

***Pseudomonas stutzeri* MLA9, una cepa marina con alto potencial para degradar pireno**

Araujo-Palomares, Cynthia Lizzeth¹, Ramos-Mendoza, Ileana Sarahí¹, Silva-Jiménez, Hortencia^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Oceanológicas, Universidad Autónoma de Baja California, Carretera Tijuana-Ensenada, No. 3917, Fraccionamiento Playitas, 22860, Ensenada, Baja California, México. Teléfono: +52 646-1745462, Ext. 64717; e-mail: silvah@uabc.edu.mx

Araujo-Palomares, Cynthia Lizzeth, Ramos-Mendoza, Ileana Sarahí, Silva-Jiménez, Hortencia, *Pseudomonas stutzeri* MLA9, una cepa marina con alto potencial para degradar pireno

Alianzas y Tendencias-BUAP. 2019, 4 (13): 1- 17.

Recibido: 20 febrero 2019.

Aceptado: 10 marzo 2019.



RESUMEN

Una alternativa para remover los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) del ambiente es usando bacterias hidrocarbonoclastas. El objetivo de este trabajo fue comenzar con la caracterización de la cepa bacteriana marina *Pseudomonas stutzeri* MLA9 con potencial para degradar el pireno. La cepa bacteriana previamente fue identificada por el sistema MALDI-Biotyper y confirmado en este estudio por la secuenciación del gen ribosomal 16S como *Pseudomonas stutzeri*. La cepa bacteriana puede crecer en medio mínimo suplementado con pireno, fenantreno o naftaleno como su única fuente de carbono y energía, siendo el pireno su mejor sustrato. Análisis moleculares han permitido la detección de genes que codifican para dioxigenasas de hidroxilación y de escisión, enzimas que participan en la ruta de degradación de HAP. Además, *P. stutzeri* MLA9 es una cepa productora de biosurfactantes y formadora de biopelículas, mecanismos que pueden facilitar el proceso de degradación. Lo anterior apunta a *P. stutzeri* MLA9 como una excelente candidata para continuar los estudios de degradación de HAP y su posible aplicación en procesos de biorremediación.

ABSTRACT

An alternative to remove polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) of the environment is using hydrocarbonoclastic bacteria. The aim of this work was to begin with the characterization of the marine bacterial strain MLA9 with potential to degrade pyrene. The isolate was previously identifying used MALDI-Biotyper and, in this study, its identity was confirmed by 16S ribosomal gene sequencing as *Pseudomonas stutzeri*. The bacterial strain can grow in minimal medium supplemented with pyrene, phenanthrene or naphthalene as sole carbon and energy source, being pyrene the best substrate. Molecular analysis has allowed hydroxylating and excision dioxygenases genes detection, enzymes that participating in PAH degrading pathway. Moreover, *P. stutzeri* MLA9 is a biosurfactant producer and biofilm former, mechanisms could facilitate the degrade process. To above described, *P. stutzeri* MLA9 appears to be an excellent candidate to continue PAH degradation studies and its potential application on bioremediation processes.

Keywords: Hydrocarbonoclastic bacteria, *Pseudomonas stutzeri*, PAH, pyrene

INTRODUCCIÓN

Los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) son un grupo de compuestos orgánicos que se consideran peligrosos debido a su alta toxicidad y por las propiedades carcinogénicas y mutagénicas

que pueden presentar. Estructuralmente, los HAP constan de dos o más anillos aromáticos fusionados y pueden ser introducidos al ambiente, ya sea por fuentes naturales y/o por actividades antropogénicas. Estos compuestos son considerados contaminantes persistentes debido a la baja solubilidad que presentan en medios acuosos y a su alta estabilidad, que los hace estar asociados a material particulado y sedimentario [1,2]. Además, la persistencia de los HAP en el ambiente aumenta al asociarse con otros contaminantes como metales pesados e inclusive, con la presencia de otros tipos de hidrocarburos [3].

A pesar de la recalcitrancia de los HAP, son compuestos que pueden estar sujetos a degradación bajo condiciones aerobias o anaerobias, por diferentes microorganismos denominados hidrocarbonoclastos [4,5].

En ese sentido, las bacterias hidrocarbonoclastas son candidatos potenciales para ser utilizados como herramientas en los procesos de biorremediación en sitios con presencia de estos contaminantes, ya que cuentan con un metabolismo especializado y con mecanismos para potencializar la degradación de HAP. El contenido enzimático especializado, como las dioxigenasas, son esenciales para degradar HAP. En ese contexto, diversos genes de dioxigenasas, tanto de hidroxilación como de escisión, han sido reportados y, en algunos de ellos, se ha demostrado su participación en la degradación de pireno [6,7]. No obstante, aunque

los microorganismos presenten enzimas hidrolíticas, existen otros mecanismos que pueden apoyar en el proceso de degradación, tales como la producción de sustancias tensoactivas (biosurfactantes), que permiten romper la tensión superficial y hacer más biodisponible el HAP, y la formación de biopelículas, eventos biológicos que permiten el anclamiento de las células bacterianas al sustrato [8,9].

La habilidad de degradar HAP por bacterias ha sido identificada en diversos géneros pertenecientes, principalmente, a los filos *Firmicutes*, *Actinobacteria* y *Proteobacteria*, tales como *Bacillus*, *Acinetobacter*, *Rhodococcus*, *Kocuria*, *Achromobacter*, *Arthrobacter*, *Micrococcus*, *Nocardia*, *Ochrobacterium*, *Pantoea* por mencionar algunos [1,10,11]. Sin embargo, dentro del filo *Proteobacteria*, destacan las Gamma-proteobacterias del género de *Pseudomonas*, las cuales se caracteriza por ser microorganismos ubicuos y poseer una gran versatilidad metabólica, traduciéndose en una amplia adaptabilidad fisiológica y genética a diferentes condiciones ambientales [12,13].

Entre las especies de *Pseudomonas* con rutas catabólicas para HAP se encuentra *P. stutzeri* y varias cepas de esta especie han sido reportadas con capacidad para metabolizar compuestos como fluoreno, fenantreno y pireno, entre otros HAP, al igual que otros compuestos aromáticos [2,14–16].

Así pues, el uso de microorganismos nativos expuestos a contaminantes como los HAP, aumenta

la probabilidad de una mineralización parcial o completa de estos compuestos tóxicos. En ese sentido, la selección de microorganismos bacterianos con la habilidad de utilizar los HAP como única fuente de carbono y energía requiere de realizar un estudio generalizado que nos brinde información para determinar si el microorganismo cataboliza HAP. Por lo anterior, en este trabajo se inició con la caracterización de la cepa hidrocarbonoclasta *P. stutzeri* MLA9, una cepa aislada de la costa de Rosarito Baja California, para determinar el potencial para degradar compuestos aromáticos policíclicos y su posible aplicación en procesos de biorremediación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa bacteriana y medios de cultivo.

La cepa *Pseudomonas stutzeri* MAL9 utilizada como modelo de estudio fue aislada de una muestra de agua superficial de la zona costera del Puerto de Rosarito en Baja California, México [11]. Para los ensayos de crecimiento, rango de utilización de HAP, formación de biopelículas y ensayos cualitativos de biosurfactantes, los pre-cultivos y cultivos de la cepa MLA9 se llevaron a cabo en medio Bushnell-Haas (BH), el cual contiene (por litro): 0.20 g de MgSO₄, 0.02 g de CaCl₂, 1 g de KH₂PO₄, 1 g de K₂HPO₄, 1 g de NH₄NO₃ 1 g y 0.05 g de FeCl₃. Para medio sólido, se adicionó 1.5% de Bacto Agar a la solución. Para la extracción de material genético, la cepa fue crecida en medio Luria Bertani (LB) cuya composición es

(por litro): 10 g de triptona, 10 g de NaCl y 5 g de extracto de levadura, pH 7.0.

Evaluación del crecimiento de la cepa MLA9 en presencia de HAP.

El crecimiento y rango de utilización de HAP de la cepa *Pseudomonas stutzeri* MLA9 se evaluó en medio líquido utilizando el medio BH suplementado con pireno, fenantreno o naftaleno a una concentración final de 100 mg/L. Los HAP fueron disueltos en acetona y, a partir de soluciones stock concentradas, fueron adicionados al medio de cultivo, dejándose en agitación por 48 H para volatilizar la acetona. Posteriormente, los matraces suplementados con los HAP fueron inoculados con una alícuota de un pre-inóculo de *P. stutzeri* MLA9 crecido en medio BH suplementado con pireno (100 mg/L), incubado durante 7 días, en agitación constante (160 rpm) y a una temperatura de 25 ± 2 °C, a una densidad óptica final medida a 600 nm de 0.01-0.05. Los cultivos fueron crecidos utilizando las mismas condiciones para el pre-inóculo y el crecimiento celular fue monitoreado a 600 nm espectrofotométricamente durante 10 días.

Extracción de ADN genómico.

La extracción del ADN se llevó a cabo mediante el uso del kit comercial Wizard Genomic DNA Purification Kit (PROMEGA), siguiendo las indicaciones del proveedor.

Identificación molecular de la cepa MLA9.

La amplificación de un fragmento del gen ribosomal 16S se realizó utilizando el par de oligonucleótidos universales 27-F 5'-AGAGTTTATCCTGGCTCGA-3' y 1492-R 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3'. La

mezcla de reacción consistió en 1X de buffer de reacción para PCR (10X), 2.0 mM de MgSO₄ (50 mM), 0.2 mM de cada dNTP (10 mM), 0.2 μM de cada oligonucleótido (10 μM), 500 ng de ADN templado y 1 U/reacción de Taq polimerasa (Platinum® Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen). Las condiciones de PCR utilizadas fueron: 1 ciclo a 94°C por 5 min, 94°C por 1 min, 55°C por 1 min, 68°C por 1 min, durante 35 ciclos; 1 último ciclo a 68°C por 7 min y finalmente almacenado a 12°C [17]. El fragmento amplificado se purificó utilizando el kit QIAquick PCR Purification (QIAGEN) siguiendo las instrucciones del proveedor. El producto amplificado y purificado fue enviado al laboratorio especializado Eton Bioscience (San Diego, CA, USA) para su secuenciación. La secuencia fue analizada usando el programa BLAST [18] en la base de datos del NCBI (National Center for Biotechnology Information) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). El árbol filogenético fue construido utilizando el programa MEGA 7 [19].

Detección de los genes que codifican para las dioxigenasas.

Para la amplificación del gen de la dioxigenasa del tipo hidroxilante específica para HAP en bacterias Gram negativas (RHD-PAH-GN) se utilizaron los oligonucleótidos GNF 5'-GAGATGCATACCACGTKGGTTGGA-3' y GNR 5'-AGCTGTTGTTTCGGAAGAYWGTGCMGTT-3' [6]. Los pares de oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes que codifican para las dioxigenasas de escisión fueron C12OF 5'-

CGCCTTCAAAGTTGATCTGCGTGGT-3' y C12OR 5'-GCCAACGTCGACGTCTGGCA-3' para la 1,2-catecol dioxigenasa (C12O) y C23OF 5'-GAATCGTTTCGTTGAGCACAC-3' y C23OR 5'-CGTGTACTGGACATGAGCAA-3' para la 2,3-catecol dioxigenasa (C23O) [20]. Las mezclas de reacción consistieron en 1X de buffer de reacción para PCR (10X), 1.5 mM de MgSO₄ (50 mM), 0.2 mM de cada dNTP (2.5 mM), 0.2 μ M de cada oligonucleótido (10 μ M), 500 ng de ADN templado y 1 U/reacción de Taq polimerasa (Taq DNA Polymerase Recombinant, Invitrogen). Las condiciones de PCR utilizadas para la amplificación del gen de la RHD fueron: 1 ciclo a 95°C por 5 min, 95°C por 30 seg, 55°C por 30 seg, 72°C por 1 min, durante 35 ciclos; 1 último ciclo a 72°C por 7 min y finalmente almacenado a 12°C [6]. Mientras que para la amplificación de los genes de C12O y C23O, las condiciones de la PCR fueron: 1 ciclo a 95°C por 2 min, 94°C por 15 s, 55°C por 30 s, 72°C por 1 min, durante 35 ciclos; 1 último ciclo a 72°C por 7 min y finalmente almacenado a 12°C.

Detección de biosurfactantes aniónicos por el método del agar azul en placa.

En el centro de placas de Petri preparadas con agar BH, suplementando con 0.2 g/L de bromuro de cetil-metil-amonio (CTAB) y 0.005 g/L de azul de metileno y previamente esparcidas en la superficie con una solución de 100 mg/L de pireno, disuelto en acetona, se colocaron 15 μ L de medio de cultivo libre de células. Como control positivo se utilizó dodecilsulfato sódico (SDS, al 10 %), que es un compuesto tensoactivo aniónico. Las placas se

incubaron durante 5 días a una temperatura de 25 \pm 2°C. La presencia de un halo azul oscuro alrededor de las colonias indica producción de biosurfactantes aniónicos, como los ramnolípidos [21].

Detección del fragmento del operón rhlab que codifica para las subunidades de la ramnosil-transferasa.

Un fragmento del operón que codifica para la subunidad A y B de la ramnosil-transferasa I (rhlab) fue amplificado utilizando el par de oligonucleótidos ya reportados y cuyas secuencias son RhIABf 5'-CAGGCCCGATGAAGGGAAATA-3' y RhIABr 5'-AGGACGACGAGGTGGAAATC-3'. Las condiciones de PCR utilizadas para la amplificación fueron: 1 ciclo a 95°C por 2 min, 95°C por 30 s, 53°C por 30 s, 72°C por 1 min, durante 35 ciclos; 1 último ciclo a 72°C por 7 min y finalmente almacenado a 12°C [8].

Producción de biopelículas.

La producción de biopelículas se llevó a cabo siguiendo el protocolo reportado en [22] con algunas modificaciones. A partir de un pre-inóculo de siete días, crecido en medio BH suplementado con 100 mg/L de pireno se inocularon tubos de borosilicato con el mismo medio e incubado bajo las mismas condiciones que el pre-inóculo. Una vez terminado su tiempo de incubación, el medio de cultivo de cada tubo fue desechado y se añadió cristal violeta al 0.4%, dejándose actuar durante 15 minutos. Pasado el tiempo, se retiró el colorante y realizaron lavados con agua destilada. Los tubos se

secaron a temperatura ambiente hasta que no quedó rastro de agua.

RESULTADOS

Identificación molecular mediante la secuenciación del gen ribosomal 16S.

La cepa MLA9 fue aislada de muestras de agua superficial de la costa de Rosarito en Baja California y fue identificada como *Pseudomonas stutzeri* utilizando el sistema MALDI-Biotyper [11]. Dado que el sistema antes mencionado, basado en el análisis de proteínas ribosomales, es una técnica emergente para la identificación de microorganismos ambientales [23,24], se decidió corroborar la identidad de *P. stutzeri* MLA9 por la amplificación y secuenciación del gen ribosomal 16S, la técnica estándar para la identificación molecular procariota. El análisis de la secuencia nucleotídica obtenida revela que la cepa MLA9 presenta un 99% de identidad con *Pseudomonas stutzeri*, corroborando la identificación basada en el análisis de proteínas ribosomales a través del sistema MALDI-Biotyper. Además, el análisis filogenético fortalece el resultado obtenido, ya que muestra la cercanía evolutiva de MLA9 con otras cepas de *P. stutzeri* (Fig. 1).

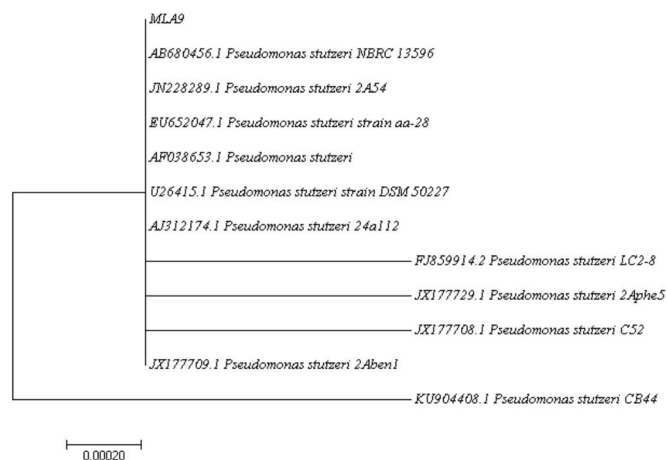


Figura 1. Análisis molecular filogenético por el método de Máxima Probabilidad. La historia evolutiva se dedujo por el método de Máxima Probabilidad basado en el modelo de Hasegawa-Kishino-Yano [25]. El análisis evolutivo se llevó a cabo con el programa MEGA7 [19].

Evaluación del crecimiento de la cepa MLA9 en presencia de HAP.

Dado el metabolismo tan versátil que poseen las bacterias del género de *Pseudomonas*, muchos de sus miembros son hidrocarbonoclastos hacia HAP y pueden utilizar una gran variedad de compuestos tóxicos como su fuente de carbono y energía [26–28]. Para verificar el rango de HAP que puede utilizar MLA9, la cepa bacteriana fue sometida a ensayos de crecimiento en medio mínimo BH en presencia de naftaleno, fenantreno o pireno, HAP representativos de bajo y alto peso molecular, a una concentración final de 100 mg/L. El seguimiento del crecimiento de MLA9 durante 10 días reveló que es capaz de crecer en los HAP probados, siendo el pireno el sustrato preferencial, seguido por el fenantreno (Fig. 2). Mientras que el

naftaleno, el HAP de menor peso molecular, formado con dos anillos bencénicos fusionados, no estimula el crecimiento de *P. stutzeri* MLA9, inclusive, la fase de muerte aparece 48 H antes que cuando el microorganismo es crecido en HAP de tres o cuatro anillos (Fig. 2).

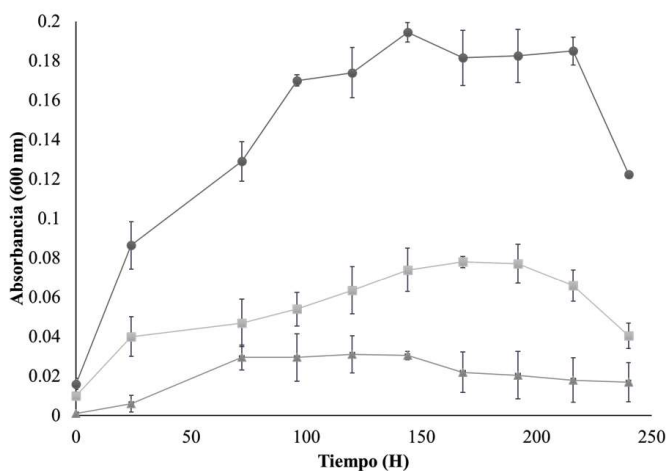


Figura 2. Utilización de diversos HAP por *P. stutzeri* MLA9. La cepa MLA9 fue crecida en medio Bushnell Haas suplementando con diferentes HAP como su única fuente de carbono y energía a una concentración final de 100 mg/L: □ Pireno, □ Fenantreno y □ Naftaleno. El crecimiento fue seguido por medir el incremento de la DO600nm por 10 días.

Detección de genes implicados en procesos de degradación de HAP.

El potencial que puede presentar la cepa *P. stutzeri* MLA9 para degradar compuestos orgánicos como los HAP se evaluó amplificando un fragmento del gen que codifica para la dioxigenasa que hidroxila el anillo de HAP específica para bacterias Gram (-) (RHD-PAH-GN) y que participa en el paso inicial para la degradación aerobia de HAP. El producto de amplificación obtenido tiene un corrimiento

electroforético de 306 pb, correspondiendo al peso molecular esperado para este fragmento génico (Fig 3-a, carril 1), indicando que MLA9 posee el gen que codifica para la enzima que actúa en el primer paso de la ruta de degradación de HAP. Además, MLA9 parece ser una cepa con un catabolismo muy versátil, ya que los genes que codifican para las catecol 1,2- y catecol 2, 3-dioxigenasas están presentes en esta cepa (Fig. 3-b, carriles 1 y 2, respectivamente), sugiriendo que puede escindir el anillo en orto y/o meta, respectivamente.

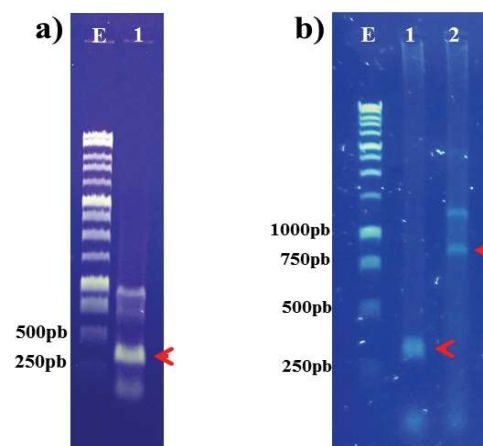


Figura 3. Detección molecular de dioxigenasas en *P. stutzeri* MLA9. La presencia de dioxigenasas implicadas en el proceso de degradación de HAP fue detectado por la amplificación de los genes que codifican para la dioxigenasa que hidroxila el anillo de HAP para Gram negativas RHD-PAH-GN, la catecol 1,2-dioxigenasa (C120) y catecol 2, 3-dioxigenasa (C230). a) Producto de amplificación de 306 pb correspondiente al peso del gen de RHD-PAH-GN; b) Carril 1: Producto de amplificación de 350 pb correspondiente al peso del gen de la C120; carril 2: Producto de amplificación de 867 pb correspondiente al peso del gen de la C230. Para ambos gels, E corresponde a la escalera de estándar de ADN de una 1kb (PROMEGA)

Producción de biosurfactantes y formación de biopelículas por *P. stutzeri*.

Muchas especies del género de *Pseudomonas* son productoras de biosurfactantes del tipo ramnolípidos y *P. stutzeri* MLA9 no es la excepción, a juzgar por el ensayo cualitativo del método del agar azul, donde se observa la formación de un halo de color azul intenso (Fig. 4-a), debido a la reacción del tensoactivo aniónico con el CTAB y azul de metileno (Fig. 4-a y 4-c). La producción de ramnolípidos por MLA9 puede ser una herramienta potente para el fácil acceso y la utilización de HAP como su fuente de carbono y energía.

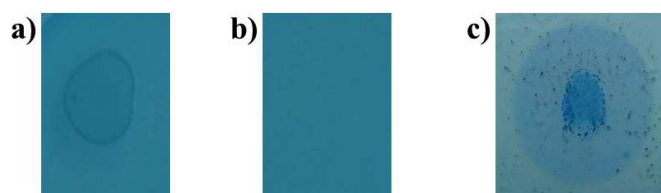


Figura 4. Ensayo cualitativo para la producción de ramnolípidos por la cepa MLA9 de *P. stutzeri*. La producción de biosurfactantes del tipo ramnolípidos por la cepa MLA9 fue detectado por el ensayo de Agar azul en placa. Las placas de agar azul suplementadas con pireno fueron inoculadas con gotas de a) Cultivo de MLA9, b) Medio Bushnell Haas (Control negativo) y c) Dodecil sulfato de sodio al 10% (Control positivo) se incubaron 5 días a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Para apoyar lo anterior, se procedió a detectar molecularmente un fragmento del operón de la ramnosil-transferasa I, la cual está implicada en la biosíntesis de ramnolípidos (Fig. 5). Un producto de amplificación obtenido para MLA9 fue de 1000 pb (Fig. 5, carril 2), 230 pb mayor que el producto esperado, el cual corresponde a *rhlAB* de *P.*

aeruginosa, la especie de referencia para la producción de ramnolípidos y utilizada como control positivo en este trabajo (Fig. 5, carril 1). Para corroborar que realmente el fragmento de 1000 pb de MLA9 corresponde a *rhlAB*, será necesario enviar a secuenciar y comparar en las bases de datos.

Además, *P. stutzeri* MLA9, al igual que otras *Pseudomonas* degradadoras de HAP y de otros hidrocarburos aromáticos, presenta la capacidad de formar biopelículas cuando es crecida en medio mínimo suplementado con el pireno (Fig. 6).

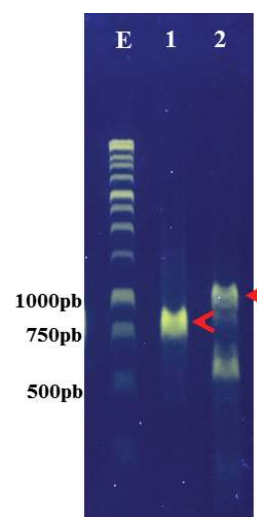


Figura 5. Detección del fragmento del operón *rhlAB* en *P. stutzeri* MLA9. E: Marcador de peso molecular estándar de ADN de una 1kb (PROMEGA). Producto de amplificación de *rhlAB*: Carril 1: *P. aeruginosa* y carril 2: *P. stutzeri* MLA9.

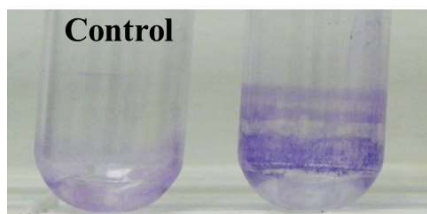


Figura 6. Formación de biopelículas en tubo de borosilicato. MLA9 presenta formación de biopelículas cuando es crecida en medio Bushnell Haas (BH) suplementado con pireno 100 mg/L después de 7 días de incubación. El tubo Control contiene medio BH con el hidrocarburo, mientras que el segundo tubo fue inoculado con la cepa *P. stutzeri* MLA9. Ambos tubos, junto con su contenido, estuvieron sometidos bajo las mismas condiciones de crecimiento y tratamiento para la detección de biopelículas (Ver materiales y métodos).

DISCUSIÓN

El género de *Pseudomonas* es un grupo de microorganismos con una gran versatilidad metabólica, que puede catabolizar compuestos tóxicos orgánicos tan variados como los hidrocarburos aromáticos policíclicos [26–29].

Varias cepas del género de *Pseudomonas*, incluyendo de *P. stutzeri*, son hidrocarbonoclastas para una gama de contaminantes orgánicos como el pireno y otros HAP [28,30,31]. De manera general, se ha observado en muchos microorganismos procariontes, que los compuestos de menor peso molecular y con estructuras químicas más sencillas, suelen promover el crecimiento bacteriano por su fácil degradación [32]. Aunque también se han reportado cepas bacterianas que utilizan como sustrato preferencial

compuestos con estructuras químicas más complejas. Por ejemplo, el grupo de Obayori [33] reportan que tres cepas de *Pseudomonas* aisladas de suelos contaminados con petróleo denominadas LP1, LP5 y LP6, sometidas a ensayos de crecimiento con diversos compuestos orgánicos tóxicos, las cepas utilizaron preferencialmente al pireno, presentando un crecimiento abundante y mucho menor, e inclusive, un crecimiento nulo, cuando los sustratos tienen estructuras menos recalcitrantes. En ese sentido, la cepa MLA9 de *P. stutzeri* presenta el comportamiento antes mencionado, observándose que tiene un mejor crecimiento cuando el medio mínimo está suplementado con pireno, un HAP formado de cuatro anillos bencénicos fusionados, y muy pobremente en fenantreno y naftaleno (Fig. 2). Este hecho hace a MLA9 una prometedora cepa degradadora de HAP de alto peso molecular, moléculas recalcitrantes y con alta persistencia en el ambiente.

Los microorganismos hidrocarbonoclastos poseen una amplia gama de enzimas que le permiten utilizar compuestos orgánicos tóxicos como su única fuente de carbono y energía. Para que las bacterias puedan catabolizar los HAP, al igual que otros compuestos aromáticos, requieren romper la aromaticidad de la estructura química que conforma al compuesto tóxico y para ello, la intervención de enzimas dioxigenasas es vital [32,34,35]. Las dioxigenasas RHD (Ring Hydroxylating Dioxygenase) participan en el paso inicial para la degradación aeróbica de HAP [35,36].

Estas enzimas permiten la activación del anillo aromático para su posterior apertura por la acción de la dioxigenasas de escisión como las catecol 1, 2 dioxigenasa que hace un corte intradiol u orto y/o la catecol 2, 3 dioxigenasa que realizar un corte extradiol en meta y así, producir cis-cis muconato y semialdehído 2-hidroxi muconato, respectivamente, los cuales serán sustratos de una serie de enzimas para dar lugar a diversos intermediarios metabólicos, hasta llegar a aquellos que puedan ingresar al ciclo de Krebs para poder obtener energía para el desarrollo y buen funcionamiento celular [35,37]. En MLA9 se detectaron, por PCR, los genes de RHD-PAH-GN, C120 y C230, sugiriendo que esta cepa puede ser eficiente en la degradación de diversos HAP. Lo anterior puede avalarse con lo reportado en otra cepa de *P. stutzeri* [20], en donde se demostró la presencia de los genes y las enzimas de las C120 y C230 y los autores reportan la alta eficiencia de degradación para fenantreno y pireno en los 10 días de incubación.

Las bacterias hidrocarbonoclastas, además de la batería enzimática que las hace aptas para el catabolismo de compuestos orgánicos tóxicos, también suelen poseer mecanismos que les permiten facilitar el proceso de degradación como producir compuestos tensoactivos [38]. En ese sentido, diversas especies de *Pseudomonas* producen tensoactivos del tipo ramnolípidos, tales como *P. putida* [39], *P. fluorescens* [40], *P. chlororaphis* [41] y *P. aeruginosa* [42,43].

Es importante hacer incapié que MLA9 puede producir biosurfactantes cuando es crecida en medio mínimo de sales BH suplementado con pireno, esta habilidad puede ser una ventaja en el ambiente marino, donde la escasez de nutrientes no será una limitante para la producción del compuesto tensoactivo y acceder al contaminante.

La detección molecular de los genes implicados en la producción de ramnolípidos se ha llevado a cabo principalmente en *P. aeruginosa* [44,45], aunque hay reportes mencionando que en otros Pseudomonadales se han detectado homólogos de los genes *rhlA* y *rhlB* como *Burkholderia* [46], así como en bacterias del orden Enterobacterial como *Serratia rubidaea* [47] y *Pantoea ananatis* [48] y los productos génicos para *rhlA* oscilan entre las 880 a 900 pb, mientras que para *rhlB* alrededor de las 1280 pb [49]. Un análisis de las secuencias proteicas de *RhIA*, *RhIB* y *RhIC* de cepas de *P. aeruginosa*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis* y *P. syringae*, demuestran que mantienen un alto grado de conservación [44]. Por otro lado, en la base de datos de *Pseudomonas* los genes *rhlA*, *rhlB* y *rhlC* están anotado solamente para los genomas, tanto parcial como totalmente secuenciados de *P. aeruginosa* [49]. En el caso particular de *P. stutzeri*, a pesar de que ya han sido reportadas cepas productoras de biosurfactantes del tipo ramnolípidos [50], hasta donde sabemos, no hay evidencia de la caracterización de las proteínas ni de las secuencias de los genes implicados en la biosíntesis de ramnolípidos. Lo anterior nos invita a no desechar la posibilidad que el fragmento

amplificado obtenido para MLA9, utilizando los cebadores específicos para un fragmento del operón rhlab de *P. aeruginosa*, cuya masa molecular fue de 1000 pb y no de 770 pb como lo esperado (Fig. 5, carriles 1 y 2) sea un homólogo de este operón. Como se mencionó anteriormente en el texto, será necesario obtener la secuencia del fragmento amplificado de 1000 pb de MLA9 y realizar un alineamiento en las bases de datos disponibles, como BLAST.

La biodisponibilidad de los contaminantes es una de las limitaciones para que el proceso de biodegradación se lleve a cabo. Para tener acceso a los compuestos tóxicos, la formación de biopelículas es otro de los mecanismos utilizados por los microorganismos hidrocarbonoclastos [51–54]. La conglomeración bacteriana en las biopelículas y la formación de la matriz extracelular, le permite tener una mayor superficie de contacto con el contaminante, así como una protección hacia los efectos adversos que les pudiera generar el compuesto tóxico y potencia el proceso de degradación por favorecer la transferencia del contaminante a las células bacterianas [51,54]. Por ejemplo, en *Stankeya spp* la biopelícula funge como una barrera física que le confiere protección contra la toxicidad de los HAP, por permitir una separación adecuada entre el contaminante y la comunidad bacteriana. Lo anterior, además, permite una mejor transferencia de materia, lo que se traduce en un incremento en el proceso de biodegradación [55]. En el caso particular de *Pseudomonas*, en la cepa de *P. putida* ATCC 17514, se demostró que las

biopelículas formadas por este microorganismo pueden incorporar y degradar eficientemente fluoreno y fenantreno [9]. Recientemente, un estudio reveló que diversas cepas de *Pseudomonas* degradan petróleo crudo en mayor proporción cuando están como células sésiles en biopelículas que cuando están en forma planctónica [56]. En este estudio, la cepa MLA9 de *P. stutzeri* presenta la capacidad de formar biopelículas en medio mínimo y en presencia de pireno, lo que sugiere que podría promover la biodisponibilidad y así aumentar, considerablemente, la degradación de este compuesto tóxico. Aunque es un resultado preliminar, también es un resultado prometedor en el sentido que esta habilidad puede ser considerada una herramienta biotecnológica en los procesos de biorremediación.

CONCLUSIÓN

Una alternativa para remover los hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP) del ambiente es usando bacterias hidrocarbonoclastas. El aislamiento, identificación y caracterización de este tipo de microorganismos es esencial para poder estructurar estrategias que permitan sanear zonas afectadas por los diversos contaminantes orgánicos tóxicos.

La caracterización inicial de la cepa MLA9 de *Pseudomonas stutzeri*, aislada del Puerto de Rosarito, B.C, México, demuestra que posee, al igual que muchos miembros del género de *Pseudomonas*, un metabolismo muy versátil ya que este microorganismo tiene la capacidad de crecer

en presencia de HAP de bajo y alto peso molecular, así como de utilizar estos compuestos tóxicos como su única fuente de carbono y energía. Además, es una productora de biosurfactantes del tipo ramnolípidos y formadora de biopelículas. Sumado lo anterior, *P. stutzeri* MLA9 es una cepa hidrocarbonoclasta que puede catalogarse como una excelente candidata para continuar los estudios de degradación de HAP, así como ahondar más en su caracterización para su posible aplicación en procesos de biorremediación.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Oceanológicas-Universidad Autónoma de Baja California, proyecto IIO-UABC [403/1949] y al Programa para el Desarrollo Profesional Docente, para el Tipo Superior (PRODEP), proyecto UABC-PTC-621.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Johnsen AR, Wick LY, Harms H. Principles of microbial PAH-degradation in soil. *Environ Pollut.* 2005;133(1):71–84.
- [2] Seo JS, Keum YS, Li QX. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int J Environ Res Public Health.* 2009; 6:278-309 p.
- [3] Bamforth SM, Singleton I. Bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons: Current

knowledge and future directions. *J Chem Technol Biotechnol.* 2005; 80(7):723–36.

- [4] Eriksson M, Sodersten E, Yu Z, Dalhammar G, Mohn WW. Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons at Low Temperature under Aerobic and Nitrate-Reducing Conditions in Enrichment Cultures from Northern Soils. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69(1):275–84. doi: <http://aem.asm.org/cgi/doi/10.1128/AEM.69.1.275-284.2003>

- [5] Haritash AK, Kaushik CP. Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): a review. *J Hazard Mater.* 2009;169(1–3):1–15. doi: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0304389409005494>

- [6] Cébron A, Norini M-P, Beguiristain T, Leyval C. Real-Time PCR quantification of PAH-ring hydroxylating dioxygenase (PAH-RHD□) genes from Gram positive and Gram negative bacteria in soil and sediment samples. *J Microbiol Methods.* 2008;73(2):148–59. doi: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701208000286?via%3Dihub>

- [7] Badejo AC, Badejo AO, Shin KH, Chai YG. A Gene Expression Study of the Activities of Aromatic Ring-Cleavage Dioxygenases in *Mycobacterium gilvum* PYR-GCK to Changes in Salinity and pH during Pyrene Degradation. *PLoS One.* 2013;8(2). e58066. doi:10.1371/journal.pone.0058066

- [8] Kumar M, León V, De Sisto Materano A, Ilzins OA, Luis L. Biosurfactant production and hydrocarbon-degradation by halotolerant and thermotolerant *Pseudomonas* sp. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008;24(7):1047–57.
- [9] Rodrigues AC, Wuertz S, Brito AG, Melo LF. Fluorene and phenanthrene uptake by *Pseudomonas putida* ATCC 17514: Kinetics and physiological aspects. *Biotechnol Bioeng.* 2005;90(3):281–9.
- [10] Fuentes S, Barra B, Caporaso JG, Seeger M. From Rare to Dominant□: a Fine-Tuned Soil Bacterial Bloom during. *Appl Environ Microbiol.* 2016;82(3):888–96.
- [11] Silva-Jiménez H, Araujo-Palomares CL, Macías-Zamora JV, Ramírez-Álvarez N, García-Lara B, Corrales-Escobosa AR. Identification by MALDI-TOF MS of Environmental Bacteria with High Potential to Degrade Pyrene. *J Mex Chem Soc.* 2018;62(2):1–13. doi: <http://www.jmcs.org.mx/index.php/jmcs/article/view/411>
- [12] Jiménez JI, Nogales J., García JL, Díaz E. A genomic view of the catabolic of aromatic compounds in *Pseudomonas*. In: Timmis KN, Ed. *Handb Hydrocarb Lipid Microbiol.* 2009; 1298-1325. doi: 10.1007/978-3-540-77587-4_91
- [13] Moscoso F, Deive FJ, Longo MA, Sanromán MA. Insights into polyaromatic hydrocarbon biodegradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930: operation at bioreactor scale and metabolic pathways. *Int J Environ Sci Technol.* 2015;12(4):1243–52.
- [14] Moscoso F, Deive FJ, Longo MA, Sanromán MA. Technoeconomic assessment of phenanthrene degradation by *Pseudomonas stutzeri* CECT 930 in a batch bioreactor. *Bioresour Technol.* 2012;104:81–9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.10.053>
- [15] Aitken MD, Kazunga C. Products from the Incomplete Metabolism of Pyrene by Polycyclic Aromatic Hydrocarbon-Degrading Bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 2000;66(5):1917–22.
- [16] Kong J, Wang H, Liang L, Li L, Xiong G, Hu Z. Phenanthrene degradation by the bacterium *Pseudomonas stutzeri* JP1 under low oxygen condition. *Int Biodeterior Biodegrad.* 2017;123:121–6. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2017.06.001>
- [17] Mohanram R, Jagtap C, Kumar P. Isolation, screening, and characterization of surface-active agent-producing, oil-degrading marine bacteria of Mumbai Harbor. *Mar Pollut Bull.* 2016;105(1):131–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.marpolbul.2016.02.040>
- [18] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215: 403–10.
- [19] Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version

7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016;33(7):1870–4.

[20] Singh P, Tiwary BN. Optimization of conditions for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation by *Pseudomonas stutzeri* P2 isolated from Chirimiri coal mines. *Biocatal Agric Biotechnol.* 2017;10:20–9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2017.02.001>

[21] Satpute SK, Bhawsar BD, Dhakephalkar PK, Chopade BA. Assessment of different screening methods for selecting biosurfactant producing marine bacteria. *Indian J Mar Sci.* 2008;37(3):243–50.

[22] O'Toole G, Kolter R. Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365. *Mol Microbiol.* 1998;28(3):449–461. doi: [http://www.csupomona.edu/~gbrlles/Mic428L/Supplementary reading Lab 3.pdf](http://www.csupomona.edu/~gbrlles/Mic428L/Supplementary%20reading%20Lab%203.pdf)

[23] Santos I, Martin M, Carlton D, Amorim C, Castro P, Hildenbrand Z, et al. MALDI-TOF MS for the Identification of Cultivable Organic-Degrading Bacteria in Contaminated Groundwater near Unconventional Natural Gas Extraction Sites. *Microorganisms.* 2017;5(3):47. doi: <http://www.mdpi.com/2076-2607/5/3/47>

[24] Popović NT, Kazazi SP, Strunjak-Perović I, Čož-Rakovac R. Differentiation of environmental aquatic bacterial isolates by MALDI-TOF MS. *Environ Res.* 2017; 152:7–16.

[25] Hasegawa M, Kishino H, Yano T aki. Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol.* 1985;22(2):160–74.

[26] Ma J, Xu L, Jia L. Characterization of pyrene degradation by *Pseudomonas* sp. strain Jpyr-1 isolated from active sewage sludge. *Bioresour Technol.* 2013;140:15–21.

[27] Ghosh I, Jasmine J, Mukherji S. Biodegradation of pyrene by a *Pseudomonas aeruginosa* strain RS1 isolated from refinery sludge. *Bioresour Technol.* 2014;166:548–58. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.05.074>

[28] Amini I, Tahmourespour A, Abdollahi A. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Pseudomonas* species. *Pollution.* 2017;3(1):9–19. doi: https://jpoll.ut.ac.ir/article_59566_0.html

[29] Sopeña F, Laiz L, Morillo E, Sanchez-Trujillo MA, Villaverde J, Jurado V, et al. Phenanthrene Biodegradation by *Pseudomonas xanthomarina* Isolated from an Aged Contaminated Soil. *Clean - Soil, Air, Water.* 2014;42(6):785–90.

[30] Feijoo-Siota L, Rosa-Dos-Santos F, De Miguel T, Villa TG. Biodegradation of naphthalene by *Pseudomonas stutzeri* in marine environments: Testing cells entrapment in calcium alginate for use in water detoxification. *Bioremediat J.* 2008;12(4):185–92.

[31] Jin J, Yao J, Zhang Q, Liu J. Biodegradation of pyrene by *Pseudomonas* sp. JPN2 and its initial degrading mechanism study by combining the catabolic nahAc gene and structure-based analyses.

Chemosphere. 2016;164:379–86. doi:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2016.08.113>

[32] Ghosal D, Ghosh S, Dutta TK, Ahn Y. Current state of knowledge in microbial degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Front Microbiol.* 2016;7:1396. doi: 10.3389/fmicb.2016.01369

[33] Obayori OS, Ilori MO, Adebuseye SA, Oyetibo GO, Amund OO. Pyrene-degradation potentials of *Pseudomonas* species isolated from polluted tropical soils. *World J Microbiol Biotechnol.* 2008;24(11):2639–46.

[34] Parales RE, Lee K, Resnick SM, Jiang H, Lessner DJ, Gibson DT. Substrate specificity of naphthalene dioxygenase: Effect of specific amino acids at the active site of the enzyme. *J Bacteriol.* 2000;182(6):1641–9.

[35] Nolan LC, O'Connor KE. Dioxygenase- and monooxygenase-catalysed synthesis of cis-dihydrodiols, catechols, epoxides and other oxygenated products. *Biotechnol Lett.* 2008;30(11):1879–91.

[36] Kauppi B, Lee K, Carredano E, Parales RE, Gibson DT, Eklund H, et al. Structure of an aromatic-ring-hydroxylating dioxygenase naphthalene 1,2-dioxygenase. *Structure.* 1998;6(5):571–86.

[37] Tavakoli A, Hamzah A. Characterization and evaluation of catechol oxygenases by twelve

bacteria, isolated from oil contaminated soils in Malaysia. *Biol J Microorg.* 2017;5(20):71–80.

[38] Kaskatepe B, Yildiz S. Rhamnolipid biosurfactants produced by *Pseudomonas* Species. *Brazilian Arch Biol Technol.* 2016;59:1–16.

[39] Tuleva BK, Ivanov GR, Christova NE. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift fur Naturforsch - Sect C J Biosci.* 2002;57(3–4):356–60.

[40] Vasileva-Tonkova E, Sotirova A, Galabova D. The effect of rhamnolipid biosurfactant produced by *Pseudomonas fluorescens* on model bacterial strains and isolates from industrial wastewater. *Curr Microbiol.* 2011;62(2):427–33.

[41] Gunther IV NW, Nuñez A, Fett W, Solaiman DKY. Production of rhamnolipids by *Pseudomonas chlororaphis*, a nonpathogenic bacterium. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(5):2288–93.

[42] Déziel E, Paquette G, Villemur R, Lépine F, Bisailon J, Le OIS. Biosurfactant Production by a Soil *Pseudomonas* Strain Growing on Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Appl Environ Microbiol.* 1996; 62(6):1908–12.

[43] Abdel-Mawgoud AM, Lépine F, Déziel E. Rhamnolipids: Diversity of structures, microbial origins and roles. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010;86(5):1323–36.

[44] Perfumo A, Rudden M, Marchant R, Banat M. Biodiversity of Biosurfactants and ROles in Enhancing the (Bio)availability of Hydrophobic Substrates. In: Krell T, Ed. *Cellular Ecophysiology*

of Microbe. Handb Hydrocarb Lipid Microbiol. 2017;1–29. doi:

http://link.springer.com/10.1007/978-3-319-20796-4_35-1

[45] Palomino RA, Romero G, González-Valdez A, Soberón-Chávez G, Gutiérrez SM, Merino FA. Presencia de genes rhIAB, rhIR y rhIC en *Pseudomonas aeruginosa* nativas sobreproductoras de ramnolúpidos. Rev Peru Biol. 2017;24(3):293–302.

[46] Toribio J, Escalante AE, Soberón-Chávez G. Rhamnolipids: Production in bacteria other than *Pseudomonas aeruginosa*. Eur J Lipid Sci Technol. 2010;112(10):1082–7.

[47] Yao X, Sun Q, Liu W, Yin X, Pei G, Wang Y, et al. Complete Genome Sequence of *Serratia rubidaea* Isolated in China. Genome Announc. 2016;4(2):e00283-16. doi:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125482>
[Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125482](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125482)
[%0Ahttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125482](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27125482)

[48] De Maayer P, Chan WY, Venter SN, Toth IK, Birch PRJ, Joubert F, et al. Genome sequence of *Pantoea ananatis* LMG20103, the causative agent of Eucalyptus blight and dieback. J Bacteriol. 2010;192(11):2936–7.

[49] Winsor GL, Griffiths EJ, Lo R, Dhillon BK, Shay JA, Brinkman FSL. Enhanced annotations and features for comparing thousands of *Pseudomonas* genomes in the *Pseudomonas* genome database.

Nucleic Acids Res. 2016;44(D1):D646–53. doi: 10.1093/nar/gkv1227

[50] Singh DN, Tripathi AK. Coal induced production of a rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas stutzeri*, isolated from the formation water of Jharia coalbed. Bioresour Technol. 2013;128:215–21. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.127>

[51] Johnsen AR, Karlson U. Evaluation of bacterial strategies to promote the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons. Appl Microbiol Biotechnol. 2004;63(4):452–9.

[52] Edwards SJ, Kjellerup B V. Applications of biofilms in bioremediation and biotransformation of persistent organic pollutants, pharmaceuticals/personal care products, and heavy metals. Appl Microbiol Biotechnol. 2013;97(23):9909–21.

[53] Khoei NS, Lampis S, Turner RJ, Vallini G, Andreolli M. A comparison of the response of two *Burkholderia fungorum* strains grown as planktonic cells versus biofilm to dibenzothiophene and select polycyclic aromatic hydrocarbons. Can J Microbiol. 2016;62(10):851–60.

[54] Mitra A, Mukhopadhyay S. Biofilm mediated decontamination of pollutants from the environment. AIMS Bioeng. 2016;3(1):44–59.

[55] Martirani-Von Abercron S-M, Marín P, Solsona-Ferraz M, Castañeda-Cataña M-A, Marqués S. Naphthalene biodegradation under oxygen-limiting conditions: community dynamics and the

relevance of biofilm-forming capacity. *Microb Biotechnol.* 2017; 10(6):1781–96.

[56] Dasgupta D, Ghosh R, Sengupta TK. Biofilm-Mediated Enhanced Crude Oil Degradation by Newly Isolated *Pseudomonas* Species. *ISRN Biotechnol.* 2013;2013: Article ID 250749. doi: <http://dx.doi.org/10.5402/2013/250749doi>