

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**
AUTÓNOMA DE MÉXICO **POSGRADO**



FACULTAD DE QUÍMICA

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS**

IDENTIFICACIÓN DE UNA ESTERASA
EXTRACELULAR CUYA ACTIVIDAD ESTÁ
RELACIONADA CON EL CRECIMIENTO
DE *Acinetobacter* sp. EN POLIURETANO

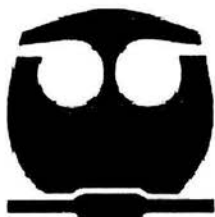
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRÍA EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)

P R E S E N T A:

AGUSTÍN CARRILLO GARCÍA

Tutor: DRA. HERMINIA LOZA TAVERA



MÉXICO, D. F.

Diciembre 2004



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

IDENTIFICACIÓN DE UNA ESTERASA EXTRACELULAR CUYA ACTIVIDAD ESTÁ RELACIONADA CON EL CRECIMIENTO DE *Acinetobacter* sp. EN POLIURETANO

RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección de la Dra. Herminia Loza Tavera en el laboratorio 105 del departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas, en el Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dra. Herminia Loza Tavera	Facultad de Química, UNAM
Dra. María del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Dr. Agustín López-Munguía Canales	Instituto de Biotecnología, UNAM

Se reconoce la colaboración del Dr. M. Javier Cruz Gómez, del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química, en cuyo laboratorio se llevaron a cabo los experimentos de CG-EM.

El equipo de trabajo reconoce de manera muy especial el apoyo brindado por el Dr. Javier Cruz desde el inicio y durante todo el desarrollo del trabajo ya que sin el mismo esto no habría sido posible.

Se reconoce la asesoría técnica del M. en C. Néstor Noé López Castillo en la realización de los análisis de cromatografía y la M. en C. Brenda Porta Briseño en la realización e interpretación de espectros de IR y RMN y en general por el apoyo prestado.

Se reconoce el apoyo técnico del M. en C. Miguel Rodríguez Meza y del M. en C. Martín Pedro Vargas.

Durante los estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT con número de registro 170398.

Esta tesis fue defendida en examen presentado el día

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dr. Armando Gómez Puyou	Instituto de Fisiología, UNAM
Vocal	Dr. Agustín López-Munguía Canales	Instituto de Biotecnología, UNAM
Secretario	Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dra. Amelia Farrés González-Saravia	Facultad de Química, UNAM
Suplente	Dr. Luis Servín González	Instituto de Inv. Biomédicas, UNAM

A Clauss,

Inseparable amiga e inspiración.
El amor de mi vida.

A Lau y Azulita,

Mi principal razón para lograr esta meta.

A mi Papá, Tte. Agustín Carrillo Lozano†,

Me enseñaste el valor de luchar por los ideales.
Sé que estarías muy orgulloso.

A mi Mamá, Cristina

Sé que tienes apartado un lugar en el cielo.
Este logro también es tuyo.

A Malena y Armando,

Con ustedes fracasa el estereotipo del suegro.
El apoyo moral es tan valioso como el material.

A Diana, Moisés, Ernesto y Norma,

Los mejores hermanos que puedo tener.

A todos mis familiares y amigos.

Gracias por estar en el momento y lugar indicados.

CONTENIDO

Contenido	iv
Índice de tablas y figuras	v
Abreviaturas	vi
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	5
1. Poliuretano: origen, composición y usos	5
2. Disposición de desechos de PUR	7
3. Plásticos biodegradables y biodegradación de plásticos	8
a) Poli-hidroxi-alcanoatos (PHAs)	9
b) Biodegradación de PUR	10
4. Actividades enzimáticas asociadas a la degradación del poliuretano	11
a) Proteasas	12
b) Ureasas	13
c) Esterasas y Lipasas	13
5. Mecanismo de acción de esterazas que atacan polímeros	16
IV. Hipótesis	18
V. Objetivos	19
VI. Estrategia Experimental	20
VII. Materiales y métodos	23
VIII. Resultados	34
IX. Discusión	58
X. Conclusiones	68
XI. Perspectivas	69
XII. Anexos	70
XIII. Bibliografía	78

INDICE DE TABLAS Y FIGURAS

- Figura 1. Síntesis de poliuretano y posibles sitios de ataque enzimático
Figura 2. Modelo propuesto para el ataque de la PHA-depolimerasa y la esterasa de *C. acidovorans*
Figura 3. Diagrama de flujo de la estrategia experimental
Figura 4. Curva de crecimiento de las cepas 402-2 y 402-4 en MB+PURh
Figura 5. Estructura química de los compuestos encontrados en PURh
Figura 6. Halos de degradación de las cepas aisladas y cultivadas en Agar YES+PURh
Figura 7. Curva patrón de actividad de proteasa
Figura 8. Curva patrón de amonio
Figura 9. Cultivo en agar de Christensen
Figura 10. Cultivo en agar Tween® 80
Figura 11. Curva patrón de p-nitrofenol
Figura 12. Actividad de esterasa en sobrenadante
Figura 13. Cultivo en MB con las distintas fracciones de la destilación del PURh
Figura 14. Cromatogramas de la extracción clorofórmica de sobrenadante
Figura 15. Efecto del pH en la hidrólisis de PNPA por la esterasa de la cepa 402-2
Figura 16. Temperatura de máxima actividad para la hidrólisis de PNPA por la esterasa
Figura 17. Curvas de los ajustes de datos de la actividad de la esterasa

- Tabla 1. Materias primas usadas en la fabricación de PUR
Tabla 2. Usos de los distintos tipos de PUR
Tabla 3. Organizaciones involucradas con el reciclado de PUR
Tabla 4. Microorganismos involucrados con la degradación de PUR y actividades enzimáticas asociadas
Tabla 5. Propiedades bioquímicas de enzimas capaces de atacar el poliuretano
Tabla 6. Genes que codifican enzimas bacterianas que degradan PUR
Tabla 7. Composición de la resina PURh
Tabla 8. Identificación de actividades enzimáticas en medios diferenciales
Tabla 9. Análisis de actividades enzimáticas en sobrenadantes de medio de cultivo
Tabla 10. Evolución de los componentes de la resina en el cultivo de *Acinetobacter* sp.
Tabla 11. Parámetros obtenidos de los ajustes no lineales

ABREVIATURAS

^{13}C -RMN	Resonancia magnética nuclear con núcleo de ^{13}C
^1H -RMN	Resonancia magnética nuclear protónica
CG-EM	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
DPGME	Di-propilen-glicol-metil-éter
IR	Espectroscopía de Infrarrojo
ISOPA	European Diisocyanate & Polyol Producers Association
LB	Luria-Bertani
MB	Medio Basal
MB+PURh	Medio Basal con Hydroform® como fuente de carbono
MDI	Metilen-bis(fenil-diisocianato)
MES	Ácido 4-morfolin-etan-sulfónico
NMP	N-metil-pirrolidona
PE	Poliéter
PE-PUR	Poliuretano-Poliéter
PHA	Polihidroxialcanoato
PMSF	Fenil-metil-sulfonil-fluoruro
PNP	Para-nitrofenilo
PNPA	Acetato de para-nitrofenilo ó para-nitrofenil-acetato
PS	Poliéster
PS-PUR	Poliuretano-poliéster
PUR	Poliuretano
PURh	Poliuretano hidrosoluble. Resina de Hydroform® completa
TDI	Tolilen-diisocianato

I. RESUMEN

Este trabajo comprende el aislamiento de bacterias capaces de crecer en un medio de cultivo mineral cuya formulación incluye Hydroform®, una resina comercial de tipo poliuretano-poliéster hidrosoluble (denominada en adelante PURh) como única fuente de carbono. El estudio comprende además la caracterización de una enzima extracelular de tipo esterasa asociada al crecimiento.

La obtención de las cepas se realizó partiendo de cultivo líquido y siembra por aislamiento en placa usando PURh como única fuente de carbono y posteriormente fueron caracterizadas por pruebas bioquímicas. Se aislaron dos cepas de bacterias del género *Acinetobacter* capaces de crecer en poliuretano como única fuente de carbono, lo que representa el primer reporte de una cepa de este género que tiene tal capacidad.

La resina fue caracterizada químicamente por destilación fraccionada, cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM), espectrofotometría de infrarrojo (IR) y resonancia magnética nuclear (RMN). La caracterización química de la resina polimérica indica la presencia de compuestos tipo poliuretano-poliéster, *N*-metil-pirrolidona e isómeros de dipropilenglicolmetileter.

Se realizaron pruebas para detectar actividades enzimáticas de tipo esterasa, proteasa y ureasa presentes en el sobrenadante de cultivo

líquido, empleando ensayos en donde se determinaba la hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo, caseína y urea, respectivamente.

La cepa de *Acinetobacter* sp. 402-2 es capaz de usar *N*-metil-pirrolidona y poliuretano-poliéster como fuentes de carbono. Esta cepa genera una esterasa que se induce al cultivar en poliuretano-poliéster pero que no se genera al cultivar en *N*-metil-pirrolidona o medio Luria-Bertani. Sin embargo, en este trabajo no se determinó si la actividad de esterasa es la responsable de degradar el poliuretano.

La actividad presenta un pH óptimo de 7.5 y una temperatura óptima de actividad a los 38 °C. El análisis de regresión no lineal usando el programa Origin 6.0 indica que la $K_{0.5}$ es igual a 1 mM.

II. INTRODUCCIÓN

A menudo los microorganismos pueden adaptarse al uso de sustancias químicas normalmente no encontradas en el ambiente y usarlas como nuevos sustratos y fuentes de energía. Dichas sustancias incluyen desde moléculas de tamaño pequeño como clorobifenilos y clorobencenos, hasta moléculas de gran tamaño como polímeros sintéticos (van der Meer, 1992; Watanabe y Hamamura, 2003; Howard, 2002).

Así, mientras se realizan esfuerzos por generar polímeros más resistentes a la biodegradación, por otra parte se buscan enzimas que los degraden y que son generadas por bacterias capaces de utilizarlos como fuente de carbono (Howard, 2002; Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

La degradación de plásticos generados por la actividad humana y que no se encuentran en la naturaleza, es tema de estudios que involucran distintas disciplinas científicas. Estos estudios incluyen desde la producción de plásticos biodegradables (van der Meer, 1992), el estudio de microorganismos que generan y utilizan biopolímeros como moléculas de almacenamiento tales como los polihidroxialcanoatos (PHAs) (Jendrosseck y Handrick, 2002), hasta la obtención de enzimas bacterianas capaces de degradar polímeros sintetizados por el ser humano tales como el poliuretano (PUR) (Akutsu *et al.*, 1998).

El estudio de la degradación de poliuretano ha permitido el aislamiento de varias especies bacterianas capaces de usarlo como fuente de carbono, tales como *Comamonas acidovorans* TB-35 (Nakajima-Kambe

et al. 1995), *Pseudomonas chlororaphis* (Howard *et al.* 1999) y *Pseudomonas fluorescens* (Howard y Blake, 1998), entre otras. Por otra parte, el aislamiento de dichas especies ha hecho posible la purificación de enzimas que degradan el poliuretano entre las que se encuentran esterasas, lipasas y proteasas (Akutsu *et al.* 1998, Rowe y Howard, 2002, Howard y Blake, 1998)

El estudio de microorganismos que degradan PUR representa un campo de investigación que permitirá el desarrollo de infraestructura para el tratamiento de desechos industriales. La purificación y caracterización de actividades enzimáticas asociadas al crecimiento de estos microorganismos en PUR, permitirá entender los mecanismos a través de los cuales el PUR es degradado en la naturaleza.

II. ANTECEDENTES

1. Poliuretano: origen, composición y usos.

El poliuretano (PUR), polímero derivado de la condensación de poliisocianato y polioles de tipo poliéster o poliéter, es un material ampliamente usado en la industria. Los poliuretanos contienen en su estructura principal grupos carbamato -NHCOO- , también denominados grupos “uretano”. Los materiales usados para la síntesis de poliuretano (figura 1) son poliisocianatos, polioles, catalizadores y materiales auxiliares tales como agentes de entrecruzamiento. Los poliisocianatos más usados son el tolilendiisocianato (TDI) y el 4,4-metilen-bis-(fenil-diisocianato) (MDI) (Tabla 1). Entre los polioles usados se encuentran los poliésteres (PS) y los poliéteres (PE), en cuyo caso se obtiene poliuretano-poliéster (PS-PUR) y poliuretano-poliéter (PE-PUR), respectivamente (Urlich, 1997).

La rápida formación de polímeros de uretano de alto peso molecular a partir de monómeros líquidos, proceso que transcurre a menudo a temperatura ambiente, es una característica única del proceso de síntesis de PUR que genera productos que incluyen desde fibras lineales y elastómeros hasta redes entrecruzadas. Debido a lo anterior, las características del PUR varían en función de su composición, lo que determina su clasificación de ligero a duro. El PUR ligero o de tipo espuma se logra a partir de la adición de pequeñas cantidades de solvente durante el proceso de síntesis, ya que la reacción exotérmica produce la evaporación del mismo, el cual queda atrapado dentro del PUR. Por otra

parte, la obtención de poliuretano duro se logra a partir de diisocianatos con grupos aromáticos o polioles ramificados (Urlich, 1997).

Tabla 1. Materias primas usadas en la fabricación de PUR.

Poliisocianato	2,4 tolilendiisocianato (2,4-TDI) 2,4-TDI/2,6-TDI (mezcla 80:20) 4,4'-difenilmetanodiisocianato 1,3-Xililendiisocianato Hexametilendiisocianato 1,5-Naftalendiisocianato
Polioles Tipo poliéster	Poli(butilen adipato) Poli(etilen butilen adipato) Poli(etilen adipato) Policaprolactona Poli(propilen adipato) Poli(etilen propilen adipato)
Tipo poliéter	Poli(oxitetrametilen)glicol Poli(oxipropilen)glicol Poli(oxipropilen)-co-poli(oxietilen)glicol
Agentes de entrecruzamiento y extensores	1,4-Butanodiol Etilenglicol 1,3-Butanodiol 2,2-dimetil-1,3-propanodiol Trimetilolpropano Glicerol 1,2,6-Hexanotriol

La sustitución de madera o metal por polímeros fácilmente moldeables obtenidos a bajo costo implica un uso eficiente de otros recursos naturales, ya que evita la tala de árboles y el uso de recursos no renovables. El uso de materiales de PUR, algunos de los cuales se enlistan en la tabla 2, va desde la fabricación de plásticos para materiales de empaque hasta recubrimiento en autos, industria en la cual encuentran su uso principal (Urlich, 1997).

Tabla 2. Usos de los distintos tipos de PUR.

Espumas de PUR	Muebles Asientos en autos Materiales con retardantes antifuego
PUR semirígido	Tableros de autos y otras autopartes que ayudan a disminuir la vibración
Tipo CASE (siglas de Coating, Adhesives, Sealants and Elastomers)	Pinturas Resinas para recubrimiento Pegamentos Plásticos Textiles

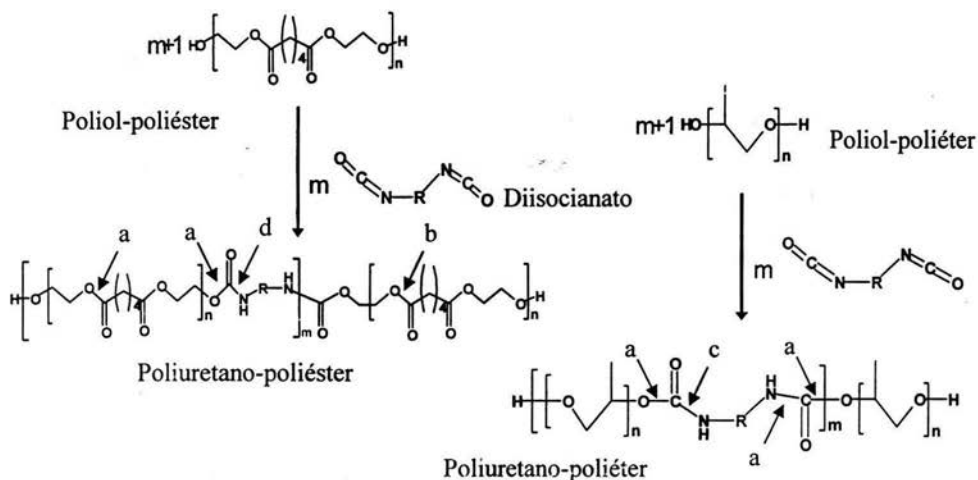


Figura 1. Síntesis de poliuretano y posibles sitios de ataque enzimático. Los átomos en negritas muestran el enlace uretano. Las letras indican los posibles sitios de ataque de enzimas: a) esterasas, b) lipasas, c) ureasas y d) proteasas

2. Disposición de desechos de PUR

Un problema asociado a la producción de PUR es la generación de grandes cantidades de desechos de este material considerado no biodegradable, lo que ha provocado una gran preocupación en empresas y gobiernos por la contaminación que el mismo genera. La tabla 3 enlista algunos de las organizaciones involucradas en el estudio de los desechos

de PUR para su posible reutilización o disposición final. Cabe resaltar el hecho de que los esfuerzos realizados se llevan a cabo principalmente en países industrializados.

Tabla 3. Organizaciones involucradas con el reciclado de PUR.

Estados Unidos	Polyurethane Recycle and Recovery Council Alliance for the Polyurethanes Industry
Europa	ISOPA
Japón	Japan Urethane Institute Recycle Comité
Alemania	EWvK (Asociación para el desarrollo y recuperación de plásticos)

Algunos métodos de reciclado de PUR incluyen el uso de desechos del mismo en la fabricación de zapatos u hojuelas para su uso en máquinas de moldeo por inyección. Otros usos incluyen la obtención de PUR en hojuelas para su uso en derrames químicos o la reacción con MDI para la producción de materiales de recubrimiento en gimnasios o embarcaciones marítimas. Otros procesos poco rentables incluyen la glicólisis química con el fin de obtener los monómeros para su posterior reutilización, la pirólisis en presencia de oxígeno con el fin de utilizar la energía calorífica liberada, o la pirólisis en presencia de hidrógeno a fin de obtener combustibles de menor peso molecular (Urlich, 1992).

3. Plásticos biodegradables y biodegradación de plásticos.

A partir de la aparición de los plásticos, la vida del ser humano se ha vuelto más sencilla a un alto costo para la naturaleza. Aproximadamente 140 millones de toneladas de polímeros sintéticos se generan al año en todo el mundo. Se reconoce como un grave problema de contaminación la presencia de desechos plásticos sólidos y polímeros sintéticos en las aguas de desecho (Shimao, 2001). Al margen de determinar si es prioridad fabricar polímeros biodegradables o biodegradar los polímeros existentes un hecho es que el estudio de biodegradabilidad de los primeros puede dar

una visión clara del mecanismo involucrado en el proceso de biodegradación de los segundos.

a) Poli-hidroxi-alcanoatos (PHAs).

Los polihidroxialcanoatos (PHAs) son polímeros naturales sintetizados por algunas bacterias, que se han propuesto como moléculas útiles en la producción de polímeros biodegradables. Los PHAs son moléculas estructuralmente simples, sintetizadas por muchas bacterias gram-positivas y gram-negativas. Estos son acumulados como gránulos discretos que representan hasta el 90% del peso seco de la bacteria. Al parecer, actúan como "almacenes" de carbono y moléculas con capacidad reductora; sin embargo, ya se han descubierto otros aspectos relacionados con su regulación ante situaciones de estrés. Cuando la célula se encuentra ante un desequilibrio en el suministro de nutrientes, es ventajoso para ella almacenar intracelularmente el exceso de los mismos y, por otra parte, al transformar compuestos normalmente solubles en polímeros insolubles, su presión osmótica no se ve afectada, evitando así la salida de los mismos. Además, los nutrientes se encuentran disponibles a un costo de mantenimiento relativamente bajo y con un retorno seguro de la energía invertida (Jendrosseck y Handrick, 2002).

Cuando son extraídos, los PHAs muestran propiedades similares a plásticos comunes, como el polipropileno, con la ventaja de que, al ser de origen bacteriano, pueden ser degradados por una amplia variedad de microorganismos (Madison y Huisman 1999). Las enzimas que degradan PHA, denominadas PHA-depolimerasas, son esterases del tipo serina-hidrolasas. En general, las secuencias estudiadas contienen cuatro regiones: una secuencia señal de secreción, un dominio catalítico que contiene una "caja" de lipasa, un dominio de unión a sustrato que actúa

como sitio de absorción para sustratos poliméricos y un dominio que se une a los sitios de unión y catalíticos (Shimao, 2001).

b) Biodegradación de PUR

Intentos recientes por generar PUR biodegradable contrastan con aquellos orientados a obtener materiales con menor capacidad de biodegradación, y aunque el fin es distinto, los estudios han ayudado a determinar algunos procesos relacionados con la biodegradación de un material inicialmente considerado no biodegradable (Lee, 2002; Anderson, 1998, Kay *et al.* 1993). Por ejemplo, se sabe que el PS-PUR es más susceptible al deterioro microbiano que el PE-PUR (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999). Existen reportes de degradación microbiana del PUR, especialmente debida a hongos, aunque la degradación por parte de bacterias es la más estudiada. Entre los hongos involucrados se sabe que cepas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Aerobasidium pullulans*, *Trichoderma sp.* y *Chaetomium globosum*, pueden degradar diferentes tipos de poliuretanos (Crabe *et al.*, 1994, Darby y Kaplan, 1968, Pathirana y Seal, 1983). Entre las bacterias reportadas como capaces de atacar PUR se encuentran cepas de *Commamonas acidovorans*, *Pseudomonas sp.*, *Corynebacterium sp.* y *Enterobacter agglomerans* (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995, Howard y Blake, 1998, Kay *et al.* 1991) (tabla 4).

La cepa bacteriana *Commamonas acidovorans* TB35 ha sido la única especie microbiana reportada capaz de atacar PUR como única fuente de carbono (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). En contraste, la degradación de PUR por hongos requiere la adición de varios nutrientes orgánicos al medio de cultivo y hasta el momento no se han descrito casos de hongos que puedan utilizar el PUR como única fuente de carbono (Stern y Howard, 2000; Allen *et al.*, 1999).

4. Actividades enzimáticas asociadas a la degradación del poliuretano.

Debido a que las características fisicoquímicas del PUR difieren en gran medida en función de su composición, es difícil comparar las actividades que degradan PUR provenientes de diferentes microorganismos, ya que el tipo de PUR utilizado por cada investigador para probar la actividad enzimática es diferente (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

Tabla 4. Microorganismos involucrados con la degradación de PUR y actividades enzimáticas asociadas.

Microorganismo	Tipo de PUR	Actividad Enzimática
Hongos		
<i>Aspergillus niger</i>	PS, PE	Desconocida
<i>A. flavus</i>	PS, PE	Desconocida
<i>A. fumigatus</i>	PS	Esterasa
<i>A. versicolor</i>	PS, PE	Desconocida
<i>Aereobasidium pullulans</i>	PS, PE	Desconocida
<i>Chaetomium globosum</i>	PS, PE	Desconocida
<i>Cladosporium sp.</i>	PS	Desconocida
<i>Curvularia senegalensis</i>	PS	Esterasa*
<i>Fusarium solani</i>	PS	Desconocida
<i>Gliocladium roseum</i>	PS	Esterasa, proteasa, ureasa
<i>Penicillium citrinum</i>	PS	Esterasa, proteasa, ureasa
<i>P. funiculosum</i>	PS, PE	Desconocida
<i>Trichoderma sp.</i>	PS, PE	Desconocida
Bacterias		
<i>Commamonas acidovorans</i>	PS	Esterasa*
<i>Corynebacterium sp.</i>	PS	Esterasa
<i>Enterobacter agglomerans</i>	PS	Desconocida
<i>Serratia rubidaea</i>	PS	Desconocida
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	PS	Desconocida
<i>P. chlororaphis</i>	PS	Esterasa, proteasa, lipasa
<i>P. fluorescens</i>	PS	Esterasa, proteasa, lipasa
<i>Bacillus subtilis</i>	PS	Lipasa (?)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	PE	Desconocida

PS, poliuretano-poliéster; PE, poliuretano-poliéter.* enzimas que han sido purificadas. (Adaptado de Nakajima-Kambe *et al.*, 1999; Howard, 2002)

Se ha reportado que las actividades enzimáticas que podrían atacar el poliuretano son esterases, lipasas, proteasas y ureasas (figura 1 y tabla

4). El proceso de degradación microbiana de PUR puede ser dividido de manera general en dos tipos: degradación de los enlaces uretano y degradación de los segmentos poliol, principales constituyentes del PUR. Sin embargo, la degradación del poliol depende de la estructura química de los segmentos de éste, ya sea de tipo poliéster o poliéter.

La hidrólisis del enlace uretano se debe a una enzima de tipo esterasa, pero esta hidrólisis sólo es observada en productos de bajo peso molecular, y aunque existen reportes de degradación de enlaces uretano en PUR, no es claro si éstos son hidrolizados directa o posteriormente a una ruptura para producir compuestos de bajo peso molecular. Con relación a la hidrólisis de los polioles, se sabe que el PS-PUR posee muchos enlaces vulnerables a la hidrólisis y que los hongos son los mejores efectores conocidos en la degradación de este tipo de compuestos (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

a) Proteasas.

Darby y Kaplan (1968) reportaron que especies fúngicas se encuentran involucradas con la degradación de PUR, pero fueron Pathirana y Seal (1983) quienes determinaron las actividades involucradas en la degradación microbiana del polímero. Ellos reportaron actividades de proteasa en especies de *Chaetomium globosum*, *Gliocladium roseum* y *Penicillium citrinum*, pero no se tiene informes de purificación de estas enzimas ni de la determinación de sus propiedades bioquímicas o moleculares.

Santerre *et al.* (1994) describieron, a partir de un estudio de mejoramiento de poliuretano con fines médicos, que enzimas hidrolíticas tales como la colesterol-esterasa eran capaces de atacar el poliuretano *in vitro*. Howard y Blake (1998) fueron los primeros en identificar una actividad extracelular de proteasa en *P. fluorescens* y posteriormente Ruiz

y Howard (1999) describieron sus características a partir de la enzima purificada. Más adelante, Ruiz *et al.* (1999) reportan una actividad de proteasa detectada en *P. chlororaphis*, aunque no se ha descrito su purificación.

b) Ureasas.

Pathirana y Seal (1983) detectaron actividades de tipo ureasa presentes en la degradación de PUR por parte de hongos. No existen reportes de actividades de este tipo detectadas en bacterias y hasta ahora no se ha reportado la purificación de enzimas de este tipo capaces de degradar PUR (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

c) Esterasas y lipasas.

La mayor parte de las enzimas degradadoras de PUR reportadas (tabla 5) corresponden a esterasas y lipasas. Parece lógico, si recordamos que el PS-PUR es más susceptible a ser biodegradado que el PE-PUR. Por otra parte, los enlaces éster se encuentran presentes en muchos polímeros naturales que son fácilmente degradados por esterasas (Shimao, 2001).

En los estudios de biodegradación se ha usado desde poliuretano en cubos sintetizado en el laboratorio (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995) hasta resina coloidal de uso común (Howard *et al.*, 1998, 1999, 2001). Debido a que la estructura química de un polímero como éste puede ser muy variada, los resultados entre los distintos grupos pueden no ser comparables.

Tabla 5. Propiedades bioquímicas de enzimas capaces de atacar el poliuretano.

Enzima (a)	Microorganismo	Localización	M _r kDa	pH ÓPTIMO	K _m mM (b)	V _{max} U/mg (b)	PUR _{USADO} (c)	Inhibidores (d)	Observación	Referencia (e)
Esterasa	<i>C. acidovorans</i> cepa TB35	Unida a la membrana	62	6.5	-	-	Cubos	dBIGCHAP (0.04%)	T _{opt} =45°C Monómero	1,2
Esterasa (CBS)(f)	<i>C. acidovorans</i> cepa TB35	Extracelular	62	6.5	-	-	Cubos	-	T _{opt} =45°C	2
Esterasa (pudA)	<i>C. acidovorans</i>	Extracelular	42	7.0	51.5	180	Coloidal	PMSF, ITS	-	6
Esterasa (pueB)	<i>P. chlororaphis</i>	Extracelular	31	8.5	-	-	Coloidal	PMSF	-	7, 9
Lipasa (pueA)	<i>P. chlororaphis</i>	Extracelular	63	8.5	-	-	Coloidal	PMSF	-	7, 8
Esterasa (pulA)	<i>P. fluorescens</i>	Extracelular	48	7.0	-	-	Coloidal	PMSF	-	3, 5
Proteasa (pulB)	<i>P. fluorescens</i>	Extracelular	29	5.0	-	-	Coloidal	ITS, PMSF, Cu ²⁺ , Mn ²⁺ , Zn ²⁺	Posible tetrámero	3, 4
Lipasa	<i>B. subtilis</i>	Extracelular	28	-	-	-	Coloidal	-	-	10

- Las letras en paréntesis representan el nombre que se ha asignado en los artículos. (CBS: *culture broth secreted* o "secretada al medio de cultivo")
- La determinación de K_m y V_{max} se realizó con el método de hidrólisis de acetato de p-nitrofenilo. Una unidad de esterasa fue definida como la cantidad de enzima que libera 1 μmol de PNP por minuto.
- El PUR en cubos corresponde a PUR sintetizado a partir de adipato de poli(dietilenglicol) y 2,4-TDI, usado en los trabajos de Nakajima-Kambe *et al.* (1999). El PUR coloidal es el Impranil® usado en los trabajos del grupo de Howard *et al.*, (1999)
- Los inhibidores son: PMSF = fenil-metil-sulfonil-fluoruro; ITS = inhibidor de tripsina de soya, dBIGCHAP = *N,N*-bis(3-D-gluconamidopropil)desoxi-col-amida.
- Las referencias corresponden a: 1) Akutsu *et al.*, 1998, 2) Shigeno-Akutsu *et al.*, 1999, 3) Howard y Blake 1998, 4) Ruiz y Howard, 1999, 5) Vega *et al.*, 1999, 6) Allen *et al.*, 1999, 7) Ruiz *et al.*, 1999, 8) Stern y Howard, 2000, 9) Howard, *et al.*, 2001, 10) Rowe y Howard, 2002.
- CBS: secretada al medio de cultivo.

En *Comamonas acidovorans* cepa TB35 se han descrito dos esterases: una extracelular y otra unida a la membrana. La pérdida de peso promedio en el ensayo de actividad enzimática sobre PS-PUR en cubo de la enzima unida a membrana fue diez veces mayor (1.3 mg) en comparación con la obtenida con la actividad extracelular (0.1 mg) (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). Ambas enzimas, que ya han sido purificadas, atacan la porción éster del poliuretano, pero la que se encuentra unida a la membrana ataca el poliuretano y la que se secreta al medio sólo ataca los segmentos de poli (adipato de polietilenglicol). Por otro lado, la hidrofobicidad de la enzima secretada al medio es menor que la que se encuentra unida a la membrana. Shigeno-Akutsu *et al.*, (1999) han propuesto que la enzima unida a la membrana es procesada previamente a su liberación al medio extracelular. Un hecho que soporta la afirmación anterior es que una cepa de *E. coli* que tiene insertado el gen de la esterasa expresa una esterasa extracelular y otra unida a la membrana. (Shigeno-Akutsu *et al.*, 1999, Nomura *et al.* 1998).

Se han aislado los genes *pueA* que codifica una lipasa (Stern y Howard, 2000) y el gen *pueB* que codifica una esterasa (Howard, *et al.*, 2001) de *Pseudomonas chlororaphis* capaces de atacar el poliuretano. Adicionalmente se han determinado las características bioquímicas de una esterasa obtenida de *Comamonas acidovorans* (Allen *et al.*, 1999) y a últimas fechas se han identificado varios genes que codifican enzimas con actividad de lipasa en *Bacillus subtilis* (Rowe y Howard, 2002) y *Pseudomonas fluorescens* (Howard y Blake 1998, Ruiz y Howard, 1999), todos ellos asociados con actividad poliuretanolítica (Nomura *et al.* 1998).

El gen de la esterasa de *P. fluorescens* ha sido clonado observándose que presenta una secuencia consenso de serina-hidrolasa (GXSGX) (Vega *et al.*, 1999). El gen fue clonado y expresado en *E. coli* encontrando que la enzima se excreta al medio y es inhibida por PMSF. Su secuencia es

semejante a lipasas de *P. fluorescens* y *S. marcescens*, las cuales, sin embargo, no son capaces de utilizar el PUR (Ruiz y Howard, 1999).

Tabla 6. Genes que codifican enzimas bacterianas que degradan PUR

<i>Gen</i>	<i>Microorganismo</i>	<i>Actividad</i>	<i>Referencia</i>
<i>pudA</i>	<i>C. acidovorans</i>	Esterasa	Allen <i>et al.</i> , 1999
<i>pulB</i>	<i>P. fluorescens</i>	Proteasa	Ruiz and Howard, 1999
<i>pulA</i>	<i>P. fluorescens</i>	Esterasa	Howard and Blake, 1998
<i>pueA</i>	<i>P. chlororaphis</i>	Lipasa	Stern y Howard, 2000
<i>pueB</i>	<i>P. chlororaphis</i>	Esterasa	Howard <i>et al.</i> , 2001
<i>lipB</i>	<i>B. subtilis</i>	Lipasa (?)	Rowe and Howard, 2002

5. Mecanismo de acción de esterases que atacan polímeros.

El mecanismo de acción de esterases que pueden atacar poliuretano aún se desconoce. Sin embargo, se ha estudiado la actividad de una esterasa de *C. acidovorans* TB-35, comparándola con la actividad de la PHA depolimerasa, la cual degrada el PHA. Esta enzima tiene un dominio hidrofóbico de unión a la superficie del polímero y un dominio catalítico que lleva a cabo la degradación de PHA. Se ha sugerido que esta degradación es realizada a través de dos pasos: el primero es una adsorción de la enzima sobre la superficie a través del dominio de unión, y el segundo paso es la hidrólisis del enlace éster. La reacción catalizada por esta enzima es inhibida por un exceso de la misma enzima, por lo que se ha propuesto el modelo de la figura 4. Cuando hay un exceso de enzima, el sitio catalítico no puede alcanzar la superficie del PHA por lo que la reacción es inhibida, fenómeno que no ocurre con la esterasa de *C. acidovorans* TB-35, lo que sugiere que en esta enzima el sitio catalítico y el sitio de unión podrían estar muy cercanos uno del otro (Kasuya *et al.*, 1997; Akutsu *et al.*, 1998).

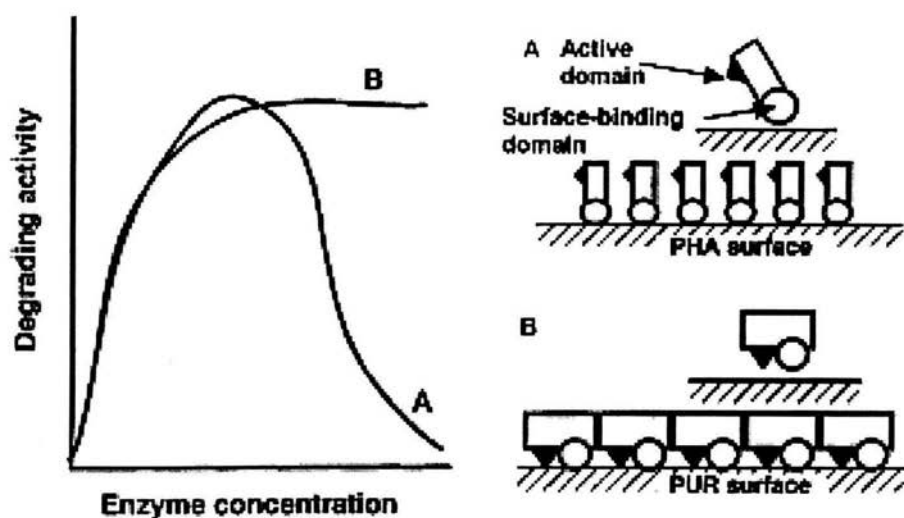


Figura 2. Modelo propuesto para el ataque de la PHA-depolimerasa y la esterasa de *C. acidovorans*. Ataque sobre a) PHA por parte de la PHA-depolimerasa y b) Esterasa de *C. acidovorans* TB35 sobre el poliuretano. (Tomado de Nakajima Kambe *et al.*, 1999).

IV. HIPÓTESIS

Microorganismos aislados de PUR en proceso de deterioro podrán crecer en medios de cultivo en el que este polímero sea la única fuente de carbono debido a que algunas enzimas tales como proteasa, ureasa, esterasa o lipasa les permiten degradarlo.

V. OBJETIVOS

- Aislar bacterias capaces de crecer en PUR como única fuente de carbono, seleccionar las que presenten mayor crecimiento e identificarlas.
- Determinar los compuestos químicos que forman parte de la resina de poliuretano (PURh) (Hydroform®) .
- Determinar la presencia de actividades enzimáticas que pudieran degradar el PURh (proteasa, ureasa, esterasa, lipasa), cuando éste se emplea como única fuente de carbono en el medio de cultivo.
- Caracterizar la(s) actividad(es) enzimática(s) detectadas (K_m , V_{max} , temperatura y pH óptimo de actividad).

VI. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

La estrategia experimental seguida fue la siguiente: (figura 3)

- a) Toma de muestra a partir de muestras en deterioro en basureros.
- b) Cultivo líquido simultáneo por duplicado en medio basal más Hydroform® con el fin de enriquecer las muestras en bacterias poliuretanolíticas. La incubación se realizó a 28 y 37 °C en un lapso de 5 días. El medio basal es un medio mineral que permite probar varios compuestos como fuente de carbono, lo que lo hace más selectivo en el aislamiento de bacterias que tienen la capacidad de asimilar un sustrato en particular. Por otro lado, el Hydroform® es una resina de tipo poliuretano alifático hidrosoluble que tiene la capacidad de ser suspendida en el medio de cultivo sin generar turbidez, además de tratarse de un poliuretano de uso comercial, distribuido por la empresa Polyform®. De acuerdo a los datos proporcionados por la empresa, este producto es el equivalente a aquel usado en el trabajo de Howard y Blake (1998) para el aislamiento de las bacterias poliuretanolíticas. En el anexo 4 se encuentran las especificaciones proporcionadas por el proveedor.
- c) Siembra para aislamiento en agar medio basal más Hydroform® (MB+PURh). Ocasionalmente se sembraron las colonias aisladas en medio LB para mantenerlas viables a temperatura ambiente y en cultivo axénico que posteriormente fue enviado a identificación en el cepario de la Facultad de Química.

- d) Resiembra de cepas en medios diferenciales para identificación de actividades enzimáticas producidas por las bacterias: ureasas (Urea de Christensen), para actividad de proteasas (medio YES) y para identificación de lipasas (medio Tween 80®) (Atlas, 1993). El medio YES ha sido útil en el aislamiento de bacterias poliuretanolíticas (Howard y Blake, 1998). Sin embargo, es un medio que contiene gelatina y extracto de levadura en su formulación, además de Hydroform®. La gelatina y el extracto de levadura pueden funcionar como fuentes de carbono para algunas especies de microorganismos lo que hacen de éste un medio rico que puede soportar el desarrollo de microorganismos, no necesariamente poliuretanolíticos.
- e) Análisis de la resina PURh por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) para determinar su composición química.
- f) Cultivo en medio líquido MB+PURh para determinación del tipo de actividad enzimática en el sobrenadante del medio de cultivo, empleando ensayos colorimétricos. Las pruebas enzimáticas que se montaron fueron para la determinación de ureasa, proteasa, y esterasa
- g) Cultivo de las cepas poliuretanolíticas en medio basal utilizando como fuente de carbono los compuestos obtenidos por destilación al vacío de la resina PURh.
- h) Determinación de los parámetros cinéticos de la actividad encontrada en el sobrenadante del cultivo con la bacteria capaz de utilizar PUR como fuente de carbono.

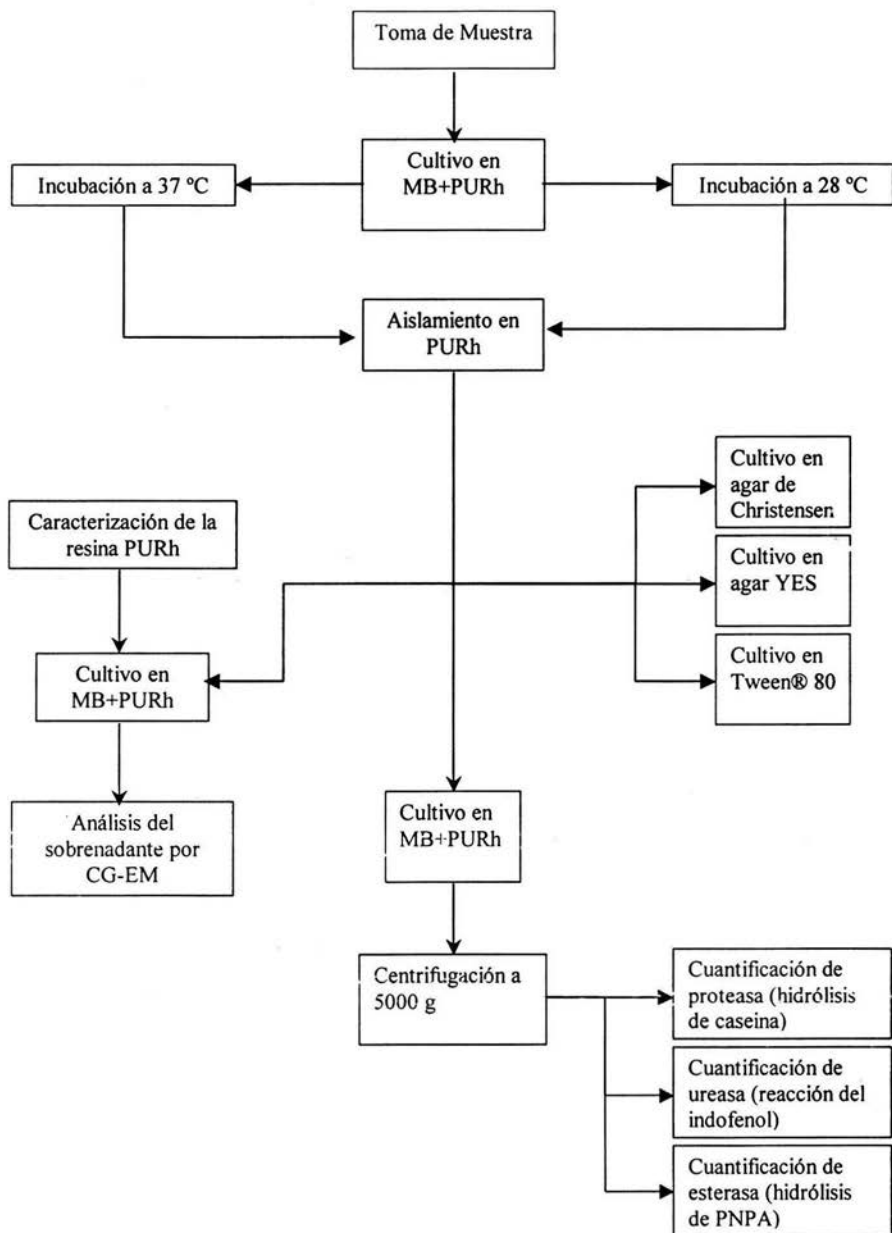


Figura 3. Diagrama de flujo de la estrategia experimental.

VII. MATERIALES Y MÉTODOS

1. Origen y procesamiento de muestras

Las muestras de poliuretano se colectaron de distintos residuos encontrados en sillones y en el suelo en varias partes del basurero Bordo de Xochiaca, ubicado en el municipio de Nezahualcóyotl, Estado de México, a partir de hule espuma de sillones en proceso de deterioro, así como de poliuretano encontrado en el suelo. Las muestras fueron transportadas en bolsas tipo Ziploc®. En el caso de muestras sumergidas en el agua también se colectó un poco del agua en que fueron encontradas. Las muestras fueron obtenidas en invierno y la temperatura promedio de la zona no superaba los 30°C. Las muestras se inocularon el mismo día de la colecta. Se colectaron 9 muestras.

2. Aislamiento de organismos con capacidad de crecer en poliuretano

Las muestras colectadas se inocularon por duplicado en matraces con medio basal más poliuretano hidrosoluble marca Hydroform® (MB-PURh) de acuerdo al enfoque usado por Nakahima-Kambe *et al.*, (1995). La formulación de los medios se detalla en el anexo I. Una serie de matraces fueron incubados a 37°C y otra a 28°C, a 200 rpm durante 5 días, en el transcurso de los cuales se tomaron muestras para siembra en Agar

MB+PURh para aislamiento de los microorganismos. Se incubaron las cajas durante 48 hrs a 37°C y 28 °C.

3 Caracterización del crecimiento bacteriano en medio líquido con PURh

Se inoculan las cepas en 10 ml de medio MB+PURh líquido, y se incuba a 37 °C y 200 rpm por 16-24 hrs o hasta que el cultivo alcanza absorbencia a 660 nm igual a 1.0. Se toma una muestra de 1 ml y se inocula un matraz con 50 ml de medio de cultivo MB+PURh nuevo. Esto representa una dilución al 2%.

4. Identificación de actividades producidas utilizando medios diferenciales

Se inocularon cajas con medio YES, Urea de Christensen y Tween® 80 (ver anexo I). Se cultiva en cada uno y se observan las características macromorfológicas de las cepas para determinar la actividad presente en dicha cepa.

a) Siembra en medio YES para identificación de proteasa

Fundamento

El colorante azul de Coomassie se une al poliuretano, tiñéndolo de azul. La gelatina presente en el medio también se une al colorante. Cuando el poliuretano o la gelatina son degradados no se observa coloración alrededor de la colonia con capacidad de degradar tales

sustratos, observándose un halo de decoloración (Howard y Hilliard, 1999)

Método

1. Incubar las placas con medio YES con poliuretano (ver preparación de medios), sembradas con el microorganismo del que se desea conocer si presenta actividad, durante 2 a 5 días.
2. Adicionar sucesivamente a las placas una solución de azul de coomassie R-250 al 0.1% [30 minutos], metanol absoluto [20 minutos] y ácido acético al 10% [20 minutos].
3. Observar los halos de degradación bajo un fondo azul. Se considera que existe degradación cuando se observa un halo claro que no es teñido con el azul de Coomassie alrededor de las colonias.

b) Siembra en Agar Urea de Christensen.

Se inocularon las colonias en Agar Urea de Christensen (ver formulación en anexo I). El medio contiene rojo de fenol, un indicador que vira a rojo al aumentar el pH debido a la presencia del amonio liberado durante la acción de la ureasa sobre el sustrato. Las cajas fueron incubadas a 37 °C durante 24 a 48 hrs (Atlas, 1993).

c) Siembra en Agar Tween® 80.

El ensayo cualitativo para la actividad de lipasa se realizó por siembra en agar Tween 80® (monooleato de polietilenglicolsorbitan), cuya formulación se encuentra en el anexo I. La hidrólisis del Tween 80® produce compuestos que reaccionan con el calcio contenido en el medio y generan un halo de precipitación alrededor de las cepas productoras de esterasas de tipo lipasa (Gupta, 2003).

5. Caracterización de la resina PURh

Los componentes de la resina fueron separados por destilación al vacío. Las fracciones líquidas fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM). El residuo sólido fue enviado a análisis de infrarrojo y resonancia magnética nuclear (^2H -RMN y ^{13}C -RMN). La interpretación de los resultados fue realizada por el M. en C. Néstor Noé López Castillo y la M. En C. Brenda Porta Briseño del laboratorio del Dr. Javier Cruz Gómez, del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química, UNAM.

6. Identificación de actividades enzimáticas en el sobrenadante del medio de cultivo

La determinación de actividad en el sobrenadante sin concentrar se realizó a partir del obtenido al centrifugar a 5000 *g* durante 5 minutos para separar las células. En caso de no detectarse actividad, la muestra era concentrada usando un sistema Centricón® de corte a 10 kDa y 5000 *g* hasta obtener una reducción en el volumen de hasta 10 veces.

a) Determinación de actividad de proteasa por ensayo en pozos

Fundamento

El azul de Coomassie se une a proteínas. La degradación de éstas se detecta por pérdida de la coloración (Lovrien y Matulis, 1995). La actividad proteasa puede ser detectada colocando una muestra de cultivo libre de células, en pozos hechos en geles de agarosa con gelatina que posteriormente puede ser teñido con azul de Coomassie. Un halo transparente alrededor de los pozos es indicativo de degradación de la gelatina del medio (Howard y Hilliard, 1999)

Método

1. Pegar por el costado y el derredor de una placa de vidrio (20 x 20 cm), cinta adhesiva, con el fin de formar un "recipiente".
2. Preparar una solución que contenga 50 mL de buffer fosfatos (50 mM pH 7.0), 750 mg de agarosa y 50 mg de gelatina. Calentar agitando hasta disolver. Vaciar sobre el vidrio y dejar solidificar.
3. Con el reverso de una punta plástica para pipeta realizar perforaciones sobre el gel y succionar con una jeringa (o con una manguera conectada a una trampa de vacío), para producir los pozos donde se adicionará la muestra
4. Adicionar a cada pozo los microlitros de sobrenadante de medio de cultivo o Solución de Proteinasa K (GIBCO BRL no. cat. 5530UA) 10mUA/mL, como control. Elaborar una curva patrón de proteína soluble de albúmina sérica bovina (fracción V, GIBCO LABORATORIES No. Cat. 810-1018IM)
5. Incubar durante 16 horas a 37°C en cámara húmeda.
6. Adicionar sucesivamente a las placas una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.1% [30 minutos], metanol absoluto [20 minutos] y ácido acético al 10% [20 minutos].
7. Observar los halos de degradación bajo un fondo azul.

b) Determinación de actividad de proteasa por acción sobre caseína

Fundamento

Los péptidos pequeños, producto de degradación de proteínas de mayor tamaño por acción de proteasas, son solubles en ácido tricloroacético y pueden ser separados y cuantificados por absorbencia a 280 nm o teñidos por el método de Folin-Ciocalteu (Lovrien y Matulis, 1995).

Método

1. Sustrato de caseína: un gramo de caseína en 5 mL de agua. Adicionar 4 mL de hidróxido de sodio 1.0 N y agitar hasta disolver la caseína. Adicionar 5 mL de buffer de fosfatos 1M, pH 7.5 para clarificar la solución. Ajustar con HCl, 1M a pH 7.5 y aforar a 100 mL.
2. Colocar 500 µL de sustrato en tubos y preincubar a 37 °C durante 3 minutos.
3. Al tiempo 0 adicionar a los tubos de muestra 100 µL de enzima e incubar durante 10 minutos a 37 °C. Dejar un tubo blanco sin enzima. A fin de montar el protocolo experimental, se usó como control positivo Proteinasa K fúngica (GIBCO BRL no. cat. 5530¹JA)
4. Adicionar 500 µL de solución de ácido tricloroacético a todos los tubos y mezclar en vortex. Adicionar al blanco 100 µL de enzima.
5. Leer absorbencia a 280 nm contra el blanco de reacción.
6. Preparar una curva patrón de proteinasa K partiendo de una solución de 10 mUA/mL y preparando un blanco para cada muestra. Elaborar una curva de proteína soluble de albúmina sérica bovina.

c) Determinación de actividad de ureasa por el método del indofenol

Fundamento

El ensayo *in vitro* se basa en la producción de indofenol a partir de la reacción del amonio con el fenol en presencia de hipoclorito y nitroprusiato de sodio. El ensayo colorimétrico es leído a 639 nm. Se determina el amonio liberado interpolando en una curva patrón elaborada con diferentes concentraciones de cloruro de amonio (Witte y Medina-Escobar, 2001)

Método

1. ES IMPORTANTE EL USO DE GUANTES EN TODO MOMENTO, a fin de evitar contaminación en el tubo de reacción.
2. Preparación del reactivo de hipoclorito de sodio: Disolver 2.96 g de NaOH en 140 mL de agua. Adicionar 29.74 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{ H}_2\text{O}$, agitar hasta disolución total y adicionar 16.6 mL de solución comercial de hipoclorito de sodio de 12%. Ajustar el pH a 12 con solución de NaOH y ajustar el volumen a 200 mL.
3. Colocar en tubos eppendorf 180 μL de solución buffer de fosfatos (50 mM, pH 7.0) y 100 μL de solución de urea (5 M en buffer fosfatos 50 mM pH 7.0). Preincubar a 37 °C durante 3 minutos. Preparar un blanco por cada tubo de muestra con sustrato y buffer y preincubar el mismo tiempo.
4. Al tiempo 0 adicionar a los tubos de muestra 20 μL de extracto enzimático. NO ADICIONAR el extracto enzimático a los tubos correspondientes al blanco de reacción. Tapar los tubos e incubar 3 minutos. Se usó como control positivo el sobrenadante de cultivo de *Proteus vulgaris* ureasa positivo (cepa obtenida del cepario de la Facultad de Química) en medio con urea, concentrando la muestra en Cetrincón® 10 Kda y lavando con buffer fosfatos.
5. Después del período de incubación, agitar en vortex e inmediatamente adicionar 100 μL de reactivo de fenol (solución acuosa de fenol al 7% y nitroprusiato de sodio al 0.034%). Después de adicionar el fenol, adicionar el extracto enzimático SOLO A LOS TUBOS CORRESPONDIENTES AL BLANCO.
6. Adicionar inmediatamente a todos los tubos 200 μL de reactivo de hipoclorito de sodio y tapar de inmediato. Agitar en vortex.
7. Colocar en baño maría a 50 °C durante 20 minutos

8. Determinar la concentración de amonio liberado por absorbencia a 639 nm. (Espectrofotómetro UV-VIS Ultrospec 2000, de PHARMACIA BIOTECH)
9. Elaborar una curva patrón con 200 μ L de soluciones stock de cloruro de amonio a 20, 50, 100, 200 y 400 μ M, adicionando los reactivos de fenol e hipoclorito e incubando como se mencionó anteriormente.

d) Determinación de actividad de esterasa por el método de hidrólisis del paranitrofenilacetato (PNPA) (Howard y Blake, 1998)

Fundamento

La hidrólisis del acetato de p-nitrofenilo (PNPA) genera los productos acetato y p-nitrofenol, el cual provoca un aumento en la absorbencia a 405 nm. La reacción es catalizada por esterasas como carboxilesterasas y lipasas (Howard y Blake, 1998) El uso de solventes polares ayuda a la disolución del PNPA.

Método

1. Reactivo de paranitrofenilacetato (PNPA): Preparar una solución de acetato de paranitrofenol (Sigma no. cat. N-8130) 20 mM en acetonitrilo.
2. En tubos eppendorf agregar 250 μ L de solución de PNPA y 250 μ L de buffer (fosfatos 200 mM pH 7.5) y 250 μ L de agua. Preparar simultáneamente un blanco con sustrato y buffer.
3. Adicionar a los tubos de muestra hasta 250 μ L de extracto enzimático (si es necesario reemplazar extracto por un volumen de equivalente de agua y viceversa). Incubar a 37 °C y obtener las lecturas de absorbencia a 405 nm cada minuto. De forma simultánea agregar 250 μ L de agua al blanco e incubar a 37 °C registrando la absorbencia cada minuto.

4. Realizar la curva patrón partiendo de una solución stock de 200 μ M de paranitrofenol en buffer (fosfatos, 50 mM pH 7.5).

e) Medición de proteína

Se preparó un “stock” de albúmina (fracción V, GIBCO LABORATORIES No. Cat. 810-1018IM) en MB+PURh y se determinó la absorbencia de concentraciones crecientes de proteína a 280 nm usando un Espectrofotómetro UV-VIS Ultrospec 2000, de PHARMACIA BIOTECH.

7. Siembra en MB usando los compuestos de la resina PURh como fuente de carbono.

Cada fracción obtenida de la destilación del PURh fue usada como fuente de carbono; en medio basal (anexo I) a fin de determinar si el compuesto probado era capaz de sostener el crecimiento bacteriano. Las concentraciones fueron ajustadas para adicionar el equivalente a la concentración obtenida cuando se adiciona el PURh completo.

8. Análisis del sobrenadante de medio de cultivo por extracción clorofórmica y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas.

Con el fin de determinar qué componentes del Hydroform® eran degradados por la bacteria, se realizaron extracciones clorofórmicas del sobrenadante de cultivo en MB+PURh, a 1, 2.5, 5, 9, 11 y 22.5 hrs de incubación y la fase orgánica fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM).

Fundamento

El análisis de los compuestos presentes en la extracción con cloroformo del sobrenadante del medio de cultivo a través de un sistema CG-EM, permite determinar la cinética de degradación de los compuestos presentes en el medio por acción de las bacterias (Nakajima-Kambe *et al.*, 1997).

Método

1. Extracción con cloroformo.
 - a. A 4 mL de muestra de cultivo a adicionar 1 mL de cloroformo y agitar en vortex evitando que se forme una emulsión.
 - b. Dejar reposar y extraer la fase orgánica con una pipeta Pasteur. Colocar en otro tubo y adicionar una pequeña cantidad de sulfato de sodio para secar.
2. Analizar la muestra en un cromatógrafo de gases de acuerdo a los siguientes parámetros.

a. Columna	Capilar 5 % Phenyl methyl siloxane
b. Temperatura inicial	50 °C
c. Temperatura final	100 °C
d. Rampa	20 °C/min
e. Gas acarreador	Helio
f. Flujo	1.8 mL/min
g. Volumen de inyección	1 µL
h. Equipo	Gas Chromatography HP 6890
i. Detector	Mass Selective Detector HP 5973

9. Determinación de parámetros cinéticos de la actividad enzimática encontrada

a) pH óptimo

Se determinó el pH óptimo cuantificando la actividad de la enzima por el método de hidrólisis de PNPA (ver inciso e. del tema 4) usando una mezcla de diferentes amortiguadores (MES, 50mM; Fosfato de potasio monobásico, 50 mM; Tris-HCl, 50 mM; Glicina, 50 mM) a una concentración final total de 200 mM. Se ajusta la solución amortiguadora a valores de pH de 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 y 8.0.

b) Temperatura óptima de actividad

Se determinó la actividad por el método de hidrólisis de PNPA (ver inciso e. del tema 4) en una celda de cuarzo sumergida en baño maría. Las temperaturas usadas fueron: 10, 20, 30, 35, 37, 40, 42, 45, 50, 55 y 60 °C.

c) Parámetros cinéticos.

Se determinaron los parámetros cinéticos de acuerdo al ensayo de actividad por hidrólisis del acetato de paranitrofenol, empleando concentraciones de sustrato de 0.5, 1.0, 2.0 y 3.0 mM.

VIII. RESULTADOS

1. Aislamiento de cepas poliuretanolíticas

Se aislaron 19 cepas bacterianas y 9 cepas fúngicas capaces de crecer en medio YES, el cual ha sido empleado exitosamente en el aislamiento de bacterias poliuretanolíticas por el grupo de Howard (Howard y Blake, 1998, Ruiz y Howard, 1999, Rowe y Howard, 2002). Dado que el desarrollo de bacterias en este medio puede deberse a la presencia de cualquiera de las fuentes de carbono presentes en el mismo (gelatina, extracto de levadura o Hydroform®) era difícil asegurar si el crecimiento bacteriano se debía al Hydroform® o a alguna de las otras fuentes de carbono presentes. En consecuencia, se decidió trabajar con medio mineral con poliuretano hidrosoluble (MB+PURh) para el aislamiento, lo que resultó en la disminución del número de cepas bacterianas inicialmente obtenidas de 18 a dos: las cepas 402-2 y 402-4, capaces de usar Hydroform® como única fuente de carbono.

La identificación que realizó el cepario del departamento de Biología de la Facultad de Química (Biol. Luciano Hernández Gómez, Anexo II) establece que ambas cepas pertenecen al género *Acinetobacter*. Sin embargo, y pese a que las cepas fueron clasificadas como miembros de una misma especie, el comportamiento es diferente, como se observa al comparar las curvas de crecimiento (Figura 4).

La cinética de crecimiento de las cepas 402-2 y 402-4 en MB+PURh muestra que la densidad óptica (D.O.₆₆₀) de la cepa 402-2 aumentó

exponencialmente, alcanzando un valor aproximado de 1.0 de absorbencia alrededor de las 16 horas de cultivo. Ocho horas después del máximo, la absorbencia disminuyó un 35%, después de lo cual se estabilizó (Figura 4). Por otro lado, la cepa 402-4 presentó una fase de adaptación más larga que la 402-2, a pesar de que ambos cultivos fueron iniciados con la misma cantidad de inóculo en crecimiento activo. En esta cepa, la fase de crecimiento exponencial fue más lenta, alcanzando la fase estacionaria a 0.8 unidades de absorbencia, 36 horas después (Figura 4).

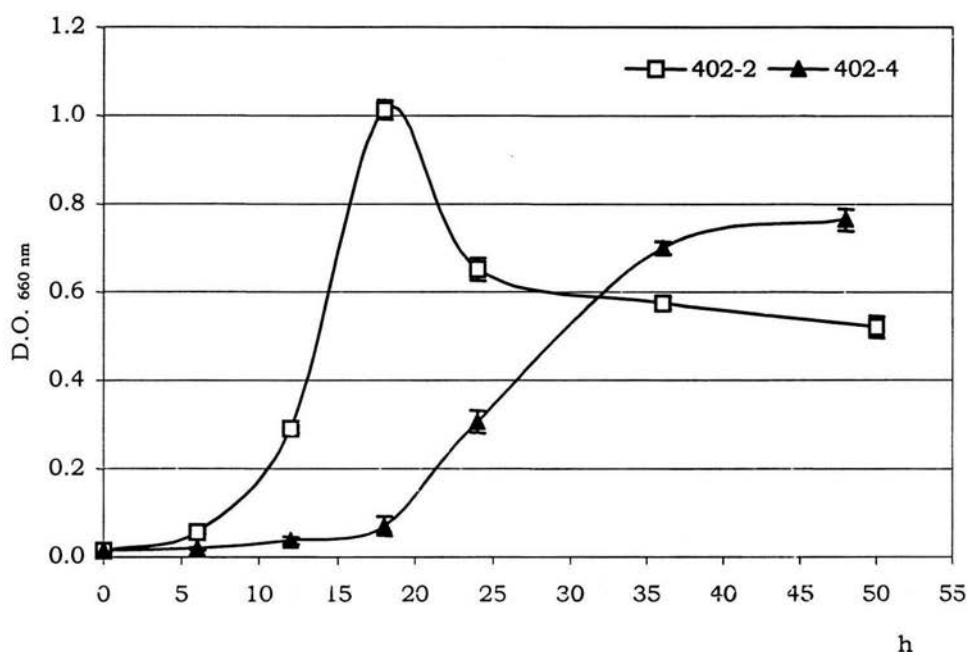


Figura 4. Curvas de crecimiento de las cepas 402-2 y 402-4 en MB+PURh.
Condiciones: cultivo líquido, 37°C, 200 rpm, [PURh] = 3.0 g/L. (n=4).

2. Caracterización de los compuestos químicos de la resina de PURh.

La destilación a presión reducida de los componentes de la resina PURh resultó en la separación de dos fracciones, denominadas fracción I y II, y un residuo sólido (Tabla 7). El análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) indica que la fracción I corresponde a agua. La fracción II corresponde a una mezcla de N-metil-pirrolidona y dos isómeros de dipropilen-glicol-metil-éter (DPGME). Las posibles fórmulas estructurales de estos compuestos se muestran en la Figura 5. Tanto el DPGME como la NMP son solventes usados en la fabricación de resinas y barnices de tipo poliuretano. La interpretación de los resultados del análisis de resonancia magnética nuclear (RMN) en estado sólido, del residuo sólido de la destilación (realizada por los M. en C. Néstor López y Brenda Porta del laboratorio 212 de Ingeniería Química, Fac. Química, UNAM) revela que se trata de un compuesto de tipo poliuretano-poliéster. En el Anexo III se incluye la interpretación de los espectros de RMN e IR

Tabla 7. Composición de la resina PURh.

Fracción	Compuesto	Cantidad aproximada
I	Agua	50%
II	N-metil-pirrolidona (NMP) e isómeros de dipropilenglicol-metil-éter (DPGME)	20%
Sólido residual	Poliuretano-poliéster (PS-PUR)	30%

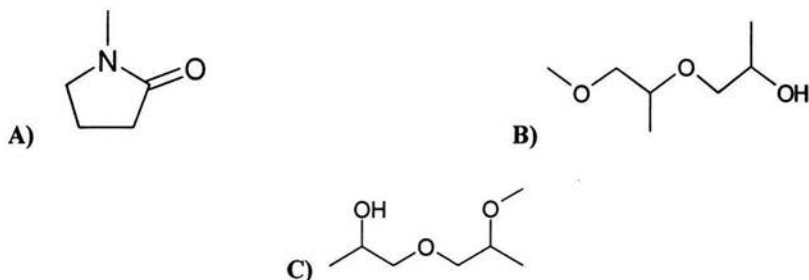


Figura 5. Estructura química de los compuestos encontrados en el PURh. A) N-metil-pirrolidona, B) y C) isómeros de Dipropilen-glicol-metil-éter (DPGME).

3. Caracterización de actividades enzimáticas

Varios tipos de actividades poliuretanolíticas (lipasa, esterasa, proteasa) han sido identificadas en las cepas bacterianas capaces de crecer en PUR (Howard y Blake, 1998, Ruiz y Howard, 1999, Nakajima-Kambe *et al.*, 1995), por lo que en este trabajo se hicieron determinaciones de estas actividades con el objetivo de identificar cual de ellas estaba presente en las cepas 402-2 y 402-4.

Para la identificación de actividad de proteasa se emplearon: a) el cultivo en Agar YES + PURh, que contiene gelatina y poliuretano, los cuales son degradados por las proteasas extracelulares producidas por las bacterias, y al teñirse con azul de coomassie se muestra como un halo transparente alrededor de las colonias; b) un ensayo para cuantificación de proteasa *in vitro*, empleando el sobrenadante del cultivo bacteriano como fuente de enzima y caseína como sustrato.

En el ensayo en placa se incluyeron como controles positivos varias cepas obtenidas durante el proceso de aislamiento entre ellas la 801

(Figura 6). El ensayo mostró que varias de estas cepas no producían proteasas extracelulares, ya que no se observaron halos transparentes alrededor de estas colonias. La cepa 402-2 muestra un pequeño halo de menor coloración, que no aparece en la cepa 402-4. Además, el halo presenta un borde más definido, en comparación con las demás cepas como, por ejemplo, la 801 que es más difuso y que coincide con la generación de proteasa como se indicará más adelante (Figura 6, Tabla 8).

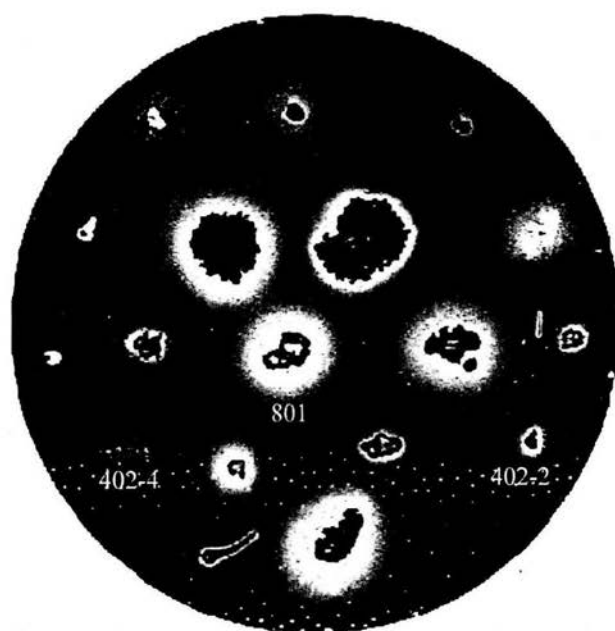


Figura 6. Halos de degradación de las cepas aisladas y cultivadas en Agar YES + PURh. Se señalan solamente las cepas 801, 402-2 y 402-4. Las bacterias fueron cultivadas durante 36 hrs a 37° C antes de realizar la tinción con azul de Coomassie. El fondo oscuro es de color azul y los halos blancos son las zonas de degradación de proteína alrededor de la colonia causadas por actividad proteasa.

El ensayo para la medición de la actividad de proteasa fue montado empleando proteinasa K (GIBCO BRL no. cat. 5530UA) como fuente de enzima. Este ensayo fue lineal hasta 1.5 mg de proteína ml⁻¹ (Figura 7). Se empleó como control positivo el sobrenadante de cultivo libre de células de la cepa 801 en medio YES líquido. No se detectó actividad de proteasa en las cepas 402-2 y 402-4 (Tabla 9).

Tabla 8. Identificación de actividades enzimáticas en medios diferenciales. Los cultivos YES, Christensen y Tween® 80 fueron probados en placa incubados a 37 °C. El medio con PURh fue en cultivo líquido incubado a 37 °C y 200 rpm.

Cepa	Proteasa YES	Ureasa Christensen	Esterasa Tween® 80	Crecimiento en PURh
<i>Pseudomonas sp.</i>	+	-	+	-
<i>E. coli</i>	+	-	-	-
*801	+	ND	ND	-
*805	+	+	ND	-
402-2	-	-	+	+
402-4	-	-	+	+

*Cepas inicialmente seleccionadas por su crecimiento en medio YES con PURh. Posteriormente se descartaron por no crecer en MB con PURh, aunque se utilizaron como control positivo para el crecimiento en los medios selectivos y en los análisis enzimáticos. El signo positivo indica la presencia de la actividad probada.

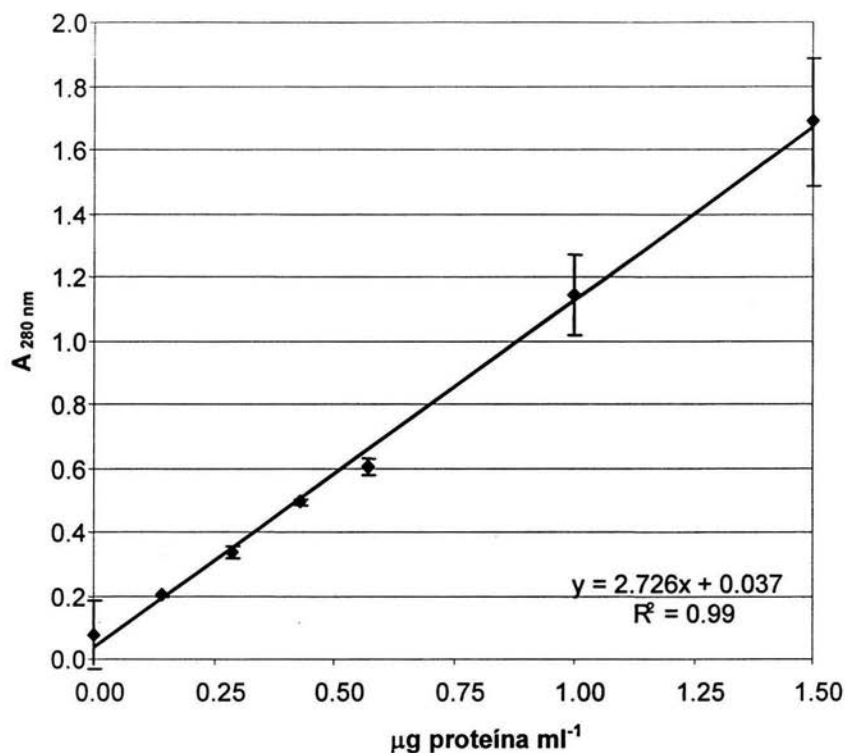


Figura 7. Curva patrón de proteína. Albúmina sérica bovina. Curva usada en la determinación de proteína solubilizada en el ensayo de proteasa. Condiciones: Enzima: proteinasa K (Gibco), sustrato: 10 mg/ml caseína. Volumen de reacción 0.6 ml, tiempo de reacción: 10 min)

Tabla 9. Análisis de actividades enzimáticas en sobrenadantes de medio de cultivo. Se analizaron los sobrenadantes de los cultivos en MB + PURh cuando alcanzaban $A_{660} = 1$ (aproximadamente 16 h).

Cepa	Proteasa (Caseína) μg proteína solubilizada $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$	Ureasa (Indofenol) $(\mu\text{mol NH}_4 \text{lib min}^{-1} \text{mg}^{-1})$	Esterasa (PNPA) $(\mu\text{mol PNP lib min}^{-1} \text{mg}^{-1})$
^a <i>Pseudomonas</i>	0.58	ND	ND
^a <i>E. coli</i>	ND	ND	ND
^a 805	0.78	243.5	0.62
^b 402-2	0	0	1.63
^b 402-4	0	0	0.57

^a Determinadas en sobrenadantes de cultivo en medio LB.

^b Determinadas en sobrenadantes de cultivo en medio MB+PURh.

ND: no determinado.

Para la determinación de la actividad de ureasa se realizaron las pruebas: a) cultivo en medio diferencial de Christensen, con el que se detecta actividad de ureasa, al cambiar el color del azul de bromofenol a rosa, debido a la generación de amonio por la hidrólisis de la urea, y b) ensayo *in vitro* empleando urea como sustrato y detectando amonio como producto que se libera por la actividad de la ureasa. El amonio se cuantifica comparando contra una curva patrón (Figura 8). En el primer caso se cultivó *Proteus vulgaris* como control positivo. La cepa de *P. vulgaris* presenta un halo de color rosa, indicativo de la generación de ureasas de tipo extracelular, a diferencia de las cepas 402-2 y 402-4, lo cual indica que éstas no producen dichas enzimas (Figura 9). Por otra parte, el ensayo para la medición de la actividad de ureasa fue montado con el sobrenadante del medio de cultivo de *P. vulgaris* (cepa ureasa positiva obtenida del cepario de la Facultad de Química) en presencia de urea como fuente de carbono y las cepas 402-2 y 402-4 en MB+PURh. A

RESULTADOS

diferencia del control positivo, no se detectó actividad de ureasa en las cepas 402-2 y 402-4 empleando este método (Tabla 9).

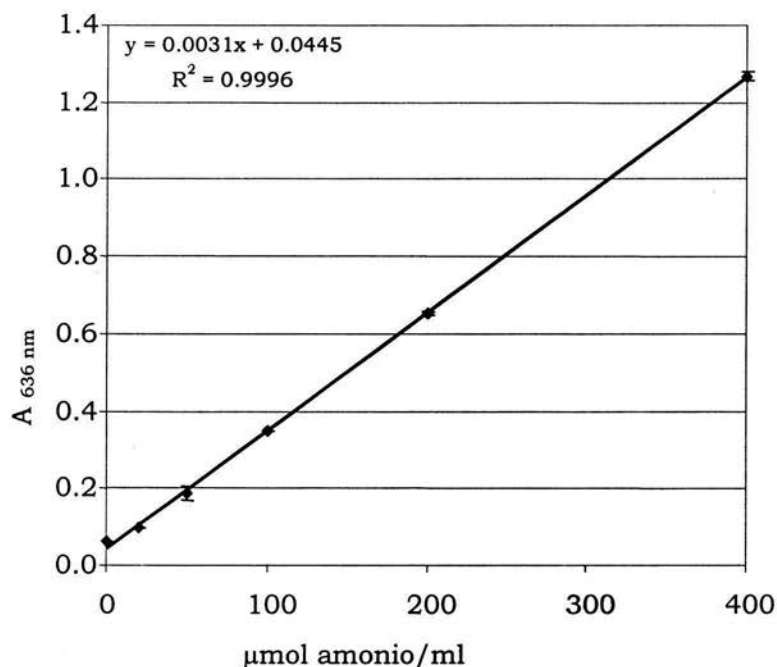


Figura 8. Curva patrón de amonio. Solución patrón de cloruro de amonio 1mM. Reacción con fenol e hipoclorito de sodio en presencia de nitroprusiato de sodio. Volumen de reacción: 1 ml. Absorbencia a 636 nm después de 10 minutos de iniciada la reacción. Espectrofotómetro UV-VIS Ultrospec 2000, de PHARMACIA BIOTECH. Temperatura: 37 °C.

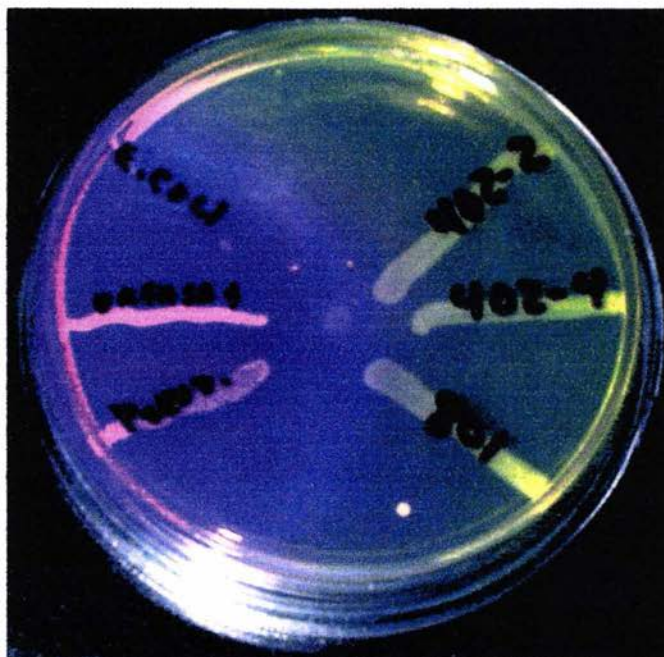


Figura 9. Cultivo en agar de Christensen. Cultivos a 48 hrs, el halo rojo implica la presencia de actividad de ureasa. Del lado izquierdo de la imagen: *E. coli*, cepa ureasa positiva (*P. vulgaris*) y *Pseudomonas* sp.. Del lado derecho, las cepas 402-2, 402-4 y 801.

Con el fin de determinar la presencia de actividades de esterasa o lipasa se hicieron las siguientes pruebas: a) cultivo en Agar Tween® 80 con el que se identifica la actividad de esterasa (Figura 10) al observar halos de precipitación alrededor de las cepas productoras de esta actividad y b) un ensayo *in vitro* en el que se analiza la capacidad de hidrolizar el enlace éster del acetato de paranitrofenilo en el sobrenadante de cultivo en MB+PURh y leyendo la absorbencia a 405 nm (Figura 11)

En la prueba en medio diferencial se empleó como control positivo *Pseudomonas* sp. (cepa obtenida de los aislamientos) y como control negativo *E. coli* (cepa XL-1 blue) Las cepas 402-2 y 402-4, así como la 805,

mostraron un halo de precipitación al cultivar en este medio, lo que indica que son productoras de esterases (Gupta, *et al.* 2003) (Figura 10).

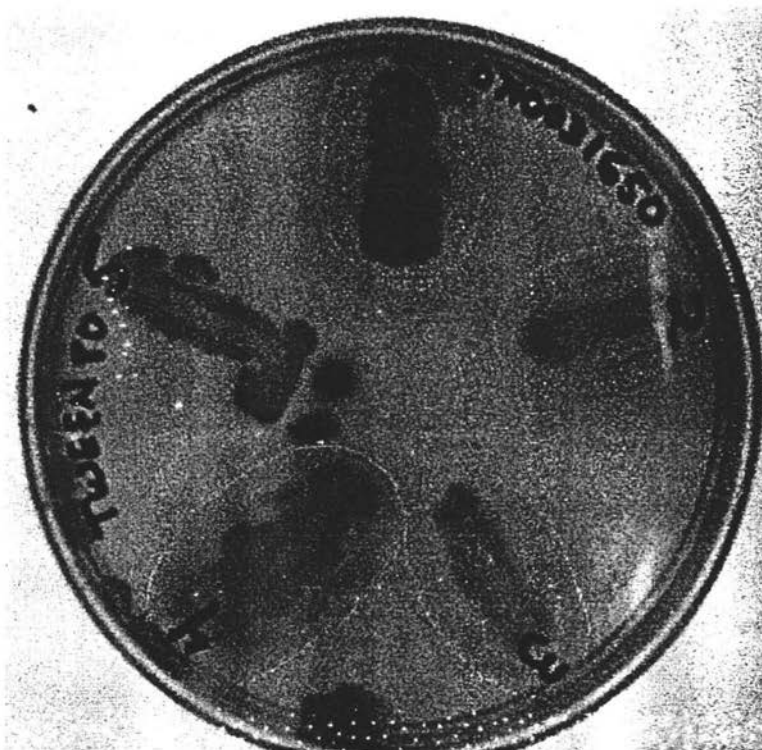


Figura 10. Cultivo en Agar Tween® 80. Halos de precipitación producidos por la actividad de esterasa 1) *Pseudomonas* sp., 2) 402-2, 3) 402-4, 4) 805 y 5) *E. coli*. Condiciones: 72 hrs de cultivo a 37 °C.

En el ensayo *in vitro* se empleó como control positivo una lipasa de *P. fluorescens* (Aldrich; no. cat. 390445). A la actividad obtenida en cada ensayo se le sustrajo el valor de la hidrólisis química. Este valor fue determinado analizando muestras con extractos de medio de cultivo sin inocular. La actividad de las cepas 402-2 y 402-4 fue de 1.63 y 0.57 $\mu\text{moles PNP}_{\text{lib}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ proteína, respectivamente en los sobrenadantes de cultivos de 36 horas, en medio basal con PURh (Figura 12).

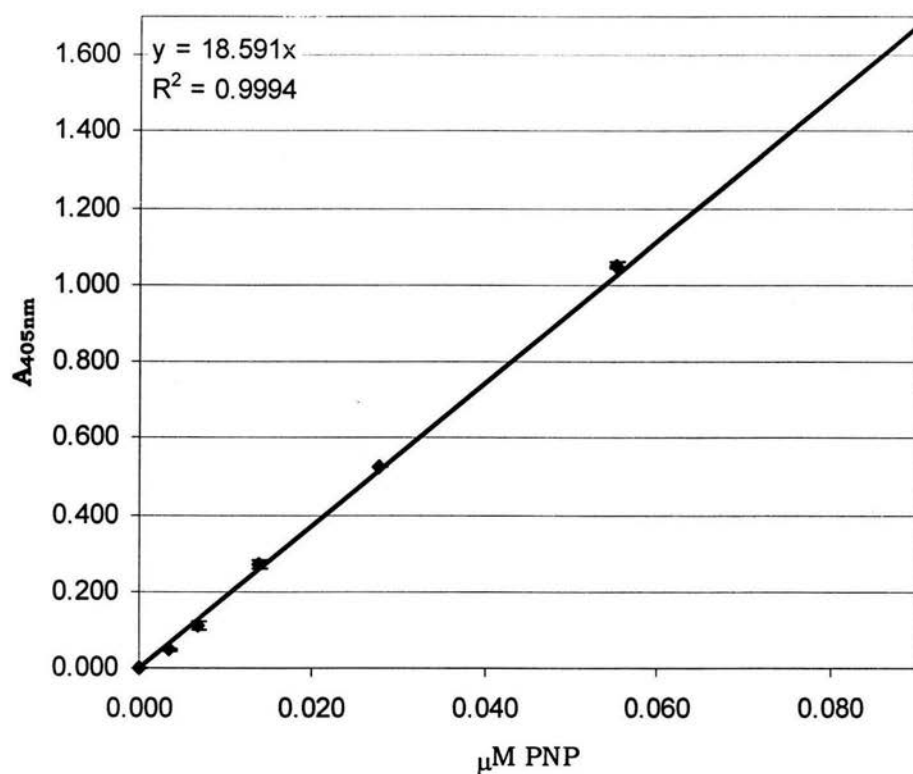


Figura 11. Curva patrón de p-nitrofenol (PNP). Volumen: 1 ml, Espectrofotómetro UV-VIS Ultrospec 2000 Pharmacia-Biotech.

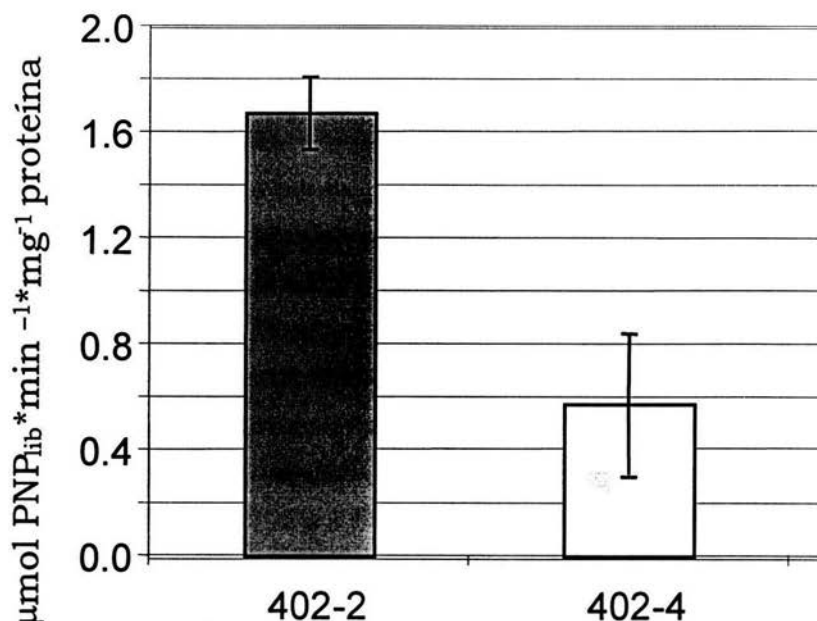


Figura 12. Actividad de esterasa en sobrenadante. Cultivo de las cepas 402-2 (16 hrs) y 402-4 en MB+PURh (36 horas). Substrato: 1mM PNPA. Los valores se presentan descontando la actividad de hidrólisis química de cada muestra (n=6).

4. Cultivo en los componentes del PURh.

Con el fin de determinar la fracción del PURh que sostiene el crecimiento, las cepas se cultivaron en MB usando como fuente de carbono cada una de las fracciones obtenidas de la destilación de la resina y el crecimiento se comparó con el observado en MB+PURh a las 24 horas de cultivo. Las concentraciones de los distintos componentes fueron 3 g/l de resina sin destilar (PURh), 0.6 g/ml de fracción II y 0.9 g/l del compuesto residual. Dado que la fracción II contenía NMP, también se

estableció un cultivo en MB con 0.3 g/l de NMP (Sigma-Aldrich no. cat. 31903). La concentración de todos los componentes probados fue el equivalente a la cantidad de PURh que se adiciona al medio de cultivo (3 g/L).

En MB + PURh el crecimiento de las cepas 402-2 y 402-4 fue de 1.6 y 1.3 μg de peso seco por ml de medio de cultivo (PS/ml) respectivamente, mientras que para *Pseudomonas sp.* fue de 0.1 μg PS/ml. Usando la fracción II, que corresponde a los solventes NMP y DPGME, el crecimiento de las cepas 402-2, 402,4 y *Pseudomonas sp.* fue de 1.12, 1.05 y 0.10 μg PS/ml respectivamente. El crecimiento en NMP puro fue de 1.1 μg PS/ml para ambas cepas aisladas y de 0.1 μg PS/ml para *Pseudomonas sp.* En el cultivo empleando el sólido residual de la destilación, que correspondía al poliuretano-poliéster (PS-PUR), se observó un bajo crecimiento en los cultivos inoculados con las cepas poliuretanolíticas 402-2 (0.3 μg PS/ml) y 402-4 (0.1 μg PS/ml), pero ningún crecimiento con *Pseudomonas sp.* después de 5 días de cultivo (Figura 13).

Con el fin de determinar la presencia de actividad de esterasa en el sobrenadante de los cultivos conteniendo las diferentes fracciones de destilación del PURh, se empleó la reacción de hidrólisis de PNPA, cuantificando el producto, PNP. La actividad de esterasa se detectó en el SN de los cultivos con PURh y en los cultivos que contenían el sólido residual PS-PUR, pero no en los cultivos que contenían la Fracción II o NMP, aún concentrando las muestras 10X usando un Centricón® de corte en 10 kDa. La actividad de esterasa de la cepa 402-2, en medio PS-PUR fue de $34 \mu\text{moles PNP}_{\text{lib}} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ de proteína a partir del sobrenadante concentrado 10X, después de 3 días de cultivo. Por el contrario, no se detectó actividad en el sobrenadante del cultivo de la cepa 402-4 en medio basal con la fracción PS-PUR. Con base en estas observaciones se concluye que la actividad esterasa se genera en presencia del PS-PUR y no en presencia de la NMP o cualquiera de los solventes

presentes en la resina completa. Esta actividad se encuentra en el medio de cultivo, lo que indica que se trata de una actividad extracelular.

Para determinar si la enzima se detecta en el sobrenadante sólo cuando existe PURh, o si la actividad se produce independientemente del medio en el que se cultive, se cuantificó la actividad de esterasa en el sobrenadante de cultivo en medio LB, de la cepa 402-2. Se usó como control *Pseudomonas sp.* y ambas fueron cultivadas en LB y en MB + PURh. Después de 24 hrs se realizó la cuantificación de esterasa en el sobrenadante, por el método de hidrólisis del PNP. No se detectó actividad de esterasa en el sobrenadante de ninguna de las dos bacterias cultivadas en LB, aún concentrando la muestra hasta el décimo de su volumen. Estos resultados indican que la enzima no es producida constitutivamente por la bacteria, sino que se sintetiza en respuesta al PURh.

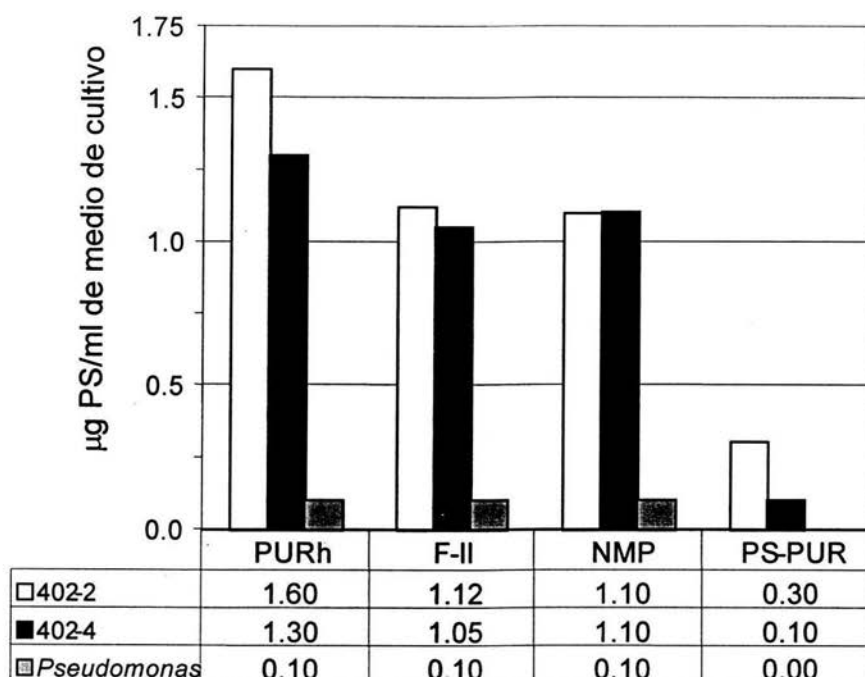


Figura 13. Cultivo en MB con las distintas fracciones de la destilación del PURh. PURh: resina Hydroform® completa (usada a 3 g/L), F-II: fracción II (0.6 g/L), NMP: N-metil-pirrolidona (0.3 g/L), PS-PUR: compuesto residual (0.9 g/L). Condiciones: cultivo líquido, 37 °C, 200 rpm. tiempo de cultivo para NMP, F-II y PURh: 24 hrs, tiempo de cultivo para PS-PUR: 5 días.

5. Análisis de extractos clorofórmicos del medio de cultivo.

Para confirmar si la bacteria era capaz de usar la NMP y determinar si también existía la asimilación del DPGME, se realizó un extracto clorofórmico del sobrenadante de cultivo de la cepa 402-2 que fue analizado por CG-EM. En los cromatogramas se observan los picos que pertenecen a los isómeros de DPGME, así como la NMP. Los picos correspondientes a los isómeros de DPGME se mantienen constantes a lo

largo de todo el tiempo de cultivo, mientras que el pico de la NMP, con un tiempo de retención aproximado de 6.24, disminuye a medida que transcurre el tiempo (Figura 14).

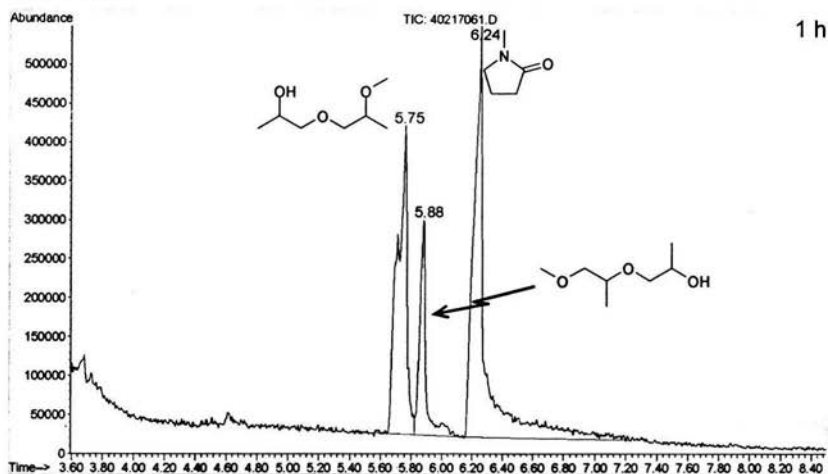
El área de los cromatogramas, así como la relación de NMP con respecto a uno de los isómeros de DPGME, muestra que la NMP va desapareciendo paulatinamente (Tabla 10). Este compuesto desaparece totalmente a las 22.5 horas de cultivo, lo cual sugiere que la NMP se va consumiendo mientras que los isómeros del DPGME no son asimilados por las bacterias.

Tabla 10. Evolución de los componentes de la resina en el cultivo de *Acinetobacter* sp. cepa 402-2. Áreas de los cromatogramas resultado del análisis de extractos clorofórmicos del sobrenadante de medio de cultivo a diferentes tiempos.

Hrs	Area (DPGME ₁)	Area (DPGME ₂)	Area (NMP)	(DPGME ₁ /DPGME ₂)	(NMP/DPGME ₁)	(NMP/DPGME ₂)
1.0	17337840	8110351	23646875	2.14	1.36	2.92
2.4	12863332	5840421	13833198	2.20	1.08	2.37
5.0	19026108	8401215	21396819	2.26	1.12	2.55
9.0	22289496	8840947	21133622	2.52	0.95	2.39
11.0	20947628	8891258	14600980	2.36	0.70	1.64
22.4	19974665	8524972	0	2.34	0.00	0.00

RESULTADOS

File : D:\DATA\PUR\40217061.D
 Operator : Agustín Carrillo
 Acquired : 18 Jun 2003 12:09 using AcqMethod GLICOLIA
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: Crecimiento 1706 1 hr
 Misc Info :
 Vial Number: 1



File : D:\DATA\PUR\40217062.D
 Operator : Agustín Carrillo
 Acquired : 18 Jun 2003 12:22 using AcqMethod GLICOLIA
 Instrument : GC/MS Ins
 Sample Name: Crecimiento 1706 2.4 hr
 Misc Info :
 Vial Number: 1

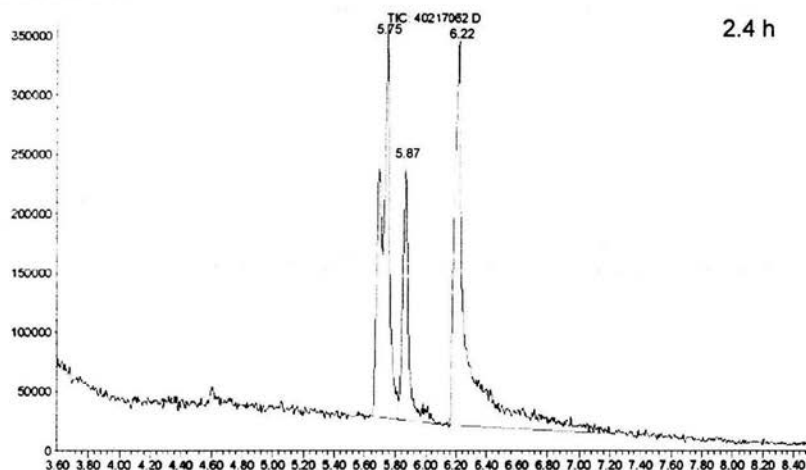
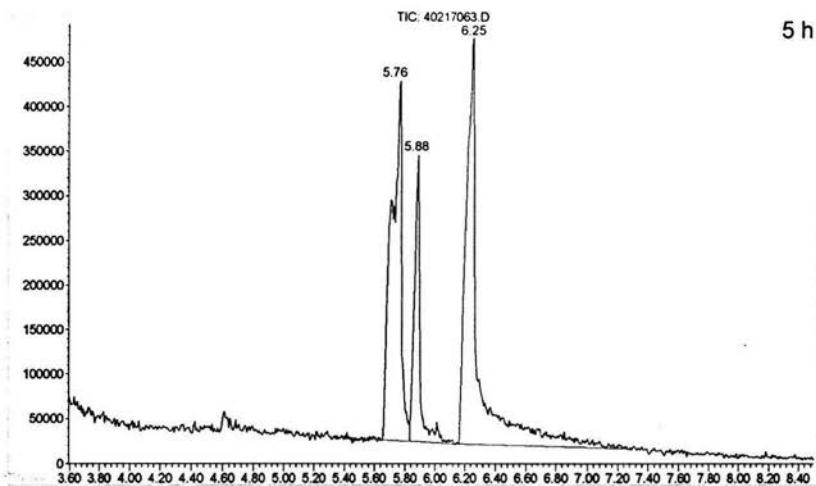


Figura 14. Cromatogramas de la extracción clorofórmica del SN. Cultivo líquido en MB + PURh seguido hasta las 22.5 hrs cultivado a 37 °C , 200 rpm. Las condiciones cromatográficas se detallan en el capítulo de métodos.

RESULTADOS

File : D:\DATA\PUR\40217063.D
Operator : Agustin Carrillo
Acquired : 18 Jun 2003 12:39 using AcqMethod GLICOL1A
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: Crecimiento 1706 5 hrs
Misc Info :
Vial Number: 1



File : D:\DATA\PUR\40217064.D
Operator : Agustin Carrillo
Acquired : 18 Jun 2003 12:59 using AcqMethod GLICOL1A
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: Crecimiento 1706 9 hrs
Misc Info :
Vial Number: 1

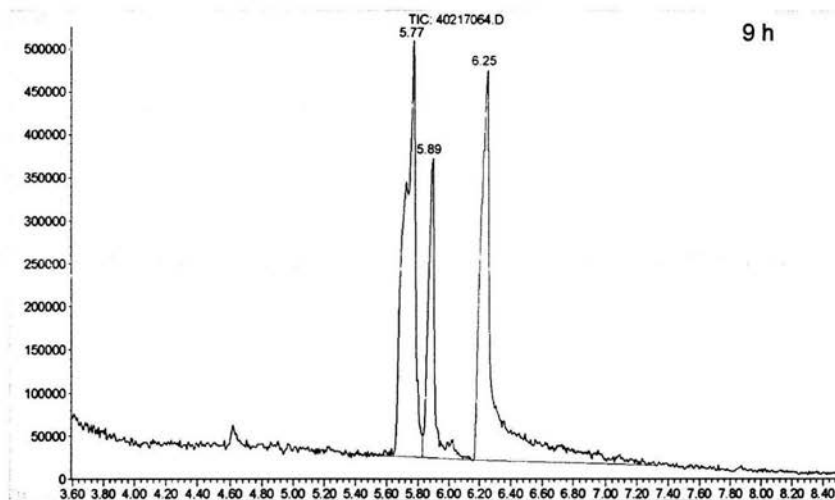
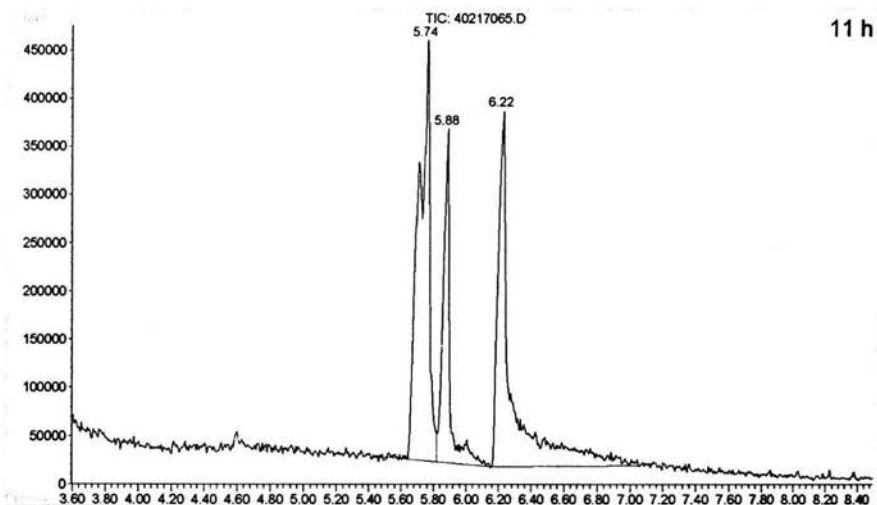


Figura 14. Continuación

RESULTADOS

File : D:\DATA\PUR\40217065.D
Operator : Agustin Carrillo
Acquired : 18 Jun 2003 13:39 using AcqMethod GLICOL1A
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: Crecimiento 1706 11 hrs
Misc Info :
Vial Number: 1



File : D:\DATA\PUR\40217066.D
Operator : Agustin Carrillo
Acquired : 18 Jun 2003 13:23 using AcqMethod GLICOL1A
Instrument : GC/MS Ins
Sample Name: Crecimiento 1706 22.5 hrs
Misc Info :
Vial Number: 1

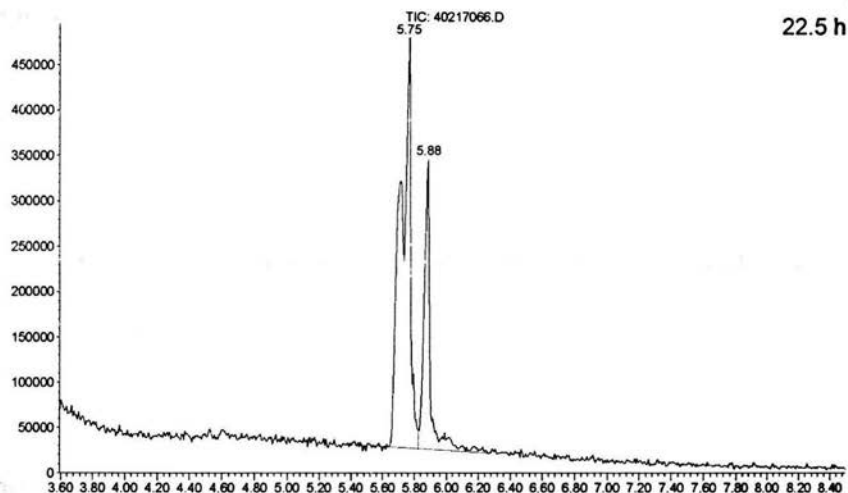


Figura 14. Continuación

6. Determinación de constantes cinéticas y efecto del pH y la temperatura sobre la esterasa.

Del sobrenadante de un cultivo en MB+PURh de 24 h de crecimiento (o absorbencia de 1.0 a 660 nm) de la cepa 402-2, se determinó el pH óptimo de la hidrólisis de PNPA en una mezcla amortiguadora ajustada a pH de 5.5, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0 y 8.5 (Figuras 15). La esterasa presenta un pH óptimo de hidrólisis de PNPA de 7.5. El pH del medio de cultivo es de 7.3 al momento de su preparación y no se altera en el transcurso del estudio (se realizaron tres mediciones).

La temperatura óptima de la actividad se obtuvo incubando la muestra a temperaturas de 10, 25, 30, 35, 38, 42, 45, 50, 55 y 60 °C. El equipo usado fue un espectrofotómetro UV-VIS Ultrospec 2000, de PHARMACIA BIOTECH y la prueba se determinó en un baño de temperatura, de acuerdo a lo descrito en la metodología. Se determinó que la actividad óptima se presenta a 38 °C (Figura 16).

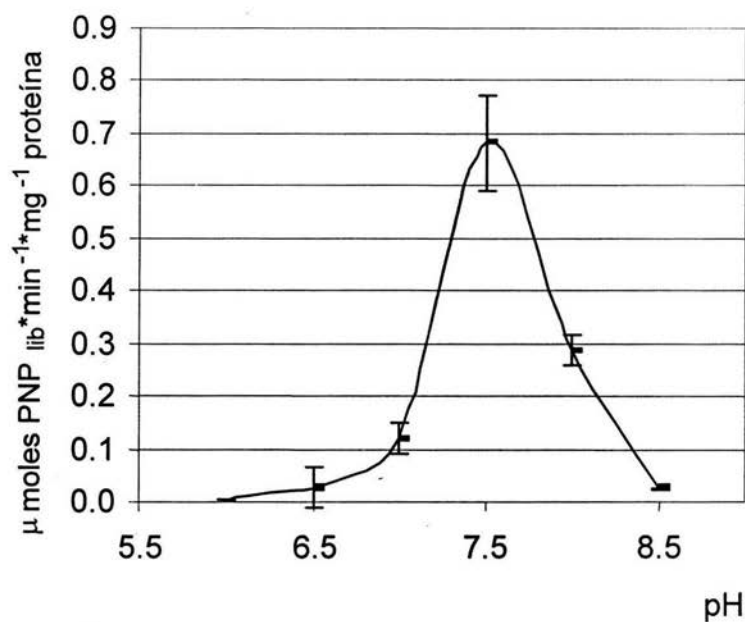


Figura 15. Efecto del pH en la hidrólisis de PNPA por la esterasa de la cepa 402-2. n=5. Tiempo de reacción: 5 minutos. Tiempo de preincubación: 3 minutos.

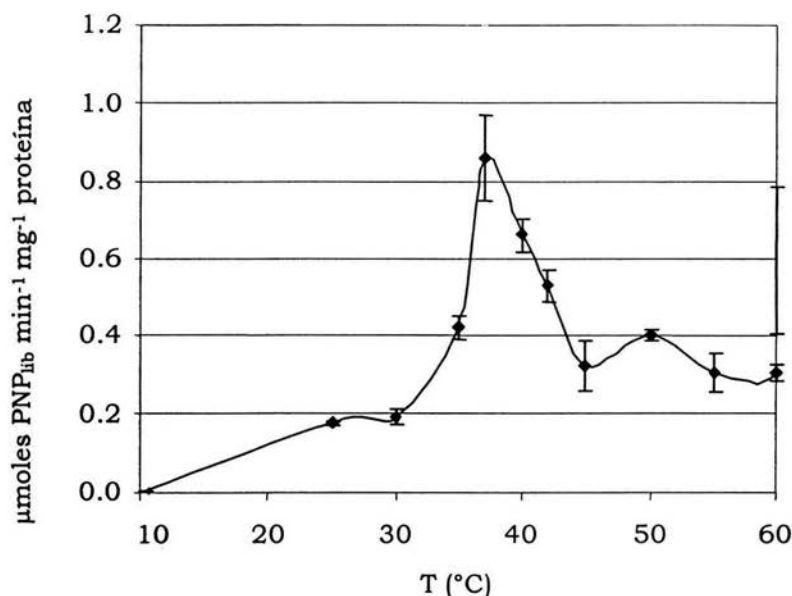


Figura 16. Temperatura de máxima actividad para la hidrólisis de PNPA por la esterasa de la cepa 402-2. n=4. Tiempo de preincubación: 3 minutos, tiempo de reacción: 5 minutos. pH del medio: 7.5.

Las constantes cinéticas de la actividad sobre PNPA (Figura 17) fueron calculadas por ajuste con el programa Microcal® Origin® 5.0 Professional. Se analizaron los datos empleando tanto el modelo de Michaelis-Menten como el modelo de Hill. Los valores de este análisis se presentan en la tabla 11. Estos análisis muestran que aunque el valor de Chi cuadrada para el modelo de Michaelis es menor que para el modelo de Hill, los valores de desviaciones estándar de $K_{0.5}$ y V_{max} fueron menores para este último modelo. Estos resultados indican que ninguno de los dos modelos explican el comportamiento cinético observado, lo cual puede deberse a la poca cantidad de puntos realizados, lo cual se tratará en el capítulo de discusión.

Tabla 11. Parámetros obtenidos de los ajustes no lineales. Ajuste usando los modelos de Hill y de Michaelis-Menten. Programa usado; Microcal® Origin® 5.0.

Modelo	Hill		Michaelis-Menten	
Parámetro	Valor	Desviación	Valor	Desviación
$V_{\max}$ ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$)	67.73	24.2	126.2	84.4
$K_{0.5}$ (mM)	1.003	0.5	2.75	3.2
n	2.75	3	-	-
Chi ²	234.4		130.5	

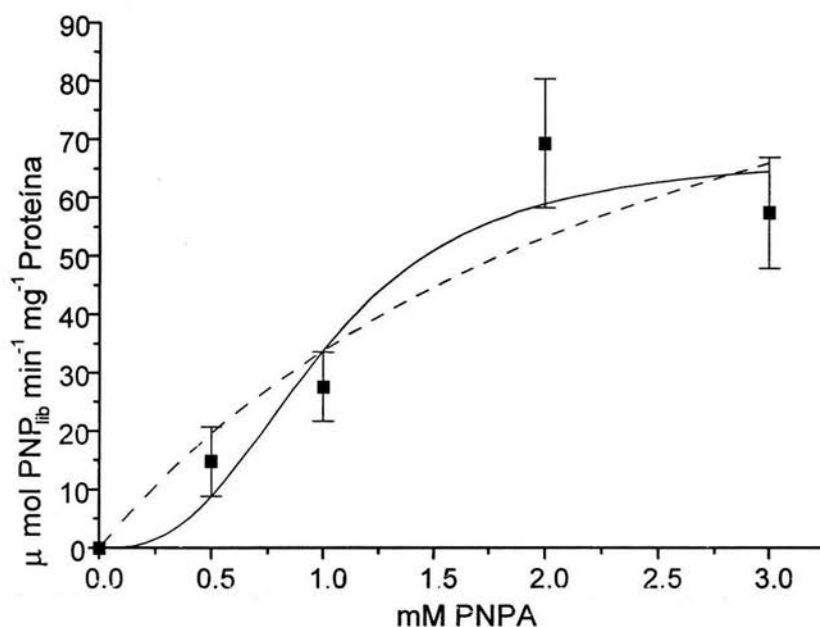


Figura 17. Curvas de los ajustes de datos de la actividad de la esterasa. Modelos de Michaelis-Menten (línea segmentada) y Hill (línea continua) para la cinética de degradación de PNPA en presencia de la esterasa de *Acinetobacter* sp. n=9.

IX. DISCUSION

1. Dos diferentes cepas de *Acinetobacter* sp. fueron capaces de crecer en Hydroform® como única fuente de carbono.

Algunos autores han usado muestras de suelo, barnices en proceso de deterioro y muestras encontradas a la intemperie como fuentes para el aislamiento de bacterias poliuretánolíticas (Nakajima-Kambe *et al.* 1995, Kay *et al.*, 1991, El-Sayed *et al.*, 1996). El uso de sillones en proceso de deterioro para el aislamiento de bacterias con capacidad poliuretánolítica en este trabajo toma relevancia al realizarse a partir de muestras colectadas de un basurero a la intemperie, donde existe una alta probabilidad de que estas bacterias existan.

En los métodos de aislamiento se ha usado PUR sintetizado específicamente para obtención de estas bacterias o PUR comercial de tipo coloidal (por ejemplo Impranil®, fabricado por industrias Bayer®) (Nakajima-Kambe *et al.* 1995; Howard *et al.*, 2001). De acuerdo con los datos proporcionados por la empresa Polyform®, el poliuretano hidrosoluble marca Hydroform® sería el equivalente del Impranil® de Bayer®, por lo que en este trabajo se empleó para la selección de bacterias poliuretánolíticas. El Hydroform® es una resina de poliéster-poliuretano alifático base agua cuya hidrofiliidad permite solubilizarlo en el medio de cultivo, favoreciendo así su hidrólisis y asimilación por parte de las

bacterias. Por otra parte, cabe recordar que el poliéster poliuretano es más susceptible a ser degradado que el poliéter-poliuretano.

Howard y Hilliard (1999) reportaron que las cepas cultivadas en agar YES con poliuretano como fuente de carbono y teñidas posteriormente con azul de Coomassie muestran halos alrededor de las colonias capaces de degradar dicho polímero sintético. Debido a que el azul de Coomassie tiene la capacidad, como muchos colorantes, de unirse a los enlaces amida de las proteínas (Lovrien y Matulis, 1995) y que el enlace uretano puede considerarse un enlace de este tipo, es posible la unión del colorante a dichos enlaces (Howard y Hilliard, 1999). El agar YES contiene extracto de levadura y gelatina, por lo que puede considerarse un medio rico que, por un lado, suministra los cofactores necesarios para lograr la degradación de poliuretano y por otro, la presencia de gelatina en el medio favorece la generación de proteasas, enzimas cuya acción sobre el poliuretano ha sido sugerida (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

Sin embargo, los resultados muestran que las cepas aisladas que generan halos de degradación en agar YES no son capaces de crecer en medio basal. Esto implica que las proteínas presentes en el medio son usadas como fuente de carbono. El azul de Coomassie no solo se une a los enlaces amida presentes en el poliuretano, sino también a los presentes en la gelatina, lo que implica que un halo de degradación en medio YES no necesariamente es debido a degradación de poliuretano, sino que podría ser degradación de la gelatina. Esto concuerda con lo observado en la Figura 6 y la Tabla 8, en donde se observa que la cepa 402-2 muestra un halo de hidrólisis alrededor de la colonia, pero no presenta actividad de proteasa, mientras que la cepa 801 muestra el halo de hidrólisis y además presenta actividad de proteasa. La presencia del halo alrededor de la cepa 402-2 sugiere que esta cepa es capaz de degradar el poliuretano presente

en el medio de cultivo, por la actividad de enzimas que no son de tipo proteasa.

En consecuencia, el medio YES no es específico para el aislamiento de bacterias poliuretanolíticas, aunque podría considerarse diferencial en la identificación de cepas proteolíticas o poliuretanolíticas. En contraste, el medio basal (MB) representa una opción útil en el aislamiento de cepas capaces de usar Hydroform® como fuente de carbono, debido a que no contiene otra fuente de carbono alterna al poliuretano. Esta situación ayudó a la discriminación de cepas capaces de usar el poliuretano como fuente de carbono.

Por otro lado, el uso de MB+PURh tendría la desventaja de no proporcionar nutrientes necesarios para el crecimiento de microorganismos que degraden PUR. En este trabajo, el aislamiento en MB+PURh redujo la cantidad de cepas aparentemente poliuretanolíticas, de 18 a 2, por tratarse de un medio selectivo para la utilización de poliuretano como única fuente de carbono (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995).

Aunque bacterias del género *Acinetobacter* sp., al cual pertenecen las especies aisladas en este trabajo, se han encontrado involucradas en la degradación de barnices de poliuretano usados en cubiertas y navíos marítimos (El-Sayed, 1996, Rutkowska *et al.*, 2002), el tipo de actividad encargada de esta degradación no se ha identificado. Además, no existen reportes de bacterias de este género capaces de usar PUR como única fuente de carbono, aunque existen trabajos que indican que *Acinetobacter* sp. es capaz de crecer en presencia de hidrocarburos (Bach, *et al.* 2003; Koma *et al.*, 2001) lo que permite sugerir que especies de este género pueden degradar moléculas orgánicas de cadena larga. Por otro lado, el género *Acinetobacter* sp. pertenece al orden *Pseudomonadales*, familia *Moraxellaceae*, integrada por varias especies que han sido reportadas como

capaces de degradar compuestos xenobióticos e hidrocarburos (Carr *et al.*, 2003, Abdel-El-Haleem, 2003).

2. *Acinetobacter* es capaz de utilizar tanto la NMP como el PS-PUR presentes en el Hydroform®.

El aislamiento y cultivo en MB+PURh aseguraba que las bacterias aisladas eran capaces de utilizar el Hydroform® como fuente de carbono. Sin embargo, este producto comercial está constituido por 30% de poliéster poliuretano (PS-PUR) y 20% de *N*-metil-pirrolidona (NMP) e isómeros de dipropilenglicol-metil-éter (DPGME). Con objeto de determinar qué compuesto(s) estaba(n) siendo utilizado(s) por la bacteria, se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) de extractos clorofórmicos del medio donde se cultivaba la bacteria.

La NMP desapareció del medio de cultivo en las primeras 22.5 horas de crecimiento. Se ha descrito la degradación de NMP por bacterias presentes en lodos activados en plantas de tratamiento de aguas (Chow y Ng, 1983), de los cuales se han aislado cepas de *Acinetobacter* pero no se conoce la forma en que el compuesto es asimilado. En cultivos de *Pseudomonas aeruginosa*, usando 2-pirrolidona como fuente de carbono, se ha encontrado que la misma es degradada por una hidrolasa que la transforma en ácido γ -aminobutírico; sin embargo, la cepa no fue capaz de usar NMP como fuente de carbono (Noe y Nickerson, 1958). Esto sugiere que la ruptura del enlace de la sustitución en *N* posiblemente requiera de una enzima adicional capaz de liberar dicho grupo metilo. Considerando que la cepa de *Acinetobacter* sp. 402-2 aislada es capaz de emplear la NMP

como fuente de carbono, y que no existe información adicional sobre las vías de asimilación o degradación de NMP en bacterias, el estudio de la posible actividad enzimática establecería las bases para su uso en la biodegradación de NMP. Esto toma relevancia al considerar que la NMP ha sido usada crecientemente en sustitución del cloruro de metileno, normalmente usado en condensadores eléctricos y resinas de pinturas (Roelofs y Ellenbecker, 2003). En pruebas realizadas en humanos se han detectado la 5-hidroxi-*N*-metil-2-pirrolidona (5-HNMP), *N*-metilsuccinimida (MSI) y 2-hidroxi-*N*-metilsuccinimida (2-MSI) como productos de degradación de NMP (Åkesson y Jonsson, 1997), pero a la fecha no se tienen reportes de la forma en que las bacterias degradan dicho compuesto.

Al cultivar esta bacteria en NMP puro, el crecimiento fue menor que cuando se hacía en PURh completo, lo que sugería que posiblemente la bacteria pudiera estar utilizando otro compuesto presente en el PURh. El cromatograma de los extractos clorofórmicos mostró que las concentraciones de DPGME no se alteraban durante el cultivo, por lo que el único que podría ser usado como fuente de carbono fue el PS-PUR. Al cultivar *Acinetobacter* en medio basal con la fracción PS-PUR obtenida por destilación del PURh, se observó un bajo crecimiento, el 20% del presentado cuando se cultivaba en MB + PURh completo. Si bien este crecimiento es bajo, el resultado podría ser explicado por una menor disponibilidad de las moléculas PS-PUR en el medio, en comparación a como se encuentra en la resina completa. Los monómeros de poliuretano provenientes de la resina, dispersos en el medio basal (MB+PURh) generan un sistema coloidal con un bajo grado de polimerización, a diferencia de la fracción residual o PS-PUR, donde la ausencia de solventes favorece el proceso de polimerización y genera un compuesto insoluble en agua.

3. Se identificó una actividad de esterasa en el sobrenadante del cultivo de *Acinetobacter* sp. en medio con Hydroform®.

Las actividades que han sido sugeridas como capaces de degradar el poliuretano son proteasas, esterasas (tanto carboxilesterasas como lipasas) y ureasas (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999). Aunque en bacterias sólo se han encontrado las primeras dos actividades relacionadas con este proceso (Howard, 2002).

Con el objeto de identificar qué tipo de actividad enzimática podría ser la responsable de la utilización del PURh, en este trabajo realizamos varias pruebas con medios diferenciales y mediciones de actividad enzimática del sobrenadante de medios de cultivo de *Acinetobacter* cultivado en medio con Hydroform®. Las pruebas para determinar la presencia de proteasas y ureasas mostraron que estas actividades no estaban presentes en los cultivos de *Acinetobacter* sp. en los tiempos analizados (24 h).

Los halos de precipitación en agar Tween® 80 indican que tanto las cepas de *Acinetobacter* sp. aisladas, como el control de *Pseudomonas* sp. son capaces de generar esterasas, pero sólo *Acinetobacter* sp. es capaz de usar Hydroform® como única fuente de carbono y por lo tanto crecer en ese medio. Los halos de precipitación en Tween® 80 indican que las enzimas generadas por ambas especies son esterasas capaces de degradar un sustrato que posee cadenas no polares como el polisorbato de polioxietilenglicol. Generalmente se ha considerado que la prueba de Tween® 80 identifica lipasas, sin embargo, y debido a que el Tween® también puede ser hidrolizado por esterasas, esta prueba no debe ser considerada específica para identificación de lipasas (Gupta *et al.*, 2003).

Debido a que el PURh es un sustrato que posee cadenas no polares, es posible que la esterasa generada por *Acinetobacter* sp. sea la que esté involucrada con la degradación de PURh. Esta propuesta proviene del hecho de que la cepa no generó otra actividad extracelular relacionada con la degradación de PUR y que pudiera haber sido detectada por medios diferenciales ni por los ensayos *in vitro*.

En *Comamonas acidovorans* TB35 se han identificado dos actividades de tipo esterasa, una unida a la pared celular y otra de tipo extracelular, capaces de degradar el poliuretano (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995, Akutsu *et al.*, 1998). Kay (1991) determinó la existencia de una actividad de esterasa en el sobrenadante de cultivo líquido de *Corynebacterium* sp. en presencia de poliuretano como fuente de carbono. Pese a encontrar dicha actividad, no pudo demostrar la relación entre la presencia de la enzima y la degradación del polímero.

4. La actividad de esterasa de *Acinetobacter* se presenta cuando se cultiva en Hydroform® y en PS-PUR, pero no cuando se cultiva en NMP o medio Luria.

Como se comentó en la sección 2, la capacidad de *Acinetobacter* sp. de crecer en Hydroform® es debida a la utilización tanto de NMP como de PS-PUR. Aunque no se conoce el tipo de actividad responsable de la degradación de NMP (van der Meer *et al.*, 1992) puede sugerirse, con base en el enlace amida que posee (Figura 8), que las actividades capaces de degradarla podrían ser de tipo ureasa o proteasa. Sin embargo, no se detectó actividad de este tipo ni a las 24 h ni en etapas iniciales del cultivo en placa ni en el ensayo *in vitro*, por lo que se descarta dicha posibilidad.

Por otro lado, la actividad de esterasa detectada a las 24 h de cultivo no se detecta a las 2, 4 o 6 h del inicio el mismo. Debido a que en los análisis de CG-EM no se observó la presencia de otras moléculas que pudieran considerarse productos de degradación de NMP, así como por el tamaño pequeño de la molécula, existe la posibilidad de que la NMP sea asimilada y degradada dentro de la célula. Debido a que la utilización de 2-pirrolidona en *Pseudomonas aeruginosa* parece estar asociada al metabolismo de aminoácidos (Noe y Nickerson, 1958), es posible que la asimilación de NMP pueda asociarse a un transportador relacionado con la misma vía en *Acinetobacter* sp. Con base en lo anterior, sugerimos que en las etapas tempranas del cultivo, el crecimiento bacteriano podría ser sostenido por la asimilación y degradación interna de la NMP, mientras que en etapas más avanzadas del cultivo, el PUR sería asimilado a través de un proceso que involucra la generación de una actividad esterasa extracelular, que puede atacar el segmento poliéster del PURh. La caída en el crecimiento de la cepa 402-2 alrededor de las 18 h podría representar el punto en el que la NMP se agota en el cultivo y la bacteria debe cambiar sus procesos metabólicos para ser capaz de utilizar el PURh. En contraste, existen otros aspectos que determinan el comportamiento de la absorbencia del medio de cultivo, tales como el comportamiento de la bacteria en el medio o su lisis. Debido a esto queda pendiente la determinación de la biomasa celular, a fin de concluir sobre dicha sugerencia.

En *Comamonas acidovorans* TB35, tanto la esterasa extracelular como la que se encuentra unida a la pared celular son capaces de atacar el poliuretano. Sin embargo, la actividad asociada a la pared es diez veces mayor a la encontrada en el sobrenadante (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995; Akutsu *et al.*, 1998; Shigeno-Akutsu *et al.*, 1999). En este trabajo no analizamos la posibilidad de la existencia de una esterasa asociada a la

pared celular en *Acinetobacter* sp., por lo que esta posibilidad deberá ser analizada en estudios posteriores.

El pH óptimo de actividad de la enzima se encuentra cercano al valor de pH del medio de cultivo. Esto es común en bacterias denominadas neutrofilicas, esto es que son capaces de mantener un crecimiento óptimo a pH alrededor de 7 o ligeramente menor (Horikoshi, 1999). Por otro lado, la temperatura óptima de actividad de la enzima fue cercana a la temperatura de crecimiento de la bacteria, lo que también resulta en una mejor transformación del sustrato. Adicionalmente, las condiciones mencionadas se encuentran dentro de los intervalos reportados para la mayoría de las bacterias (Madigan *et al.*, 2003).

5. ¿Podría la actividad producida por *Acinetobacter* ser una lipasa?

No son claras las diferencias entre las esterasas y las lipasas, ya que tanto unas como otras hidrolizan y forman enlaces de tipo éster. Se ha establecido que acilgliceroles de más de 10 átomos de carbono son sustratos para las lipasas en contraposición con acilgliceroles menores a 10 átomos de carbono que son sustratos habituales de esterasas (Jaeger *et al.*, 1999). Sin embargo, se han enumerado características adicionales, que aunque no son exclusivas de lipasas, es común que sean ellas quienes las presenten. Estas características son: (a) la capacidad de actuar en medios orgánicos, (b) gran cantidad de aminoácidos con carácter hidrofóbico, (c) la presencia de una “tapa” sobre el sitio catalítico que en presencia del sustrato genera un cambio conformacional que favorece la unión del sustrato, y (d) la denominada “activación interfacial” que representa un aumento en la actividad en presencia de interfaces hidrofóbicas (Jaeger *et al.*, 1999, Kouker y Jaeger, 1987, Fojan *et al.*, 2000, Kvittingen, 1994).

El ensayo de actividad esterasa empleado en este trabajo no diferencia si la actividad encontrada en el sobrenadante del medio de cultivo es de tipo carboxilesterasa o de tipo lipasa (Kouker y Jaeger, 1987, Gupta *et al.*, 2002). Sin embargo, varias características de la actividad esterasa de *Acinetobacter* sp. permiten sugerir que podría tratarse de una lipasa. Estas características son: (a) que la actividad encontrada presenta un pH óptimo de 7.5, cercano al óptimo reportado para lipasas, de entre 8 y 9. El pH óptimo reportado para actividades de esterasas es de entre 5.5 y 6.5 (Fojan *et al.*, 2000); (b) el carácter hidrofóbico del sustrato (PUR) requiere que la enzima tenga dominios de unión al sustrato de carácter hidrofóbico, lo cual es característico de lipasas (Gupta *et al.*, 2003, Bornscheuer, 2002). (c) el ensayo *in vitro* para determinar la actividad enzimática contiene un solvente orgánico (acetonitrilo) y la enzima es capaz de funcionar adecuadamente, lo cual es típico de lipasas (Bornscheuer, 2002, Jaeger y Reetz, 1998); (d) el análisis cinético de la actividad no se ajusta a un modelo Michaeliano, aunque tampoco se ajusta completamente al modelo de Hill. La actividad enzimática de las lipasas no sigue un modelo Michaeliano ya que las reacciones lipolíticas ocurren en la interfase lípido-agua, y el modelo solo aplica si la reacción catalítica se lleva a cabo en fase homogénea (Jaeger y Reetz, 1998, Verger, 1997).

De acuerdo con los resultados presentados, es posible que la enzima detectada sea una lipasa, sin embargo esta hipótesis requiere de comprobación en estudios posteriores.

X. CONCLUSIONES

1. Se aislaron dos cepas identificadas como *Acinetobacter* sp. capaces de crecer en poliuretano hidrosoluble (Hydroform®) como única fuente de carbono.
2. Estas bacterias son capaces de emplear tanto N-metilpirrolidona como poliéster-poliuretano como fuente de carbono.
3. Se detectó una actividad enzimática extracelular de tipo esterasa, cuya producción aumentó en presencia de poliéster-poliuretano.

XI. PERSPECTIVAS

La mejor caracterización bioquímica y fisicoquímica de la esterasa permitirá conocer mejor los mecanismos de degradación de la resina. Para ello, se requiere trabajar en la purificación de la enzima. Lo anterior permitirá saber si se trata de una nueva enzima capaz de degradar el poliuretano, o si es una ya reportada y cuya actividad sobre el poliuretano no había sido probada.

Queda por explorar el papel de actividades enzimáticas adicionales capaces de atacar el PUR, localizadas en la superficie de las bacterias o intracelularmente. Con estos conocimientos se podrán establecer bases para el posible uso industrial de la cepa o de la enzima en tratamiento de residuos.

XII. ANEXOS

1. FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

A) Medio YES. (Howard *et al.*, 1999)

Solución A.

K_2HPO_4	50	g
KH_2PO_4	25	g
Agua c.b.p.	1000	ml

Solución B.

$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	50	g
Agua c.b.p.	1000	ml

Solución C.

$MnCl_2 \cdot 4H_2O$	1.000	g
$CuCl_2 \cdot 2H_2O$	0.014	g
$ZnCl_2$	0.011	g
$CoCl_2 \cdot 6H_2O$	0.020	g
$Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$	0.013	g
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.075	g
Agua c.b.p.	500	ml

Preparación. Preparar y las soluciones B y C, filtrar y esterilizar. Guardar a temperatura ambiente. Preparar la solución A y diluirla 1:50 con agua

destilada; adicionar 0.4 g de NH_4Cl , 4.0 g de gelatina y 20 mg de extracto de levadura por litro y esterilizar. A un litro de la preparación de la solución A, adicionar 10 ml de solución B y 1 ml de solución C. Adicionar Impranil DLN (o algún homólogo) para completar el medio YES. El pH final debe ser 7.2.

B) Medio Basal. (Composición por litro. Basado en el medio propuesto por Nakajima-Kambe *et al.*, 1995)

Solución A. (10x)

- | | |
|----------------------------|--------|
| ➤ KH_2PO_4 | 20.0 g |
| ➤ K_2HPO_4 | 70.0 g |

Solución B. (100x)

- | | | |
|---|--------|-----------|
| ➤ NH_4NO_3 | 100.0g | Ver nota. |
| ➤ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 10.0 g | |

Solución Elementos traza. (1000x)

- | | |
|---|--------|
| ➤ $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 1.0 g |
| ➤ $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 0.10 g |
| ➤ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ | 10.0 g |
| ➤ $\text{MnSO}_4 \cdot 4-6\text{H}_2\text{O}$ | 2.0 g |

Nota: Omitir el NH_4NO_3 si se prueba PUR como única fuente de nitrógeno.

Preparación: Preparar las soluciones A y B y esterilizar en autoclave a 120°C / 20 minutos. Preparar la solución de elementos traza y esterilizar por filtración. A 800 ml de agua estéril adicionar en condiciones asépticas 100 ml de solución A, 10 ml de solución B y 1 ml de solución de elementos traza. Llevar a un litro y distribuir en matraces o tubos. En caso de adicionar la resina como fuente de carbono, sustituir 100 ml de agua estéril por 100 de solución 10x de resina esterilizada por filtración. En caso de usar polvo de poliuretano como fuente de carbono, adicionar 1% del mismo al medio de cultivo. Por último, si se preparan placas de agar MB esterilizar el agua con el equivalente a 1.5 % de concentración final de agar. pH final del medio: 7.2.

C) Medio de hidrólisis de Tween ® 80. Composición por litro.

❖ Agar	12.0 g
❖ Peptona	10.0 g
❖ NaCl	5.0 g
❖ CaCl ₂	0.1 g
❖ Tween ® 80	10.0 ml

Preparación: Adicionar los componentes a un matraz, calentar hasta ebullición y agitar hasta disolución total. Distribuir en tubos o matraces y esterilizar en autoclave a 121 °C/15 minutos. Antes de que solidifiquen vaciar en placas y dejar enfriar.

D) Agar Urea de Christensen. Composición por litro.

❖ Urea	20.0 g
❖ Agar	15.0 g
❖ NaCl	5.0 g
❖ KH ₂ PO ₄	2.0 g
❖ Peptona	1.0 g
❖ Glucosa	1.0 g
❖ Rojo fenol	0.012g

Preparación: Adicionar todos los componentes, excepto el agar a 100 ml de agua deionizada, agitar hasta disolución y esterilizar por filtración (solución A). Aparte, adicionar el agar en 900 ml de agua deionizada y calentar a ebullición, agitando hasta disolución. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos. Enfriar a 50 °C y adicionar en forma aséptica la solución A. Mezclar y distribuir en cajas o tubos (en cuyo caso se colocan en posición inclinada).

2. REPORTE DE LA CARACTERIZACIÓN BIOLÓGICA



FACULTAD DE QUÍMICA
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA
CEPARIO



DRA. HERMINIA LOZA TAVERA
Profesor de carrera, TC
Departamento de Bioquímica, Fac. de Química UNAM.

PRESENTE:

El resultado de la identificación de los microorganismos es el siguiente:

402-1, 402-2, 402-4 = *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*. En un 92 % de similitud.

La similitud con el género *Acinetobacter* es del 100 %.

La similitud con *Acinetobacter junii* es del 75 % con las pruebas bioquímicas que se realizaron

La bibliografía utilizada es Murray, P.R.; Jo, B.E.; Pfäller, M.A.; Tenover, F.C.; Tenover, R.H. (1999): Manual of Clinical Microbiology. 7ª Edition. American Society for Microbiology, Washington, D.C.

Sin más por el momento quedo de usted.

ATENTAMENTE:
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Ciudad Universitaria a 3 de octubre de 2003

Biol. Luciano Hernández Gómez
Jefe del Cepario de la Facultad de
Química, U.N.A.M.

Edificio "A" primer piso. Ciudad Universitaria 04510, México, D.F Teléfono 56-22-37-36 y Fax: 622 36 96
E mail: lhergom@servidor.unam.mx

	402-1	402-2	402-4
Oxidasa	0	0	0
Crec. Mc	1	1	1
Crec. Cet	0	0	0
Crec. 42° C	1	1	1
Citrato	0	0	0
Esculina	0	0	0
Gelatina	0	0	0
Sulfhidrico	0	0	0
Indol	1	1	1
Movilidad	0	0	0
Lisisna	0	0	0
Ornitina	0	0	0
Arginina	0	0	0
Gas Nitratos	0	0	0
Red Nitratos	1	1	1
Red. Nitritos	1	1	1
Crec NaCl 6.5%	0	0	0
Malonato	1	1	1
Fenil alanina	0	0	0
Urea	0	0	0
VP/RM	0	0	0
Pigmento	0	0	0
O/F glucosa	0/0	0/0	0/0
Glucosa	0	0	0
Lactosa	0	0	0
Xilosa	0	0	0

0 = negativo

F= fermentador

1 = positivo

402-1, 402-2, 402-4 = *Acinetobacter calcoaceticus* var. *lwoffii*.

3. ANÁLISIS DE RESONANCIA MAGNÉTICA NUCLEAR Y ESPECTROMETRÍA DE INFRARROJO



Reporte: Resina de uretano

Resonancia Magnética Nuclear ^1H (Protónica)

desplazamiento (ppm)	grupo funcional	multiplicidad	integración
0.99	CH_3	doblete	3
1.14	CH	tripleto	1
1.87	CH_2	quintuplete	2
2.25	CH_2	tripleto	2
2.65	$\text{CH}_2\text{-N<}$	singulete	3
3.05	CH-O	cuadruplete	1
3.2	$\text{CH}_2\text{-N}$	singulete	seis protones
3.3	$\text{CH}_2\text{-COO}$	multiplete	
3.5	$>\text{CH-OH}$	singulete	
3.8	CH-O	sextuplete	trazas
4.68	CH-COOH	tripleto	trazas
8.28	COOH	singulete	trazas

Dado que el espectro se obtuvo en D_2O como disolvente, las señales de OH no aparecen, sin embargo se avistan trazas de ácido carboxílico. Cabe mencionar la ausencia de dobles ligaduras en la muestra.

Resonancia Magnética Nuclear ^{13}C (carbono)

desplazamiento	grupo funcional
10.32	CH_3
16-20	CH_2
48-50	$\text{CH}_2\text{-OH}$
19, 32, 52	C-N
57-60	$\text{CH}_2\text{-C-N}$
70-78	$\text{CH}_2\text{-O-CO}$
180	$>\text{C=O}$ ácido

Señales de IR (polímero)

Banda cm^{-1}	grupo
3416	C=O éster, $-\text{OH}$
2929 y 2856	CH_2
1727	C=O éster
1665	C=O amida
1536	C-N
1435	CH_2
1245	$\text{CH}_2\text{-CO-O-}$ éster

La banda de aproximadamente 3300cm^{-1} se afina, lo que indica menor presencia de alcoholes en la muestra destilada. La relación entre las bandas en $1730\text{-}1660\text{cm}^{-1}$ en la resina es casi equivalente, mientras que en el destilado la relación entre estas bandas se inclina hacia los grupos éster.

4. ESPECIFICACIONES DE PROVEEDOR DEL Hydroform®.



Imprimar e hidroform

POLY-FORM DE MEXICO, S.A. DE C.V.

M.R.

LA PINTURA QUE DURA MAS

BELLAVISTA No. 559
COL. SAN NICOLAS TOLENTINO
APDO. POSTAL 55-401
MEXICO 13. D.F. C.P. 09850

TELS 5 612-0145 5 612-3477
5 612-1345 5 612-2385
TELEFAX 5 612-7893

E-MAIL: polyform@mai internet.com.mx

INFORMACION TECNICA**HYDROFORM****BARNIZ POLIURETANO BASE AGUA****DESCRIPCION DEL PRODUCTO:**

Barniz elaborado con resinas de poliuretano de tipo alifático para interiores y exteriores.
emulsionable al agua.

PRESENTACION:

Hydroform sistema un bote, disponible en: ½ lt., 1 lt., galón 4 lts. y porrón de 20 lts.

Línea alifática (etiqueta azul) para interiores y exteriores

- Transparente brillante No. 60-28
- Transparente semi-mate No. 60-26
- Transparente mate No. 60-24

USOS RECOMENDADOS:

Se puede aplicar sobre corcho, loseta de barro, loseta vinílica, concreto, pisos, puertas y muebles de madera, etc.

ESPECIFICACIONES FISICAS:

Características Físicas	Alifático para exteriores No. 60-28
Tipo	Emulsion de poliuretano alifático 100% base agua
Presentación	1 componente
Disolvente	Agua
Aspecto	Lechoso
Acabado	Brillante 100%
Tiempo de secado al tacto	20 min.
Fraguado	2 horas
Sólidos	30% +/- 1
Viscosidad	60 - 100 cps.
Densidad	1.04 - 1.06 g/cc.
Pli	7 +/- 0.5
Dureza	Muy buena
Brillo	100%
Rendimiento teórico	12 m² x lt. a mil de pulg. en superficie sellada
Regulación voc	Cumple

NOTA: A MAYOR TEMPERATURA EL TIEMPO DE SECADO Y FRAGUADO SERAN MAS RAPIDOS A MAYOR HUMEDAD EL SECADO ES MAS LENTO. ESTAS PRUEBAS SE EFECTUARON A 20° C Y 25% H.R.

4. ESPECIFICACIONES DE PROVEEDOR DEL Hydroform®. (continuación)

1. Observe que la superficie sobre la cual se aplique, no tenga humedad, grasa, cera, aceite, polvo o material suelto.
2. Si la superficie no tiene poro para un buen anclaje solicite asesoría técnica.
3. Aplique con brocha, rodillo, aplicador o método convencional.
4. Para dar un buen acabado se recomienda dar una mano de sellador Sealer Form No. 40-30
5. Asentar con lija N° 240 ó 320 y quitar el polvo con un trapo humedecido en agua (bien exprimido)
6. Aplicar dos manos de acabado (asentando entre mano y mano). En superficies de mayor tráfico de una tercera mano.

PRECAUCIONES:

- BARNIZ POLIURETANO ALIFATICO 100% BASE AGUA.
- NO SE DEJE AL ALCANCE DE LOS MENORES DE EDAD.
- NO SE INGIERA, EN CASO DE INGESTION, NO SE PROVOQUE EL VOMITO. SOLICITE ATENCION MEDICA DE INMEDIATO. EVITE EL CONTACTO CON LA PIEL Y CON LOS OJOS.
- EL USO DE ESTE PRODUCTO POR NIÑOS DEBE SER SUPERVISADO POR ADULTOS.

XIII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abdel-El-Haleem D. 2003. *Acinetobacter*: environmental and biotechnological applications. *Afric J Biotechnol*, 2: 71-74
2. Åkesson B, Jönsson BAG. 1997. Major metabolic pathway for N-methylpyrrolidone in humans. *Drug Metabol Disp*, 25: 267-269
3. Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T. 1998. Purification and Properties of a Polyester Polyurethane-Degrading Enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. *App Environ Microbiol*, 64: 62-67
4. Allen AB, Hilliard N, Howard GT. 1999. Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans*. *Int Biodeg Biodet*, 43: 37-41
5. Anderson JM, Hiltner A, Wiggins MJ, Schubert MA., Collier TO, Kao WJ, Mathur AB. 1998. Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation. *Polym Int*, 46: 163-171
6. Bach H, Berdichevsky Y, Gutnick D. 2003. An Exocellular Protein from the Oil-Degrading Microbe *Acinetobacter venetianus* RAG-1 Enhances the Emulsifying Activity of the Polymeric Bioemulsifier Emulsan. *App Environ Microbiol*, 69: 2608-2615
7. Bornscheuer UT. 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiol Rev*, 26: 73-81
8. Carr EL, Kampfer P, Patel BKC, Gurtler V, Seviour RJ. 2003. Seven novel species of *Acinetobacter* isolated from activated sludge. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53: 953-963
9. Chow ST, Ng TL. 1983. The biodegradation of N-methyl-2-pyrrolidone in water by sewage bacteria. *Wat Res*, 17: 117-118
10. Crabbe JR, Campbell JR, Thompson L, Waltz SL, Schultz WW. 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *Int Biodeg Biodet*, 33: 103-113

11. Darby RT, Kaplan AM. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *App Microbiol*, 16: 900-905
12. El-Sayed AHMM, Mahmoud WM, Davis EM, Coughlin RW. 1996. Biodegradation of polyurethane coatings by hydrocarbon-degrading bacteria. *Int Biodeg Biodet*, 37: 69-79
13. Fojan P, Jonson PH, Petersen MTN, Petersen SB. 2000. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochemie*, 82: 1033-1041
14. Gupta N, Rath P, Gupta R. 2002. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay for lipases and esterases. *Anal Biochem*, 311: 98-99
15. Gupta R, Rath P, Gupta N, Bradoo S. 2003. Lipase assays for conventional and molecular screening: an overview. *Biotechnol Appl Biochem*, 37: 63-71
16. Horikoshi K. 1999. Alkaliphiles: Some Applications of Their Products for Biotechnology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 735-750
17. Howard GT, Blake RC. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. *Int Biodeg Biodet*, 42: 213-220
18. Howard GT, Crother B, Vicknair J. 2001. Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (pueB) from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int Biodeg Biodet*, 47: 141-149
19. Howard GT, Hilliard NP. 1999. Use of Coomassie blue-polyurethane interaction in screening of polyurethanase proteins and polyurethanolytic bacteria. *Int Biodeg Biodet*, 43: 23-30
20. Howard GT, Ruiz C, Hilliard NP. 1999. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *Int Biodeg Biodet*, 43: 383-28
21. Howard, G. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeg Biodet*, 49: 245-252
22. Jaeger KE, Dijkstra BW, Reetz MT. 1999. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu Rev Microbiol*, 53: 315-351
23. Jaeger KE, Reetz MT. 1998. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trend Biotechnol*, 19: 396-403

24. Jendrossek D, Handrick R. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates. *Annu Rev Microbiol*, 56: 403-432
25. Kasuya KI, Inoue Y, Tanaka T, Akehata T, Iwata T, Fukui T, Doi Y. 1997. Biochemical and molecular characterization of the polyhydroxybutyrate depolymerase of *Comamonas acidovorans* YM1609, isolated from freshwater. *App Environ Microbiol*, 63: 4844-4852
26. Kay MJ, McCabe RW, Morton HG. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *Int Biodeg Biodec*, 31: 209-225
27. Kay MJ, Morton LHG, Prince EL. 1991. Bacterial degradation of polyester polyurethane. *Int Biodec*, 27: 205-222
28. Koma D, Hasumi F, Yamamoto E, Ohta T, Chung SY, Kubo M. 2001. Biodegradation of Long-Chain n-Paraffins from Waste Oil of Car Engine by *Acinetobacter* sp. *J Biosc Bioeng*, 91: 94-96
29. Kouker G, Jaeger KE. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipases. *App Environ Microbiol*, 53: 211-213
30. Kvittingen L. 1994. Some aspects of biocatalysis in organic solvents. *Tetrahedron*, 50: 8253-8574
31. Lee S, Teramoto Y, Shiraishi N. 2002. Biodegradable polyurethane foam from liquefied waste paper and its thermal stability, biodegradability and genotoxicity. *J App Polym Sc*, 83: 1482-1489
32. Lovrien R, Matulis D. 1995. Assays for total protein. en *Current Protocols in Protein Science*, Unidad 3.4: 38010
33. Madigan MT, Martinko JM, Parker J. 2003 *Brock Biología de los microorganismos*. Ed. Pearson Prentice Hall. 10ª edición.
34. Madison LL, Huisman GW. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol Mol Biol Rev*, 63: 21-53
35. Nakajima-Kambe T, Onuma F, Akutsu Y, Nakahara T. 1997. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. *J Ferm Bioeng*, 83: 456-460
36. Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara, T. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS Microbiol Lett*, 129: 39-42

37. Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara T. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl Microbiol Biotech*, 51: 134-140
38. Noe FF, Nickerson WJ. 1958. Metabolism of 2-pyrrolidone and γ -aminobutyric acid by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol*, 75: 674-681
39. Nomura N, Shigeno-Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nakahara T. 1998. Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB35. *J Ferm Bioeng*, 86: 339-345
40. Pathirana RA, Seal, KJ. 1983. A potential biodeteriogen of polyester-polyurethane elastomers. *Biodeterioration*, 5: 679-689
41. Roelofs CR, Ellenbecker MJ. 2003. Source reduction for prevention of methylene chloride hazards: cases from four industrial sectors. *Environ Healt: A Glob Acc Sc S*, 2: 9
42. Rowe L, Howard GT. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodeg Biotet*, 50: 33-40
43. Ruiz C, Howard GT. 1999. Nucleotide sequencing of a polyurethanase gene (pudA) from *Pseudomonas fluorescens*. *Int Biodeg Biotet*, 44: 127-131
44. Ruiz C, Main T, Hilliard NP, Howard GT. 1999. Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int Biodeg Biotet*, 43: 43-47
45. Rutkowska M, Krasowska K, Heimowska A, Steinka I, Janik H. 2002. Degradation of polyurethanes in sea water. *Polym Deg Stab*, 76: 233-239
46. Santerre JP, Labow RS, Duguay DG, Erfle D, Adams GA. 1994. Biodegradation evaluation of polyether and polyester-urethanes with oxidative and hydrolytic enzymes. *J Biomed Mater Res*, 28: 1187-1199
47. Shigeno-Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T. 1999. Purification and properties of culture-broth-secreted esterase from the polyurethane degrader *Comamonas acidovorans* TB-35. *J Biosc Bioeng*, 88: 484-487
48. Shimao, M. 2001. Biodegradation of plastics. *Curr Op Biotech*, 12: 242-247
49. Stern RV, Howard GT. 2000. The polyester polyurethane gene (pudA) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase. *FEMS Microbiol Lett*, 185: 163-168

50. Uhlig K. 1992. Polyurethanes. in Ullman's Encyclopedia of Industrial Chemistry., A21: 708-711
51. Ulrich H. 1997. Urethane Polymers. en Kirk-Othmer Encyclopedia of Chemical Technology, 24: 695-726
52. van der Meer JR, de Vos WM, Harayama S, Zehnder AJ. 1992. Molecular mechanisms of genetic adaptation to xenobiotic compounds. Microbiol Rev, 12: 677-694
53. Vega RE, Main T, Howard GT. 1999. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*. Int Biodeg Biodet, 43: 49-50
54. Verger R. 1997. "Interfacial activation" of lipases: facts and artifacts. Trend Biotechnol, 15: 32-38
55. Watanabe K, Hamamura N. 2003. Molecular and physiological approaches to understanding the ecology of pollutant degradation. Curr Op Biotech, 14: 289-295
56. Witte CP, Medina-Escobar N. 2001. In-Gel Detection of Urease with Nitroblue Tetrazolium and Quantification of the Enzyme from Different Crop Plants Using the Indofenol Reaction. Anal Biochem, 290: 102-107