as Laguna Grande. Water samples (15 ml) from each site were collected in sterile BD Falcon vials (BD Biosciences) and 200 µl from each sample was inoculated on glutamate/starch/phenol red (GSP) agar plates (Kielwein, 1971). The GSP medium had the following composition (g l⁻¹): sodium L-(+)-glutamate, 10.0; starch (soluble), 20.0; potassium dihydrogen phosphate, 2.0; magnesium sulfate, 0.5; phenol red, 0.36; agar–agar, 12.0). Incubation was performed at 29 °C for 48 h. Colonies grown on different GSP plates were purified by subculture on Luria–Bertani (LB) agar (1% tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl and 1.5% agar) plates and the cultures were maintained at –80 °C in LB broth (1% tryptone, 0.5% yeast extract and 1% NaCl) with 20% (w/v) glycerol prior to analysis.

The GenBank/EMBL/DDBJ accession numbers for the 16S rRNA sequences of strains 1N^T and 3N are EU791281 and EU791282, respectively.

A figure showing a pulsed-field electrophoresis gel of novel strains described in this work and type and reference strains of known *Pseudomonas* species is available with the online version of this paper.

Isolates were grown in 5 ml LB broth. DNA was extracted by using a DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. Repetitive-sequence-based PCR profiles of the isolates and reference strains were determined with BOX primers and conditions as described by Versalovic *et al.* (1991, 1994). The PCR conditions consisted of an initial denaturing step at 95 °C for 7 min, 30 cycles of 94 °C for 1 min, 53 °C for 1 min, 65 °C for 8 min and a final extension at 65 °C for 8 min. The PCR products were electrophoresed in 1.5 % agarose gels (0.5 × TAE buffer; 2.42 g Tris-HCl, 0.57 ml glacial acetic acid, 1 ml 0.5 M EDTA (pH 8.0) and 1 l distilled and deionized water) for 5 h at 180 mV (5 V cm⁻¹). The gels were stained with ethidium bromide and a digital image was obtained for further analysis. Isolates that displayed the same number of bands and similar fragment sizes were considered identical and therefore belonging to the same bacterial group or genotype. On this basis, nine isolates recovered from different water samples were identified as having identical (or very similar) repetitive-sequence-based PCR patterns (data not shown). 16S rRNA gene sequences were obtained from two of these strains, namely 1N^T and 3N, in order to define their taxonomic affiliation. The almost-complete 16S rRNA gene sequences were obtained by PCR amplification using primers 27F and 1492R and the conditions described previously (Lane, 1991). 16S rRNA gene sequences (approx. 1450 bp) were obtained (High-Throughput Sequencing Enterprise of the University of Washington, USA) and were compared with all publicly available complete 16S rRNA gene sequences of the type strains of *Pseudomonas* species with validly published names, using the Ribosomal Database Project (RDP) II database and software (Cole *et al.*, 2007). An

analysis based on 16S rRNA gene sequence similarities indicated that the closest relatives of strain 1N^T were *Pseudomonas peli* R-20805^T (98.5 %), *Pseudomonas argentinensis* CH01^T (97.5 %), *Pseudomonas flavescens* B62^T (97.4 %) and *Pseudomonas anguilliseptica* NCIMB 1949^T (97.4 %). Recently, two novel *Pseudomonas* species, *Pseudomonas guineae* and *Pseudomonas marincola*, were described (Bozal *et al.*, 2007; Romanenko *et al.*, 2008) that showed 97.9 and 97.6 % identity, respectively, with respect to strain 1N^T. The phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequences (Fig. 1) illustrates the position of strains 1N^T and 3N relative to members of *Pseudomonas* species; both strains clustered within a single group that was clearly separated from the cluster formed by the closely related type strains of the species *P. peli*, *P. anguilliseptica* and *P. guineae*, and from the clusters formed by the type strains of *Pseudomonas borbori*, *P. marincola*, *Pseudomonas segetis*, *P. argentinensis* and *P. flavescens*. These data suggested that the nine isolates analysed in the present study might constitute a novel *Pseudomonas* species.

The preparation of whole-cell proteins from all of the isolates and SDS-PAGE assays were performed as described previously (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001). The *Pseudomonas* isolates recovered from the lagoon shared almost-identical protein profiles, but their protein patterns were notably different from those of *P. anguilliseptica* LMG 21629^T and *P. peli* LMG 23201^T, as well as from those of representatives of other closely related *Pseudomonas* species (Fig. 2). It has previously been noted that bacteria with identical or similar protein patterns possess high levels of genome similarity (Vandamme *et al.*, 1996). On this basis, the SDS-PAGE results strongly suggested that all of the isolates represented a novel *Pseudomonas* species.

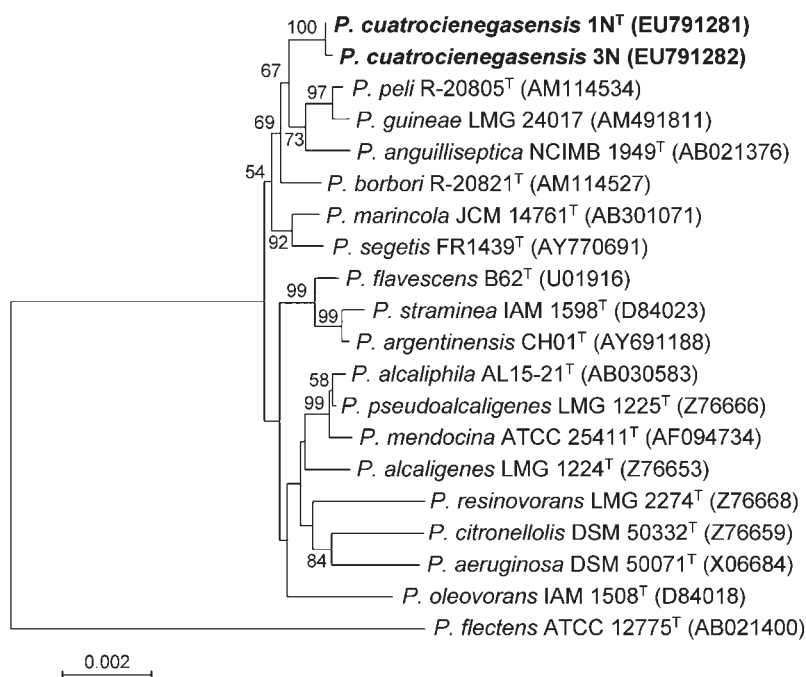


Fig. 1. Phylogenetic tree, based on Kimura two-parameter distances and neighbour-joining clustering after multiple alignment (1480 bp) of the 16S rRNA gene sequences of strains 1N^T and 3N and the most closely related members of the genus *Pseudomonas*. Bootstrap percentages (based on 1000 replications) >50 % are shown at branch points. The phylogenetic analysis was performed by using the software package MEGA, version 3.1 (Kumar *et al.*, 2004). The unweighted pair group method with arithmetic averages and the maximum-parsimony method were also used and gave approximately the same results, with the same clustering of the novel strains. Bar, 0.002 substitutions per site.

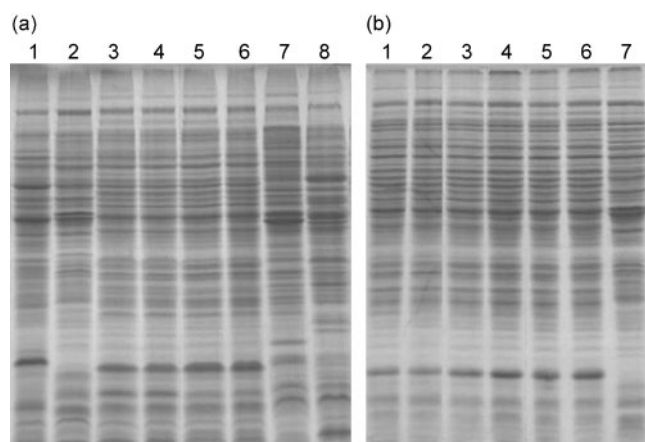


Fig. 2. Whole-cell protein profiles of strains 1N^T, 11N, 10N and 9N and of type strains of known *Pseudomonas* species. (a) Lanes: 1, *P. anguilliseptica* LMG 21629^T; 2, *P. peli* LMG 23201^T; 3–6, strains 1N^T, 11N, 10N and 9N, respectively; 7, *P. stutzeri* LMG 11199^T; 8, *P. flavescens* LMG 18387^T. (b) Lanes: 1–6, strains 1N^T, 3N, 2N, 9N, 8N and 6N, respectively; 7, *P. peli* LMG 23201^T.

For qualitative and quantitative analysis of the cellular fatty acids, strains 1N^T and 3N were cultivated on tryptic soy agar (Sigma-Aldrich) for 2 days at 28 °C. The whole-cell fatty acid compositions were determined by using an Agilent 6850 gas chromatograph (Agilent Technologies) and the fatty acid methyl esters were analysed by using the Sherlock 4.5 Microbial Identification System (Microbial ID). The fatty acid compositions of strains 1N^T and 3N, together with type-strain data for their closest phylogenetic relatives, are shown

in Table 1. The major fatty acid composition supports the affiliation of strains 1N^T and 3N to the genus *Pseudomonas*; in addition, there are differences in the relative abundance of fatty acids with respect to the type strains of *P. anguilliseptica*, *P. flavescens*, *P. guineae* and *P. peli*. Strains 1N^T and 3N exhibit clear quantitative differences for C_{12:0}, C_{12:0} 3-OH and C_{16:0} with respect to the type strains of their closest relatives, i.e. *P. anguilliseptica*, *P. marincola*, *P. guineae* and *P. peli*. In addition, these strains exhibit summed feature a (C_{16:1}ω7 and/or C_{16:1}ω6c), which is not present in the closely related species (Table 1). Although most of the fatty acids reported previously for the most closely related *Pseudomonas* species are present in the profiles of strains 1N^T and 3N, the absence of an unknown fatty acid (equivalent chain length 11.799) and the fatty acid components of summed feature b (C_{16:1}ω7 and/or iso-C_{15:0} 2-OH) is noteworthy. Special caution should be exercised with regard to comparison of the fatty acid profiles of 1N^T and 3N with that of *P. guineae* M8^T, as the latter was grown for 4 days at 15 °C before the fatty acid analysis, and this is not typical of the standard temperature ranges used for this type of analysis in members of the genus *Pseudomonas*.

To clarify the taxonomic relationships at species level, DNA–DNA hybridization experiments were performed as described previously (Estrada-De Los Santos *et al.*, 2001); the analysis was based on relative levels of hybridization to ³²P-labelled DNA from strain 1N^T. DNA–DNA relatedness assays were performed with four strains recovered from the lagoon, with the type strain of the most closely related *Pseudomonas* species (as indicated by 16S rRNA gene sequence data) and with the type strain of *Pseudomonas stutzeri*, which has a fatty acid profile very similar to those of 1N^T and 3N according to the database of the Microbial

Table 1. Cellular fatty acid compositions of strains 1N^T and 3N and strains of the most closely related *Pseudomonas* species

Taxa: 1, strain 1N^T; 2, strain 3N; 3, *P. peli* (LMG 23201^T and R-20815); 4, *P. anguilliseptica* LMG 21629^T; 5, *P. guineae* (three replicate readings of M8^T); 6, *P. marincola* JCM 14761^T; 7, *P. flavescens* LMG 18387^T. Data for *P. peli*, *P. anguilliseptica* and *P. flavescens* were taken from Vanparrys *et al.* (2006), values for *P. guineae* were taken from Bozal *et al.* (2007) and values for *P. marincola* were taken from Romanenko *et al.* (2008). Results for groups of strains are expressed as means (with SD in parentheses). tr, Trace (<0.1%); –, not detected.

Fatty acid	1	2	3	4	5	6	7
C _{10:0} 3-OH	3.11	3.17	4.10 (0.23)	3.17	3.47 (0.58)	5.7	5.23
Unknown (ECL 11.799)*	–	–	4.01 (0.06)	3.14	3.70 (0.39)	1.2	tr
C _{12:0}	8.08	8.08	4.92	3.87	3.99 (0.49)	13.2	11.7
C _{12:0} 3-OH	3.69	3.67	4.17 (0.28)	2.7	3.61 (0.28)	3.7	4.85
C _{16:0}	14.85	15.16	10.01 (0.04)	23.17	10.92 (3.08)	20.2	19.15
C _{16:1}	–	–	–	–	–	18.6	–
C _{17:1} ω8c	tr	tr	3.17 (0.04)	tr	tr	3.7	tr
C _{18:0}	1.03	1.00	tr	tr	tr	–	tr
C _{18:1} ω7c	31.29	31.46	26.53 (0.61)	33.57	31.02 (1.08)	32.1	33.82
Summed features†							
a	34.79	34.70	–	–	–	–	22.07
b	–	–	27.55	26.81	37.81 (1.33)	–	–

*ECL, Equivalent chain length.

†Summed features: a, C_{16:1}ω7c and/or C_{16:1}ω6c; b, C_{16:1}ω7c and/or iso-C_{15:0} 2-OH.

Table 2. Enzyme activity and assimilation of carbon sources

Taxa: 1, 1N^T; 2, 3N; 3, *P. peli* LMG 23201^T; 4, *P. guineae* M8^T; 5, *P. anguilliseptica* LMG 21629^T; 6, *P. marincola* JCM 14761^T; 7, *P. flavescens* LMG 1837^T. All strains were positive for oxidase and catalase activity and for assimilation of malate. All strains were negative for the following: indole formation, fermentative acid production from glucose, urease, hydrolysis of aesculin and gelatin, β-galactosidase, N-acetylglucosamine and assimilation of D-ribose, maltose, adipate, erythritol, D-arabinose, L-xylose, D-adonitol, methyl β-D-xylopyranoside, L-sorbose, dulcitol, inositol, D-sorbitol, methyl α-D-glucopyranoside, methyl α-D-mannopyranoside, amygdalin, arbutin, aesculin, ferric citrate, salicin, cellobiose, D-lactose (bovine origin), melibiose, D-sucrose, inulin, melezitose, raffinose, starch, glycogen, xylitol, gentiobiose, turanose, D-lyxose, D-tagatose, L-fucose, D-arabitol, L-arabitol and 5-ketogluconate. Data for *P. guineae* were taken from Bozal *et al.* (2007) and data for *P. marincola* were taken from Romanenko *et al.* (2008). NA, Data not available; w, weakly positive; +, positive; −, negative.

Characteristic	1	2	3	4	5	6	7
Fluorescent pigments	−	−	−	−	−	−	+
Enzyme activity:							
Nitrate reduction	−	−	−	+	−	+	−
Arginine dihydrolase	−	−	−	−	−	+	−
Assimilation of:							
D-Glucose	−	−	−	−	−	−	+
Trehalose	−	−	−	−	−	−	+
L-Arabinose	−	−	−	−	−	−	+
D-Mannose	−	−	−	−	−	−	+
D-Mannitol	−	−	−	−	−	−	+
Caprate	+	+	−	+	+	+	+
Citrate (trisodic)	+	+	−	+	+	+	−
Glycerol	−	−	−	−	−	−	+
D-Xylose	+	+	−	−	−	−	−
D-Galactose	−	−	−	+	−	−	+
D-Fructose	−	−	−	−	−	NA	w
D-Mannose	−	−	−	−	−	−	+
L-Rhamnose	+	+	−	−	−	−	−
D-Mannitol	−	−	−	−	−	−	+
D-Fucose	+	+	−	−	−	−	−
Potassium gluconate	+	+	−	−	−	−	+
Potassium 2-ketogluconate	−	+	−	−	−	−	−
Phenyl acetate	−	−	−	−	−	+	−

Identification System (Microbial ID). The DNA–DNA reassociation values between the strains recovered from the lagoon were in the range 87–99 % (3N, 87 %; 2N, 96 %; 5N, 97 %), indicating close relationships at the species level (Vandamme *et al.*, 1996; Stackebrandt *et al.*, 2002). In contrast, low reassociation values (<15 %) were obtained in hybridizations of strain 1N^T with *P. peli* LMG 23201^T (14 %), *P. anguilliseptica* LMG 21629^T (14 %), *P. flavescens* LMG 18387^T (13 %) and *P. stutzeri* LMG 11199^T (12 %). These DNA–DNA reassociation data, together with the 16S rRNA gene sequence results, as well as the SDS-PAGE protein patterns and the fatty acid profiles, support the notion that the isolates recovered from the evaporating

lagoon represent a novel species of the genus *Pseudomonas*, for which the name *Pseudomonas cuatrocienegasensis* sp. nov. is proposed.

To estimate the genome size of *P. cuatrocienegasensis* sp. nov., strains 1N^T, 2N, 3N, 6N, 8N, 9N, 10N and 11N were analysed by PFGE with I-CeuI endonuclease. Genomic DNA preparation and digestion of whole genomes were carried out as described by Liu *et al.* (1993) and Matushek *et al.* (1996), but with some modifications in the DNA-extraction procedure [3 h lysis time instead of overnight; two overnight washes of the lysed product instead of one; and eight washes with TE (10 mM Tris–Cl, pH 7.5; 1 mM EDTA) instead of two]. For *P. cuatrocienegasensis* sp. nov., the mean genome size was 2995 ± 663 kb, which is similar to those of *P. peli* LMG 23201^T (3450 kb) and *P. flavescens* LMG 18387^T (2665 kb), but much smaller than that of *P. aeruginosa* PAO1 (6262 kb). Four RNA operons were detected in *P. cuatrocienegasensis* sp. nov. strain 1N^T (Supplementary Fig. S1, available in IJSEM Online).

Bacteriological and biochemical characterization of the novel isolates was carried after growth in LB medium for 48–72 h at 29 °C. The production of fluorescent pigments was tested on King’s B medium (King *et al.*, 1954). Other phenotypic features were assayed with the API 20NE and API 50CH systems according to the instructions of the manufacturer (bioMérieux). The API 20NE system was used to determine nitrate reduction, gelatin liquefaction, aesculin hydrolysis, urease activity, indole production, fermentative acid production from glucose, β-galactosidase activity and arginine dihydrolase activity. All colonies were grown on LB agar plates to determine the oxidase reaction as a complementary test in the API 20NE system. The utilization of various carbon sources was tested by using the API 50CH system after incubation for 72 h at 29 °C. The inoculation medium used for the API 50CH test strips was CHB/E [l^{−1}: ammonium sulfate (2 g), yeast extract (0.5 g), tryptone (1 g), disodium phosphate (3.22 g), monopotassium phosphate (0.12 g), trace elements (10 ml), phenol red (0.17 g); pH 7.4–7.8]; the incubation was performed at 20–25 °C. The results of these tests showed that the strains of *P. cuatrocienegasensis* sp. nov. differ from the most closely related species in terms of the utilization of specific carbon sources, e.g. D-xylose, D-fucose and gluconate; complete data are shown in Table 2.

Description of *Pseudomonas cuatrocienegasensis* sp. nov.

Pseudomonas cuatrocienegasensis (cu.a.tro.cie.ne.gas.en’sis. N.L. fem. adj. *cuatrocienegasensis* pertaining to the Cuatro Ciénegas valley, the location of the evaporative lagoon from which the organism was isolated).

Cells are rods (1.2 ± 0.13 μm long and 0.53 ± 0.02 μm wide) that are motile by means of a single, polar flagellum. Gram-negative, oxidase-positive and catalase-positive. Good growth occurs on LB agar and GSP agar at 28–32 °C; colonies on LB agar are beige, mucoid and irregular.

No production of fluorescent pigments is observed in King's B medium. The major fatty acids in the type strain are C_{16:0} (14.85%), C_{18:1ω7c} (31.29%) and summed feature a (C_{16:1ω7c} and/or C_{16:1ω6c}; 34.79%); in addition, C_{12:0} (8.08%), C_{12:0} 3-OH (3.69%), C_{10:0} 3-OH (3.11%), C_{18:0} (1.03%) and C_{17:1ω8c} (<1%) are detected. It is noteworthy that strains 1N^T and 3N lack an unknown fatty acid (equivalent chain length 11.799) that is present in type strains of all of the most closely related species. The carbon sources utilized are indicated in Table 2. The utilization of D-xylose, L-rhamnose, D-fucose and potassium gluconate serve as differential characteristics for this species.

The type strain, 1N^T (=LMG 24676^T=CIP 109853^T), was isolated from an evaporative lagoon in Cuatro Ciénegas, Coahuila State, Mexico.

Acknowledgements

We thank R. González-Chauvet (Biosfera-UNO, México), G. M. Rosas-Barrera (Instituto de Ecología, UNAM, México), A. Casamitjana and the Modern American School (México) for sample collection and technical assistance. We gratefully acknowledge Bulmaro Reyes-Coria (Instituto de Investigaciones Filológicas, UNAM, México), Jean Euzéby (Ecole Nationale Vétérinaire, Toulouse, France) and Bernhard Schink (Universität Konstanz, Germany) for help with the etymological construction of the novel species name, G. Delgado-Sapien (Facultad de Medicina, UNAM, México) for assistance with the molecular techniques, A. Patrón-Soberano (Instituto de Fisiología Celular, UNAM, México) for the micrographs and L. E. Eguiarte (Instituto de Ecología, UNAM, México) for comments and ideas. This project was supported by grants from SEMARNAT/CONACyT to V. S. (2002-CO1-0246) and by a CONACyT-UNAM scholarship to A. E. E.

References

- Anzai, Y., Kim, H., Park, J.-Y., Wakabayashi, H. & Oyaizu, H. (2000). Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int J Syst Evol Microbiol* **50**, 1563–1589.
- Bozal, N., Montes, M. J. & Mercadé, E. (2007). *Pseudomonas guineae* sp. nov., a novel psychrotolerant bacterium from an Antarctic environment. *Int J Syst Evol Microbiol* **57**, 2609–2612.
- Cole, J. R., Chai, B., Farris, R. J., Wang, Q., Kulam-Syed-Mohideen, A. S., McGarrell, D. M., Bandela, A. M., Cardenas, E., Garrity, G. M. & Tiedje, J. M. (2007). The ribosomal database project (RDP-II): introducing *myRDP* space and quality controlled public data. *Nucleic Acids Res* **35** (Database issue), D169–D172.
- Estrada-De Los Santos, P., Bustillos-Cristales, R. & Caballero-Mellado, J. (2001). *Burkholderia*, a genus rich in plant-associated nitrogen fixers with wide environmental and geographic distribution. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2790–2798.

Kielwein, G. (1971). Die Isolierung und Differenzierung von Pseudomonaden aus Lebensmitteln. *Arch Lebensmittelhyg* **22**, 29–37 (in German).

King, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. (1954). Two simple media for the demonstration of pycocyanin and fluorescein. *J Lab Clin Med* **44**, 301–307.

Kumar, S., Tamura, K. & Nei, M. (2004). MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform* **5**, 150–163.

Lane, D. J. (1991). 16S/23S rRNA sequencing. In *Nucleic Acid Techniques in Bacterial Systematics*, pp. 115–175. Edited by E. Stackebrandt & M. Goodfellow. Chichester, UK: Wiley.

Liu, S. L., Hessel, A. & Sanderson, K. E. (1993). Genomic mapping with I-Ceu I, an intron-encoded endonuclease specific for genes for ribosomal RNA, in *Salmonella* spp., *Escherichia coli*, and other bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 6874–6878.

Matushek, M. G., Bonten, M. J. & Hayden, M. K. (1996). Rapid preparation of bacterial DNA for pulsed-field gel electrophoresis. *J Clin Microbiol* **34**, 2598–2600.

Migula, W. (1894). Über ein neues System der Bakterien. *Arb Bakteriol Inst Karlsruhe* **1**, 235–238 (in German).

Moore, E. R. B., Tindall, B. J., Martins Dos Santos, V. P., Pieper, D. H., Ramos, J.-L. & Palleroni, N. (2006). Nonmedical *Pseudomonas*. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, pp. 643–703. Edited by M. Dworkin and others. New York: Springer.

Romanenko, L. A., Uchino, M., Tebo, B. M., Tanaka, N., Frolova, G. M. & Mikhailov, V. V. (2008). *Pseudomonas marincola* sp. nov., isolated from marine environments. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**, 706–710.

Spiers, A. J., Buckling, A. & Rainey, P. (2000). The causes of *Pseudomonas* diversity. *Microbiology* **146**, 2345–2350.

Stackebrandt, E., Frederiksen, W., Garrity, G. M., Grimont, P. A. D., Kampfer, P., Maiden, M. C. J., Nesme, X., Rossello-Mora, R., Swings, J. & other authors (2002). Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 1043–1047.

Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev* **60**, 407–438.

Vanparys, B., Heylen, K., Lebbe, L. & De Vos, P. (2006). *Pseudomonas peli* sp. nov. and *Pseudomonas borbori* sp. nov., isolated from a nitrifying inoculum. *Int J Syst Evol Microbiol* **56**, 1875–1881.

Versalovic, J., Koeuth, T. & Lupski, J. R. (1991). Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. *Nucleic Acids Res* **19**, 6823–6831.

Versalovic, J., Schneider, M., de Bruijn, F. J. & Lupski, J. R. (1994). Genomic fingerprinting of bacteria using repetitive sequence-based polymerase chain reaction. *Methods Mol Cell Biol* **5**, 25–40.

Yamamoto, S., Kasai, H., Arnold, D. L., Jackson, R. W., Vivian, A. & Harayama, S. (2000). Phylogeny of the genus *Pseudomonas*: intragenomic structure reconstructed from the nucleotide sequences of *gyrB* and *rpoD* genes. *Microbiology* **146**, 2385–2394.

Characterisation of a biosurfactant produced by a *Bacillus cereus* strain tolerant to cadmium and isolated from green coffee grain

Juan Carlos Velázquez-Aradillas · Jeiry Toribio-Jiménez ·
Ma. del Carmen Ángeles González-Chávez · Francisco Bautista ·
Mariano E. Cebrián · Fernando José Esparza-García ·
Refugio Rodríguez-Vázquez

Received: 12 September 2009 / Accepted: 6 August 2010
© Springer Science+Business Media B.V. 2010

Abstract In this work, a Gram-positive bacterium with bacillus-type morphology was isolated from low-quality coffee beans in a nutritive medium supplemented with 178 μM of Cd [$\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$]. PCR showed 99% similarity of the isolated bacteria with *Bacillus cereus* QD232. This bacterium produced a biosurfactant after 120 h of growth with an average production of 480 mg l^{-1} and was able to emulsify various hydrocarbons such as diesel (60%), cyclohexane (48%), benzene (48%), isooctane (47%) and toluene (40%). The molecular weight of the

biosurfactant, as determined by high-performance liquid chromatography, was 34,194 Da. The cell-free media had a surface tension of 45 mN m^{-1} and a critical micellar concentration in the range of 0.2–2.5% (v/v), as evaluated by surface tension and conductance, respectively. The emulsifying agent maintained its properties over a pH range from 6 to 10. The composition of the biosurfactant was 53% proteins, 44.4% lipids and 2.6% carbohydrates. Only a few reports have described the production of biosurfactant from *Bacillus cereus* strains, and the results from this study show that the biosurfactant properties of *Bacillus cereus* may have potential environmental applications.

J. C. Velázquez-Aradillas · F. J. Esparza-García ·
R. Rodríguez-Vázquez (✉)
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería, Centro de
Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico
Nacional, Av. IPN 2508 Col. San Pedro Zacatenco, Del, Gustavo
A. Madero, DF, Mexico
e-mail: rrodrig@cinvestav.mx

J. Toribio-Jiménez
Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Instituto
de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma
de México, Mexico, Mexico

Ma. del Carmen Ángeles González-Chávez
Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo, km. 36.5 Carr.,
México-Texcoco, Montecillo, Texcoco Edo. de México, CP
56230, Mexico

F. Bautista
Centro de Investigaciones en Geografía Ambiental, Universidad
Nacional Autónoma de México, Ant. Carretera a Pátzcuaro No.
8701 Col. Ex Hacienda San José de la Huerta, CP 58190
Morelia, Michoacán, Mexico

M. E. Cebrián
Departamento de Toxicología, Centro de Investigación y de
Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, Av. IPN
2508 Col. San Pedro Zacatenco, Del. Gustavo A. Madero, DF,
Mexico

Keywords Biosurfactant · *Bacillus cereus* · Cadmium ·
Green coffee bean · Critical micellar concentration ·
Emulsifying activity

Introduction

Cadmium (Cd) is an element without biological function and is considered to be a priority pollutant by the Environmental Protection Agency. Cadmium has high affinity for the SH-group of proteins, promoting its interaction with specific DNA nucleotides and causing its mutagenic and carcinogenic effects in cells and organisms (Hugues and Poole 1989).

Microbial metabolites can form very stable complexes with essential and non-essential metals like Mg, Fe, Zn, Cu, Cd and Pb (Ochoa-Loza et al. 2001; Wei et al. 2004). Among these metabolites are biosurfactants, which are biological molecules that include a hydrophilic and a hydrophobic moiety and are produced by diverse genera of bacteria, fungi and plants (Desai and Banat 1997; Luna-Velazco et al. 2007; Solís-Domínguez et al. 2007). Biosurfactants can be classified into

two categories: those with low molecular weight (e.g., rhamnolipids, sophorolipids, trehalolipids and lipopeptides) and those with high molecular weight (e.g., polysaccharides, proteins and lipopolysaccharides) (Desai and Banat 1997; Rosenberg and Ron 1999).

Surfactants from microorganisms have distinct advantages compared to synthetic surfactants, including low toxicity, biodegradability and the ability to be adsorbed to interfaces; biological surfactants also display decreased interfacial and surface tension, increasing the surface area of contact (Rosen 2004) and can be produced from low-cost raw materials such as agro-industrial wastes (Makkar and Cameotra 1999).

Biosurfactant-producing microorganisms have been isolated from different heavy metal- and oil- contaminated substrates, such as soil, lagoon water (Bodour et al. 2003; Ilori et al. 2005; Menezes-Bento et al. 2005), seawater and marine sediments (Olivera et al. 2009; Das et al. 2008; Yakimov et al. 1998). Some species of *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Aeromonas*, *Cellulomonas*, *Serratia* and fungi that grow in green coffee beans (Silva et al. 2000) are reported to be biosurfactant-producing microorganisms (Desai and Banat 1997).

Green coffee beans can support microbial populations because of their nutritional composition, which includes carbohydrates, amino acids and organic acids (Barragán-Huerta et al. 2007).

The aim of this study was to characterise a biosurfactant produced by a Cd-tolerant bacterium isolated from green coffee beans.

Materials and methods

Isolation of a Cd-tolerant bacterium

A sample of green coffee beans, donated by the Mexican Coffee Council, was ground and sieved to a 20-mesh size and stored in an aluminium-wrapped glass bottle. A 0.08 g sample was added to a 125-ml Erlenmeyer flask containing 40 ml of Bioxon nutrient medium (5 g l⁻¹ pancreatic digest of gelatine and 3 g l⁻¹ beef extract). The solution pH was adjusted to 6.5 with 1 N NaOH. After 18 h of incubation in a rotary shaker (120 rev min⁻¹ and 30°C), a 0.4 ml aliquot was added to 125 ml flasks containing 40 ml of medium with Cd(NO₃)₂ · 4H₂O (provided by J.T.Baker) added at the following concentrations: 0, 44, 89, 178 and 356 μM. The bacteria continued to grow to 178 μM but no growth was observed at 356 μM. Bacterial purification was performed by repetitive growth in solid medium. Pure colonies were preserved in Luria-Bertani medium (10 g l⁻¹ NaCl, 10 g l⁻¹ pancreatic digest of casein and 5 g l⁻¹ yeast extract) (Atlas 2004) at -120°C.

Identification of the strain

The morphology of pure, isolated bacterium was determined by Gram and Sheaffer–Foulton tests. Phylogenetic analysis was performed by polymerase chain reaction (PCR) of the 16S ribosomal gene analysis. Bacterial DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen CA, USA) according to the manufacturer's protocol. Primers 27F and 1492R were used to obtain the genomic sequence (1,450 bp) using a sequencing procedure provided by the High-Throughput Sequencing Enterprise of the University of Washington (EUA) program. These sequences were compared with other published sequences found in the Ribosomal Database Project II (Cole et al. 2007).

Biosurfactant production

Screening of biosurfactant production was performed to determine whether the isolated bacterium was able to produce biosurfactant. PPGAS was used as medium and consisted of NH₄Cl (0.02 M), KCl (0.02 M), Tris-HCl (0.12 M), glucose (0.5%), peptone (1%) and MgSO₄ (0.0016 M) (Zhang and Miller 1992). The initial pH value of the medium was adjusted to 7.1. The medium was sterilised at 120°C for 15 min. A 125 ml Erlenmeyer flask with 50 ml of medium was inoculated with a colony of the isolated strain. After 18 h growth, an aliquot containing 6 × 10⁷ CFU ml⁻¹ was used to inoculate 200 ml of medium. The growth conditions were 30°C and 200 rpm. Bacterial growth was monitored for 120 h. Subsamples of medium with cells were centrifuged (5,000 × g for 15 min) and reducing sugars in the cell-free supernatant were measured using the 2, 3 dinitrosalicylic acid method (Miller 1959). The presence of biosurfactant in the medium was qualitatively confirmed by the drop-collapse test (Bodour and Maier 1998). This test was performed in a lid from a 96-microwell plate previously rinsed with warm water, ethanol and distilled water. A 2 μl sample of light mineral oil (Fisher Scientific) was placed in microwells and dried at room temperature to allow formation of a homogeneous layer. A 5 μl sample of cell-free supernatant was added to the wells. The drop that formed was observed using a Krüss A microscope. Distilled water and sterilised PPGAS medium served as controls. Determinations of pH and emulsifying activity (E₂₄) were also performed on the cell-free supernatant (Cooper and Goldenberg 1987).

Emulsifying activity was assessed by mixing a 2 ml sample of the cell-free medium with 3 ml of diesel fuel oil. The samples were shaken at high speed using a vortex mixer and left for 24 h. The emulsifying activity was calculated by dividing the height of the emulsion by the total height of the solution-diesel medium. This test was done in

triplicate. Control samples were prepared with sterilised PPGAS medium and water.

Extraction and chemical analysis of the biosurfactant

The separation of the biosurfactant was performed from a 120 h bacterial culture. The medium was centrifuged at $5,000\times g$ for 20 min, and the supernatant was then acidified to pH 2.0 and incubated for 10 h at 4°C. The precipitate was extracted three times with chloroform: methanol (2:1 v/v). The organic phase was evaporated and the residue was recovered with methanol, placed in a vial and weighed after evaporation of the solvent. The semi-purified biosurfactant was then diluted in alkaline distilled water (pH 8.5) and used to determine its composition.

Quantification of protein was performed by the modified Lowry method (Peterson 1977) using bovine albumin serum as a standard. The carbohydrate content was quantified by the phenol–sulfuric acid test (Dubois et al. 1956). The lipid fraction was quantified by extraction with diethyl ether using a modified technique from Camargo de Morais et al. (2003). Biosurfactant samples were extracted with diethyl ether, recovered in vials, evaporated and weighed. For determination of the fatty acid composition, hydrolysis of a semi-purified biosurfactant sample was performed with 6 N HCl at 100°C for 4 h. The hydrolysed samples were extracted with hexane and methylated with HCl and methanol. Gas chromatography (GC) analyses were done in a Perkin Elmer Autosystem with an ionisation detector (capillary column Zebron Zb-FFAP, 30×0.25 m with a detector temperature of 270°C). A mixture of fatty acids (lauric, myristic, oleic, linolenic, palmitic and linoleic acids) was used as a standard.

Determination of biosurfactant molecular weight

A semi-purified biosurfactant sample was extracted three times with hexane (1:1 v/v). The aqueous fraction was filtered and analysed using high-performance liquid chromatography (HPLC) with a refractive index detector (Perkin Elmer Series 200a, Software TurboSEC, column TSK with gel G5000PWXL, $30 \text{ cm} \times 7.8 \text{ mm}$, Tosoh Bioscience). The operational parameters were as follows: the temperature of the column was 65°C, and the mobile phase was water (0.6 ml min^{-1}). A calibration plot was made with molecular weight standards from 22,800 to 1,400,000.

Analysis of low molecular weight compounds

In order to detect low molecular weight compounds, the biosurfactant was precipitated from the culture medium by acidification and extracted at a chloroform methanol ratio of 2:1. Two solutions were prepared separately by mixing

0.5 μl of the extracted biosurfactant and 0.5 μl of a liquid matrix, (2, 5 Dihydroxybenzoic acid or α -cyano-4-hydroxycinnamic acid). Then the mixtures were analyzed for low molecular weight compounds in a mass spectrometer MALDI TOF / TOF plus ABSCIEX 4,800, applying a 4,000 V laser intensity.

Determination of critical micellar concentration

The determination of critical micellar concentration (CMC) was carried out by measuring the surface tension and conductance using aliquots of cell free medium diluted in deionised water. Surface tension measurements were made with a Krauss tensiometer coupled to a Tensiometer K-12 processor (the DuNouy ring method). The surface tension values were plotted against the dilution percentage, and the CMC value was determined using the method described and developed by Desai and Banat (1997) and Abdel-Mawgoud et al. (2008). Conductance measurements were performed with a Hanna Instruments meter. Measurements were performed at 25°C, and the pH of the media was adjusted to 8 using NaOH 2N. The analyses were performed at least twice.

Effect of pH on emulsifying activity

In order to determine the effect of pH on emulsifying activity, pH values of 50 ml aliquots of cell-free medium were adjusted (range between 6–12) using 3 N NaOH or 2 M HCl. E₂₄ was tested using the method described above using diesel as a substrate. Assays were done in triplicate.

Emulsifying activity by hydrophobic substrates

The ability of the biosurfactant to emulsify different substrates was tested. 3 ml aliquots of diesel, cyclohexane, isooctane, benzene, hexane, toluene and xylene were mixed with 2 ml of cell-free medium. The samples were vortexed for 3 min at high speed and left for 24 h. Emulsifying activity was calculated as previously described.

Statistical analysis

All results were analysed using ANOVA and evaluated using comparative media and correlation analyses with SAS 9.0 software. The level of significance was $P < 0.05$.

Results

Bacterial isolation and identification

A Gram-positive, ($6.2 \times 1.8 \mu\text{m}$) endospore-forming, rod-shaped bacterium with bacillar morphology was isolated

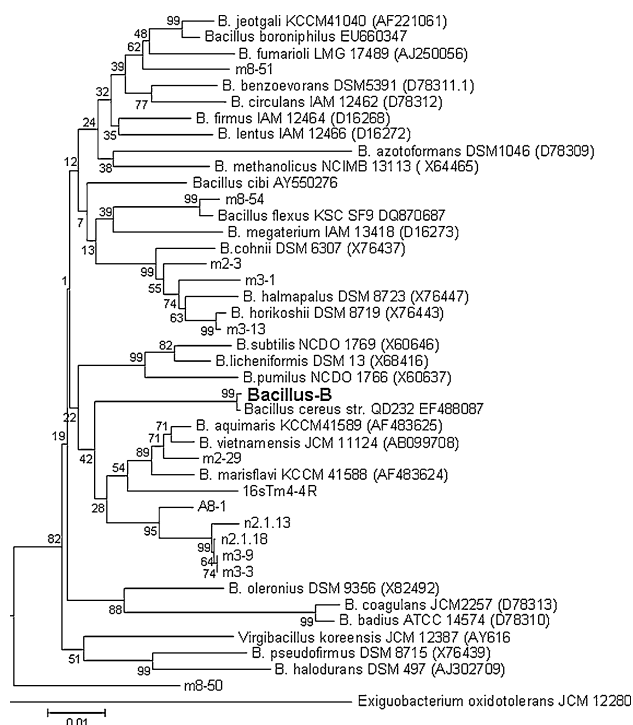


Fig. 1 Phylogenetic location of the isolated strain based on Kimura-2 and neighbour-joining parameters after a multiple alignment (1,480 bp) of 16S rRNA sequences with the closest members of the *Bacillus* gene. Starting point values (expressed as the percentage after 10,000 repetitions) are shown as *union points*. Phylogenetic analysis was done by MEGA software version 3.1 (Kumar et al. 2004)

from the medium containing 178 $\mu\text{Mol Cd}$. The sequence of the 16S rRNA demonstrated a high degree of similarity (99%) with *B. cereus* QD232 (Fig. 1).

Biosurfactant production

The stationary bacterial growth phase started after 8 h of culture, and glucose was depleted ~ 48 h after incubation. The bacterial growth increased by decreasing the concentration of reducing sugars ($P < 0.05$), which reached a value of $0.48 \pm 0.13 \text{ mg ml}^{-1}$ and remained constant after 48 h (Fig. 2). The extracellular biosurfactant production increased by increasing the pH value (between pH values of 6–8). The average production of biosurfactant after 120 h of incubation was 480 mg l^{-1} and had an E_{24} of 60% (Fig. 2); the emulsions were stable for longer than 24 h (Desai and Banat 1997; Myers 2006; Rosen 2004). The drop-collapse test showed an increase in the diameter of drops with cell-free medium relative to water and sterilised medium.

The analyses of the biosurfactant showed an average weight of 34,194 Da with a composition including proteins (53%), lipids (44%) and a small amount of carbohydrates (2.5%). The GC analysis of the lipid fraction showed a

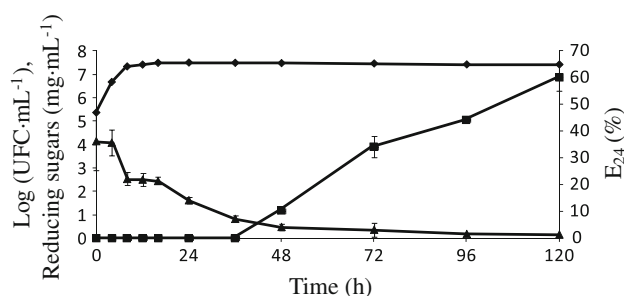


Fig. 2 *Bacillus cereus* growth kinetics, emulsifying activity (E_{24}), reducing sugars, and increment in viable cells (CFU. ml^{-1}). Bars represent the standard deviation of each analysis; $n = 3$. (filled diamond, cfu. ml^{-1} ; filled triangle, reducing sugars; filled square, E_{24})

mixture of unsaturated acids (myristic, lauric, palmitic and stearic acids, 43.5%), monounsaturated acids (oleic acid, 40.8%) and polyunsaturated acids (linolenic and linoleic acids, 14.7%).

Low molecular weights compounds were not detected in the MALDI-TOF spectrometer due to the impurities of the biosurfactant, therefore further purification is recommended in order to detect these compounds.

Determination of the critical micellar concentration

The value of the CMC (2.5%) was obtained from the intersection point of the lines A and B with \times (Fig. 3). Surface tension decreased with the increasing biosurfactant concentration in the medium. Conductance measurements (Fig. 4) showed an inflexion point at 0.2% dilution. It was not possible to perform measurements above 20% dilution because the values were out of range.

Effect of pH on emulsifying activity

The pH did not affect the emulsifying activity within the pH range studied (Fig. 5). Test were not done at $\text{pH} \leq 5$, because a precipitate was observed.

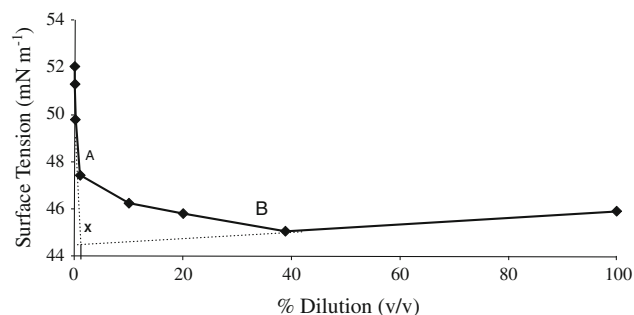


Fig. 3 Surface tension (mN m^{-1}) versus cell-free medium with biosurfactant in water (% v/v) at 25°C and pH 8

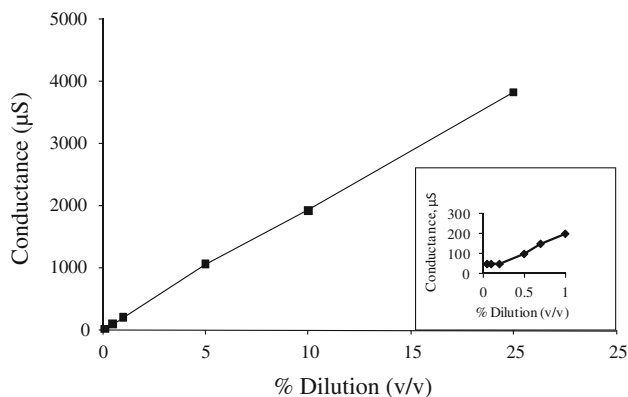


Fig. 4 Conductance (μS) versus cell-free medium with biosurfactant in water (% v/v) at 25°C; relative density of the sample = 0.9986. Error bars represent the standard deviation; $n = 2$

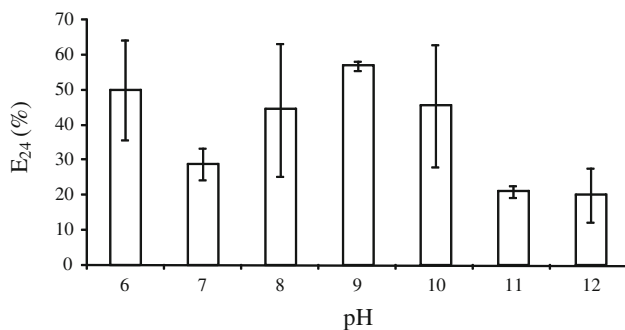


Fig. 5 Emulsifying activity as a function of pH. The test was done at 25°C. Bars represent the standard deviation; $n = 3$

Emulsifying activity with selected hydrophobic substrates

The strain *B. cereus*-produced biosurfactant had high emulsifying activity with cyclic and aromatic substrates, such as cyclohexane, xylene and benzene (48 ± 0.69 , 49 ± 1.37 and $48 \pm 1.55\%$, respectively) (Fig. 6). Lower

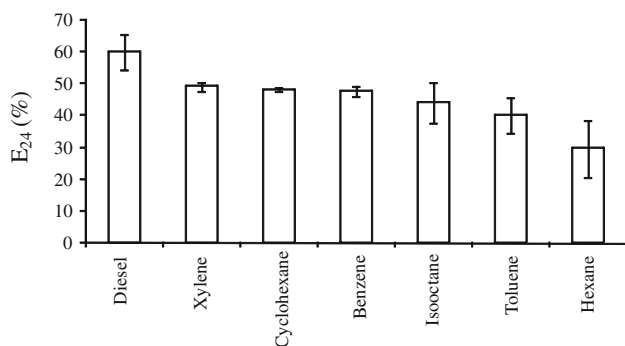


Fig. 6 Emulsifying activity of *Bacillus cereus*-produced biosurfactant with selected organic substrates. All solvents were analytical grade. Cell-free broth was used for this test at pH 8.0 and at 25°C

activities were observed for toluene and n-hexane ($40.2\% \pm 5$, $29.7\% \pm 9$).

Discussion

The results of the isolation showed the existence of a Gram-positive, spore-forming bacterium identified as *Bacillus cereus*. The presence of *Bacillus* in green coffee beans was reported by Silva et al. (2008), who identified different *Bacillus* species during the natural processing of coffee. *Bacillus cereus* is commonly found in agricultural products, food, soil, dust and natural waters (Hsueh et al. 2006).

Biosurfactant production

The ability of cell-free medium to emulsify diesel demonstrated the presence of a compound with emulsifying properties. The average production of biosurfactant after 120 h of incubation was 480 mg l^{-1} lower than that produced by *B. cereus* IAF346 after 96 h of incubation ($1,600 \text{ mg l}^{-1}$) (Cooper and Goldenberg 1987). Our results were similar to those of Al-Ajlani et al. (2007) and Davis et al. (1999), who showed surfactin production of 300 and 439 mg l^{-1} by *B. subtilis* DQ327713 and *B. subtilis* ATCC 21332, respectively.

The pH can affect biosurfactant production, as it was shown by Guerra-Santos et al. (1986), who reported that biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* was higher at pH 6.5. Huszcza and Burczyk (2003) found that *B. coagulans* produced a biosurfactant in a pH range 4–7.5. Further research is in progress to establish pH effects on *B. cereus* biosurfactant production (data not shown). Few studies have reported on biosurfactant-producing *B. cereus* strains, for example, Cooper and Goldenberg (1987) detected a polysaccharide and a monoglyceride biosurfactant in *B. cereus* IAF 346. Hsueh et al. (2006) found that biosurfactant production by *B. cereus* was physiologically related to the formation of a biofilm under nutrient-limiting conditions. The medium used in the present study was phosphate-limited, and such conditions promote the biosurfactant production of *Pseudomonas* (Dean et al. 2001; Zhang and Miller 1992).

Characterisation of the biosurfactant

With an average weight of 34,194 Da, the biosurfactant has a high molecular weight compared to rhamnolipids (1,500 Da) and some lipopeptides, which have weights of 1,003–1,127 Da (Tan et al. 1994). Some other polymeric biosurfactants have higher molecular weights than those obtained in this work. For example, *Acinetobacter*

calcoaceticus A2 produces an anionic heteropolysaccharide biosurfactant with a molecular weight of 51.4 kDa (Rosenberg et al. 1988). In addition, the Alasan biosurfactant produced by *Acinetobacter radioresistans* and a surfactant type produced by *Pseudomonas marginalis* have molecular weights of up to 1×10^6 Da (Navon-Venezia et al. 1995; Burd and Ward 1996).

Biosurfactants can be classified by their microbial origin and chemical composition (Desai and Banat 1997). *Bacillus* spp. is recognised as a producer of lipopeptides (Lang 2002) with a hydrophilic portion that is constituted mainly of amino-acid residues or peptides. In this work, the biosurfactant was composed of proteins (53%), lipids (44%) and a small amount of carbohydrates (2.5%). The GC analysis of the lipid fraction showed a mix of unsaturated acids (myristic, lauric, palmitic and stearic acids, 43.5%), monounsaturated acids (oleic acid, 40.8%) and polyunsaturated acids (linolenic and linoleic acids, 14.7%).

The composition of the growth medium can affect the nature of fatty acids in the biosurfactant molecule (Martinez-Toledo et al. 2006). Cooper and Goldenberg (1987) reported the production of a biosurfactant composed of a monoglyceride with surface activity and a significant quantity of araquidic acid (53%) made by *B. cereus* IAF 346. Fatty acids are known to provide surface activity to some biosurfactants produced by *Bacillus* spp. (Youssef et al. 2005).

Determination of critical micellar concentration

The behaviour of parameters such as conductance and surface tension at the level of the CMC has been described by many authors, including Rosen (2004) and Schramm (2000). At the CMC value, amphiphilic molecules readily associate to form supramolecular structures like micelles, bilayers and vesicles (Desai and Banat 1997). The minimum value of surface tension obtained in the present study was 45 mN m^{-1} , which is similar to the value of 50 mN m^{-1} found for a biosurfactant produced by *B. cereus* AY238271 isolated from diesel-contaminated soil. The minimal surface tension obtained in the present study was higher than *B. cereus* IAF346 grown in minimal medium for 80 h, which produced a biosurfactant that reduced surface tension to 28 mN m^{-1} (Cooper and Goldenberg 1987). The surface activities of biosurfactants produced by the *Bacillus* genus were documented by Desai and Banat (1997).

The differences between the strain isolated in the present study and other strains are primarily due to growth conditions and the structure of the biosurfactant produced. Another source of variance is the type of compounds in the residual medium (i.e., electrolytes), which may bind to the biosurfactant molecule (Rosen 2004).

Effect of pH on emulsifying activity

The pH did not affect the emulsifying activity in the pH range studied, as shown in Fig. 5. Cooper and Goldenberg (1987) reported an increase in emulsifying activity in the biosurfactants produced by *B. cereus* IAF346 and *Bacillus* sp. IAF 343 using kerosene as the substrate in acidic pH conditions, but they did not report the precipitation of biosurfactant. Ilori et al. (2005) reported high emulsifying activities in *Aeromonas* sp. biosurfactant (50%) at pH 5–9 with a maximum activity at pH 8.0.

Emulsifying activity with selected hydrophobic substrates

The biosurfactant showed the highest activity in diesel ($60 \pm 5\%$) and the lowest activity in n-hexane ($29 \pm 9\%$) (Fig. 6), a pattern similar to the glycolipid produced by *Aeromonas* sp. (diesel 65%, n-hexane 22%) (Ilori et al. 2005). In addition, the surfactin produced by *B. subtilis* BS5 had similar activity in hexadecane, kerosene and diesel (65, 55 and 65%, respectively) (Abdel-Mawgoud et al. 2008).

Acknowledgments JCVA thanks to the National Council of Science and Technology (CONACYT) for his doctoral scholarship, to Dr. René Cerritos Flores (INE-UNAM) for the construction of the phylogenetic tree, to M.C. Josefina Verdejo (Fenómenos de Superficie, Facultad de Química, UNAM) for the measurement of surface tension, QFB Elvira Ríos, I.B. María Dolores Díaz Cervantes and Ph.D. Martha Barajas Aceves for their technical support.

References

- Abdel-Mawgoud AM, Mohammad MA, Haleem HN (2008) Characterization of surfactin produced by *Bacillus subtilis* isolates BS5. *Appl Biochem Biotechnol* 150:289–303. doi:10.1007/s12010-008-8155-x
- Al-Ajlani MM, Sheik MA, Ahmad Z, Hasnain S (2007) Production of surfactin from *Bacillus subtilis* MZ-7 grown on pharmaceutical commercial medium. *Microb Cell Fact* 6:17. doi:10.1186/1475-2859-6-17
- Atlas R (2004) *Handbook of microbiological media*, 3rd edn. CRC Press, USA
- Barragán-Huerta BE, Costa-Perez C, Peralta-Cruz J, Barrera-Cortés J, Esparza-García F, Rodríguez-Vázquez R (2007) Biodegradation of organochlorine pesticides by bacteria grown in microniches of the porous structure of green bean coffee. *Int Biodeter Biodegr* 59:239–244. doi:10.1016/j.ibiod.2006.11.001
- Bodour A, Miller-Maier R (1998) Application of a modified drop-collapse technique for surfactant quantitation and screening of biosurfactant-producing microorganisms. *J Microbiol Meth* 32: 273–280
- Bodour A, Dress K, Miller-Maier R (2003) Distribution of biosurfactant-producing bacteria in undisturbed and contaminated arid southwestern soils. *Appl Environ Microbiol* 69:3280–3287
- Burd G, Ward OP (1996) Physicochemical properties of PM-factor, a surface active agent produced by *Pseudomonas marginalis*. *Can J Microbiol* 42:243–252

- Camargo de Morais MM, Ramos FAS, Pimentel BCM, de Morais MA, Filho LJJ (2003) Production of an extracellular polysaccharide with emulsifying properties by *Penicillium citrinum*. World J Microbiol Biotechnol 19:191–194. doi:10.1023/A:1023299111663
- Cole JR, Chai B, Farris RJ, Wang Q, Kulam-Syed-Mohideen AS, McGarrell DM, Bandela AM, Cardenas E, Garrity GM, Tiedje JM (2007) The Ribosomal Database Project (RDP-II): introducing my RDP space and quality controlled public data. Nucl Acid Res 35:169–172. doi:10.1093/nar/gkl889
- Cooper D, Goldenberg B (1987) Surface-active agents from two *Bacillus* species. Appl Environ Microbiol 53:224–229
- Das P, Mukerjee S, Sen R (2008) Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactant derived from a marine *Bacillus circulans*. J Appl Microbiol 104:1675–1684. doi:10.1111/j.1365-2672.2007.03701
- Davis DA, Lynch HC, Varley J (1999) The production of surfactin in batch culture by *Bacillus subtilis* ATCC 21332 is strongly influenced by the conditions of nitrogen metabolism. Enzyme Microb Tech 25:322–329
- Dean S, Jin Y, Cha D, Sviatlana V, Radosevich M (2001) Phenanthrene degradation in soils co-inoculated with phenanthrene-degrading and biosurfactant-producing bacteria. J Environ Qual 30:1126–1133
- Desai J, Banat I (1997) Microbial production of biosurfactants. Microbiol Mol Biol R 61:47–64
- Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal Chem 28:350–356
- Guerra-Santos LH, Käppeli O, Fiechter A (1986) Dependence of *Pseudomonas aeruginosa* continuous culture biosurfactant production on nutritional and environmental factors. Appl Microbiol Biotechnol 24:443–448
- Hsueh YH, Somers EB, Lereclus D, Lee-Wong AC (2006) Biofilm formation by *Bacillus cereus* is influenced by PlcR, a pleiotropic regulator. Appl Environ Microbiol 72:5089–5092. doi:10.1128/AEM.00573-06
- Hugues MN, Poole RK (1989) Metals and micro-organisms. Chapman and Hall, Great Britain
- Huszczka E, Burczyk B (2003) Biosurfactant production by *Bacillus coagulans*. J Surfactants Deterg 6:61–64. doi:10.1007/s11743-003-0249-2
- Ilori MO, Amobi CJ, Odocha AC (2005) Factors affecting biosurfactant production by oil degrading *Aeromonas* sp. isolated from a tropical environment. Chemosphere 61:985–992. doi:10.1016/j.chemosphere.2005.03.066
- Kumar S, Tamura K, Nei M (2004) Mega 3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. Brief Bioinform 5:150–163. doi:10.1093/bib/5.2.150
- Lang S (2002) Biological amphiphiles (microbial biosurfactants). Curr Opin Colloid Interface Sci 7:12–20
- Luna-Velazco MA, Esparza-García F, Cañizares-Villanueva RO, Rodríguez-Vázquez R (2007) Production and properties of a bioemulsifier synthesized by phenanthrene-degrading *Penicillium* sp. Process Biochem 42:310–314. doi:10.1016/j.procbio.2006.08.015
- Makkar R, Cameotra S (1999) Biosurfactant production by microorganisms on unconventional carbon sources. J Surfact Detergents 2:237–241
- Martínez-Toledo A, Ríos-Leal E, Vázquez-Duhalt R, González-Chávez MC, Esparza-García JF, Rodríguez-Vázquez R (2006) Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *P. putida* in different media. Environ Technol 27:137–142
- Menezes-Bento F, de Oliveira-Camargo F, Okeke B, Frankenberger W (2005) Diversity of biosurfactant producing microorganisms isolated from soils contaminated with diesel oil. Microbiol Res 160:249–255. doi:10.1016/j.micres.2004.08.005
- Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. Anal Chem 31:426–428
- Myers D (2006) Surfactant science and technology. Wiley-Interscience, USA
- Navon-Venezia S, Zozim Z, Gottlieb A, Legmann R, Carmeli S, Ron EZ, Rosenberg E (1995) Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. Appl Environ Microbiol 61:3240–3244
- Ochoa-Loza FJ, Artiola JF, Maier RM (2001) Stability constants for the complexation of various metals with a rhamnolipid biosurfactant. J Environ Qual 30:479–485
- Olivera NL, Marina LN, Lozada M, del Prado G, Dionisi HB, Sñieriz F (2009) Isolation and characterization of biosurfactant-producing *Alcanivorax* strains: hydrocarbon accession strategies and alkane hydroxylase gene analysis. Res Microbiol 160:19–26. doi:10.1016/j.resmic.2008.09.011
- Peterson G (1977) A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. Anal Biochem 83:346–356
- Rosen M (2004) Surfactants and interfacial phenomena. John Wiley, USA
- Rosenberg E, Ron EZ (1999) High- and low-molecular-mass microbial surfactants. Appl Microbiol Biotechnol 52:154–162
- Rosenberg E, Rubinovitz C, Gottlieb A, Rosenhak S, Ron EZ (1988) Production of biodispersant by *Acinetobacter calcoaceticus* A2. Appl Environ Microbiol 54:317–322
- Schramm L (2000) Surfactants: fundamentals and applications in the petroleum industry. Cambridge University Press UK
- Silva CF, Schwan RF, Dias ES, Wheals AE (2000) Microbial diversity during maturation and natural processing of coffee cherries of *Coffea arabica* in Brazil. Int J Food Microbiol 60:251–260
- Silva CF, Batista LR, Magalhães-Abreu L, Souza-Diaz E, Freitas-Schwan R (2008) Succession of bacterial and fungal communities during natural coffee (*Coffea arabica*) fermentation. Food Microbiol 25:951–957. doi:10.1016/j.fm.2008.07.003
- Solís-Dominguez FA, González-Chávez MC, Carrillo-González R, Rodríguez-Vázquez R (2007) Accumulation and localization of cadmium in *Echinochloa polystachya* grown within a hydroponic system. J Hazard Mater 141:630–636. doi:10.1016/j.jhazmat.2006.07.014
- Tan H, Champion JF, Artiola JF, Brusseau ML, Miller RM (1994) Complexation of cadmium by a rhamnolipid biosurfactant. Environ Sci Technol 28:2402–2406
- Wei Y, Wang L, Chang J (2004) Optimizing iron supplement strategies for enhanced surfacting production with *Bacillus subtilis*. Biotechnol Prog 20:979–983
- Yakimov MM, Golyshin PN, Lang S, Moore ERB, Lunsdorf H, Timmis KN (1998) *Alcanivorax borkumensis* gen. nov., sp. nov., a new, hydrocarbon-degrading and surfactant-producing marine bacterium. Int J Syst Bacteriol 48:339–348
- Youssef NH, Duncan KE, McInerney MJ (2005) Importance of 3-hydroxy fatty acid composition of lipopeptides for biosurfactant activity. Appl Environ Microbiol 71:7690–7695. doi:10.1128/AEM.71.12.76907695.2005
- Zhang Y, Miller RM (1992) Enhanced octadecane dispersion and biodegradation by a *Pseudomonas* rhamnolipid surfactant (biosurfactant). Appl Environ Microbiol 58:3276–3282

Microbiología industrial

Guillermo Gosset Lagarda*

Vol. 48, No. 2
Abril - Junio, 2006
pp. 91 - 98

RESUMEN. La aplicación industrial de los microorganismos es una actividad antigua que se orientaba principalmente a la producción y modificación de alimentos. El conocimiento acumulado acerca de la genética y la fisiología microbianas, así como el desarrollo de herramientas moleculares que permiten la ingeniería genética, generaron la posibilidad de modificar a los microorganismos para ser empleados en un amplio espectro de aplicaciones industriales que incluyen las áreas alimentaria, farmacéutica y química. En este trabajo, se presentan ejemplos sobre el desarrollo y caracterización de cepas microbianas para aplicaciones industriales específicas. Se presentan y discuten las estrategias seguidas para generar cepas sobreproductoras de compuestos aromáticos y ramnolípidos con *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. Por otro lado, la contaminación ocasionada por el azufre y el nitrógeno orgánicos presente en el petróleo es un problema serio en todo el mundo. En este trabajo se comparten experiencias sobre el aislamiento, la caracterización y el empleo de microorganismos autóctonos para la desulfurización y desnitrógenación de fracciones de petróleo.

Palabras clave: Control biológico, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, baculovirus, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Bauberia bassiana*, *Metarhizium anisopliae*1, *Trichoderma* spp.

INTRODUCCIÓN

El empleo de microorganismos para la producción de compuestos útiles es una actividad antigua. Estos organismos han sido empleados por pueblos en todo el mundo para la modificación de las propiedades de algunos alimentos y para la producción de bebidas alcohólicas. La existencia de los microorganismos y su participación en transformaciones químicas fue demostrada por los trabajos pioneros de científicos como Louis Pasteur y Antonie van Leeuwenhoek. Éstos y otros descubrimientos fueron la base para el desarrollo de la microbiología industrial. Durante el siglo pasado, el conocimiento acumulado por diferentes disciplinas, generaron el conjunto de herramientas conocidas como ingeniería genética, que permiten la modificación directa del material genético en cualquier organismo. La aplicación de estas herramientas al desarrollo de cepas microbianas de uso industrial, ha ampliado de forma muy importante el tipo y número de productos útiles que pueden ser obtenidos. Ahora es

ABSTRACT. In this review we cover the biological control of insects, bacteria and fungus that affect different crops. Using different microorganism as bacteria viruses and fungus can do the biological control of these important problems. In this work we describe with detail the mode of action of the different microorganisms used to control insects and plant diseases. We also present novel strategies to improve the efficiency of these microorganisms against their targets and we present the development and production of several formulations to be used in the fields for the biological control of some plant problems.

Key words: Biological control, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus subtilis*, baculovirus, *Paecilomyces fumosoroseus*, *Bauberia bassiana* y *Metarhizium anisopliae*1, *Trichoderma* spp.

posible que bacterias puedan producir proteínas humanas para uso terapéutico, así como enzimas y compuestos químicos de uso industrial. Así mismo, ha sido posible identificar bacterias que degradan compuestos tóxicos e incrementar esta capacidad mediante modificaciones genéticas.

Actualmente, la industria química se basa en el empleo de derivados del petróleo como materia prima. Algunos de estos procesos tienen la desventaja de generar subproductos que pueden contaminar el medio ambiente. Esto ha generado la necesidad de identificar y utilizar bacterias capaces de degradar los compuestos tóxicos para convertirlos en sustancias inocuas. Por otro lado, al ser el petróleo recurso no renovable, su disponibilidad será limitada en el futuro. Por estos motivos, se buscan alternativas tecnológicas que permitan obtener productos mediante procesos no contaminantes y que no dependan del petróleo. Una de las alternativas tecnológicas más prometedoras se basa en el empleo de materias primas constituidas por fuentes renovables de carbono como los azúcares de origen vegetal. La viabilidad de este tipo de tecnologías depende de la capacidad de obtener a un bajo costo azúcares a partir de material vegetal y la posibilidad de contar con cepas microbianas modificadas para convertir eficientemente dichas materias primas en compuestos útiles.

* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D. F. 04510.

Ingeniería de vías metabólicas para la producción de compuestos aromáticos en *Escherichia coli*

José Luis Báez-Viveros,* Joel Osuna,* Georgina Hernández-Chávez,* Xavier Soberón,* Francisco Bolívar,* Guillermo Gosset*

* Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología, UNAM, Apdo. Postal 503-10, Cuernavaca, Mor. 62250. gosset@ibt.unam.mx

Los compuestos aromáticos tienen un gran número de aplicaciones en las industrias química, farmacéutica y de alimentos. El aminoácido aromático L-fenilalanina (L-Fen) es utilizado extensamente por la industria alimentaria, reportándose una producción anual mundial de 11,000 toneladas.² Este aminoácido es producido mediante síntesis química, en un proceso donde se genera una mezcla racémica de los isómeros D y L, lo cual complica el proceso de purificación.⁴ Una alternativa a este método, es la síntesis microbiana a partir de azúcares como materia prima. Sin embargo, para que un proceso biotecnológico como este pueda ser viable económicamente, debe aproximarse a la mayor productividad y el rendimiento posibles en la conversión de la materia prima (glucosa), al producto deseado.

En este trabajo, se aplicaron las herramientas de la ingeniería de vías metabólicas para el desarrollo y la caracterización de cepas de *E. coli* diseñadas para la producción de L-Fen. La estrategia utilizada se basó en incrementar la disponibilidad metabólica del precursor aromático fosfoenolpiruvato (PEP) y la redirección del flujo de carbono de la vía común de síntesis de compuestos aromáticos hacia la vía de síntesis de L-Fen. Esta estrategia fue implementada empleando una cepa de *E. coli* que carece del sistema de fosfotransferasa (PTS). El PTS participa en el transporte y fosforilación de la glucosa, utilizando al PEP como donador del grupo fosfato. Esta situación limita la cantidad de PEP que puede ser dirigido hacia la vía de síntesis de compuestos aromáticos. En este trabajo, se utilizó una cepa de *E. coli* previamente aislada, la cual carece del PTS pero ha recuperado la capacidad de transportar glucosa utilizando ATP como donador del grupo fosfato (fenotipo PTS⁻ Glucosa⁺).³ Por otro lado, la capacidad de dirigir el flujo de carbono hacia la vía de síntesis de L-Fen depende de que la célula contenga una versión mutante insensible a inhibición alostérica de la enzima bifuncional

corismato mutasa-prefenato deshidratasa (CM-PDT). Utilizando la reacción en cadena de polimerasa, se amplificó del gene *pheA*, el segmento correspondiente a la región catalítica de CM-PDT y eliminando el dominio involucrado en la inhibición alostérica por L-Fen. La enzima mutante fue mejorada en su actividad catalítica siguiendo un esquema de evolución dirigida. La cepa PTS⁻ Glucosa⁺ y una cepa control PTS⁺ fueron transformadas con tres plásmidos; conteniendo genes que codifican para una versión insensible a inhibición alostérica de la enzima DAHP sintasa, tranacetolasa y la versión evolucionada de CM-PDT. En condiciones de cultivo en matraz, se determinó que las cepas PTS⁺ y PTS⁻ Glucosa⁺ produjeron L-Fen con un rendimiento a partir de glucosa de 0.21 y 0.33 g/g, correspondiendo al 38 y 60% del rendimiento máximo teórico (0.55 g/g), respectivamente. El rendimiento obtenido con la cepa PTS⁻ Glucosa⁺ es el más alto reportado para la producción microbiana de L-Fen.¹ Estos resultados indican que la aplicación del fenotipo PTS⁻ Glucosa⁺ en cepas de *E. coli* es una estrategia que permite incrementar el rendimiento a partir de glucosa para compuestos aromáticos.

REFERENCIAS

1. Báez-Viveros J. L., Osuna J., Hernández-Chávez G., Soberón X., Bolívar F. & Gosset G. 2004. Metabolic Engineering and Protein Directed Evolution Increase the Yield of L-Phenylalanine Synthesized from Glucose in *Escherichia coli*. *Biotechnology & Bioengineering*, 87:516-524.
2. Bongaerts J., Krämer M., Müller U., Raeven L. & Wubbolts M. 2001. Metabolic engineering for microbial production of aromatic amino acids and derived compounds. *Metab Eng* 3:289-300.
3. Flores N., Yong-Xiao J., Berry A., Bolivar F. & Valle F. 1996. Pathway engineering for the production of aromatic compounds in *Escherichia coli*. *Nat Biotechnol* 14:620-623.
4. Frost J.W. & Lievens J. 1994. Prospects for biocatalytic synthesis of aromatics in the 21st century. *J Chem* 18:341-348.

La síntesis de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa*

Gloria Soberón Chávez,* Humberto García,* Marisela Aguirre,* Luz María Delgado,* Abigail González,* Jeiry Toribio,* Alsino Villarreal*

* Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad Universitaria, México D. F. 04510.

Pseudomonas aeruginosa es una γ proteobacteria que puede ser aislada de una gran variedad de ambientes tanto acuáticos como terrestres, por lo que se ha considerado ubicua.^{3,6} Esta bacteria es, además, un patógeno oportunista humano que representa un problema de salud importante ya que presenta una alta resistencia a antibióticos¹² y es una infección común en ambientes hospitalarios.⁷ Por otra parte, presenta una alta tasa de morbilidad y mortalidad en pacientes que tienen fibrosis quística,⁵ el padecimiento genético más común en poblaciones caucásicas. La producción de gran parte de los factores de virulencia de *P. aeruginosa*, al igual que la de los ramnolípidos, está regulado a nivel transcripcional por una intrincada red llamada la respuesta sensora de quórum.^{20,25}

Sin embargo, a la vez que *P. aeruginosa* causa al hombre problemas de salud, esta bacteria tiene diversas aplicaciones biotecnológicas, sobre todo en el área ambiental. Así se sabe que es uno de los pocos organismos capaces de degradar al-

gunos contaminantes como los alcanos de cadena ramificada.¹⁹ Produce biosurfactantes²² que son útiles para la limpieza de suelos contaminados con hidrocarburos⁸ o con metales pesados¹⁰ y pueden ser usados en el control biológico de hongos zoospóricos;²⁴ y algunas enzimas, como la lipasa.⁹ con distintas aplicaciones potenciales.²³ *P. aeruginosa*, al igual que otras *Pseudomonas*, produce un polímero de ácidos grasos, el polihidroxialcanoato (PHA), que puede ser usado para producir plásticos biodegradables.¹⁵

Los biosurfactantes tienen una serie de ventajas sobre los surfactantes sintetizados químicamente, ya que no son tóxicos y son biodegradables.¹¹ *P. aeruginosa* produce los biosurfactantes ramnolípidos y sus precursores los dímeros de ácidos grasos (3-(3-hidroxi)alcanoiloxi)alcanoicos o HAAs²² (Fig. 1). Los principales ramnolípidos producidos por esta bacteria son los que tienen una molécula de ramnosa (mono-ramnolípidos, Fig. 1) y los que tienen dos (di-ramnolípidos, Fig. 1).

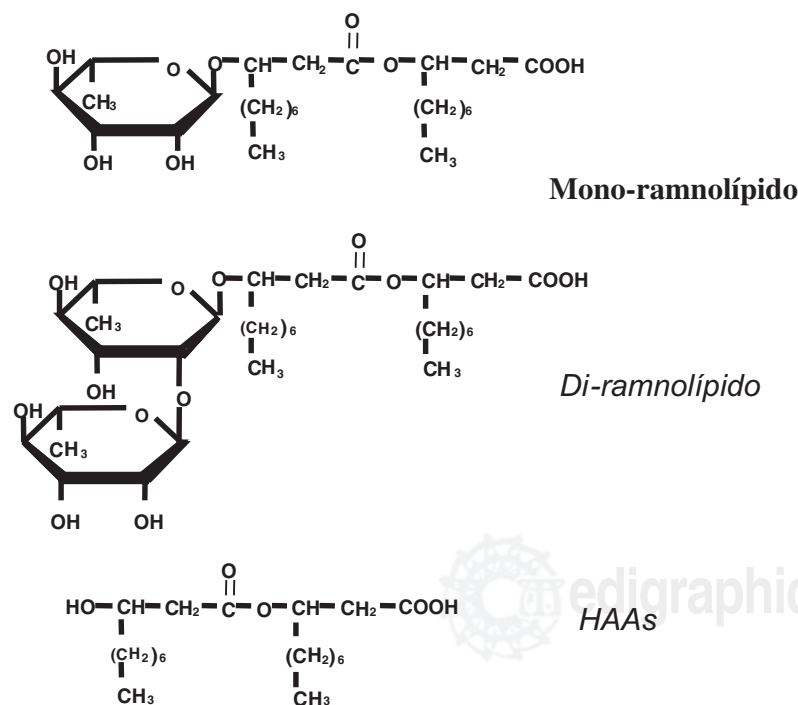


Figura 1. Estructura de los ramnolípidos y el ácido (3-(3-hidroxi)alcanoiloxi)alcanoico (HAAs). Se muestran las especies con dímeros de ácido 3-hidroxi)decanoico que es la especie más abundante.

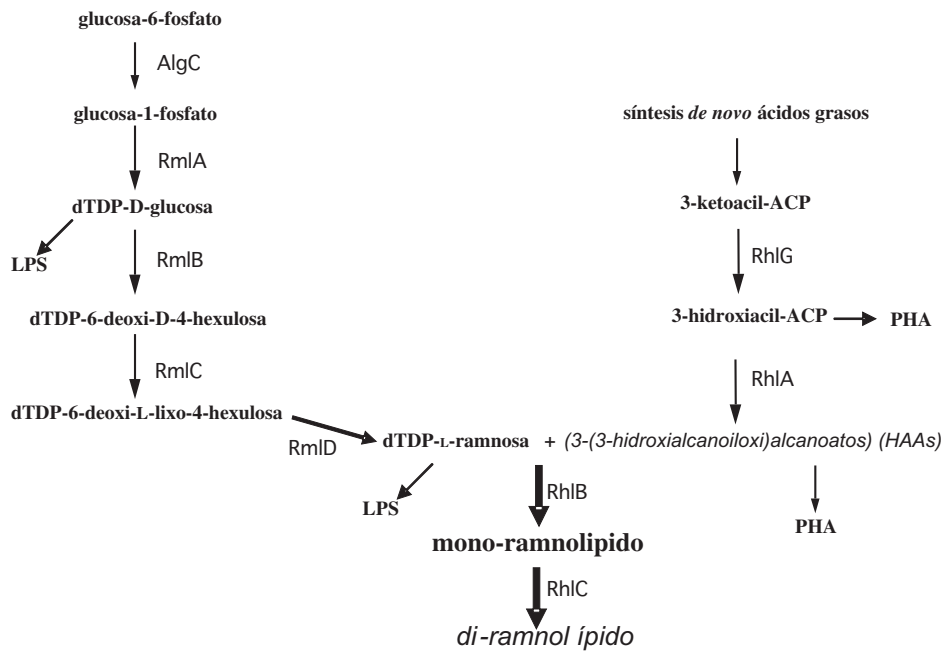


Figura 2. Ruta de síntesis de los ramnolípidos y HAA.

El sustrato de las dos ramnosiltransferasas que intervienen en la síntesis de los ramnolípidos, RhIB para los mono-ramnolípidos¹³ y RhIC para los di-ramnolípidos,¹⁸ es la dTDP-L-ramnosa (Fig. 2). Este azúcar activado es también un precursor del lipolisacárido (LPS)¹⁷ y es sintetizado por las enzimas RmlA, RmlB, RmlC y RmlD a partir de glucosa-1-fosfato (17, Fig. 2). La enzima AlgC, que también participa en la síntesis del exopolisacárido alginato, convierte la glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato.¹⁶

La enzima RhIA (Fig. 2) usa como sustrato ácidos grasos de la síntesis celular, drenados del ciclo general de síntesis *de novo* por la enzima RhIG,² o del catabolismo de ácidos grasos, para sintetizar los HAA que son sustratos de RhIB en la síntesis del mono-ramnolípidos.^{1,4} La vía de biosíntesis de los ramnolípidos está muy relacionada con la de PHA, ya que la enzima RhIG provee sustratos para su síntesis (2, Fig. 2) la actividad de RhIA modifica la producción de este polímero (21, Fig. 2).

Debido a que la biosíntesis de ramnolípidos en *P. aeruginosa* es un proceso multienzimático que usa intermediarios del metabolismo primario de la bacteria, como son la dTDP-L-ramnosa y los ácidos grasos, y a que su vía de síntesis está muy relacionada con la síntesis de otros compuestos celulares (alginato, LPS, PHA), la construcción de cepas hiperproductoras de estos biosurfactantes requeriría un enfoque de ingeniería de vías metabólicas. Por otra parte, ya que la expresión del operón *rhlAB* está regulado por la respuesta sensora de quórum, junto con diversos factores de virulencia,^{20,25} no es fácil construir deriva-

dos que sobre expresen estas enzimas clave en la vía de síntesis de los ramnolípidos. Sobre todos estos problemas para la construcción de cepas sobreproductoras de ramnolípidos está la limitante de que *P. aeruginosa* es un patógeno oportunista y no puede ser usado para la producción industrial de ningún producto. Como un enfoque alternativo para tener cepas que puedan ser usadas a nivel industrial para la síntesis de ramnolípidos, se ha expresado el operón *rhlAB* en huéspedes heterólogos.^{13,14} Recientemente reportamos¹ que si se coexpresa en *Escherichia coli* el operón *rhlAB* y el que codifica para las enzimas de la síntesis de dTDP-L-ramnosa (*rmlBDAC*), se puede obtener una producción de mono-ramnolípidos que no es mucho más baja que la producida por *P. aeruginosa*. La optimización de las condiciones de cultivo y la manipulación genética de cepa recombinantes de *E. coli* que produzcan ramnolípidos podría representar una estrategia viable para la construcción de cepas que puedan ser usadas a nivel industrial para la síntesis de estos biosurfactantes.

REFERENCIAS

- Cabrera, N., A.-P. Richardson, C. Olvera, L. G. Treviño, E. Déziel, F. Lépine & G. Soberón-Chávez. 2006. Mono-rhamnolipid and 3-(3-hydroxyalkanoiloxy)alkanoic acids (HAA) production using *Escherichia coli* as a heterologous host. Appl. Microbiol. Biotechnol. Aceptado para su publicación.
- Campos-García, J., A. D. Caro, R. Nájera, R. M. Miller-Maier, R. A. Al-Tahhan, & G. Soberón-Chávez. 1998. The *Pseudomonas aeruginosa rhlG* gene encodes a NADPH-dependent b-ketoacyl reductase which is specifically involved in rhamnolipid synthesis. J. Bacteriol. 180:4442-4451.

3. Costerton, J. W. 1980. *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease, p. 15-24. In C. D. Sabath (ed.), *Pseudomonas aeruginosa: the organism, diseases it causes and their treatment*. Hans Huber Publishers, Bern, Switzerland.
4. Déziel E., F. Lépine, S. Milot & R. Villemur. 2003. *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy)alkanoic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol.* 149:2005-2013.
5. Govan, J. R. W. & V. Deretic 1996. Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60:539-574.
6. Hardalo, C. & S. C. Edberg. 1997. *Pseudomonas aeruginosa*: Assessment of risk from drinking water. *Crit. Rev. Microbiol.* 23:47-75.
7. Lyczak, J. B., C. L. Cannon & G. B. Pier. 2000. Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection* 2:1051-1060.
8. Maier, M. R. & G. Soberón-Chávez. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 54:625-633.
9. Martínez, A. & G. Soberón-Chávez. 2001. Characterization of the *lipA* gene encoding the major lipase from *Pseudomonas aeruginosa* IGB83. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56:731-735.
10. Miller, R. M., 1995. Biosurfactant-facilitated remediation of metal-contaminated soils. *Environ. Health Perspect.* 103(Suppl):59-62.
11. Mulligan, C. N. 2005. Environmental applications of biosurfactants. *Environ. Pollut.* 133:183-198.
12. Nikaido, H. 1998. Multiple antibiotic resistance and efflux. *Curr. Opin. Microbiol.* 1:516-523.
13. Ochsner, U. A., A. Fiechter & J. Reiser. 1994. Isolation, characterization, and expression in *Escherichia coli* of the *Pseudomonas aeruginosa rhlAB* genes encoding a rhamnosyltransferase involved in rhamnolipid biosurfactant synthesis. *J Biol. Chem.* 269:19787-19795.
14. Ochsner, U. A., J. Reiser, A. Fietcher & B. Witholt. 1995. Production of *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipid biosurfactants in heterologous host. *Appl Environ. Microbiol.* 61:3503-3506.
15. Olivera, E. R., D. Cenicero, R. Jodra, B. Minambres, B. García, et al. 2001. Genetically engineered *Pseudomonas*: a factory of new bioplastics with broad applications. *Environ. Microbiol.* 3:612-618.
16. Olivera, C., J. B. Goldberg, R. Sánchez & G. Soberón-Chávez. 1999. *Pseudomonas aeruginosa algC* gene product participates in rhamnolipids biosynthesis. *FEMS Microbiol. Lett.* 179:85-90.
17. Rahim, R., L. L. Burrows, M. A. Monteiro, M. B. Perry & J. S. Lam. 2000. Involvement of the *rml* locus in core oligosaccharide and O polysaccharide assembly in *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol.* 146:2803-2814.
18. Rahim, R., U. A. Ochsner, C. Olivera, M. Graninger, P. Messner, J. S. Lam & G. Soberón-Chávez. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa rhlC* gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol. Microbiol.* 40:708-718.
19. Schaeffer T. L., S. G. Cantwell, J. L. Brown, D. Watt & R. R. Fall. 1979. Microbial growth on hydrocarbons: terminal branching inhibits biodegradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 38:742-746.
20. Soberón-Chávez, G., M. Aguirre-Ramírez & L. G. Ordóñez. 2005. Is *Pseudomonas aeruginosa* only sensing quorum? *Critical Rev. Microbiol.* 31:171-182.
21. Soberón-Chávez, G., M. Aguirre-Ramírez & R. Sánchez. 2005. The *Pseudomonas aeruginosa RhlA* enzyme is not only involved in rhamnolipid, but also in polyhydroxyalkanoate production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 32:675-677
22. Soberón-Chávez, G., F. Lépine & E. Déziel. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:718-725.
23. Soberón-Chávez G. & B. Palmeros. 1994. *Pseudomonas* lipases: Molecular genetics and potential industrial applications. *Critical Rev. Microbiol.* 20:95-105.
24. Stanghellini M. E. & R. M. Miller. 1997. Biosurfactants: their identity and potential efficacy in the biological control of zoospore plant pathogens. *Plant Diseases* 81:4-12
25. van Delden, C. & B. H. Iglewski. 1998. Cell-to-cell signaling and *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Emerg. Infect. Dis.* 4:551-560.

Compartiendo experiencias de microbiología y biotecnología petrolera

Sylvie Le Borgne*

* Universidad Autónoma Metropolitana-Unidad Cuajimalpa. División de Ciencias Naturales e Ingeniería.

La importancia de la industria petrolera a nivel mundial y en nuestro país es indiscutible. La explotación de los yacimientos petroleros empezó hace un siglo y, hoy en día, nuestra sociedad es fuertemente dependiente del petróleo para la producción de energía y de materias primas para diversas industrias. Otro problema asociado al petróleo es la contaminación ambiental. Los derrames de petróleo durante la extracción, producción y transporte de este energético son frecuentes. Los plásticos en la actual-

idad son en gran parte producidos a partir del petróleo, su producción mundial excede 100 millones de toneladas al año y se estima que cerca de la mitad de estos plásticos se desecha después de 2 años de uso sin ser reciclada.⁵ La producción de gases con efecto invernadero durante la quema de combustibles derivados del petróleo y la refinación del petróleo impacta fuertemente al medio ambiente y es responsable en gran medida del cambio global observado en nuestro planeta.

La refinación del petróleo es principalmente basada en procesos fisicoquímicos como destilación y catálisis química que operan a altas temperaturas y presiones. Estos procesos son muy costos a nivel energético además de ser altamente contaminantes. En años recientes se ha propuesto que los bioprocesos podrían ser una alternativa ya que las reacciones bioquímicas que ocurren en los microorganismos son muy específicas, operan a bajas temperaturas y presiones además de que generan pocos subproductos indeseables.⁷ Para poder implementar bioprocesos en la industria petrolera, es necesario poder contar con microorganismos resistentes y activos en las condiciones encontradas en la industria petrolera: medios hidrofóbicos complejos, altas temperaturas. Importantes avances ocurridos en ingeniería genética, microorganismos extremófilos, ingeniería de proteínas y biocatálisis en medios no convencionales soportan la idea de que la biotecnología podría integrarse en la industria petrolera. Los principales campos de acción de la biotecnología y de la microbiología petrolera se muestran en la Tabla 1.

A continuación se comparten experiencias sobre biodesulfuración de diesel con microorganismos aislados de suelos contaminados en refinerías mexicanas y sobre la caracterización de microorganismos extremófilos sulfoxidantes autóctonos para la eliminación de azufre inorgánico en corrientes gaseosas.

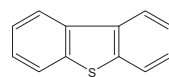
La quema de combustibles provoca la emisión atmosférica de óxidos de azufre que contribuyen a la formación de lluvia ácida y partículas contaminantes. La respuesta legal a este problema ha sido la implementación de normas muy estrictas sobre el contenido de azufre en combustibles como el diesel las cuales requieren de una reducción progresiva del contenido de azufre en este combustible hasta menos de 15 ppm para el año 2006.^{3,4} La Unión Europea propuso que el diesel producido sea libre de azufre en el 2011.⁹ La hidrosulfuración (HDS) es el proceso fisicoquímico que se utiliza actualmente para remover el azufre contenido en fracciones de petróleo a altas temperaturas (350-425°C) y presiones (10-50 kg/cm²). Los costos de mantenimiento y de operación de la HDS se incrementan rápidamente cuando la concentración de azufre y la complejidad de las moléculas azufradas aumenta y cuando se requieren niveles de azufre debajo de 100 ppm. El 70% del azufre contenido en el petróleo crudo se encuentra en tiofenos condensados, como el dibenzotiofeno (DBT) y sus formas sustituidas (Fig. 1) los cuales se concentran en las fracciones utilizadas para producir el diesel. Estas moléculas son las más recalcitrantes al proceso de HDS.⁸ Este escenario ha incentivado la búsqueda de métodos eficientes y novedosos que complementen en el corto plazo o sustituyan en el largo plazo los procesos actuales de HDS.

Dentro de este contexto, se aislaron cuatro cepas bacterianas capaces de utilizar al DBT como única fuente de azufre. Estas cepas fueron capaces de remover selectivamente el azufre del DBT y del 4,6-dimetilDBT sin atacar las estructuras carbonadas de estos compuestos mediante la ya reportada ruta metabólica "4S", produciendo los hidroxibifenilos correspondientes a cada uno de estos compuestos y sulfato inorgánico.⁶ Aunado a ello, se logró reducir de hasta un 60 % el contenido de azufre en dieseles previamente hidrosulfurados en refinerías de PEMEX (Tabla 2). Estas reacciones fueron realizadas con células creciendo en un medio mineral suplementado con diesel. Sin embargo, estas cepas presentaron una baja resistencia a este solvente inactivándose completamente en presencia de tan solo 15% de diesel en el medio de cultivo lo cual limita su aplicabilidad a un proceso industrial.

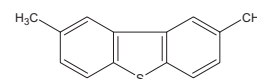
Al secuenciar las 1,500 bases del gene 16S rDNA de estas bacterias y compararlas con las secuencias publicadas en bases de datos publicas, se encontró que estas cepas presentaban una homología con *Rhodococcus erythropolis* (0.56% de diferencia) y *Rhodococcus globerulus* (0.76% de diferencia). Como la determinación de la especie no fue clara empleando la secuenciación del gene 16S

Tabla 1. Principales campos de acción de la biotecnología y de la microbiología petrolera.

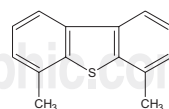
Recuperación microbiana mejorada del aceite
Biocorrosión
Biorrefinación
Biodesulfuración
Biodenitrificación
Biotratamiento
Biorremediación
Tratamiento de aguas y efluentes gaseosos



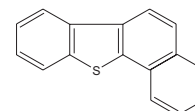
DBT



2,8-dimetilDBT



4,6-dimetilDBT

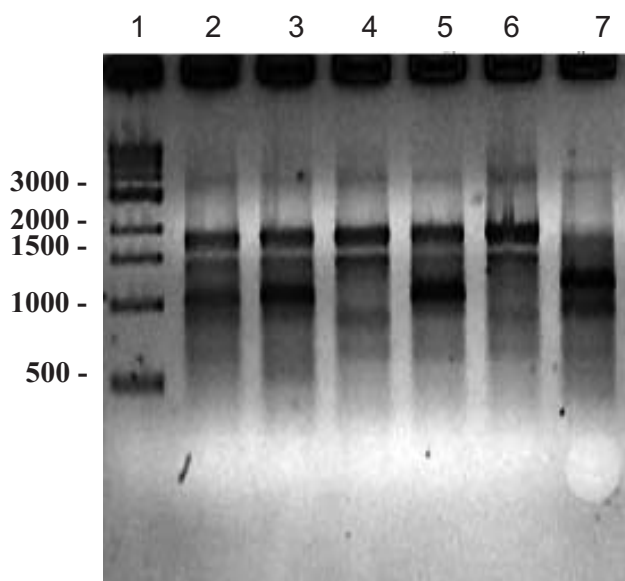


3,4-benzoDBT

Figura 1. Estructura química del DBT y de algunos de sus derivados sustituidos.

Tabla 2. Biodesulfuración de diesel con cepas bacterianas aisladas.

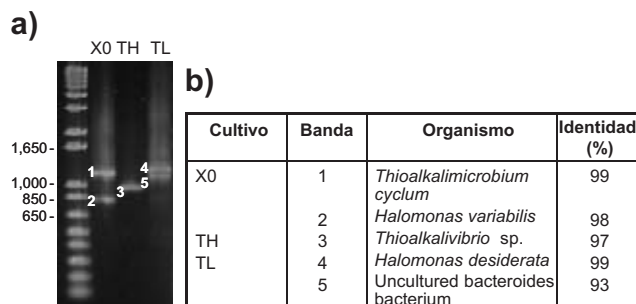
Diesel	% de diesel	[S] inicial (ppm)	[S] final (ppm)	% de remoción
Tula	5	550	210	62
Tula	10	550	380	31
Tula	15	550	550	0
Tula	20	550	550	0
Salina Cruz	5	440	180	60
Salina Cruz	10	440	318	28
Salina Cruz	15	440	440	0
Salina Cruz	20	440	440	0

**Figura 2.** Análisis RAPD de cepas desulfuradoras. Carril 1: cepa IGTS8; carriles 2, 3, 4, 5 y 6: cepas aisladas de refinerías mexicanas; carril 7: cepa X309.

rDNA, estas cepas fueron finalmente nombradas como *Rhodococcus* sp.² Posteriormente, las cepas fueron caracterizadas por el método RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA* en inglés) con el fin de ver si estas cepas eran diferentes de otras cepas desulfuradoras de *R. erythropolis* prototipo patentadas IGTS8 y X309. Uno de los cebadores produjo patrones diferentes entre las diferentes cepas y las diferencias observadas fueron tanto en el tamaño como en la intensidad de las bandas (Fig. 2). El análisis RAPD fue entonces capaz de distinguir diferencias entre las diferentes cepas desulfuradoras aisladas en este y otros trabajos mostrando que las cepas aquí reportadas son diferentes de las cepas patentadas IGTS8 y X309 a nivel de su material genético global.

Tabla 3. Reacciones biológicas de sulfoxidación.

Sulfoxidación	
Oxígeno limitante:	
$H_2S + 0.5 O_2 \rightarrow S^0 + H_2O$	Azufre elemental
Exceso de oxígeno:	
$H_2S + 2O_2 \rightarrow SO_4^{2-} + 2H^+$	Sulfato

**Figura 3.** Análisis de cultivos bacterianos sulfoxidantes.

Algunos efluentes gaseosos de la industria petrolera contienen azufre inorgánico en forma de ácido sulfhídrico H_2S . Este gas es también emitido durante la extracción del petróleo y el gas producido tiene un alto contenido de H_2S . Algunas bacterias denominadas sulfoxidantes tienen la capacidad de oxidar el H_2S en compuestos menos tóxicos a la diferencia del caso anterior en el que las bacterias aisladas tenían la capacidad de remover selectivamente el azufre de moléculas orgánicas complejas convirtiéndolo en sulfato. En el presente caso se produce azufre elemental (Tabla 3). Con estas bacterias se pueden diseñar y operar biofiltros para el tratamiento de emisiones gaseosas de H_2S . En esta parte se describe la caracterización molecular de consorcios bacterianos capaces de oxidar el H_2S y el H_2S en condiciones extremas con un pH de 10. Estos consorcios fueron desarrollados a partir de tierras alcalino-salinas recolectadas en diferentes puntos de la república y enriquecidos en un medio mineral pH 10 con tiosulfato como única fuente de azufre.¹

Se analizaron las poblaciones bacterianas presentes en estos cultivos mediante la técnica molecular de RISA (*Ribosomal Intergenic Spacer Analysis* en inglés). La Figura 3a muestra el perfil de bandas obtenido para tres cultivos enriquecidos mientras que la Figura 3b muestra la identificación molecular de los microorganismos correspondientes a cada una de las bandas.

En esta ocasión, se encontraron bacterias sulfoxidantes quimioautótrofas haloalcalófilas (*Thioalkalimicrobium* y *Thioalkalivibrio* así como bacterias heterótrofas halófilas

(*Halomonas*). La banda 5 mostró un porcentaje de homología muy bajo (93%) con una bacteria *Bacteroides* no cultivable por lo que se podría tratar de un género y especie nueva.

Hacia el futuro, la biotecnología y la microbiología petrolera se verán beneficiadas por el aislamiento de un número creciente de microorganismos extremófilos capaces de resistir las condiciones extremas encontradas en la industria petrolera. Los catalizadores biomiméticos que se empiezan a diseñar actualmente son prometedores ya que poseen la especificidad y la selectividad de los biocatalizadores con una base química que les confiere una mayor estabilidad. Finalmente, la biotecnología del futuro tiene que jugar un papel importante en el desarrollo de nuevos materiales biodegradables y fuentes de energía renovables menos contaminantes.

REFERENCIAS

1. Alcántara-Pérez S., Muñoz-Colunga A.M., Le Borgne S. & Olgún-Lora P. 2005. Molecular and physiological characterization of haloalkaliphilic sulfur-oxidizing microbial cultures from Mexican saline alkaline environments. En preparación.
2. Castorena G., Suárez C., Váldez I., Amador G., Fernández L. & Le Borgne S. 2002. Sulfur-selective desulfurization of dibenzothiophene and diesel oil by newly isolated *Rhodococcus* sp. strains. FEMS Microbiol. Lett. 215: 157-161.
3. EPA. 2000. Heavy-duty engine and vehicle standards and highway diesel fuel sulfur control requirements. EPA420-F-00-057.
4. Fletcher S. 2000. US EPA proposes severe diesel sulfur limits. Oil Gas J. Online Story, may 17.
5. Greenpeace. 1998. The plastics boom and the looming PVC Waste Crisis. Amsterdam. The Netherlands. <http://archive.greenpeace.org/comms/pvctoys/reports/loomingcontents.html>
6. Kilbane J.J. 1992. Mutant microorganisms useful for cleavage of organic C-S bonds. US Patent 5,104,801.
7. Le Borgne S. & Quintero R. 2003. Biotechnological processes for the refining of petroleum: a general overview. Fuel Proc. Technol. 81:155-169.
8. Monticello D.J. & Finnerty W.R. 1985. Microbial desulfurization of fossil fuels. Annu. Rev. Microbiol. 39: 371-389.
9. Young D. 2001. European fuels meet 2005 specs; refiners look beyond. Oil Gas J. 99(47):Online.

Correspondencia:

Guillermo Gosset.

Departamento de Ingeniería Celular y Biocatálisis, Instituto de Biotecnología/UNAM, Apdo. Postal 503-10, Cuernavaca, Mor. 62250. gosset@ibt.unam.mx