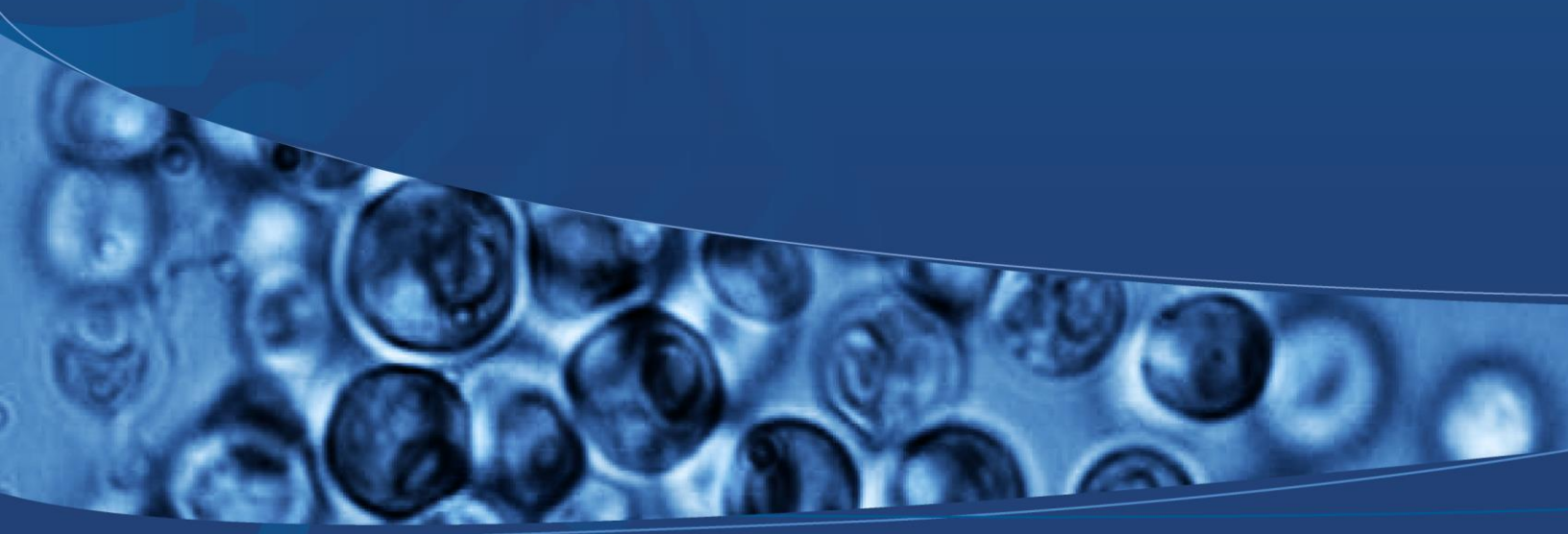
Revista de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería A.C.



Año 2019 Volumen 23, Número 1
ISSN 0188-4786

Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería

Revista de la Sociedad Mexicana de
Biotecnología
y Bioingeniería A.C.

MESA DIRECTIVA

Dr. Adelfo Escalante Lozada
Presidente

Dr.Jaime Ortega López
Vice-Presidente

Dra. Sylvie Leborgne
Secretario

Dra. Angélica Meneses Acosta
Tesorero

Dr. Alvaro R. Lara
Subsecretario

Dra. Angélica Meneses Acosta
Vocal Profesional

Q. A. Alma Y. Alva Aviles
Vocal Estudiante

COMITÉ EDITORIAL

Dra. Romina Rodríguez Sanoja
Editora en Jefe
Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM

Dr. Luis Bernardo Flores Cotera
CINVESTAV

Dr. Fernando Luis García Carreño
CIBNOR

Dr. Mariano Gutiérrez Rojas
UAM-I

Dra. Sara Solís Pereira
Instituto Tecnológico de Mérida

Dra. Elizabeth Langley McCarron
Instituto Nacional de Cancerología

ISSN 0188-4786, revista cuatrimestral publicada por la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, A.C. incluida en PERIÓDICA, índice de Revista Latinoamericanas en Ciencias (CICH-UNAM). Certificado de Licitud de Título en trámite y Certificado de Licitud de Contenido en trámite. Reserva de derechos de Título04-1999-082516265000-101. Los Conceptos que en ella aparecen son responsabilidad exclusiva de los autores. Se prohíbe la reproducción total o parcial de su contenido sin previa autorización por escrito del Comité editorial. Toda correspondencia deberá enviarse a Km. 23.5 Carretera Federal México-Cuernavaca, Av. Cipreses s/n, Col. San Andrés Totoltepec, C.P. 14400, Del. Tlalpan, México, D.F. o a la siguiente dirección electrónica smbb1982@gmail.com

INSTRUCCIONES PARA LOS AUTORES 4

ARTÍCULOS

Aislamiento y caracterización de una cepa de Streptomyces thermocarboxydus con actividad antibiótica

Mariana Ávalos-García, Beatriz Ruiz-Villafán, Romina Rodríguez-Sanoja y Sergio Sánchez 8

Importancia del pH y protocolo de desinfección en la germinación de esporas de Cyathea bicrenata

Samanta A. Reyes, Héctor González, Ana M. Castillo, Víctor H. Volke, Carmen Jacinto, César Carvajal, Gabino García 22

Uso de Pseudomonas aeruginosa en biorremediación

Daniel Luján 32

Guía de Autores

La revista puede recibir trabajos de investigación original, así como de revisión en los campos de la biotecnología y bioingeniería. Todos los manuscritos serán sujetos a revisión por al menos dos miembros del Comité Editorial y deberán contar con una recomendación de aceptación para ser publicados.

Los idiomas de la revista son el español y el inglés.

Los trabajos se escribirán en hoja tamaño carta (21.6 cm x 27.6 cm). Los márgenes aplicados a todo el manuscrito serán de 2.5 cm para los extremos superior e inferior, así como 3 cm de cada lado. Las páginas deberán estar numeradas en la parte inferior y central de cada hoja.

Para evitar errores innecesarios se recomienda usar el corrector de gramática y ortografía del procesador de palabras. Se recomienda que los trabajos completos tengan un máximo de 25 páginas, escritas con un interlineado de 1.5 renglones, incluyendo las tablas y figuras. Las publicaciones en la revista Biotecnología están exentas de costo para los autores.

Cuando corresponda, se recomienda el uso de abreviaturas para referirse a unidades de tiempo (h, min, s), de volumen (l, ml, µl), de peso (kg, g, mg, µg), ADN, ARN y otras comúnmente aceptadas en la literatura científica.

Los trabajos de investigación original pueden tocar cualquiera de los diversos campos que cultivan la biotecnología y la bioingeniería, desde aspectos fundamentales hasta sus aplicaciones, incluyendo: Enzimas y Biocatálisis, Microbiología, Biotecnología Agrícola y Vegetal, Biotecnología Marina, Alimentos y bebidas, Biotecnología Ambiental, Bioingeniería y fermentaciones, Bioenergía y biocombustibles, Biología de sistemas y bioinformática, Biología sintética, Nanobiotecnología y biomateriales, Ingeniería metabólica, Omicas, Bioseguridad y Bioética.

Tanto los trabajos de investigación original como las revisiones deberán apegarse al siguiente formato:

Instrucciones para los autores

1. El título del manuscrito será puesto en negritas con letra Arial o equivalente tamaño 14. El título deberá estar centrado y ser conciso e informativo. Evite el uso de abreviaciones y fórmulas.
2. El nombre de los autores ocupará los siguientes renglones escribiendo el nombre y primer apellido de cada participante. Se usará letra Arial o equivalente tamaño 12. Los nombres de los participantes deberán estar centrados, señalando con un asterisco el autor responsable de la publicación. En el siguiente renglón con letra itálica Arial del mismo tamaño, se incluirá la dirección postal de la institución de adscripción de los autores, así como la dirección de correo del autor corresponsal.
3. Se deberá añadir un Resumen de no más de 250 palabras en español y el correspondiente Abstract en inglés.
4. Se incluirán entre 3 a 6 Palabras clave: que permitan clasificar el artículo en una base de datos. Estas palabras deberán de incluirse en español y en inglés (Key words).
5. Si el texto inicia con el nombre de algún subtema, éste de pondrá como primera línea en cursivas con letra Arial o equivalente tamaño 10. Después en el siguiente renglón se iniciará el texto descriptivo usando letra Arial o equivalente tamaño 10. El texto deberá ser escrito con un interlineado de 1.5 renglones. Se deberá dejar un espacio de un renglón al inicio de una sección o subtema nuevo. Los géneros y especies deberán escribirse en letras itálicas.
6. Las figuras deberán numerarse con arábigos, correlativamente en orden de aparición en el texto. No se integrarán al texto, sino al final del manuscrito. No obstante, para facilitar el trabajo de edición, se recomienda indicar la ubicación de las mismas en el momento en que son mencionadas por primera vez en el texto. Las figuras deben incluir un breve título explicativo en la parte inferior de la misma. Si es necesario incluir fotos, éstas se deberán designar como figuras.
7. Las tablas también se numerarán con arábigos ubicados en la parte superior de las mismas e incluirán un breve título explicativo. Las notas en las tablas deberán ser indicadas con letras minúsculas en superíndice. La ubicación de las tablas será señalada en el texto, pero se anexarán en hojas separadas y al igual que las figuras, al final del manuscrito.
8. La información dada como referencias bibliográficas deberá permitir a los lectores llegar con facilidad a la fuente de información original. En el texto del trabajo, las referencias se citan por autor y año entre paréntesis redondos. Por ejemplo: “Martínez & García

(1999) han demostrado que...", o bien, "Datos recientes (Martínez & García, 1999) han demostrado que...". Si la cita posee varios autores se escribirá como sigue: "Gutiérrez et al. (2003), han demostrado…" O bien: "Datos recientes (Gutiérrez et al., 2003) han mostrado…" Si la cita es una página de Internet, la dirección URL deberá escribirse completa y entre paréntesis directamente en el texto.

9. La lista de Referencias se deberá escribir con el mismo tipo de letra del texto principal (Arial tamaño 10) y con sangría francesa de acuerdo con el siguiente formato:

Artículos:

García-Carreño F, Cota K & Navarrete del Toro MA (2008) Phenoloxidase activity of hemocyanin in whiteleg shrimp, Penaeus vannamei: conversion, characterization of catalytic properties, and role in postmortem melanosis. J. Agric. Food Chem. 56: 6454-6459.

Libros:

Ullrich M (2009) Bacterial Polysaccharides: Current Innovations and Future Trends. Horizon Scientific Press, Norwich.

Capítulos de libros:

Sánchez S & Demain AL (2009) Metabolic regulation and overproduction of primary metabolites. In: Encyclopedia of Industrial Biotechnology. Bioprocess, Bioseparation, and Cell Technology (EIB). Flickinger MC (ed). John Wiley & Sons, Inc. Hoboken, NJ. pp. 396-458.

Patentes:

Fenical WH, Jensen PR & Kwon HC (2009) Polyol macrolide antitumor-antibiotics from the marine actinomycete strain CNQ140. US patent 7,521,414.

Congresos y reuniones (Se aceptarán un máximo de dos citas de este tipo):

Reyes N, Domínguez RM, Islas I & Solis S (2007) Inducción diferencial por pH y temperatura del complejo pectinolítico producido por células inmovilizadas de Aspergillus HL. XII Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería. Morelia Mich. México. OIII-12.

Sitios en internet:

Van Deuren J, Wang Z & Ledbetter J (1997) Remediation Technologies Screening Matrix and Reference Guide. 3ª Ed. Technology Innovation Office, EPA. Disponible en: http://www.epa.gov/tio/ remed.htm.

Revistas electrónicas:

Sun J, Lu X, Rinas U, & Zeng AP (2007) Metabolic peculiarities of Aspergillus niger disclosed by comparative metabolic genomics. Genome Biol. 8: R182.

Tesis de pre y posgrado:

Cárdenas C (2009) Evaluación del uso biotecnológico de la semilla de Ditaxis heterantha para la producción de safranal. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas. Universidad Nacional Autónoma de México. México D.F. pp. 1-78.

Cada autor es responsable de la precisión de las citas que emplea.

Una vez que ha sido revisado y aceptado su trabajo, los autores deberán enviar una carta de cesión de los Derechos de Autor, de manera que la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería pueda hacer uso del artículo aceptado, o parte de él, con fines de divulgación y difusión de la actividad científica y tecnológica. En ningún caso, dichos derechos afectan la propiedad intelectual que es propia de los autores, para usar la totalidad o parte de ese artículo con fines no lucrativos.

Los trabajos se someten en línea en la página electrónica de la Sociedad Mexicana de Biotecnología, en la dirección https://smbb.mx/publicaiones/publicacion-de-articulo/. Al momento de recibirlo, se enviará un acuse de recibo al autor corresponsal. La dirección para mantener comunicación con el editor es: revista_biotecnologia@smbb.mx

Una vez aceptados, los trabajos son editados y enviados a los autores para su corrección. En esta condición no se permitirán cambios sustanciales en el contenido de los mismos sin la aprobación del editor en jefe. Una vez aprobada la prueba, el trabajo se publicará en línea y podrá ser consultado en la página de la Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería AC http://www.smbb.com.mx/.

Aislamiento y caracterización de una cepa de *Streptomyces thermocarboxydus* con actividad antibiótica

Mariana Ávalos-García, Beatriz Ruiz-Villafán*, Romina Rodríguez-Sanoja y Sergio Sánchez

Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. Ciudad de México, CDMX, AP 70228, CP 04510.

**beatrizruiz@biomedicas.unam.mx*

Resumen

El género *Streptomyces* es un grupo de microorganismos de gran importancia industrial pues son los principales productores de los antibióticos que se comercializan actualmente. A pesar de que se han descrito muchas biomoléculas producidas por las actinobacterias, el porcentaje de nuevos antibióticos descubiertos es muy bajo. Por otra parte, la resistencia de microorganismos patógenos a los antibióticos de uso corriente se incrementa cada día, por lo que cobra vital importancia la búsqueda de nuevos antibióticos para combatirlos. En el presente trabajo se aisló una actinobacteria de una muestra de suelo del Valle de Chalco, Estado de México, México. El microorganismo aislado fue identificado preliminarmente como *Streptomyces thermocarboxydus* K155 y produjo actividad antibiótica contra una serie de cepas de prueba (>20 mm de diámetro de halo de inhibición) cuando fue crecido en medio YMG. Se realizó una extracción del medio de fermentación con metanol y se fraccionó por medio de cromatografía en columna de sílice 100. Las fracciones activas fueron seleccionadas por bioensayo y se continuó su purificación por HPLC. Aunque la identificación estructural final de la molécula bioactiva no fue posible, algunas de las propiedades fisicoquímicas del metabolito como son su solubilidad, polaridad, espectro de absorción UV y termoestabilidad nos proporcionaron pistas sobre el posible carácter químico de la molécula responsable de la actividad antibiótica.

Palabras clave: *Streptomyces*, antibióticos, actinobacterias, árbol filogenético, ADN ribosomal, caracterización polifásica

Abstract

The genus *Streptomyces* comprise a group of microorganisms of great industrial importance because they are the main source of the antibiotics currently commercialized. Although many biomolecules produced by actinobacteria have been described, the percentage of new antibiotics discovered is very low. On the other hand, the resistance of pathogenic microorganisms to the antibiotics of current use increases every day, making the search for new antibiotics of vital importance to fight against resistant pathogens. In the present work, an actinobacteria was isolated from a soil sample from the Chalco Valley, Estado de México, México. The isolated microorganism was preliminarily identified as *Streptomyces thermocarboxydus* K155 and it was found that produce antibiotic activity against a series of test strains (> 20 mm diameter inhibition halo) when grown in YMG medium. An extraction of the fermentation medium with methanol was carried out and fractionated by means of chromatography on a silica column 100. The active fractions were determined by bioassay and their purification was continued by HPLC. Although the final structural identification of the bioactive molecule was not possible, some of the metabolic physicochemical properties such as its solubility, polarity, UV absorption spectrum and thermostability gave us clues about the possible chemical character of the molecule responsible for the antibiotic activity.

Key words: *Streptomyces*, antibiotics, actinobacteria, phylogenetic tree, ribosomic DNA, polyphasic characterization

Introducción

A pesar de que existe un gran número de antibióticos de uso en medicina humana y veterinaria, en la actualidad el número de cepas resistentes a estos antibióticos ha aumentado dramáticamente (Lukacisinová & Bollenbach, 2017). Por ello, resulta relevante el estudio de alternativas microbianas para la producción de antimicrobianos que pudieran resultar novedosos y con potencial para su uso en la industria farmacéutica.

Se sabe que los estreptomicetos producen una gran cantidad de antibióticos y otros metabolitos secundarios activos, como antitumorales, herbicidas y antihelmínticos. De los antibióticos conocidos provenientes de microorganismos, la mayor parte son producidos por este género. Incluso, si se toman en cuenta otro tipo de actividades biológicas, además de la antimicrobiana, las actinobacterias producen la mayoría (60%) de estos compuestos, y dentro de esta familia,

Streptomyces produce el 80% de estas sustancias (Kieser et al., 2000).

Materiales y Métodos

Identificación preliminar de la cepa de Streptomyces sp*. K155 por su secuencia de ADNr 16S*

El aislamiento de la bacteria se hizo a partir de una muestra de suelo de la región de Valle de Chalco del Estado de México, México. La cepa aislada se conservó en forma de esporas en una suspensión de glicerol al 20%v/v a -20°C. A partir de esta suspensión se realizaron los estudios subsecuentes. Para la caracterización de la bacteria se empleó un enfoque polifásico, con ello, se estudiaron sus características morfológicas, fisiológicas, bioquímicas y genéticas (secuencia de ADN ribosomal 16S).

La secuencia de ADN ribosomal se obtuvo mediante PCR usando como molde el ADN genómico de la cepa. Para la amplificación se utilizaron los primers fD1 (ccgaattcgtcgacaacAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) y RD1 (cccgggatccaagcttAAGGAGGTGATCCAGCC) reportados en Weisburg et al., (1991). Las condiciones de amplificación fueron: desnaturalización inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 25 ciclos de 94°C (30 s), 56.5°C (1 min), 72°C (2 min) y una extensión final de 72°C por 7 minutos. La secuencia obtenida se comparó contra secuencias de la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y del Ribosomal Database Project (RDP). La secuencia se comparó y alineó empleando el programa MUSCLE (**Mu**ltiple **S**equence **C**omparison by **L**og- **E**xpectation) con aproximadamente 500 secuencias de ADN ribosomal 16S reportadas en el RDP correspondientes a las especies aisladas y tipificadas, en la taxonomía de este género. Con la finalidad de facilitar la visualización del árbol filogenético, se construyó utilizando solamente 65 de estas secuencias más la secuencia de *Streptomyces* sp. K155, en el programa MEGA 7 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, Kumar et al., 2016). El alineamiento de las 66 secuencias se realizó con MUSCLE y se seleccionó el modelo evolutivo que ajustara mejor a los datos con el programa JModelTest (Darriba et al., 2012, Guindon y Gascuel, 2003). De este modo, la inferencia de la historia evolutiva se hizo con el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de GTR+I+G (General Time Reversible) partiendo de un árbol inicial construido con el método de Neighbor-Joining (Lanave et al.,1984, Tavaré 1984, Rodríguez et al., 1990).

La construcción del árbol filogenético de 49 cepas de *S. thermocarboxydus, S. lusitanus* y *S. spinoverrucosus,* más *Streptomyces* sp. K155 (número de acceso en Genbank MK537326) se realizó siguiendo la misma estrategia arriba mencionada, excepto que el modelo que se ajustó mejor a los datos fue HKY+G+I (Hasegawa-Kishino-Yano, Hasegawa et al.,1985). Para la construcción

final de ambos árboles se ejecutaron 1000 muestreos para cada uno (boostrap).

Adicionalmente se realizó un ensayo de hibridación ADN-ADN (Tourova & Antonov, 1987) empleando el ADN genómico completo de *Streptomyces* sp. K155 y el ADN genómico de la cepa más cercana encontrada después de realizar el análisis filogenético.

Caracterización morfológica de Streptomyces sp. *K155*

Las características morfológicas se determinaron con base en lo reportado por Shirling & Gottlieb (1966) para discriminar la formación de micelio aéreo, el color y la producción de pigmentos solubles difusibles al medio de cultivo. Para lo anterior, se utilizaron los medios señalados por el International *Streptomyces* Project (ISP) como son ISP-1 a 5 (BD-Difco) y los medios de tripticaseína-agar, agar nutritivo (BD-Difco) y agar soya-manitol (Kieser et al., 2000). También se observó la producción de esporas, su forma y tamaño empleando un microscopio electrónico de barrido (JEOL JSM-6360LV Scanning Electron Microscope).

Caracterización fisiológica

Se determinó el efecto de las condiciones de cultivo sobre el crecimiento de la cepa de *Streptomyces* sp. K155 en matraces bafleados de 250 ml con 50 ml de medio TSB (Tryptic Soy Broth, BD-Difco) y se determinó la cantidad de biomasa después de 48 h de incubación, por peso seco. Para el pH óptimo se ajustó inicialmente a pH 4, 5, 6 y 7 con HCl y a pH 8, 9 y 10 con NaOH, se incubó a 29°C con agitación a 180 rpm. Para la temperatura se incubó a las temperaturas: 29, 37, 45, 50 y 52°C, con agitación a 180 rpm.

Se determinó la tolerancia a NaCl de la cepa K155 mediante su adición a concentraciones 4, 7, 10 y 13%w/v, incubándose a 29°C y 180 rpm de agitación.

La capacidad de la cepa K155 de *Streptomyces* para emplear diversos carbohidratos como única fuente de carbono fue evaluada con el kit API 50CH de Biomèrieux. La inoculación de las galerías se llevó a cabo siguiendo la ficha técnica del fabricante. Por cada ampolleta de medio de cultivo (proporcionada en el kit) se emplearon 100 µL de la suspensión de esporas previamente lavadas para eliminar el glicerol y suspendidas en solución salina isotónica.

También se determinó la presencia de ácido L-diaminopimélico en la pared celular según Staneck & Roberts, (1974).

Ensayo de actividad antibiótica

La actividad antibiótica se escaneó empleando un ensayo cualitativo mediante estría cruzada, enfrentando directamente a la cepa de *Streptomyces* contra las cepas de prueba seleccionadas: *Bacillus subtilis, Micrococcus luteus, Escherichia coli y Saccharomyces cerevisiae.*

Producción y ensayos de purificación del metabolito bioactivo

La producción del metabolito secundario con actividad antibiótica se realizó en medio YMG modificando las concentraciones de sus componentes para obtener una mayor cantidad de antibiótico reflejada en un mejor efecto inhibitorio.

El aislamiento y purificación del compuesto responsable de la actividad antibiótica se realizó empleando un enfoque biodirigido, que consistió en llevar a cabo la purificación siguiendo la actividad antibiótica contra *M. luteus*.

El cultivo a partir del cual se realizó el aislamiento del compuesto activo se incubó por 6 días a 29°C, 180 rpm. La extracción se realizó con metanol previa eliminación del agua mediante liofilización. El metanol fue evaporado y el residuo se suspendió en una mezcla de acetonitrilo:agua (7:3), este extracto fue fraccionado mediante cromatografía en columna (1 m x 2 cm) empacada con sílica gel 100 (Merck). La elución se llevó a cabo empleando un gradiente de acetonitrilo:agua. Se determinaron las fracciones activas por medio de ensayos de antibiosis. Todas las fracciones que presentaron actividad antibiótica se combinaron y a la mezcla resultante se le determinó la concentración inhibitoria 50 según Wiegand et al., (2008) contra *M. luteus* y *S. cerevisiae*. La purificación final se hizo mediante HPLC con el equipo Varian ProStar con detector UV-Vis, empleando una columna de Macherey-Nagel Nucleodur C18 Pyramid de 5 µm y acetato de trietilamonio (TEAA) como fase móvil.

Resultados

Identificación de la cepa de Streptomyces sp. *K155*

La secuencia de ADN ribosomal 16S de *Streptomyces* sp. K155 mostró una mayor similitud con las cepas *Streptomyces thermocarboxydus* y *Streptomyces aureus*, en una búsqueda preliminar con el programa BLAST. Al construir un árbol filogenético con esta secuencia se encontró una mayor relación con la especie *S. thermocarboxydus* DSM 44293 ya que se agrupan en el mismo clado, a diferencia de *S. aureus* que se agrupa con *Streptomyces scabies* y *Streptomyces diastatochromogenes* (Fig. 1). La cercanía a la especie *thermocarboxydus* se hizo más patente en la construcción de otro árbol filogenético en donde se tomaron en cuenta las especies más cercanas a *Streptomyces* sp. K155 (Fig. 2). Sin embargo, con respecto a las características fisiológicas reportadas para esta cepa por Kim et al., (1998) se habían observado varias diferencias, por lo que se consideró necesaria la caracterización polifásica que permitiera discernir si *Streptomyces* sp. K155 era una nueva variedad, para lo cual se empleó la cepa *S. thermocarboxydus* DSM 44293 con fines de comparación.

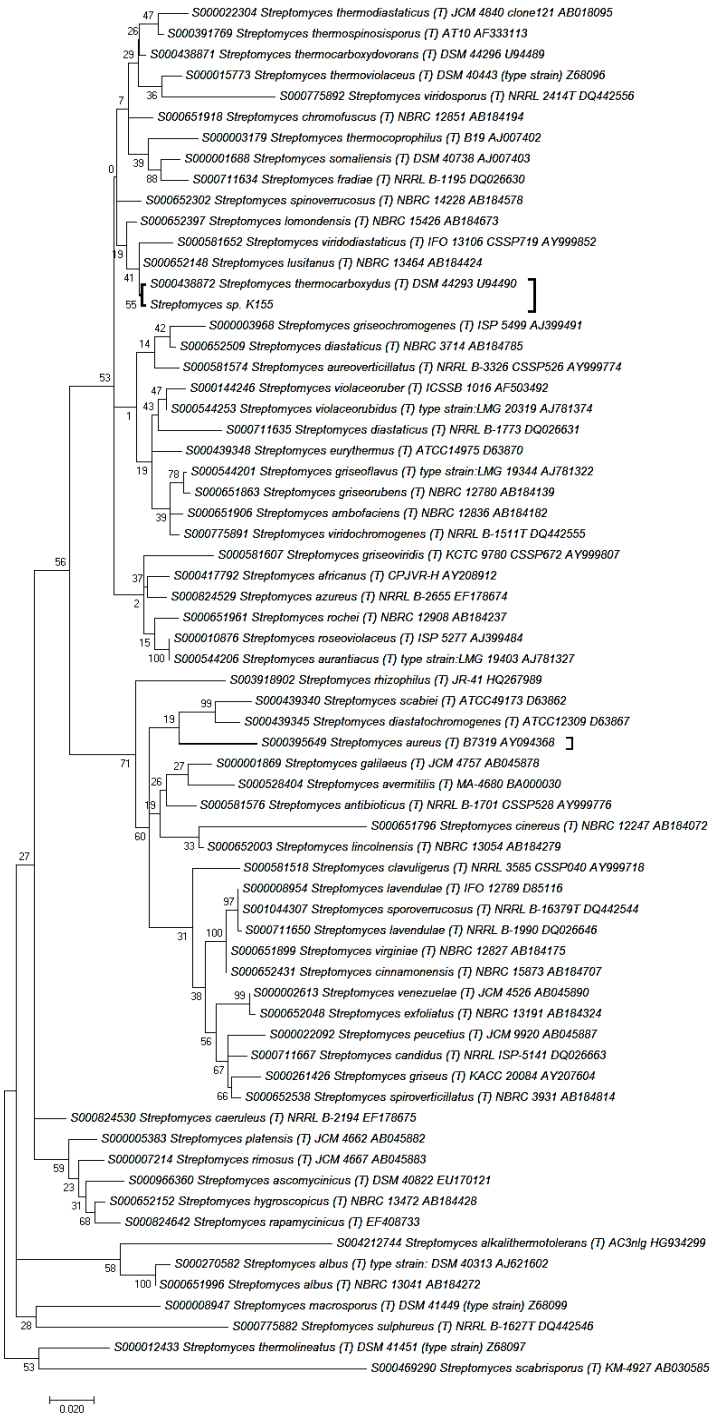


Figura 1. Árbol filogenético construido con 65 secuencias de ADNr 16S del género *Streptomyces* más la secuencia de *Streptomyces* sp. K155. En brackets negritos se muestra el sitio en donde se agrupa la cepa *Streptomyces* sp. K155. La historia evolutiva se construyó con el método GTR+G+I, con 1000 muestras (Bootstrap) usando el programa Mega 7. Los números de acceso de Genbank de las secuencias de ADNr 16 S están al final del nombre de cada cepa, por ejemplo, la de *Streptomyces viridodiastaticus* IFO13106 es AY999852.

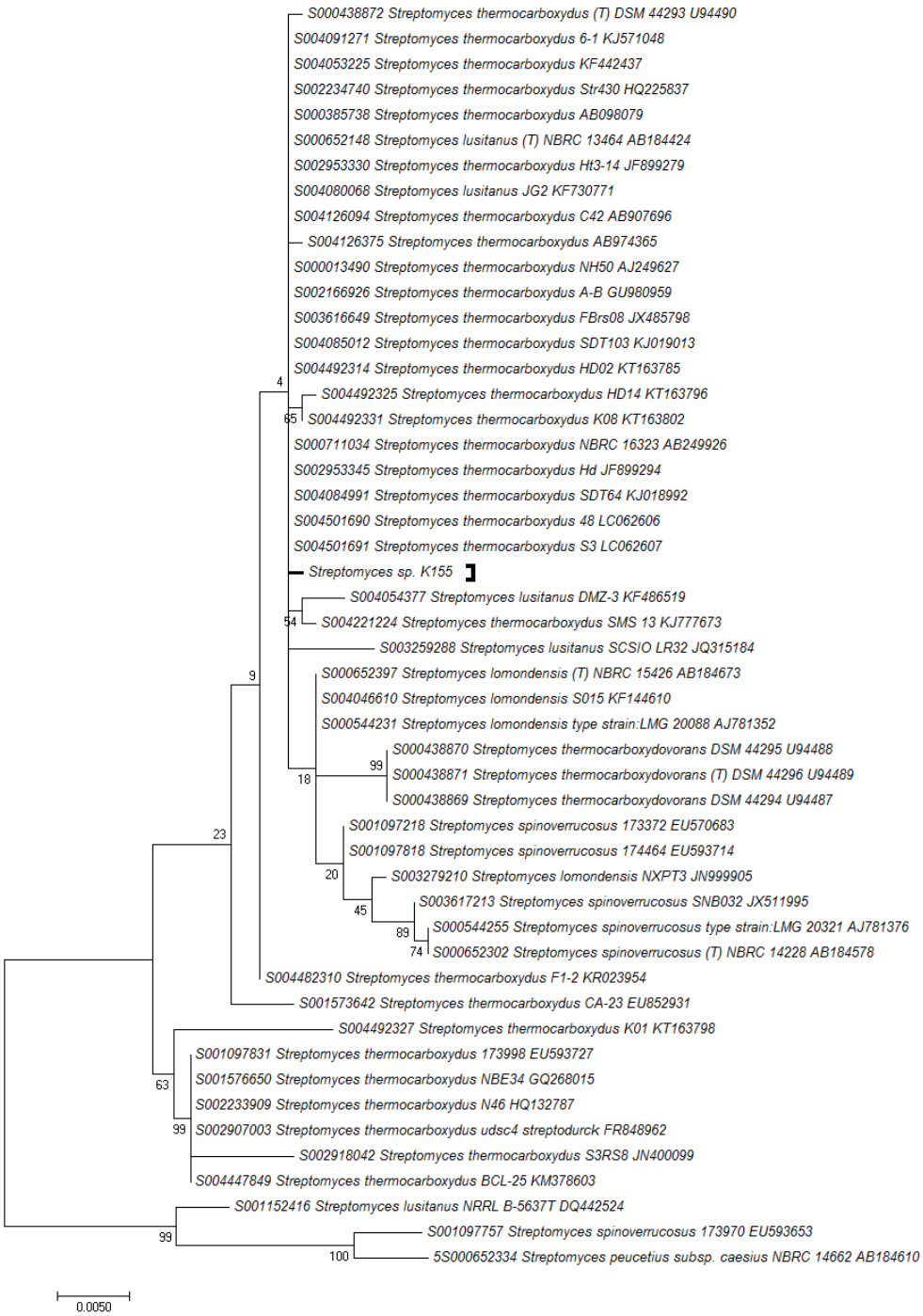


Figura 2. Árbol filogenético elaborado con las secuencias de ADNr 16S de la cepa K155 y las especies más cercanas, *S. thermocarboxydus, S. lusitanus* y *S. lomondensis*. En brackets negritos se muestra la cepa K155. La historia evolutiva se construyó con el método HKY+G+I, con 1000 muestras (Bootstrap) usando el programa Mega 7. Los números de acceso de Genbank de las secuencias de ADNr 16 S están al final del nombre de cada cepa, por ejemplo, la de *Streptomyces lusitanus* DMZ-3 es KF486519.

Características y diferencias entre la cepa de Streptomyces sp. *K155 y S. thermocarboxydus DSM 44293*

En la tabla 1 se indican las características del color del micelio aéreo en diferentes medios de cultivo definidos por el International *Streptomyces* Project (ISP) para la clasificación del género de estas bacterias. Podemos observar que en todos estos medios de cultivo sólido el color del micelio de la cepa *Streptomyces* sp. K155 y el de *S. thermocarboxydus* DSM 44293 son diferentes como por ejemplo el medio ISP-3 donde *Streptomyces* sp. K155 produce el micelio color gris y *S. thermocarboxydus* DSM 44293 de color blanco.

Una de las características que se utilizan para la clasificación de los miembros del género *Streptomyces*, es la morfología de las esporas, por ello se observaron el micelio y las esporas al microscopio electrónico. Lo más relevante que se observó fue la diferencia en la superficie de las esporas, así como el tamaño de éstas, ya que *S. thermocarboxydus* DSM 44293 produce esporas de textura más rugosa y de mayor tamaño a diferencia de las esporas de *Streptomyces* sp. K155 (Fig.3). Estas diferencias se podrían deber a la producción de polisacáridos de pared celular diferentes entre ambas cepas de *Streptomyces*.

Tabla 1. Color del micelio aéreo producido por *Streptomyces* sp. K155 y *S. thermocarboxydus*.

Medio Agar	**K155**	***S. thermocarboxydus***
Triptona-Lev (ISP-1)	Blanco	Gris
YMG (ISP-2)	Gris	Blanco/Gris
Avena (ISP-3)	Gris	Blanco
Almidón-Sales Inorgánicas (ISP-4)	Gris	Blanco
Glicerol-Asparagina (ISP-5)	Blanco	Café
Soya tripticaseína-agar	Blanco/Gris	Blanco
Agar nutritivo	Escaso grisáceo	Gris
Soya-Manitol	Gris	Blanco

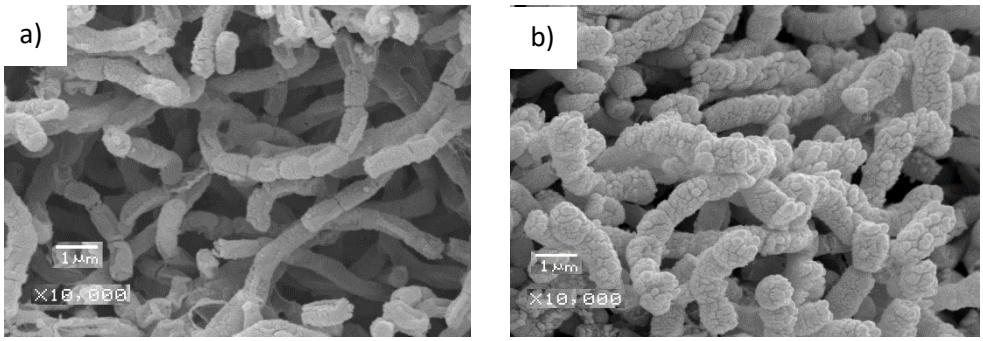


Figura 3. Fotografías de microscopía electrónica de barrido del micelio y esporas de a) K155 y b) *S. thermocarboxydus* vistas al microscopio electrónico de barrido.

En cuanto al crecimiento en medio de cultivo líquido a diferentes valores de pH, no se observaron diferencias siendo 7 el valor óptimo de ambas. Sin embargo, en cuanto a la temperatura y a la tolerancia al NaCl sí se observaron, puesto que *S. thermocarboxydus* DSM 44293 es termófilo, capaz de crecer a temperaturas de hasta 55°C mientras que *Streptomyces* sp. K155 es mesófilo y crece a temperaturas menores a 50°C.

Las pruebas bioquímicas de utilización de carbohidratos mostraron que a diferencia de *S. thermocarboxydus*, *Streptomyces* sp. K155 no puede metabolizar galactosa, fructosa, inositol, N-acetilglucosamina, ni genitiobiosa, bajo las condiciones de crecimiento de las tiras API.

La hibridación ADN-ADN mostró una similitud mayor al 70%, por lo que según el criterio empleado para la caracterización e identificación de una nueva especie (Anderson & Wellington, 2001), la cepa de *Streptomyces* sp. K155 pertenece a la especie *S. thermocarboxydus*. Sin embargo, dadas las diferencias encontradas, puede tratarse de una subespecie. Para confirmar esto, son necesarias una serie de análisis que brinden mayor detalle e información que permitan realizar esta clasificación.

Durante la caracterización de la cepa de *Streptomyces* sp. K155 se le encontró actividad antibiótica contra bacterias Gram-positivas como *Bacillus subtilis* y *Micrococcus luteus*, así como la levadura *Saccharomyces cerevisiae* y tomando en cuenta que *S. thermocarboxydus* no tiene reportes de producción de antibióticos se decidió caracterizar el antibiótico producido.

Caracterización del principio bioactivo

Después de comprobar que la actividad antimicrobiana se producía en el medio de cultivo, se determinó su termoestabilidad. Se encontró que el extracto crudo con actividad antibiótica se mantuvo estable desde 37°C hasta 121°C (un ciclo en autoclave) por 20 min. Posteriormente, se procedió a su aislamiento y purificación. Se encontró que el metabolito bioactivo es

sumamente polar, por lo que únicamente pudo extraerse del extracto crudo eliminando primero el agua por medio de liofilización y posteriormente añadiendo metanol para su extracción. Una vez obtenido el extracto en metanol, el disolvente se evaporó y se suspendió en una mezcla de acetonitrilo:agua (1:1) para fraccionarlo por medio de cromatografía en columna. Se obtuvieron fracciones activas cuando se empleó una proporción de 50:50.

Las fracciones anteriores se colectaron y purificaron por medio de HPLC con detector UV-Vis, la elución de la columna se realizó de manera isocrática con TEAA. En el cromatograma obtenido (figura 4) se observan siete picos en un intervalo de tiempo de retención entre 2.5 y 6.5 minutos.

Estos picos corresponden a compuestos con mayor polaridad (como moléculas de tipo alcohol) que el pico mayoritario, que apareció en un intervalo de retención de 9.5-11.5 minutos.

Los primeros siete picos no mostraron ninguna actividad antibiótica, como el pico mayoritario, que conservó su actividad contra *M. luteus*. Este cromatograma nos demostró lo conveniente del fraccionamiento previo por medio de cromatografía en columna, pues se eliminó la mayoría de los componentes no deseados del extracto crudo y además se logró concentrar el producto de interés. Por otra parte, los resultados nos reafirmaron la naturaleza polar de dicho antibiótico, pues únicamente se empleó una fase móvil acuosa para la elución.

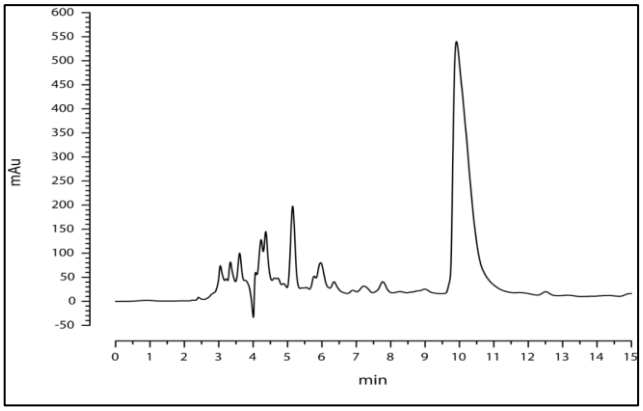


Figura 4. Cromatograma de la purificación de los compuestos biológicamente activos eluyendo isocráticamente con TEAA 100%.

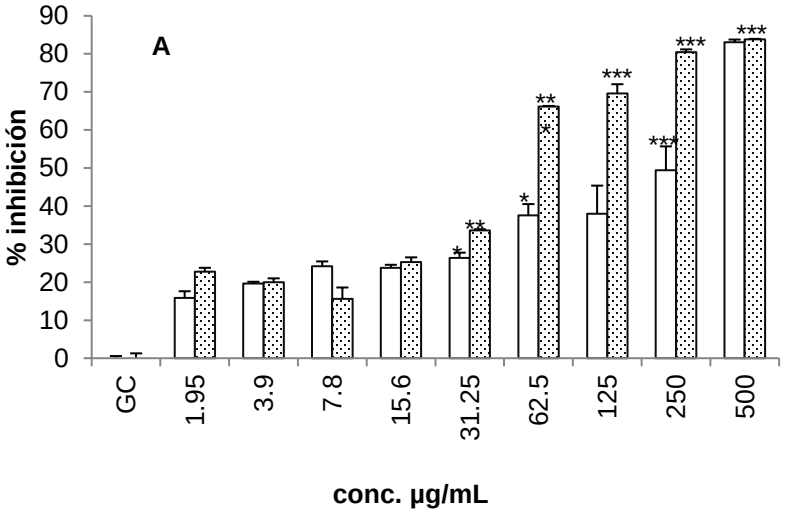
Se realizaron estudios estructurales preliminares (RMN, MS, IR), sin embargo, se encontraron en mayor cantidad señales correspondientes a la fase móvil de la elución (TEAA), por lo que únicamente se sabe que el peso molecular del compuesto es de aproximadamente 580 m/z, además de que posee un pico máximo de absorción a menos de 200 nm lo que nos indica que no posee un sistema de dobles enlaces conjugados. Con

las características encontradas, se podría pensar que el metabolito a activo pertenece a moléculas de tipo macrólido.

Caracterización del efecto inhibitorio

Con la fracción obtenida de la cromatografía en columna se determinó la concentración inhibitoria 50 (CI_{50}).

La CI_{50} del compuesto puro contra *M. luteus* fue de 31.25 µg/mL (figura 5A), y para *S. cerevisiae* de 250 µg/mL (figura 5B). Los controles empleados fueron eritromicina para *M. luteus* y cicloheximida para *S. cerevisiae*, ambos antimicrobianos fueron efectivos a la menor concentración empleada, sin embargo, fueron específicos para cada microorganismo, es decir la eritromicina no tuvo actividad contra *S. cerevisiae* y viceversa, la cicloheximida no inhibe a *M. luteus.* Que la fracción probada tuviera actividad contra ambas cepas nos indica que este antibiótico posee un amplio espectro de acción o que en dicho pico hay dos compuestos activos.



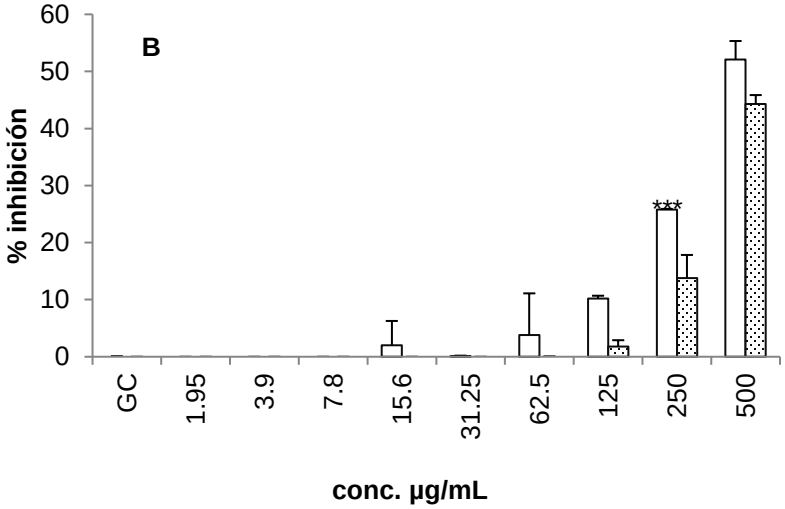


Figura 5. Gráficas para la determinación de la concentración mínima inhibitoria de la fracción 20 (barras punteadas) obtenida de la cromatografía en columna y del compuesto obtenido después de la purificación con HPLC (barras vacías), sobre las cepas *M. luteus* (A) y *S. cerevisiae* (B). GC indica el crecimiento de la cepa sin antibióticos.

Discusión

La clasificación taxonómica polifásica tradicionalmente incluye datos de morfología colonial, y microscópica, así como fisiología y composición de la pared celular, además de incluir datos de secuencia de ADNr 16S e hibridización ADN-ADN (Mahato et al., 2017).

En lo concerniente a la cepa *Streptomyces* sp. K155, los resultados de la secuencia del ADNr 16S mostraron que tenía una mayor semejanza con la cepa de *Streptomyces thermocarboxydus*, lo mismo se observó en la hibridización ADN-ADN en donde mostraron tener más del 70% de semejanza. Sin embargo, la comparación entre ellas de otras características fisiológicas no muestra tantas similitudes. La temperatura óptima de crecimiento por ejemplo es mayor en *S. thermocarboxydus* (50°C) que en *Streptomyces* sp. K155 (29°C). En contraste la tolerancia a la concentración de NaCl fue mayor para K155 que para *S. thermocarboxydus*. Ambas diferencias son notables y podrían deberse al origen de aislamiento de ambas cepas, la cepa tipo fue aislada de suelo inglés y la nuestra del Estado de México por lo que probablemente la composición, altitud y temperatura del origen podrían haber influido. En lo concerniente a la utilización de las fuentes de carbono probadas, se observaron algunas diferencias notables como la incapacidad de *Streptomyces* sp. K155 de usar fructosa y N-acetilglucosamina, ambas transportadas por el único PTS que posee el género *Streptomyces* y que es funcional justamente para esas dos fuentes de carbono (Parche et al., 2000). Aunque los genes que corresponden al PTS se encuentran en el genoma de *Streptomyces* sp. K155, podría ser que alguno de ellos no fuera funcional y por ello no pudo degradarlas en las tiras API.

Por otro lado, la morfología y superficie de las esporas producidas había sido utilizada anteriormente como ayuda para la clasificación de los *Streptomyces* (Tresner et al., 1961). En este caso, *S. thermocarboxydus* presentó esporas verrugosas a diferencia de la cepa de *Streptomyces* sp. K155, lo que puede deberse a diferencias en la producción de polisacáridos de la pared celular.

El análisis del hidrolizado ácido de la pared celular nos confirmó la presencia de ácido L-diaminopimélico en la pared celular de los *Streptomyces*, sin embargo, son necesarios estudios en HPLC-MS para determinar la presencia de los demás componentes de carbohidrato.

Según Cohan (2002) no hay que concebir a la especie bacteriana como “un conjunto de organismos con propiedades genéticas, ecológicas, evolutivas o filogenéticas especiales”. Por el contrario, se ha visto que cada “especie” contiene muchos

ecotipos (taxa bacterianos ecológicamente homogéneos) cada uno con propiedades dinámicas propias de una especie (Cohan, 2002, Cohan, 2016). Esto coincide con nuestros resultados pues genéticamente son muy semejantes, pero no ocurre lo mismo con algunas de sus características fenotípicas.

Finalmente, con respecto a la actividad antibiótica de *Streptomyces* sp. K155, es notable que la fracción activa mostrara capacidad inhibitoria contra bacterias Gram-positivas como *B. subtilis* y *M. luteus* y con un mayor efecto inhibitorio contra la levadura *S. cerevisiae.* Una actividad de este amplio espectro se podría explicar si el compuesto fuera semejante a un mutágeno como la antraciclina doxorrubicina (Arcamone et al., 2000), la cual actúa como un agente intercalante del ADN, que inhibe la duplicación del cromosoma. Pero para saberlo con certeza aún habría que determinar la estructura del compuesto activo.

Conclusión

Se determinó la pertenencia de la cepa de *Streptomyces* sp. K155 a la especie *S. thermocarboxydus*, sin embargo, no existen reportes de antibióticos producidos por esta especie. Aunado a esto, el hecho de encontrar actividad tanto contra bacterias Gram-positivas como contra *S. cerevisiae*, hace la continuación del estudio de dicha cepa interesante, pues abre la posibilidad de obtener compuestos novedosos y/o con mayor actividad.

Referencias

Anderson AS & Wellington EMH (2001) The taxonomy of *Streptomyces* and related genera, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 797-814.

Arcamone F, Cassinelli G, Fantini G, Grein A, Orezzi P, Pol C & Spalla C (2000) Adriamicin, 14-hydroxydaunomycin, a new antitumor antibiotic from *S. peucetius* var. *caesius*. *Biotech. Bioeng.* 67: 704-13.

Cohan FM (2002) What are bacterial species? *Annu. Rev. Microbiol.* 56: 457-487.

Cohan FM (2016) Bacterial speciation: genetic sweeps in bacterial species. *Curr. Biol.* 26: R102-R124.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R & Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods.* 9: 772.

Guindon S & Gascuel O (2003) A simple, fast and accurate method to estimate large phylogenies by maximum-likelihood. *Syst. Biol.* 52: 696-704.

Hasegawa M, Kishino H & Yano T (1985) Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial ADN. *J. Mol. Evol.* 22:160-174.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF & Hopwood DA (2000). Practical *Streptomyces* genetics I. The John Innes Foundation. Norwich, UK.

Kim SB, Falconer C, Williams E & Goodfellow M (1998) *Streptomyces thermocarboxydovorans* sp. nov. and

Streptomyces thermocarboxydus sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 48: 59-68.

Kumar S, Stecher G & Tamura K (2016) MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* 33: 1870-1874.

Lanave C, Praparata G, Saccone C & Serio G (1984) A new method for calculating evolutionary substitution rates. *J. Mol. Evol.* 20: 86-93.

Lukacisinová M & Bollenbach T (2017) Toward a quantitative understanding of antibiotic resistance evolution. *Curr. Opin. Biotech.* 46: 90-97.

Mahato NK, Gupta V, Singh P, Kumari R, Verma H, Tripathi Ch, Rani P, Sharma A, Singhvi N, Sood U, Hira P, Kohli P, Nayyar N, Puri A, Bajaj A, Kumar R, Negi V, Talwar Ch, Khurana H, Nagar S, Sharma M, Mishra H, Singh AK, Dhingra G, Negi RK, Shakarad M, Singh Y & Lal R (2017) Microbial taxonomy in the era of OMICS: application of DNA sequences, computational tools and techniques. *Antonie van Leewuenhoek.* DOI 10.1007/s10482-017-0928-1.

Parche S, Nothaft H, Kamionka A & Titgemeyer F (2000) Sugar uptake utilization in *Streptomyces coelicolor*: a PTS view to the genome. *Antonie van Leewuenhoek.* 78: 243-51.

Rodríguez F, Oliver JL, Marín A & Medina JR (1990) The general stochastic model of nucleotide substitution. *J. Theor. Biol.*142: 485-501

Shirling EB & Gottlieb D (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16: 313-340.

Staneck JL & Roberts GD (1974). Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 28: 226–231.

Tavaré S (1984) Line-of-descendent and genealogical processes, and their applications in population genetics models. *Theor. Popul. Biol.* 26: 119-164.

Tresner HD, Davies MC & Backus EJ (1961) Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. *J. Bacteriol.* 81: 70-80.

Tourova TP & Antonov AS (1988) Identification of microorganisms by rapid DNA-DNA hybridization. In Methods in microbiology. Current methods for classification and identification of microorganisms. Colwell RR & Grigorova R (ed). Academic Press Inc. UK. Vol.19, pp. 333-355.

Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA & Lane DJ (1991) 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J. Bacteriol.* 173: 697-703.

Wiegand I, Hilpert K, & Hancock R (2008) Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* 3: 163-75.

Importancia del pH y protocolo de desinfección en la germinación de esporas de *Cyathea bicrenata*

Samanta A. Reyes[1]*, Héctor González[1], Ana M. Castillo[2], Víctor H. Volke[1], Carmen Jacinto[3], César Carvajal[4], Gabino García[1].

[1]Colegio de Posgraduados. Campus Montecillo. Carretera México-Texcoco Km, 36.5, Montecillo, Texcoco, Estado de México. C.P. 56230. [2]Universidad Autónoma Chapingo. Departamento de Fitotecnia. Carretera México-Texcoco Km, 38.5, Chapingo, Estado de México. C.P 56230. [3]Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), Campo Experimental Valle de México (CEVAMEX) Km, 13.5 carretera Los Reyes-Texcoco, Estado de México. C.P. 56250. [4]Centro de Investigaciones Tropicales. Universidad Veracruzana. Ex Hacienda Lucas Martín. Privada Araucarias s/n. Col. Periodistas, Xalapa, Veracruz. C.P. 91019.

**reyes.samanta@colpos.mx*

Resumen

Los helechos forman parte de las especies que habitan los bosques húmedos de montaña (BHM). En este tipo de vegetación, existen helechos arborescentes que desempeñan funciones ecológicas relevantes. México cuenta con 14 especies, la mayor riqueza de especies registrada de helechos arborescentes. La disminución de las poblaciones de *Cyathea bicrenata* Liebmann han contribuido a su clasificación en la NOM-059-ECOL-2010, como especie en riesgo de extinción. Entre los factores que han mermado las poblaciones de esta especie, están la recolecta ilegal. El objetivo de este trabajo, fue generar el protocolo para la germinación *in vitro* de esporas de *C. bicrenata*, con el fin de obtener esporofitos para su conservación como especie con protección especial (Pr). Se concluyó que el mejor desinfectante de esporas de *C. bicrenata* fue el NaOCl al 35 % con tiempo de exposición de 5 y 10 min. En estos tiempos de exposición se presentó una exitosa germinación.

Palabras clave: esporas, gametofito, germinación, método Dyer

Abstract

Ferns are part of the species inhabiting temperate rain forests (TRF). Mexico has 14 species; the greatest registered affluence of dendriform fern species. The decrease of *Cyathea bicrenata* Liebmann populations has contributed to its classification in the NOM-059-SEMARNAT-2010 as endangered species. Illegal harvesting is among the factors that have diminished this species' population. This work's goal was to generate a protocol for *in vitro* germination of spores of *C. bicrenata*, aiming for the obtainment of sporophytes for its conservation as a species with special protection. It was concluded that the best disinfectant of *C. bicrenata* spores was NaOCI at 35 % with an exposition time of 5 and 10 min. In these times of exposition, a successful germination was presented.

Key words: spores, gametophyte, germination, Dyer method

Introducción

En México y el mundo, la mayor riqueza de especies de helechos se encuentra en la zona ecológica templada húmeda, entre los 1000 y 2000 m s.n.m. área que incluye al bosque mesófilo (BMM) (Kluge et al. 2006; Carvajal-Hernández & Krömer 2015). Los helechos arborescentes constituyen un componente conspicuo del bosque húmedo de montaña (también conocido como bosque mesófilo de montaña) de las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Pérez et al. 2014). En este tipo de vegetación, desempeñan funciones ecológicas relevantes, por ejemplo, sus rizomas aéreos son excelentes forofitos de otras especies de helechos, algunos de los cuales son indicadores de ecosistemas en buen estado de conservación (p. ej. las familias Grammitidaceae e Hymenophyllaceae) (Álvarez et al. 2012; Krömer et al. 2013; Armenta-Montero et al. 2015). Se tienen registros de cuatro familias de helechos arborescentes en México (Cibotaceae, Cyatheaceae, Dicksoniaceae y Lophosoriaceae), representadas por 16 especies (Mickel & Smith, 2004).

Cyathea bicrenata es una especie de helecho arborescente que se distribuye en algunos países de América: Costa Rica, Ecuador, Guatemala, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Venezuela (Moran 2003, Grandtner & Chevrette 2013). En México se encuentra presente en los estados de Guerrero, Hidalgo, Chiapas, Oaxaca, Puebla, Tabasco y Veracruz (Mickel & Smith, 2004; Mehltreter & García-Franco 2008; García-Mendoza & Meave, 2011; Vázquez et al. 2012; Villaseñor et al. 2013; Carvajal et al. 2014) la cual está sujeta a la categoría de protección especial según la norma NOM-059-ECOL-2010, que se encuentra en el marco de la legislación mexicana encargada

de la protección ambiental. La disminución de las poblaciones de *C. bicrenata* se asocia a varias causas: i) La reducción de su hábitat ii) la extracción ilegal de la planta, para fines de ornato y; iii) la explotación del "maquique" que es la capa de raíces adventicias desarrolladas alrededor del tallo, que es utilizado para realizar artesanías como macetas o sustratos de orquídeas y otros helechos herbáceos (Palacios & Flores, 1992). *Cyathea bicrenata* en su ambiente natural produce una gran cantidad de esporas (69 esporas por soro) (Riba, 1981). A pesar del éxito reproductivo reflejado en la cantidad de esporas, en recorridos *in situ* en zonas de Hidalgo, se ha observado que las poblaciones se encuentran representadas por pocos individuos aislados. En su ambiente natural los gametofitos desarrollados son muy sensibles a los cambios de humedad ambiental, así como a la competitividad por nutrimentos y espacio, lo que disminuye el número de individuos que llegan a la etapa adulta (Palacios & Flores 1992; Riaño et al. 2015).

Vargas & Droste (2014) han abordado metodologías para conservar o restaurar la riqueza genética, que junto con las especies y los ecosistemas conforman la biodiversidad. La micropropagación es una opción que ha tomado auge, teniendo resultados muy notables en la propagación de especies cuyo estatus es de posible riesgo de extinción (Rodríguez-Trejo, 2005).

La germinación de las esporas en cultivo *in vitro* es una opción que ha permitido obtener numerosos gametofitos. Este método proporciona condiciones controladas para la propagación de esporofitos y el estudio de la biología de las especies. Se han realizado numerosos métodos de desinfección de esporas de helechos, sin embargo, existe una pérdida significativa de esporas durante el proceso de desinfección, ya sea por contaminación del medio donde se cultivan, o porque la mayoría de los métodos son de arduo procedimiento. Muchos de estos métodos son todavía ineficientes en términos de tiempo y pérdida de esporas. El método de propagación debe ser específico para cada género o especie, tomando en cuenta los factores externos que pueden provocar contaminación, además, se debe considerar la viabilidad de la especie, el tiempo de almacenamiento, la concentración y el tipo de desinfectante. Es por ello que este trabajo tiene como objetivo establecer un método adecuado y simple para el desarrollo de esporas de helechos arborescentes que son extraídos del medio silvestre y que se pretenden cultivar de forma *in vitro*.

Materiales y métodos

Material biológico

La recolecta de frondas de *C. bicrenata* se realizó a la orilla de la carretera México-Tampico en el municipio de Tlanchinol Hgo. Se registró la ubicación geográfica del punto de muestreo con un GPS (20° 55' 06'' N y 98° 41' 55'' E) con una altura registrada de 1476 m s.n.m. Se colectaron frondas fértiles, las cuales se colocaron en hojas de papel periódico. Se guardaron a temperatura ambiente a 24 °C ± 4 °C durante tres semanas, hasta que se observó dehiscencia

de los esporangios que liberaron las esporas. Posteriormente, se tamizaron en una malla de 62 µm.

Métodos de desinfección

Método de Dyer (1979)

El método para la desinfección de esporas de helechos de Dyer (1979), consistió en pesar 50 mg de esporas que fueron depositadas en tubos previamente esterilizados a los que se le añadieron 25 ml de solución de benomil (1.5 g L^{-1}), se colocó en una centrifuga Damon/ IEC modelo 41125 a 1500 x g durante 5 min. Posteriormente, se utilizó una solución de NaOCl (0.02, 0.04, 0.06, 1, 2, 35 y 50 %) más dos gotas de tween 80 y tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 min. Se hicieron tres lavados con agua destilada esterilizada.

Método del filtro

Consistió en pesar 50 mg de esporas que se colocaron en paquetes hechos con discos de papel filtro Whatman del número 40 que fueron depositados en viales especiales de centrifuga previamente esterilizados, se añadieron 25 ml de solución de benomil (1.5 g L^{-1}), se centrifugaron a 1500 x g durante 5 min. Consecutivamente se utilizó una solución de NaOCl con dos gotas de tween 80 usando las concentraciones de NaOCl (0.02, 0.04, 0.06, 1,2 y 50 %) y tiempos de exposición de 5, 10, 15 y 20 min. Se hicieron tres lavados con agua desionizada esterilizada.

Método por aspersión de etanol

El tercer método empleado fue la aspersión de etanol que consistió en pesar 50 mg de esporas que fueron depositadas en discos de papel filtro esterilizado.

Se asperjó etanol al 96 % durante 30 min. Una vez desinfectadas las esporas con los tres tratamientos de desinfección se cultivaron en cajas de Petri de 9 cm de diámetro con medio de Murashige & Skoog (1962) al 100 % con pH ajustado con HCl o NaOH al 1N: 4.0 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 y 6.5. Las cajas de Petri se sellaron con plástico. El experimento se mantuvo en un cuarto de incubación con una temperatura de 24 º C ± 4 º C, con fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad. El experimento se realizó por cuadruplicado.

Porcentaje de germinación

El porcentaje de germinación se estimó en cada caja de Petri se utilizaron los rangos empleados en la escala de Braun-Blanquet (1979), según la metodología utilizada por Narváez et al. (2013) y Ruíz et al. (2015), que consistió en evaluar de manera indirecta según el grado de cobertura de gametofitos desarrollados en la caja de Petri. Se consideró un intervalo de valores de 1 a 5. Donde 1= cobertura menor al 5 %; 2= cobertura del 5 al 25 %; 3 =cobertura del 25 al 50 %; 4= cobertura del 50 al 75 % y 5= cobertura igual o superior al 75 %. Se estimó el porcentaje obtenido por medio de los rangos empleados (1 a 5) según la escala de Braun Blanquet y se obtuvo la mediana de frecuencias.

Desarrollo del gametofito

Para evaluar el desarrollo de la espora hasta la fase de gametofito, se

cultivaron las esporas en 20 ml del medio de Murashige y Skoog (1962) con pH de 5.7 (ajustado con solución de NaOH al 1N) en cajas de Petri de 9 cm de diámetro (24 repeticiones). El método utilizado para la desinfección de las esporas fue el Dyer (1979), con una concentración de NaOCl al 35 % con un tiempo de exposición de 5 min.

La observación de los gametofitos se realizó durante 43 días, cada semana se observaron en un microscopio invertido (marca Zeiss Primo vert). Para este procedimiento se realizó, una preparación de 20 gotas de medio MS de las cajas de Petri, se tomó una gota y se colocó en un portaobjetos, encima de esté un cubreobjetos. Se hicieron observaciones con el objetivo de 40 X y 20 X después de 30 días. El seguimiento de su desarrollo inició desde la fase de espora hasta la formación del gametofito.

Resultados y discusión

El mejor método para la desinfección de las esporas, sin dañar su viabilidad fue el método de Dyer (1979), con una concentración de NaOCl al 35 % en los tiempos de exposición de 5 y 10 min. Es importante mencionar que, con este mismo método, pero con tiempos de exposición de 15 y 20 min no existió contaminación del medio. Sin embargo, hubo daño en la viabilidad de las esporas, por lo tanto, no existió germinación. Narváez et al. (2013) concluyeron que la exposición de las esporas a tiempos prolongados con agentes desinfectantes, puede alterar la composición química de la pared celular, la membrana y por lo tanto la germinación. De acuerdo a Narváez et al. (2013) el empleo de soluciones desinfectantes puede afectar la capacidad de germinación de las esporas, afectando su viabilidad. Este concepto es confirmado por Simabukuro et al. (1998) quienes afirman que la esterilización química de las esporas puede mermar su capacidad de germinación. Por otro lado, aunque el método de Dyer fue el método más efectivo para la germinación de las esporas, resultó ser un método que propiciaba la perdida de esporas durante los enjuagues con agua estéril. Hua et al. (2009) probaron un método de centrifugación similar al de Dyer (1979), donde se encontraron con la problemática de que las esporas libres en el vial tienden a caer cuando se vierte la solución de desinfectante y al realizar los lavados con el agua estéril. Es importante mencionar que sus resultados contrastan con esta investigación al reportar 0 % de contaminación.

Al utilizar el método de desinfección del “filtro”, no se reportó perdida de esporas durante el proceso de desinfección, ya que las esporas se mantuvieron dentro de los paquetes del papel filtro. Sin embargo, los resultados reportan contaminación de hongos y bacterias al 100%, por ende, se vio inhibida la germinación de esporas. Estos resultados contrastan con lo que reportan Hua et al. (2009) quienes diseñaron el método del “filtro” para la desinfección de esporas de helechos de *Adiantum reniforme* var. Sinense y experimentaron con dos tipos de desinfectantes ($HgCl_2$ y el NaOCl) y

concluyeron que el mejor desinfectante fue el NaOCl. Cuando esterilizaron las esporas a través de paquetes, reportan que no hubo pérdida mayor de esporas, debido a que la mayoría de las esporas se mantuvieron dentro de los paquetes. Así concluyeron que la pérdida de esporas es mínima, no hay contaminación y se presentan los mayores porcentajes de germinación, de entre 60.8 y 62.2 %. En el método de aspersión de etanol no hubo germinación debido a que presentó contaminación del 100 % en todas las unidades experimentales. Caso contrario a lo que reportan Narváez et al. (2013) que el método de aspersión de etanol no causo efectos adversos en el índice de germinación.

Los mejores resultados para la estimación de cobertura vegetal se obtuvieron conjugando tres variables: el tiempo de desinfección, la concentración de NaOCl y el pH, se lograron los mejores resultados en pH de 5, con un tiempo de exposición de 5 min a una concentración de 35 % de NaOCl (Figura 1). Muchos helechos germinan y se desarrollan mejor en pH ligeramente ácido, con una temperatura de 25 °C, en condiciones húmedas (Nondorf et al. 2003). El pH determina la solubilidad y por tanto la asimilabilidad o disponibilidad de los nutrientes minerales, así como de la capacidad que las esporas tomen estos elementos para el proceso de germinación. El pH juega un rol determinante en la germinación de las esporas, por lo que esporas cultivadas en pH de 6.0 y 6.5 no germinaron (Figura 1).

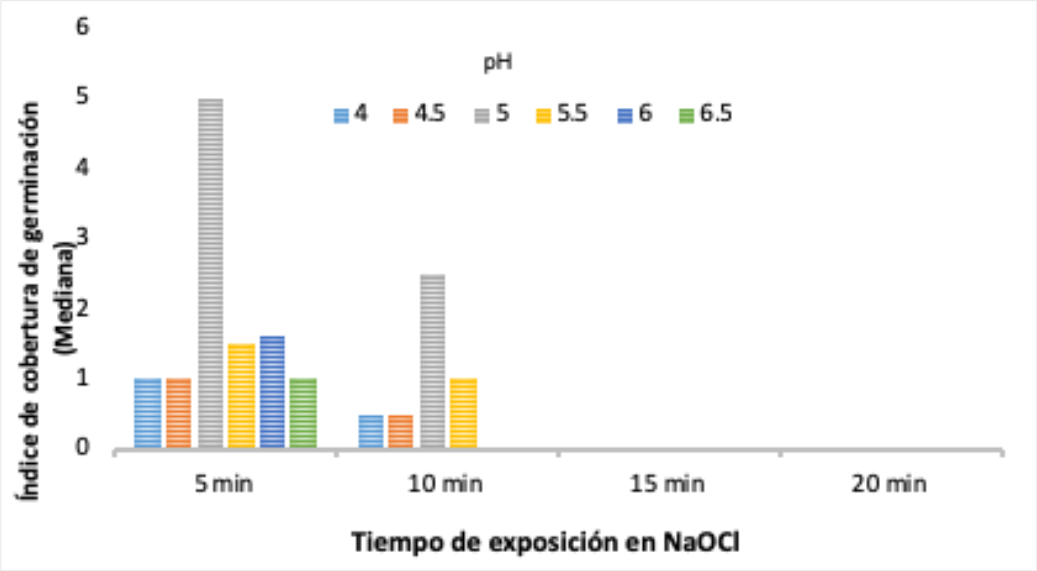


Figura 1. Índice de cobertura de germinación de esporas de *C. bicrenata*, en cuatro tiempos de exposición en NaOCl (35 %) a diferentes pH. Donde 1= Cobertura menor al 5 %; 2= Cobertura del 5 al 25 %; 3 =Cobertura del 25 al 50 %; 4= Cobertura del 50 al 75 % y 5= Cobertura igual o superior al 75 %.

La germinación de las esporas de *C. bicrenata* se inició a los 30 días después de su cultivo y continuó hasta los 46 días. La germinación fue ecuatorial del tipo *Cyathea* formándose dos células una de las cuales desarrolla el rizoide y la otra el filamento germinal, originando filamentos cortos de dos a seis células (Nayar & Kaur, 1971; Pérez-García et al. 1995). Narváez et al. (2013) reportaron que los primeros indicios de germinación de *Cyathea caracasana* se presentaron en un periodo de 18 a 22 días. El filamento germinativo de *C. bicrenata* es corto con hasta tres rizoides (Figura 2b). A los 43 días hubo aparición de dos hileras de células que dan origen al prótalo (Figura 2c y 2d). A los 53 días se presentó la formación laminar. Se formó un gametofito cordiforme (Figura 2e). El desarrollo del prótalo fue del tipo *Adiantum* (Mendoza et al. 1997), una célula meristemática se establece sólo cuando el talo tiene cuatro o cinco células de grosor.

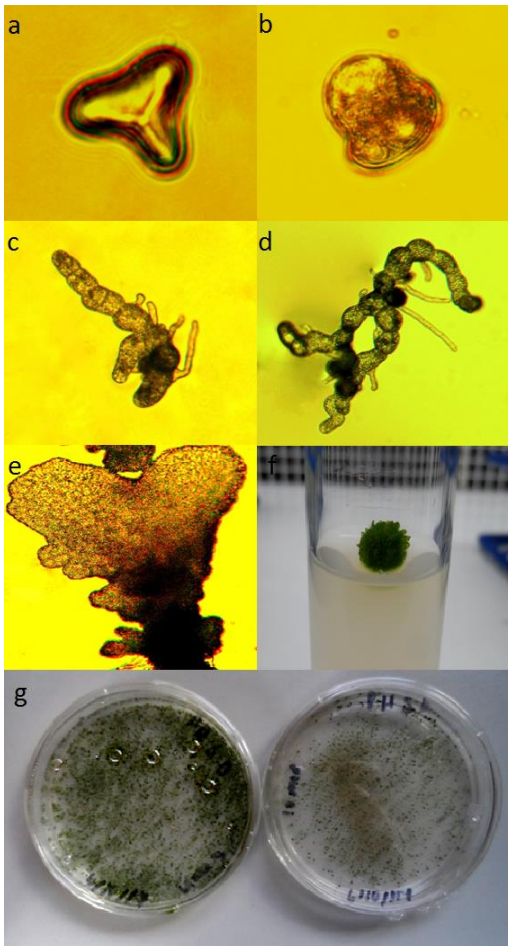


Figura 2. Desarrollo de la espora hasta la fase de gametofito. a) Espora trilete de *C. bicrenata* a los cuatro días (40 X) b) Espora germinada de *C. bicrenata* a los 30 días después de su cultivo (40 X) c) Formación de rizoides y desarrollo de células de *C. bicrenata* a los 43 días después de su cultivo (20 X) d) Elongación y formación de gametofito e) Prótalo a los 53 días f) Masa de gametofitos laminares en medio MS sólido g) Cultivo de esporas en medio MS con pH 5 en dos tiempos de desinfección izq. 5 min, der. 10 min.

Conclusiones

La información generada en este estudio nos permitió conocer el desarrollo de la espora hasta la fase gametofítica, el pH adecuado donde se presentó mayor porcentaje de germinación que fue de 5 seguido por el 5.5, por el contrario los valores de pH de 6.0 y 6.5 no inducen la germinación de esporas de C. bicrenata. Por lo cual se concluye que esta especie prefiere pH moderadamente ácido para la germinación y el desarrollo de prótalo. Así como, también, el mejor método para desinfección de esporas que fue el de Dyer con NaOCl al 35 %, y el tiempo de exposición del NaOCl entre 5 y 10 min. Se estableció el protocolo adecuado en la desinfección y el cultivo in vitro de Cyathea bicrenata. protocolo que puede ser empleado en el cultivo in vitro de otros helechos arborescentes.

Referencias

Álvarez Z, Sánchez L, López J & Tejero D (2012) Composición y abundancia de las pteridofitas en el bosque mesófilo de montaña del municipio de Tlanchinol, Hidalgo, México. Botanical Sciences.2: 163-177.

Armenta-Montero S, Carvajal-Hernández C, Ellis & Krömer T (2015) Distribution and conservation status of Phlegmariurus (Lycopodiaceae) in the state of Veracruz, Mexico. Tropical Conservation Science 8:114-137.

Braun-Blanquet J. (1979) Fitosociología. Bases para el estudio de las comunidades vegetales. Blume, Madrid, España. pp 820.

Carvajal-Hernández C y T Krömer (2015) Riqueza y distribución de helechos y licófitos en el gradiente altitudinal del Cofre de Perote, centro de Veracruz, México. Botanical Sciences. 93:601-614.

Carvajal-Hernández C, Krömer T & Vázquez T (2014) Riqueza y composición florística de pteridobiontes en bosque mesófilo de montaña y ambientes asociados en el centro de Veracruz, México. Revista Mexicana de Biodiversidad.85: 491-501.

Dyer A (1979) The culture of fern gametophytes for experimental investigation. In Dyer, A.F. (Ed). The experimental biology of ferns. London: Academic Press, pp: 253-305.

García-Mendoza A J & Meave J (2011) Diversidad florística de Oaxaca: de musgos a angiospermas (colecciones y lista de especies). Instituto de Biología, UNAM-CONABIO. México. 351 pp.

Grandtner M & Chevrette J (2013) Dictionary of trees. Volume 2: South American, Nomenclature, Taxonomy and Ecology. Academic Press Elsevier. Canada 466 pp.

Hua W, Ping C, Li Y & Long C (2009) An efficient method for surface sterilization and sowing fern spores in vitro. American Fern Journal 99(3):226–230.

Kluge J, Kessler M & Dunn R (2006) What drives elevational patterns of diversity? A test of geometric constraints, climate and species pool effects for pteridophytes on

an elevational gradient in Costa Rica. Global Ecology and Biogeography 15: 358-371.

Krömer T, Acebey A, & Smith R (2013) Taxonomic update, distribution and conservation status of grammitid ferns (Polypodiaceae, Polypodiopsida) in Veracruz State, Mexico. Phytotaxa 82:29-44.

Mendoza A, Pérez-García B & Reyes P (1997) Morfogénesis de la fase sexual del helecho Lophosoria quadripinnata varo contracta (Lophosoriaceae). Revista Biología Tropical. 45(3): 993-998.

Mehltreter K & García-Franco J (2008) Leaf Phenology and Trunk Growth of the Deciduous Tree Fern Alsophila firma (Baker) D. S. Conant in a Lower Montane Mexican Forest. American Fern Journal 98(1):1-13.

Mickel J & Smith R (2004) The Pteridophytes of Mexico. Memoirs of The New York Botanical Garden. USA. 1054 pp.

Moran R (2003) Low-Trunk Epiphytic Ferns on Tree Ferns Versus Angiosperms in Costa Rica. Biotropica 35(1): 48-56.

Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and biossays with tobacco tissue cultures. Physiology Plant. 15: 473-497.

Murillo A & Murillo M (2003) Pteridófitos de Colombia IV. Novedades en Cyathea (Cyatheaceae). Rev. Acad. Colomb. Cienc. 27 (102): 45-51.

Narváez P, Jerez J & S. Mantilla (2013) Etapas de desarrollo in vitro del gametofito del helecho arborescente Cyathea aff. caracasana (KLOTZSCH) DOMIN. Bistua: Revista de la Facultad de Ciencias Básicas. 11 (2):74-84.

Nayar B & Kaur S (1971) Gametophytes of homosporous ferns. Botanical Review (Lancaster) 37:295-396

Nondorf L, Dooley A, Palmieri M & Swatzell J (2003) The effects of pH, temperature, light intensity, light quality, and moisture levels on spore germination in Cheilanthes feei of Southeast Missouri. American Fern Journal. 93 (2): 56-69.

Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT (2010) Protección ambiental-Especies nativas de México de flora y fauna silvestres-Categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo.

Palacios R & Flores M (1992) Notas sobre el maquique y cómo afecta su uso a los helechos arborescentes. Boletín de la Asociación Mexicana de Orquideología, A. C. México. D.F. 92: 2-5.

Pérez-García B, Fraile M & Mendoza A (1995) Desarrollo del gametofito de Lophosoria quadripinnata (Filicales: Lophosoriaceae). Revista de Biología Tropical. 43:55-60.

Pérez P, González S & Tejero D (2014) Estructura poblacional y características del hábitat de dos especies de Cyatheaceae del estado de Hidalgo, México. Botanical Sciences 92 (2): 259-271.

Riaño K, Briones O & Pérez-García B (2015) Spore Germination of Three Tree Fern

Species in Response to Light, Water Potential, and Canopy Openness. American Fern Journal 105(2):59-72.

Riba R (1981) Flora de Veracruz. Cyatheaceae. INIREB. Xalapa, Veracruz. 43p.

Rodríguez-Trejo D (2005) Plantaciones Forestales de Restauración (enfoque biotecnológico). En: González, R. H y Jacinto, H. C. (Ed). Avances de Biotecnología Agropecuaria y Forestal en México. Asociación Nacional de Biotecnología Agropecuaria y forestal. pp: 245-251.

Ruiz R, Díaz M & Gutiérrez R (2015) Propagación In Vitro de Platicerium andinum Baker a partir de esporas. Revista ECIPerú 2 (1): 47-52.

Simabukuro E, Esteves L & Felippe G (1998) Analysis of a fern spore bank in Southeast Brazil. Hoehnea.25: 45-57.

Vargas I & A Droste (2014) In vitro propagation of Cyathea atrovirens (Cyatheaceae): spore storage and sterilization conditions. Revista Biología Tropical 62 (1): 299-308.

Vázquez T, Carvajal-Hernández C, Aquino A, Armenta S & Frontini P (2012) Los helechos de Xalapa y sus alrededores. Universidad Veracruzana. Veracruz, México. 190p.

Villaseñor J, Ortiz E, Alvarado L, Mora M & Segura G (2013) Catálogo florístico taxonómico de los árboles de México. Informe final Proyecto JE012. Bases de datos SNIB-CONABIO. México, D. F.

Uso de *Pseudomonas aeruginosa* en biorremediación

Daniel Luján*

Programa de postgrado en Infectología y Medicina Tropical, Facultad de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Professor Alfredo Balena, 190 - Santa Efigênia. Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil. CEP 30130-100

**daniellujanroca@gmail.com*

Resumen

Se realiza una revisión de la participación de *Pseudomonas aeruginosa* en los procesos de biorremediación de ambientes contaminados con moléculas orgánicas de difícil degradación y metales tóxicos; la importancia de esto radica en que, esta bacteria, debido a su diversidad metabólica, abundancia en comunidades microbianas y resistencia a los agentes de remediación química presentes en estos ambientes, se convierte en una de las especies más prometedoras de esta corriente biotecnológica.

Palabras clave: *Pseudomonas aeruginosa*, biorremediación, contaminación

Abstract

A review of *Pseudomonas aeruginosa* participation in bioremediation processes of polluted environments with organic molecules of difficult degradation and toxic metals is made, the importance of this lies in the fact that this bacterium due to its metabolic diversity, abundance in microbial communities and resistance to chemical remediation agents present in these environments becomes one of the most promising species of this biotechnological field.

Key words*: Pseudomonas aeruginosa*, bioremediation, pollution

Introducción

El medio ambiente presenta un progresivo deterioro, teniendo como causas principales a la explosión demográfica, industrialización, urbanización y turismo, debido a que, asociado a estos aspectos se incrementa el consumo del petróleo y sus derivados, los cuales generan residuos que favorecen la acumulación de desechos tóxicos (Vásquez et al., 2010).

Los hidrocarburos líquidos forman una película que impide el ingreso de la luz a nivel del agua, la oxigenación y fijación de nitrógeno en los suelos, matando a gran parte

de la flora bacteriana (Vásquez et al., 2010; Fernández, 2012). Los desechos orgánicos producto de la agricultura son uno de los principales problemas en la industria debido a que son bioacumulables (Wuana, 2011). La minería, en su proceso de lixiviación, contribuye en la acumulación de metales pesados, vertidos en muchos casos en fuentes de agua o diluidos por intervención de la lluvia permitiendo la contaminación del agua y suelo (Giraldo, 2014).

Para contrarrestar este problema, algunas soluciones biotecnológicas se han presentado, entre ellas la biorremediación, la cual es fundamentalmente un proceso metabólico de transferencia de electrones, necesario para el crecimiento microbiano (Gadd, 2010), que se obtiene durante el proceso de oxidación de materiales reducidos, donde las enzimas microbianas catalizan esta transferencia (Vidali, 2001). Un buen número de bacterias pueden participar de este proceso, entre ellas se destaca *Pseudomonas aeruginosa* debido a su gran versatilidad en el uso de fuentes de carbono (Tonini et al., 2010, Oliveira & Alves, 2013).

P. aeruginosa es una bacteria Gram negativa aislada en cultivo puro de heridas cutáneas por primera vez en 1882 por Gessard (Luján, 2014), derivándose, su denominación, de la palabra aeruginoso (*aeruginous*), la cual significa “el color del cobre oxidado”, debido al característico color azul-verdoso que presentan sus colonias en cultivo (Haynes, 1951; Ruíz, 2007). Es oxidasa y catalasa positiva, degrada glucosa oxidativamente y presenta una temperatura óptima de 30°C a 37°C. Puede vivir en numerosos ambientes, siendo muy fácil de encontrar en ambientes acuáticos y terrestres e inclusive en tejidos animales y vegetales. Es aerobia, pero algunas cepas pueden crecer anaeróbicamente por desnitrificación (Özen & Ussery, 2012). Usa un amplio rango de compuestos orgánicos e inorgánicos para su metabolismo lo que le permite aprovechar muchos tipos de sustratos, varios considerados tóxicos, como hidrocarburos alifáticos y aromáticos, aparte de ser resistentes a metales pesados, antimicrobianos y detergentes (Ruíz, 2007; Martínez et al., 2010).

Por lo expuesto el objetivo de este estudio fue actualizar la información referente a la participación de *P. aeruginosa* en biorremediación y ofrecer algunas perspectivas en referencia a este tema.

Biorremediación

Consiste en el uso de diferentes organismos (plantas, levaduras, hongos, bacterias, etc.) para neutralizar sustancias toxicas, disminuyendo su toxicidad o convirtiéndolas en inocuas para el medio ambiente y la salud humana (Torres, 2003; López et al., 2006).

Existen dos tipos: *In situ* que consiste en tratar las aguas, suelos o arenas contaminadas sin sacarlas del lugar en el que se encuentran usando la biolabranza, bioaireación, bioestimulación y bioaumentación; y *Ex situ* que consiste en que los procesos de tratamiento se llevan a cabo tras la excavación del medio contaminado

usando compostaje y biorreactores (Volke, 2002; Rodríguez & Sánchez, 2003).

Participan factores fisicoquímicos y biológicos (Duque, 2015). Entre los físico-químicos la temperatura tiene un gran efecto sobre la naturaleza del petróleo y sus derivados, a bajas temperaturas la viscosidad de los hidrocarburos aumenta, la volatilización de alcanos de cadena corta se reduce y disminuye la solubilidad del oxígeno en el agua (Vavasseur, 2014). El pH influye en la recuperación de suelos contaminados por hidrocarburos, ya que determina el grado de adsorción de iones por las partículas del suelo (Volke & Velazco, 2002). La humedad puede tanto inhibir la actividad microbiana como entorpecer la difusión de oxígeno a los microorganismos (Bahmani et al., 2018). Los nutrientes son sustancias químicas necesarias para la actividad microbiana y metabólica de los microorganismos (Gómez et al., 2008). La transferencia de los electrones favorece el proceso de oxidación de materiales reducidos, otorgando la energía necesaria (Reginatto et al., 2011), siendo los aceptores más utilizados el oxígeno y los nitratos, cuando el primero es utilizado la respiración microbiana se produce en condiciones aerobias, convirtiéndose los contaminantes en dióxido de carbono, agua y masa celular (El Mamouni et al., 2002). Entre los biológicos los microorganismos (bacterias, hongos y algas), que son los que sobrevivieron a la primera fase de la contaminación, sufren adaptaciones para usar los compuestos xenobióticos como fuente de carbono y en el caso de la biodegradación de hidrocarburos en diferentes ecosistemas (suelo y agua) su presencia es requerida, para que, a través de la actividad bioquímica, los oxiden (Solanas, 2009; Bahmani et al., 2018).

Contaminantes

En la actividad petrolera cuando un combustible llega al suelo, sus componentes se separan en tres fases: disuelta, líquida y gaseosa. Una pequeña fracción de los componentes de la mezcla se disuelve en el agua de la capa freática, una segunda porción es retenida en los espacios porosos del suelo en su forma líquida pura como saturación residual y otra parte de los contaminantes pasibles de evaporación da origen a la contaminación atmosférica, actuando de esta manera a tres niveles, suelo, agua subterránea y atmósfera (Reginatto et al., 2011), convirtiéndose el petróleo, incluyéndose explosiones y/o incendios, en un riesgo para la salud humana y el ecosistema (Zacharyasz et al., 2012; Mosaed et al., 2015).

Las actividades industriales generan una contaminación a gran escala con metales pesados (cobre, zinc, plomo, cadmio, cromo, níquel, mercurio, cobalto, plata y oro) (Abah et al., 2016); los cuales son elementos químicos no degradables, que una vez incorporados al medio ambiente, se distribuyen en el aire, agua y suelo, en algunos casos cambiando su estado de oxidación o en otros incorporándose a los seres vivos (Ukpong et al., 2013; Jyothi et al., 2017). Su presencia en los suelos suele afectar la fertilidad, mientras que en los acuíferos y aguas superficiales

puede comprometer su uso como fuentes de agua para el consumo humano (Vullo, 2003).

Los plaguicidas contaminan, ya que, aproximadamente el 47% del producto aplicado se deposita en suelos, aguas colindantes o se dispersa en la atmósfera, su biodisponibilidad en el organismo depende de su toxicocinética (absorción, distribución, metabolismo y eliminación), estos procesos están influenciados tanto por factores externos relacionados con los patrones de exposición, sustancias químicas, así como, por factores inherentes al individuo (edad, sexo, dotación genética, estado de salud, estado nutricional, estilos de vida, vía principal de absorción, etc.) (Ramírez & Lacasaña, 2001; Budzinski & Couderche, 2018).

Las industrias agrarias, de gran demanda actualmente (Vásquez et al., 2010), conllevan un aumento en la producción de desechos vegetales, contaminación del agua por nitratos, fosfatos y plaguicidas, son fuente antropogénica de gases responsables del efecto invernadero, metano y óxido nitroso, contribuyendo en gran medida a otros tipos de contaminación del aire y del agua (FAO, 2002).

Uso de *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa es más frecuentemente asociado como causa de infección humana; sin embargo, naturalmente existe en el medio ambiente. La bacteria se considera un patógeno oportunista, que causa principalmente infecciones nosocomiales en pacientes inmunocomprometidos (Vallés & Mariscal, 2005; Berube at al., 2016; Streeter & Katouli, 2016). A pesar de, principalmente, ser asociada con afectaciones a la salud (Luján et al., 2008), varias de sus cepas han sido reportadas con capacidad desintoxicante de ciertos contaminantes orgánicos e inorgánicos de suelos (Das & Mukherjee, 2007; Mayz & Manzi, 2017) indicándosele especialmente útil para combatir la contaminación por metales pesados (Cervantes et al., 2006; Bojórquez et al., 2016).

En la limpieza del petróleo y sus derivados, *P. aeruginosa* ha demostrado ser uno de los métodos más ecológicos, debido a que es rentable y convierte a los hidrocarburos en subproductos inocuos como el dióxido de carbono y el agua (Prakash & Irfam, 2011). Utiliza y degrada *n*-alcanos entre 11 y 40 átomos de carbono llegando a un 60% de efectividad usando C_{20} como substrato (Salgado et al., 2008). Es eficiente en la remoción de hidrocarburos del petróleo en suelo contaminado, registrándose 90% para C_{10} y 69% para C_{20+} (Safdari et al., 2017). En la bioremediación de contaminantes del petróleo en zonas costeras, presenta un 100% de índice de emulsificación frente al petróleo crudo con reducción de la tensión superficial a 26,5 mN/m (Cheng et al., 2017). También, en la contaminación de suelos con petróleo crudo puro, es bastante efectiva como bioestimulante mucho mejor que con petróleo crudo tratado (Ojewumi et al., 2018). Además, en la bioremediación de suelo salino contaminado con petróleo reduce al hidrocarburo hasta un 30% comparado con el suelo no tratado (Ebadi et al., 2017).

En la contaminación por metales pesados, *P. aeruginosa* presenta una alta capacidad bioremediativa, lo que evita que estos, en cantidades superiores a ciertos límites sean extremadamente perjudiciales para el suelo y la biota que los soporta (Awasthi et al., 2015). Demuestra capacidad para remediar estanques de desechos con bajas concentraciones de Cobre (Cu), eliminando 30% de este a partir de 160 ppm del metal (Baltazar et al., 2014). Elimina Arsénico (As) de aguas subterráneas, hasta en un 60%, disminuyendo su concentración de 1,0 a 0,4 mg/L (Pellizari et al., 2015). Detecta y adsorbe iones (Hg^{2+}) hasta en un 80% y actúa también sobre Cu^{2+}, Pb^{2+}, Co^{2+}, Cd^{2+} y Cr^{3+} (Yin et al., 2016). Biorremedia varios iones metálicos, siendo los principales Zn^{2+} con 57,5% (648,4 $mg \cdot L^{-1}$), Cu^{2+} con 51,3% (518,9 $mg \cdot L^{-1}$) y Fe^{3+} con 48,5% (298,6 $mg \cdot L^{-1}$) (Sindu & Gautam, 2017). Muestra una eficiencia de 76,1% en la remoción de Cesio (Cs) de aguas residuales (Kang et al., 2017). También, adsorbe Cadmio (Cd) con una capacidad máxima de 131,9 µmol/g (Tang et al., 2018).

Actualmente los ramnolípidos producidos por *P. aeruginosa* con potencial de bioremediación son una interesante área de estudio (Chong & Li, 2017). Esta produce dos formas de ramnolípidos en cultivo líquido. Los que presentan una sola molécula de azúcar se definen como mono-ramnolípidos, mientras que los que tienen dos son los di-ramnolípidos (Figura 1) (Maier & Soberón-Chavez, 2000; Kaskatepe & Yildiz, 2016, Shao et al., 2017). Los factores reguladores de estos incluyen sistemas de proteínas de percepción de cuórum (*quorum sensing*) y respuesta medioambiental, así como, sistemas reguladores globales dentro de la fisiología bacteriana basal, que actúan tanto a nivel transcripcional o postranscripcional (Reis et al., 2011). Numerosos estudios han confirmado que los ramnolípidos pueden afectar la biodegradación de hidrocarburos, tanto alifáticos como aromáticos. Además, se ha demostrado que su adición a cultivos puros de *P. aeruginosa* mejora la biodegradación de hexadecano, octadecano, n-parafinas y fenantreno (Rikalović et al., 2015). Siendo que, en condiciones de laboratorio el petróleo

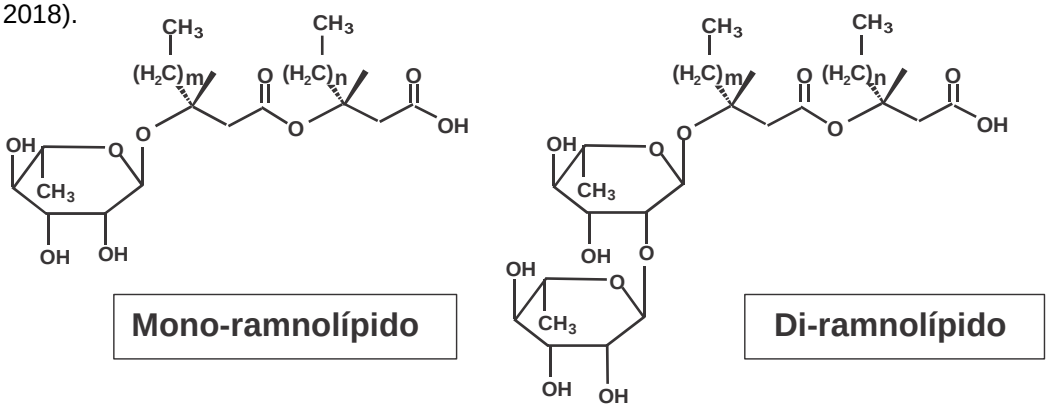


Figura 1. Estructura general de ramnolípidos típicos.

crudo ha sido removido entre un 58 a 95% (Zhang et al, 2005; Ma et al, 2016; He et al., 2017). Estos ramnolípidos han mostrado que tienen una gran afinidad por una variedad de iones metálicos específicos, facilitando la remoción de metales pesados, tales como el plomo o el cadmio, presentes como contaminantes en suelos y aguas (Giraldo et al., 2014). Su aplicación en la remoción de estos metales pesados en suelos contaminados ha sido determinada, indicándose la remoción de cobre hasta en un 74% (Venkatesh & Vedaraman, 2012), niquel en un 56% (Elouzi et al., 2012), cromo en un 70% (Avramović et al., 2013) y hierro en un 60% (Akintunde et al., 2015).

La deliberación anterior estaría vinculada a la salud, ya que, el hecho de no remediar el medio ambiente contaminado incide en la misma; todos los contaminantes orgánicos e inorgánicos se quedarían como remanentes ambientales, acumulándose en cantidades muy superiores a los permitidos, encontrándose o pudiéndose encontrar en fuentes muy próximas a humanos y animales, afectándoles en sus potenciales fisiológicos e incluso en su desarrollo evolutivo, con la concomitante carga e incremento para los sistemas de salud pertinentes (Zheng et al., 2013; Jamieson et al., 2017; Karlsson et al., 2019).

Conclusiones

P. aeruginosa presenta un rol a destacar en la biorremediación debido a su gran capacidad catabólica, requerimientos abióticos no muy exigentes y fácil adaptación a condiciones adversas. Lo cual le permite participar activamente en la degradación de contaminantes tales como hidrocarburos y metales pesados. La actual investigación sobre esta especie está ofreciendo nuevas evidencias en lo que respecta a su participación en esta corriente biotecnológica y a la posibilidad de ser usada en diferentes escenarios medio ambientales.

Agradecimientos

A Maria Geralda Fagundes-Penido, BA, por su asistencia administrativa.

Referencias

Abah J, Mashebe P & Onjefu SA (2016) Preliminary assessment of some heavy metals pollution status of Lisikili river water in Zambezi region, Namibia. IJEPR. 4: 13-30.

Akintunde TA, Abioye OP, Oyeleke SB, Boboye BE & Ijah UJJ (2015) Remediation of iron using rhamnolipid-surfactant produced by Pseudomonas aeruginosa. Res. J. Environ. Sci. 9: 169-177.

Avarmović NS, Nikolić-Mandić SD & Karadžić IM (2013) Influence of rhamnolipids, produced by Pseudomonas aeruginosa NCAIM(P), B001380 on their Cr(VI) removal capacity in liquid medium. J. Serb. Chem. Soc. 78: 639–651.

Awasthi G, Chester A, Chaturvedi R & Prakash J (2015) Study on role of Pseudomonas aeruginosa on heavy metal bioremediation. Int. J. Pure. App. Biosci. 3: 92-100.

Bahmani F, Ataei SA & Mikaili MA (2018) The effect of moisture content variation on the bioremediation of hydrocarbon contaminated soils: modeling and experimental investigation. J. Environ. An. Chem. 5: 2.

Baltazar M, Gracioso L, Avanzi I, Veiga M, Gimenes L, Nascimento C & Perpetuo E (2014) Bioremediation potential of Pseudomonas aeruginosa and Enterobacter cloacae isolated from a copper-contaminated area. BMC. Proceedings. 8(Suppl 4): P188.

Berube BJ, Rangel SM & Hauser AR (2016) Pseudomonas aeruginosa: breaking down barriers. Curr. Genet. 62: 109-113.

Bojórquez C, Frías MG & Voltolina D (2016) Removal of cadmium and lead by adapted strains of Pseudomonas aeruginosa and Enterobacter cloacae. Rev. Int. Contam. Ambient. 32: 407-412.

Budzinski H & Couderche M (2018) Environmental and human health issues related to pesticides: from usage and environmental fate to impact. Environ. Sci. Poll. Res. 25: 14277–14279.

Cervantes C, Espino-Saldaña AE, Acevedo-Aguilar F, León-Rodríguez IL, Rivera-Cano ME, Avila-Rodríguez M, Wróbel KK, Wróbel ZK, Gutiérrez CJF, Rodríguez ZJS & Moreno SR (2006) Interacciones microbianas con metales pesados. Rev. Latinoam. Microbiol. 48: 203-210.

Cheng T, Liang J, He J, Hu X, Ge Z & Liu J (2017) A novel rhamnolipid-producing Pseudomonas aeruginosa ZS1 isolate derived from petroleum sludge suitable for bioremediation. AMB. Express. 7: 120.

Chong H & Li Q (2017) Microbial production of rhamnolipids: opportunities, challenges and strategies. Microb. Cell. Fact. 16: 137

Das K & Mukherjee AK (2007) Crude petroleum-oil biodegradation efficiency of Bacillus subtilis and Pseudomonas aeruginosa strains isolated from a petroleum-oil contaminated soil from North-East India. Bioresour. Technol. 98: 1339–1345.

Duque C (2015) Revisión del potencial biológico de las bacterias sulfatoreductoras para la mitigación de metales pesados contaminantes en aguas de uso industrial. Tesis de especialización en Planeación Ambiental y Manejo Integral de los Recursos Naturales. Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá. pp. 1-17.

Ebadi A, Sima NAK, Olamaee M, Hashemi M & Nasrabadi RG (2017) Effective bioremediation of a petroleum-polluted saline soil by a surfactant-producing Pseudomonas aeruginosa consortium. J. Adv. Res. 8: 627-633.

El Mamouni R, Jacquet R, Gerin P & Agathos SN (2002) Influence of electron donors and acceptors on the bioremediation of soil contaminated with trichloroethene and nickel: laboratory- and pilot-scale study. Water. Sci. Technol. 45: 49-54.

Elouzi AA, Akasha AA, Elgerbi AM, El-Baseir M & El Gammudi BA (2012) Removal of

heavy metals contamination by bio-surfactants (Rhamnolipids). J. Chem. Pharm. Res. 4: 4337-4341.

Food and Agriculture Organization (2002) Agricultura mundial, hacia los años 2015/2030: informe resumido. FAO, Roma.

Gadd GM (2010) Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. Microbiology. 156: 609–643.

Giraldo J, Gutiérrez S & Merino F (2014) Actividad emulsificante y de remoción de metales pesados del ramnolípido producido por Pseudomonas aeruginosa PB 25. Rev. Soc. Quím. Perú. 80: 35-44.

Gómez SE, Gutiérrez DC, Hernández AM, Hernández CZ, Casallas ML & Mantilla PC (2008) Factores bióticos y abióticos que condicionan la biorremediación por Pseudomonas en suelos contaminados por hidrocarburos. NOVA. 6: 76-84.

Haynes WC (1951) Pseudomonas aeruginosa - its characterization and identification. J. Gen. Microbiol. 5: 939-950.

He C, Dong W, Li J, Li Y, Huang C & Ma Y (2017) Characterization of rhamnolipid biosurfactants produced by recombinant Pseudomonas aeruginosa strain DAB with removal of crude oil. Biotechnol. Lett. 39: 1381–1388.

Jamieson AJ, Malkocs T, Piertney SB, Fujii T & Zhang Z (2017) Bioaccumulation of persistent organic pollutants in the deepest ocean fauna. Nat. Ecol. Evol. 1: 0051.

Jyothi M, Srinivasarao D, Swarnalatha G & Sudhakar G (2017) Assessment of heavy metals content in surface and sub surface soil samples in waste dumpsites of Guntur, Andhra Pradesh. IRJET. 4: 2420-2424.

Kang SM, Jang SC, Heo NS, Oh SY, Cho HJ, Rethinasabapathy M, Ezhil Vilian AT, Hand YK, Roh C & Huh YS (2017) Cesium-induced inhibition of bacterial growth of Pseudomonas aeruginosa PAO1 and their possible potential applications for bioremediation of wastewater. J. Hazar. Mater. 338: 323–333.

Karlsson CMG, Cerro-Gálvez E, Lundin D, Karlsson C, Vila-Costa M & Pinhassi J (2019) Direct effects of organic pollutants on the growth and gene expression of the Baltic Sea model bacterium Rheinheimera sp. BAL341. Microb. Biotechnol. 0: 1-15.

Kaskatepe B & Yildiz S (2016) Rhamnolipid biosurfactants produced by Pseudomonas species. Braz. Arch. Biol. Technol. 59: e16160786.

Lladó S (2012) Biorremediación de suelos contaminados por hidrocarburos pesados y caracterización de comunidades microbianas implicadas. Tesis de Doctorado en Microbiología Ambiental y Biotecnología. Universidad de Barcelona. Barcelona. pp 1-274.

López de Mesa JB, Quintero G, Guevara-Vizcaíno AL, DCJ Cáceres, Gutiérrez-Riaño SM & Miranda-García J (2006) Bioremediación de suelos contaminados

con hidrocarburos derivados del petróleo. NOVA. 4: 82-90.

Luján DA (2014) Pseudomonas aeruginosa: un adversario peligroso. Acta. Bioquím. Clín. Latinoam. 48: 465-474.

Luján DA, Ibarra JO & Mamani E (2008) Resistencia a los antibióticos en aislados clínicos de Pseudomonas aeruginosa en un hospital universitario en Lima, Perú. Rev. Biomed. 19: 156-160.

Ma KY, Sun MY, Dong W, He CQ, Chen FL & Ma YL (2016) Effects of nutrition optimization strategy on rhamnolipid production in a Pseudomonas aeruginosa strain DN1 for bioremediation of crude oil. Biocatal. Agric. Biotechnol. 6: 144-151.

Maier RM & Soberón-Chávez G (2000) Pseudomonas aeruginosa rhamnolipids: biosynthesis and potential applications. Appl. Microbiol. Biotechnol. 54: 625-633.

Martínez A, Cruz M, Veranes O, Carballo ME, Salgado I, Olivares S, Lima L & Rodríguez D (2010) Resistencia a antibióticos y a metales pesados en bacterias aisladas del río Almendares. Rev. CENIC. Cien. Biol. 41: 1-10.

Mayz JC & Manzi LV (2017) Bacterias hidrocarburoclásticas del género Pseudomonas en la rizosfera de Samanea saman (Jacq.) Merr. Rev. Colomb. Biotecnol. 19: 29-37.

Mosaed HP, Sobhanardakani S, Merrikhpour H, Farmany A, Cheraghi M & Ashorlo S (2015) The Effect of Urban Fuel Stations on Soil Contamination with Petroleum Hydrocarbons. Iranian. J. Toxicol. 9: 1378-1384.

Ojewumi ME, Anenih EV, Taiwo OS, Adekeye BT, Awolu OO & Ojewumi MO (2018) A bioremediation study of raw and treated crude petroleum oil polluted soil with Aspergillus niger and Pseudomonas aeruginosa. J. Ecol. Eng. 19: 226–235.

Oliveira RM & Alves F (2013) Diversidade microbiana utilizada na biorremediação de solos contaminados por petróleo e derivados. Acervo da Iniciação Científica 3: 1-14.

Özen AI & Ussery DW (2012) Defining the Pseudomonas genus: Where do we draw the line with Azotobacter?. Microb. Ecol. 63: 239-248.

Pellizzari EE, Marinich LG, Flores SA & Giménez CM (2015) Degradación de arsénico por Pseudomonas aeruginosa para biorremediación de agua. Estudio preliminar. Av. Cienc. Ing. 6:1-5.

Prakash B & Irfan M (2011) Pseudomonas aeruginosa is present in crude oil contaminated sites of Barmer Region (India). J. Bioremed. Biodegrad. 2:129.

Ramírez JA, & Lacasaña M (2001) Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Arch. Prev. Riesgos. Labor. 4: 67-75.

Reginatto C, Colla LM & Thomé A (2011) Biorremediação de resíduos oleosos em solos. Ver. CIATEC-UPF. 3: 19-31.

Reis RS, Pereira AG, Neves BC & Freire DMG (2011) Gene regulation of rhamnolipid production in Pseudomonas aeruginosa

– A review. Bioresour. Technol. 102: 6377–6384.

Rikalović MG, Vrvić MM & Karadžić IM (2015) Rhamnolipid biosurfactant from Pseudomonas aeruginosa – from discovery to application in contemporary technology. J. Serb. Chem. Soc. 80: 279–304.

Rodríguez JL & Sánchez-Martín J (2003) Biorremediación: Aspectos tecnológicos y aplicación al vertido del Prestige. Industria y Minería 351: 17-21.

Ruíz L (2007) Pseudomonas aeruginosa, aportación al conocimiento de su estructura y al de los mecanismos que contribuyen a su resistencia a los antimicrobianos. Tesis de doctorado en Microbiología Molecular. Universidad de Barcelona. Barcelona. pp. 1-180.

Safdari MS, Kariminia HR, Nejad ZG & Fletcher TH (2017) Study potential of indigenous Pseudomonas aeruginosa and Bacillus subtilis in bioremediation of diesel-contaminated. Water. Air. Soil. Poll. 22: 37.

Salgado R, Pineda G, Mesta AM, Díaz F & Wang T (2008) Degradación de n-alcanos por Pseudomonas aeruginosa MGP-1. Cienc. Tecnol. 7: 123-132.

Shao B, Liu Z, Zhong H, Zeng G, Liu G, Yu M, Liu Y, Yang X, Li Z, Fang Z, Zhang J & Zhao C (2017) Effects of rhamnolipids on microorganism characteristics and applications in composting: A review. Microbiol. Res. 200: 33–44.

Sindu PA & Gautam P (2017) Studies on the biofilm produced by Pseudomonas aeruginosa grown in different metal fatty acid salt media and its application in biodegradation of fatty acids and bioremediation of heavy metal ions. Can. J. Microbiol. 63: 61-73.

Solanas AM (2009) La biodegradación de hidrocarburos y su aplicación en la biorremediación de suelos. Estudios en la Zona no Saturada del Suelo 9: 1-8.

Streeter K & Katouli M (2016) Pseudomonas aeruginosa: A review of their pathogenesis and prevalence in clinical settings and the environment. Infect. Epidemiol. Med. 2: 25-32.

Tang X, Zenga G, Fana C, Zhoua M, Tang L, Zhua J, Wana J, Huanga D, Chen M, Xua P, Zhanga C, Lua Y & Xiong W (2018) Chromosomal expression of CadR on Pseudomonas aeruginosa for the removal of Cd(II) from aqueous solutions. Sci. Total. Environ. 636: 1355-1361.

Tonini RMCW, de Rezende CE & Grativol AD (2010) Degradação e biorremediacão de compostos do petróleo por bactérias: revisão. Oecol. Aust. 14: 1025-1035.

Torres D (2003) El papel de los microorganismos en la biodegradación de compuestos tóxicos. Ecosistemas 12: 1-5.

Ukpong EC, Antigha RE & Moses EO (2013) Assessment of heavy metals content in soils and plants around waste dumpsites in Uyo metropolis, Akwa Ibom state. THE. IJES. 2: 75-86.

Vallés J & Mariscal D (2005) Neumonía por Pseudomonas aeruginosa. Enferm.

Infecc. Microbiol. Clin. 23(Suppl 3): 30-36.

Vásquez MC, Guerrero-Figueroa JT & Quintero AP (2010) Biorremediación de lodos contaminados con aceites lubricantes usados. Rev. Col. Biotecnol. 2: 141-157.

Vásquez MC, Prada PA & Mondragon MA (2010) Optimización del proceso de compostaje de productos post-cosecha (cereza) del café con la aplicación de microorganismos nativos. Nova. 8: 213-219.

Vavasseur A (2014) Bioremédiation des sols et des eaux: application aux pollutions chimique et nucléaire. Pollution Atmosphérique (Supl.): 80-86.

Venkatesh NM & Vedaraman N (2012) Remediation of soil contaminated with copper using rhamnolipids produced from Pseudomonas aeruginosa MTCC 2297 using waste frying rice bran oil. Ann. Microbiol. 62: 85–91.

Vidali M (2001) Bioremediation. An overview. Pure. Appl. Chem. 73: 1163–1172.

Volke TL & Velasco JA (2002) Tecnologías de remediación para suelos contaminados. INE-SEMARNAT, México.

Volke TL (2002) Biorremediación de suelos contaminados. BioTecnología 7: 24-39.

Vullo DL (2003) Microorganismos y metales pesados: una interacción en beneficio del medio ambiente. QViva. 2: 93-104.

Wuana RA & Okieimen FE (2011) Heavy metals in contaminated soils: A review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. ISRN. Ecology. Volume 2011, Article ID 402647, 20 pages.

Yin K, Lv M, Wang Q, Wu Y, Liao C, Zhang W & Chen L (2016) Simultaneous bioremediation and biodetection of mercury ion through surface display of carboxylesterase E2 from Pseudomonas aeruginosa PA1. Water. Res. 103: 383-390.

Zacharyasz P, Siepak J & Rosada J (2012) Petroleum-contaminated soil and water analysis and biodegradation. Polish. J. Environ. Stud. 21: 1467-1480.

Zhang GL, Wu YT, Qian XP & Meng Q (2005) Biodegradation of crude oil by Pseudomonas aeruginosa in the presence of rhamnolipids. J. Zhejiang. Univ. SCI. B. 6: 725-730.

Zheng W, Wang X, Tian D, Jiang S, Andersen ME, He G, Crabbe MJC, Zheng Y, Zhong Y & Qu W (2013) Water pollutant fingerprinting tracks recent industrial transfer from coastal to inland China: A case study. Sci. Rep. 3: 1031.

www.smbb.com.mx