

RESPUESTA DE MICROORGANISMOS A LOS CONTAMINANTES AMBIENTALES. EL EJEMPLO DE LA *Pseudomonas putida* ML2

Corona, M.; Bonilla, M.; Soubes, M.¹

RESUMEN

En busca de microorganismos capaces de degradar hidrocarburos, se aisló una cepa identificada como *Pseudomonas putida* ML2 con capacidad de crecer en naftaleno a velocidades similares a las de glucosa. Entre las pruebas de selección se utilizaron dos índices de emulsificación que mostraron la producción y liberación al medio de un emulsificante. Se estudiaron las diferentes condiciones de producción así como diferentes propiedades fisicoquímicas del emulsificante. Se caracterizó el producto extracelular producido en medio mineral con glucosa como fuente de carbono, como un polisacárido formado por unidades repetidas de un hexasacárido, no descrito anteriormente. En medio complejo el microorganismo produjo también un emulsificante que tiene características fisicoquímicas diferentes al producido en medio mínimo-glucosa. En todas las condiciones ensayadas se produjo el emulsificante. Por el método de la sobrecapa se pudo demostrar la solubilización de fenantreno que no es utilizado como sustrato de crecimiento, lo cual sugiere que la producción del exopolisacárido es una adaptación al crecimiento en ambientes contaminados con hidrocarburos.

PALABRAS CLAVE: *Pseudomonas putida*, exopolisacárido, naftaleno, bioemulsificador, índice de emulsificación.

SUMMARY

RESPONSE OF MICROORGANISMS TO ENVIRONMENTAL CONTAMINANTS. *Pseudomonas putida* ML2 AS AN EXAMPLE

Searching for microorganisms with the ability to degrade hydrocarbons we isolated a strain of *Pseudomonas putida* named ML2 which has a high growth rate on naphthalene. Different indexes were employed to determine the emulsification properties of cell free supernatants produced under different culture conditions. Physicochemical properties of the crude supernatant were determined. The extracellular emulsifier produced in mineral medium with glucose as the only carbon source was characterized as a polysaccharide formed by hexasaccharide repeating units, not reported previously. In complex medium the produced emulsifier has physicochemical properties different from the emulsifier produced when growing on glucose.

KEY WORDS: *Pseudomonas putida*, exopolysaccharide, naphthalene, bioemulsifier, emulsification index.

INTRODUCCIÓN

Los surfactantes y los emulsionantes son productos que permiten frenar o enlentecer la tendencia natural a separarse que presentan las fases de un sistema heterogéneo termodinámicamente inestable. Son de naturaleza anfifílica.

Muchos procesos biológicos necesitan de la presencia de compuestos anfifílicos. No es de extrañar entonces que una enorme variedad de seres vivos sintetice compuestos con actividad superficial, a los que se considera

surfactantes naturales (Holmberg, 2001). Éstos son producidos tanto por las plantas (ej. saponinas, lecitinas), como por los microorganismos (ej. glicolípidos), e incluso por animales y el hombre (ej. sales biliares), para llevar a cabo actividades tanto a nivel intracelular como extracelular como la emulsificación de los alimentos, el transporte de material a través de las paredes celulares, o el reconocimiento celular (Bognolo, 1999).

Los compuestos de origen microbiano que exhiben actividad superficial elevada, es decir, disminuyen la tensión superficial y poseen alta capacidad emulsionante, son

¹Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química, General Flores 2124, CC 1157, Montevideo, Uruguay.

denominados biosurfactantes (Georgiou *et al.*, 1992) y constituyen uno de los principales grupos de surfactantes naturales (Kitamoto *et al.*, 2002; Nitschke & Pastore, 2002). De acuerdo a su peso molecular, los biosurfactantes son divididos en tres grandes grupos: biosurfactantes de bajo peso molecular, biosurfactantes de alto peso molecular o poliméricos, y biosurfactantes particulados (Desai & Banat, 1997). Los biosurfactantes de bajo peso molecular son glicolípidos, lipopéptidos, fosfolípidos, ácidos grasos o lípidos neutros. En términos generales, la estructura química de los biosurfactantes poliméricos involucra polisacáridos, proteínas, lipopolisacáridos, lipoproteínas o mezclas complejas de estos biopolímeros (Rosenberg & Ron, 1999). Dentro de los biosurfactantes particulados se incluyen, por un lado, vesículas extracelulares de membrana con actividad surfactante producidas por ciertos microorganismos, y por otro, algunas células microbianas que presentan una elevada hidrofobicidad o una actividad superficial considerable, y que son por esto consideradas en sí mismas como una forma especial de biosurfactantes (Bognolo, 1999; Desai & Banat, 1997; Nitschke & Pastore, 2002).

La producción a escala comercial de estos productos ha sido fundamentalmente para producir estabilizadores de emulsiones, tanto para la industria alimentaria como para aplicaciones medioambientales como la biorremediación, o la sustitución de solventes clorados en el mantenimiento de cañerías de petróleo.

Una de las propiedades más novedosas y singulares de los biosurfactantes en comparación con los surfactantes sintéticos es que presentan actividad biológica (Cameotra & Makkar, 2004; Kitamoto *et al.*, 2002; Singh & Cameotra, 2004). Se han descrito productos de este tipo capaces de actuar como agentes antibacterianos, antifúngicos y antivirales a la vez que otros muestran usos potenciales como agentes inmunoreguladores, agentes adhesivos e incluso en vacunas y en terapia génica (Cameotra & Makkar, 2004). Por lo tanto, los biosurfactantes han captado con el tiempo un interés creciente en varios campos (Bonilla *et al.*, 2005) como materiales multifuncionales para el nuevo siglo.

Años atrás se llevó a cabo una búsqueda de microorganismos utilizadores aerobios de petróleo en sedimentos de la bahía de Montevideo. De las múltiples caracterizaciones fenotípicas clásicas se seleccionó y estudió un microorganismo perteneciente en principio a la especie *Pseudomonas putida*, pero atípico en cuanto a la producción de pigmentos (no los produce) que producía un agente emulsificante. En este trabajo se describen diferentes propiedades del microorganismo y del emulsificante, y algunos factores que influyen en la producción en pequeña escala de este.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fuente del microorganismo

La cepa ML2 se aisló de un sedimento de la Bahía de Montevideo.

Las cepas de *Pseudomonas putida* DSM 291 y DSM 50222 fueron adquiridas en la colección alemana de microorganismos DSMZ.

Medios de cultivo y condiciones de incubación

Bushnell-Haas (BH) (Laboratorios Difco) Base mineral, composición por litro: $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,2 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,026 g; KH_2PO_4 1 g; K_2HPO_4 1 g; NH_4NO_3 1 g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,05 g. Para preparar medio sólido se agrega agar 15 g.

Base Mínima Mineral (BMM), modificada de (Navon-Venezia *et al.*, 1995). Composición por litro: KH_2PO_4 7,26 g; Na_2HPO_4 13,7 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,4 g; $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0,001 g; $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 0,0135 g. Para preparar medio sólido se agrega agar 15 g.

Agar Trypticosa Soja (TSA): (Laboratorios Difco) Composición por litro: Triptona 15 g; soytona 5 g, NaCl 5 g; agar 15 g.

Caldo Trypticosa Soja (TSB) (Laboratorios Difco) Composición por litro: Triptona 17 g; soytona 3 g; dextrosa 2,5 g; NaCl 5 g; K_2HPO_4 2,5 g.

El pH de estos medios fue inicialmente ajustado a 7,0.

Salvo que se indiquen específicamente otras condiciones el crecimiento de la cepa fue llevado a cabo en matraces tipo erlenmeyer conteniendo un volumen de medio de cultivo equivalente a la quinta parte de su volumen total. El medio de cultivo fue inoculado con 0,2 ml de una suspensión al 1-2 de la escala Mac Farland preparada a partir de un cultivo fresco de la cepa en TSA por cada 100 ml de medio. Los erlenmeyer fueron luego incubados a 28° C y bajo agitación orbital 100 rpm.

Condiciones de enriquecimiento y caracterización iniciales

Se sembraron 10 mL de sedimento en medio BH, con el agregado de crudo de petróleo como única fuente de carbono y energía e incubaron en baño con agitación (Stuart Scientific, Shaker bath SBS 30), a una temperatura entre 24 y 28 °C.

Como blanco se utilizó un matraz con medio BH estéril y 1 ml de crudo autoclavado.

Cada 20 días se tomaron 10 ml del enriquecimiento y se subcultivaron en nuevos matraces con 90 ml de BH y 1 ml de crudo autoclavado.

El procedimiento se repitió 5 veces. Luego de los 5 subcultivos se aislaron los microorganismos presentes por método de estrías en placa de medio TSA, con temperatura de incubación de 24 °C. La identificación preliminar se llevó a cabo por métodos convencionales (Gram, oxidasa, catalasa) y además se realizaron caracterizaciones de propiedades consideradas de interés tales como: capacidad de crecer en BH hexadecano (0,5mL/tubo), BH aceite de oliva (0,5mL/tubo), capacidad emulsificante y crecimiento en naftaleno, fenantreno y etanol como únicas fuentes de carbono.

Determinación de los parámetros óptimos de crecimiento

La temperatura y pH óptimos de crecimiento de la cepa fueron determinados a partir de los valores de tiempos de duplicación (t_d) de la misma para diferentes temperaturas de incubación y valores de pH inicial. Dichos valores fueron calculados a partir de las curvas de crecimiento ($\ln A_{600}$ vs. tiempo) de la cepa obtenidas en las diferentes condiciones (Brock & Madigan, 1993).

Preparación del sobrenadante libre de células

El sobrenadante libre de células (SLC) se obtuvo por centrifugación del cultivo a 10.000g durante 15 minutos a 4°C y posterior filtración a través de un filtro de membrana de 0.45m (Millipore Corp., Bedford, Massachusetts). Todos los SLCs fueron ensayados dentro de las cuatro horas siguientes al muestreo.

Para su preservación los SLCs fueron liofilizados y almacenados a 4°C. Se prepararon luego, en oportunidad de cada análisis, soluciones stock de trabajo (20mg/mL) a partir del polvo liofilizado con agua destilada.

Test de emulsificación

Se usaron dos técnicas diferentes:

- La determinación del índice de emulsificación con kerosene E_{24} (Cooper & Goldenberg, 1987) que consiste en agitar en vortex por 45 segundos en tubos de vidrio de 45mm volúmenes iguales de muestra y kerosene. Se deja en reposo por 24 hs y se mide el % del volumen total ocupado por emulsión (se utiliza como blanco un volumen igual de medio de cultivo sin sembrar);
- La actividad emulsificante de hexadecano E_{hex} por micrométodo modificado (Toren *et al.*, 2001) en el que 0,5mL de muestra se colocan en tubos tipo Eppendorf de 1,5 mL que contienen 1,0mL de solución tampón TM (20 mmol/L tampón Tris-HCl y

0,10 mmol/L $MgSO_4$) y 0,02 ml de hexadecano (Sigma Chemical Co., Poole, UK). Los tubos se agitaron en vortex a temperatura ambiente por 30 minutos a 300 rpm. Se midió la absorbancia a 600 nm (A_{600}) luego de 30 segundos de reposo contra un blanco preparado con 0,5 mL de TM en vez de muestra. Se reporta el promedio de tres ensayos de cada muestra como E_{hex} .

Determinación de concentración de glucosa y urea

Glucosa y urea se determinaron utilizando kits enzimáticos (Wiener Laboratorios SAIC, Rosario, Argentina) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Crecimiento en diferentes fuentes de carbono

Para evaluar el crecimiento de la cepa en diferentes fuentes de carbono se utilizó BMM conteniendo según el caso 500 ppm de naftaleno (agregados en forma sólida después de autoclavar el medio), 500 ppm de fenantreno (agregados en forma sólida antes de autoclavar el medio), 200 ppm de hexadecano (Sigma Chemical Co., Poole, UK) (agregadas antes de autoclavar el medio) o etanol al 0,5 % (etanol filtrado a través de un filtro de membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,22mm y agregado luego de autoclavar el medio), y urea como fuente de nitrógeno.

Influencia de la fuente de carbono y nitrógeno en la producción de surfactante

Se realizó en matraces de 200 mL con 50 mL de medio BMM incubado con agitación orbital (100 rpm, a 28°C) y con: a) 30g/L de glucosa o 30 g/L de glicerol como fuente de carbono, y b) 4,8 g/L de urea o 6,4g/L de NH_4NO_3 como fuente de nitrógeno. Se utilizó asimismo peptona (0,2g/L) o extracto de levadura (0,2 g/L) como factores de crecimiento.

Producción de emulsificante en medio mínimo optimizado

Se empleó para la producción de bioemulsionante, BMM con una concentración de glucosa de 10 g/L y una concentración de urea de 0,45 g/L. Se realizó el seguimiento de la concentración de glucosa y urea por kits enzimáticos así como la medida de absorbancia, y las pruebas de emulsificación en el SLC durante el transcurso del experimento.

En el caso del naftaleno, se agregó directamente al medio como sólido luego de la esterilización de la base.

Caracterización fisicoquímica del bioemulsificante

Modificación de la tensión superficial

La medida de la tensión superficial (τ) de los sobrenadantes se realizó con un tensiómetro K6 (Krüss GmbH, Hamburgo, Alemania), con una resolución de 0,1 mN/m utilizando el método del anillo de du Nouy, realizando las medidas por triplicado.

Solubilización del fenantreno

Se usó la técnica de sobrecapa de la sobrecapa de agarosa (Bogardt & Hemmingsen, 1992). Para preparar la sobrecapa, una solución al 1,5 % de agarosa de bajo punto de gelificación fue fundida y termostalizada a 45°C. Luego se agregaron por cada 3,5 ml de agarosa fundida 0,2 ml de una solución de 8,5 mg/ml de fenantreno en etanol previamente filtrada a través de un filtro de membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro 0,22 μ m. Ambas soluciones fueron mezcladas inmediatamente y la mezcla fue vertida sobre una capa solidificada de BMM agar conteniendo 1,8 g/l de urea. Una vez endurecida la sobrecapa las placas fueron sembradas por estría, incubadas a 28°C y observadas periódicamente para evaluar la formación de zonas de aclaramiento.

Capacidad de estabilizar emulsiones fuel oil/agua del emulsionante

Las muestras fueron colocadas en frascos de vidrio de 20 ml y se agregó a cada una de ellas una gota de fuel oil, se agitó la mezcla durante unos minutos y luego se la dejó reposar durante el tiempo adecuado. Se observó luego el aspecto del líquido y la cantidad de fuel-oil que quedó adherida a las paredes del recipiente.

Determinación del tipo de emulsión que se forma

Se tiñeron alternativamente las fases acuosa y oleosa mediante el uso de colorantes hidrosolubles y liposolubles, respectivamente, y se observó la emulsión formada al microscopio óptico.

Caracterización química

Se realizó caracterización preliminar por cromatografía de capa fina (Parra *et al.*, 1989). Los SLC liofilizados se resuspendieron en agua y ultrafiltraron a través de unidad ultrafree-20 (Millipore Corporation). Se agregaron 3 volúmenes de acetona fría al sobrenadante y se almacenó de un día para el otro a 4°C. El precipitado, se resuspendió en

agua destilada y se extrajo con fenol 90% w/v en agua. Se determinó el coeficiente E_{hex} de todas las fracciones.

Se realizó purificación de la fracción polisacáridica por cromatografía de gel-filtración (Sephacryl 200-S, Pharmacia).

Análisis de los azúcares

Se llevó a cabo la hidrólisis ácida con CF_3CO_2H 2M a 120°C 1 hora. Se neutralizó con $NaHCO_3$ y liofilizó. El polvo obtenido se utilizó para el análisis de azúcares por reducción (Solución acuosa saturada de $NaBH_4$ en NH_4OH 1M 1 hora) y acetilación (Ac_2O /piridina 1:1, 80°C, 30 min) seguida de cromatografía gaseosa (GC) y GC masa (GC-MS). La desacetilación se hizo con NH_4OH 1M a 25°C por 24 hs.

RESULTADOS

Caracterización de la cepa ML2

Identificación de la cepa

A través de pruebas convencionales y de los sistemas comerciales APIGN32 (Calleros, 1999) y VITEKGN+, la cepa ML2 se identificó como perteneciente al grupo fluorescens-putida, y en particular posiblemente como *Pseudomonas putida*. La información complementaria se obtuvo con la secuenciación del gen del ARNr 16S. El análisis por BLAST de esta secuencia, depositada en GenBank con el número de acceso AF378011, indicó una homología del 99% con cepa de referencia de *P. plecoglossicida* y otras *Pseudomonas* spp. Por ser este valor de homología superior al 97%, se realizaron estudios de hibridación ADN-ADN con la cepa de *P. putida* (DSM291). Los análisis de hibridación ADN-ADN entre la cepa ML2 y la cepa de referencia arrojaron un 96% de homología entre ambas, concluyéndose por tanto que ambas pertenecen a la misma especie y que la cepa ML2 es una nueva cepa de *Pseudomonas putida* con fenotipo diferente a las hasta ahora descritas.

Producción de emulsificantes por cepas de referencia

Se comparó la capacidad de producir bioemulsionante de la cepa ML2 con la de dos *Pseudomonas putida* pertenecientes a las biovariedades 1 y 2. Según se muestra en la Figura 1, la emulsificación de kerosene es un rasgo singular de la cepa ML2. Al cabo de 48 horas de incubación, no se detectó producción de bioemulsionantes en los caldos de cultivo correspondientes a las otras cepas de referencia, ya que la actividad emulsionante mostrada por estas fue equiva-

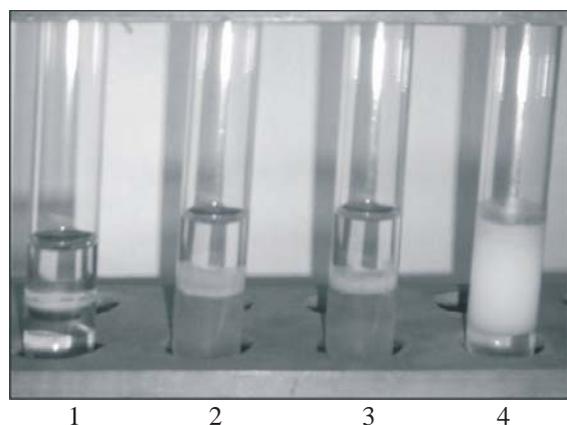


Figura 1. Comparación de la producción de emulsionante por distintas cepas de *Pseudomonas putida*. Se realizó la prueba del kerosene sobre una alícuota del cultivo obtenida a las 48 hs de incubación en medio TSB. **1.** Blanco de medio TSB **2.** *Pseudomonas putida* DSM 291 **3.** *Pseudomonas putida* DSM 50222 **4.** *Pseudomonas* ML2. Los valores de los porcentajes de emulsificación son 1,5 %, 1,5 %, 1,5 % y 66%, respectivamente

lente a la registrada para el blanco de medio TSB sin inocular. Por lo tanto la capacidad de producir bioemulsionantes no es un rasgo común dentro de la especie.

Crecimiento en diversas fuentes de carbono

La cepa fue capaz de crecer utilizando glucosa, naftaleno, etanol y glicerol como única fuente de carbono. Con res-

pecto al fenantreno el comportamiento fue muy diferente. Cuando se empleó fenantreno como única fuente de carbono en medio mínimo líquido no se registró crecimiento de la cepa. Si bien se observó la aparición de un producto hidrosoluble de color amarillo en el medio, no hubo evidencias macroscópicas de crecimiento.

En todos los casos en que hubo crecimiento, se detectó actividad emulsificante por alguno de los dos métodos tanto en el cultivo como en el SLC. No hubo crecimiento en hexadecano.

Determinación de los parámetros óptimos de crecimiento

Según se muestra en el Cuadro 1, las condiciones de incubación más convenientes para el crecimiento de la cepa son un pH inicial 7,0 tanto en medio TSB como en medio mínimo, y 28°C de temperatura. Este último valor está dentro del rango de temperaturas óptimas de crecimiento reportado para la especie (Palleroni, 1984).

Influencia de las fuentes de carbono y nitrógeno sobre la producción de bioemulsionante

Como alternativas a la glucosa y la urea del medio original se ensayaron el glicerol y el nitrato de amonio, respectivamente. Además se usaron peptona y/o extracto de levadura en bajas concentraciones y en todas las combinaciones posibles con las distintas fuentes de carbono y nitrógeno.

Cuadro 1. Determinación de la temperatura y pH óptimos de crecimiento. Valores de tiempos de duplicación (t_D) de la cepa ML2 para diferentes temperaturas de incubación y valores de pH inicial, en los medios de cultivo que se indican. Medio mínimo: medio BMM conteniendo 30 g/l de glucosa y 1,8 g/L de urea.

MEDIO	T (°C)	tD (min)
Medio mínimo	24,0	117
	28,0	43
	35,0	93

pH inicial: 7,0

MEDIO	pH	tD (min)
Medio mínimo	6,0	78
	7,0	43
	8,0	145
TSB	6,0	73
	7,0	50
	8,0	78

Temperatura de incubación: 28°C

Se consideró que la cepa era capaz de reducir el nitrato en forma asimilativa, según datos obtenidos anteriormente por nuestro grupo (Calleros, 1999).

Como se muestra en la Figura 2, el uso de distintas fuentes de nitrógeno y carbono influye sobre la producción de emulsionante. Con respecto a la fuente de nitrógeno, cuando se utilizó urea, y por tanto todo el nitrógeno fue suministrado al nivel de oxidación del amonio, la actividad emulsionante que se obtuvo fue siempre superior que cuando se utilizó nitrato de amonio, caso en el que parte del nitrógeno fue aportado en el estado de oxidación del amonio y parte en el estado de oxidación del nitrato. Para la fuente de carbono, las actividades registradas fueron mayores con glucosa que con glicerol en casi todos los casos cuando se empleó nitrato de amonio, mientras que con urea como fuente de nitrógeno, las actividades fueron levemente superiores para el medio con glicerol que

para el medio con glucosa. Cuando se aportaron peptona y/o extracto de levadura como factores de crecimiento se registró un aumento pequeño de la actividad emulsionante en algún caso. No existe por tanto un efecto de estimulación de la producción de bioemulsionante por parte de estos componentes del medio, por lo que se excluyeron en el proceso de optimización del medio mineral.

Producción de emulsificante en medio mínimo optimizado

Durante el crecimiento en medio mineral con glucosa (Figura 3), la actividad emulsificante del SLC aumentó junto con el número de células. No se obtuvieron cambios significativos en E_{24} ni E_{hex} luego de las 72 horas.

En TSB el E_{24} alcanzado fue mayor que en MMB glucosa con un máximo de 55% al cuarto día. En contraposición el E_{hex} fue siempre menor en TSB (max 1,2) que en glucosa.

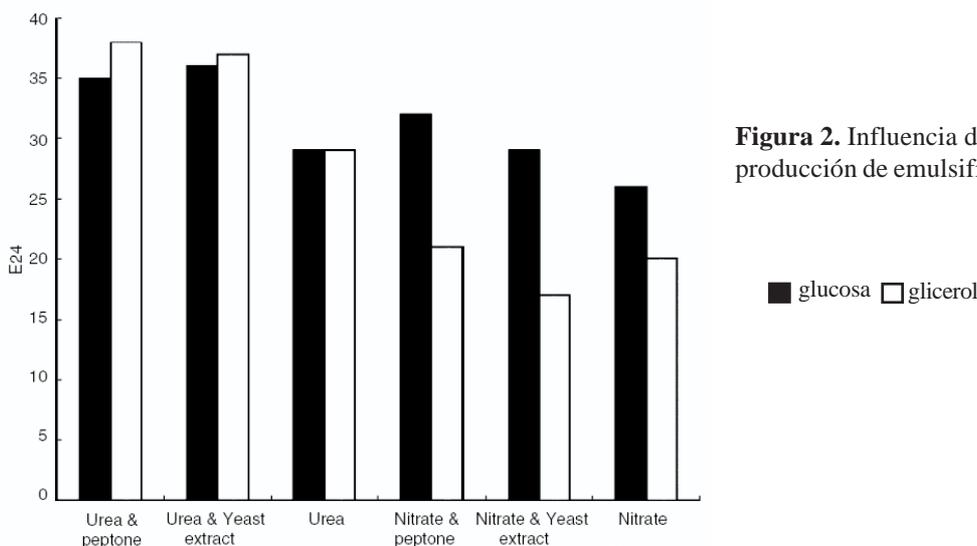
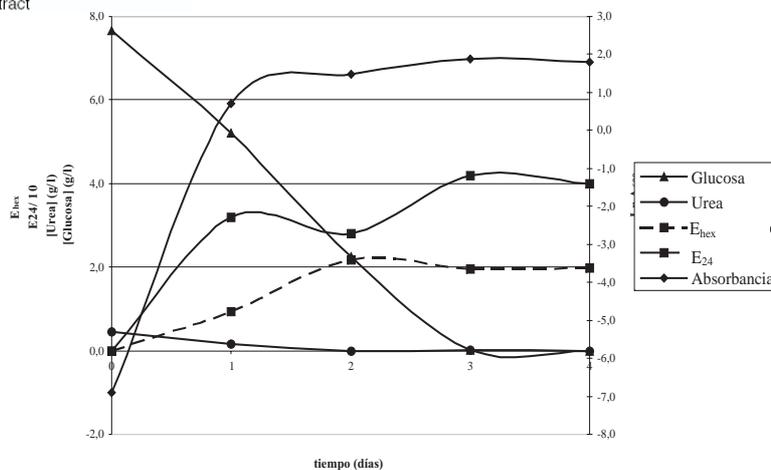


Figura 2. Influencia de la fuente de C y N sobre la producción de emulsificante E_{24} .

Figura 3. Seguimiento de la producción de bioemulsionante en medio mínimo glucosa.

La cepa fue crecida en medio base MM2 con 10 g/l de glucosa y 0,45 g/l de urea. Se siguieron cuatro fermentaciones idénticas en paralelo. Los valores de $\ln A_{600}$ mostrados corresponden al \ln de la A_{600} promedio de alícuotas tomadas de cada uno de los cuatro cultivos cada día. Los valores de [Glucosa], [Urea], E_{24} y E_{hex} corresponden a alícuotas que fueron tomadas cada uno de los días de un cultivo diferente



Cuando se llevó a cabo el cultivo en BMM, con urea y naftaleno como fuente de carbono (Figura 4) se obtuvieron elevados índices de emulsificación tanto con kerosene como con hexadecano que acompañaron el crecimiento celular. Las emulsiones producidas con kerosene fueron estables por varios días.

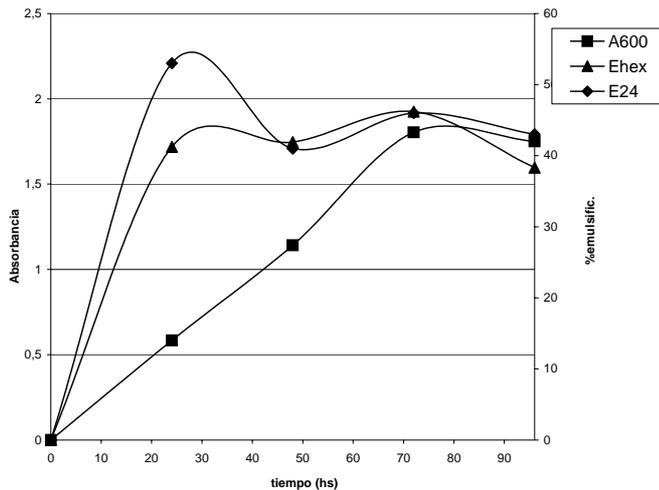


Figura 4. Cultivo en medio mineral con naftaleno como única fuente de carbono.

Propiedades fisicoquímicas del emulsificante

Modificación de la tensión superficial

Después de 96 hs de incubación, el SLC del cultivo en TSB mostró una tensión superficial de 35mN/m y el cultivo en medio optimizado con glucosa y urea 56,2 mN/m. Estos valores se corresponden con E_{24} de 68% y 42% y E_{hex} de 1 y 2,3 respectivamente.

Solubilización del fenantreno

Cuando se ensayó el comportamiento de la cepa respecto al fenantreno en medio sólido mediante la técnica de la sobrecapa de agarosa, se visualizaron zonas de desaparición de las partículas de fenantreno alrededor de la estría (ver Figura 5). No puede afirmarse por esto que la cepa sea capaz de crecer en fenantreno como única fuente de carbono dado que la cepa fue capaz de crecer en placas que solamente contenían la capa inferior de agar mineral utilizando impurezas del agar como fuente de carbono probablemente. Por lo tanto la aparición de zonas de aclaramiento en la sobrecapa podría interpretarse, en forma similar a como lo han hecho en su caso los autores que proponen

este método (Bogardt and Hemmingsen, 1992): se debe a la solubilización del fenantreno. Esta solubilización podría deberse al emulsionante liberado al medio.

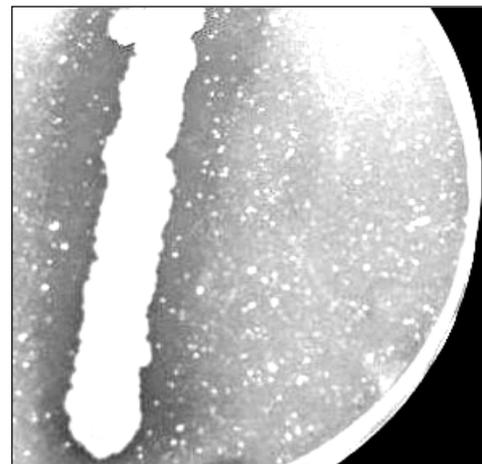


Figura 5. Solubilización del fenantreno por la cepa ML-2. La imagen se obtuvo tras dos semanas de incubación de las placas.

Determinación del tipo de emulsión

Cuando se utilizaron colorantes liposolubles, fueron las gotas en la emulsión quienes se tiñeron, mientras que con colorantes hidrosolubles el color apareció por fuera de las gotas, es decir, en el resto de la emulsión. Por lo tanto, las emulsiones formadas por el bioemulsionante son del tipo aceite-en-agua.

Estabilización de emulsiones de fuel-oil en agua

Para evaluar la capacidad del compuesto de emulsionar fuel-oil se recurrió a un ensayo de emulsificación sencillo, cuyos resultados se muestran en la Figura 6. Como puede verse allí, en aquellas muestras en las que el emulsionante estaba presente (muestras 2 y 3) la fase acuosa se ennegreció, en comparación con el blanco de medio TSB (muestra 1), y además una cantidad menor de fuel oil permaneció adherida a las paredes del frasco. Esto indica que el fuel oil se encuentra emulsionado en la fase acuosa por efecto del bioemulsionante. Por otra parte, estas mezclas mantuvieron este mismo aspecto durante varios meses. Así, el bioemulsionante sería capaz de estabilizar emulsiones fuel-oil en agua por largos períodos de tiempo.

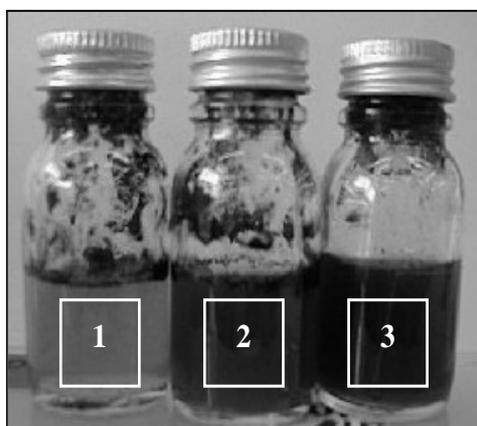


Figura 6. Ensayo cualitativo para evaluar la capacidad del emulsionante de estabilizar emulsiones fuel oil/agua.

1. Blanco de medio TSB;
2. SLC de un cultivo de 48 hs en medio TSB;
3. Liofilizado de un SLC de cultivo de 48 hs en medio TSB resuspendido en agua a concentración desconocida.

Características químicas

El análisis por TLC, y el fraccionamiento seguido por ensayo de emulsificación descartó que el emulsificante fuera de los siguientes tipos de compuestos de bajo peso molecular: péptidos, lipopéptidos, ramnolípidos, glicolípidos, y fosfolípidos. También se descartó que se tratara de una proteína. Se concluyó finalmente que se trataba de un polisacárido.

En particular se trata de una estructura en que se repite un hexasacárido consistente en unidades de ramnosa, glucosa y glucosamina en relación molar 3:2:1, con residuos N-acetil y O-piruvil (Bonilla *et al.*, 2005).

DISCUSIÓN

La mayor parte de la investigación sobre biosurfactantes de *Pseudomonas* se ha enfocado en los ramnolípidos de *Pseudomonas aeruginosa* (Holden *et al.*, 2002; Reiling *et al.*, 1986; Sandrin *et al.*, 2000) y recientemente se reportó una cepa de *Pseudomonas putida* que produce ramnolípidos (Tuleva *et al.*, 2002).

En cuanto a exopolisacáridos (EPS), alginatos, levanos y el galactoglucano marginalan (Osman & Fett, 1989; Royan *et al.*, 1999) han sido descritos como los más frecuentemente producidos por *Pseudomonas* spp. (Cescutti *et al.*, 1999; Royan *et al.*, 1999).

Con respecto a los polisacáridos segregados por *P. putida* se ha descrito un alginato (Govan *et al.*, 1981), y otro similar al marginalan (Read and Costerton, 1987). Este EPS está constituido por cantidades equimoleculares de glucosa y galactosa combinadas con acetato y piruvato. Finalmente, recientemente se describió otro EPS de *P. putida* (Kachlany *et al.*, 2001) pero con una estructura completamente diferente del descrito en este trabajo.

A diferencia de otros reportes, la cepa ML2, produce el EPS cuando crece en sustratos como glicerol, naftaleno y etanol, además de glucosa, en medios minerales simples, y también en medios complejos como el TSB donde además de azúcares hay peptonas.

Los valores bajos de Ehex en TSB comparados con el medio mínimo glucosa, así como los valores elevados de E24 que se obtienen siempre en TSB sugieren que el producto en los medios que contienen peptonas podría ser diferentes, tal vez similar al emulsan (mezcla de carbohidratos y proteínas) producido por *Acinetobacter* (Toren *et al.*, 2002).

Como el emulsificante se produce también cuando crece en naftaleno, podría cumplir un rol en la solubilización de hidrocarburos como se demuestra por el método de sobrecapa de fenantreno (Figura 5), propiedad que se ha atribuido también al EPS de *Rhodococcus rhodochrous* S-2 (Iwabuchi *et al.*, 2002).

El nuevo compuesto descrito parcialmente en este trabajo confirma la alta versatilidad de una cepa perteneciente a una especie conocida desde hace mucho tiempo.

La propiedad de emulsificar se mantuvo sin presión exterior, por lo cual se considera que se trata de una característica constitutiva que al igual que la posibilidad de crecer en naftaleno no puede asignarse a plásmidos (resultados nuestros no mostrados).

En el Laboratorio de Biotecnología Ambiental de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Química hemos aislado y caracterizado otros microorganismos no descritos hasta el presente como *Caloramator proteoclasticus* (Tarlera *et al.*, 1997), *Coprotermobacter platensis* (Etchebehere *et al.*, 1998), *Comanomona nitrativorans* (Etchebehere *et al.*, 2001), *Anaerobaculum mobile* (Menes & Muxi, 2002), y *Sterolibacterium denitrificans* (Tarlera & Denner, 2003), en todos los casos vinculados a procesos de interés medioambiental por lo cual estamos convencidos de que la biodiversidad bacteriana aún dentro de los microorganismos cultivables al presente continúa sin ser descubierta totalmente. Tanto métodos clásicos como moleculares deben continuar siendo aplicados para visualizar fenotipos de interés.

En cuanto al presente trabajo continuamos con la caracterización química del producto producido en diferen-

tes condiciones de cultivo. También trabajamos en la utilización de desechos como sustratos para su producción con miras a su utilización sin purificar en procesos de biorremediación.

AGRADECIMIENTOS

A la Comisión Sectorial de Investigación Científica de la Universidad de la República, Uruguay por el apoyo financiero, y a Alvaro Vazquez y Cristina Olivaro por la caracterización del exopolisacárido que se describe en el trabajo (Bonilla *et al.*, 2005).

BIBLIOGRAFÍA

- BOGARDT, A. H. & HEMMINGSEN, B. B. 1992. Enumeration of phenanthrene-degrading bacteria by an overlay technique and its use in evaluation of petroleum-contaminated sites. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2579-2582.
- BOGNOLO, G. 1999. Biosurfactants as emulsifying agents for hydrocarbons. *Colloids Surf., A* **152**, 41-52.
- BONILLA, M., OLIVARO, C., CORONA, M., VAZQUEZ, A. & SOUBES, M. 2005. Production and characterization of a new bioemulsifier from *Pseudomonas putida* ML2. *Journal of Applied Microbiology* **98**, 456-463.
- BROCK, T. D. & MADIGAN, M. T. 1993. *Microbiología*, Prentice-Hall Hispanoamericana, México.
- CALLEROS, L. 1999. In *Cátedra de Microbiología* Facultad de Química, Universidad de la República, Montevideo, pp. 41.
- CAMEOTRA, S. S. & MAKKAR, R. S. 2004. Recent applications of biosurfactants as biological and immunological molecules. *Current Opinion in Microbiology* **7**, 262-266.
- CESCUTTI, P., TOFFANIN, R., POLLESELLO, P. & SUTHERLAND, I. 1999. Structural determination of the acidic exopolysaccharide produced by a *Pseudomonas* sp. strain 1.15. *Carbohydrate Research* **315**, 159-168.
- COOPER, D. G. & GOLDENBERG, B. G. 1987. Surface-active agents from two *Bacillus* species. *Applied and Environmental Microbiology* **53**, 224-229.
- DESAI, J. D. & BANAT, I. M. 1997. Microbial production of surfactants and their commercial potential. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 47-64.
- ETCHEBEHERE, C., ERRAZQUIN, M. I., DABERT, P., MOLETTA, R. & MUXI, L. 2001. *Comamonas nitrivorans* sp. nov., a novel denitrifier isolated from a denitrifying reactor treating landfill leachate. *Int J Syst Evol Microbiol* **51**, 977-83.
- ETCHEBEHERE, C., PAVAN, M. E., ZORZOPULOS, J., SOUBES, M. & MUXI, L. 1998. *Coprothermobacter platensis* sp. nov., a new anaerobic proteolytic thermophilic bacterium isolated from an anaerobic mesophilic sludge. *Int J Syst Bacteriol* **48 Pt 4**, 1297-304.
- GEORGIOU, G., LIN, S. C. & SHARMA, M. M. 1992. Surface-active compounds from microorganisms. *Biotechnology* **10**, 60-65.
- GOVAN, J. R., FYFE, J. A. & JARMAN, T. R. 1981. Isolation of alginate-producing mutants of *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas mendocina*. *Journal of General Microbiology* **125**, 217-220.
- HOLDEN, P. A., LAMONTAGNE, M. G., BRUCE, A. K., MILLER, W. G. & LINDOW, S. E. 2002. Assessing the role of *Pseudomonas aeruginosa* surface-active gene expression in hexadecane biodegradation in sand. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2509-2518.
- HOLMBERG, K. 2001. Natural surfactants. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **6**, 148-159.
- IWABUCHI, N., SUNAIRI, M., URAI, M., ITOH, C., ANZAI, H., NAKAJIMA, M. & HARAYAMA, S. 2002. Extracellular polysaccharides of *Rhodococcus rhodochrous* S-2 stimulate the degradation of aromatic components in crude oil by indigenous marine bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **68**, 2337-2343.
- KACHLANY, S. C., LEVERY, S. B., KIM, J. S., REUHS, B. L., LION, L. W. & GHIORSE, W. C. 2001. Structure and carbohydrate analysis of the exopolysaccharide capsule of *Pseudomonas putida* G7. *Environmental Microbiology* **3**, 774-784.
- KITAMOTO, D., ISODA, H. & NAKAHARA, T. 2002. Functions and potential applications of glycolipid biosurfactants — from energy-saving materials to gene delivery carriers. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **94**, 187-201.
- MENES, R. J. & MUXI, L. 2002. *Anaerobaculum mobile* sp. nov., a novel anaerobic, moderately thermophilic, peptide-fermenting bacterium that uses crotonate as an electron acceptor, and emended description of the genus *Anaerobaculum*. *Int J Syst Evol Microbiol* **52**, 157-64.
- NAVON-VENEZIA, S., ZOSIM, Z., GOTTLIEB, A., LEGMANN, R., CARMELI, S., RON, E. Z. & ROSENBERG, E. 1995. Alasan, a new bioemulsifier from *Acinetobacter radioresistens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3240-3244.
- NITSCHKE, M. & PASTORE, G. M. 2002. Biosurfactantes: propiedades e aplicações. *Quim. Nova* **25**, 772-776.

- OSMAN, S. F. & FETT, W. F. 1989. Structure of an acidic exopolysaccharide of *Pseudomonas marginalis* HT041B. *Journal of Bacteriology* **171**, 1760-1762.
- PALLERONI, N. J. 1984. Family I. Pseudomonadaceae. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 1 (Ed. Krieg, N. R.) Williams and Wilkins, Baltimore, MD, pp. 141-219.
- PARRA, J. L., GUINEA, J., MANRESA, M. A., ROBERT, M., MERCADÉ, M. E., CORMELLES, F. & BOSCH, M. P. 1989. Chemical characterization and physicochemical behaviour of biosurfactants. *Journal of the American Oil Chemists Society* **66**, 141-145.
- READ, R. R. & COSTERTON, J. W. 1987. Purification and characterization of adhesive exopolysaccharides from *Pseudomonas putida* and *Pseudomonas fluorescens*. *Canadian Journal of Microbiology* **33**, 1080-1090.
- REILING, H. E., THANEI-WYSS, U., GUERRA-SANTOS, L. H., HIRT, R., KAPPELI, O. & FIECHTER, A. 1986. Pilot plant production of rhamnolipid biosurfactant by *Pseudomonas aeruginosa*. *Applied and Environmental Microbiology* **51**, 985-989.
- ROSENBERG, E. & RON, E. Z. 1999. High- and low-molecular-mass microbial surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 154-162.
- ROYAN, S., PARULEKAR, C. & MAVINKURVE, S. 1999. Exopolysaccharides of *Pseudomonas mendocina* P2d. *Letters in Applied Microbiology* **29**, 342-346.
- SANDRIN, T. R., CHECH, A. M. & MAIER, R. M. 2000. A rhamnolipid biosurfactant reduces cadmium toxicity during naphthalene biodegradation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 4585-4588.
- SINGH, P. & CAMEOTRA, S. S. 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends in Biotechnology* **22**, 142-146.
- TARLERA, S. & DENNER, E. B. 2003. *Sterolibacterium denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel cholesterol-oxidizing, denitrifying member of the beta-Proteobacteria. *Int J Syst Evol Microbiol* **53**, 1085-91.
- TARLERA, S., MUXI, L., SOUBES, M. & STAMS, A. J. 1997. *Caloramator proteoclasticus* sp. nov., a new moderately thermophilic anaerobic proteolytic bacterium. *Int J Syst Bacteriol* **47**, 651-6.
- TOREN, A., NAVON-VENEZIA, S., RON, E. Z. & ROSENBERG, E. 2001. Emulsifying activities of purified alasan proteins from *Acinetobacter radioresistens* KA53. *Applied and Environmental Microbiology* **67**, 1102-6.
- TOREN, A., ORR, E., PAITAN, Y., RON, E. Z. & ROSENBERG, E. 2002. The active component of the bioemulsifier alasan from *Acinetobacter radioresistens* KA53 is an OmpA-like protein. *Journal of Bacteriology* **184**, 165-170.
- TULEVA, B. K., IVANOV, G. R. & CHRISTOVA, N. E. 2002. Biosurfactant production by a new *Pseudomonas putida* strain. *Zeitschrift Fur Naturforschung C: Journal of Biosciences* **57**, 356-360.