

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. Palomino ¹, Guillermo Romero ¹, Abigail González-Valdez ², Gloria Soberón-Chávez ², Susana M. Gutiérrez ^{1*} y Fernando A. Merino ¹

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: romerogguillermo@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: sgutierrezm@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 rRNA 16S. Se encontró que *Pseudomonas aeruginosa* fue el microorganismo de mayor prevalencia en los estratos sobreproductores y productores de ramnolípidos. Además, se encontraron: *Burkholderia cepacea*, *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 cepacea*, *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, standardized by the UNAM laboratory, showed that the selected strains had the genes: *rhlA*, *rhlB*, *rhlR* and *rhlC*. For the sequencing of the *rhlABR* 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 standardized 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 ramnolípido (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 ramnolípidos, reactivó cepas aisladas de ambientes contaminados por petróleo, determinando que el 30% de éstas, pertenecían al género *Pseudomonas* sp.

Los biosurfactantes del tipo ramnolípidos 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 ramnolípidos 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 ramnolípido (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-ramnolípido conteniendo una molécula de L-ramnosa y el di-ramnolípido 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 ramnolípidos, 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 éstos glicolípidos, en forma de dTDP-L-ramnosa (Reis et al. 2011). La síntesis de ramnolípidos se lleva a cabo en 3 reacciones enzimáticas principales (Dobler et al. 2016, Toribio et al. 2010) y la participación de dos ramnosiltransferasas: RhIA que cataliza la dimerización de intermediarios de la biosíntesis

de ácidos grasos para producir los β -hidroxialcanoil- β -hidroxialcanoatos (HAAs) mientras que RhIB (ramnosiltransferasa 1) transfiere a los HAAs una primera molécula de ramnosa 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 RhIC (ramnosiltransferasa 2) agregando una segunda molécula de ramnosa, usando también una molécula de dTDP-L-ramnosa como precursor, obteniendo finalmente di-ramnolípido (Bazire & Dufour 2014, Rahim et al. 2001)

La producción de ramnolípidos 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 ramnolípidos) 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 microorganismos de ramnolípidos.

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 ramnolípido, 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 *GeneJET Genomic DNA Purification Kit* (Thermo Scientific).

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

Células competentes y plásmidos utilizados.- Con el fin de obtener mayor cantidad de ADN para el posterior secuenciación, 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 Biolabs*).

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> IIT1P2
6	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4B7(7)
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K-11

Tabla 3. Cebadores empleados en la amplificación y secuenciación.

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
FrhIA-nft	TGG CGG CGA ATT CCA GGG CCA G	rhlAB
rhlAB-HindIII	TAA GCT TGC ACC GTT CAG GAC G	rhlAB
F-rhlABRc	CCT GCC GAA TTC CTG ACG CCA GAG C	rhlABR
R-rhlABR	GCC CAA GCT TTC GTG GAT CGG CTG C	rhlABR
rhlRf	TC GAT CAG GGC TTA CTG TCA TGA G	rhlR
rhlRr	AGG ATG AAC GGC AAG CTT CCT G	rhlR
rhlCf	CTG GCA ACT TCG ACC TAC GGG A	rhlC
rhlCr	CCT ATG CGG GAA TGC GTT TCG	rhlC

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 *rhIR* y *rhIC*.- 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 µL de Buffer 5X Phusion Green HF, 1 uL dNTPs [10 mM], 0.5 µL de oligonucleótido forward [10 mM], 0.5 µL de oligonucleótido reverse [10 mM], 0.5 µL DNA obtenido (en caso de *rhLAB*), 1.0 µL DNA obtenido (en caso de *rhLABR*), 37 µL de agua grado milliphore (en caso de *rhLAB*), 36.5 µL de agua grado milliphore (en caso de *rhLABR*) y 0.5 µL de enzima.

La amplificación de los genes *rhIR* y *rhIC* 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 µL de Buffer 5X Green Go Taq, 1 µL dNTPs [10 mM], 1 µL de oligonucleótido forward [10 mM], 1 µL de oligonucleótido reverse [10 mM], 4 µL de MgCl₂ 25 mM, 1 µL DNA obtenido, 18.5 µL de agua (grado milliphore) y 0.5 µL de enzima. La mezcla de la reacción se transfiere al termociclador utilizándose 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

minuto a 42 °C, luego un choque de frío en hielo por 5 minutos. Se adicionó 900 µL 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 µL, haciendo uso de espátula de Drigalsky en placas de agar LB mas solución stock de carbenelina (50 mg/mL), en caso del vector CloneJET, para una concentración final de 100 µg/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 µg/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 mondadientes estériles se procedió a cultivar en matraces conteniendo 15 mL de medio Luria Bertini (LB) mas solución stock de carbenicilina (50 mg/mL) para una concentración final de 100 µg/mL, finalmente se incubó toda la noche a 37 °C con agitación de 220 rpm. Después 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).

Análisis 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 secuenciamiento. 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 hydrophyla*, *Pseudomonas fluorescens*, *Burkholderia cepacea* y *Chryseobacterium indologenes* (Tabla 7). *Chryseobacterium indologenes* se evidenció sólo en los estratos productoras de RL (Código IKA3-2a-1) y no productoras de RL (Código IA1-B-5).

Tabla 5. Parámetros de PCR de amplificación de *rhLAB*, *rhLABR*, *rhIR*, *rhIC*.

	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	
rhIR	1	1	94	5 min
	2	30	95	1 min
			60	30 seg
	72	1 seg		
3	1	72	5 min	
rhIC	1	1	94	5 min
	2	30	95	1 min
			60	30 seg
	72	1 seg		
3	1	72	5 min	

Tabla 6. Caracterización bioquímica de microorganismos seleccionados por categorías: sobreproductoras, prodductoras 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
SOBREPDUCTORAS 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>
	IIAPK-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>	
IIPBT15-2 (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*. Narvaéz-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 Calera 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, II PKA41b, 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 ADN_r) 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 genética 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 ramnolípido. - 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* IIIIT1P2, *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	N° 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

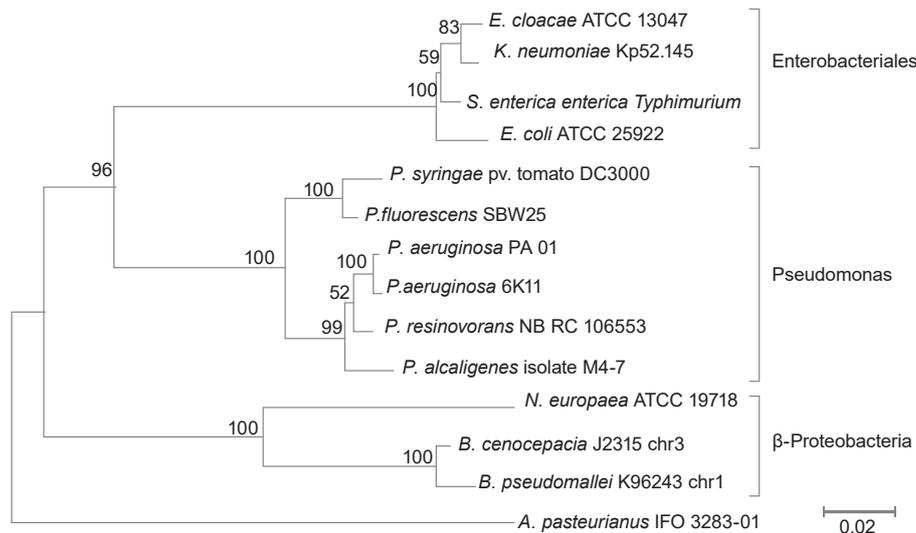


Figura 1. Posición filogenética de la cepa 6K-11, a partir del secuenciamiento al gen ribosomal 16 S. Los números indican el valor de bootstrap de 2000 repeticiones. El análisis de las secuencias de las otras cepas ensayadas dieron un comportamiento similar, determinándose ser especies del género *Pseudomonas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

nas 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-hidroxicanoiloxi)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 mono-ramnolípidos y
- la enzima ramnosiltransferasa 2, responsable de la

biosíntesis de di-ramnolípidos (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 RhIR 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

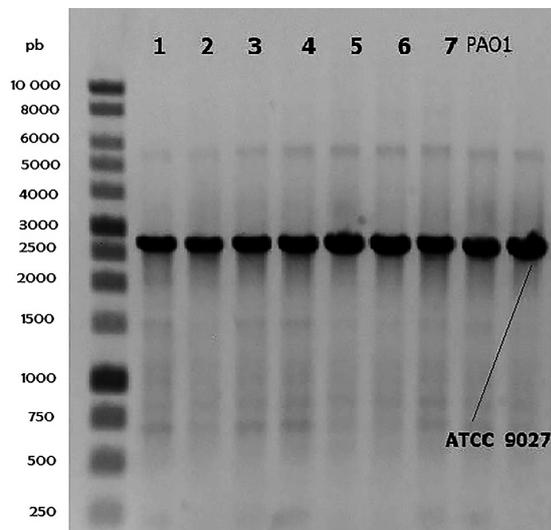


Figura 2. Detección mediante electroforesis para la región *rhlAB* en diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: 1)2K1, 2)T2X-2, 3)IIPKA41b, 4)3Bh-16, 5)IIT1P2, 6)4B7(7), 7)6K-11.

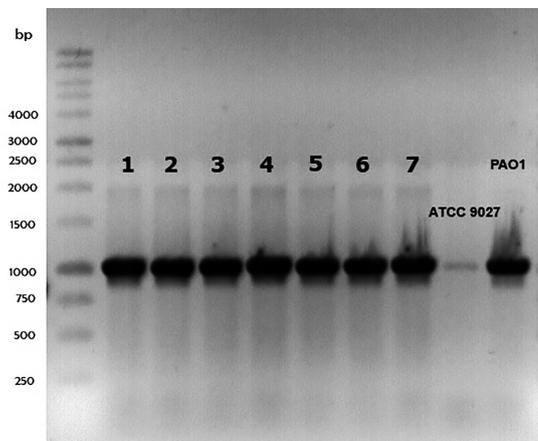


Figura 3. Detección mediante electroforesis para el gen *rhlC* en diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: 1)2K1, 2) T2X-2, 3)IIPKA41b, 4)3Bh-16, 5)IIT1P2, 6)4B7(7), 7)6K-11. Se usaron como controles las cepas *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 (productor de di-ramnolípidos) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 (productor de mono-ramnolípidos).

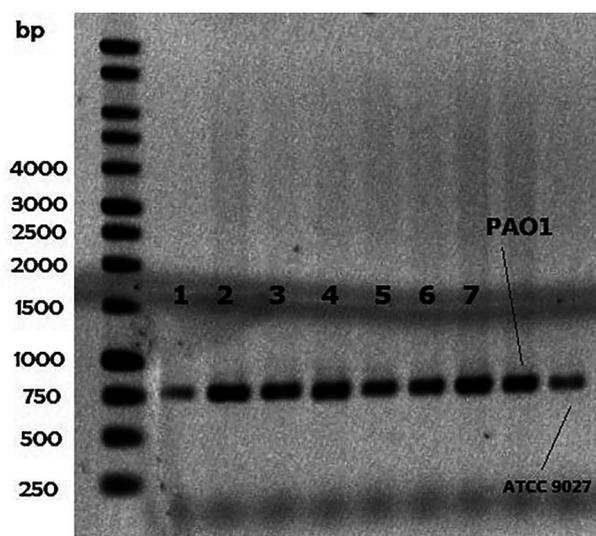


Figura 4. Detección mediante electroforesis para el gen *rhlR* en diversas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: 1)2K1, 2) T2X-2, 3)IIPKA41b, 4)3Bh-16, 5)IIIT1P2, 6)4B7(7), 7)6K-11.

5 de fuentes ambientales; encontrando una remarcable 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 secuenciar 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*, *rhlI*, 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 ramnolípido 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 ramnolípido) 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 (Innóvate 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:
- 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 operon *rmlDBAC* por el sistema sensor de quórum Rhl 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	GCGTCTGGGGCGGTATCTCCACGCTGCTGGCGCTGTCGCGCAATCCGCGCGGCATCCGC
T2K2	GCGTCTGGGGCGGTATCTCCACGCTGCTGGCGCTGTCGCGCAATCCGCGCGGCATCCGC
ATCC_9027	GCGTCTGGGGCGGTATCTCCACGCTGCTGGCGCTGTCGCGCAATCCGCGCGGTATCCGC
6K-11	GCGTCTGGGGCGGTATCTCCACGCTGCTGGCGCTGTCGCGCAATCCGCGCGGCATCCGC
III_T1P2	GCGTCTGGGGCGGTATCTCCACGCTGCTGGCGCTGTCGCGCAATCCGCGCGGCATCCGC
(...)	
PAO1	ACCGTCGGCAAATACCTGCCGACGCGCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTTCG
T2K2	ACCGTCGGCAAATACCTGCCGCGCGCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTTCG
ATCC_9027	ACCGTCGGCAAATACCTGCCGCGCGCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTTCG
6K-11	ACCGTCGGCAAATACCTGCCGCGCGCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTTCG
III_T1P2	ACCGTCGGCAAATACCTGCCGCGCGCTGAAAGCCAGCAACCATCAGCACATGGCTTCG
(...)	
PAO1	CTTGGCTTGCTGGAGCGGATCCAGAGCCACGTGCATTTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAAAT
T2K2	CTTGGCTTGCTGGAGCGGATCCAGAGCCACGTGCATTTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAAAT
ATCC_9027	CCTGGCTTGCTGGAGCGGATCCAGAGCCACGTGCATTTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAGT
6K-11	CCTGGCTTGCTGGAGCGGATCCAGAGCCACGTGCATTTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAAAT
III_T1P2	CCTGGCTTGCTGGAGCGGATCCAGAGCCACGTGCATTTTCATCAACGGCAGCTGGGACGAAAT

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	CTGCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGGTGTTTCGCGACGCGG	
T2K2	CCCTGAAA	TGCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGGTGTTTCGCGACGCGG	
ATCC_9027	CCCTGAAA	TGCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGGTGTTTCGCGACGCGG	
6K-11	CCCTGAAA	TGCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGGTGTTTCGCGACGCGG	
III_T1P2	CCCTGAAA	TGCGCGGGCACCGCGTGAGCCTCTGCACCATCCCGGTGTTTCGCGACGCGG	
(...)			
PAO1	TGGGCGATCCGCGCCTGTGGGACCCCAAGACGTCCTTCGGCGTGCTCTGGCAA	GCCATCG	
T2K2	TGGGCGATCCGCGCCTGTGGGACCCCAAGACGTCCTTCGGCGTGCTCTGGCAA	GCCATCG	
ATCC_9027	TGGGCGATCCGCGCCTGTGGGACCCCAAGACGTCCTTCGGCGTGCTCTGGCAA	GCCATCG	
6K-11	TGGGCGATCCGCGCCTGTGGGACCCCAAGACGTCCTTCGGCGTGCTCTGGCAA	ACCATCG	
III_T1P2	TGGGCGATCCGCGCCTGTGGGACCCCAAGACGTCCTTCGGCGTGCTCTGGCAA	ACCATCG	
(...)			
PAO1	TGGTCGGCTCGCTA	TGGGCGCTGGGCGCACGCATCGCTCACGAGAAGTACGGGATTCCT	
T2K2	TGGTCGGCTCGCT	TGGGCGCTGGGCGCACGCATCGCTCACGAGAAGTACGGGATTCCT	
ATCC_9027	TGGTCGGCTCGCT	TGGGCGCTGGGCGCACGCATCGCTCACGAGAAGTACGGGATTCCT	
6K-11	TGGTCGGCTCGCT	TGGGCGCTGGGCGCACGCATCGCTCACGAGAAGTACGGGATTCCT	
III_T1P2	TGGTCGGCTCGCT	TGGGCGCTGGGCGCACGCATCGCTCACGAGAAGTACGGGATTCCT	
(...)			
PAO1	ACCTGTCCGCGCAGGTCTCGCCATCGACCT	TGTGTGTCGGCGCACCTGCCGCGGTACACC	
T2K2	ACCTGTCCGCGCAGGTCTCGCCATCGACCT	TGTGTGTCGGCGCACCTGCCGCGGTACACC	
ATCC_9027	ACCTGTCCGCGCAGGTCTCGCCATCGACCT	TGTGTGTCGGCGCACCTGCCGCGGTACACC	
6K-11	ACCTGTCCGCGCAGGTCTCGCCATCGACCT	TGTGTGTCGGCGCACCTGCCGCGGTACACC	
III_T1P2	ACCTGTCCGCGCAGGTCTCGCCATCGACCT	TGTGTGTCGGCGCACCTGCCGCGGTACACC	
(...)			
PAO1	TCGGCCTGGAA	ACGCCGGTGAAGCGCATCTCACC	CAATGGATGCATTGCGCCGAGGGCG
T2K2	TCGGCCTGGAG	ACGCCGGTGAAGCGCATCTCACC	CAATGGATGCATTGCGCCGAGGGCG
ATCC_9027	TCGGCCTGGAG	ACGCCGGTGAAGCGCATCTCACC	CAATGGATGCATTGCGCCGAGGGCG
6K-11	TCGGCCTGGAA	ACGCCGGTGAAGCGCATCTCACC	CAATGGATGCATTGCGCCGAGGGCG
III_T1P2	TCGGCCTGGAA	ACGCCGGTGAAGCGCATCTCACC	CAATGGATGCATTGCGCCGAGGGCG
(...)			
PAO1	ACATGACCGGCTTCCCGCTGTT	CGACGGCAGTATCCCGGGACCCCGCTCGACGACGAAC	
T2K2	ACATGACCGGCTTCCCGCTGTT	CGACGGCAGTATCCCGGGAACCCCGCTCGACGACGAAC	
ATCC_9027	ACATGACCGGCTTCCCGCTGTT	CGACGGCAGTATCCCGGGACCCCGCTCGACGACGAAC	
6K-11	ACATGACCGGCTTCCCGCTGTT	CGACGGCAGTATCCCGGGACCCCGCTCGACGACGAAC	
III_T1P2	ACATGACCGGCTTCCCGCTGTT	CGACGGCAGTATCCCGGGACCCCGCTCGACGACGAAC	
(...)			
PAO1	CGCGTGGGATCTTCTCACCGGCGCCGGCCAGGA	ACCGCTGCGCGGCTTGCCGAACCACG	
T2K2	CA	CGTGGGATCTTCTCACCGGCGCCGGCCAGGAACCGCTGCGCGGCTTGCCGAACCATG	
ATCC_9027	CGCGTGGGATCTTCTCACCGGCGCCGGCCAGGA	ACCGCTGCGCGGCTTGCCGAACCACG	
6K-11	CGCGTGGGATCTTCTCACCGGCGCCGGCCAGGA	ACCGCTGCGCGGCTTGCCGAACCACG	
III_T1P2	CGCGTGGGATCTTCTCACCGGCGCCGGCCAGGA	ACCGCTGCGCGGCTTGCCGAACCACG	
(...)			
PAO1	CCATGAGCCTAGCCTTGGCGGCGGGGGTGCCGCAGGTGCTGCTGCCCTG	TGCCACGACC	
T2K2	CCATGAGCCTGGCCTTGGCGGCGGGGGTGCCGCAGGTGCTGCTGCCCTG	TGCCACGACC	
ATCC_9027	CCATGAGCCTGGCCTTGGCGGCGGGGGTGCCGCAGGTGCTGCTGCCCTG	TGCCACGACC	
6K-11	CCATGAGCCTGGCCTTGGCGGCGGGGGTGCCGCAGGTGCTGCTGCCCTG	TGCCACGACC	
III_T1P2	CCATGAGCCTGGCCTTGGCGGCGGGGGTGCCGCAGGTGCTGCTGCCCTG	TGCCACGACC	
(...)			
PAO1	GGGATGCTCGATGGCTGAAGGCTGCGTCCTGA		
T2K2	GGGATGCGCGATGGCTGAAGGCTGCGTCCTGA		
ATCC_9027	GGGATGCTCGATGGCTGAAGGCTGCGTCCTGA		
6K-11	GGGATGCGCGATGGCTGAAGGCTGCGTCCTGA		
III_T1P2	GGGATGCGCGATGGCTGAAGGCTGCGTCCTGA		

Figura 6. Comparación de las secuencias del gen *rhlB* entre *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 y las distintas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*: T2X-2, IIIIT1P2, 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 rhamnolípido (rhl's) y polihidroxicanoatos (PHA's) en *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis, Maestro en Ciencias Bioquímicas. Universidad Autónoma de México. México 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-hydroxyalkanoxy) alkanolic acids (HAAs), 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. Sudafrica. 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 rhamnolípido 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 rhamnolípido 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 expression 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 Access 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 cetiltrimetilammonio bromuro y azul de metileno para la selección de cepas de *Pseudomonas* spp. productoras de rhamnolípido. 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 rhamnolípido y polihidroxicanoatos 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>.