



Volumen 5, Número 2. Abril-Junio 2014

Título del artículo.

***Pseudomonas sp* productoras de biosurfactantes**

Título del artículo en idioma Inglés.

***Pseudomonas sp* producing biosurfactants**

Autores.

Jeiry Toribio-Jiménez
Juan Carlos Velázquez Aradillas
Yanet Romero Ramírez
Miguel Ángel Rodríguez Barrera
José Daniel Chávez González
Joseph Guevara Luna
José Luis Aguirre Noyola
Arely Fierro Torres

Referencia bibliográfica:

MLA

Toribio-Jiménez, Jeiry, Juan Carlos Velázquez Aradillas, Yanet Romero Ramírez, Miguel Ángel Rodríguez Barrera, José Daniel Chávez González, Joseph Guevara Luna, José Luis Aguirre Noyola y Arely Fierro Torres. " *Pseudomonas sp* productoras de biosurfactantes." *Tlamati*. 5.2 (2014): 66-82. Print.

APA

Toribio-Jiménez, J., Velázquez-Aradillas, J. C., Romero-Ramírez, Y., Rodríguez-Barrera, M. A. Chávez-González, J. D., Guevara-Luna, J. , Aguirre-Noyola, J. L., Fierro-Torres, A. (2014). *Pseudomonas sp* productoras de biosurfactantes. *Tlamati*, 5(2), 66-82.

ISSN: 2007-2066.

Publicado el 29 de Junio del 2014.

© 2014 Universidad Autónoma de Guerrero

Dirección General de Posgrado e Investigación

Dirección de Investigación

TLAMATI, es una publicación trimestral de la Dirección de Investigación de la Universidad Autónoma de Guerrero. El contenido de los artículos es responsabilidad exclusiva de los autores y no refleja de manera alguna el punto de vista de la Dirección de Investigación de la UAG. Se autoriza la reproducción total o parcial de los artículos previa cita de nuestra publicación.



***Pseudomonas sp* productoras de biosurfactantes**

Jeiry Toribio-Jiménez^{1*}
 Juan Carlos Velázquez Aradillas²
 Yanet Romero Ramírez¹
 Miguel Ángel Rodríguez Barrera¹
 José Daniel Chávez González¹
 Joseph Guevara Luna¹
 José Luis Aguirre Noyola¹

¹Unidad Académica de Ciencias Químico-Biológicas, Laboratorio de Investigación en Biotecnología y Genética Microbiana, Universidad Autónoma de Guerrero. Av. Lázara Cárdenas s/n, Ciudad Universitaria Sur.

Chilpancingo, Gro. Teléfono: (+52) 747 4725503 Chilpancingo, Gro. México

²Posgrado en Diseño de Bioprocesos, Universidad Politécnica de Puebla., Puebla.

³Preparatoria No. 1., Universidad Autónoma de Guerrero., Chilpancingo, Gro.

***Autor de correspondencia**

Resumen

Los biosurfactantes (BS) son moléculas anfifílicas de origen biológico con propiedades similares a los surfactantes sintéticos, es decir, con capacidad de reducir la tensión superficial del agua en la interface y llegan a formar estructuras agregadas denominadas micelas. Existe una gran diversidad de BS en la naturaleza, de los cuales se destacan los producidos por el género *Pseudomonas sp*. Este grupo de bacterias tienen la capacidad de sintetizar diferentes tipos de biosurfactantes. Se han aislado y reportado diversas especies de *Pseudomonas sp* en diversos nichos ecológicos con la capacidad de producir BS, los más producidos por este género son los glicolípidos y los lipopéptidos cíclicos (CLP's), entre otros. Es por ello que en este trabajo se presenta una revisión actualizada sobre la producción, biosíntesis, métodos de obtención, purificación y usos potenciales de los biosurfactantes producidos por las diferentes especies del género *Pseudomonas*.

Palabras claves: biosurfactantes, *Pseudomonas sp*, producción y regulación

Abstract

Biosurfactants are amphiphilic molecules from biological origin with similar properties as the synthetic surfactants with the capacity of reducing surface tension from water at the interface and they are able to form structures of aggregation called micelles. A wide diversity of biosurfactants (BS) are found in nature. From this diversity, *Pseudomonas sp*. genre are highlighted as a producer of BS. This group of bacteria has the capacity of synthesizing different types of biosurfactants. Different *Pseudomonas sp*. species has been isolated from different ecological niches. Glicolipids and cyclic lipopeptides (CLP) among others, are produced by these genera. This is a review about production, biosynthesis, extraction and purification methods, and potential uses of produced biosurfactants from different species from *Pseudomonas*.

Como citar el artículo:

Toribio-Jiménez, J., Velázquez-Aradillas, J. C., Romero-Ramírez, Y., Rodríguez-Barrera, M. A. Chávez-González, J. D., Guevara-Luna, J., Aguirre-Noyola, J. L., Fierro-Torres, A. (2014). *Pseudomonas sp* productoras de biosurfactantes. *Tlamati*, 5(2), 66-82

Introducción

Los biosurfactantes son moléculas anfífilas de origen biológico con propiedades similares a los surfactantes sintéticos, es decir, con capacidad de reducir la tensión superficial del agua en la interface y a concentraciones mayores a la concentración micelar crítica producen agregados denominados micelas (Rosen, 2004). Debido a estas propiedades, las moléculas de los biosurfactantes se ubican en la interface de fluidos como son los sistemas aceite-agua y aire-agua (Stoyanov, Rehage y Paunov, 2003). Además, la presencia de biosurfactantes en un medio acuoso favorece la solubilidad y la biodisponibilidad de compuestos orgánicos, siendo ésta una de sus principales propiedades para su aplicación en el área de la biotecnología ambiental en el campo de la biodegradación de contaminantes (Liu, Laha y Luthy, 1991). Además se ha reportado también que poseen actividad antibacterial, anti-fúngica, anti-tumoral, antimicoplasmica y anti-viral (Makkar y Cameotra, 2002; Singh y Cameotra, 2004). Son producidos extracelularmente o forman parte de la membrana celular de una amplia variedad de microorganismos (bacterias, hongos y levaduras) (Gautam y Tyagi, 2006, Rhaman et al., 2009) mostrando una amplia variedad en su estructura química, entre las cuales destacan los glicolípidos, lipopéptidos, lipoproteínas, ácidos grasos, fosfolípidos, lípidos particulados y poliméricos (Lang, 2002., Mulligan, 2009). Los biosurfactantes difieren de los surfactantes químicos (generalmente derivados del petróleo) por su baja toxicidad, presentan mayor compatibilidad con el ambiente y son altamente específicos en su acción (Nitschke, Costa, Haddad, Gonçalves, Eberlin y Contreiro., 2005ab., Gautam y Tiagy, 2006, Mukherjee, Das y Sen, 2006). Varios de los biosurfactantes como los ramnolípidos presentan carga de tipo aniónica o neutra, y muy pocos presentan carga catiónica. Tal es el caso de los que poseen en su estructura química grupos amino (Mulligan, 2009). Los BS pueden ser producidos usando una amplia variedad de materiales a bajo costo o materias primas de residuos agroindustriales, son estables en condiciones extremas de temperatura, pH y salinidad a diferencia de los sintetizados químicamente (Jiménez, 2010). El interés en los biosurfactantes se ha incrementado considerablemente en años recientes por sus potenciales aplicaciones en la industria y en la remediación de sitios contaminados. Por ello, el registro en el número de patentes internacionales para la aplicación de biotensoactivos en los sectores de alimentos, limpieza doméstica, cosméticos, recuperación de crudo, remediación de suelos y aplicaciones en agricultura, crece de manera significativa año con año (Abdel-Mawgoud et al., 2010). No obstante, uno de los factores que limita la comercialización de biosurfactantes en algunos casos, son los costos elevados de los sustratos, del proceso de producción y purificación, y baja productividad de las especies microbianas utilizadas, lo que limita su producción en gran escala (Jiménez, 2010). Por esta razón, las investigaciones recientes se han enfocado tanto a la optimización de los procesos

de producción como a la búsqueda de sustratos económicos, con la finalidad de incrementar la rentabilidad de su producción a nivel comercial (Mukherjee et al., 2006).

Existe una amplia variedad de microorganismos que tienen la capacidad de producir biosurfactantes, entre éstos destaca el género *Pseudomonas*. Este es uno de los más grupos bacterianos más diversos, y su taxonomía ha sufrido varios cambios desde su descripción temprana (Palleroni, 1984). Los miembros de este género son *sensu stricto* al grupo I RNA, dentro del grupo de las *Gamma proteobacterias* (Mulet, Lalucat y García-Valdés, 2010). Se han reportado diversas especies de este género con capacidad de producir biosurfactantes y sus diversas aplicaciones biotecnológicas. Es por ello que en este capítulo se plantea un panorama actual de las *Pseudomonas sp* como productoras de biosurfactantes, sus propiedades, condiciones de producción, biosíntesis, estructura química y sus aplicaciones biológicas, con la finalidad de ofrecer una revisión actualizada de los diferentes biosurfactantes producidos por este género.

Especies de pseudomonas productoras de biosurfactantes:

Las especies de *Pseudomonas* forman un gran grupo de bacterias productoras de BS. Muchos de los aislamientos de *Pseudomonas* han sido reportados por su capacidad de producir glicolípidos, especialmente ramnolípidos. Además se han reportado cepas de *Pseudomonas*, como *Pseudomonas sp* (Lim et al., 2007 and 2009; D'aes et al., 2011) con capacidad de producir artrofactina del grupo de los lipopéptidos (Lim et al., 2007; Washio et al., 2010), biosurfactante -PM, producido por *P. maltophilia* (Phale et al., 1995), corrugatina producido por *P. corrugate* (Risse et al., 1998), lipopéptidos cíclicos (Janek et al., 2010; Rokni-zadeh et al., 2012), lipodepsipéptidos (Laycock et al., 1999, Monti et al., 2001), biosurfactantes particulados producidos por *Pseudomonas sp* (Burd and Ward, 1997), pseudomicina A producida por *P. syringae* MSU 16H (Coiro et al., 1998). Otros de ellos incluyen a la viscosina y el depsipéptido viscosinamina producida por *P. fluorescens* DR54 (Rokni-zadeh et al., 2013; Alsohim et al., 2014), putisolvina I y II producidos por *P. putida* PCL1445 (Kruijtit et al., 2009; Rokni-zadeh et al., 2013), polipeptina (Ui et al., 1997), siringomicina y siringopeptina producidas por *P. syringae* pv. *syringae* B301D (Burch et al., 2014), amphisina producida por *Pseudomonas* sp DSS73 (Sørensen et al., 2001, Koch et al., 2002), lokisina producida por *P. koreensis* 2.74 (Hultberg et al., 2010) y entolisina producida por *P. entomophila* (Vallet-Gely et al., 2010). La producción de surfactina, fenhicina y lichenisina se reportó en una cepa de *Pseudomonas sp* WJ6 (Xia et al., 2014). A continuación se describe una breve discusión de los tipos de biosurfactantes producidos por las diferentes especies de *Pseudomonas*.

Ramnolípidos producidos por Pseudomonas sp.

Diversas especies de *Pseudomonas* destacan por su capacidad para producir ramnolípidos (Maier y Soberón-

Chávez, 2000; Abdel-Mawgoud et al., 2011; Muller et al., 2012). Los primeros en reportar la estructura de un glicolípido de tipo ramnolípido fueron Bergström et al. (1946), sintetizado por *P. pyocyanea* (ahora *P. aeruginosa*), conformado por ramnosa y ácido β -hidroxidecanoico. Tres años después, Jarvis y Johnson (1949), empleando medios de cultivo con 3% de glicerol, también aislaron al biosurfactante ramnolípido producido por *P. aeruginosa*, y determinaron que estos compuestos estaban formados por un glucósido de β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato y dos moléculas de ramnosa. Cabe mencionar que antes de elucidar con certeza la estructura de los ramnolípidos, en la década de 1950 ya eran usados en procesos de biorremediación de suelos contaminados con aceites y metales pesados (Hemminger, 2005).

La primera estructura claramente elucidada de los ramnolípidos fue encontrada por Edwards y Hayashi (1965), quienes demostraron la unión glicosídica del disacárido de ramnosa al β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato y cuya estructura se ha denominado como R2 (véase figura 1). Esta misma estructura también fue observada por Hisatsuka et al. (1971), utilizando *P. aeruginosa* S7B1 cultivada en hexa *n*-decano y parafinas. Un año después, Itoh y Suzuki (1972) encontraron que *P. aeruginosa* KY 4025 cultivada con 10% de *n*-alcanos produce monoramnolípido correspondiente a L- α -ramnopiranosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato, estructura a la cual se ha denominado R. Se han reportado otras variantes productoras de ramnolípidos, tal es el caso de *P. aeruginosa* 44T1 (Robert et al., 1989), *P. aeruginosa* GS3 (Patel and Desai, 1997), *P. aeruginosa* EM1 (Chayabutra et al., 2001), *P. aeruginosa* BS2 (Dubey and Juwarkar, 2001), *P. aeruginosa* LBI (Benincasa et al., 2002, Nitschke et al., 2009). *P. aeruginosa* (Costa et al., 2006, Marsudi et al., 2008).

Por otro lado se han reportado otras especies de *Pseudomonas* sp con la capacidad de producir ramnolípido como se describe a continuación: *P. putida* 300-B mutante (obtenida de *P. putida* 33 silvestre), *Pseudomonas* sp 47T2

NCIB 400044 (Mercade et al., 1993), *P. cepacea* (Onbasli y Aslim 2009), *P. chlororaphis* NRRL B-30761 (Gunther et al., 2005, 2006), *P. clemancea* y *P. collierea* (Rahman et al., 2009), *P. fluorescens* 29L (Husain, 2008), *P. fluorescens* (Abouseoud et al., 2008a,b), *P. fluorescens* (Wilson and Bradley, 1996), *P. fluorescens* HW-6 (Vasileva-Tonkova et al., 2006), *P. fluorescens*, *P. stutzeri*, *P. luteola* y *P. putida* (Onbasli y Aslim 2009), *P. putida* (Martinez-Toledo et al., 2006), *P. putida* (Tuleva et al., 2002), *P. putida* (Cuny et al., 2004), *P. stutzeri* G11 (Celik et al., 2008), *P. stutzeri* (Janiyani et al., 1992), *P. teessidae* (Rahman et al., 2009). *Pseudomonas* sp (Singh et al., 2009), *P. lurida* NARs9 (Mishra, 2009) y *P. aeruginosa* NY3 también con la capacidad de producir un nuevo ramnolípido (Maiqian Nie et al., 2010, *P. desmolyticum* NCIM-2112 es capaz también de producir ramnolípidos (Jadhav et al., 2011).

Aplicación y biosíntesis de ramnolípidos

En particular, los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* han sido estudiados para su aplicación en distintas áreas, que incluyen la descontaminación de suelos contaminados con petróleo, la eliminación de elementos potencialmente tóxicos (EPT) de suelos, recuperación terciaria de petróleo, en la industria cosmética, en la protección contra plagas y en la industria farmacéutica. Son también una fuente importante de L-ramnosa, que es usada en química fina y como materia prima para la síntesis de compuestos orgánicos. Aunque la función fisiológica de los ramnolípidos en *P. aeruginosa* no ha sido completamente establecida, se les ha considerado como factores de virulencia y antimicrobianos, además, se les ha implicado en el establecimiento de la estructura y en la disgregación de las biopelículas, así como en la movilidad tipo "swarming" de esta bacteria (Caiazza et al., 2005).

En términos generales, los principales ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* son el ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidroxidecanoato (mono-ramnolípido) y

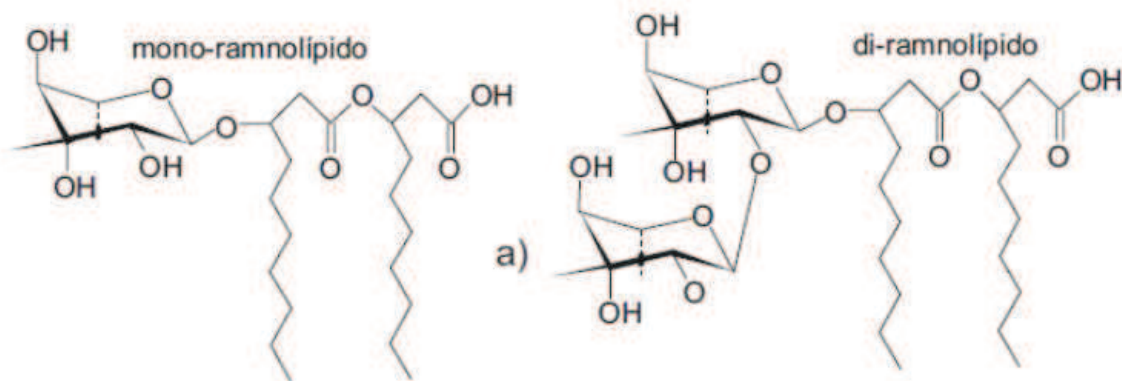


Figura 1. Estructura de los principales glicolípidos (mono y di-ramnolípidos)

el ramnosil-ramnosil- β -hidroxidecanoil- β -hidrodecanoato (di-ramnolípido). La biosíntesis de estos biosurfactantes fueron descritos por Burger et al. (1963). La biosíntesis de los ramnolípidos en *P. aeruginosa* ocurre a través de tres etapas secuenciales (Soberón Chávez et al., 2005): (1) la enzima RhlA (codificada por el gen *rhlA*) es involucrada en la síntesis del dímero de ácido graso (HAAs) del ramnolípido (Lépine et al. 2002; Déziel et al., 2003; Zhu y Rock 2008); (2) la ramnosiltransferasa RhlB se encuentra unida a la membrana (codificada por el gen *rhlB*) usa dTDP-L-ramnosa y la molécula de HAAs como precursores, el cual forman el monoramnolípido (Ochsner et al., 1994) y (3) estos monoramnolípidos a su vez son sustratos, junto con la dTDP-L-ramnosa, de la ramnosiltransferasa RhlC (codificada por el gen *rhlC*) para producir diramnolípido (Rahim et al., 2001) (véase figura 2). En *P. aeruginosa*, un operón bicistrónico *rhlAB*, codifica para las primeras dos enzimas, mientras que *rhlC* se halla en otro operón en el genoma. La transcripción de las enzimas responsables de la biosíntesis de ramnolípidos es regulada por RhlR (codificado por el gen *rhlR*); esta proteína actúa cuando está unido a su autoinductor C4-HSL (sintetizado por el gen *rhlI*), activa la expresión y cuando no está unido al autoinductor la reprime. La transcripción de *rhlR* es activada por el regulador transcripcional LasR (codificado por *lasR*), unido a su autoinductor 3O-C12-HSL (sintetizado por el gen *lasI*) (Williams y Cámara, 2009).

La producción de ramnolípidos por *P. aeruginosa* depende de factores nutricionales y ambientales, incluyendo limitaciones de nitrógeno, pH, y temperatura. La biosíntesis

ocurre durante la fase exponencial tardía y la fase estacionaria de crecimiento, típicamente bajo las condiciones de limitación de nitrógeno y fosfatos. (Soberón – Chávez G et al., 2005).

Los ramnolípidos reducen la tensión superficial del agua de 72 mN/m a 30 mN/m y la tensión interfacial del agua/aceite de 43 mN/m a valores por abajo de 1 mN/m. Las propiedades de los ramnolípidos dependen de su composición, distribución y determinado a su vez por la cepa bacteriana, las condiciones de cultivo y la composición del medio, principalmente la fuente de carbono (Jiménez et al., 2010).

Los ramnolípidos muestran la capacidad de emulsificar hidrocarburos y estabilizar emulsiones. Haba et al., (2000) reportaron que sobrenadantes obtenidos en medios de cultivo provenientes de diferentes aislamientos de *Pseudomonas sp* fueron capaces de emulsificar keroseno. Tales emulsiones permanecieron estables hasta por tres meses. Las emulsiones de *n*-alcanos, compuestos aromáticos, aceite crudo, keroseno, aceite de coco y de oliva fueron estabilizadas por los ramnolípidos, mostrando una estabilidad de entre 5 a 25% de estabilidad después de 24 horas dependiendo de la fuente de carbono (Haba et al 2000, Mohamed Sifour et al., 2007).

Características, aplicaciones y biosíntesis de lipopéptidos cíclicos

Los lipopéptidos son compuestos por un péptido que puede ser ciclados (pudiendo formar estructuras cíclicas) para formar un anillo lactona entre dos aminoácidos en la

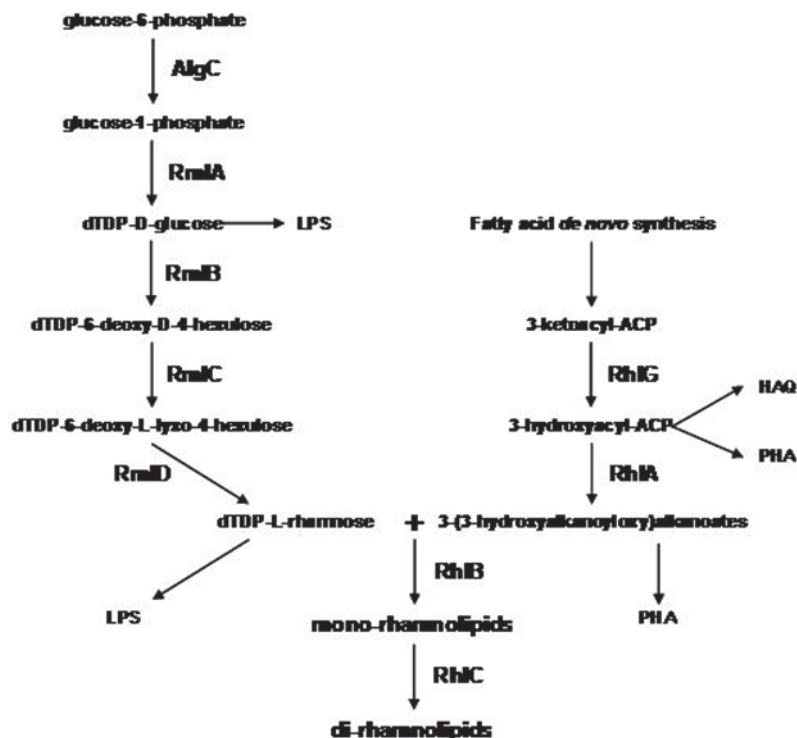


Figura 2. Biosíntesis de ramnolípidos (Soberón-Chávez, et al., 2005)

cadena peptídica y una cadena de ácido graso unida por el N-terminal del aminoácido. Ambos varían en tamaño, esta característica le proporcionan diferentes propiedades biológicas entre los diversos lipopéptidos estudiados, las cuales incluyen antifúngicos, fitotóxicos, antimicrobianos y reguladores de la formación de biopelículas, entre otras. (Hutchinson et al., 1995; Nielsen et al., 1999; Huber et al., 2002).

Los lipopéptidos son producidos por diversas especies de *Pseudomonas*, en la que se incluyen especies patógenicas y saprofitas. Estos compuestos juegan un papel importante en la virulencia y la motilidad de las bacterias (Nybroe y Sorensen, 2004; Raaijmakers et al., 2006). Los ciclolipopéptidos o CLP's producidos por *Pseudomonas* sp presentan actividad contra un amplio rango de microorganismos patógenos, entre los que se incluyen virus, micoplasmas y bacterias grampositivas. Su amplio espectro antimicrobiano ha sido explotado en el control biológico de hongos patógenos de plantas (Nybroe y Sorensen, 2004).

Los CLP's son producidos por un péptido sintetasa norribosomal (NRPS) los cuales poseen una estructura modular. Cada módulo está construido por bloques, resultado de la incorporación paso a paso de aminoácidos a la cadena peptídica. (Gewolb, 2002; Sieber y Marahiel, 2005). El orden y número de módulos de un NRPS en muchos casos, son secuencias colineares de aminoácidos que corresponden a una fracción del CLP. Los módulos pueden ser subdivididos de iniciación y elongación. Un módulo típico de elongación de NRPS consiste en un dominio de adenilación (A), responsable de la selección y activación de aminoácidos, un dominio de tiolación (T) responsable de la tioesterificación del aminoácido activado y por último un dominio de condensación (C) el cual sirve para la formación del enlace peptídico entre dos sustratos y así elongar la cadena peptídica. Los módulos de iniciación proveen el primer aminoácido para la síntesis del péptido y típicamente pierden un dominio C terminal (Finking y Marahiel, 2004). El dominio catalítico genera un péptido lineal el cual se fracciona y al final se ensambla por un dominio de tioesterasa (TE), la cual resulta en la liberación de un producto lineal o péptido cíclico vía reacción ciclización intramolecular. (Kohli et al., 2001; Sieber y Marahiel, 2005; Bruijn et al., 2007).

Basados en el tamaño y composición de la cadena de ácido graso y el péptido, los CLP's de las especies de *Pseudomonas* fueron clasificados en 4 grupos mayoritarios: viscosina, amfisina, tolasina y siringomicina. Los del grupo de la viscosina incluyen CLP's con nueve aminoácidos (viscosina, viscosinamida, masetolido A y D, pseudofomina A y B); esta clase son originados de diversos nichos ambientales; incluyen suelos, rizosfera, filosfera, así como ambientes marinos (Raaijmakers et al., 2006). Los CLP's del grupo de la amfisina, compuestos por tensina, amfisina, polipeptina A, lokisina y artrofactina (Henriksen et al., 2000; Sørensen et al., 2001), el péptido consta de once aminoácidos y se acopla con el ácido 3-hydroxidecanoico (3-HDA). El grupo de la tolasina que

incluyen tolasina, FP-B, corpeptina A, SP22 y SP25A, es un grupo muy diverso en cuanto a la composición y tamaño del péptido el cual varía de 19 a 25 aminoácidos, y el lípido puede ser 3-HDA o 3-hydroxioctanoico (3-HOA). La parte del péptido en este grupo contiene aminoácidos inusuales, incluyen ácido 2,3-dihidro-2-aminobutírico (Dhb) y homoserina (Hse), pudiendo el primer aminoácido estar siempre por delante de los residuos allo-Thr. La parte cíclica del péptido contiene cinco a ocho aminoácidos y el anillo de lactona es formado entre el C-terminal del aminoácido y el residuo de allo-Thr. Los lipopéptidos cíclicos del grupo de la tolasina son factores de virulencia producidos por *Pseudomonas* sp patógenas de plantas. Los CLP's del grupo de la siringomicina (incluyen a la siringomicina, siringotastina, siringotóxina, pseudomonicina A y cormicina A) estos muestran similaridad estructural con el grupo de la viscosina, pero contienen aminoácidos inusuales; Dhb, o 2,4-ácido diamino butírico (Dab) y el anillo de lactona es formado entre el N-terminal de la Ser y el C-terminal del 4-clorotreonina (Thr[4-Cl]), y el lípido puede estar compuesto por 3-hidroxi o 3,4-dihidroxi compuesto de 10 a 14 carbonos. Otro estudio reciente de estructuras de lipopéptidos cíclicos incluyen a la artrofactina producida por *Pseudomonas* sp MIS38, la cual contienen un péptido de once aminoácidos unido a una cadena de ácido graso β -hydroxidecanoil, y putisolvina I y II (Kuiper et al., 2004), el cual consiste en un péptido de 12 aminoácidos unido a una cadena lipídica de hexanóico. La ciclización de la putisolvina es diferente a otros péptidos, el anillo de lactona se forma entre el C-terminal y los residuos del noveno aminoácido en lugar del primer o tercer aminoácido (Raaijmakers et al., 2006). En otro estudio se demuestra la producción de un nuevo CLP's llamado entolisina, producido por *P. entomophila*, una bacteria entomopatogénica capaz de matar a *Drosophila melanogaster* después de su ingestión. Este nuevo CLP's contiene catorce aminoácidos unido a ácido 3-hydroxidecanoico (Vallet-Gely et al., 2010).

Características y biosíntesis de determinados lipopéptidos cíclicos

1 Artrofactina: La artrofactina producida por *Pseudomonas* sp MIS38, es el lipopéptido cíclico más potente reportado. Este péptido contiene once aminoácidos unidos a un ácido graso β -hydroxidecanoil. Basado en su estructura química, cae dentro del grupo de la amfisina y es muy similar a la lokisina (Raaijmakers, et al., 2006). Se han encontrado tres genes involucrados en la biosíntesis de la artrofactina sintetasa, *arfA*, *arfB* y *arfC*, en el cual forman el cluster y codifican para ArfA, ArfB y ArfC contiene dos, cuatro y cinco módulos funcionales respectivamente (un módulo es definido por una unidad que cataliza la incorporación de un aminoácido específico dentro del producto peptídico). Cada módulo presenta un dominio C de condensación (responsable de la formación del enlace peptídico entre dos aminoácidos consecutivos), un dominio A de adenilación (responsable de formar un reconocer y adenilación a expensa de ATP) y un dominio T de tio-

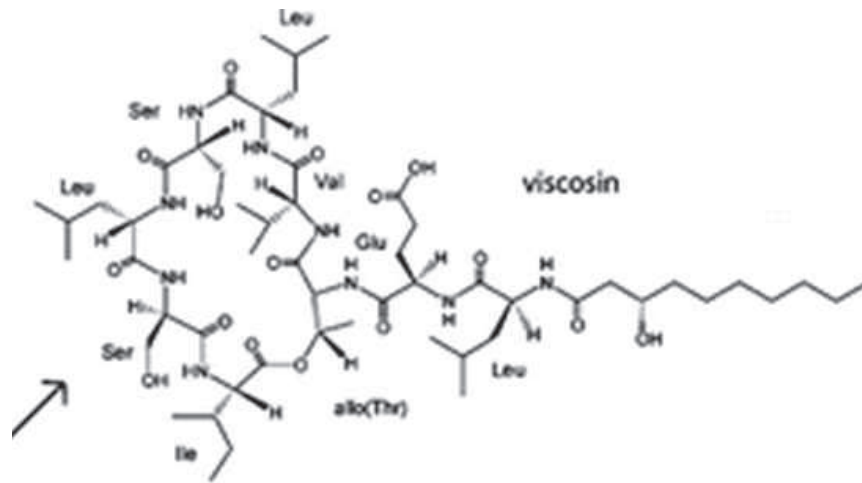


Figura 3. Estructura de la viscosina (Braun et al., 2001)

denilación (es un sitio que sirve para unir el co-factor 4-fosfopanteteino y un acarreador de intermediarios de aminoácidos tioesterificados). Sin embargo ninguno de los once módulos posee el dominio E de epimerización, responsable de la conversión de residuos de aminoácidos de la forma L a la forma D. Por lo tanto dos dominios tioesterasas son localizadas en tandem en el C-terminal al final de ArfC. El gen *arfB* se expresa en la producción de artrofactina (Roongsawang et al., 2003).

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

El control genético de la producción de la viscosina fue examinada en *P. fluorescens* PfA7B. Ésta bacteria causa perforaciones en las cabezas del brócoli. Es un potente biosurfactante y hace capaz a la bacteria de entrar en contacto íntimo con las cabezas de cera que son difíciles de mojar en el brócoli (ya que actúa como un agente humectante). En mutantes deficientes de producción de viscosina obtenidas por mutagénesis con Tn5 y analizadas por HPLC se observó que las mutantes Vis⁻ conservan su capacidad pectolítica, pero carecen de la capacidad de hacer perforación en los brócolis sanos a diferencia de la cepa silvestre (Braun et al., 2001, Palashpriya, et al., 2008), En mutantes triparentales complementadas con sus clones silvestres correspondientes y transformadas en *E. coli* HB101 (plásmido pPK2013), en las tres transconjugantes obtenidas disminuye su capacidad estable de producción de viscosina y causan decaimiento típico en el tejido del brócoli. Los mapas de estos clones y perfil de proteínas muestran una región de DNA cromosomal de 25 kb de *PfA7B* afectada en la producción de tres proteínas de alto peso molecular requeridas para su síntesis. Estas proteínas son de aproximadamente 218, 215 y 137 kDa respectivamente, y al parecer comprende un complejo sintetasa que se ensambla en un péptido de nueve aminoácidos de viscosina y subsecuentemente se une a un componente hidrofóbico (ácido graso) (Braun et al., 2001).

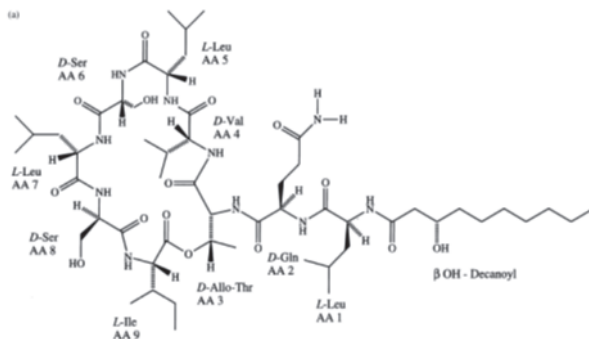


Figura 4. Estructura de la viscosinamida (Braun et al., 2001)

3. Viscosinamida: La viscosinamida es un nuevo antibiótico y biosurfactante, pertenece a la familia de los depsipéptidos cíclicos aislados de *Pseudomonas* sp. La estructura se asemeja a la viscosina (véase figura 4), aislada de *P. viscosa* y de *P. fluorescens* biovar II. La secuencia aminoácidos en este péptido es D-glutamato y D-glutamina en la viscosina y viscosinamida respectivamente. Su producción está relacionada con la fase inicial de crecimiento, según lo observado en *P. fluorescens* DR54, por lo que se le considera un metabolito primario y no secundario. Esto ha sido observado en otros biosurfactantes, en donde la producción puede estar vinculada a la proliferación celular y al crecimiento en vez de condiciones de estrés (Nielsen et al.,

1999).

La viscosamida se ha identificado como un determinante antagonico producido por *P. fluorescens* DR54 y ha demostrado que induce cambios fisiológicos en *Pythium ultimum* *in vitro*, la cual se ha detectado en muestras de la rizósfera. El impacto en el crecimiento y la actividad de *P. ultimum* se estudió por microscopia directa después de la tinción fluorescente. *P. fluorescens* DR54 causa reducción en la densidad del micelio, la formación de oósporas y actividad intracelular. Los estudios *in vitro* confirman que la viscosinamida purificada induce el enquistamiento de las zoosporas de *P. ultimum* (Thrane et al., 2000).

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

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

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

2001).

5. Lokisina: La lokisina fue aislada de *Pseudomonas* sp DSS41 como un agente de biocontrol antifúngico. Basado en estudios de NMR (resonancia magnética nuclear) y MS (espectrometría de masas), la lokisina fue tentativamente identificada como polipeptina (véase figura 5). Sin embargo, en análisis detallados de los constituyentes de aminoácidos determinado por cromatografía de gases reveló una diferencia de D-/L-leucina a una tasa de 3:2 y el alioisomero de treonina. Este biosurfactante representa una nueva variación estructural de lipoundecapéptido (Sørensen et al., 2002).

Además se ha reportado a *P. koreensis* 2.74 con capacidad de producir lokisina. La eficacia de este biosurfactante fue determinado y el extracto crudo fue usado contra el oomiceto de *P. ultimum*, en cultivos hidropónicos de tomate, observándose una reducción significativa de la enfermedad. La adición del biosurfactante no afecta la microflora de la raíz de la planta, esto se observó cuando solo se evaluó una fuente de carbono. Estos resultados confirman que los biosurfactantes son importantes en el desarrollo de estrategias de control biológico contra oomicetos (Hultberg et al., 2010). En otro estudio se aisló y caracterizó un nuevo linaje de *P. koreensis* M9b, M9c y CCB10 con capacidad de producir biosurfactante (probablemente lokisina) el cual tiene la capacidad de desplazar (competir) a las bacterias *Exiguobacterium aeriumticu* M5G y *B. subtilis* ATCC 6633 en caldo PPGly y en condiciones de laboratorio (Toribio Jimenez et al., 2011).

6. Siringomicina: Muchos aislamientos fitopatógenos de *P. syringae* pv *syringae* secretan un lipodepsipéptido cíclico con propiedades de actividad de amplio espectro antimicrobiano y antifúngico. La siringomicina (*syr*) y siringopéptina (*syp*) son un determinante clave en la virulencia de *P. syringae* pv. *syringae* B301D y B728a (Sørensen et al., 2001; Sørensen et al., 2002) que contribuyen al desarrollo de la enfermedad. La siringomicina es un péptido compuesto con una cabeza polar, con una secuencia Ser-D-Ser1-D-Dab-Dab-Arg- Phe-Dhb-(3-OH) Asp-(4-Cl)Thr, unida a una cola de ácido 3-hidroxidecanoico y 3-hidroxitetradecanoico (Segre et al., 1989). Se han detectado y caracterizado cuatro genes involucrados en la biosíntesis de la siringomicina *syrB*, *syrC*, *syrD*, y *syrP*, que abarcan aproximadamente una región de 7 Kb. El gen *syrB* muestra alta similaridad con dominios de unión a la péptido sintetasa *syrC*, la cual codifica para una enzima parecida a la tioesterasa *syrD* y se transcribe en orientación opuesta con respecto a *syrB* y *syrC*, además codifica para una proteína similar a la súper familia de proteínas involucradas en la secreción específica y puede estar implicada en la secreción de la siringomicina a través de la membrana citoplasmática. Finalmente, *syrP*, es localizada entre *syrB* y *syrD*, y exhibe similaridad con la región de fosfotransferasa de histidina cinasa y puede participar en un mecanismo de fosforilación de transducción de señales que controle la síntesis de siringomicina y promueve la virulencia de *P. syringae* (Guenzi. et al., 1998, Wang et al., 2006). Los genes *syr-syp* son coordinados por SalA y SyrF en respues-

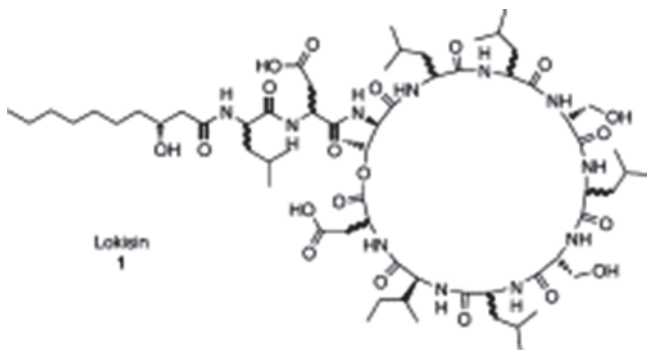


Figura 5. Estructura de la lokisina (Sørensen et al., 2002)

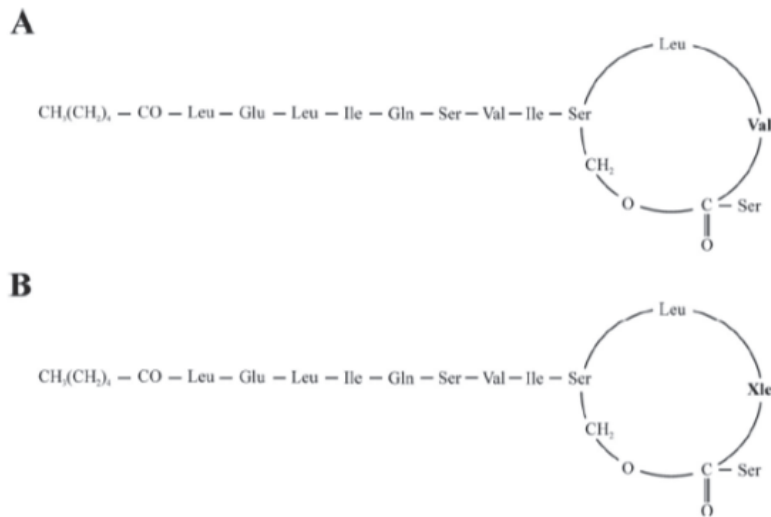


Figura 6. Estructura de la putisolvina; A) Putisolvina I; B) Putisolvina II. (Kuiper et al., 2004)

ta a las condiciones ambientales (Wang et al., 2006).

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

8. Putisolvina: Es producida por *P. putida* PCL1445, crece en suelos contaminados con metales pesados y con hidrocarburos aromáticos (PAHs) (Kuiper et al., 2001). *P. putida* PCL1445 es un colonizador eficiente de raíz y puede proliferar en productos de degradación del naftaleno y fenantreno. Es capaz de formar biopelículas en la superficie de las raíces de plantas y en PVC (Kuiper et al., 2001).

Esta cepa produce dos lipodepsipéptidos cíclicos, llamados putisolvina I y II, cada uno contiene un lípido hexanoico unido al N-terminal del péptido de doce aminoácidos, en el cual el C-terminal del grupo carboxilo forma un enlace estér con el hidroxilo de la cadena de Ser-9 (Kuiper et al., 2004). La diferencia entre las dos estructuras es localizada en el segundo aminoácido del C-terminal, el cual para la putisolvina I es Val y Leu/Ile para putisolvina II respectivamente (véase figura 6).

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

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

Con el fin de identificar los genes y características involucradas en la regulación de la producción de la putisolvina por PCL1445, se generó una biblioteca de Tn5*luxAB* y las mutantes fueron seleccionadas por la pérdida de la producción de biosurfactante usando el método de la gota colapsada (Bodour Maier, 1998). El análisis de secuencias de las regiones flanqueantes del Tn5*luxAB* de una

mutante PCL1627, muestra que la inserción del Tn fue insertada en una región homóloga al *dnaK*, la cual es localizada río abajo de *grpE* y río arriba de *dnaJ*. El análisis de la producción de la putisolvina y de expresión indican que *dnaK*, junto con *dnaJ* y *grpE* son genes de choque térmico, que participan de manera positiva en la regulación (directa o indirectamente) de la biosíntesis de putisolvina a nivel transcripcional. El crecimiento de PCL1445 a bajas temperaturas resulta en un incremento en los niveles de producción de putisolvina. Además, la biosíntesis de PCL1445 es dependiente del sistema de señalización de dos componentes GacA/GacS, ya que en los análisis de expresión indican que *dnaK* es regulado positivamente por GacA/GacS (Dubern et al., 2005).

Las moléculas de putisolvina I y II son secretadas al medio de cultivo durante la fase exponencial tardía de crecimiento, indicando que su producción probablemente sea regulada por *quorum sensing* (percepción de quórum [PQ]). Para comprobar esto se identificaron los genes del sistema de quórum en *P. putida* PCL1445, los cuales incluye a *ppuI*, *rsaL* y *ppuR* mostrando alta similaridad con un clúster de genes en cepas de *P. putida* IsoF y WCS358, respectivamente (Steidle et al., 2002; Bertani and Venturi, 2004.). Las cepas con mutaciones en *ppuI* y *ppuR* muestran una reducción severa en la producción del biosurfactante. En el análisis de expresión de los genes biosintéticos, el gen *ppuI* muestra una expresión deficiente, la cual se complementa con la adición sintética de 3-oxo-C₁₀-N-acilhomoserina lactona (3-oxo-C₁₀-AHL) o 3-oxo-C₁₂-AHL al medio. En mutantes *rsaL* sobreproductoras de AHLs, la producción de putisolvina es inducida durante la fase de crecimiento temprano. El análisis de formación de biopelículas en PVC muestra que mutantes en *ppuI* y *ppuR* producen un biofilm denso a diferencia de la cepa silvestre, lo cual correlaciona con un decremento en la producción de putisolvina, y en mutantes *rsaL* existe un retraso en la formación del biofilms, lo cual correlaciona con la producción temprana de putisolvina. Estos resultados demuestran que las señales de QS inducen la producción de putisolvina I y II, y controlan la formación de biofilms por *P. putida* (Dubern et al., 2006).

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

Condiciones de producción de lipopéptidos cíclicos

Existe un gran número de investigaciones que demuestran que la sobreproducción de biosurfactantes por *Pseudomonas sp.*, se lleva a cabo una vez que los cultivos llegan

a fase estacionaria de crecimiento (Guerra-Santos et al., 1986; Mulligan y Gibbs., 1989; Venkataramana y Karanth., 1989). En *P. fluorescens*, la producción de biosurfactante generalmente requiere una baja concentración de oxígeno y nitrógeno en cultivos líquidos (Persson et al., 1988). La limitación de cationes multivalentes también causa una sobreproducción de biosurfactantes. Las limitaciones de hierro estimulan la producción de biosurfactante en *P. fluorescens* (Persson et al., 1990a, 1990b). Las fuentes de carbono juegan un importante papel en el peso y la estructura. La producción de viscosina es óptima *in vitro* en un medio que contenga glicerol como fuente de carbono para su síntesis (Georgiou et al., 1992). Tipos diferentes de biosurfactante pueden ser producidos por especies bacterianas dependiendo de la fuente de carbono y otros nutrientes disponibles (Desai et al., 1988).

Métodos usados para la detección de bacterias productoras de biosurfactantes:

Para estudiar la producción de biosurfactante, es necesario un método rápido, sensible y preciso para su detección. Una variedad de diferentes métodos han sido descritos para la detección de microorganismos potencialmente productores, los que se enumeran a continuación:

(1). Van Der Vegt et al., (1991) desarrollaron un método asimétrico para el análisis de la gota colapsada (ADSA) para la evaluación de microorganismos productores de biosurfactantes. En esta técnica, las gotas de medio de cultivo se colocan en una superficie de fluoroetileno-propileno. La tensión superficial es calculada a partir de los perfiles de las gotas colapsadas por ADSA. Solamente las bacterias productoras de biosurfactante en suspensión muestran reducción en la tensión superficial.

(2). Siegmund y Wagner (1991), describen una estimación colorimétrica de biosurfactantes bajo el principio de que los tensoactivos aniónicos reaccionan con el catión indicador formando un complejo de color característico. Ya que la cantidad de biosurfactante está en relación directa con el diámetro del halo, este método puede ser tanto cuantitativo como cualitativo. Shulga et al., (1993) y Hansen et al., (1993) desarrollaron este método para la detección de bacterias productoras de ramnolípidos degradadores de hidrocarburos.

(3). Una prueba desarrollada por Hildebrand (1989), en la cual una gota de agua se colapsa cuando es adicionada a una suspensión bacteriana productora de biosurfactante. Jain et al. (1991) colocaron una gota de suspensión bacteriana en una superficie cubierta de aceite. En este método, las gotas que contienen biosurfactante se colapsan y las que no contienen permanecen estables.

(4). Otra técnica utilizada es la cromatografía directa en capa fina (TLC) para la caracterización rápida de bacterias que producen biosurfactantes y descrito por Matsuyama et al., (1987). Con esta técnica, se identificaron los biosurfactante en *Serratia marscescens* mediante la aplicación de una sola colonia bacteriana directamente en placa de TLC sin ninguna preparación previa de la muestra.

(5). Por reducción de la tensión de la superficie de una

solución, mediante la cuantificación exacta de la tensión superficial en presencia de biosurfactante. Las determinaciones se basan evaluando los cambios en la tensión superficial e interfacial, por estabilización o desestabilización de emulsiones, y su balance hidrofílico-lipofílico (HLB). La tensión superficial en la interface del aire/agua y aceite/agua pueden ser fácilmente medible con un tensiómetro. La tensión superficial del agua destilada es de 72 mN/m. Cuando un agente tensoactivo se añade al aire/agua o aceite/agua en concentraciones crecientes, se observa una reducción en la tensión superficial hasta un nivel crítico, por encima del cual las moléculas anfifílicas se asocian rápidamente hasta formar estructuras moleculares parecida a micelas, bicapas y vesículas. Este valor se conoce como Concentración Micelar Crítica (CMC) y se define como la concentración mínima de surfactante a partir del cual se forman micelas espontáneamente en una solución y es comúnmente usada para medir la eficiencia de un surfactante (Rosen, 2004).

(6). Bunster et al., (1989) estudiaron la actividad de superficie de las bacterias, mediante la medición de los ángulos de contacto obtenidos después de adición de las bacterias a una gota de agua. El ángulo de contacto es ubicado en la interface entre la gota y la superficie sólida. En ausencia de surfactante, las moléculas de agua se adhieren fuertemente entre sí, por lo que la gota conserva una apariencia redonda con un ángulo de contacto de más de 90°, mientras que en la presencia de biosurfactante, las fuerzas de adherencia se reducen causando un colapso de la gota creando un ángulo de contacto de menos de 90°.

(7). Detección de la actividad hemolítica, esta prueba de detección es cualitativa para la detección de microorganismos productores de biosurfactante, para esta se usa agar LB o nutritivo, suplementado con 5% de sangre de carnero fresca (Carrillo et al., 1996; Banat, 1993). Los microorganismos son inoculados e incubados a temperatura óptima durante 48h. Una hemólisis se observa visualmente y puede ser indicativo de la lisis celular debido a la ruptura de la membrana, causada por la presencia de sustancias activa de superficie.

(8). Método de dispersión en aceite: en este método se adicionan 10 µl de caldo de cultivo sobre una capa de aceite crudo (20 µl) en 50 ml de agua destilada. Posteriormente se agrega sobre la superficie cubierta de agua con aceite. La presencia de un halo emulsionado es indicador de presencia de biosurfactantes. Este es un método sensible que permite detectar bacterias con esta capacidad (Morikawa et al., 2000).

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

mililitro (EU/ml) (Patil and Chopade, 2001a, b; 2003).

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

(11). Ensayo de turbidez, este método fue desarrollado por Rosenberg et al. (1979) y posteriormente fue modificado por Neua and Porralla (1990). El caldo de cultivo filtrado y secado se re suspende en una solución buffer. Se mide la DO a 446 nm. Para esto, se adiciona hidrocarburo y se agita vigorosamente por 2 min, se deja reposar por 10 min y se vuelve a medir la DO. La diferencia en turbidez se determina midiendo las diferencias entre a DO inicial y la final.

(12). Métodos moleculares para identificar los genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes. La búsqueda directa de genes involucrados en la producción de biosurfactantes es rápida y menos laboriosa. Invenciones más recientes como las de Whiteley, Lee et al., (1999) pueden ser usados para identificar moduladores y genes involucrados en el sistema de PQ en bacterias productoras de biosurfactantes. Nuevas cepas y vectores han sido diseñados con éxito para evaluar la producción de biosurfactantes.

1 Métodos de recuperación y/o purificación de biosurfactantes:

Una de las limitantes para la producción de biosurfactantes en escala piloto y semi-piloto se basa en el alto costo de la recuperación el cual llega a representar hasta el 60% del costo total de producción. Para reducir los costos se requiere la utilización de sustratos renovables y de bajo costo (Desai y Banat, 1997; Banat, et al., 2000; Makkar y Cameotra, 1997). Durante todos estos procesos el riesgo de contaminación con compuestos no deseados del proceso de fermentación es latente. Una fuente potencial de contaminación es la espuma producida durante la fermentación, por lo que se debe elegir con cuidado un anti espumeante que no afecte la estructura del biosurfactante y no sea tóxico para la bacteria. La carga iónica (cromatografía), la solubilidad (agua/solvente orgánico) y localización (si es intracelular, extracelular o pegada a la célula) determinan el procedimiento de obtención del biosurfactante de interés. En el caso de moléculas de alto peso molecular, la obtención y purificación se obtiene por precipitación usando sulfato de amonio, seguido por diálisis para remover pequeñas moléculas (Desai y Desai, 1993., Barck y Steinius, 1994). Otros métodos también involucran el uso de ácido tricloroacético (TCA), la precipitación con acetona, etanol y cloroformo/metanol. Diversos métodos convencionales conocidos para la recuperación de biosurfactantes son mencionados más adelante. (1) Precipitación con acetona en el que el sobrenadante libre de células es mezclado

con acetona fría para precipitar emulsionantes, el cual después es re-suspendido en un buffer de fosfatos. La mezcla es incubada a 4°C por 15 a 20 h para el precipitado del emulsificador. El biosurfactante es analizado por su capacidad emulsificante, fracción proteica y polisacárido. Este método ha sido usado en diversos trabajos, para purificar biosurfactantes (Rosenberg et al., 1979; Patil y Chopade, 2001a, b; 2003). (2) Precipitación con etanol: es similar a la acetona, el etanol es un solvente popular para obtener extracto crudo de bioemulsionadores del sobrenadante de *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Cyanobacterium* y especies de levaduras. El medio de cultivo es centrifugado a 11,000g/20min/4°C y el biosurfactante es precipitado del sobrenadante usando etanol frío. Phetrong et al., (2008), hallaron una mayor eficiencia por precipitación del emulsificador de *A. calcoaceticus* subsp *anitrus* SM7 con este método comparado con otros. (3) Precipitación con sulfato de amonio; este sirve para precipitar biosurfactante de alto peso molecular como es el caso del emulsan. Este método fue introducido por Rosenberg et al., (1979) para precipitación de biosurfactantes de *Arthrobacter* RAG-1. Para este fin, se agrega 30% de (NH₄)₂SO₄ directamente al medio de cultivo sin remover las células y se deja reposar toda la noche. Después el precipitado es suspendido en 3% de (NH₄)₂SO₄ saturado y centrifugado hasta que el sobrenadante sea clarificado. Posteriormente se agrega (NH₄)₂SO₄ a una concentración final de 40%. El precipitado resultante es centrifugado y extraído con éter. Kaplan y Rosenberg (1982), obtuvieron biosurfactante de *A. calcoaceticus* BD413 por incremento sucesivo de (NH₄)₂SO₄ agregado a extractos libre de células. (4) Precipitación ácida; este método es fácil, económico y rápidamente disponible para recuperar crudo como la surfactina, lipopéptidos, glicolípidos, etc. La hidrólisis ácida usa HCl concentrado para bajar el pH hasta 2.0 de insolubles a pH bajos (Mukherjee, Das, y Sen, 2006), precipita proteína y lípidos contenidos en los biosurfactantes a 4°C (Cooper et al., 1981). La muestra se centrifuga y el pellet obtenido es extraído usando varios solventes (Nitschke y Pastore, 2006; Thaniyavarn et al., 2003). El material extraído es filtrado para remover residuos y evaporado hasta secar completamente en un rotavapor. Los lipopéptidos de microorganismos que desarrollan en medios simples o complejos son purificados también por este método. En el caso de los ramnolípidos el sobrenadante es hidrolizado con HCl para precipitar glicolípidos, lo cual son convertidos en insolubles en solución acuosa. Durante la acidificación, el biosurfactante presente es protonado, lo cual lo hace menos soluble en agua. Los métodos de acidificación, centrifugación y extracción son aplicables a otros glicolípidos. Sin embargo, diferentes solventes, cloroformo, metanol y acetato de etilo son usados generalmente para purificar ramnolípidos. La fase orgánica es removida y se mezcla con Na₂SO₄ para remover el agua y puede ser concentrado en un rotavapor a 40°C para obtener el extracto crudo. Los residuos son disueltos en NaHCO₃ para purificar el biosurfactante. El número de publicaciones reportando la purificación de ramnolípidos por precipitación ácida ha ido en aumento (Haba et al.,

2000; Smyth et al., 2009a). Otras moléculas como los sofolípidos (Nunez et al., 2001), lípidos de trealosa, lípidos de mannosylerytritol (MELs) (Rapp et al., 1979), son extraídos de forma similar que los ramnolípidos.

2 Métodos de caracterización de biosurfactantes:

La caracterización preliminar del biosurfactante se realiza mediante una cromatografía en capa fina (TLC), esta es una de las técnicas más comunes para detectar biosurfactante, y se basa en el principio de competencia de solutos con el solvente en los sitios de superficie del adsorbente. Los compuestos son distribuidos en la superficie del adsorbente. Cada muestra es separada en la placa para evitar contaminación cruzada con otra. Para detectar biosurfactante, se utiliza un sistema de solventes dependiendo el tipo de compuesto de interés. Los solventes orgánicos e inorgánicos en los que puede ser disuelto y no volátiles son los que se prefieren. Los solventes que no pueden ser usados en HPLC, detección de UV por su interferencia pueden ser usados en el TLC. Algunos como el ácido acético, diétil éter, acetato de etilo, n-hexano y pirimidina son necesarios para mover los grupos funcionales del biosurfactante. La detección de los spots de las muestras en las placas de TLC, pueden ser determinadas por técnicas destructivas y no destructivas, las no destructivas tenemos la iodina, métodos con agua y radiación UV, las destructivas involucra el uso de H₂SO₄, orcinol, y ninhidrina para la detección de carbohidratos, lípidos y proteínas (Costa et al., 2006., Desai y Banat., 1997., Ellaiah et al., 2002., Gunther et al 2000, Arutchelvi y Doble., 2010).

Los biosurfactantes de alto peso molecular son analizados por ensayos colorimétricos (Lowry's, Bradford), espectrometría de masas (MS) y técnicas de secuenciación. El contenido de ácidos grasos y secuenciación del péptido es determinado con la ayuda de un equipo automatizado de degradación de EDMAN y espectrómetro de masas. La combinación de todas estas diferentes metodologías es importante para predecir la estructura completa del biosurfactante.

3 Determinación del contenido de proteína-lípidos

Los biosurfactante de alto peso molecular por lo general contienen lipoproteínas, proteínas, polisacáridos, lipopolisacáridos o combinación de estas. Las proteínas son cuantificadas por el método de Lowry (Lowry et al., 1951) y Bradford (1976) y es usado por varios investigadores.

4 Uso de proteasas para la digestión de proteínas

La identificación de la secuencia de aminoácidos de la proteína, no siempre es posible debido a la incapacidad de obtener mediciones precisas de proteínas más grandes, por lo que la degradación de EDMAN y la MS son más factibles para el análisis de estructura de péptidos pequeños. Es necesaria la digestión de la proteína en pequeños péptidos de 6 a 20 aminoácidos para ser analizadas por EDMAN y MS/MS con la finalidad de proporcionar información necesaria para identificar y reconstruir la estructura de la protei-

na completa. Las proteasas son usadas para la digestión, se usa tripsina por ejemplo que rompe las proteínas en los residuos de lisina y arginina en la dirección del C-terminal. Otras proteasas pueden ser usadas para ayudar a determinar el orden de secuencia de cada péptido (Strader et al., 2006 y Smyth et al., 2009b).

5 Electroforesis en geles de poliacrilamida-Dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)

Este método sirve para separar y determinar el peso molecular de la molécula del biosurfactante, involucra el uso de electroforesis, en el cual la muestra es aplicada en un buffer de carga que contiene un buffer y SDS. El papel del buffer de reducción es romper los enlaces de disulfuro para facilitar la disposición lineal de la proteína. Seguido por la unión del SDS a la proteína (dependiendo de la masa molecular) para crear una proteína cargada negativamente. Bajo la influencia de la corriente eléctrica, las proteínas (dependiendo de la masa molecular) son separadas. Cada proteína puede ser eludida, removida y extraída de la banda (Toren et al., 2001).

6 Ensayos colorimétrico para detección y cuantificación de glicolípidos

Los glicolípidos son cuantificados por el desarrollo de color usando la prueba de antrona u órcinol. Estos ensayos detectan y cuantifican los glicolípidos presentes después de la acidificación y calentamiento de la ramnosa, la cual forma un color con el reactivo, se usa una curva de calibración de ramnosa o ramnolípidos de 0-50 mg/dl (Hodge y Hofreiter, 1962). Las moléculas de ramnosa de los ramnolípidos reaccionan con el H₂SO₄ y órcinol (1,3-dihidroxi-5-metilbenceno) a altas temperaturas (30 min/80°C) y es cuantificado a 421 nm (Koch et al., 1991).

7 Caracterización química de los biosurfactante

Existen varios métodos llamados: TLC, HPLC (Cromatografía Líquida de Alta Afinidad), IR (Infrarrojo), GC-MS (Cromatografía de Gases-Espectrómetro de Masas), NMR (Resonancia Magnética Nuclear) y FAB-MS (Bombardeo Atómico Rápido-Espectrómetro de Masas). El HPLC, consiste en una fase móvil, fase estacionaria y un detector. La fase móvil lleva la muestra en solución y es inyectada a través del inyector. La fase estacionaria es un sólido, sobre el cual la fase móvil fluye continuamente los componentes de la muestra. Los componentes migran acorde a las interacciones no covalentes de los compuestos de la columna. El detector emite respuesta a la elución de la muestra y subsecuentemente señales en picos en el cromatograma. La cromatografía de gases GC-MS constituye un poderoso instrumento en la determinación de los componentes de una muestra, al permitir tanto la separación de éstos como su detección individual. El espectro de masas (MS) de un compuesto puro ofrece valiosa información para fines de identificación cualitativa, siendo la determinación del peso molecular lo más importante, si bien la

fragmentación de la molécula puede ayudar en gran medida a la identificación del compuesto (Yakimov et al., 1995). El análisis de infrarrojo (IR): consiste en la aplicación de una fuente de radiación infrarroja, la cual cubre el rango del espectro entre 0.78 y 1000 nm. La absorción de IR es restringida a compuestos con pequeña energía en los estados vibracional y rotacional. Esta técnica determina los grupos funcionales de muestras; gases, líquidos y sólidos, y apoya a la elucidación de la estructura del compuesto (Heyd et al., 2008). La surfactina, liquesina y ramnolípidos han sido caracterizados por esta técnica (Das, 2008; Mukherjee, 2008; Sen, 2008). El análisis por NMR; se basa en la transición de átomos con un momento magnético cuando un campo magnético externo se aplica. La NMR proporciona información sobre los grupos funcionales, así como la posición de los vínculos dentro de las moléculas de carbohidratos y lípidos. Es posible obtener la ubicación exacta de cada grupo funcional así como la información de los isómeros estructurales. El método de FAB-MS es un método de ionización suave que requiere una sonda de inserción directa para la introducción de la muestra. La muestra del biosurfactante se disuelve en metanol, se mezcla con la matriz y se utiliza para el análisis. El grupo de investigación de Manso Pajarrón et al., (1993) han identificado mezclas de ramnolípidos utilizando este método. Es importante mencionar que los requisitos de tiempo para llevar a cabo algunas de la extracción, purificación y análisis de algunos de los procedimientos descritos anteriormente pueden ser afectadas por varios factores tales como volumen de muestra, la presencia de carbono residual o la producción de otros sustratos como el petróleo, mezclas o complejas composiciones medio (Satpute et al., 2010).

Conclusiones

Basados en esta revisión, los biosurfactantes producidos por especies del género *Pseudomonas*, principalmente las asociadas a plantas son ampliamente diversos, en estructura, y en actividad biológica. Aunque se han identificado un gran número de genes involucrados en la biosíntesis de biosurfactantes, aun en varios de ellos se desconoce su regulación de producción en este género. Se conoce mucho en cuanto a la producción, biosíntesis, regulación y aplicaciones de los ramnolípidos, y se desconocen algunos de estos puntos en los lipopéptidos cíclicos. Se debe dar mayor énfasis en las bacterias que tienen la capacidad de producir biosurfactante, utilizar los métodos correctos para su identificación y elucidación de la estructura, así como las posibles aplicaciones ambientales (biocidas, biocontrol, biorremediación, etc) con la finalidad de usar estas tecnologías compatibles con el medio ambiente. Se debe considerar el uso de fuentes de carbono de bajo costo y renovables, así como continuar la investigación dirigida hacia el análisis y explotación de la secuencia de los genomas de las bacterias productoras, lo cual permitirá la comprensión de la síntesis, regulación y actividad de los biosurfactante producidos por *Pseudomonas sp.*

Referencias

- Abdel-Mawgoud, A. M., Lepine, F., Deziel, E., (2010). Rhamnolipids: diversity of structures, microbial origins and roles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86, 1323–1336.
- Abdel-Mawgoud, A. M., Hausmann, R., Lépine, F., Müller, M. M., y Déziel, E., (2011). Rhamnolipids: detection, analysis, biosynthesis, genetic regulation and bioengineering of production. En: Sobéron-Chavez, G. (Ed.), *Biosurfactant, 1st edition*, VII 216 pp. Springer, Berlin, pp. 13–55.
- Abouseoud, M., Maachi, R., Amrane, A., Boudergua, S. y A. Nabi. (2008a). Evaluation of different carbon and nitrogen sources in production of biosurfactant by *Pseudomonas fluorescens*. *Conference on Desalination and the Environment*. Sani Resort, Halkidiki, Greece, pp 143-151.
- Abouseoud, M., Yataghene, A., Amran, A. y Maachi, R. (2008b). Biosurfactant production by free and alginate entrapped cells of *Pseudomonas fluorescens*. *J Ind Microbiol Biotech*, 35, 1303-1308.
- Alsohim, A. S., Taylor, T. B., Barrett, G. A., Gallie, J., Zhang, X. X., Altamirano-Junqueira, A. E., Johnson, L. J., Rainey, P. B. y Jackson, R. W. (2014). The biosurfactant viscosin produced by *Pseudomonas fluorescens* SBW25 aids spreading motility and plant growth promotion. *Environ Microbiol*, 6(7), 2267-81.
- Banat, I. M., Makkar, R. S. y Cameotra, S. S. (2000). Potential commercial applications of microbial surfactants. *Appl Microbiol Biotechnol*, 53, 495-508.
- Banat, I. M. (1993). The isolation of a thermophilic biosurfactant producing *Bacillus sp.* *Biotechnol Lett*, 15(6), 591-594.
- Barck, M. y Stenius, P. (1994). Interactions between carboxymethyl cellulose and cationic surfactants I. Phase equilibria and surface tensions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 89(1), 59-69.
- Bassarello, C., Lazzaroni, S., Bifulco, G., Cantore, P. L., Iacobellis, N. S., Riccio, R., Gomez-Paloma L. y Evidente, A. (2004). Tolaasins A-E, five new lipodepsipeptides produced by *Pseudomonas tolaasii*. *J. Nat. Prod.*, 67, 811-816.
- Benincasa, M., Abalos, A., Oliveira, I. y Manresa, A. (2004). Chemical structure, surface properties and biological activities of the biosurfactant produced by *Pseudomonas aeruginosa* LBI from soapstock. *Antonie Van Leeuwenhoek Int J Gen Mol Microbiol*, 85, 1-8.
- Benincasa, M. y Accorsini, F. R. (2008). *Pseudomonas aeruginosa* LBI production as an integrated process using the wastes from sunflower-oil refining as a substrate. *Bioresour Technol*, 99(9), 3843-9.
- Ben J. Duijff, W. Meijer, P. J., Bakker A. H. M. y Schippers, B. (1993). Siderophore-mediated competition for iron and induced resistance in the suppression of fusarium wilt of carnation by fluorescent *Pseudomonas* spp. *Neth. J. Pl. Path.*, 99, 277-289.
- Bergström S., Theorell, H. y Davide, H. (1946). On a metabolic product of *Ps. pyocyanea*, pyolipic acid, active against *Myobact. tuberculosis*. *Ark. Kem. Mineral Geol*, 23A, 1-12.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for quantification of microorganism quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Ana Biochem*, 76: 248-254.
- Braun, V. (1997). Surface signaling: novel transcription initiation mechanism starting from the cell surface. *Arch. Microbiol*, 167, 325-331.
- Bruijn I., Maarten, J. D., de K Meng., Y., de Waard, P., van Beek, T. A. y Raaijmakers, J. M. (2007). Genome-based discovery, structure prediction and functional analysis of cyclic lipopeptide antibiotics in *Pseudomonas* species. *Molecular Microbiology*, 63(2), 417-428.
- Bunster L, Fokkema, N. J. y Schippers, B. (1989). Effect of surface-active *Pseudomonas* spp. on leaf produced by *Pseudomonas marginalis*. *Canadian Journal of Microbiology*, 42 (3), 243-251.
- Burch, A. Y., Zeisler, V., Yokota, K., Schreiber, L. y Lindow, S. E. (2014). The hygroscopic biosurfactant syringafactin produced by *Pseudomonas syringae* enhances fitness on leaf surfaces during fluctuating humidity. *Environ Microbiol*. 16(7), 2086-98.
- Burd, G., y Ward, O. P. (1997). Energy-dependent accumulation of particulate biosurfactant by *Pseudomonas marginalis*. *Can J Microbiol*, 43, 391-94.
- Cameotra, S. S. y Bollag, J. M. (2003). Biosurfactant-enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Crit. Rev. Env. Sci. Tec*, 33, 111-126.
- Carrillo, P. G., Mardaraz, C., Pitta-Alvarez, S. I. y Giuliett, A. M. (1996). Isolation and selection of biosurfactant producing bacteria. *World J Microbiol Biotechnol*, 12, 82-84.
- Caiazza, N. C., Shanks, R. M. Q., y O'Toole, G. A. (2005). Rhamnolipids modulate swarming motility patterns of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol*, 187, 7351–7361.
- Celik, G. Y., Aslim, B. y Beyatli, Y. (2008). Enhanced crude oil biodegradation and rhamnolipid production by *Pseudomonas stutzeri* strain G11 in the presence of Tween-80 and Triton X-100. *J Environ Biol*, 29, 867-870.
- Chayabutra, C., Wu, J. y Lu-Kwang, J. (2001). Rhamnolipid production by *Pseudomonas aeruginosa* under denitrification: effects of limiting nutrients and carbon substrates. *Biotechnol. Bioeng*, 72, 25-33.
- Cho, K. H., Wang, H. S. y Kim, Y. K. (2010). Temperature-dependent hemolytic activity of membrane pore-forming peptide toxin, tolaasin. *J Pept Sci*, 16(2), 85-90.
- Coiro, V. M., Segre, A. L., Di Nola, A., Paci, M., Grottesi, A., Veglia, G. y Ballio, A. (1998). Solution conformation of the *Pseudomonas syringae* MSU 16H phytotoxic lipodepsipeptide Pseudomicina A determined for computer simulations using distance geometry and molecular dynamics from NMR data. *Eur J Biochem*, 257, 449-56.
- Cooper, D. G., Macdonald, C. R., Duff, S.J. y Kosaric, N. (1981). Enhanced Production of Surfactin from *Bacillus subtilis* by Continuous Product Removal and Metal Cati-

- on Additions. *Appl Environ Microbiol*, 42, 408-412.
- Costa S.G., Nitschke, M., Haddad, R., Eberlin, M. N. y Contiero, J. (2006). Production of *Pseudomonas aeruginosa* LBI rhamnolipids following growth on Brazilian native oils. *Process Biochem*, 41, 483-488.
- Costa S.G., Lépine, F., Milot, S., Déziel, E., Nitschke M. y Contiero J. (2009). Cassava wastewater as a substrate for the simultaneous production of rhamnolipids and polyhydroxyalkanoates by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 36(8), 1063-72.
- Cuny, P., Acquaviva, M. y Gilewicz, M. (2004). Phenanthrene degradation, emulsification and surface tension activities of a *Pseudomonas putida* strain isolated from a coastal oil contaminated microbial mat. *Ophelia*, 58, 283-287.
- D'aes, J., Hua, G. K., De Maeyer, K., Pannecouque, J., Forrez, I., Ongena, M., Dietrich, L. E., Thomashow, L. S., Mavrodi, D. V. y Hofte, M. (2011). Biological control of Rhizoctonia root rot on bean by phenazine and cyclic lipopeptide-producing *Pseudomonas* CMR12a. *Phytopathology*, 101, 996-1004.
- Das, P., Mukherjee, S. y Sen, R. (2008). Antimicrobial potential of a lipopeptide biosurfactante derived from a marine *Bacillus circulans*. *J Appl Microbiol*, 104, 1675-1684.
- Desai, A. J., Patel, K. M., y Desai, J. D. (1988). Emulsifier production by *Pseudomonas fluorescens* during the growth on hydrocarbons. *Current Science*, 57(9), 500-501.
- Desai, J. D. y Banat, I. M. (1997). Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61, 47-64.
- Desai, J. D. y Desai, J. A. (1993). Production of biosurfactants. En N. Kosaric (ed.), *Biosurfactants*. Marcel Dekker, New York, pp. 65-97.
- Déziel, E., Lépine, F., Milot, S. y Villemur, R. (2003). *rhlA* is required for the production of a novel biosurfactant promoting swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*: 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acids (HAAs), the precursors of rhamnolipids. *Microbiol Sgm*, 149, 2005-2013.
- Dubern, J. F., Lagenrijk, E. L., Lugtenberg, B. J. J. y Bloemberg, G. V. (2005). The heat shock genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *Journal of Bacteriology*, 187(17), 5967-76.
- Dubern, J. F., Lagendijk, E. L., Lugtenberg, B. J. J. y Bloemberg, G. V. (2005). The heat shock genes *dnaK*, *dnaJ*, and *grpE* are involved in regulation of putisolvin biosynthesis in *Pseudomonas putida* PCL1445. *J Bacteriol*, 187, 5967-5976.
- Dubern, J. F., Lugtenberg, B. J. J. y Bloemberg, G. V. (2006). The *ppuI-rsaL-ppuR* quorum sensing system regulates biofilm formation of *Pseudomonas putida* PCL1445 by controlling biosynthesis of the cyclic lipopeptides putisolvin I and II. *J.Bacteriol*, 188, 2898-2906.
- Dubey, K. y Juwarkar, A. (2001). Distillery and curd whey wastes as viable alternative sources for biosurfactant production. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 17, 61-69.
- Dubern, J.F. y Guido, B. V. (2006). Influence of environmental conditions on putisolvins I and II production in *Pseudomonas putida* strain PCL1445. *FEMS Microbiol Lett*, 263, 169-175.
- Edwards, J. R. y Hayashi, J. A. (1965). Structure of a rhamnolipid from *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch. Biochem. Biophys*, 111, 415-421.
- Ellaiah, P., Prabhakar, T., Sreekanth, M., Taleb, A. T., Raju, P. B. y Saisha, V. (2002). Production of glycolipids containing biosurfactant by *Pseudomonas species*. *Indian J Exp Biol*, 40, 1083-1086.
- Finking, R. and M.A. Marahiel. (2004). Biosynthesis of nonribosomal peptides. *Annu. Rev. Microbiol.* 58:453-88
- Gautam K.K. y Tyagi V.K. (2006). Microbial surfactants: a review. *J. Oleo Sci*, 55, 155-166.
- Georgiou, G., Lin, S. C. Sharma, M. M. (1992). Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology*, 10, 60-65.
- Gewolb, J. (2002). Bioengineering. Working outside the protein-synthesis rules. *Science*, 295, 2205-2207.
- Guenzi, E., Galli, G., Grgurina, I., Dennis, C. G., y Grandi, G. (1998). Characterization of the Syringomycin Synthetase gen Cluster. A link between prokaryotic and eukaryotic peptide synthetases. *Journal of Biological Chemistry*, 273(49), 32857-32863.
- Gunther, N. W., Nunez, A., Fett, W. y Solaiman, D. K. Y. (2005). Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol*, 71, 2288-2293.
- Gunther, N. W., Nunez, A., Fortis, L., Solaiman, D. K. Y. (2006). Proteomic based investigation of rhamnolipid production by *Pseudomonas chlororaphis* strain NRRL B-30761. *J Ind Microbiol Biotech*, 33, 914-920.
- Haba E., Espuny, M. J., Busquets, M. y Manresa, A. (2000). Screening and production of rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa* 47T2 NCIB40044 from waste frying oils. *J. Appl. Microbiol*, 88, 379-387.
- Hansen, K.G., Desai, J. D. y Desai, A. J. (1993). A rapid and simple screening technique for potential crude oil degrading microorganisms. *Biotechnology. Technology*, 7, 745-748.
- Heid, M., Kohnert, A. Tan, T. H., Nusser, M., Kirschhöfer, F., Brenner-Weiss, G., Franzreb, M. y Berensmeier S. (2009). Development and trends of biosurfactant analysis and purification using rhamnolipids as an example. *Anal Bioanal Chem*, 391, 1579-1590
- Hemminger, P. (2005). Bioremediation of contaminated soils. *Biocycle*, 46, 35-38.
- Henriksen, A., Anthoni, U., Nielsen, T.H., Sørensen, J., Christophersen, C. y Gajhede, M. (2000). Cyclic lipoundecapeptide tensin from *Pseudomonas fluorescens* strain 96.578. *Acta Crystal*, 56, 113-115.
- Hildebrand, P. D. (1989). Surfactant-like characteristics and identity of bacteria associated with broccoli head rot in Atlantic Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*,

- 11(3), 205-224.
- Hisatsuka K., Nakahara, T., Sano, N. y Yamada, K. (1971). Formation of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa* and its function in hydrocarbon fermentation. *Agr. Biol. Chem. Tokyo*, 35, 686-692.
- Hodge, J.D. y Hofreiter, B. T. (1962). Determination of reducing sugars and carbohydrates. *Methods in Carbohydrate Chemistry*, 1: 380-394.
- Huber, B., Riedel, K., Kothe, M., Givskov, M., Molin, S. y Eberl, L. (2002). genetic analysis of function involved in the late stages of biofilm development in *Burkholderia cepacia* HIII. *Mol Microbiol*, 46, 411-426.
- Hultberg M, Alsberg, T., Khalil, S. y Alsanius, B. (2010). Suppression of disease in tomato infected by *Pythium ultimum* with a biosurfactant produced by *Pseudomonas koreensis*. *BioControl*, 55(3), 435-444.
- Husain, S. (2008). Effect of surfactants on pyrene degradation by *Pseudomonas fluorescens* 29L. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 2411-2419.
- Hutchinson, M. L., Tester, M. A. y Gross, D. C. (1995). Role of biosurfactants and ion-channelforming activities of syringomycin in transmembrane ion flux - a model for the 150 mechanism of action in the plant-pathogen interaction. *Mol Plant Microbe Interact*, 8, 610-620.
- Hutchison, M. I. y Johnstone, K. (1993). Evidence for the involvement of the surface-active properties of the extracellular toxin tolaasin in the manifestation of brown blotch disease symptoms by *Pseudomonas tolaasii* on *Agaricus bisporus*. *Physiol. Mol. Plant Pathol*, 42, 373-384.
- Itoh, S. y Suzuki, T. (1972). Effect of rhamnolipids on growth of *Pseudomonas aeruginosa* mutant deficient in n-paraffin-utilizing ability. *Agric. Biol. Chem. Tokyo*, 36, 2233-2235.
- Jadhav, M., Kalme, S., Tamboli, D. y Govindwar, S. (2011). Rhamnolipid from *Pseudomonas desmolyticum* NCIM-2112 and its role in the degradation of Brown 3REL. *Journal of Basic Microbiology*, 51(4), 385-396.
- Jagtap, S., Yavankar, S., Pardesi, K. y Chopade, B. (2009). Production of bioemulsifier by *Acinetobacter sp.* from healthy human skin of tribal population. *Ind J Expt Biol* (in press).
- Jain, D. K., Thompson, D. L. C, Lee, H. y Trevors, J. T. (1991). A drop-collapsing test for screening surfactant producing microorganisms. *J. Microbiol. Methods*, 13, 271-279.
- Janek, T., Lukaszewicz, M., Rezanka, T. y Krasowska, A. (2010). Isolation and characterization of two new lipopeptide biosurfactants produced by *Pseudomonas fluorescens* BD5 isolated from water from the Arctic Archipelago of Svalbard. *Bioresour Technol*, 101(15), 6118-23.
- Janiyani, K.L., Wate, S.R. y Joshi, S. R. 1992. Surfactant production by *Pseudomonas stutzeri*. *J Microb Biotechnol*, 7, 18-21.
- Jarvis, F.G. y Johnson, M. J. (1949). A Glyco-lipide produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Am Chem Soc*, 71, 4124-4126.
- Jiménez, D. I., Medina, S. A. M. y Gracida, J. N. (2010). Propiedades, Aplicaciones y Producción de Biotensoactivos. *Rev. Int. Contam. Ambient*, 26(1) 65-84.
- Kaplan N. y Rosenberg, E. (1982). Exopolysaccharide distribution of and bioemulsifier production by *Acinetobacter calcoaceticus* BD4 and BD413. *Appl Environ Microbiol*, 44, 1335-1341.
- Kruijt, M., Tran, H. & Raaijmakers, J. M. (2009). Functional, genetic and chemical characterization of biosurfactants produced by plant growth-promoting *Pseudomonas putida* 267. *J Appl Microbiol*, 107, 546-56.
- Koch, B., Nielsen, T.H., Sørensen, D., Andersen, J. B. Christophersen, C., Molin, S., Givskov, M., Sørensen, J., y Nybroe, O. (2002). Lipopeptide Production in *Pseudomonas sp.* Strain DSS73 Is Regulated by Components of Sugar Beet Seed Exudate via the Gac Two-Component Regulatory System. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(9), 4509-4516.
- Koch, A. K., Käppeli, O., Fiechter, A. Reiser, J. (1991). Hydrocarbon assimilation and biosurfactant production in *Pseudomonas aeruginosa* mutants. *J Bacteriol*, 173, 4212-4219.
- Kochi, M., Weiss, D. W., Pugh, L. H. y Groupé, V. (1951). Viscosin, a new antibiotic. *Bacteriol Proc*, 1, 29-30.
- Kohli, R.M., Trauger, J.W., Schwarzer, D., Marahiel, M.A. y Walsh, C. T. (2001). generality of peptide cyclization catalyzed by isolated thioesterase domains of nonribosomal peptide synthetases. *Biochemistry*. 40, 7099-108
- Kuiper I., Bloemberg, G.V. y Lugtenberg, B.J.J. (2001). Selection of a plant-bacterium pair as a novel tool for rhizostimulation of polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria. *Mol Plant-Microbe Interact*, 14 1197-1205.
- Kuiper I., Lagendijk, E.L., Pickford, R., Derrick, J.P., Lamers, G.E.M., Thomas-Oates, J.E., Lugtenberg, B.J. y Bloemberg, G.V. (2004). Characterization of two *Pseudomonas putida* lipopeptide biosurfactants, putisolvin II and I, which inhibit biofilms formation and break down existing biofilms. *Mol Microbiol* 51, 97-113.
- Kwang-Hyun, C., Sung-Tae, K. y Young-Kee, K. (2007). Purification of a Pore-forming Peptide Toxin, Tolaasin, Produced by *Pseudomonas tolaasii* 6264. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 40 (1), 113-118.
- Laycock, M.V., Hildebrand, P.D., Thibault, P., Walter, J.A. y Wright, J.L.C. (1991). Viscosin, a potent peptidolipid biosurfactant and phytopathogenic mediator produced by a pectolytic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 39, 483-489.
- Lépine, F., Déziel, E., Milot, S. y Villemur, R. (2002). Liquid chromatographic/mass spectrometric detection of the 3-(3-hydroxyalkanoyloxy) alkanolic acid precursors of rhamnolipids in *Pseudomonas aeruginosa* cultures. *J Mass Spectrom* 37, 41-46.
- Lim, S.P., Roongsawang, N., Washio, K. y Morikawa, M. (2007). Functional analysis of a pyoverdine synthetase from *Pseudomonas sp.* MIS38. *Biosci Biotechnol Biochem*, 71(8), 2002-9.
- Lim, S.P., Roongsawang, N., Washio, K. y Morikawa, M.

- (2009). Flexible exportation mechanisms of arthrofactin in *Pseudomonas sp.* MIS38. *J Appl Microbiol*, 107(1), 157-66.
- Liu Z., Laha S. y Luthy, R.G.. (1991). Surfactant solubilization of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in soil-water suspensions. *Water Sci. Technol.* 23, 475-485.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193, 265-275.
- Maiher, R.M. y Soberón-Chávez, G.. (2000). *Pseudomonas aeruginosa* rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. *Appl. Microbiol. Biot.* 54, 625-633.
- Maiqian, N., Xihou, Y., Chunyan, R., Yang, W., Feng, X. y Qirong S. (2010). Novel rhamnolipid biosurfactants produced by a polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacterium *Pseudomonas aeruginosa* strain NY3. *Biotechnology Advances*, 28(5), 635-643.
- Makkar, R.M. Cameotra, S. S. (1997). Biosurfactant production by a thermophilic *Bacillus subtilis* strain. *J Ind Microbiol Bioeng*, 18, 37-42.
- Makkar, R.S. y Cameotra, S. S. (2002). An update on the use of unconventional substrates for biosurfactant production and their new applications. *Appl Microbiol Biotechnol*, 58, 428-434.
- Manso-Pajarrón, A., De Koster, C.G., Heerma, W., Schmidt, M. y Haverkamp, J. (1993). Structure identification of natural rhamnolipid mixtures by fast atom bombardment tandem mass spectrometry. *Glycoconjugate J*, 10, 219-226.
- Marsudi, S., Unno, H. y Hori, K. (2008). Palm oil utilization for the simultaneous production of polyhydroxyalkanoates and rhamnolipids by *Pseudomonas aeruginosa*. *Appl Microbiol Biotechnol*, 78(6), 955-61.
- Martínez-Toledo A., Ríos-Leal, E., Vázquez-Duhalt, R., González-Chavez, M. C., Esparza-García, F.J. y Rodríguez-Vázquez, R. (2006). Role of phenanthrene in rhamnolipid production by *P. putida* in different media. *Environ Technol*, 27, 137-142.
- Matsuyama T., Sogawa, M. y Yano, I. (1987). Direct colony thin-layer chromatography and rapid characterization of *Serratia marcescens* mutants defective in production of wetting agents. *Appl. Environ. Microbiol*, 57, 1186-1188.
- Mercade, M. E., Manresa, M. A., Robert, M., Espuny, M. J., de Andres, C. y Guinea, J. (1993). Olive oil mill effluent (OOME). New substrate for biosurfactant production. *Bioresource Technology*, 43, 1-6.
- Mishra P. K., Mishra, S., Bisht, S. C., Selvakumar, G., Kundu, S., Bisht J.K. y Gupta, H. S. (2009). Isolation, molecular characterization and growth-promotion activities of a cold tolerant bacterium *Pseudomonas sp. NARs9 (MTCC9002)* from the Indian Himalayas. *Biol Res*, 42(3), 305-13.
- Mohamed, S., Al-Jilawi, H. M., y Ghazi, M. A. (2007). Emulsification Properties of Biosurfactant Produced from *Pseudomonas aeruginosa* RB 28. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10, 1331-1335.
- Monti, S.M., Gallo, M., Ferracane, R., Borrelli, R.C., Riti, A., Greco, M. L., Graniti, A. y Flogiano, V. (2001). Analysis of bacterial lipopeptides by matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight and high performance liquid chromatography with electrospray mass spectrometry. *Rap Commun Mass Spectrometry*, 15, 623-8.
- Morikawa, M., Hirata, Y. y Imanaka, T. (2000). A study on the structure-function relationship of lipopeptide biosurfactants. *Biochim Biophys Acta*, 1488, 211-218.
- Mukherjee, S., Das, P. y Sen, R. (2006). Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends Biotechnol*, 24, 509-515.
- Mulet, M., Lalucat, J. y García-Valdés, F. (2010). DNA sequence-based analysis of the *Pseudomonas* species. *Environmental Microbiology*. 12(6), 1513-30.
- Muller, M. M., Kugler, J. H., Henkel, M., Gerlitzki, M., Hormann, B., Pohnlein, M., Syldatk, C. y Hausmann, R. (2012). Rhamnolipids--next generation surfactants? *J Biotechnol*, 162, 366-80.
- Mulligan, C.N. y Gibbs, B.F. (1989). Correlation of nitrogen metabolism with biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied Environment Microbiology*, 55, 3016-3019.
- Mulligan, C. (2009). Recent advances in the environmental applications of biosurfactants. *Current opinion of colloids and interface science*, 14, 372-378.
- Murata, H. y Magae, Y. (1996). Toxin production in a mushroom pathogenic bacterium, *Pseudomonas tolaasii* strain PT814 is activated by signals present in a host, *Pleurotus ostreatus*, and those accumulating in the medium in the course of bacterial growth. En D. J. Royse (ed). *Mushroom biology and mushroom products*, 483-494.
- Neu, T.R., Hartner, T. y Poralla, K. (1990). Surface active properties of Viscosin a peptidolipid antibiotic. *Appl Microbiol Biotechnol*, 32, 518-520.
- Nielsen T. H., D. Sørensen, C. Tobiassen, J. B. Andersen, C. Christophersen, M. Givskov y J. Sørensen. (2002). Antibiotic and Biosurfactant Properties of Cyclic Lipopeptides Produced by Fluorescent *Pseudomonas sp.* From the Sugar Beet Rhizosphere. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3416-3423.
- Nitschke, M., Costa, S. y Contiero, J. (2009). Structure and applications of a rhamnolipid surfactant produced in soybean oil waste. *Appl Biochem Biotechnol*. 160(7), 2066-74.
- Nitschke, M. y Pastore, G.M. (2006). Production and properties of a surfactant obtained from *Bacillus subtilis* grown on cassava wastewater. *Bioresour Technol*, 97, 336-341.
- Nitschke, M., Costa, S.G.V., y Conteiro, J. (2005a). Rhamnolipid surfactants: an update on the general aspects of these remarkable biomolecules. *Biotechnol Prog*, 21, 1593-1600.
- Nitschke M., Costa, S.G.V., Haddad, R., Gonçalves, L.A.G., Eberlin, M.N., y Conteiro, J. (2005b). Oil wastes as unconventional substrates for rhamnolipid biosurfac-

- tant production by *Pseudomonas aeruginosa* LBI. *Bio-technol Prog*, 21, 1562-1566.
- Nunez, A., Ashby, R., Foglia T.A., y Solaiman, D. K. Y. (2001). Analysis and characterization of sophorolipids by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization. *Chromatographia*, 53, 673-677.
- Onbasli, D. y Aslim, B. (2009). Biosurfactant production in sugar beet molasses by some *Pseudomonas spp.* *J Environ Biol*, 30, 161-163.
- Onbasli, D. y Aslim, B. (2009). Effects of some organic pollutants on the exopolysaccharides (EPSs) produced by some *Pseudomonas spp.* strains. *J Hazard Mater*, 168(1), 64-7.
- Palleroni, N.J. (1984). Genus I *Pseudomonas* Migula 1894. En N.R Kreig y J. G. Holt (Eds), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 2. Baltimore, MD. USA: The Williams's vs Wilkins Co., 323-379.
- Patel, R.M. y Desai, A. J. (1997). Biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* GS3 from molasses. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 91-94.
- Patil, J.R. y Chopade, B. A. (2001a). Distribution and in vitro antimicrobial susceptibility of *Acinetobacter* species on the skin of healthy humans. *Natl Med J India*, 14, 204-208.
- Patil, J.R. y Chopade, B. A. (2001b). Studies on bioemulsifier production by *Acinetobacter* strains isolated from healthy human skin. *J Appl Microbiol*, 91, 290-298.
- Persson, A., Molin, G. y Weibull, C. (1990a). Physiological and morphological changes induced by nutrient limitation of *Pseudomonas fluorescens* 378 in continuous culture. *Applied Environment and Microbiology*, 56, 686-692.
- Persson, A., Molin, G. y Weibull, C. (1990b). Biosurfactant yields and nutrient consumption of *Pseudomonas fluorescens* 378 studied in a microcomputer controlled multi-fermentation system. *Biotechnology Bioengineer*, 36, 252-255.
- Persson, A., Osterberg E. y Dostalek, M. (1988). Biosurfactant production by *Pseudomonas fluorescens* 378: growth and product characteristics. *Applied Microbiology Biotechnology*, 29, 1-4.
- Phale, P.S., Savithri, H.S., Rao, N. y Vaidyanathan, C. S. (1995). Production of biosurfactant Biosur-pm by *Pseudomonas maltophilia* Csv89. Characteriation and role in hydrocarbon Uptake. *Arch Microbiol*, 163, 424-31.
- Phetrong, K., H-Kittikun, A. y Maneerat, S. (2008). Production and characterization of bioemulsifier from a marine bacterium, *Acinetobacter calcoaceticus* subsp. *anitratus* SM7. *Songklanakarinn J Sci Technol*, 30(3), 297-305.
- Raaijmakers, J.M., de Bruijn I. y de Kock Maarten, J. D. (2006). Cyclic Lipopeptide Production by Plant-Associated *Pseudomonas spp.* Diversity, Activity, Biosynthesis, and Regulation. *MPMI*, 19(7), 699-710.
- Rahim, R., Ochsner, U. A., Olvera, C., Graninger, M., Messner, P., Lam, J. S. y Soberón-Chávez, G. (2001). Cloning and functional characterization of the *Pseudomonas aeruginosa* rhlC gen that encodes rhamnolipid transferase 2, an enzyme responsible for di-rhamnolipid biosynthesis. *Mol Microbiol*, 40, 708-718.
- Rahman, P., Lungut, A., Idowu, J. Olea, M. (2009). Biosurfactant production using novel bacteria from North-east England. *Building business on bioscience sustainable innovation conference*. Heriot-Watt University, Edinburgh.
- Rainey, P.B., Brodey, C.L. y Johnstone, K. (1993). Identification of a gen cluster encoding three high-molecular-weight proteins, which is required for synthesis of tolaasin by the mushroom pathogen *Pseudomonas tolaasii*. *Mol Microbiol*, 8(4), 643-52.
- Rapp, P., Bock, H., Wray, V. Wagner, F. (1979). Formation, isolation and characterization of trehalose dimycolates from *Rhodococcus erythropolis* grown on n-alkanes. *J Gen Microbiol*, 115, 491-503.
- Risse, D., Beiderbeck, H., Taraz, K., Budzikiewicz H. y Gustine, D. (1998). Bacterial constituents part LXXVII. Corrugatina, a lipopeptide siderophore from *Pseudomonas corrugate*. *J Biosci*, 10, 869-80.
- Robert, M., Mercade, M. E., Bosch, M. P., Parra, J. L., Espuny, M. J., Manresa M.A. y Guinea, J. (1989). Effect of the carbon source on biosurfactant production by *Pseudomonas aeruginosa* 44Ti. *Biotechnology Letters*, 11, 871-874.
- Rokni-Zadeh, H., LI, W., Sanchez-Rodriguez, A., Sinnave, D., Rozenski, J., Martins, J. C. y De Mot, R. (2012). genetic and functional characterization of cyclic lipopeptide white-line-inducing principle (WLIP) production by rice rhizosphere isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. *Appl Environ Microbiol*, 78, 4826-34.
- Rokni-zadeh, H., Li, W., Yilma, E., Sanchez-Rodriguez, A. y De Mot, R. (2013). Distinct lipopeptide production systems for WLIP (white line-inducing principle) in *Pseudomonas fluorescens* and *Pseudomonas putida*. *Environ Microbiol Rep*, 5, 160-9.
- Rosen, M. (2004). *Surfactants and interfacial phenomena*. John Wiley and Sons, Inc. USA.
- Rosenberg, E., Zuckerberg, A., Rubinovitz, C. y Gutnick, D. L. (1979). Emulsifier of *Arthrobacter* RAG-1: isolation and emulsifying properties. *Appl Environ Microbiol*, 37, 402-408.
- Rosenberg, E. (1993). Exploiting microbial growth on hydrocarbons- new markets. *Tibtech*, 11, 419-424.
- Segre, A., Bachmann, R.C., Ballio, A., Bossa, F., Grgurina, I., Iacobellis, N.S., Marino, G., Pucci, P., Simmaco, M. y Takemoto, J. Y. (1989). The structure of syringomycins A1, E and G. *FEBS Lett*, 255(1), 27-31.
- Shirata, A., Sugaya, K., Takasugi M., y Monde, K. (1995). Isolation and biological activity of toxins produced by a Japanese strain of *Pseudomonas tolaasii*, the pathogen of bacterial rot of cultivated oyster mushroom. *Ann. Phytopathol.Soc. Jpn*, 61, 493-502.
- Shulga, A. N., Karpenko, E.V., Eliseev, S.A. y Turovsky, A. A. (1993). The method for determination of anionogenic bacterial surface-active peptidolipids. *Microbiol. J*, 55, 85-88.
- Sieber, S.A. y Marahiel, M. A. (2005). Molecular mechanisms underlying nonribosomal peptide synthesis: approaches to new antibiotics. *Chem Rev*, 105, 715-738.