



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América

Facultad de Ciencias Biológicas

Escuela Profesional de Genética y Biotecnología

**Mejoramiento de la producción de ramnolípidos en la
cepa nativa *Pseudomonas* sp. 6K-11 por mutagénesis
con radiación ultravioleta**

TESIS

Para optar el Título Profesional de Biólogo Genetista
Biotecnólogo

AUTOR

Guillermo Frank ROMERO GUERRA

ASESOR

Susana Mónica GUTIÉRREZ MORENO

Lima, Perú

2016



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

Referencia bibliográfica

Romero, G. (2016). *Mejoramiento de la producción de ramnolípidos en la cepa nativa Pseudomonas sp. 6K-11 por mutagénesis con radiación ultravioleta*. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.



UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE
BIÓLOGO GENETISTA BIOTECNÓLOGO
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)

Siendo las 12:20 horas del 05 de diciembre de 2016, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** de **GUILLERMO FRANK ROMERO GUERRA**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 011-EPGB-2016, el titulando expuso su tesis: **"MEJORAMIENTO DE LA PRODUCCIÓN DE RAMNOLÍPIDOS EN LA CEPA NATIVA *Pseudomonas sp.* 6K-11 POR MUTAGÉNESIS CON RADIACIÓN ULTRAVIOLETA"** y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 1.9 , calificativo:

Sobresaliente... con mención.

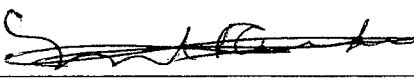
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Biólogo Genetista Biotecnólogo** a **GUILLERMO FRANK ROMERO GUERRA** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.


Siendo las 14:15 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 05 de diciembre de 2016.


Dr. JAIME SÁNCHEZ VENEGAS
(PRESIDENTE)


Dra. SUSANA GUTIÉRREZ MORENO
(ASESORA)


Blgo. MIGUEL TALLEDO RIVERA
(MIEMBRO)


Blga. NILDA OLIVEROS RODRÍGUEZ
(MIEMBRO)

A mis padres y a mi hermano.

AGRADECIMIENTOS

El camino de la elaboración de la presente tesis habría sido imposible sin la participación de diversas personas, por las cuales tengo un profundo agradecimiento. A ellos quisiera dedicar unas líneas para expresar mi gratitud. En primer lugar, a mi familia, mis padres y hermano, por cuyo apoyo y consejos continuamos esta empresa.

Igualmente, quedo en deuda con mi familia académica, el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana (Lamybim S-23), empezando por los profesores Susana Gutiérrez y Fernando Merino. Su apoyo no se restringió nunca al consejo y al debate académico, sino que debo agradecer su preocupación, actuación concreta e incentivo para producir una investigación profesional, así como la formación científica recibida, por lo cual les considero como padres académicos.

A Diandra, Manuel y Takeshi, mi especial gratitud por entrenarme en los procedimientos básicos y especializados del trabajo de laboratorio, así como por sus correcciones y sugerencias, y no menos, ser germen de un proyecto al cual más de uno debemos nuestra iniciación científica.

A todo el equipo del Lamybim, Gustavo, Jaime, María Gracia, Pamela, Carmen, Elim, Kevin, Christian, Eliza, Rafael, Fabio y Kim, por su colaboración, apoyo y comentarios, en especial a las personas de Jackeline, Vivian e Ingrid, quienes se constituyeron en mi mano derecha y colaboradoras materiales fundamentales en distintas etapas de mi trabajo. De manera especial, también a Roger Palomino, por la colaboración en la identificación molecular. A todos ustedes, les depare Dios la realización profesional y científica para bien del país.

Es preciso agradecer también el apoyo del profesor Miguel Talledo y de Katty Zumaeta, quienes aportaron en sugerencias y en discusión científica respecto al

tratamiento de los bacteriófagos. A ellos y al Laboratorio de Fagotipia, mi especial gratitud por el apoyo brindado.

A la Universidad Privada Antenor Orrego, al LABINM en las personas de Mg. César Díaz, Dr. Fredy Pérez, Kevin Wilkinson, Ph.D. e Ing. Santos N. Miranda López, a cuya colaboración debemos la realización del análisis químico por cromatografía líquida y espectrometría de masas. Por su participación tendemos hoy un vínculo entre nuestras casas de estudio para mayor prestigio de ambas.

Finalmente, debemos hacer mención de que esta tesis fue financiada por el Programa Nacional de Innovación para la competitividad y Productividad (Innovate Perú) en el marco del proyecto contrato N°238-FINCYT-IA-2013 “Producción a escala piloto de un surfactante ramnolípido a partir de una cepa nativa y/o mutagenizada de *Pseudomonas* spp. aislada de ambientes contaminados con petróleo para su uso en biorremediación”. Con estos resultados, esperamos aportar sustantivamente en el desarrollo científico del país.

ABREVIATURAS

AcN	Acetonitrile	Acetonitrilo
ADN	<i>Desoxoribonucleic acid</i>	Ácido desoxorribonucleico
ARN	<i>Ribonucleic acid</i>	Ácido ribonucleico
BEH	<i>Ethylene Bridged Hybrid (Waters®)</i>	Híbrido de puentes de etileno (Waters®)
CID	<i>Collision-induced dissociation</i>	Disociación inducida por colisión
CTAB	<i>Cetyltrimethylammonium bromide</i>	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
ELSD	<i>Evaporative light-scattering detector</i>	Detector evaporativo de dispersión de luz
MB	<i>Methylene blue</i>	Azul de metileno
MIC	<i>Minimum inhibitory concentration</i>	Concentración mínima inhibitoria
MS	<i>Mass spectrometry</i>	Espectrometría de masas
NER	<i>Nucleotide excision repair</i>	Reparación por escisión de nucleótidos
nm	<i>Nanometer (measurement unit)</i>	Nanómetro (unidad de medida)
NTG	<i>Methylnitrosoguanidine</i>	Metilnitrosoguanidina
PRE	<i>Photo-reactivative Enzyme</i>	Enzima fotorreactivadora
Rha	<i>Rhamnose</i>	Ramnosa
RL	<i>Rhamnolipid</i>	Ramnolípido
sp.	<i>Species</i>	Especie
ToF	<i>Time of Flight</i>	Tiempo de vuelo
TSA	<i>Tryptone soy agar</i>	Agar triptona de soya
TSB	<i>Tryptic soy broth</i>	Caldo triptona de soya
UPLC	<i>Ultra Performance Liquid Chromatography</i>	Cromatografía líquida de ultra-alta eficacia
UV	<i>Ultraviolet radiation</i>	Radiación ultravioleta

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
ÍNDICE DE FIGURAS	I
ÍNDICE DE TABLAS	II
RESUMEN	III
ABSTRACT	IV
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	3
1. Ramnolípidos	3
2. Análisis de ramnolípidos	4
3. Mutagénesis por radiación ultravioleta	6
4. Curado de lisógenos de Pseudomonas	7
5. Desarrollo de la producción de ramnolípidos	8
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	11
1. Hipótesis	11
2. Objetivos	11
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	12
1. Identificación de la cepa	12
2. Dosificación de la radiación	13
3. Mutagenización y tamizaje	14
4. Seguimiento de la producción de ramnolípidos	15
5. Caracterización del ramnolípidos	16
6. Eliminación de bacteriófagos.	17
7. Análisis estadístico	18

V.	RESULTADOS	19
1.	Identificación	19
2.	Mutagenización y tamizaje	21
3.	Seguimiento de la producción de ramnolípidos	24
4.	Caracterización del ramnolípidos producido	30
5.	Eliminación de bacteriófagos	33
VI.	DISCUSIÓN	34
VII.	CONCLUSIONES	37
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Estructura química del di-ramnolípido Rha-Rha-C10-C10.	4
Figura 2. Distribución anual de trabajos relacionados a ramnolípidos y <i>Pseudomonas</i> .	9
Figura 3. Posición evolutiva de la cepa 6K-11.	19
Figura 4. Cinética de muerte de la cepa <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K-11.	20
Figura 5. Detalle de patrones de halo de ramnolípidos en agar CTAB/MB.	21
Figura 6. Estimación de producción de ramnolípidos de mutantes derivadas de 6K-11.	22
Figura 7. Estimación de producción de ramnolípidos de mutantes derivadas de 6K-11-1S050.	23
Figura 8. Producción de ramnolípidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K-11-1S050.	25
Figura 9. Producción de ramnolípidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K-11-1S061.	26
Figura 10. Producción de ramnolípidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K-11-1S050-1.	28
Figura 11. Producción de ramnolípidos por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 6K-11-1S050-3.	29
Figura 12. Cromatograma por UPLC de ramnolípido de la cepa 6K-11.	31
Figura 13. Cromatograma por UPLC de ramnolípido de la mutante 6K-11-1S050.	32
Figura 14. Efecto del ciprofloxacino en el crecimiento de <i>P. aeruginosa</i> 6K-11.	33

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Códigos de acceso a las secuencias de referencia empleadas en la identificación molecular de la cepa 6K-11	13
Tabla 2. Condiciones técnicas del ensayo en UPLC	17
Tabla 3. Condiciones técnicas del ensayo en MSqTOF	17
Tabla 4. Resumen de prueba de hipótesis para la producción de ramnolípidos entre la cepa original y la línea mutante 6K-11-1S050.	24
Tabla 5. Resumen de prueba de hipótesis para la producción de ramnolípidos entre la cepa original y la línea mutante 6K-11-1S061.	24
Tabla 6. Resumen de prueba de hipótesis para la producción de ramnolípidos entre la cepa original y la mutante 6K-11-1S050-1.	27
Tabla 7. Resumen de prueba de hipótesis para la producción máxima de ramnolípidos entre la cepa original y la mutante 6K-11-1S050-3	27
Tabla 8. Comparación de especies químicas de ramnolípidos producidas por la cepa original y la mutante 6K-11-1S050	30

RESUMEN

Los ramnolípidos son tensoactivos de origen biológico producidos principalmente por bacterias del género *Pseudomonas*. Sus propiedades químicas son óptimas para su empleo en biorremediación de ambientes contaminados con hidrocarburos y metales pesados, y algunas áreas industriales como la petroquímica. Dada la baja producción de ramnolípidos en forma natural, se requiere mejorar el rendimiento con miras a la producción a gran escala.

Se ha sometido a la cepa ambiental *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 a mutagénesis aleatoria mediante radiación ultravioleta (254 nm), consiguiéndose una producción de ramnolípidos de 32.3 g/l y la alteración en abundancia de las especies químicas producidas. Así mismo, se produjo una reducción de 6 horas del tiempo de máxima producción en un bioproceso por lotes sumergido en un medio mineral suplementado con aceite de maíz como fuente de carbono. La cepa mutante mostró una menor producción de monoramnolípidos de cadenas hidrofóbicas de 10 y de 12 átomos de carbono (Rha-C10-C12, Rha-C12-C10) y un incremento sustancial de los siete dirramnolípidos estudiados y de los monoramnolípidos de hidroxialcanoatos de 8 y 10 carbonos (Rha-C8-C10, Rha-C10-C8, Rha-C10-C10, Rha-C10-C12:1).

De forma paralela, la cepa *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 fue curada de bacteriófagos temperados aplicando un protocolo que conjuga un inductor lítico de naturaleza química, ciprofloxacino, y otro físico, como es la radiación ultravioleta.

Palabras clave: Ramnolípidos, *Pseudomonas aeruginosa*, mutagénesis, mejoramiento de cepas, radiación ultravioleta, UPLC-MS/MS

ABSTRACT

Rhamnolipids are biosurfactants mainly produced by bacteria from the genus *Pseudomonas*. Their chemical properties are optimal for its usage in heavy-metal- and oil-polluted environment bioremediation and some industrial sectors such as the petroleum industry. Due to the low natural yield of rhamnolipids, it is necessary to improve the performance to achieve large-scale production.

The environmental strain of *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 has undergone random mutagenesis by UV irradiation, by means of which a 32.3 g/l maximum rhamnolipid production and an alteration on the abundance of the chemical species of rhamnolipids produced have been achieved, as well as a 6-hour reduction on the time of maximum production in a batch bioprocess with mineral media and corn oil as the carbon source supplemented. The mutant strain produced less mono-rhamnolipids with 10- or 12-carbon hydrophobic chains and show an extensive increase of di-rhamnolipids and 8- and 10-carbon-hydroxialcanoate mono-rhamnolipids.

Likewise, *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 was cured from temperate bacteriophages applying a mixed protocol conjugating a chemical lysis inductor such as ciprofloxacin and a physical one, UV radiation.

Key words: Rhamnolipids, *Pseudomonas aeruginosa*, mutagenesis, strain improvement, UV radiation.

I. INTRODUCCIÓN

Los tensoactivos o surfactantes son ampliamente usados en diversas industrias químicas para la manipulación de hidrocarburos; entre estas aplicaciones, se encuentra la remediación de suelos contaminados por petróleo y metales pesados (Schramm, et al., 2003). Sin embargo, el uso de tensoactivos sintéticos reserva un problema potencial debido a su larga permanencia en el suelo. Se ha reportado que inhibe el desarrollo de algunos microorganismos fijadores de nutrientes, y su producción implica la expulsión de grandes volúmenes de gases invernadero (Rebello, et al., 2014).

Como alternativa, se ha planteado el uso de surfactantes de origen biológico, y dentro de ellos, los ramnolípidos son la clase de biosurfactantes más promisorios. Se ha demostrado su efectividad en la movilización de hidrocarburos, así como de metales pesados (Giraldo, et al., 2014). Su producción puede efectuarse con diversos sustratos orgánicos. No obstante, la baja producción nativa de ramnolípidos por *Pseudomonas* contraviene su empleo en gran escala (Reis, et al., 2013). Actualmente, el precio de venta del ramnolípidos puro (al 90%) es de s/. 1700 por 10 mg (Sigma-Aldrich Co.).

Para salvar estas dificultades, buscamos incrementar el rendimiento mediante la mutación de las cepas superproductoras. Para ello elegimos como agente mutagénico la radiación ultravioleta. Este agente físico no ionizante es una vía más asequible y biológicamente segura frente a agentes químicos de amplio uso, como es el caso de la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, agente químico irritante y carcinogénico además de recalcitrante y de fácil dispersión mediante vapores (Shrivastav, et al., 2010).

En cuanto al modelo empleado, *Pseudomonas aeruginosa* es la especie más apropiada para realizar mejoramiento genético para la producción de ramnolípidos, en

razón de ser el modelo mejor estudiado en cuanto a las rutas metabólicas y genes involucrados (Abdel-Mawgoud, et al., 2011). Por otro lado, el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana (F. CC. BB. – UNMSM) posee catalogadas 743 cepas de *Pseudomonas* sp. nativas aisladas de ambientes contaminados con petróleo, de las cuales 12 son superproductoras de ramnolípidos (Tabuchi Yagui, 2014). La cepa *Pseudomonas* sp. 6K-11 pertenece a este grupo y produce más de 2.6 g/l en un cultivo por lotes en medio mineral con glicerol.

II. MARCO TEÓRICO

1. Ramnolípidos

Los tensoactivos son sustancias químicas de diversa naturaleza química caracterizadas por la propiedad de reducir la tensión superficial en la superficie de contacto de dos fases. De esta propiedad deriva el acrónimo inglés *surfactant* (*surface-active agents*), también calcado a la lengua española como *surfactante*. Para reducir la tensión superficial entre ambas fases, las moléculas tensoactivas deben de ser *anfipáticas*, esto es, poseer grupos químicos en sus extremos que posean baja afinidad por el soluto y alta por el solvente (Rosen & Kunjappu, 2012).

Los biosurfactantes son tensoactivos producidos por diversos tipos de microorganismos. Su producción les permite solubilizar sustrato o favorecer la adherencia a las superficies de su entorno. Se clasifican entre los de bajo y alto peso molecular. Los ramnolípidos (RL) calzan en la primera categoría. Son glicolípidos aniónicos conformados por unidades de L-(+)-ramnosa y ácido β -hidroxialcanoico (**Figura 1**). Fueron caracterizados por primera vez en 1949 (Jarvis & Johnson, 1949). Las unidades de ramnosa se unen entre sí mediante enlace O-glicosídico, y con los ácidos grasos mediante enlace éster. Los ácidos grasos se unen entre sí en la posición β , su longitud es variable (entre 6 y 12 átomos) y suelen ser generalmente saturados. La razón entre la parte hidrofílica y la hidrofóbica, medible a través del índice HLB, le da a los ramnolípidos condiciones ópticas y comprobadas para servir de agentes emulsificantes (Abdel-Mawgoud, et al., 2011).

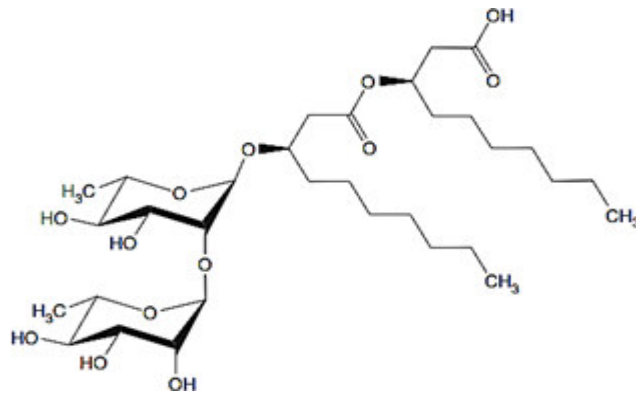


Figura 1. Estructura química del di-ramnolípido Rha-Rha-C10-C10. Se representa al denominado α -L-ramnopiranosil- α -L-ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (Abdel-Mawgoud, et al., 2011)

2. Análisis de ramnolípidos

El método de detección más empleado para el análisis cualitativo de ramnolípido en soluciones es una variante desarrollada por Pinzón y Ju (2009) de la prueba del agar CTAB (Abdel-Mawgoud, et al., 2011), ideada por Siegmund y Wagner (1991). Tabuchi *et al.* (2015) han desarrollado una nueva variante de la prueba que emplea precipitación con ácido clorhídrico para mejorar la visualización directa de las bandas formadas por el acomplejamiento de las moléculas de ramnolípido con los componentes del agar CTAB.

Entre los métodos cuantitativos se cuenta con diversas pruebas colorimétricas como el método del orcinol (Chandrasekaran & BeMiller, 1980) y el del resorcinol (Monsigny, et al., 1988), los cuales no obstante tienen en su contra la necesidad de usar solventes orgánicos contaminantes y ácidos fuertes. La cromatografía líquida de alta presión permite una buena separación de las distintas especies químicas, las cuales se detectan con precisión en un sistema acoplado de espectrometría de masas. (Abdel-Mawgoud, et al., 2011).

Las técnicas de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) no solo son apropiadas para la separación de los RL (Schenk *et al.*, 1995; Arino *et al.*, 1996; Déziel

et al., 1999; Mata-Sandoval *et al.*, 1999; Ábalos, 2010) sino que también pueden ser acopladas con varios dispositivos de detección para su identificación y cuantificación.

Los espectrómetros de masas (MS) y los detectores evaporativos de dispersión de luz (ELSD) son algunos de los equipos de mayor precisión que existen para este fin (Heyd *et al.*, 2008). También se puede utilizar para el análisis un detector de luz ultravioleta acoplado al HPLC (HPLC-UV); sin embargo, los ramnolípidos carecen de grupos cromóforos requeridos para la detección de UV en su estado nativo. Para superar este obstáculo, los RL deben transformarse (derivarse) a ésteres de p-bromofenacilo, que pueden ser detectados a 244 nm. A diferencia del análisis de HPLC-MS, en HPLC-UV y HPLC-ELSD se requieren de una comparación con tiempos de retención de estándares para permitir la identificación de la estructura (Smyth *et al.*, 2014). Por medio de HPLC-ELSD o HPLC-MS, los ramnolípidos pueden ser detectados sin derivación (Helbert y Brown, 1957; Arino *et al.*, 1996).

En general los análisis de LC-MS proporcionan un análisis en profundidad que combina la separación basada en la polaridad de la cromatografía líquida y la avanzada instrumentación de la espectrometría de masas (Smyth *et al.*, 2014). El MS es el detector más preciso en cromatografía porque es capaz de detectar bajas concentraciones de analito, suministrando información tanto cualitativa como cuantitativa sobre los compuestos que eluyen de una columna (fase estacionaria), y puede distinguir diferentes sustancias que tienen el mismo tiempo de retención. Actualmente la MS se utiliza para estudiar la secuencia de aminoácidos en proteínas, de ácidos nucleicos en ADN y las estructuras complejas de los hidratos de carbono (Arias, 2008), como los ramnolípidos (Ábalos, 2010).

3. Mutagénesis por radiación ultravioleta

La mutagénesis es la generación de modificaciones estables en el material genético. Estas mutaciones pueden ser aleatorias, cuando no se puede determinar los puntos exactos donde se producirán las mutaciones, o dirigidas cuando se conoce la secuencia blanco. La naturaleza de una mutagénesis depende del tipo de mutágeno empleado, el cual puede ser un agente físico o químico que induce la mutación. (Singleton, 2010)

La radiación ultravioleta (UV) es un tipo de radiación electromagnética que emite energía radiante a frecuencias menores que la de la luz visible. Según Setlow (1966), determinados rangos de luz UV provocan la dimerización de las pirimidinas, conformando principalmente por anillos tipo ciclobutano entre ellos, y dímeros de citosina y de timina-citosina en menor proporción. Su permanencia en el ADN puede resultar letal en cuanto que produce cambios en el metabolismo. Distorsionan la conformación del ADN e inhiben la replicación normal. (Klug, et al., 2006)

Todos los modelos biológicos conocidos presentan mecanismos de reparación de los dímeros de timina. La presencia de los dímeros gatilla la expresión de diversos sistemas de reparación, de los cuales tres actúan universalmente para reparar el daño de los dímeros: la reparación por recombinación homóloga, la reparación por escisión de nucleótidos (NER) y el sistema SOS. Un cuarto sistema, el de fotorreactivación, depende de la presencia de luz azul para accionar la enzima fotorreactivadora (PRE), no obstante, la delección de la proteína no resulta letal (Klug, et al., 2006).

La reparación por escisión de nucleótidos es de lejos el principal mecanismo de reparación de daños causados por dímeros de timina en procariontes (Nelson & Cox, 2006). En *Escherichia coli* la NER mediante el sistema *uvrABC* produce casi la totalidad de eventos de reparación del ADN. (Lewin, 2008). El segundo mecanismo de reparación en importancia, el sistema SOS, cobra relevancia en los eventos

mutagénicos, no solo por radiación UV sino ante una variedad de mutágenos. En estos casos, la expresión del gen *recA* gatilla en primera instancia la NER, y de continuar decreciendo la concentración del represor del gen *lexA*, induce a la reparación propensa a errores, mediante la expresión de polimerasas de baja fidelidad (Lewin, 2008).

La expresión del gen *recA* puede asimismo activar bacteriófagos; no obstante, no debe considerarse una constante para el caso de *Pseudomonas* (Kidambi, et al., 1996). Igualmente, se han hallado genes extracromosomales (v.g. plásmidos) que incrementan la resistencia a radiación ultravioleta UV-B, cuya frecuencia se ve aumentada en entornos de mayor radiación solar (Kokjohn y Miller, 1994; Fernández, et al., 2006).

4. Curado de lisógenos de *Pseudomonas*

Los bacteriófagos son virus que infectan células bacterianas, y representan una gran parte de la diversidad biológica del planeta (Salmond & Fineran, 2015). Diversos bacteriófagos infectan especies del género *Pseudomonas* con distintos rangos de hospederos. La diversidad reportada de bacteriófagos de *Pseudomonas* alcanza al 10% de virus bacterianos analizados por microscopía electrónica y representada por virus de ADN y ARN tanto de cadena simple como doble; aunque el orden *Caudovirales*, virus de ADN de cadena doble con cola, representan más del 96% de bacteriófagos conocidos de *Pseudomonas* (Ceysens & Lavigne, 2010).

Los virus bacterianos alteran a profundidad el metabolismo celular durante la infección. En *Pseudomonas*, provocan algunos cambios comunes de diversos órdenes virales, como el incremento del metabolismo de las pirimidinas y los azúcares nucleicos, y otros específicos de cepa o de la etapa de la infección (De Smet, et al., 2016).

5. Desarrollo de la producción de ramnolípidos

Los tensoactivos sintéticos han sido ampliamente usados en diversas industrias químicas para la manipulación de hidrocarburos; entre estas aplicaciones, se encuentra la remediación de suelos contaminados por petróleo y metales pesados (Schramm, et al., 2003). Debido los problemas ambientales asociados a su producción, tales como su larga permanencia en el suelo y a la inhibición del desarrollo de algunos microorganismos fijadores de nutrientes (Rebello, et al., 2014), los biosurfactantes han surgido como alternativas a su uso, y los ramnolípidos conforman el principal tipo de biosurfactantes emergentes (Reis, et al., 2013).

El interés creciente en el desarrollo de la producción de ramnolípidos, se ha evidenciado en el incremento de la literatura relacionada al tema (**Figura 2**), abarcando aspectos tan diversos como la optimización de medios y condiciones de cultivo, así como el desarrollo de las cepas productoras. (Dobler, et al., 2016) Elevar la baja producción nativa de ramnolípidos por *Pseudomonas* es uno de los principales requisitos para iniciar su empleo en gran escala (Reis, et al., 2013).

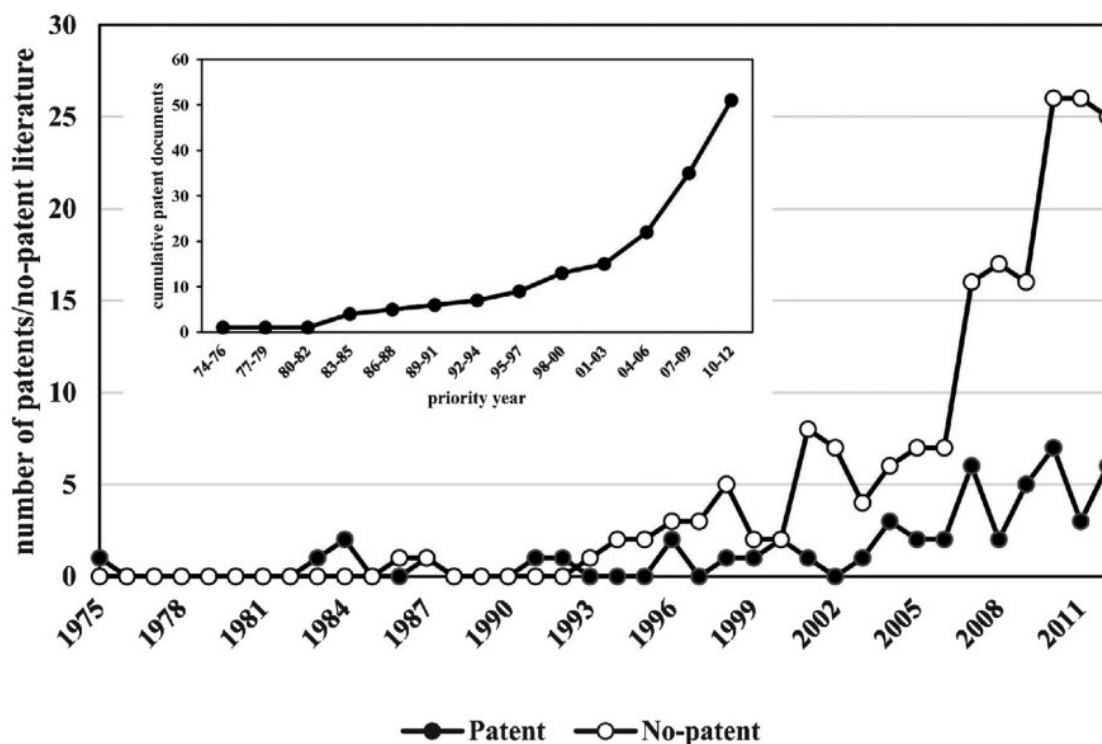


Figura 2. Distribución anual de trabajos relacionados a ramnolípidos y *Pseudomonas*. En conjunto y disgregado por trabajos con patentes y sin patentes entre los años 1975 y 2012 (Dobler, et al., 2016)

En 1997, Wild *et al.* aplicaron mutagénesis aleatoria inducida por el transposón *Tn501* para buscar un incremento de la producción de ramnolípidos, consiguiendo una cepa mutante que producía exclusivamente dirramnolípidos.

En 2004, Tahzibi *et al.* incrementaron la producción de ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* empleando el mutágeno químico NTG, incrementando la concentración del biosurfactante de 1.2 g/l a 12.5 g/l. Posteriormente, Zhu *et al.* (2007) produjeron una mutante de *Pseudomonas aeruginosa* que elevó su producción mediante mutagénesis por radiación UV, desde 12.47 g/l hasta 24.61 g/l en la mutante.

Otras alteraciones metabólicas en *Pseudomonas* se siguen realizando en la actualidad con fines industriales, v.g. Joshi *et al.* (2013) redujeron en un 25% el tiempo de degradación de un tinte azo sulfonado recalcitrante por la técnica de irradiación con luz UV. En cuanto a las cepas nativas de *Pseudomonas aeruginosa* en el Perú, Giraldo *et*

al. (2014) hallaron una producción de 2.47 g/l de ramnolípido en la cepa *Pseudomonas aeruginosa* PB25 en un medio mineral con glicerol.

En razón de estas experiencias, determinamos que la mutagénesis aleatoria por radiación ultravioleta es un procedimiento que permitiría elevar la producción natural de ramnolípidos por parte de *Pseudomonas* sp. 6K-11, coadyuvada tanto por la técnica de Siegmund y Wagner (1991) como método de tamizaje, así como por el ciprofloxacino para curación de la cepa.

III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

1. Hipótesis

La producción de ramnolípidos de *Pseudomonas* sp. 6K-11 se incrementará mediante mutagénesis aleatoria inducida por radiación ultravioleta.

2. Objetivos

a. Objetivo general

Generar cepas mutantes de *Pseudomonas* sp. 6K-11 hiperproductoras de ramnolípidos.

b. Objetivos específicos

1. Obtener la dosis mutagénica de radiación ultravioleta para la cepa nativa productora de ramnolípidos *Pseudomonas* sp. 6K-11.
2. Producir mutantes estables de *Pseudomonas* sp. 6K-11.
3. Evaluar la producción de ramnolípidos de las cepas mutagenizadas.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Identificación de la cepa

Se empleó como muestra de origen la cepa ambiental del género *Pseudomonas* conservada en el Laboratorio de Microbiología y Biotecnología Microbiana de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos con el código 6K-11, la cual fue seleccionada como superproductora de ramnolípidos (Tabuchi Yagui, 2014). La cepa fue sembrada en sucesiones de caldo tripticasa soya (TSB: triptona de caseína 17 g/l, peptona de soya 2.5 g/l, K_2HPO_4 2.5 g/l, glucosa 2.5 g/l) y agar cetrimida (peptona de gelatina 20 g/l, MgCl 1.4 g/l, K_2SO_4 10g/l, agar 13.6 g/l, cetrimida 0.3 g/l, glicerina 10 g/l) e incubada a 35 °C por periodos de 24 horas para verificar la estabilidad de la misma. *Pseudomonas* sp. 6K-11 fue sometida a identificación bioquímica mediante el sistema API® 20 NE e identificación molecular usando como marcador el gen ARNr 16S.

Para realizar la identificación molecular, se extrajo el ADN cromosómico mediante el equipo de purificación *GeneJET*® (Thermo Scientific®) siguiendo las instrucciones del proveedor. Las muestras de ADN fueron enviadas al laboratorio de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas-UNAM para su procesamiento y posterior secuenciación. A partir de los cromatogramas obtenidos del secuenciamiento, se generaron archivos FASTA de las secuencias nucleotídicas obtenidas, las cuales fueron ensambladas mediante el programa CAP3 (Huang & Madan, 1999). El cóntigo obtenido fue alineado junto a 13 secuencias nucleotídicas registradas en la base de datos GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide>) obtenidas de cepas de referencia (**Tabla 1**) mediante el programa MUSCLE (Edgar, 2004). Posteriormente, se realizaron análisis evolutivos en el paquete de aplicaciones MEGA6. Las distancias evolutivas fueron calculadas usando el método de Jukes-Cantor (1969), y la variación entre los sitios fue modelada con una distribución gama.

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).

Tabla 1. Códigos de acceso a las secuencias de referencia empleadas en la identificación molecular de la cepa 6K-11

Código de acceso	Especie	Cepa
NC_002516	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PAO1
AY835998	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	isolate M4-7
NR_074597	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>Tomato</i>	DC3000
NZ_CP011117	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	LBUM223
NC_006350	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	K96243
CP007746	<i>Burkholderia cepacia</i>	ATCC 25416
AL954747	<i>Nitrosomonas europaea</i>	ATCC 19718
NR_102794	<i>Enterobacter cloacae</i>	ATCC 13047
CP009072	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
FO834906	<i>Klebsiella pneumoniae</i> str.	Kp52.145

2. Dosificación de la radiación

Se realizó una cinética de muerte frente a la exposición a la radiación ultravioleta para determinar la dosis de radiación que genera una tasa de supervivencia menor al 1%. Para ello, la cepa fue reactivada en 5 ml de TSB, luego se sembró en agar tripticasa soya (TSA: triptona de caseína 17 g/l, peptona de soya 2.5 g/l, K₂HPO₄ 2.5 g/l, glucosa 2.5 g/l, agar 15 g/l) y agar cetrimida para confirmar pureza. Posteriormente se reinoculó en 50 ml de caldo TSB en agitación constante (150 rpm) a 35 °C durante 8 horas hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, con una densidad aproximada de 1-2 x 10⁸ células/ml.

Se realizaron las diluciones necesarias del inóculo lavado en tampón fosfato salino (PBS: NaCl 8.0 g/l, KCl 0.2 g/l, Na₂HPO₄ 1.42 g/l, KH₂PO₄ 0.24 g/l) para alcanzar una absorbancia entre 0.08 y 0.10 a una longitud de onda de 625 nm (equivalente a un patrón 0.5 de la escala de McFarland). Con esta dilución se efectuó el conteo en

placas conteniendo el medio estándar *Plate Count Agar* (PCA: peptona 5 g/l, extracto de levadura 2.5 g/l, glucosa 1 g/l, agar 15 g/l).

Se tomaron diluciones hasta dos órdenes mayores de cada una de las usadas en la experiencia descrita para su sembrado en medio PCA e irradiación con luz ultravioleta en intervalos de 30, 45, 60 y 90 segundos. Tras la irradiación, fueron dejados en oscuridad e incubados a 35°C por dos días. Al término, se realizó el conteo respectivo, para elaborar la curva de cinética de muerte.

3. Mutagenización y tamizaje

Al detectarse la presencia de una diversidad de bacteriófagos en la cepa de origen, se realizaron tres repiques continuos en medio TSA con pasajes intermedios a caldo TSB procurando seleccionar las colonias sin placas líticas. De forma paralela, se evaluó la inducción de la fase lítica por parte de una fluoroquinolona (ciprofloxacino) en nuestra cepa: Se evaluó la concentración mínima inhibitoria (MIC) de dicho compuesto mediante epsilometría sobre medio sólido de Müller-Hinton (extracto de carne 2 g/l, caseína hidrolizada 17.5 g/l, almidón 1.5 g/l, agar 17 g/l).

A continuación, las colonias sin evidencia de lisis del último sembrado fueron inoculadas en tubos independientes de 4 ml de caldo TSB. Acto seguido, fueron escalados a frascos de 24 ml de TSB con ciprofloxacino a una concentración final de MIC50, efectuándose muestreos regulares durante siete horas para medir la concentración celular, basados en una modificación del protocolo de Raya y Hébert (2009) para lactobacilos.

Corroborada la acción inductora del ciprofloxacino, se realizaron cuatro repiques sucesivos de la cepa 6K-11 en medio sólido TSA suplementado con una MIC50 de ciprofloxacino. Tres colonias sin evidencia de lisis fueron aisladas y reservadas en cepario.

La cepa originaria fue sometida a la dosis de radiación ultravioleta obtenida en los ensayos previos. Las colonias obtenidas tras la incubación fueron aisladas en medio TSA por una semana, tras lo cual fueron caracterizadas según su aspecto cultural. Los aislados que no mostraron calvas fueron luego cultivadas en medio de Siegmund-Wagner (Siegmund & Wagner, 1991) para obtener una medición semicuantitativa de la producción de ramnolípidos (Tabuchi, et al., 2015). En este último soporte, se comparó de forma relativa la producción de ramnolípidos con la cepa nativa de origen, reservando las que expresaron mayor radio del halo.

La línea derivada fue sometida a una segunda ronda de radiación ultravioleta en las mismas condiciones de la primera mutagenización. Las nuevas colonias obtenidas fueron similarmente aisladas y pasadas por tamizaje (*screening*) según la adaptación de Tabuchi y colaboradores del método de Siegmund-Wagner (1991).

4. Seguimiento de la producción de ramnolípidos

Se ejecutó la cinética de crecimiento de las cepas escogidas y de la cepa original en 250 ml de medio mineral de Siegmund-Wagner (1991) suplementado con un 3% de glicerol a temperatura y agitación constantes (35 °C, 140 rpm) durante 216 h. Para monitorear la cinética, tomaron muestras de 1 ml en intervalos de seis horas, con las cuales se midió la biomasa total y la concentración de ramnolípidos. En cada alícuota se decantaron las células presentes por centrifugación a 14 500 rpm por 10 minutos, reservando el sobrenadante para la cuantificación de los ramnolípidos. La biomasa se determinó midiendo la concentración celular por espectrometría en un equipo espectrofotométrico UNICO 2000 UV-Visible, resuspendiendo en solución salina el sedimento bacteriano de cada muestra. La concentración de ramnolípidos del sobrenadante reservado se realizó por precipitación ácida y colorimetría con resorcinol (Monsigny, et al., 1988).

Se produjeron inóculos de las cepas elegidas y la cepa original a partir de los ceparios. Para ello, se sembraron tres respectivos tubos de 5 ml de caldo TSB por 7 horas, tras las cuales fueron vertidos en matraces de 45 ml del mismo medio. Se efectuó el lavado las células en PBS; los sedimentos fueron sembrados en 250 ml de cultivo de medio mineral de Siegmund-Wagner modificado (0.07 g/l KH₂PO₄, 1.3 g/l Na₂HPO₄ 4.9 G/L NaNO₃, 0.93 g/l MgSO₄.H₂O, 50 mg/l CaCl₂.2H₂O, 3 mg/l FeSO₄, 3.04 ml/l H₃PO₄, 2 ml/l solución de elementos traza (Abalos, et al., 2002): 0.26 g/l H₃B₃O₃, 0.5 g/l CuSO₄.5H₂O, 0.5 g/l MnSO₄.7H₂O, 0.6 g/l MoNa₂O₄.2H₂O, 0.7 g/l ZnSO₄.7H₂O), suplementado en un 7% con aceite de maíz. En el inóculo, se midió la biomasa total y la concentración de ramnolípido.

5. Caracterización del ramnolípido

A partir del producto final de la cinética en glicerol, se extrajo el ramnolípido producido por la cepa original y una cepa mutante mediante precipitación ácida y extracción por solventes apolares adaptado de Giraldo *et al.* (2014). El referido método se inicia acidificando cada muestra hasta alcanzar un pH = 1.8 empleando ácido clorhídrico (HCl) concentrado. La muestra se deja precipitando toda la noche y al día siguiente se agrega la mezcla de cloroformo y etanol (2:1) en un volumen del doble de la muestra acidificada. La nueva mezcla se agita durante 30 minutos y es centrifugada a 5000 rpm durante 1 hora. La fase orgánica es luego retirada y evaporada en baño maría, al final de lo cual se obtiene el ramnolípido como una sustancia viscosa de color ámbar en el fondo del recipiente.

El ramnolípido obtenido fue resuspendido en metanol y analizado mediante cromatografía líquida de ultra-alta eficacia acoplada a espectrometría de masas (UPLC-MSqTof) bajo los parámetros detallados en las tablas respectivas (**Tabla 2**, **Tabla 2.** Condiciones técnicas del ensayo en UPLC

Fase estacionaria (columna)	Acquity UPLC BEH C18 1.7µm 2.1x50 mm
Fase móvil A	0.1% Ácido Fórmico + 0.05 NH ₄ OH
Fase móvil B	AcN (Acetonitrilo)
Temperatura de columna	40 °C

Tabla 3) para determinar cualitativamente las diferencias en la concentración del ramnolípido según catorce especies químicas de ramnolípido.

Tabla 2. Condiciones técnicas del ensayo en UPLC

Fase estacionaria (columna)	Acquity UPLC BEH C18 1.7 μ m 2.1x50 mm
Fase móvil A	0.1% Ácido Fórmico + 0.05 NH ₄ OH
Fase móvil B	AcN (Acetonitrilo)
Temperatura de columna	40 °C

Tabla 3. Condiciones técnicas del ensayo en MSqTOF

Modo de ionización	Negativo
Temperatura de Fuente	120 °C
Temperatura de desolvatación	300 °C
Flujo de gas de desolvatación	800 L/h
Flujo de cono de gas de desolvatación	50 L/h
Tensión capilar	2.0000 kV
Tensión del cono	30.0000 V
Disociación inducida por colisión (CID)	Sí
Energía de ion	1.0
Energía de colisión	6.0
Rango de masas de m/Z	100-700
Dilución de muestras	0.1 mg/ml de metanol
Velocidad de flujo	0.2 ml/min.

6. Eliminación de bacteriófagos.

A partir de los trabajos de Raya y Hébert (2009), que emplea un inductor químico, y de Gheorgiou *et al.* (1981), quienes emplean radiación ultravioleta, se elaboró un protocolo mixto para obtener cepas curadas. Dos cepas escogidas por su incremento en la producción de ramnolípido fueron reactivadas en 5 ml de caldo TSB en agitación constante de 150 rpm y 35 °C de temperatura hasta alcanzar la fase logarítmica de crecimiento, con una densidad aproximada de $1-2 \times 10^8$ células/ml. Dicho cultivo fue lavado en buffer fosfato salino (PBS) para alcanzar una absorbancia de entre 0.08 y 0.10 a una longitud de onda de 625 nm, equivalente a un patrón 0.5 de la escala de McFarland. Se tomó 0.1 ml de dicha suspensión y sembró por extensión en agar TSA suplementado con ciprofloxacino a una concentración MIC90. Inmediatamente, se sometió la placa sembrada durante 5 segundos a luz ultravioleta B ($\lambda = 254$ nm) de una fuente con una potencia de 9V y a una distancia de 30 cm.

Manteniendo las condiciones de oscuridad, se envolvieron las placas irradiadas en papel aluminio, y fueron incubadas a 35° C por 24 h, después de lo cual se hizo la caracterización cultural de las colonias resultantes. Luego, se separaron sendas colonias lisas sin placas de lisis observables, las cuales fueron trasladadas a ceparios cada cual por triplicado y almacenado por 45 días a una temperatura de 4 °C. Las mismas fueron finalmente repicadas en sucesiones de caldo y agar tripticasa soya tres veces, sometiendo la última placa a radiación UV bajo las mismas condiciones como forma de diagnosticar la persistencia de colonias lisogénicas.

7. Análisis estadístico

Se evaluaron los parámetros medidos en la cinética de crecimiento mediante el paquete estadístico IBM SPSS 22.0 (IBM Corp. Released 2013. IBM SPSS Statistics for Windows, versión 22.0. Armonk, NY: IBM Corp.).

V. RESULTADOS

1. Identificación

La cepa de *Pseudomonas* sp. 6K-11 fue identificada mediante el sistema API 20 NE como *Pseudomonas aeruginosa*, con una probabilidad del 73.8% de pertenecer a dicha especie. Por otro lado, la cepa mantiene identidad con la cepa patrón PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*. Cuando se usa como marcador el gen ARN 16S, las cepas PAO1 y 6K-11 forman un clado anidado en otro conformado además por *Pseudomonas resinovorans* y *Pseudomonas alcaligenes* (**Figura 3**. Posición evolutiva de la cepa 6K-11.**Figura 3**). Ambos grupos cuentan con el máximo soporte de *bootstrap*.

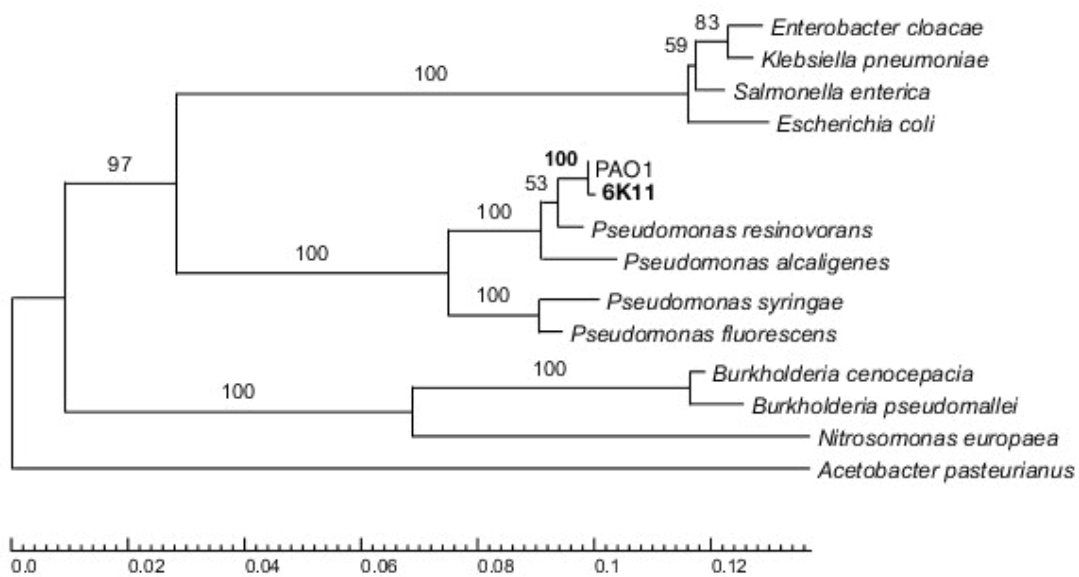


Figura 3. Posición evolutiva de la cepa 6K-11.

Se muestra el mejor árbol con una suma de 0.59865383 de longitud de ramas. El árbol está dibujado a escala, con longitudes de ramas en las mismas unidades que las de las distancias evolutivas usadas para inferir el árbol filogenético.

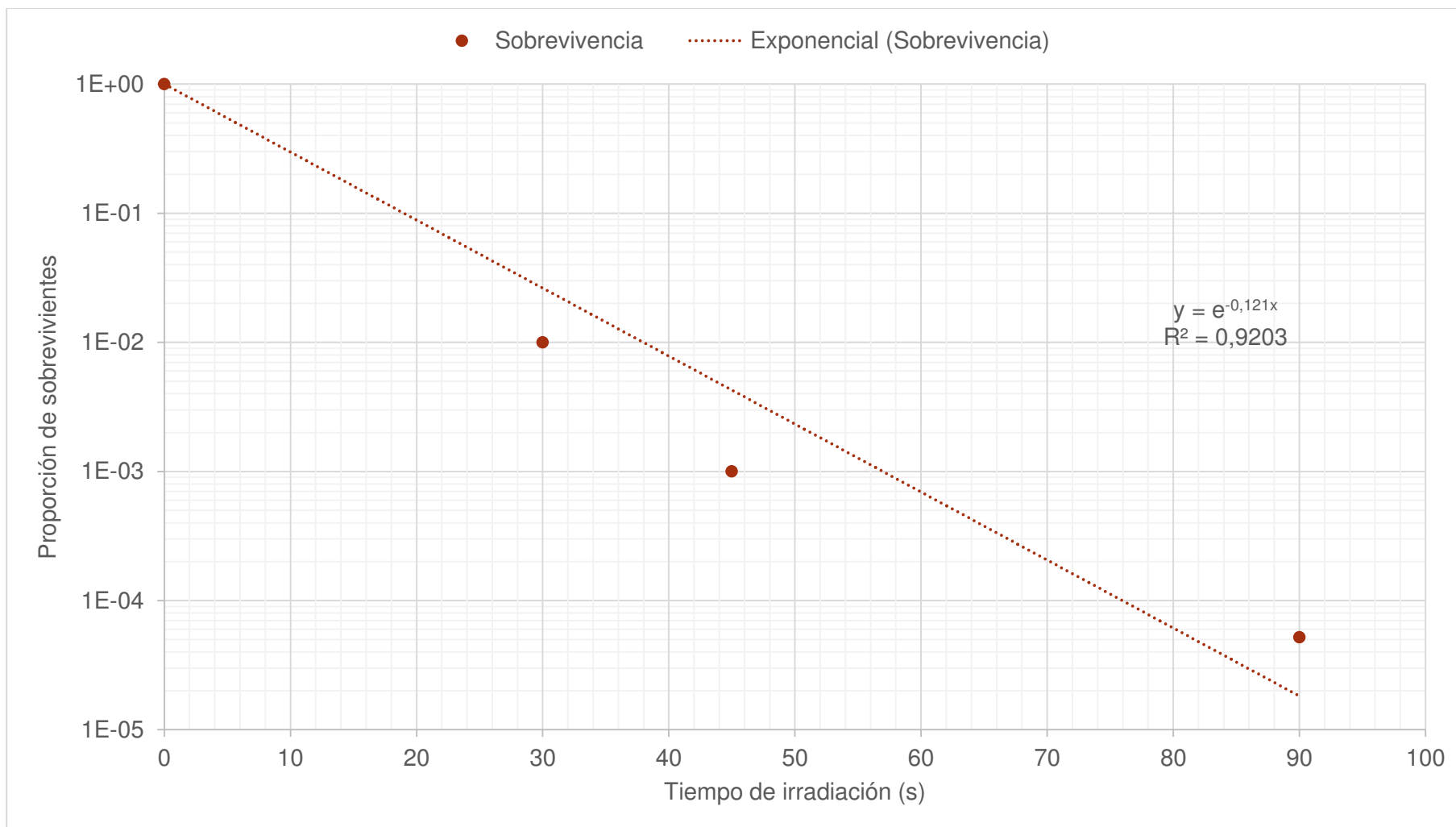


Figura 4. Cinética de muerte de la cepa *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11.

2. Mutagenización y tamizaje

Se obtuvo una curva de cinética de muerte para irradiación ultravioleta sin fotorrecuperación (**Figura 4**) descrita por la ecuación exponencial $y = e^{-0.121t}$; donde t representa el tiempo de irradiación medido en segundos, e y expresa la concentración de células sobrevivientes en unidades formadoras de colonia por mililitro (UFC/ml). Dicho modelo posee un valor $R^2 = 0.9203$. Mediante este ensayo se encontró que se obtenía un descenso de 99% de la población irradiando durante 38 segundos, y esta se tomó como dosis mutagénica.

Tras la irradiación, se obtuvieron 15 colonias sin evidencia de fagos, las cuales fueron monitoreadas en cuanto a su producción de ramnolípidos. De las colonias obtenidas, algunas destacaron por mostrar distintos patrones de halos en la placa del tamizaje, entre ellas 6K-11-1S050 (**Figura 5**) y 6K-11-1S034. Las colonias 6K-11-1S034, 6K-11-1S050 y 6K-11-1S007 mostraron mayor incremento en el área de halos en el agar CTAB/MB (**Figura 6**).

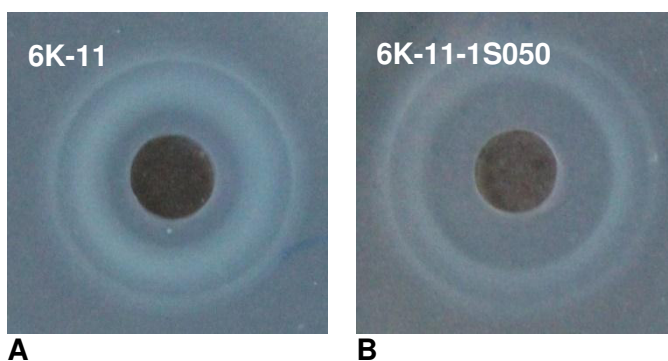


Figura 5. Detalle de patrones de halo de ramnolípidos en agar CTAB/MB. **A:** Cepa original 6K-11. **B:** Cepa mutante 6K-11-1S050.

La cepa 6K-11-1S050 produjo 12 nuevas cepas mutantes, de entre las cuales obtuvieron los mayores promedios en la prueba de Siegmund-Wagner modificada, en orden descendente: 6K-11-1S050-3, 6K-11-1S050-4, 6K-11-1S050-A, 6K-11-1S050-2, 6K-11-1S050-F, 6K-11-1S050-G, 6K-11-1S050-D y 6K-11-1S050-1 (**Figura 7**).

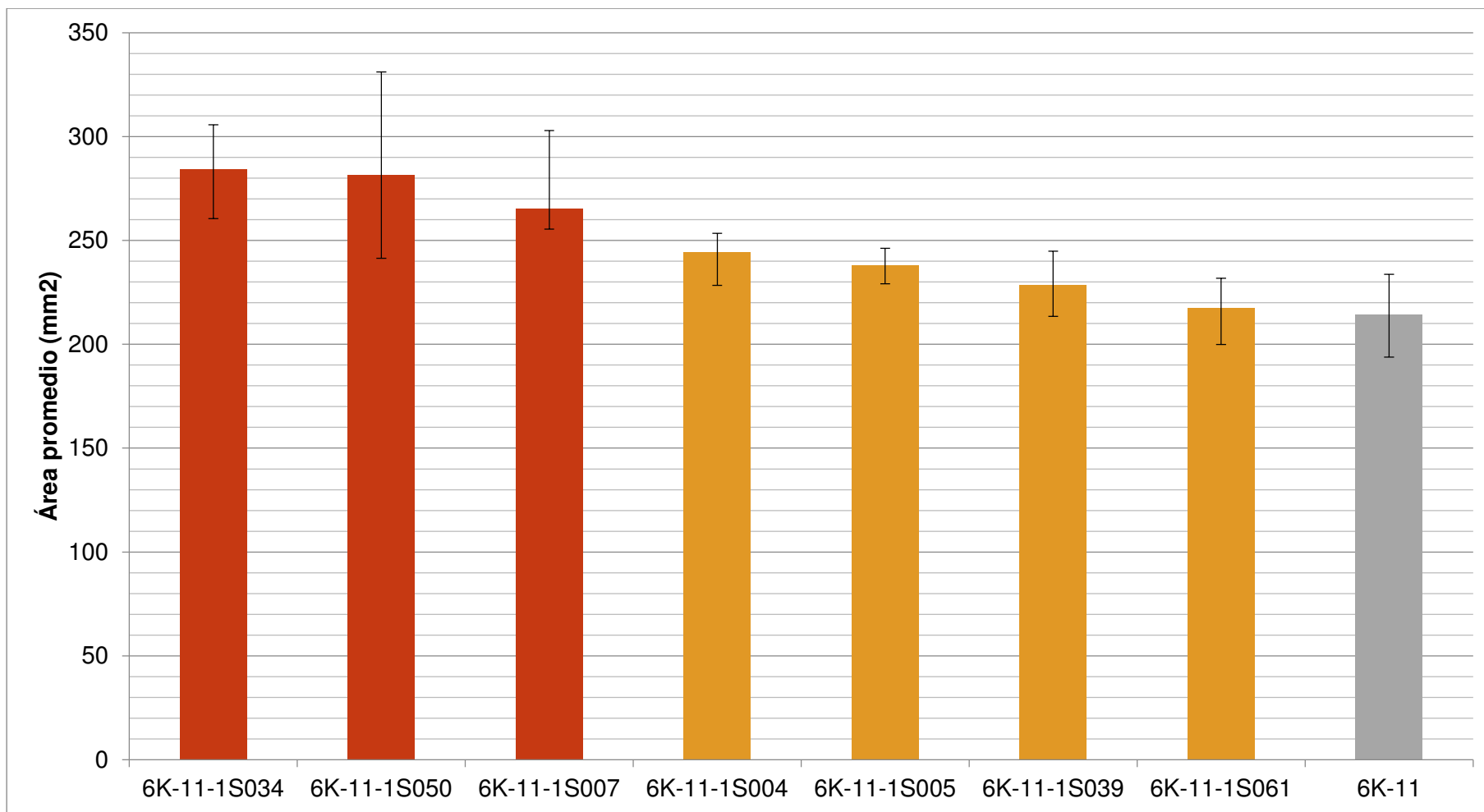


Figura 6. Estimación de producción de ramnolípidos de mutantes derivadas de 6K-11. Detección por el método de Siegmund-Wagner optimizado por Tabuchi y colaboradores (2015), los datos expresan el área de los halos formados en el agar CTAB/MB.

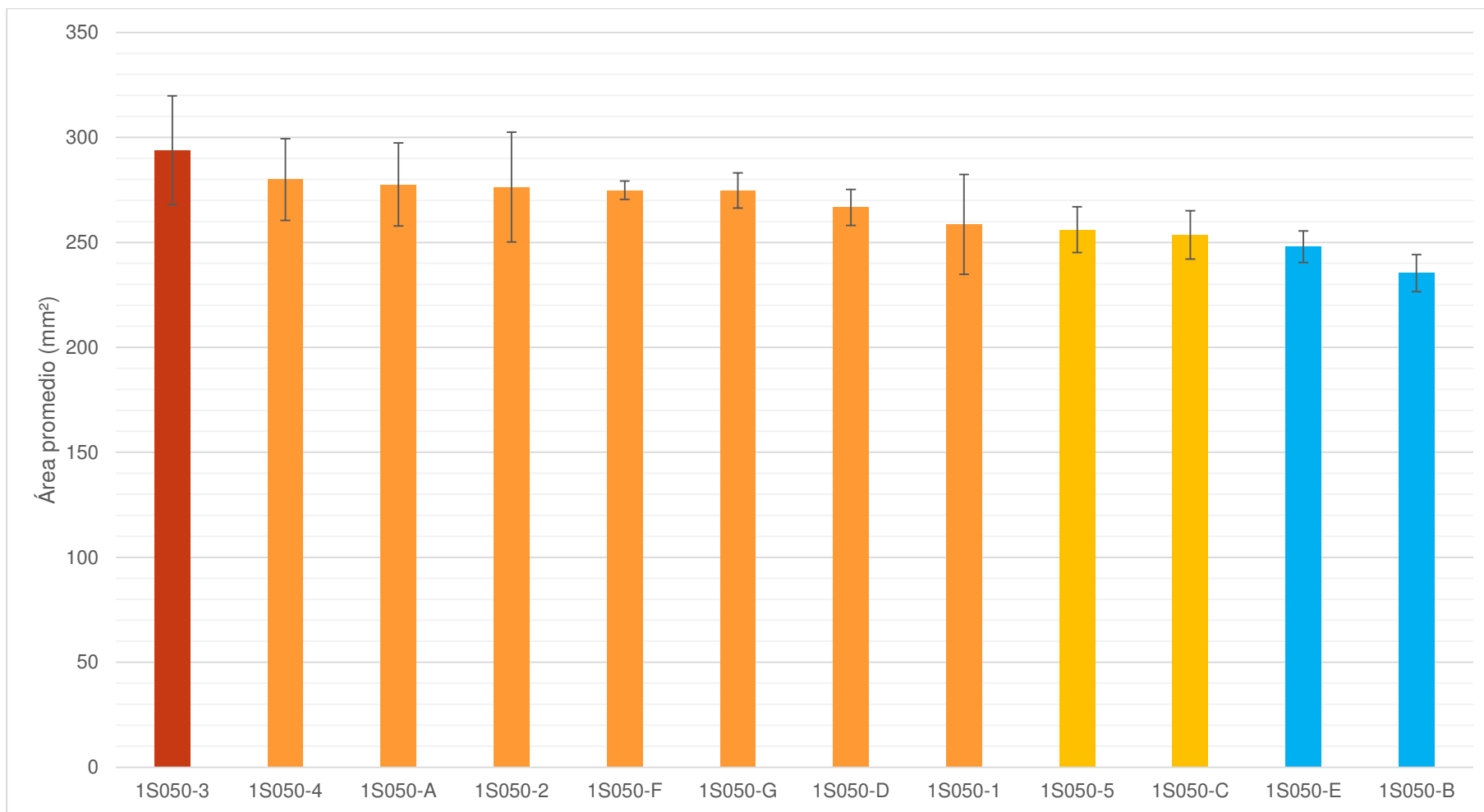


Figura 7. Estimación de producción de ramnolípidos de mutantes derivadas de 6K-11-1S050. Detección por el método de Siegmund-Wagner optimizado por Tabuchi y colaboradores (2015), los datos expresan el área de los halos formados en el agar CTAB/MB.

3. Seguimiento de la producción de ramnolípidos

Tanto la cepa original 6K-11 como la cepa mutante 6K-11-1S050 obtuvieron una producción máxima promedio de 12.5 g/l de ramnolípido a las 168 horas de fermentación en el medio se Siegmund-Wagner, una concentración sin diferencia estadística significativa que la cepa original en el mismo tiempo (**Tabla 4, Figura 8**).

Tabla 4. Resumen de prueba de hipótesis para la producción de ramnolípidos entre la cepa original y la línea mutante 6K-11-1S050.

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de Rhl son las mismas entre las categorías de Grupo.	Prueba de medianas de muestras independientes	1,000 ²	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de Rhl es la misma entre las categorías de Grupo.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	1,000 ¹	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Se muestra la significancia exacta para esta prueba.

²Sig. exacta de Fisher

Bajo las mismas condiciones, la cepa 6K-11-1S061 produjo 13.7 g/l, un promedio algo mayor, no obstante, sin diferencias significativas con la mutante en cuanto al ramnolípido producido a las 168 h (**Tabla 5, Figura 9**).

Tabla 5. Resumen de prueba de hipótesis para la producción de ramnolípidos entre la cepa original y la línea mutante 6K-11-1S061.

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de Ramnolípido son las mismas entre las categorías de Cepa.	Prueba de medianas de muestras independientes	1,000 ²	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de Ramnolípido es la misma entre las categorías de Cepa.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,700 ¹	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Se muestra la significancia exacta para esta prueba.

²Sig. exacta de Fisher

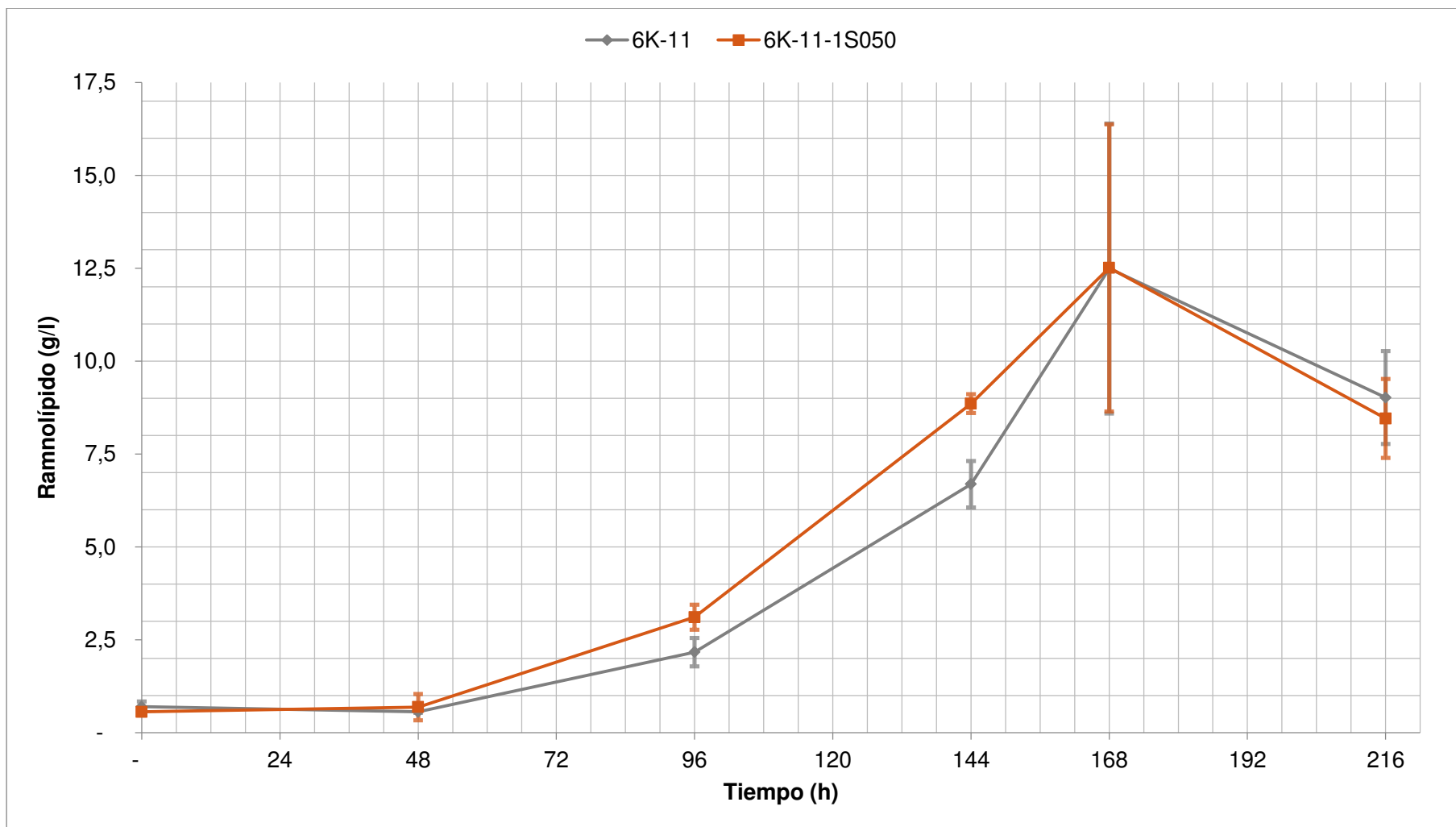


Figura 8. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11-1S050. Comparada con la cepa original 6K-11 en medio de Siegmund y Wagner con glicerol como fuente de carbono.

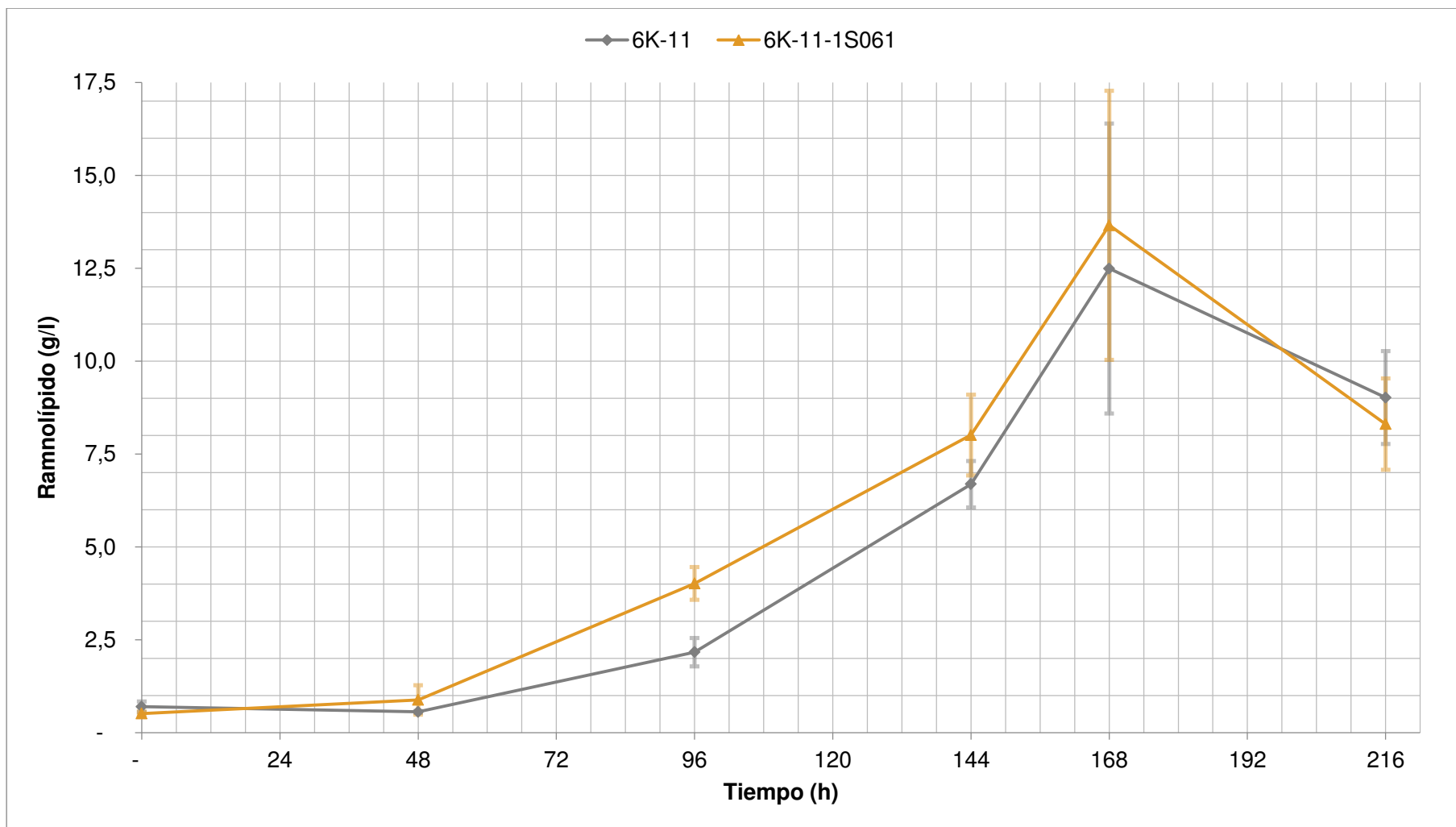


Figura 9. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11-1S061. Coparada con la cepa original 6K-11 en medio de Siegmund y Wagner con glicerol como fuente de carbono.

En medio mineral, con aceite de maíz como fuente de carbono, la cepa original 6K-11 y la mutante 6K-11-1S050-1 mostraron su producción máxima a las 96 horas de fermentación (**Figura 10**). 6K-11-1S050-1 obtuvo una producción máxima promedio de 27.7 g/l, mientras que la cepa original obtuvo 21.6 g/l para el mismo valor. Dichos promedios no son estadísticamente distintos de acuerdo con la prueba de Wilcoxon (**Tabla 6**).

Tabla 6. Resumen de prueba de hipótesis para la producción de ramnolípidos entre la cepa original y la mutante 6K-11-1S050-1.

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de Ramnolípidos son las mismas entre las categorías de Cepa.	Prueba de medianas de muestras independientes	1,000 ²	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de Ramnolípidos es la misma entre las categorías de Cepa.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,400 ¹	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Se muestra la significancia exacta para esta prueba.

²Sig. exacta de Fisher

Finalmente, también en medio mineral con aceite de maíz, se observó que la cepa mutante 6K-11-1S050-3 una producción media máxima de 32.3 g/l a las 90 horas (**Figura 11**), seis horas antes de la máximo producción media de la cepa original. Nuevamente, la prueba de Wilcoxon no permite asegurar una diferencia cuantitativa en la cantidad de ramnolípidos producido (**Tabla 7**)

Tabla 7. Resumen de prueba de hipótesis para la producción máxima de ramnolípidos entre la cepa original y la mutante 6K-11-1S050-3

	Hipótesis nula	Test	Sig.	Decisión
1	Las medianas de Ramnolípidos son las mismas entre las categorías de Cepa.	Prueba de medianas de muestras independientes	1,000 ²	Retener la hipótesis nula.
2	La distribución de Ramnolípidos es la misma entre las categorías de Cepa.	Prueba U de Mann-Whitney de muestras independientes	,200 ¹	Retener la hipótesis nula.

Se muestran las significancias asintóticas. El nivel de significancia es ,05.

¹Se muestra la significancia exacta para esta prueba.

²Sig. exacta de Fisher

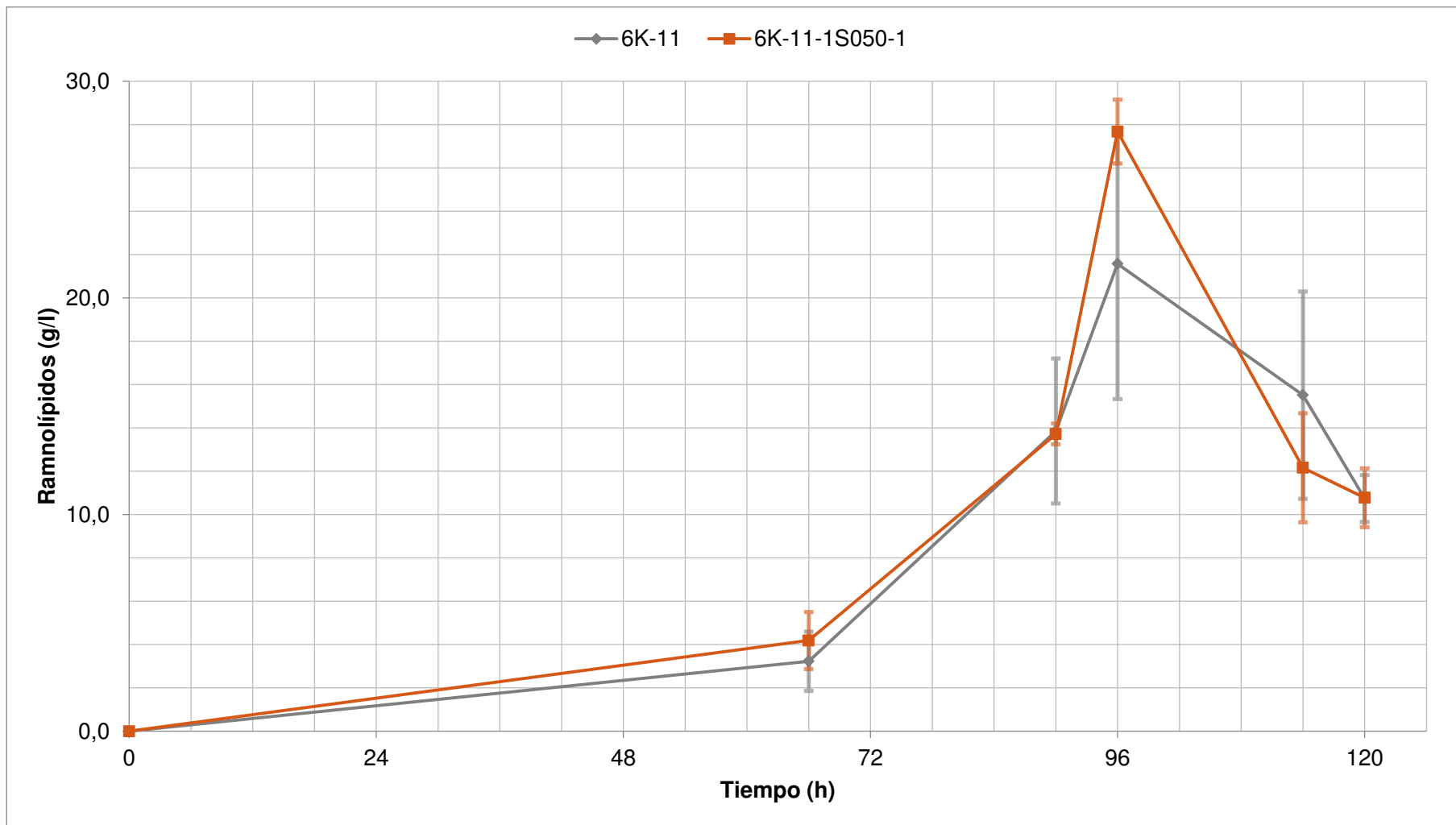


Figura 10. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11-1S050-1. Comparada con la cepa original 6K-11 y obtenida en medio mineral con aceite de maíz.

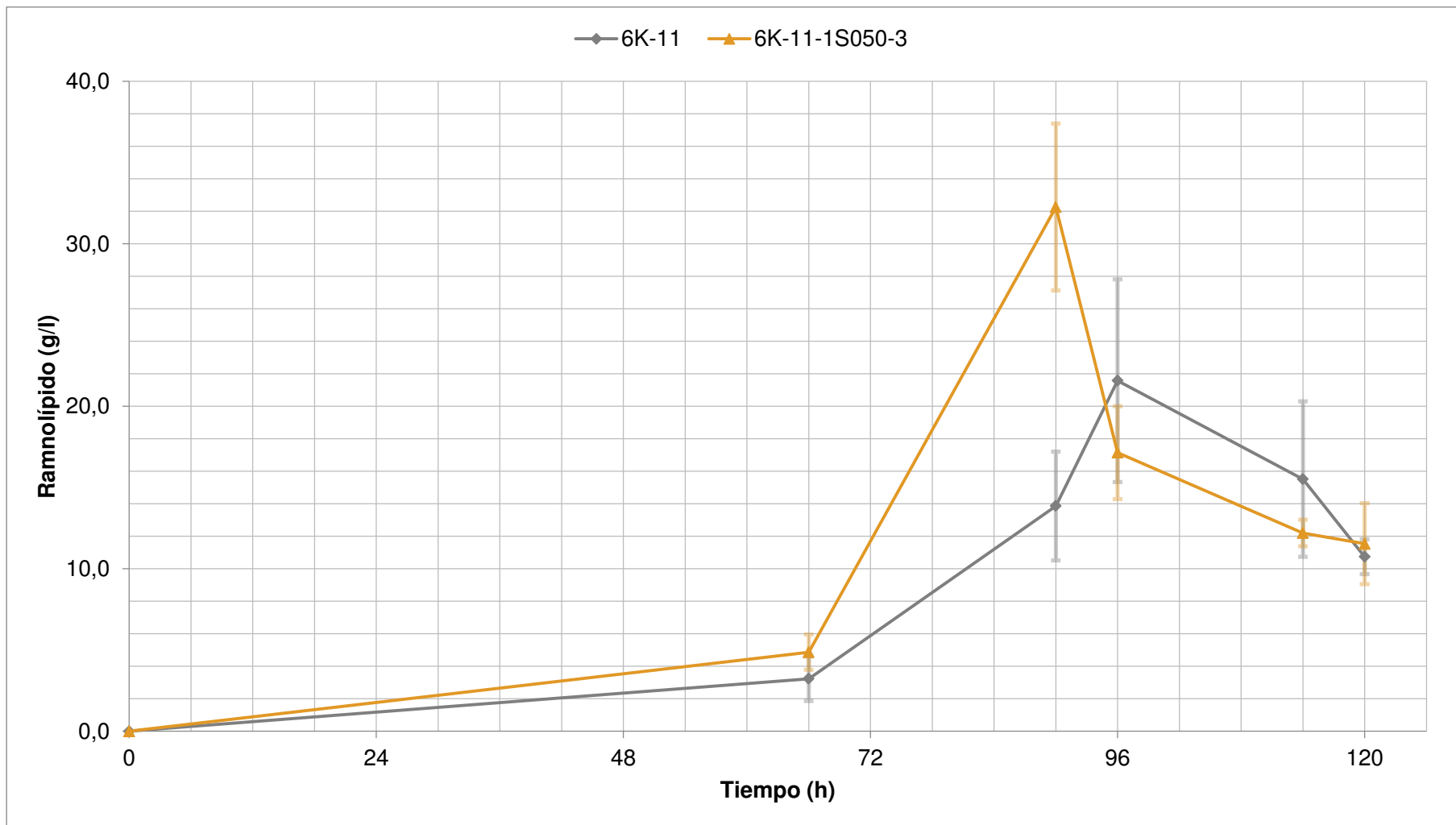


Figura 11. Producción de ramnolípidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11-1S050-3. Comparada con la cepa original 6K-11 y obtenida en medio mineral con aceite de maíz.

4. Caracterización del ramnolípido producido

El análisis mediante UPLC-MS halló las 14 especies químicas buscadas en el ramnolípido purificado producido por la cepa mutante 6K-11-1S050 y por la cepa original 6K-11 (**Figura 12, Figura 13**), aunque el monorramnolípido Rha-C12:1-C10 arrojó picos bajos en el cromatograma, por lo que deben de interpretarse sus valores con cuidado (**Tabla 8**). La cepa mutante mostró una menor producción de monorramnolípidos de cadenas saturadas de 10 y de 12 carbonos, mientras que se halló un incremento sustancial de los monorramnolípidos de 8 y 10 carbonos así como en todas las especies exploradas de dirramnolípidos (**Tabla 8**).

Tabla 8. Comparación de especies químicas de ramnolípidos producidas por la cepa original y la mutante 6K-11-1S050

Especie química	6K-11 original	6K-11-1S050	Diferencia
Rha-C8-C10	399.964	509.551	27%
Rha-C10-C8	216.542	246.739	14%
Rha-C10-C10	5,169.161	5,247.877	2%
Rha-C10-C12:1	157.442	160.898	2%
Rha-C12:1-C10*	6.905	2.986	-57%
Rha-C10-C12	56.003	42.172	-25%
Rha-C12-C10	18.956	16.704	-12%
Rha-Rha-C8-C10	3,111.027	3,977.982	28%
Rha-Rha-C10-C8	1,510.887	1,910.327	26%
Rha-Rha-C10-C10	60,635.656	66,096.453	9%
Rha-Rha-C10-C12:1	6,313.125	6,997.617	11%
Rha-Rha-C12:1-C10	192.556	232.536	21%
Rha-Rha-C10-C12	6,289.626	6,651.518	6%
Rha-Rha-C12-C10	2,162.869	2,364.774	9%

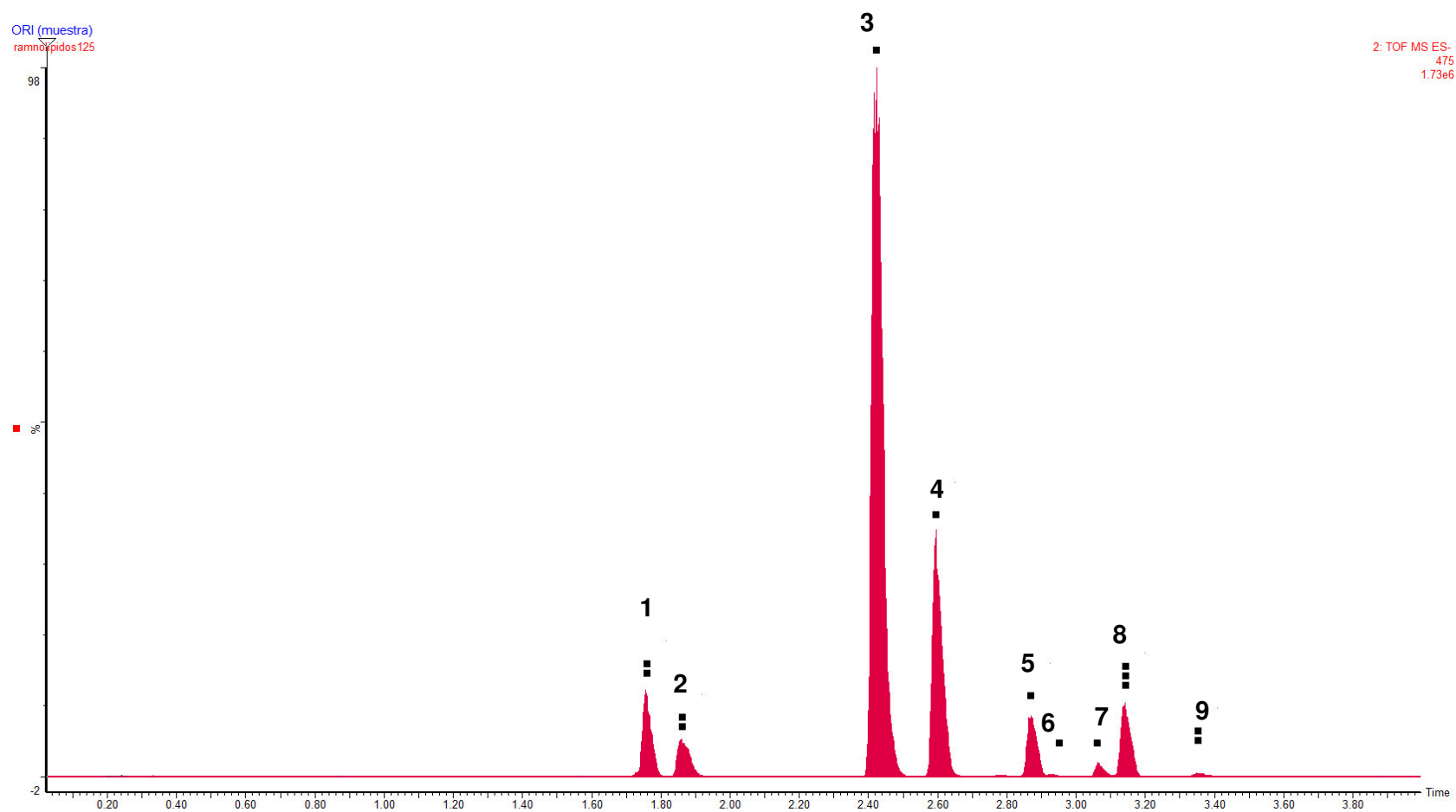


Figura 12. Cromatograma por UPLC de ramnolípido de la cepa 6K-11. Producido en medio mineral con glucosa. **(1)** Rha-Rha-C10-C8 y Rha-Rha-C8-C10, **(2)** Rha-C8-C10 y Rha-C10-C8, **(3)** Rha-Rha-C10-C10, **(4)** Rha-C10-C10, **(5)** Rha-Rha-C10-C12:1, **(6)** Rha-Rha-C12:1-C10, **(7)** Rha-C10-C12:1, **(8)** Rha-C12:1-C10, Rha-C10-C12, Rha-C12-C10, **(9)** Rha-C10, Rha-C12-C10.

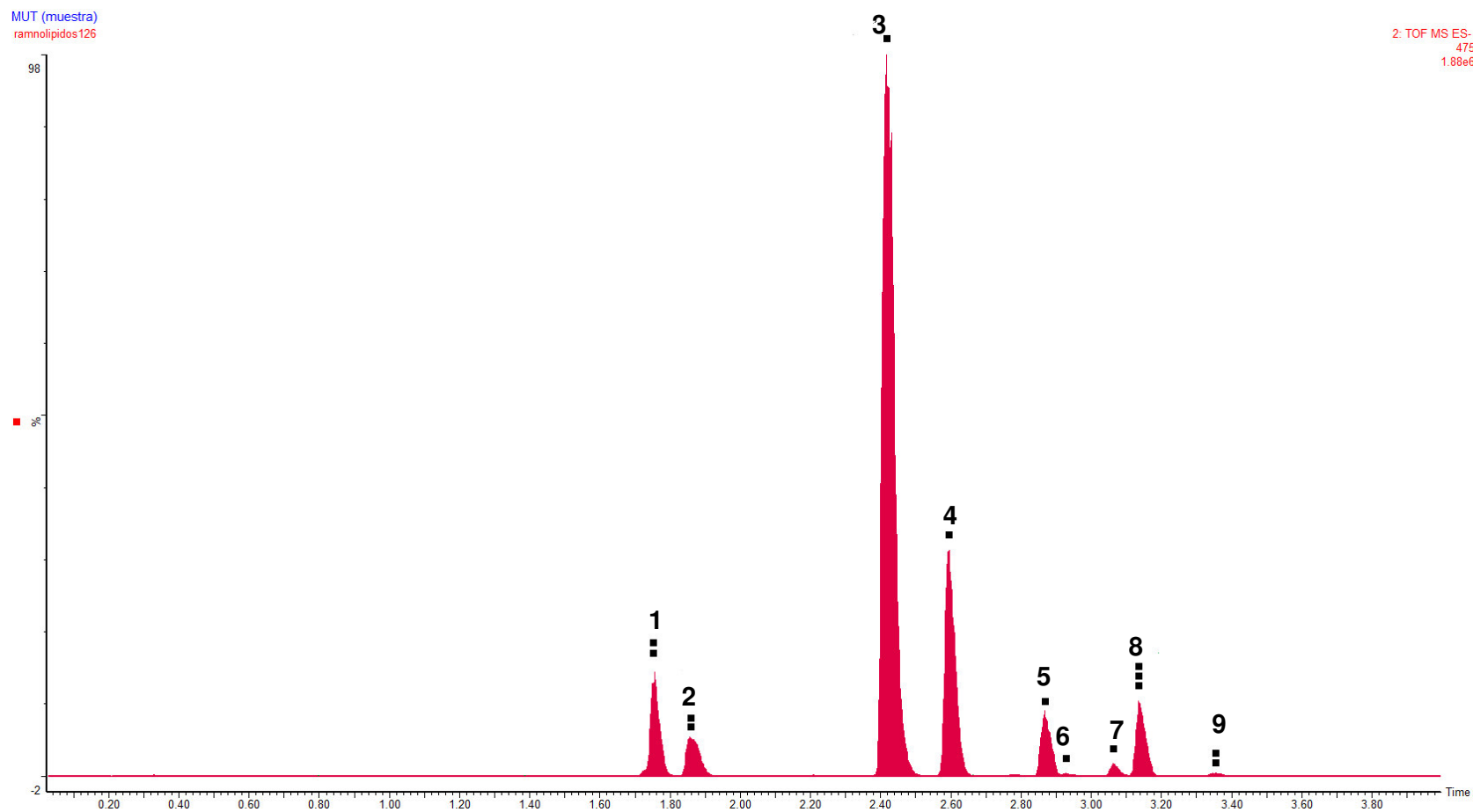


Figura 13. Cromatograma por UPLC de ramnolípido de la mutante 6K-11-1S050. Producido en medio mineral con glucosa. **(1)** Rha-Rha-C10-C8 y Rha-Rha-C8-C10, **(2)** Rha-C8-C10 y Rha-C10-C8, **(3)** Rha-Rha-C10-C10, **(4)** Rha-C10-C10, **(5)** Rha-Rha-C10-C12:1, **(6)** Rha-Rha-C12:1-C10, **(7)** Rha-C10-C12:1, **(8)** Rha-C12:1-C10, Rha-C10-C12, Rha-C12-C10, **(9)** Rha-C10, Rha-C12-C10.

5. Eliminación de bacteriófagos

La concentración mínima inhibitoria de ciprofloxacino fue determinada como MIC = 0.1 ug/ml. En los cultivos sumergidos se observó que la densidad celular decrecía (**Figura 14**), por lo cual se determinó que el ciprofloxacino inducía al ciclo lítico en dosis subletales.

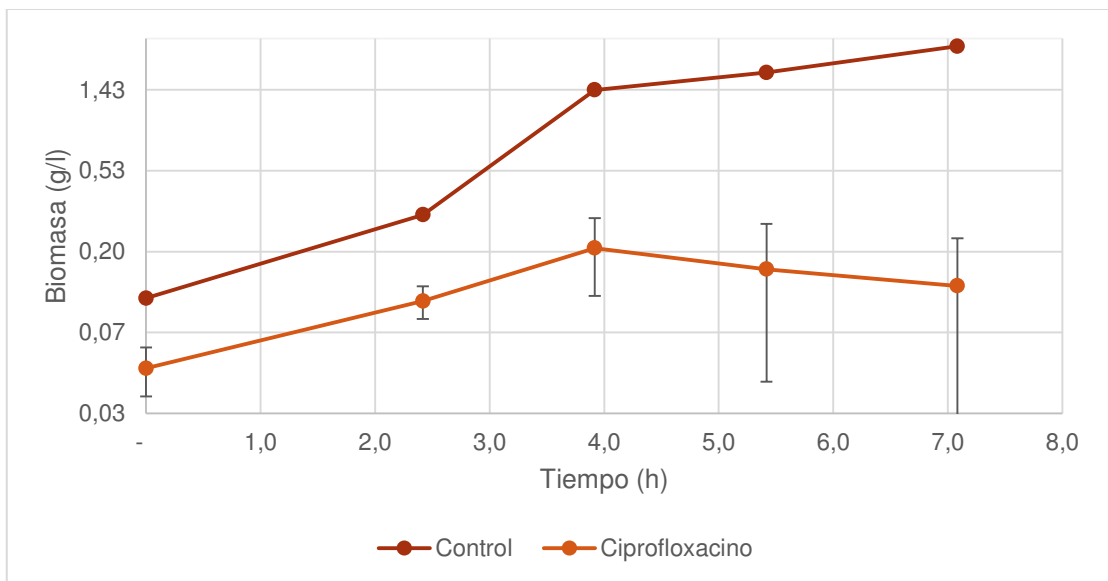


Figura 14. Efecto del ciprofloxacino en el crecimiento de *P. aeruginosa* 6K-11.

Tras la aplicación conjunta del ciprofloxacino en medio sólido y la radiación ultravioleta, se obtuvieron como cepas curadas de bacteriófagos las cepas mutantes 6K-11-1S050-1 y 6K-11-1S050-3. Ninguno de los repiques posteriores evidenció la formación de placas líticas, por lo que concluimos que los bacteriófagos habían sido eliminados.

VI. DISCUSIÓN

Se observó la correspondencia de la cepa 6K-11 a la cepa patrón PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*. Anteriores trabajos apuntan a una baja diversidad molecular entre distintas cepas, provenientes de diferentes entornos ambientales y de distintos niveles de producción de ramnolípidos (Gomila, et al., 2015). Las características genéticas que le aportan a la cepa 6K-11 la capacidad metabólica para ser superproductora de ramnolípidos se deberían a cambios recientes en la historia evolutiva de la especie.

La producción máxima de ramnolípidos en medio mineral con aceite de maíz no es significativamente distinta entre la cepa original 6K-11 y la mutante 6K-11-1S050-3, de acuerdo al análisis de Wilcoxon (**Tabla 7**); sin embargo, se observa que el tiempo de máxima producción es 6 horas menor en la mutante (**Figura 11**). En todas las experiencias, los ramnolípidos se comportan como metabolitos secundarios que alcanzan su máxima producción al final de la fase de crecimiento exponencial.

Diversos *loci* han sido estudiados para hallar las diferencias genéticas que generan distintos niveles de producción entre las cepas. Sin embargo, el metabolismo de los ramnolípidos es complejo y vincula diversas rutas metabólicas. A la fecha, se han tenido avances en el conocimiento de la regulación de estas vías, no obstante, el panorama es aún complejo. Se conoce que el metabolismo del nitrógeno está implicado en la regulación de diversos metabolitos en *Pseudomonas*. (Lee & Zhang, 2015).

Un marcador importante gatilla la expresión de diversos operones al detectar la privación de fuentes de nitrógeno orgánico en el medio intracelular, y recientemente Wenner y colaboradores han encontrado el primer microARN implicado en la regulación de estas vías, esperándose hallar nuevas secuencias de este tipo

próximamente (Wenner, et al., 2014). Un gen o algunos loci mutados podrían corresponder a secuencias de ARN reguladoras o a las secuencias diana de las mismas, lo que habría permitido adelantar la producción de ramnolípidos.

Se han producido cambios en las frecuencias de las especies químicas de ramnolípidos producidos. Anteriormente se afectó la diversidad de especies químicas de ramnolípidos producidas, pero a nivel de las unidades de ramnosa (Wild, et al., 1997), por lo que nuestros resultados requieren ser explicados por cambios distintos.

En su trabajo de licenciatura, Calleja (2016) demostró que la aparición de los anillos específicos hallados mediante precipitación ácida (Tabuchi, et al., 2015) estaba relacionada a la composición específica de la mezcla de ramnolípidos. La desaparición de un anillo central de la cepa 6K-11-1S050 en el agar CTAB (**Figura 5**) podría estar relacionada a la reducción en la abundancia de los ramnolípidos con cadenas de beta-hidroxicanoatos de 10 y 12 carbonos.

Respecto a la síntesis de la región hidrofóbica de los ramnolípidos en *Pseudomonas*, es sabido que las moléculas de ácido hidroxicanoico puede provenir tanto de la síntesis *de novo* de ácidos grasos como de la beta-oxidación (Abdel-Mawgoud, et al., 2011). Sin embargo, los datos más recientes favorecen la síntesis *de novo* como principal fuente de ácidos hidroxicanoicos para la síntesis de ramnolípidos (Dobler, et al., 2016). Esto da soporte a nuestros hallazgos con las especies producida por la cepa mutante 6K-11-1S050, donde siempre que se incrementa o reduce la abundancia de una especie química, el enantiómero se comporta de manera similar, destacando el incremento de los ramnolípidos de menor peso molecular en la porción hidrofóbica: el monoramnolípidos Rha-C8-C10 (+27%) y los dirramnolípidos Rha-Rha-C8-C10 (+28%) y Rha-Rha-C10-C8 (+26%) (**Tabla 8**).

Se obtuvieron dos cepas libres de virus, a saber, 6K-11-1S050-1 y 6K-11-1S050-3. Los bacteriófagos, abundantes en la naturaleza, pueden ser perjudiciales en un

proceso de producción de ramnolípidos a gran escala (Primrose, 2005), además de constituir un potencial agente mutagénico (Parekh, et al., 2000).

Dado el reciente auge del desarrollo de fagoterapias, muchas investigaciones desarrollan protocolos para promover la infección viral, antes que librar a la cepa de bacteriófagos. El protocolo usado en el presente trabajo podría constituir un aporte para solucionar posibles eventos de contaminación a nivel de desarrollo o de operación.

Raya y Hébert (2009), para la obtención de bacteriófagos, hacen uso de mitomicina C como agente inductor de la lisis. En esta experiencia se hizo uso de ciprofloxacino en cuanto a que ambas provocan alteraciones estructurales en el ADN bacteriano: En el caso del ciprofloxacino, este se intercala entre las bases nucleotídicas (Aleksić & Kapetamović, 2014).

Respecto a la persistencia de los bacteriófagos, esta podría deberse a una diversidad importante de las especies víricas presentes en la cepa original. En medio sólido, se hallaron hasta tres morfologías distintas de placas de lisis. Los océanos son reservorios importantes de bacteriófagos, y la cepa en estudio provenía de una zona costera, lo cual podría haber coadyuvado a concentrar distintos bacteriófagos.

En suma, el protocolo empleado sirvió para obtener cepas de interés libres de bacteriófagos.

VII. CONCLUSIONES

- Con la metodología empleada, se logró generar cepas mutantes hiperproductoras de ramnolípidos, como la cepa 6K-11-1S050-3 con mayor diversidad de especies químicas de ramnolípidos producidos en menor tiempo que la cepa original.
- La dosis mutagénica total empleada para la obtención de las cepas mutantes fue de 76 segundos de exposición a radiación ultravioleta B ($\lambda = 254 \text{ nm}$) proveniente de una lámpara de 9V de potencia situada a una distancia de 30 cm.
- Con el protocolo desarrollado, se lograron obtener dos cepas mutantes libres de bacteriófagos: 6K-11-1S050-3 y 6K-11-1S050-1
- La cepa 6K-11-1S050-3 produjo 32.3 g/l de ramnolípidos en 90 horas de producción a un medio mineral con aceite de maíz agitado a 160 rpm a una temperatura de 31.5 °C, 6 horas antes de la máxima producción de la cepa original.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABALOS, A. et al. Utilization of response surface methodology to optimize the culture media for the production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* AT10. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2002, 77(7), pp. 777-784.

ABDEL-MAWGOUD, A. M. et al. Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation, and bioengineering of production. En: *Biosurfactants*. s.l.:Springer Berlin Heidelberg, 2011, pp. 13-55.

ALEKSIĆ, M. M. & KAPETAMOVIĆ, V. An Overview of the Optical and Electrochemical Methods for detection of DNA-Drug interactions. *Acta Chim. Slov.*, 2014, Volumen 61, pp. 555-573.

ARIAS, A. “Estudio analítico de especies metálicas, Biomoléculas y metalobiomoléculas en Alimentos como marcadores de calidad y Autenticidad”. Asesores: José Luis Gómez Ariza y Tamara García Barrera. Tesis grado de Doctor. Universidad de Huelva, Huelva, 2008.

ARINO, S., et al. Identification and production of a rhamnolipidic biosurfactant by a *Pseudomonas* species. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996. Vol. 45, pp. 162-168.

CALLEJA AYALA, Gustavo Miguel. “Identificación de Rhamnolípidos producidos por *Pseudomonas aeruginosa* 6K-11 contenidos en halos revelados en agar CTAB/MB con UPLC-MS/MS”. Asesora: Susana Gutiérrez. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Microbiología y Parasitología, Lima, 2016

CEYSSSENS, P.-J. & LAVIGNE, R.. Bacteriophages of *Pseudomonas*. *Future Microbiology*, 2010, 5(7), pp. 1041-1055.

CHANDRASEKARAN, E. V. & BEMILLER, J. L., 11 - Constituent Analysis of Glycosaminoglycans. En: R. L. Whistler & J. N. BeMiller, edits. *General Methods*. s.l.:Academic Press, 1980, pp. 89-96.

DE SMET, J. et al. High coverage metabolomics analysis reveals phage-specific alterations to *Pseudomonas aeruginosa* physiology during infection. *The ISME Journal*. 2016, volumen 10, pp. 1823-1835.

DÉZIEL, E., et al. Liquid chromatography/mass spectrometry analysis of mixtures of rhamnolipids. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999. Vol. 1440(2-3), p. 244–252.

DOBLER, L., et al. Rhamnolipids in perspective: gene regulatory pathways, metabolic engineering, production and technological forecasting.. *New biotechnology*, 2016, 33(1), pp. 123-35.

EDGAR, R. C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research*, 2004, 32(5), pp. 1792-1797.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap.. *Evolution*, 1985, Issue 39, pp. 783-791.

FERNÁNDEZ ZENOFF, V., et al. Diverse Responses to UV-B Radiation and Repair Mechanisms of Bacteria Isolated from High-Altitude Aquatic Environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 2006, 72(12), pp. 7857-7863.

GHEORGIOU, D., et al. Curing of a Lysogenic Strain of *Streptococcus cremoris* and characterization of the temperate bacteriophage. *Journal of General Microbiology*, 1981, volumen 122, pp. 295-303.

GIRALDO, J. D., et al. Actividad emulsificante y de remoción de metales pesados del ramnolípido producido por *Pseudomonas aeruginosa* PB 25. *Revista de la Sociedad Química del Perú*, 2014, enero, 80(1), pp. 35-44.

GOMILA, M. et al. Phylogenomics and Systematics of *Pseudomonas*. *Frontiers in Microbiology*, 2015, 6(214).

HELBERT, J.R. and BROWN, K.D. Color Reaction of Anthrone with Monosaccharide Mixtures and Oligo- and Polysaccharides Containing Hexuronic Acids. *Analytical Chemistry*. 1957. Vol. 29(10), p. 1464–1466.

HEYD, M., et al. Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 2008. Vol. 391, p.1579–1590.

HUANG, X. & MADAN, A. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program.”. *Genome Research*, 1999, 9(9), p. 868–877.

JARVIS, F. G. & JOHNSON, M. J. A Glyco-lipide Produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of the American Chemical Society*, 1949, 71(12), pp. 4124-4126.

JOSHI, S. M., et al. Random UV mutagenesis approach for enhanced biodegradation of sulfonated azo dye, Green HE4B. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 2013, 169(5), pp. 1467-1481.

JUKES, T. & CANTOR, C. Evolution of protein molecules. En: H. Munro, ed. *Mammalian Protein Metabolism*. New York: Academic Press, 1969, pp. 21-132.

KIDAMBI, S. P., et al. RecA-dependence of the response. *Microbiology*, 1996, 142(4), pp. 1033-1040.

KLUG, W. S., et al. *Conceptos de Genética*. Madrid: Pearson Educación, S. A., 2006, pp. 235-237, 427

- KOKJOHN, T. A. & MILLER, R. V.. IncN plasmids mediate UV resistance and errorprone repair in *Pseudomonas aeruginosa* PAO. *Microbiology*, 1994, 140(1), pp. 43-48.
- LEE, J. & ZHANG, L.. The hierarchy of quorum sensing network in *Pseudomonas aeruginosa*. *Protein Cell*, 2015, 6(1), pp. 26-41.
- LEWIN, B. *Genes*. IX ed. s.l.:Jones and Bartlett Publishers, 2008, pp. 504, 515-516
- MATA-SANDOVAL, J.C., et al. High-performance liquid chromatography method for the characterization of rhamnolipid mixtures produced by *Pseudomonas aeruginosa* UG2 on corn oil. *Journal of Chromatography A*, 1999, vol. 864, pp. 211–220.
- MONSIGNY, M., et al. Colorimetric determination of neutral sugars by a resorcinol sulfuric acid micromethod. *Analytical Chemistry*, 1988, 175(2), pp. 525-530.
- NELSON, D. L. & COX, M. M. *Lehninger Principios de Bioquímica*. 4 ed. s.l.:Omega, 2006, p. 927
- PAREKH, S., et al. Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol*, 2000, Volumen 54, pp. 287-301.
- PINZON, N. M. & JU, L.-K. Improved detection of rhamnolipid production using agar plates containing methylene blue and cetyl trimethylammonium bromide. *Biotechnology Letters*, 2009, 31(10), p. 1583–1588.
- PRIMROSE, S. B. Controlling bacteriophage infections in industrial bioprocesses. *Applied Molecular Genetics*, 2005, Volumen 43, pp. 1-10.
- RAYA, R. R. & HÉBERT, E. M. Isolation of Phage via Induction of Lysogens. En: M. R. J. Clokie & A. M. Kropinski, edits. *Bacteriophages: Methods and Protocols, Volume 1: Isolation, Characterization, and Interactions*. s.l.:Humana Press, 2009, pp. 23-32.

REBELLO, S., et al. Surfactants: toxicity, remediation and green surfactants. *Environmental Chemistry Letters*, 2014, 12, pp. 275-287.

REIS, R. S., et al. Biosurfactants: Production and applications. En: R. Chamy & F. Rosenkranz, edits. *Biodegradation - Life of Science*. s.l.:InTech, 2013, pp. 31-61.

ROSEN, M. J. & Kunjappu, J. T. *Surfactants and Interfacial Phenomena*. New Jersey: John Wiley & Sons, 2012, pp. 1-3

SAITOU, N. & NEI, M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, 1987, Issue 4, pp. 406-425.

SALMOND, G. P. C. & FINERAN, P. C. A century of the phage: past, present and future. *Nature Reviews Microbiology*, 2015, Volumen 13, pp. 777-786.

SCHENK, T. et al. High-performance liquid chromatographic determination of the rhamnolipids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Chromatography A*. 1995. Vol. 693(1), 7-13.

SCHRAMM, L. L., et al. Surfactants and their applications. *Annual Reports Section "C" (Physical Chemistry)*, 2003, Volumen 99, pp. 3-48.

SETLOW, R. B. Cyclobutane-Type Pyrimidine Dimers in Polynucleotides. *Science*, 1966, 153(3734), pp. 379-386.

SHRIVASTAV, N., Li, D. & Essigmann, J. M. Chemical biology of mutagenesis and DNA repair: cellular responses to DNA alkylation. *Carcinogenesis*, 2010, 31(1), pp. 59-70.

SIEGMUND, I. & WAGNER, F.. New method for detecting rhamnolipids excreted by *Pseudomonas* species during growth on mineral agar. *Biotechnology Techniques*, 1991, 5(4), pp. 265-268.

SINGLETON, P. *Dictionary of DNA and Genome Technology*. 2 ed. s.l.:John Wiley & Sons., 2010, p. 222

SMYTH, T., et al. Protocols for the Detection and Chemical Characterisation of Microbial Glycolipids. *Hydrocarbon and Lipid Microbiology Protocols*, Springer Protocols Handbooks. 2014.

TABUCHI YAGUI, Takeshi R. Ricardo. "Optimización del uso de agar con cetiltrimetilamonio bromuro y azul de metileno para la selección de cepas de *Pseudomonas* spp. productoras de ramnolípidos". Asesora: Susana Gutiérrez. Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Genética y Biotecnología, Lima, 2014.

TABUCHI YAGUI, Takeshi y otros. Optimización y modificación del método para la detección de ramnolípidos. *Revista Peruana de Biología*, 2015, 22(2), pp. 247-258.

TAHZIBI, Abbas et al. Improved production of rhamnolipids by a *Pseudomonas aeruginosa* mutant. *Iranian Biomedical Journal*, 2004, 8(1), pp. 25-31.

WENNER, N., et al.. NrsZ: a novel, processed, nitrogen-dependent, small non-coding RNA that regulates *Pseudomonas aeruginosa* PAO1 virulence.. *Environmental Microbiology*, 2014, 16(4), pp. 1053-1068.

WILD, M. y otros. Selection and partial characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* mono-rhamnolipid deficient mutant. *FEMS Microbiology Letters*, 1997, Volumen 153, pp. 279-285.

ZHU, Y. et al. Reuse of waste frying oil for production of rhamnolipids using *Pseudomonas aeruginosa* zju.u1M. *Journal of Zhejiang University SCIENCE A*, 2007, 8(9), pp. 1514-1520.