

**REVISTA
PERUANA DE
BIOLOGÍA**

Revista Peruana de Biología

ISSN: 1561-0837

revistaperuana.biologia@unmsm.edu.pe

Universidad Nacional Mayor de San

Marcos

Perú

Palomino, Roger A.; Romero, Guillermo; González-Valdez, Abigail; Soberón-Chávez, Gloria; Gutiérrez, Susana M.; Merino, Fernando A.

Presencia de genes rhlAB, rhlIR y rhlC en *Pseudomonas aeruginosa* nativas sobre-productoras de ramnolípidos

Revista Peruana de Biología, vol. 24, núm. 3, octubre, 2017, pp. 293-302

Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Lima, Perú

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195053390009>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica

Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

TRABAJOS ORIGINALES

Presencia de genes *rhlAB*, *rhlR* y *rhlC* en *Pseudomonas aeruginosa* nativas sobreproductoras de ramnolípidos

Detection of *rhlAB*, *rhlR* and *rhlC* genes in *Pseudomonas aeruginosa* natives overproducers of ramnolipids

Roger A. Palomino¹, Guillermo Romero¹, Abigail González-Valdez², Gloria Soberón-Chávez², Susana M. Gutiérrez^{1*} y Fernando A. Merino¹

¹ Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Ciencias Biológicas, Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana. Av. Venezuela cdra. 34, Ciudad Universitaria, puerta 1, Lima, Perú.

² Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Molecular y Biotecnología. Circuito Mario de la Cueva s/n, Coyoacán, Ciudad Universitaria, Apartado Postal 70228, 04510 Ciudad de México, CDMX, México.

*Autor para correspondencia

Email Roger Palomino: micro_roger@hotmail.com

Email Guillermo Romero: romeroguillermo@gmail.com

Email Abigail González: abigaila@biomedicas.unam.mx

Email Gloria Soberón-Chávez: gloria@biomedicas.unam.mx

Email Fernando Merino: fmerinor@unmsm.edu.pe

Email Susana Gutiérrez: sgtierrezm@unmsm.edu.pe

Resumen

Se realizó la caracterización molecular de los genes asociados a la producción de ramnolípidos (RL), en 61 cepas bacterianas de la colección del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana (LAMYBIM) de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú. Las cepas provenían de entornos peruanos contaminados con hidrocarburos y fueron catalogadas como sobreproductoras de RL (n= 21), productoras de RL (n= 20) y no productoras de RL (n= 20). Las 61 cepas fueron identificadas bioquímicamente con el sistema API 20 NE. La identificación molecular se realizó empleando el gen del RNAr 16S. Se encontró que *Pseudomonas aeruginosa* fue el microorganismo de mayor prevalencia en los estratos sobreproductores y productores de ramnolípidos. Además, se encontraron: *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* y *Chryseobacterium indologenes*. Los microorganismos no productores de ramnolípidos, también fueron caracterizados bioquímicamente. Mediante amplificación de PCR y electroforesis en gel de agarosa, estandarizados por la UNAM, se evidenció que las cepas seleccionadas poseen los genes: *rhlA*, *rhlB*, *rhlR* y *rhlC*. Para el secuenciamiento de la región génica *rhlABR*, se seleccionaron cuatro especies: *Pseudomonas aeruginosa* T2X-2, *Pseudomonas aeruginosa* IIIT1P2, *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, siguiendo metodología estandarizada por la UNAM y fueron comparados con *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Nuestros resultados muestran que los genes estudiados en las cepas seleccionadas son sinónimas de sus homólogos en la cepa patrón *Pseudomonas aeruginosa* PAO1, por lo que las diferencias genotípicas que expliquen la sobreproducción de ramnolípidos deberían hallarse en otros marcadores moleculares no cubiertos en el presente estudio.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*; biosurfactantes; ramnolípidos; *rhlAB*; *rhlR*; *rhlC*.

Citación:

Palomino R.A., G. Romero, A. González-Valdez, G. Soberón-Chávez, S.M. Gutiérrez & F.A. Merino. 2017. Presencia de genes *rhlAB*, *rhlR* y *rhlC* en *Pseudomonas aeruginosa* nativas sobreproductoras de ramnolípidos. Revista peruana de biología 24(3): 293 - 302 (octubre 2017). doi: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v24i3.13902>

Presentado: 09/01/2017
Aceptado: 26/07/2017
Publicado online: 28/10/2017

Información sobre los autores:

RP, AG, FM: diseñaron el experimento. RP, AG: realizaron la parte experimental. RP, GR: analizaron los datos. RP: redactó el manuscrito. GSC, FM, SG: asesoramiento en la ejecución de la investigación. Todos los autores revisaron y aprobaron el manuscrito.

Los autores no incurren en conflictos de intereses.

Fuentes de financiamiento: FINCyT contrato N°238-FINCyT-IA-2103.

Journal home page: <http://revistasinvestigacion.unmsm.edu.pe/index.php/rpb/index>

© Los autores. Este artículo es publicado por la Revista Peruana de Biología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Este es un artículo de acceso abierto, distribuido bajo los términos de la Licencia Creative Commons Atribución-NoComercial-CompartirIgual 4.0 Internacional. (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>), que permite el uso no comercial, distribución y reproducción en cualquier medio, siempre que la obra original sea debidamente citadas. Para uso comercial, por favor póngase en contacto con editor.revperubiol@gmail.com.

Abstract

Genes associated to rhamnolipids production were molecularly characterized in 61 bacterial strains from LAMY-BIM bacterial collection (Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Perú). Strains were isolated from peruvian environments hydrocarbons polluted and were classified as RL overproducers (n= 21), RL producers (n = 20) and non-producers (n = 20) producers. Molecular identification using the 16S rRNA gene was preceded by the biochemical identification of 61 strains selected with the API 20 NE system. *Pseudomonas aeruginosa* was the most prevalent strain of the RL overproducers and RL producers. Species such as *Burkholderia cepacia*, *Pseudomonas fluorescens*, *Aeromonas hydrophila* and *Chryseobacterium indologenes*, were found too. In the same way, non-producers microorganisms were also characterized. The PCR amplification and agarose gel electrophoresis techniques, standarized by the UNAM laboratory, showed that the selected strains had the genes: *rhlA*, *rhlB*, *rhlR* and *rhlC*. For the sequencing of the *rhlAB* gene region, four strains were selected: *Pseudomonas aeruginosa* T2K2, *Pseudomonas aeruginosa* III T1P2, *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, applying the methodology standarized by the UNAM and were compared with *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Our results show that the genes studied in the selected strains are synonymous with their homologues in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 standard strain. Therefore, genotypical differences that explain the overproduction of rhamnolipid might be found in other molecular markers not covered in this study.

Keywords: *Pseudomonas aeruginosa*; biosurfactants; rhamnolipids; *rhlAB*; *rhlR*; *rhlC*.

Introducción

En el Perú, numerosos estudios de la diversidad microbiana de ambientes contaminados por petróleo, han señalado a *Pseudomonas aeruginosa* como la especie de mayor prevalencia convirtiéndose en una prometedora herramienta biotecnológica en futuros procesos de biorremediación microbiana, evaluando su capacidad degradadora, emulsificante y productora de biosurfactante de tipo rhamnolípidos (Norman et al. 2002, Hernández 2012, Arenas 1999, Rentería y Miranda 1998) Tabuchi (2014) previamente a la optimización del uso en agar CTAB/MB para selección de cepas productoras de rhamnolípidos, reactivó cepas aisladas de ambientes contaminados por petróleo, determinando que el 30% de éstas, pertenecían al género *Pseudomonas* sp.

Los biosurfactantes del tipo rhamnolípidos en comparación con sus equivalentes sintetizados químicamente tienen muchas ventajas como ser biodegradables, menos tóxicos, no peligrosos, altamente selectivos y de amplia aplicabilidad (Tejeda 2012, Singh et al. 2007) Diferentes especies de *Pseudomonas* son capaces de producir grandes cantidades de rhamnolípidos de diferentes sustratos (De Lima et al. 2009) y constituye uno de los géneros que mayor potencial aplicativo engloba (Giraldo 2012). Se ha descrito que *Pseudomonas aeruginosa* produce típicamente biosurfactante de tipo rhamnolípido (RL) (Perfumo et al. 2013, Soberón-Chávez et al. 2005) y corresponde al mayormente investigado (Du Plessis 2005). La mayoría de cepas de esta especie producen dos tipos de RL (Grosso et al. 2016), uno de ellos el mono-rhamnolípido contenido una molécula de L-ramnosa y el di-rhamnolípido que contiene dos moléculas de L-ramnosa (Aguirre et al. 2012, Croada 2011), el cual está controlado por el mecanismo de regulación génica denominada *quorum sensing* (Dobler et al. 2016).

En la biosíntesis de rhamnolípidos, es necesario tener presente la vía del dTDP-L-ramnosa y la síntesis *de novo* de los ácidos grasos. La vía de la del dTDP-L-ramnosa, produce la fracción azúcar de estos glicolípidos, en forma de dTDP-L-ramnosa (Reis et al. 2011). La síntesis de rhamnolípidos se lleva a cabo en 3 reacciones enzimáticas principales (Dobler et al. 2016, Toribio et al. 2010) y la participación de dos rhamnosiltrasferas: RhlA que cataliza la dimerización de intermediarios de la biosíntesis

de ácidos grasos para producir los β -hidroxialcanoil- β -hidroxialcanoatos (HAAs) mientras que RhlB (ramnosiltrasferasa 1) transfiere a los HAAs una primera molécula de rámnosa a partir de la dTDP-L-ramnosa (Aguirre M. 2013, Delgado 2009, Déziel et al. 2003) para formar el mono-ramnolípido, el cual se convierte en sustrato de RhlC (ramnosiltransferasa 2) agregando una segunda molécula de rámnosa, usando también una molécula de dTDP-L-ramnosa como precursor, obteniendo finalmente di-ramnolípido (Bazire & Dufour 2014, Rahim et al. 2001)

La producción de rhamnolípidos en *P. aeruginosa* está fuertemente controlada por regulación genética (transcripcional y postranscripcional) en los operones *rmlBDAC* y *rhlAB* que responde a una amplia variedad de condiciones ambientales y señales fisiológicas (Reis et. al 2013)

El propósito de nuestra investigación fue determinar la presencia de los genes *rhlA*, *rhlB*, *rhlR* y *rhlC* (asociados a la producción de rhamnolípidos) en especies nativas de *Pseudomonas aeruginosa* con capacidad de sobreproducción de este biosurfactante, los cuales provienen de ambientes contaminados por petróleo en el Perú.

Material y métodos

Microorganismos usados. Bajo la técnica de muestreo subjetivo por decisión razonada (Quezada 2010) nosotros seleccionamos una muestra aleatoria de 61 microorganismos provenientes de una población perteneciente al género *Pseudomonas* sp (n= 749), en base a lo hallado por Tabuchi 2014, de un universo de 2516 microorganismos que conforman el cepario del Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana (LAMYBIM) de la Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM. Tabuchi clasificó en estratos o categorías, de acuerdo al área de halo en agar CTAB/MB modificando el método de Pinzón y Ju, convirtiéndola en herramienta semicuantitativa para selección de microrganismos de rhamnolípidos.

La muestra se seleccionó de la siguiente forma: *sobreproductoras de RL* (n= 21), *productoras de RL* (n= 20) y *no productoras de RL* (n= 20); no se seleccionaron microorganismos del estrato baja productoras de RL (Tabla 1).

Para la caracterización molecular, se seleccionaron 7 mi-

croorganismos. Además se emplearon como controles la cepas *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (Tabla 2). A partir del DNA purificado de estas cepas, se eligió a 3 de ellas en base en los trabajos de Tabuchi (2014) sobre la producción de ramnolípidos, encontrándose estos microorganismos dentro de las 5 mejores productoras de RL.

Kits de extracción de ADN.- La extracción y purificación del ADN cromosómico se realizó mediante los *kits Ultra Clean Microbial DNA Isolation Kit Sample (Mio Bio Laboratories, Inc)* y *Gene JET Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Scientific).

Cebadores oligonucleótidos.- Los cebadores específicos utilizados tanto para la amplificación y secuenciamiento del gen ribosomal 16S de *Pseudomonas aeruginosa*, como para la amplificación de los genes y regiones génicas relacionados a la producción de ramnolípidos (*rhlAB*, *rhlABR* y *rhlR*, *rhLC*), se presentan en la Tabla 3. Se purificaron los productos de PCR, con los kits *QIAquick Gel Extracción* (QIAGEN) y *QIAquick PCR Purification Kit* (QIAGEN).

Células competentes y plásmidos utilizados.- Con el fin de obtener mayor cantidad de ADN para el posterior secuenciamiento, se ligaron los genes *rhlAB* y *rhlR* con los vectores de clonación *Kit CloneJet PCR cloning* (Thermo Scientific) y

pGEM-T Easy Vector Systems (Promega), respectivamente, en células competentes de *Escherichia coli* TOP 10. La purificación de plásmidos se realizó siguiendo las indicaciones de QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol. Se verificó la direccionalidad y peso molecular mediante una digestión con la enzima HindIII (*New England Biologics*).

Identificación bioquímica.- Se identificaron taxonómicamente las cepas seleccionadas mediante uso del sistema de identificación rápida API 20 NE (Biomérieux), siguiendo las indicaciones dadas por el proveedor.

Amplificación del gen ribosomal 16S.- Se realizó la amplificación del gen ribosomal 16S mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando la enzima Phusion Hot Start II siguiendo las recomendaciones del proveedor y como molde el ADN cromosomal de los microorganismos seleccionados, preparándose la mezcla de la reacción como sigue: 10 µL de Buffer 5X Phusion Green HF, 1 µL dNTPs [10 mM], 0.5 µL de oligonucleótido 27F [10 mM], 0.5 µL de oligonucleótido 1942R [10 mM], 0.5 µL DNA obtenido, 37 µL de agua (grado milliphore) y 0.5 µL de enzima. La mezcla de la reacción fue transferida al termociclador, programado con los parámetros que se detallan a continuación (Tabla 4).

Tabla 1. Muestra seleccionada para caracterización bioquímica

Productividad de RL	Cantidad (Nº. de cepas)	Muestra seleccionada (Nº. de cepas)
Mejores productoras	21	21
Productoras	181	20
Bajas productoras	49	0
No productoras	498	20
Total	749	61

Tabla 2. Cepas seleccionadas para caracterización molecular.

Código	Microorganismo
1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 2K1
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> T2X-2
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IIPKA4 1b
4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 3Bh-16
5	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IIIT1P2
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4B7(7)
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K-11

Tabla 3. Cebadores empleados en la amplificación y secuenciamiento.

Oligonucleotido	Secuencia 5'- 3'	Amplificación del gen
27 F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	ribosomal 16 S
1942R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	ribosomal 16 S
Frh1A-nft	TGG CGG CGA ATT CCA GGG CCA G	<i>rhlAB</i>
<i>rhlAB</i> -HindIII	TAA GCT TGC ACC GTT CAG GAC G	<i>rhlAB</i>
F- <i>rhlABR</i> c	CCT GCC GAA TTC CTG ACG CCA GAG C	<i>rhlABR</i>
R- <i>rhlABR</i>	GCC CAA GCT TTC GTG GAT CGG CTG C	<i>rhlABR</i>
<i>rhlR</i> f	TC GAT CAG GGC TTA CTG TCA TGA G	<i>rhlR</i>
<i>rhlR</i> r	AGG ATG AAC GGC AAG CTT CCT G	<i>rhlR</i>
<i>rhlC</i> f	CTG GCA ACT TCG ACC TAC GGG A	<i>rhlC</i>
<i>rhlC</i> r	CCT ATG CGG GAA TGC GTT TCG	<i>rhlC</i>

Tabla 4. Parámetros de PCR de amplificación del gen 16 S.

Segmento	Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
1	1	98	5 min
2	30	98	1 min
		50	30 seg
		72	1 seg
3	1	72	5 min

Amplificación de *rhlAB*, *rhlABR* y genes *rhlR* y *rhlC*.- La amplificación de las regiones *rhlAB*, *rhlABR*, se llevaron a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) siguiendo las recomendaciones del proveedor utilizando la enzima Phusion Hot Start II y como molde el ADN cromosomal de los microorganismos seleccionados, preparándose la mezcla de la reacción como sigue: 10 μ L de Buffer 5X Phusion Green HF, 1 μ L dNTPs [10 mM], 0.5 μ L de oligonucleótido forward [10 mM], 0.5 μ L de oligonucleótido reverse [10 mM], 0.5 μ L DNA obtenido (en caso de *rhlAB*), 1,0 μ L DNA obtenido (en caso de *rhlABR*), 37 μ L de agua grado milliphore (en caso de *rhlAB*), 36.5 μ L de agua grado milliphore (en caso de *rhlABR*) y 0.5 μ L de enzima.

La amplificación de los genes *rhlR* y *rhlC* se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa siguiendo las recomendaciones del proveedor utilizando la enzima Go Taq Polimerasa y como molde el ADN cromosomal de los microorganismos seleccionados, preparándose la mezcla de la reacción como sigue: 10 μ L de Buffer 5X Green Go Taq, 1 μ L dNTPs [10 mM], 1 μ L de oligonucleótido forward [10 mM], 1 μ L de oligonucleótido reverse [10 mM], 4 μ L de MgCl₂ 25 mM, 1 μ L DNA obtenido, 18.5 μ L de agua (grado milliphore) y 0.5 μ L de enzima. La mezcla de la reacción se transfiere al termociclador utilizando los parámetros que se detallan a continuación (Tabla 5).

Inducción de células competentes y transformación de células.- Se realizó la reacción de ligación en células competentes de *Escherichia coli* TOP 10 basada en los protocolos de: *pGEM T and pGEM T Easy Vector Systems, Thermo Scientific CloneJet PCR Cloning Kit* y el protocolo de Chung, et al (1989), modificada por el Laboratorio de Biotecnología Molecular 7 de la UNAM como sigue: Se desarrolló una ligación a 22 °C por 30 minutos. Posteriormente se mantuvo la mixtura de la ligación en hielo durante 15 minutos. Se dio un choque de calor de 1

Tabla 5. Parámetros de PCR de amplificación de *rhlAB*, *rhlABR*, *rhlR*, *rhlC*.

	Segmento	Ciclos	Temperatura °C	Tiempo
rhlAB	1	1	98	5 min
	2	30	98	1 min
			55	30 seg
			72	1.15 seg
	3	1	72	5 min
rhlABR	1	1	98	5 min
	2	30	98	1 min
			63	30 seg
			72	1.3 seg
	3	1	72	5 min
rhlR	1	1	94	5 min
	2	30	95	1 min
			60	30 seg
			72	1 seg
	3	1	72	5 min
rhlC	1	1	94	5 min
	2	30	95	1 min
			60	30 seg
			72	1 seg
	3	1	72	5 min

minuto a 42 °C, luego un choque de frío en hielo por 5 minutos. Se adicionó 900 μ L de Caldo LB, y se procedió a incubar con agitación: 37 °C a 250 rpm por un tiempo de 40 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto, eliminando el sobrenadante y sembrando por diseminación la cantidad de 100 μ L, haciendo uso de espátula de Drigalsky en placas de agar LB mas solución stock de carbenicilina (50 mg/mL), en caso del vector CloneJET, para una concentración final de 100 μ g/mL y placas de agar LB mas solución stock de X Gal (40 mg/mL), en caso del vector PGEM-T, para una concentración final de 100 μ g/mL. Las placas se incuban a 37 °C toda la noche.

Obtención de clonas y purificación de plásmidos.- Se seleccionó de 2 a 4 clonas (colonias) de cada placa con células transformadas. Con ayuda de palillos monodientes estériles se procedió a cultivar en matraces contenido 15 mL de medio Luria Bertini (LB) mas solución stock de carbenicilina (50 mg/mL) para una concentración final de 100 μ g/mL, finalmente se incubó toda la noche a 37 °C con agitación de 220 rpm. Despues de 12 horas, se purificaron los cultivos crecidos en matraces, distribuyendo en dos tubos eppendorf de 1 y 5 mL, y se centrifugó a 14 000 rpm por 2 minutos. De este *pellet* se procedió a la purificación de plásmidos, utilizando la metodología indicada en *QIAprep Spin Miniprep Kit Protocol* (QIAGEN).

Ánálisis de restricción.- Los análisis de restricción se realizaron con la enzima Hind III-HF 20 000 U/mL (*New England Biolabs*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Secuenciamiento.- Las secuencias del gen ribosomal 16S, como de las regiones génicas *rhlABR* fueron enviadas a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la Universidad Autónoma de México (UNAM), Cuernavaca, Estado de Morelos, para su secuenciación. Las lecturas de los cromatogramas de estas secuencias fueron realizadas con el software *FinchTV*.

Análisis bioinformático.- Las secuencias nucleotídicas obtenidas fueron alineadas junto a trece (13) secuencias nucleotídicas de referencia mediante el programa MUSCLE (Edgar 2004). Posteriormente, se realizaron análisis evolutivos en MEGA6. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de Jukes-Cantor (1969), y la variación entre los sitios fue modelada con una distribución gamma. Finalmente, se infirió la historia evolutiva del conjunto mediante el método de Neighbour-Joining (Saitou & Nei 1987), aplicando posteriormente la prueba de *bootstrap* con 2000 réplicas (Felsenstein 1985).

Resultados y discusión

Identificación bioquímica y molecular de microorganismos.- Mediante la identificación bioquímica con el sistema API 20 NE de una muestra aleatoria de 61 microorganismos provenientes de una población de 749 especies del género *Pseudomonas* spp. (Tabla 6). Se encontró que el microorganismo de mayor prevalencia en los tres estratos evaluados (sobreproductoras de RL, productoras de RL y no productoras de RL), corresponde a la especie *Pseudomonas aeruginosa*, con 71.4, 90.0 y 55.0% respectivamente. En menor proporción se identificaron las especies: *Aeromonas hidrophyla*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacia* y *Chryseobacterium indologenes* (Tabla 7). *Chryseobacterium indologenes* se evidenció sólo en los estratos productoras de RL (Código IIKA3-2a-1) y no productoras de RL (Código IA1-B-5).

Tabla 6. Caracterización bioquímica de microorganismos seleccionados por categorías: sobreproductoras, prodproductoras y no productoras de RL en base a tamaño de halo en Agar CTAB/MB.

Estrato	Código de cepa	Procedencia	Tamaño de halo en agar ctab/mb	Identificación bioquímica API 20 NE
SOBREPRODUCTORAS DE RL	3BH-14	Talara	1.108187980	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	3BH-13a	Talara	1.055905291	<i>Burkholderia cepacia</i>
	4B10 b	Talara	1.000314627	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIBA1-3	La Pampilla	1.027124183	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	T2X-2	Talara	1.072760553	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	6K-11i	Talara	1.197486339	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	6K-11f	Talara	1.197486339	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	1BH-1a	Talara	1.036352018	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	IB4	Talara	1.235306676	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	3BH-12	Talara	1.033351974	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIBT1-1	La Pampilla	1.099982468	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
	4B7 (7)	Talara	1.059068527	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	4B7	Talara	1.275749476	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIPKA4-1b	La Pampilla	1.050239503	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	2K-6	Talara	1.522701477	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	3BH-16	Talara	1.003453689	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIIAPK-2b1	La Pampilla	1.043911912	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	IIIT1P2	La Pampilla	1.339698818	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	3BH10	Talara	1.225221515	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	c1-1 10bc2A	Talara	0.99923888	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	4b-9	Talara	1.049641032	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PRODUCTORAS DE RL	R32T	Talara	0.463769033	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	IIT4B2	La Pampilla	0.269253262	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	22a	Talara	0.556777688	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIIT5K-3A	La Pampilla	0.458286328	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIKA2-32 (43)	La Pampilla	0.758472748	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	18b	Talara	0.565493622	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	b41c110ab	Talara	0.516675987	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIIT4B5	La Pampilla	0.276413094	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIBT5-1 (3)	La Pampilla	0.759790492	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	L1TA2	Talara	0.520066117	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	C2-1 1cC1	Talara	0.342709732	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	121 (A)	Talara	0.785015515	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	43	Talara	0.561505798	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIKA3-2a-1	La Pampilla	0.730959071	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
	5BH-1	Talara	0.717157545	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIPBT2-2a	La Pampilla	0.730949036	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIIT2B2a (45)	La Pampilla	0.796443939	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIKT5-1b	La Pampilla	0.570747995	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIPBT5-2 (23)	La Pampilla	0.723609992	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
NO PRODUCTORAS DE RL	M1AA25B	Talara	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	2K-3	Talara	0	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	L1TA1	Talara	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IT1-K1	La Pampilla	0	<i>Burkholderia cepacia</i>
	3BH-17	Talara	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	1B1 (49)	Talara	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	3K-6	Talara	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IA1-B-5	La Pampilla	0	<i>Chryseobacterium indologenes</i>
	A4BT5	Talara	0	<i>Aeromonas hydrophila</i>
	IT4B-3	La Pampilla	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	4BH-2	Talara	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	4BH-3	Talara	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	4B14	Talara	0	<i>Burkholderia cepacia</i>
	19	Talara	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	2K-1	Talara	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIBA2-4	Talara	0	<i>Burkholderia cepacia</i>
	22b	Talara	0	<i>Burkholderia cepacia</i>
	IA3K2(B)	Talara	0	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	IIBA4-5(25)	La Pampilla	0	<i>Burkholderia cepacia</i>

El 95.7% de las cepas correspondientes al estrato sobreproductoras de RL, pertenecen a especies del género *Pseudomonas* (*P. aeruginosa* *P. fluorescens*) y *Burkholderia cepacea*, especie fenotípicamente cercana a *Pseudomonas* spp. Arenas (1999) halló una frecuencia de 30.91% de cepas del género *Pseudomonas* de una muestra de 55 microorganismos identificados. El 88.24 % cepas de este género correspondió a la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

Ajustando los datos de Tabuchi (2014) mediante identificación bioquímica obtuvimos una frecuencia estimada de 19.8% de cepas correspondientes al género *Pseudomonas* del total de microorganismos del cepario de LAMIBYM (n= 2517). Este resultado es menor al reportado por Arenas (1999) que obtuvo un 30.91% en su estudio, sin embargo su población muestral (n= 55) y sus métodos de aislamiento fueron distintos a los nuestros.

A la luz de nuestros resultados, la frecuencia ponderada de cepas de *Pseudomonas* spp fue del 66.5%, valor que se eleva a 83.2 % cuando se incluye a *B. cepacia*. Observamos que nuestro estudio presenta un porcentaje de mayor prevalencia para especies del grupo *Pseudomonas*, y específicamente de *P. aeruginosa*, lo cual corrobora lo planteado por Norman et. al. (2002) que indican que *Pseudomonas* es el género con mayor frecuencia que se aísla de ambientes contaminados con hidrocarburos. Además concordamos con Pérez et al. (2008) quienes mediante pruebas bioquímicas clásicas, caracterizaron cepas bacterianas aisladas de suelos contaminados con petróleo de alrededores de una refinería de Santiago de Cuba, determinando que 5 de ellas corresponden a *Pseudomonas aeruginosa*. Narváez-Flores et al. 2008 seleccionaron bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos, aisladas de sedimentos del Caribe colombiano, identificadas con el sistema bioquímico BBL Cristal y API 50CH/E como: *Klebsiella* sp, *Chromobacterium* sp., *Flavimonas orizihabitans*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus brevis*, *B. pumillus* y *B. cereus*. Por su parte, Pucci et al. (2010) estudiaron la diversidad bacteriana con capacidad de degradar hidrocarburos en la playa de Caleta Córdova (Argentina), utilizando el sistema FAMEs, identificaron como los género de mayor frecuencia: *Pseudoalteromonas*, *Bacillus*, *Psychrobacter* y *Shewanella*; además de *Pseudomonas* sp., *Aeromonas* sp. y *Burkholderia cepacea*, entre

otras. Arrieta et al. (2012) realizaron la caracterización fenotípica y molecular de poblaciones bacterianas de un suelo contaminado con diésel, diferenciándolos molecularmente en los siguientes géneros: *Enterobacter*, *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Sanguibacter*, *Staphylococcus* y *Flavobacterium*.

Basados en el trabajo de Tabuchi (2014), tenemos un total de 21 microorganismos sobreproductores de RL, nosotros seleccionamos 8 de ellos: 7 cepas identificadas con API 20 NE como *Pseudomonas aeruginosa*: *2K1*, *T2X-2*, *IIPKA41b*, *3Bh-16*, *IIIT1P2*, *4B7* (7), *6K11* y una especie identificada como *Burkholderia cepacea* *3Bh13a*, a fin de realizar la amplificación del gen ribosomal 16 S (16 S ADNr) mediante técnica de PCR y de electroforesis en gel de agarosa, para una posterior selección al secuenciamiento respectivo. Se consideraron como controles positivos, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y *Pseudomonas aeruginosa* PAO1.

Para el secuenciamiento se seleccionaron 4 microorganismos: *Pseudomonas aeruginosa* *T2X-2*, *Pseudomonas aeruginosa* *III T1P2*, *Pseudomonas aeruginosa* *6K-11* y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027. Las secuencias obtenidas el gen ribosomal 16 S fueron analizadas y comparadas con el *Gen Bank*, encontrándose que los cuatro microorganismos aislados tienen correspondencia génica con *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Las secuencias de 16S obtenidas permite identificarlas como miembros de la especie *Pseudomonas aeruginosa*.

Las secuencias obtenidas a partir de 4 cepas problema seleccionadas presentan una alta similitud con las regiones homólogas codificadas en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Además las secuencias aminoacídicas predichas para estas secuencias noveles resultan sinónimas de la registrada para la cepa patrón (Fig. 1)

Caracterización molecular de genes asociados a la producción de rhamnolípidos. - Luego de amplificar mediante PCR las secuencias y regiones génicas *rhlAB*, *rhlABR*, *rhlR* y *rhlC*, los productos de amplificación fueron separados en gel de agarosa mediante electroforesis. Luego fueron secuenciados los productos de amplificación de la región *rhlABR* de las cepas *Pseudomonas aeruginosa* *T2X-2*, *Pseudomonas aeruginosa* *IIIT1P2*, *Pseudomo-*

Tabla 7. Distribución porcentual de la caracterización bioquímica de microorganismos en los tres estratos: sobreproductoras de RL, productoras de RL, no productoras de RL. *Pseudomonas aeruginosa* es la especie de mayor prevalencia con 71.4, 90.0 y 55.0% respectivamente.

Grupo		Nº cepas aisladas	Frecuencia (%)
Sobreproductoras de RL	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3	14.3
	<i>Burkholderia cepacia</i>	1	4.8
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	15	71.4
	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	2	9.6
Productoras de RL	<i>Aeromonas hydrophila</i>	1	5
	<i>Burkholderia cepacia</i>	0	0
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	18	90
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1	5
No productoras de RL	<i>Aeromonas hydrophila</i>	3	15
	<i>Burkholderia cepacia</i>	5	25
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	11	55
	<i>Chryseobacterium indologenes</i>	1	5

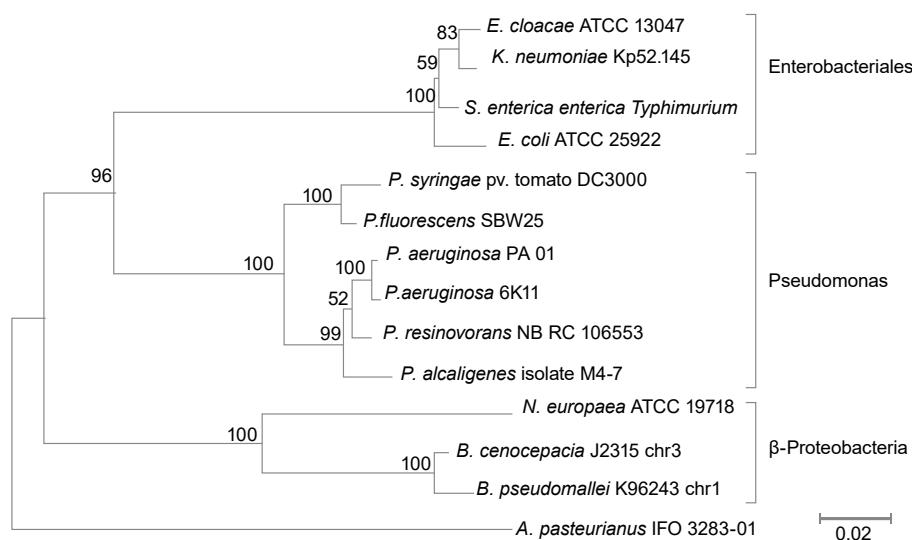


Figura 1. Posición filogenética de la cepa 6K-11, a partir del secuenciamiento al gen ribosomal 16 S. Los números indican el valor de bootstrap de 2000 repeticiones. El análisis de las secuencias de las otras cepas ensayadas dieron un comportamiento similar, determinándose ser especies del género *Pseudomonas aeruginosa*.

Pseudomonas aeruginosa 6K-11, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 y comparados con la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. En las pruebas de electroforesis realizadas a las siete cepas mencionadas previamente, se determinó la presencia de los genes: *rhlA*, *rhlB* y *rhlC*, como se observa en las Figuras 2 a 4, las cuales codifican respectivamente:

- la 3-(3-hidroxialcanoiloxy)alcanoato sintetasa (Abdel-Mawgoud et al. 2011), responsable de la síntesis de HAAs y la fracción dimérica de los ácidos grasos de los ramnolípidos (Dobler et al. 2016, Reis et al. 2011, Soberón-Chávez et al. 2005).
- la enzima ramnosiltransferasa 1, responsable de la biosíntesis de momo-ramnolípido y
- la enzima ramnosiltransferasa 2, responsable de la biosíntesis de di-ramnolípido (Bazire & Dufour 2014, Déziel et al. 2003, Soberón-Chávez et al. 2005) respectivamente.

Asimismo también se determinó la presencia del gen *rhlR*, como se muestra en la Figura 4, que codifica el regulador transcripcional RhlR que tiene un papel central en la respuesta de detección del quórum (Medina et al. 2003).

Al no encontrar diferencias significativas en la caracterización molecular de genes y regiones génicas asociadas a la producción de ramnolípidos, planteamos la hipótesis que se deba a la presencia de regiones altamente conservadas en el genoma de *Pseudomonas aeruginosa*. Esto fue demostrado por Wolfgang et al. 2003, al utilizar *microarrays* de ADN de genoma completo para determinar el contenido genómico de 18 cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, 13 aisladas de infecciones humanas más comunes y 5 de fuentes ambientales; encontrando una remarkable conservación de genes incluidos aquellos que codifican casi todos los factores de virulencia conocidos, concluyendo que cepas de *Pseudomonas aeruginosa* poseen un genoma altamente conservado que codifica genes importantes para la supervivencia en numerosos ambientes. Asimismo, Grosso et al. (2014), quienes al secuen-

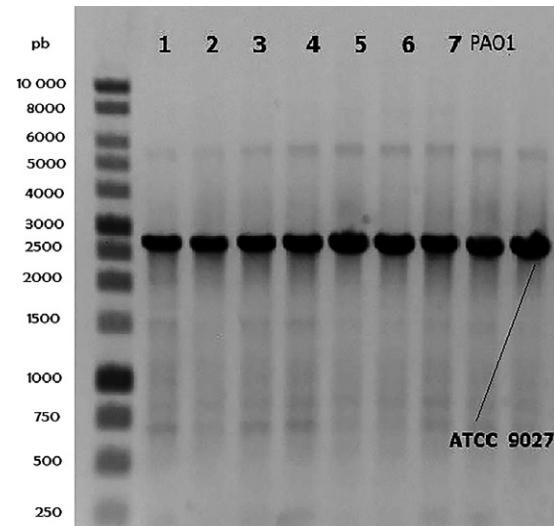


Figura 2. Detección mediante electroforesis para la región *rhlAB* en diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: 1)2K1, 2)T2X-2, 3)IIPKA41b, 4)3Bh-16, 5)IIIT1P2, 6)4B7(7), 7)6K-11.

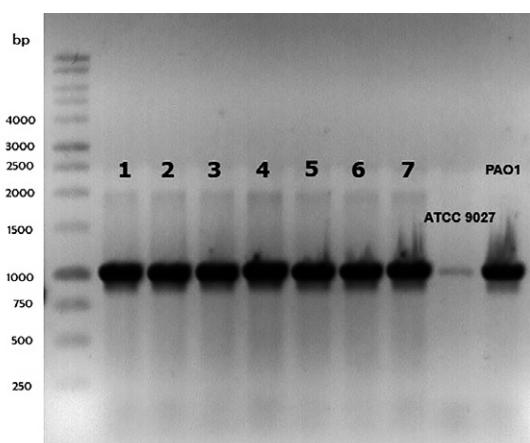


Figura 3. Detección mediante electroforesis para el gen *rhlR* en diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: 1)2K1, 2)T2X-2, 3)IIPKA41b, 4)3Bh-16, 5)IIIT1P2, 6)4B7(7), 7)6K-11.

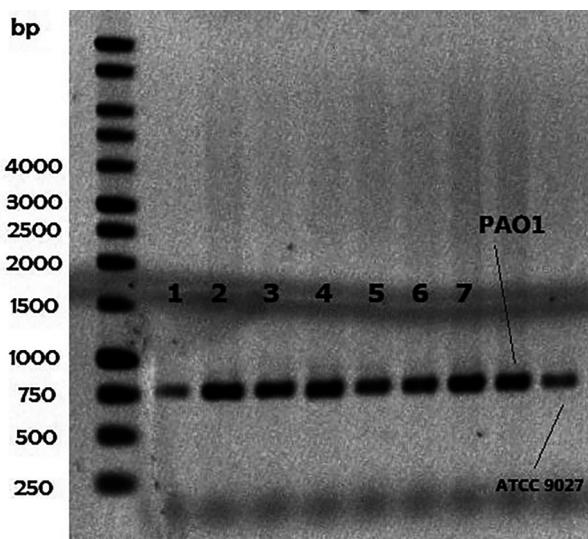


Figura 4. Detección mediante electroforesis para el gen *rhlC* en diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: 1)2K1, 2)T2X-2, 3)IPKA41b, 4)3Bh-16, 5)IIIT1P2, 6)4B7(7), 7)6K-11. Se usaron como controles las cepas *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (productor de di-ramnolípido) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (productor de mono-ramnolípido)

ciar cuatro aislados no humanos de *Pseudomonas aeruginosa* (3 ambientales y un aislado de estómago de delfín), y comparados frente a 12 aislados clínicos y uno proveniente de rizósfera de melón cepa M18, afirmaron que estos aislados estudiados tienen una larga proporción de sus genomas conservados entre ellos (núcleo genómico); concluyendo que la variabilidad genética de todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* cuyos genomas han sido secuenciados, es extremadamente bajo.

En el análisis detallado de la secuencia de los genes dependientes del QS (*rhlA*, *rhlB*, *rhlR*, *rhll*, etc), Grosso et al. (2014) demostraron que los cuatro aislados de *Pseudomonas aeruginosa* (ID 4365, M10, IGB83, 148) resultaron ser idénticos; de igual forma nosotros encontramos los mismos resultados para nuestras cepas de *Pseudomonas aeruginosa* T2X-2, IIIT1P2, 6K-11, ATCC 9027 (Figs. 5 y 6)

Es importante destacar que el análisis molecular de genes asociados a la producción de ramnolípidos solo contempló los genes del sistema rhl. Al no haber hallado diferencias genéticas en la región estudiada, debemos hallar las bases moleculares de las diferencias fenotípicas (nivel de producción de ramnolípidos) en otras regiones del genoma.

Agradecimientos

Los autores manifiestan su agradecimiento a los investigadores del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Autónoma de México (UNAM), a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA (USSDNA) del Instituto de Biotecnología de la UNAM, sede Cuernavaca, Estado de Morelos. Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad (Innovate Perú) bajo el contrato N°238-FINCYT-IA-2013.

Literatura citada

- Abdel-Mawgoud A.M., R. Hausmann, F. Lépine, et al. 2011. Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation and bioengineering of production. En: Biosurfactants. Microbiology Monographs 20. DOI: http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_2.
- Abdel-Mawgoud A.M., R. Hausmann, F. Lépine, M.M. Müller, E. Déziel. 2011. Rhamnolipids: Detection, Analysis, Biosynthesis, Genetic Regulation, and Bioengineering of Production. In: Biosurfactants. Springer, Berlin, Heidelberg. (Microbiology Monographs). p. 13–55. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-14490-5_2.
- Aguirre M., G. Medina, A. González, et al. 2012. The *Pseudomonas aeruginosa* rmlDBAC operon, encoding dTDP-L-rhamnose biosynthetic enzymes, is regulated by the quorum sensing transcriptional regulator RhlR and the alternative sigma factor σ^s . *Microbiology* 158: 908–916. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0054726-0>.
- Aguirre M. 2013. Regulación del operón rmlDBAC por el sistema sensor de quórum RhlR en *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis, Doctor en Ciencias Bioquímicas. Facultad de Química, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 47 p.
- Arenas S. 1999. Aislamiento y caracterización de bacterias de ambientes contaminados por petróleo en la Refinería La Pampilla-Lima. Tesis, Biólogo con mención Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú.

PAO1	GGCTCTGGGGCGGTATCTCACGCTGCTGGCGTGTGCGCAATCCGCGGGATCCGC
T2K2	GGCTCTGGGGCGGTATCTCACGCTGCTGGCGTGTGCGCAATCCGCGGGATCCGC
ATCC_9027	GGCTCTGGGGCGGTATCTCACGCTGCTGGCGTGTGCGCAATCCGCGGGATCCGC
6K-11	GGCTCTGGGGCGGTATCTCACGCTGCTGGCGTGTGCGCAATCCGCGGGATCCGC
III_T1P2	GGCTCTGGGGCGGTATCTCACGCTGCTGGCGTGTGCGCAATCCGCGGGATCCGC
(...)	
PAO1	ACCGTCGGCAAATACCTGCCAAGCGCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTCG
T2K2	ACCGTCGGCAAATACCTGCCCGCGCCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTCG
ATCC_9027	ACCGTCGGCAAATACCTGCCCGCGCCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTCG
6K-11	ACCGTCGGCAAATACCTGCCCGCGCCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTCG
III_T1P2	ACCGTCGGCAAATACCTGCCCGCGCCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTCG
(...)	
PAO1	CTTGGCTTGCCTGGAGCGGATCCAGAGGCCACGTGCATTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAAT
T2K2	CTTGGCTTGCCTGGAGCGGATCCAGAGGCCACGTGCATTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAAT
ATCC_9027	CCTGGCTTGCCTGGAGCGGATCCAGAGGCCACGTGCATTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAAT
6K-11	CCTGGCTTGCCTGGAGCGGATCCAGAGGCCACGTGCATTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAAT
III_T1P2	CCTGGCTTGCCTGGAGCGGATCCAGAGGCCACGTGCATTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAAT

Figura 5. Comparación de las secuencias del gen *rhlA* entre *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y las distintas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: T2X-2, IIIT1P2, 6K-11 y ATCC 9027.

PAO1	CCCTGAAA CT TCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGT TTT CGCGACGCGG
T2K2	CCCTGAAA TT TCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGT TTT CGCGACGCGG
ATCC_9027	CCCTGAAA TT TCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGT TTT CGCGACGCGG
6K-11	CCCTGAAA TT TCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGT TTT CGCGACGCGG
III_T1P2	CCCTGAAA TT TCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGT TTT CGCGACGCGG
(...)	
PAO1	TGGCGATCCCGCCTGTGGGACCCAAGACGTCTTCGGCGTGCTGGCAA GCCATCG
T2K2	TGGCGATCCCGCCTGTGGGACCCAAGACGTCTTCGGCGTGCTGGCAA GCCATCG
ATCC_9027	TGGCGATCCCGCCTGTGGGACCCAAGACGTCTTCGGCGTGCTGGCAA GCCATCG
6K-11	TGGCGATCCCGCCTGTGGGACCCAAGACGTCTTCGGCGTGCTGGCAA ACCATCG
III_T1P2	TGGCGATCCCGCCTGTGGGACCCAAGACGTCTTCGGCGTGCTGGCAA ACCATCG
(...)	
PAO1	TGGCGGCTCGCTATGGCGCTGGCGCACGCATCGCTACGAGAAGTACGGGATTCCCT
T2K2	TGGCGGCTCGCTGTGGCGCTGGCGCACGCATCGCTACGAGAAGTACGGGATTCCCT
ATCC_9027	TGGCGGCTCGCTGTGGCGCTGGCGCACGCATCGCTACGAGAAGTACGGGATTCCCT
6K-11	TGGCGGCTCGCTGTGGCGCTGGCGCACGCATCGCTACGAGAAGTACGGGATTCCCT
III_T1P2	TGGCGGCTCGCTGTGGCGCTGGCGCACGCATCGCTACGAGAAGTACGGGATTCCCT
PAO1	ACCTGTCCGCCAGGTCTGCCATCGACCTGTGTCGGCGCACCTGCCGCCGTACACC
T2K2	ACCTGTCCGCCAGGTCTGCCATCGACCTGTGTCGGCGCACCTGCCGCCGTACACC
ATCC_9027	ACCTGTCCGCCAGGTCTGCCATCGACCTGTGTCGGCGCACCTGCCGCCGTACACC
6K-11	ACCTGTCCGCCAGGTCTGCCATCGACCTGTGTCGGCGCACCTGCCGCCGTACACC
III_T1P2	ACCTGTCCGCCAGGTCTGCCATCGACCTGTGTCGGCGCACCTGCCGCCGTACACC
(...)	
PAO1	TCGGCTGGAAACGCCGGTGAAGGCCATCTCACCAATGGATGCATTGCCAGGGCG
T2K2	TCGGCTGGAGACGCCGGTGAAGGCCATCTCACCAATGGATGCATTGCCAGGGCG
ATCC_9027	TCGGCTGGAGACGCCGGTGAAGGCCATCTCACCAATGGATGCATTACCGAGGGCG
6K-11	TCGGCTGGAAACGCCGGTGAAGGCCATCTCACCAATGGATGCATTGCCAGGGCG
III_T1P2	TCGGCTGGAAACGCCGGTGAAGGCCATCTCACCAATGGATGCATTGCCAGGGCG
(...)	
PAO1	ACATGACCGGCTTCCCGTGTGACGGCAGTATCCGGGACCCCGCTCGACGACGAAC
T2K2	ACATGACCGGCTTCCCGTGTGACGGCAGTATCCGGGACCCCGCTCGACGACGAAC
ATCC_9027	ACATGACCGGCTTCCCGTGTGACGGCAGTATCCGGGACCCCGCTCGACGACGAAC
6K-11	ACATGACCGGCTTCCCGTGTGACGGCAGTATCCGGGACCCCGCTCGACGACGAAC
III_T1P2	ACATGACCGGCTTCCCGTGTGACGGCAGTATCCGGGACCCCGCTCGACGACGAAC
(...)	
PAO1	CGCGTGGATCTCCTCACCGCGCCAGGAACCGCTGCGCGCTTGC GA ACCACG
T2K2	CGCGTGGATCTCCTCACCGCGCCAGGAACCGCTGCGCGCTTGC GA ACCATG
ATCC_9027	CGCGTGGATCTCCTCACCGCGCCAGGAACCGCTGCGCGCTTGC GA ACCACG
6K-11	CGCGTGGATCTCCTCACCGCGCCAGGAACCGCTGCGCGCTTGC GA ACCACG
III_T1P2	CGCGTGGATCTCCTCACCGCGCCAGGAACCGCTGCGCGCTTGC GA ACCACG
(...)	
PAO1	CCATGAGCCTAGCCITGGCGGGGGTGC CG AGGTGCTGCTGCCCTGTGCCACGACC
T2K2	CCATGAGCCTGGCCTGGCGGGGGTGC CG AGGTGCTGCTGCCCTGCCACGACC
ATCC_9027	CCATGAGCCTGGCCTGGCGGGGGTGC CG AGGTGCTGCTGCCCTGCCACGACC
6K-11	CCATGAGCCTGGCCTGGCGGGGGTGC CG AGGTGCTGCTGCCCTGCCACGACC
III_T1P2	CCATGAGCCTGGCCTGGCGGGGGTGC CG AGGTGCTGCTGCCCTGCCACGACC
(...)	
PAO1	GGGATGCTCGATGGCTGAAGGCTGCGTCTGA
T2K2	GGGATGCGCGATGGCTGAAGGCTGCGTCTGA
ATCC_9027	GGGATGCTCGATGGCTGAAGGCTGCGTCTGA
6K-11	GGGATGCGCGATGGCTGAAGGCTGCGTCTGA
III_T1P2	GGGATGCGCGATGGCTGAAGGCTGCGTCTGA

Figura 6. Comparación de las secuencias del gen *rhlB* entre *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y las distintas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: T2X-2, III T1P2, 6K-11 y ATCC 9027.

- Arrieta O.M., A.P. Rivera, B. Rojano, et al. 2012. Caracterización fenotípica y molecular de poblaciones bacterianas aisladas de un suelo contaminado con diésel y sometido a dos tecnologías de biorremediación. *Gestión y Ambiente* 15(3):65-76. <http://www.bdigital.unal.edu.co/35842/1/36281-156060-1-PB.pdf>.
- Bazire A. & A. Dufuor. 2014. The *Pseudomonas aeruginosa* rhlG and rhlAB genes are inversely regulated and RhlG is not required for rhamnolipid synthesis. *BMC Microbiology* 2014, 14: 160. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2180-14-160>.
- Croada G. 2011. Caracterización de la regulación transcripcional del gen rhlR en *Pseudomonas aeruginosa* por Vfr. Tesis, Doctor en Ciencias (Bioquímicas). Programa de Maestría en Ciencias Bioquímicas, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 95 p.
- Delgado V. 2009. El papel de la proteína RhlA en la síntesis de rhamnolípidos (rhl's) y polihidroxialcanoatos (PHA's) en *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis, Maestro en Ciencias Bioquímicas. Universidad Autónoma de México. Mexico D.F. 123 p.
- Déziel E., F. Lépine, S. Milot, et al. 2003. rhlA is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanoic acids (HAA), the precursors of rhamnolipids. *Microbiology* 149:2005-2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26154-0>
- Dobler L., L.F. Vilela, R.V. Almeida, et al. 2016. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting. *Review. New Biotechnology*. 33(1):123-135 DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nbt.2015.09.005>.
- Du Plessis D.J.F. 2005. Regulation rhamnolipid biosynthesis in the *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 biofilm population. Tesis, Magister en Ciencias. Facultad de Ciencias Naturales y Agrícolas, Departamento de Microbiología y Patología de Plantas. Universidad de Pretoria. Sudáfrica. 112 p.
- Edgar R. C. 2004. Muscle: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkh340>.
- Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. *Evolution* 39(4):783-791. <http://dx.doi.org/10.2307/2408678>
- Giraldo J.D. 2012. Producción de rhamnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* Pb25: evaluación de su actividad emulsificante y remoción de metales pesados. Tesis, Biólogo, Mención Microbiología y Parasitología. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Lima-Perú. 58 p.
- Grosso, M.V., C. Santos, A. González, et al. 2014. *Pseudomonas aeruginosa* and environmental isolates constitute a single population with high phenotypic diversity. *BCM Genomics* 15: 318. DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-15-318>.
- Grosso, M.V., A. González, M.J. Granados, et al. 2016. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 is a non virulent strain suitable for mono-rhamnolipids production. *Applied Microbiology and Biotechnology* 100 (3):9995-10004. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-016-7789-9>.
- Hernández D. 2012. Incremento de la producción de rhamnolípidos en la cepa modelo *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Tesis, Químico Farmacéutico Biólogo. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 46 p.
- Medina, G., K. Juárez, R. Díaz, et al. 2003. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149(11):3073-81.
- Medina G., Juárez K., Díaz R., Soberón-Chávez G. 2003. Transcriptional regulation of *Pseudomonas aeruginosa* rhlR, encoding a quorum-sensing regulatory protein. *Microbiology* 149:3073-3081. DOI: <http://dx.doi.org/10.1099/mic.0.26282-0>
- Narváez-Flores S., M.L. Gómez, M.M. Martínez. 2008. Selección de Bacterias con capacidad degradadora de hidrocarburos aisladas a partir de sedimentos del Caribe Colombiano. *Boletín del Instituto de Investigaciones Marinas y Costeras (INVE-MAR)*, 37(1):61-75. ISSN 0122-9761. <http://www.scielo.org.co/pdf/mar/v37n1/v37n1a04>
- Norman R.S., R. Frontera-Suau, P.J. Morris. 2002. Variability in *Pseudomonas aeruginosa* lipopolisaccharide expresión during crude oil degradation. *Applied and Environmental Microbiology*, October 2002, p. 5096-5103. DOI: <http://dx.doi.org/10.1128/AEM.68.10.5096-5103.2002>.
- Perfumo A., M. Rudden, T. Smyth, et al. 2013. Rhamnolipids are conserved biosurfactants molecules: implications for their biotechnological potential. *Applied Genetics and Molecular Biotechnology* 97:7297-7306. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-013-4876-z>.
- Pucci N., A. Acuña, N. Tonin, et al. 2010. Diversidad de bacterias cultivables con capacidad de degradar hidrocarburos de la playa de la Caleta, Argentina. *Revista Peruana de Biología* 17(2): 237-244. DOI: <http://dx.doi.org/10.15381/rpb.v17i2.34>.
- Quezada N. 2010. Metodología de la Investigación. Estadística aplicada en la investigación. Editora Macro E.I.R.L. Lima-Perú. 334 p.
- Rahim R., U.A. Ochsner, C. Olvera, M. Graninger, et al. 2001. Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gene that encodes rhamnosyltransferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Molecular Microbiology* 40(3):708-718. DOI: <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-2958.2001.02420.x>.
- Reis R.S., S. L. Gonçalves, D.A. Chapeaurouge, et al. 2010. Effects of carbon and nitrogen sources on the proteome of *Pseudomonas aeruginosa* PA1 during rhamnolipid production. *Process Biochemistry* 45(9):1504-1510. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2010.05.032>.
- Reis R.S., A.G. Pereira, B.C. Neves, et al. 2011. Gene regulation of rhamnolipid production in *Pseudomonas aeruginosa*-A review. *Bioresource Technology* 102:6377-6384. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.074>.
- Reis R.S., G.J. Pacheco, A.G. Pereira, D.M.G. Freire. 2013. Biosurfactants: Production and Applications. En: Biodegradation-Life of Science, Chapter 2. Chamy R. & F. Rosenkranz. Editores Intech Open Acces Publications 378 p. DOI: <http://dx.doi.org/10.5772/56144>.
- Saitou N. & M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4(4):406-425.
- Pérez R.M., M.I. Camacho, J.M. Gómez, et al. 2008. Aislamiento y selección de una cepa bacteriana degradadora de hidrocarburos a partir de suelos contaminados con petróleo. CENIC-Ciencias Biológicas, 39(1):44-51. <http://www.redalyc.org/html/1812/181214889004/>
- Singh A., J. Van Hamme, & O. Ward. 2007. Surfactants in microbiology and biotechnology. Part 2. Application aspects. *Biotechnology Advances* 25:99-121. doi:10.1016/j.biotechadv.2006.10.004.
- Soberón-Chávez G., F. Lépine & E. Déziel. 2005. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. Mini-Review. *Applied Microbiology and Biotechnology* 68:718-725. DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00253-005-0150-3>.
- Tabuchi T. 2014. Optimización del uso de agar con cetiltrimetilamonio bromuro y azul de metileno para la selección de cepas de *Pseudomonas* spp. productoras de rhamnolípidos. Tesis, Biólogo Genetista Biotecnólogo. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Nacional Mayor de San Marcos. 74 pp.
- Tejeda V. 2012. Efecto de RhlA en la producción de rhamnolípidos y polihidroxialcanoatos en *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1) Tesis, Biólogo. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. 36 p.
- Toribio J., A. Escalante & G. Soberón-Chávez. 2010. Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. *Review Article. European Journal of Lipid Science and Technology* 112:1082-1087. DOI: <http://dx.doi.org/10.1002/ejlt.200900256>.
- Wolfgang M.C., B. R. Kulasekara, X. Liang, et al. 2003. Conservation of genome content of virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100(14):8484-8489. DOI: <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0832438100>.