



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

Facultad de Química

Caracterización del crecimiento de  
*Alicyclophilus sp.* BQ5 en poliuretano

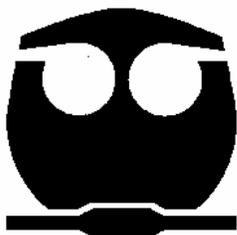
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

**Claudia Julieta Solís González**



MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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).

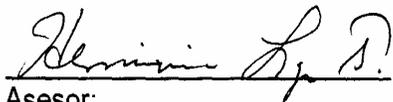
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

## JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE Prof. Jorge Soto Soria  
VOCAL Prof. Jorge Manuel Vázquez Ramos  
SECRETARIO Profra. Herminia de Jesús Loza Tavera  
1er. SUPLENTE Profra Mireya Rodríguez Penagos  
2º SUPLENTE Profra. Irma Ruiz Silva

## SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Laboratorio 105. Conjunto E  
Departamento de Bioquímica.  
Facultad de Química, UNAM.



Asesor:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera



Supervisor Técnico:

Dr. Martín Pedro Vargas Suárez



Sustentante:

Claudia Julieta Solís González

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Herminia Loza Tavera por su enseñanza y oportunos consejos, por la atención que dedicó a mi formación como profesionalista pero sobre todo por la confianza que siempre ha tenido en mí.

Al Dr. M. Javier Cruz Gómez del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química, UNAM por el apoyo técnico y económico brindado durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Carmen Wachter Rodarte y a la M. en C. Sandra Bolaños Núñez del Departamento de Alimentos de la Facultad de Química, UNAM por su valioso apoyo durante la identificación del género de *Alicyclophilus sp.*

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM por haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones.

Al Dr. Martín Vargas Suárez por su apoyo y por la valiosa amistad que siempre me ha brindado.

A la M. en C. María del Carmen Parra por sus buenos consejos, su cariño y gran amistad.

A mis compañeros del laboratorio 105 por su amistad y buenos deseos.

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

A mi padre, Emilio Solís Moreno porque con tu ejemplo me has enseñado los valores que un verdadero ser humano debe tener y que en la vida lo que importa es llevar siempre la frente en alto. Gracias a ti, porque juntos al fin llegamos al otro lado.

A mi madre, Sara González Solano por darme la maravillosa oportunidad de vivir, por tu apoyo incondicional durante este largo camino, por tu infinita fe en mí, por enseñarme que jamás debo olvidar mis sueños, por convertirme en la mujer que soy ahora, pero más que nada, por ser siempre mi mejor amiga.

A mis hermanos, Joaquín porque has compartido conmigo todas las adversidades y bendiciones que la vida nos ha dado y al pequeñito Luis porque con tu llegada no sólo iluminaste nuestro hogar sino también todas nuestras vidas.

A ustedes cuatro por su inmenso amor, por su inquebrantable confianza en mí y su constante apoyo, muchas gracias.

A mis abuelos, tíos y primos por su cariño, apoyo y confianza.

A mis profesores por ser la guía para encontrar el camino a mi verdadera vocación.

A Paulina y Alberto por demostrarme siempre con acciones que más que mis amigos se han convertido en mis hermanos.

A todos mis amigos (Ernesto, Emmanuel, Lore, Mariana, Brenda, Luis, Lalo, Fer, Vanessa, Ivonne, todos los pumitas, Claudia y aquellos que por el momento llegue a omitir) gracias por sus palabras de apoyo y por los increíbles momentos que han compartido conmigo.

Por último, gracias a todas las personas que con gratificantes o dolorosas circunstancias han hecho de mi la persona que soy ahora y porque me han dado la fuerza para vivir al máximo cada instante.

## ABREVIATURAS

PB	Solución amortiguadora de fosfatos (phosphates buffer)
GASP	Ventaja de crecimiento en fase estacionaria (Growth advantage in stationary phase)
GPL	Glicopeptidolípidos
LB	Luria Bertani
MM	Medio mínimo
MM-PUh	Medio mínimo con Hydroform <sup>®</sup>
p-NPA	p-Nitrofenilacetato
p-NP	p-Nitrofenol
PU	Poliuretano
PE-PU	Poliuretano-poliéter
PS-PU	Poliuretano-poliéster
SDS	Dodecil sulfato de sodio
SN	Sobrenadante
TES	Amortiguador Tris-EDTA-Sodio

## CONTENIDO

Abreviaturas	v
Contenido	vi
Índice de tablas y figuras	viii
1. Resumen	1
2. Antecedentes	4
2.1 Poliuretano	4
2.2 Biodegradación del poliuretano	6
2.3 Origen de la cepa BQ5	7
2.4 Formación de biocapas y cambios en la morfología colonial de las bacterias	8
3. Objetivos	12
4. Estrategia experimental	13
5. Materiales y métodos	15
5.1 Aislamiento de la cepa BQ5	15
5.2 Caracterización del crecimiento de la cepa BQ5	15
5.3 Identificación de BQ5 mediante la secuenciación del gene RNAr 16S	18
5.4 Determinación de los factores que inducen el cambio de morfología en la bacteria	19
5.5 Evaluación del crecimiento bacteriano en función de la concentración de sustrato	19
5.6 Medición de la actividad enzimática de tipo esterasa en el sobrenadante de los cultivos bajo distintas concentraciones de sustrato	22
5.7 Medición de la actividad de tipo esterasa asociada a la membrana de las células	24
5.8 Evaluación del efecto bacteriano sobre laminillas de Hydroform sólidas	24
6. Resultados	26
6.1 Los primeros cultivos a partir de gliceroles con la cepa BQ5 presentaron tres variantes en la morfología de las colonias.	26
6.2 Cada una de las tres variantes produce los tres tipos de morfología	28

6.3	Al establecer condiciones de cultivo más homogéneas únicamente se obtuvieron las VL y VR	31
6.4	Identificación de <i>Alicyclophilus sp.</i> mediante la secuenciación del rRNA 16S	34
6.5	Pruebas para tratar de identificar que factor induce el cambio de morfología en la bacteria	34
6.6	Evaluación del crecimiento de <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ5 en función de la concentración de sustrato	37
6.7	Medición de la actividad enzimática de tipo esterasa en el sobrenadante de los cultivos bajo distintas concentraciones de sustrato	41
6.8	Efecto del crecimiento bacteriano sobre Hydroform sólido	42
7	Discusión	44
7.1	Origen y características particulares de la cepa BQ5	44
7.2	La presencia de variantes en la morfología de las colonias bacterianas surge como respuesta a diversos factores	45
7.3	Las tres morfologías observadas se comportan como formas revertantes de las colonias	47
7.4	La variación fenotípica se presenta como un fenómeno natural de la cepa BQ5	48
7.5	La cepa BQ5 forma autoagregados y biofilm en medio líquido	50
7.6	Identificación de la cepa BQ5 de <i>Alicyclophilus sp.</i>	52
7.7	Caracterización del crecimiento en función de la concentración de sustrato	53
7.8	Determinación de la actividad enzimática de tipo de esterasa en el sobrenadante de cultivos con MM-PUh	55
7.9	Efecto bacteriano sobre laminillas de Hydroform sólido	57
8	Conclusiones	59
9	Anexos	60
10	Bibliografía	66

## Índice de tablas y figuras

- Figura 1. Reacción de síntesis del poliuretano (PU)
- Figura 2. Sitios posibles de actividad enzimática por parte de microorganismos degradadores
- Figura 3. Crecimiento de BQ5 en MM-PUh al 0.3%
- Figura 4A. Detección de la actividad esterasa en agar Tween 80®
- Figura 4B. Determinación de la actividad esterasa en el sobrenadante de los cultivos por el método de hidrólisis del p-NPA
- Figura 5. Pasos implicados en la formación de una biocapa
- Figura 6. Reacción de hidrólisis del pNPA
- Figura 7. Presencia de tres variantes morfológicas en los primeros cultivos de la cepa BQ5
- Figura 8. Tres tipos de morfología de la cepa BQ5 en medio LB sólido
- Figura 9. Siembra de la cepa BQ5 por estría cruzada
- Figura 10. Crecimiento en medio líquido de las tres variantes encontradas en la morfología colonial de la cepa BQ5
- Figura 11. Siembra de cepa BQ5 por dilución
- Figura 12. Crecimiento de las colonias VL y VLR en medio LB y MM-PUh después de 18 h
- Figura 13. Alineamiento de secuencias del gen RNA 16S de la cepa BQ5 y de *Alicyclophilus sp. R-24604*
- Figura 14. Efecto del poliuretano sobre la morfología de BQ5 a través del tiempo
- Figura 15. Los cambios de morfología se observaron también en cultivos en LB
- Figura 16. Incremento del peso seco de la cepa BQ5 en distintas concentraciones de sustrato
- Figura 17. Crecimiento de la cepa BQ5 en función de la concentración de MM-PUh
- Figura 18. Actividad esterasa medida en el SN de los cultivos en diferentes concentraciones de MM-PUh por el método de hidrólisis del p-NPA
- Figura 19. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las laminillas expuestas al cultivo de la cepa BQ5 en MM-PUh durante 50 días
- Tabla 1. Registro de variantes obtenidas en diferentes diluciones
- Tabla 2. Tipo de variantes presentadas en distintas concentraciones de MM-PUh

## 1. RESUMEN

El poliuretano (PU) es un polímero derivado de la condensación de poliisocianatos y polioles. Los PUs ya sean flexibles o rígidos, son utilizados ampliamente en la industria de la construcción, automotriz y en muchas otras más. Por su enorme versatilidad, el uso de estos polímeros se ha incrementado con los años generando una enorme cantidad de desechos. Sin embargo, su eliminación por métodos fisicoquímicos no es totalmente eficiente y resulta complicada y costosa.

La biodegradación es un proceso natural y ventajoso por permitir la eliminación de compuestos nocivos y el reciclaje de los elementos esenciales en la biósfera. En general, los PUs no son biodegradables, sin embargo, el PU de tipo poliéster ha resultado ser vulnerable al ataque por bacterias y hongos, por lo que la biodegradación podría ser una alternativa para eliminar sus desechos, o bien, para mejorar su tratamiento fisicoquímico.

En investigaciones previas, se obtuvieron tres cepas bacterianas, BQ1, BQ5 y BQ8, capaces de crecer en un medio mínimo cuya única fuente de carbono es un barniz de PU base agua, llamado Hydroform (MM-PUh) utilizado para la protección de superficies (Oceguera-Cervantes, 2005).

El objetivo de este trabajo, es la caracterización del crecimiento de la cepa BQ5 y el estudio de su capacidad para utilizar al PU como fuente de carbono, teniendo así un sistema biológico potencialmente capaz de llevar a cabo la biodegradación de este polímero.

La cepa BQ5 es un bacilo corto, gram negativo, sin asociación, capaz de formar biofilm en medio líquido. La secuenciación del gen 16S rRNA de la cepa BQ5 reveló que pertenece al género *Alicyclophillus* sp. Dentro de este género también se encuentran las cepas BQ1 y BQ8.

A diferencia de las otras cepas, la cepa BQ5 es capaz de presentar tres distintas variantes en su morfología colonial al ser cultivada en medio Luria Bertani (LB) sólido.

Las variantes capaces de intercambiarse entre sí, fueron nombradas lisa (VL), rugosa (VR) y extendida (VE). Se probaron distintas condiciones de cultivo con el objeto de tratar de identificar la condición que origina el cambio en la morfología. Sin embargo, los cambios en la morfología colonial no fueron inducidos por la presencia del PU como fuente de carbono en el medio de cultivo ni por la densidad poblacional. La morfología idéntica presentada a través del tiempo, cuando BQ5 es cultivada tanto en medio LB como en MM-PUh líquidos, sugiere que el cambio de morfología es un proceso natural en la bacteria, propio de su ciclo de crecimiento.

Las tres variantes cultivadas en medio MM-PUh formaron agregados desde el inicio del cultivo, característica que la diferencia de las otras dos cepas. En medio LB, sólo la morfología tipo VR fue capaz de generar agregados mientras que las otras variantes crecieron generando turbidez en el medio de cultivo.

La habilidad de las bacterias para agregarse posiblemente les confiera ciertas ventajas sobre aquéllas que no lo hacen. Diversas hipótesis intentan explicar la autoagregación de los microorganismos, incluyendo tipos y gradientes de sustratos, así como estrés fisicoquímico, sin embargo, aún no se conoce la causa de este fenómeno.

El crecimiento de la cepa BQ5 en MM-PUh se determinó cuantificando el peso seco durante 11 días utilizando cuatro concentraciones diferentes del PU en el medio de cultivo (0.3, 0.9, 1.5 y 3.0%). El crecimiento bacteriano presenta oscilaciones que sugieren un comportamiento cíclico, sin embargo, aún no podemos asegurarlo dado los altos valores de desviación estándar en nuestros resultados. Por otro lado, el crecimiento mantiene una relación directa con la concentración de PU, adecuándose al modelo de Monod, siendo 1.5 % la concentración en la que se alcanza el máximo desarrollo.

Se midió la actividad enzimática de tipo esterasa empleando el método de hidrólisis del p-Nitrofenil Acetato (p-NPA). La actividad esterasa determinada en el sobrenadante de los cultivos presentó también oscilaciones en su comportamiento y su máximo valor se obtuvo cuando la concentración de PU en el medio fue del 1.5%.

La actividad esterasa asociada a la membrana de las células presentó resultados muy variables, por lo que no podemos definir su comportamiento durante el cultivo.

Por último se evaluó el efecto bacteriano sobre laminillas de Hydroform sólidas tras 50 días de incubación con la bacteria. Las fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido muestran resultados que no permiten asegurar que exista un ataque sobre el PU por parte de la bacteria.

La presencia de oscilaciones en el crecimiento de la cepa en MM-PUh, así como la falta de algún efecto claro sobre las laminillas de Hydroform, nos permiten sugerir que es probable que la bacteria no utilice el PU como fuente de carbono, sino la N-metil pirrolidona (NMP), compuesto presente en el barniz comercial utilizado como fuente de PU. La utilización de este compuesto, la cual fue demostrada para las cepas BQ1 y BQ8 (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007), le permitiría desarrollarse durante la fase exponencial, en las primeras horas de cultivo. En la fase estacionaria, el consumo por las bacterias nuevas, de nutrientes liberados por la lisis de células viejas, permitiría dar una posible explicación a los ciclos observados. Para comprobar si efectivamente la bacteria no está atacando el PU será necesario analizar su estructura mediante espectroscopía de infrarrojo; por otro lado, también resultaría interesante probar un método alternativo para determinar el crecimiento bacteriano con el fin de observar si las oscilaciones se deben a variaciones experimentales o efectivamente son parte del crecimiento natural de la bacteria.

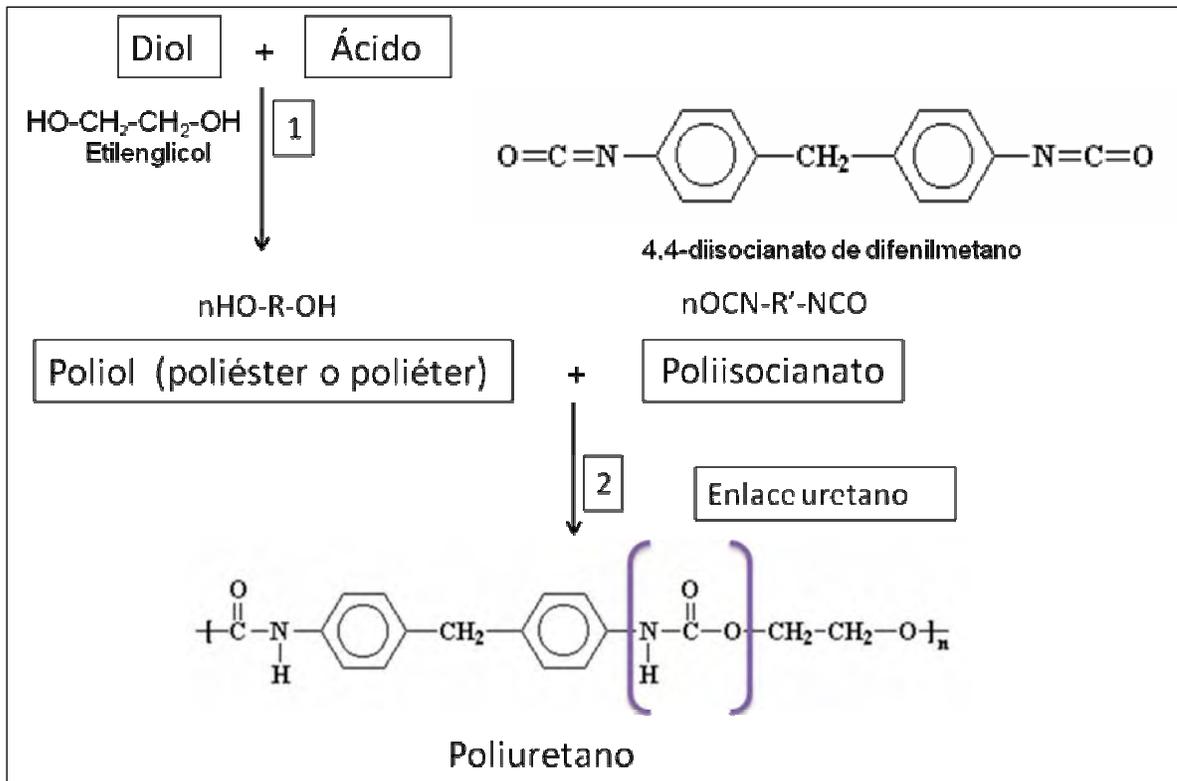
## **2. ANTECEDENTES**

### **2.1 Poliuretano**

El poliuretano (PU) es un polímero derivado de la condensación de un poliisocianato y de un poliol llevando a la formación del enlace intramolecular uretano (enlace éster carbamato -NHCOO-). De acuerdo al tipo de poliol utilizado, los poliuretanos se dividen en poliuretano de tipo poliéter (PE-PU) y poliuretano de tipo poliéster (PS-PU) (figura 1).

Los PUs presentan distintas características dependiendo de las estructuras químicas de sus precursores, por lo que adquieren distintas formas y propiedades. De manera general se clasifican en rígidos y flexibles. Los PUs flexibles son ampliamente utilizados como espumas, elastómeros, adhesivos y selladores de alto rendimiento. En la industria automotriz, se utilizan para la fabricación de sellos, empaques y juntas; por otro lado, las espumas y fibras son utilizadas para relleno en la industria mueblera. Por su parte, los PUs rígidos presentan una densidad más elevada que los PUs flexibles pero tienen características muy similares. Son utilizados como paneles para aislamiento térmico dentro de la industria de la construcción y también son utilizados en la industria automotriz como material base para defensas y volantes. Además, también existen los poliuretanos líquidos utilizados como barnices, pinturas y recubrimientos.

El uso de los PUs proporciona, en la industria y en la vida diaria, muchas ventajas en comparación con el uso de otros polímeros. Estos compuestos presentan un aumento en la resistencia a la tracción, mayor fuerza y mayores puntos de fusión logrando que sean mucho más duraderos. Por otro lado, su resistencia a la degradación por agua, aceite y otros solventes les confiere cierta predilección sobre otros tipos de plásticos.



**Figura 1. Reacción de síntesis del poliuretano (PU).** 1) La formación del grupo poliol mediante la reacción entre un diol (por lo general etilenglicol) y un ácido (por ejemplo ácido adípico). El poliol formado puede ser poliéter o poliéster, dependiendo del ácido utilizado. 2) Una vez formado el poliol, éste reacciona con un grupo diisocianato para formar el enlace uretano.

Debido a la enorme versatilidad que presentan estos polímeros, su uso se ha incrementado enormemente en las últimas décadas otorgando ciertas ventajas para la industria y facilitando la vida diaria. Sin embargo, debido a su difícil degradación, la generación de sus desechos también ha ido aumentando hasta convertirse en uno de los principales contaminantes sólidos.

El tratamiento de estos desechos por métodos físicos y químicos no es totalmente eficiente y ha resultado complicado y costoso, además en muchas ocasiones, los productos de su degradación resultan iguales o mucho más tóxicos para el ambiente de lo que resultan los propios polímeros. Debido a estas razones, en los últimos años, se han desarrollado estudios enfocados a la búsqueda de nuevas alternativas que faciliten la eliminación de estos contaminantes.

## 2.2 Biodegradación del poliuretano

La biodegradación es un proceso natural, ventajoso no sólo por permitir la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su concentración, sino que además es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales en la formación y crecimiento de los organismos.

Como la mayoría de los plásticos, los PUs no son biodegradables de manera natural. Sin embargo, el PU de tipo poliéster ha resultado ser vulnerable al ataque por bacterias y hongos (Morton y Surman 1994).

Darby y Kaplan (1968) reportaron por primera vez el ataque al PU por hongos, mientras que, en el caso de bacterias, actualmente existen reportes que describen a cepas de *Corynebacterium sp.* (Kay *et al.*, 1993), *Pseudomonas fluorescens* (Howard y Blake, 1998), *P. chlororaphis* (Howard *et al.*, 1999) y *Bacillus subtilis* (Rowe y Howard, 2002) capaces de crecer en un medio con PU y extracto de levadura o glucosa como suplementos. Por otro lado, también se ha reportado el crecimiento de *Comamonas acidovorans* TB-35 utilizando PU como única fuente de carbono (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). Por último, hace poco se publicó también la capacidad de las cepas BQ1 y BQ8 de *Alycicliphilus sp.* para degradar PU (Oceguera *et al.*, 2007).

Debido a toda la información reportada, ha surgido durante la última década un gran interés por la biodegradación, considerada quizás como una alternativa para eliminar los desechos de estos polímeros, o bien, para facilitar y mejorar su tratamiento fisicoquímico.

El mecanismo por el cual los microorganismos logran degradar a los polímeros aún no se conoce con claridad, sin embargo, dado la propia estructura química del polímero, se ha propuesto que enzimas de tipo esterasa, proteasa, ureasa y lipasa pueden actuar sobre diversos sitios de la estructura (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999) (figura 2).

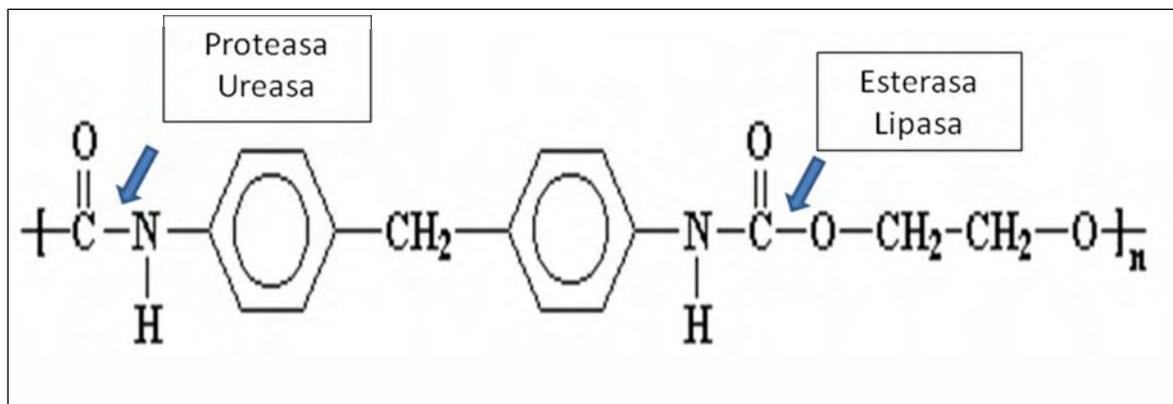
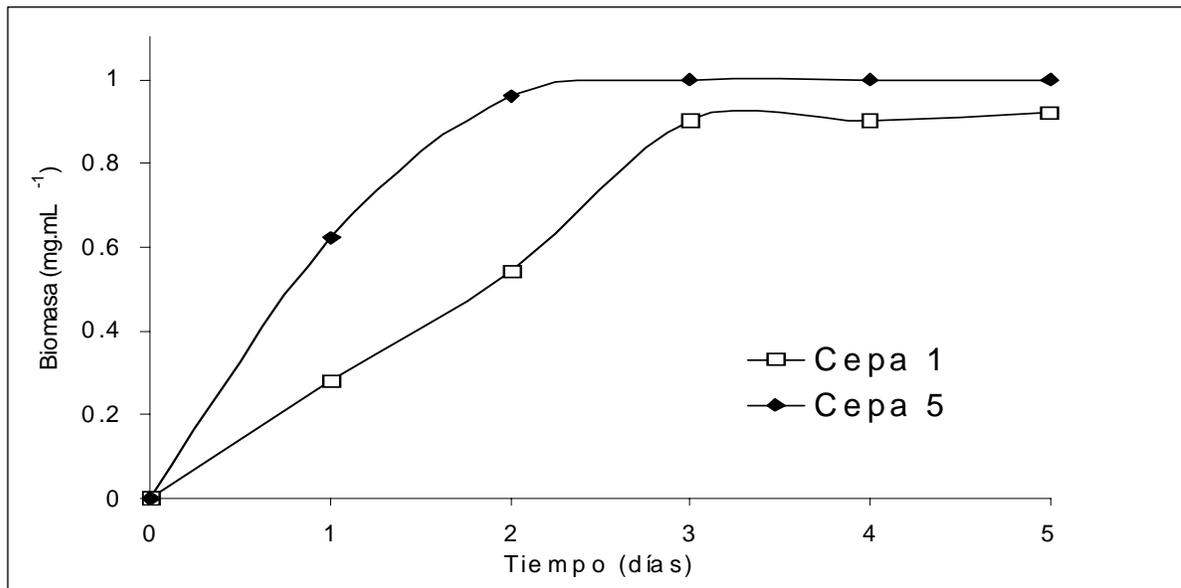


Figura 2. Sitios posibles de actividad enzimática microbiana sobre el PU.

### 2.3 Origen de la cepa BQ5

Previamente, en nuestro laboratorio la cepa BQ5 fue aislada a partir de muestras de residuos de sillones en descomposición y del suelo colectados en varias partes del basurero Bordo de Xochiaca, ubicado en el municipio de Netzahualcóyotl, estado de México (Carrillo-García, 2004).

Posteriormente, se estudió su capacidad de crecimiento en un medio mínimo de sales con PU como única fuente de carbono al 0.3% (MM-PUh). El poliuretano utilizado fue un barniz comercial llamado Hydroform<sup>®</sup>. Este barniz, producido por Polyform<sup>®</sup>, fue elegido por su alta solubilidad en agua, lo cual facilitó la preparación de los medios de cultivo (Oceguera-Cervantes, 2005). El crecimiento de la cepa BQ5 (figura 3) resultó inclusive ligeramente mejor que el de la cepa BQ1 la cual fue reportada recientemente (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007); sin embargo, en ese trabajo no se continuó el estudio de la cepa BQ5 debido a que presentaba un hábito de crecimiento distinto ya que formaba aglomerados que dificultaban su análisis.

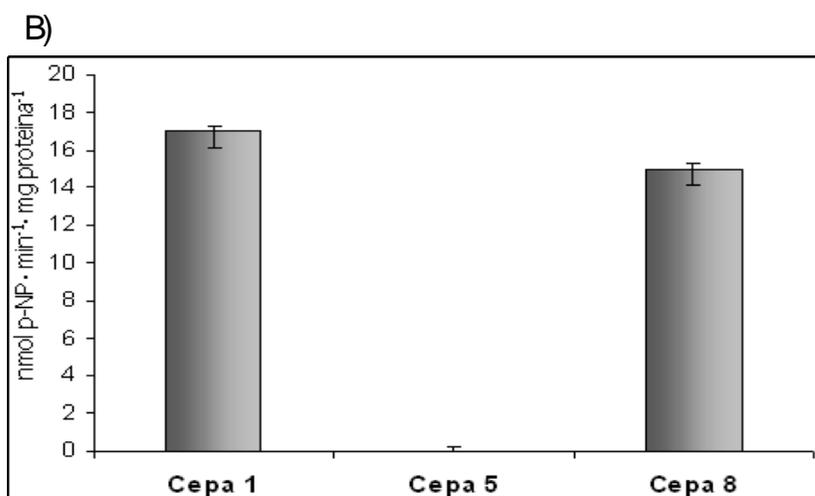
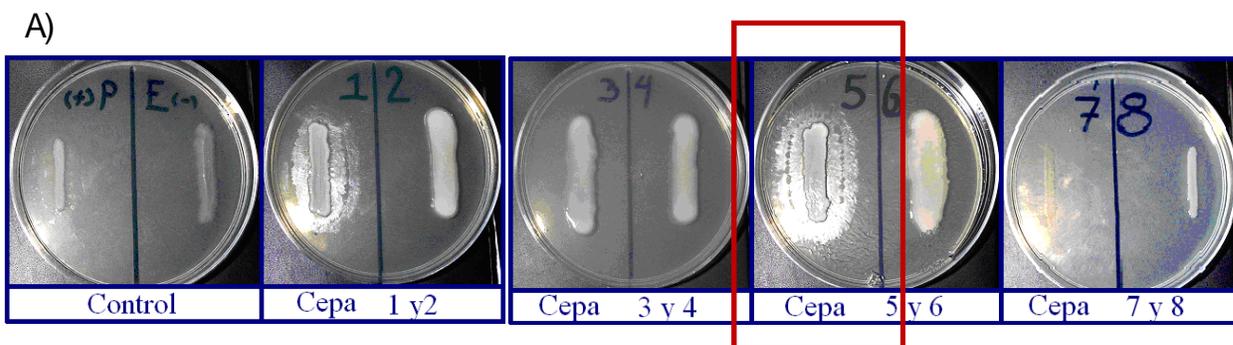


**Figura 3. Crecimiento de BQ5 en MM-PUh al 0.3 %.** También se presenta el crecimiento de la cepa BQ1, la cual es otra de las cepas estudiadas en ese trabajo. Ambos crecimientos se determinaron por peso seco. Tomado de Ocegüera-Cervantes, 2005.

Durante ese trabajo (Ocegüera-Cervantes, 2005), también se estudiaron las posibles actividades enzimáticas involucradas en la degradación del polímero por parte de la cepa, observándose que la cepa BQ5 presentaba actividad enzimática de tipo esterasa. Sin embargo, no se cuantificó dicha actividad al analizar el sobrenadante de los cultivos después de 12 h utilizando el método de hidrólisis del p-Nitrofenilacetato (p-NPA) (figura 4).

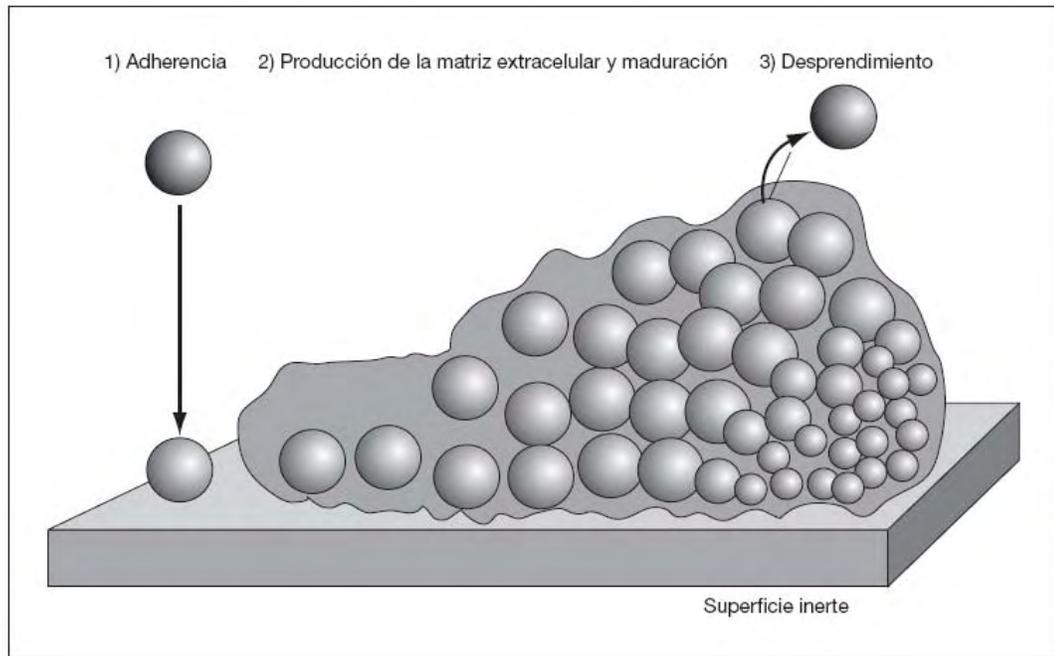
#### 2.4 Formación de biocapas y cambios en la morfología colonial de las bacterias

Un *biofilm* o biocapa bacteriana (en ocasiones también llamada biopelícula) es una comunidad de microorganismos adheridos a una superficie y envueltos en una matriz compuesta por moléculas sintetizadas por el propio microorganismo y otras procedentes del medio en el que se encuentre dicho organismo, que conforman una estructura tridimensional con una organización especial compleja (Costerton y Lewandowski, 1995).



**Figura 4. A) Detección de la actividad esterasa en agar Tween 80<sup>®</sup>.** Después de 120 h de incubación a 37° C, se observa la formación de halos de precipitación de las sales de calcio por hidrólisis de los enlaces éster del Tween 80<sup>®</sup>. Control positivo, *Pseudomonas aeruginosa* (P+); control negativo, *Escherichia coli*, DH5 $\alpha$  (E-). **B) determinación de la actividad esterasa en el sobrenadante de los cultivos por el método de hidrólisis del p-NPA.** Tomado de Ocegüera-Cervantes, 2005.

Se pueden distinguir tres pasos en su formación: 1) adherencia del microorganismo a la superficie; 2) producción de la matriz extracelular y maduración y 3) desprendimiento por parte de la biocapa al medio (figura 5). La adherencia bacteriana a una superficie está determinada por la combinación de interacciones entre la superficie bacteriana, la superficie del sustrato y el medio ambiente que los rodea. En esta interacción bacteria-superficie están implicadas fuerzas fisicoquímicas no específicas como fuerzas de Van der Waals, interacciones hidrofóbicas y polaridad (Vila y Soriano, 2008).



**Figura 5. Pasos implicados en la formación de una biocapa** (tomado de Vila y Soriano, 2008).

Las ventajas asociadas a la formación de estas estructuras incluyen la facilitación de interacciones metabólicas debido a la proximidad física entre las células, el incremento en la transferencia horizontal de genes y un aumento en la protección contra depredadores y sustancias antimicrobianas. Sin embargo, este tipo de convivencia también implica ciertas desventajas como la formación de gradientes de nutrientes, resultado de una alta densidad celular, así como la producción de metabolitos tóxicos para las propias células (Parsek, 2005).

En diferentes bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococcus pneumoniae* se ha estudiado la capacidad que tienen para presentar distintas variantes en la morfología de sus colonias. Se ha observado que diferentes presiones ambientales pueden llevar a cambios en la superficie de las bacterias, provocando la formación de colonias con morfologías alternas; por otro lado, la adherencia de las

células también es modificada alterando su capacidad para la formación de biocapas (Kirisits *et al.*, 2005; Allegrucci y Sauer, 2006).

A pesar de que diversos estudios se han enfocado en determinar la relación entre el cambio de morfología colonial y la formación de biocapas, aún no se conoce con claridad los mecanismos que implican la presencia de ambos fenómenos.

### **3. OBJETIVOS**

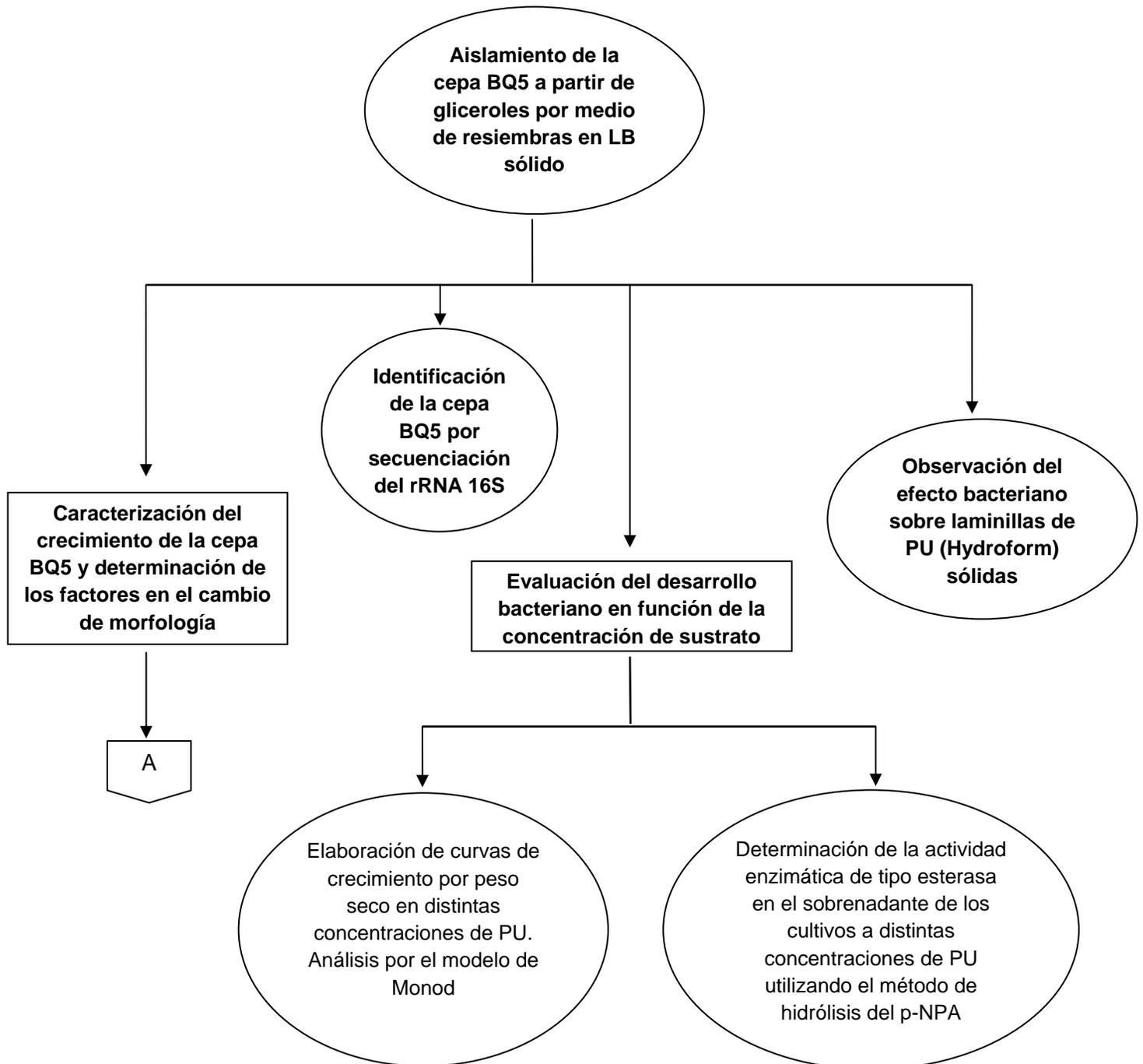
#### **Objetivo general**

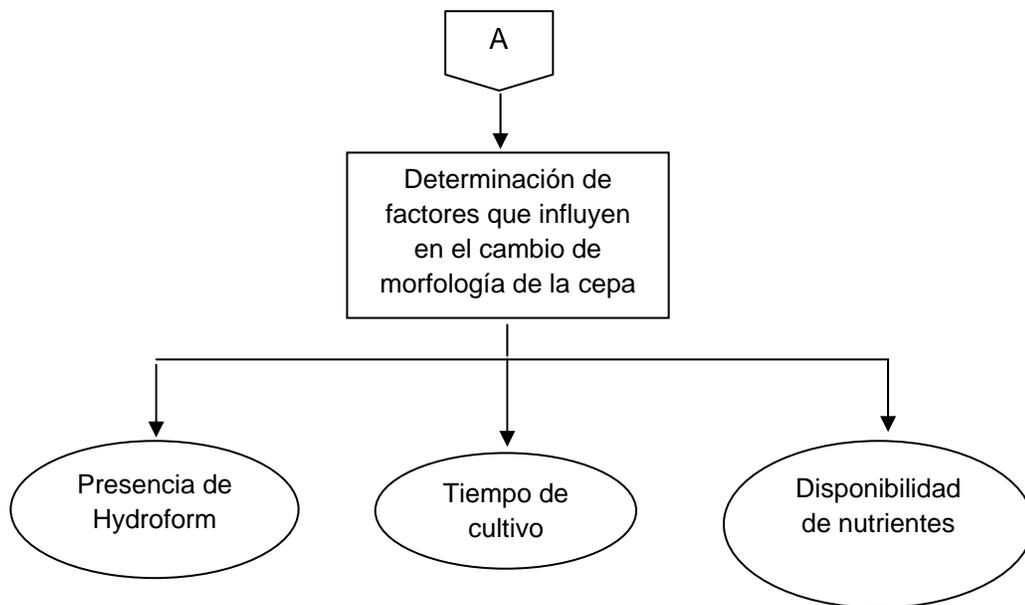
Evaluar y caracterizar el crecimiento de la cepa bacteriana BQ5 sobre un medio mínimo utilizando PU como única fuente de carbono.

#### **Objetivos particulares**

1. Determinar si la cepa BQ5 es capaz de presentar cambios de morfología en sus colonias cuando crece en medio LB sólido, así como las posibles causas que lleven a este cambio.
2. Identificar el género al que pertenece la cepa BQ5 mediante la secuenciación del gene RNAr 16S
3. Evaluar y caracterizar el crecimiento de la cepa BQ5 en distintas concentraciones de sustrato (Hydroform) mediante la aplicación del modelo de Monod.
4. Determinar si existe actividad enzimática de tipo esterasa en el sobrenadante de cultivos con distintas concentraciones de sustrato utilizando el método de hidrólisis del p-NPA.
5. Observar el efecto sobre laminillas sólidas de Hydroform al ser expuestas en cultivos de la cepa BQ5.

#### 4. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Aislamiento de la cepa BQ5**

La cepa BQ5 fue seleccionada por su capacidad de crecimiento en un medio mínimo con Hydroform, un poliuretano hidrosoluble comercial, como única fuente de carbono. Esta cepa fue obtenida a partir de poliuretano en descomposición recolectado en el basurero llamado Bordo de Xochiaca, Edo. de México. Las muestras se colocaron en matraces con medio mínimo líquido, conteniendo el barniz de poliuretano Hydroform al 0.3% (MM-PUh) (anexo) como única fuente de carbono, e incubadas por 5 días a 37°C con agitación constante a 200 rpm. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el cultivo se colocó en tubos eppendorf con glicerol al 30% (v/v), los tubos fueron sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados en refrigeración a -70°C para su conservación y posterior utilización (Carrillo-García, 2004).

El contenido de uno de estos tubos fue sembrado en una caja Petri con medio MM-PUh sólido. La caja fue incubada a 37°C por 48 h; se obtuvieron colonias blancas, pequeñas con bordes definidos. Para diferenciarlas entre si y conocer la morfología que presentaban, algunas de estas colonias fueron sembradas en medio Luria-Bertani (LB) sólido. Una vez que se obtuvieron cultivos visiblemente puros en medio LB, cada una de estas colonias fue cultivada en MM-PUh líquido al 0.3% e incubadas por 17 h a 37°C y agitación de 200 rpm. Transcurrido este tiempo, el cultivo se conservó y almacenó nuevamente en glicerol a -70°C (Oceguera-Cervantes, 2005).

### **5.2 Caracterización del crecimiento de la cepa BQ5**

A partir de un tubo con la cepa almacenada a -70°C, se tomó una pequeña porción del cultivo aún congelado y se esparció por estría cruzada sobre una caja Petri con medio LB sólido utilizando un asa bacteriológica estéril. La caja con el inóculo se incubó a 37°C por 48 h. Después del tiempo de incubación, la presencia de colonias con distintas morfologías impidió comenzar los estudios de utilización del polímero por esta cepa.

Debido a que en un inicio se creía que las variantes en la morfología eran ocasionadas por la presencia de una contaminación, cada variante fue resembrada por estría cruzada en una nueva caja con LB sólido. Este procedimiento se repitió en diversas ocasiones, sin embargo, en cada resiembra se obtuvieron ambas morfologías sin poder obtener, únicamente, colonias con morfología idéntica a la de la que fue sembrada.

Con el fin de encontrar un método que permitiera obtener cultivos con una sola morfología se decidió cultivar cada variante en una nueva caja de LB sólido por distintos métodos de siembra.

#### 5.2.1 Resiembra de las variantes morfológicas de la cepa BQ5 por agotamiento

- 1) El contenido completo de un tubo con la cepa almacenada a  $-70^{\circ}\text{C}$  fue inoculado en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, con 50 ml de MM-PUh. El matraz fue colocado en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  y 200 rpm durante 14 h.
- 2) Transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 100  $\mu\text{l}$  del matraz y se realizaron diluciones  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  y  $10^{-3}$  con buffer de fosfatos (PB) (anexo).
- 3) A partir de cada dilución, 100  $\mu\text{l}$  fueron colocados y esparcidos con una varilla de vidrio estéril en una caja con LB sólido. Las cajas fueron colocadas en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 h; estas serán las condiciones de incubación para todos los cultivos sólidos a lo largo del presente trabajo.
- 4) En cada dilución se observó la morfología que presentó cada una de las colonias perfectamente aisladas. Cada variante fue resembrada en una caja de LB sólido. La resiembra se realizó por estría cruzada utilizando un asa bacteriológica. Este procedimiento fue repetido en diferentes ocasiones sin lograr obtener cultivos con un sólo tipo de morfología colonial.
- 5) Después de diversas resiembras, cada variante fue teñida al Gram y observada al microscopio utilizando el objetivo de inmersión 100X.

6) Por otro lado, cada distinta variante fue inoculada, de manera individual, en un tubo de cultivo con 5 ml de MM-PUh al 0.3% y en un tubo con 5 ml de medio LB. Los tubos fueron incubados a 37°C y con agitación de 200 rpm. La forma del crecimiento en los tubos fue observada a las 24 y 48 h.

#### 5.2.2 Resiembra por dilución de las variantes morfológicas de la cepa BQ5

- 1) El contenido completo de un tubo con la cepa BQ5 almacenada a -70°C sirvió para inocular un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de MM-PUh al 0.3%. El matraz se incubó a 37°C y 200 rpm por 48 h.
- 2) A partir de este matraz, se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  con PB. De cada dilución fueron colocados y esparcidos con una varilla de vidrio, 100  $\mu$ l de cultivo, sobre una caja de LB sólido. Las cajas fueron incubadas como se describió anteriormente.
- 3) Después del tiempo de incubación, cada variante proveniente de los distintos cultivos (MM-PUh) fue tomada con un asa y resuspendida en un tubo eppendorf con 500  $\mu$ l de PB. Nuevamente, se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$  utilizando PB.
- 4) Se tomaron 100  $\mu$ l de la última dilución y fueron esparcidos con una varilla de vidrio estéril en una caja de LB. La morfología de las colonias presentadas fue registrada una vez transcurrido el tiempo de incubación.
- 5) El procedimiento de los puntos 3 y 4 se repitió en tres ocasiones consecutivas. Cada una de las variantes obtenidas fue inoculada, por separado, en un tubo de cultivo con 5 ml de MM-PUh y en un tubo con 5 ml de LB. Los tubos fueron colocados a 37°C y con agitación de 200 rpm; el crecimiento en los tubos fue observado a las 18 y 70 h.
- 6) A partir de los tubos con MM-PUh incubados por 18 h, se tomó una alícuota de 100  $\mu$ l y se realizaron diluciones seriadas hasta  $10^{-3}$ . A partir de esta última

dilución, se colocaron 100  $\mu\text{l}$  en una caja con LB sólido y fueron esparcidos con una varilla de vidrio estéril con el fin de saber si la morfología había cambiado después de haberse cultivado en MM-PUh.

### **5.3 Identificación de BQ5 mediante la secuenciación del gene del rRNA 16S**

- 1) A partir de un cultivo en LB sólido, se tomó una muestra de bacterias del tamaño de un grano de arroz y se colocó en un tubo con 500  $\mu\text{l}$  de amortiguador TES (anexo) estéril.
- 2) Se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de solución de Lisozima [ $20 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ] (anexo) a la muestra y se incubó a 37 °C durante 15 min; después se agregaron 8  $\mu\text{l}$  de solución de proteinasa K [ $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ] (anexo) y 16  $\mu\text{l}$  de RNAasa [ $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ ], la mezcla se agitó y se incubó a 65 °C durante 1 h.
- 3) Después de este tiempo, se agregaron 120  $\mu\text{l}$  de solución SDS al 10% (p/v) (anexo) y se incubó a 65 °C durante 10 min. Debido a que el extracto presentaba contaminación por polisacáridos, se ajustó el volumen a 600  $\mu\text{l}$  con amortiguador TES y se adicionaron 110.7  $\mu\text{l}$  de NaCl 5 M y 88.5  $\mu\text{l}$  de solución de CTAB/NaCl [10% (p/v)/0.7 M], la mezcla se agitó y se incubó a 65 °C por 10 min.
- 4) Terminada la incubación, se adicionaron 600  $\mu\text{l}$  de una mezcla de fenol-cloroformo (25:24) y se agitó vigorosamente hasta obtener una emulsión. El extracto se centrifugó a 20,800 x g durante 10 min, para obtener tres fases, de las cuales se tomó la fase superior y se colocó en un tubo nuevo.
- 5) A la fase extraída se le adicionó 1 ml de etanol absoluto frío (-20 °C) y se agitó suavemente. Se centrifugó durante 10 min a 10,600 x g, se retiró el sobrenadante (SN); una vez seco, el precipitado se resuspendió en 50  $\mu\text{l}$  de agua desionizada estéril y se congeló a -20 °C.
- 6) Para comprobar la calidad del DNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v).

- 7) El DNA obtenido fue enviado al Departamento de Alimentos, Facultad de Química, UNAM, donde se realizó la amplificación de un fragmento del gen del que codifica para la subunidad 16S del ribosoma (correspondiente a la posición 750 del gen rRNA 16S de *Escherichia coli*) por PCR, usando los siguientes primers universales cercanos a los extremos 3' y 5' de dicho fragmento pA (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y pH (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3') respectivamente (Hutson *et al.*, 1993)
- 8) Se secuenció directamente una hebra del producto de este PCR utilizando un secuenciador automático de DNA (ABI Prism 3100 genetic analyzer; Foster City, CA) empleando el primer gamma (5' ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG 3'). La secuenciación se realizó en el Instituto de Fisiología Celular, UNAM.
- 9) Para la identificación se encontraron secuencias con alto porcentaje de identidad en la base de datos GenBank usando el algoritmo BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Las secuencias se alinearon usando el editor de alineamiento de secuencias BioEdit y se revisaron visualmente.

## **5.4 Determinación de los factores que inducen el cambio de morfología en la bacteria**

### **5.4.1 Efecto de la densidad bacteriana sobre el cambio de morfología**

Debido a que la morfología rugosa se presentó con mayor frecuencia en las estrías más cerradas del cultivo en cajas de LB sólido, se llegó a pensar que el cambio de morfología se debía a la presencia de cultivos con una gran cantidad de células y, por lo tanto, con una menor disponibilidad de nutrientes. Para comprobar esta posibilidad, se decidió sembrar una alícuota de distintas diluciones seriadas sobre una caja con medio sólido. Si la morfología rugosa dependía de la aglomeración del cultivo, ésta se presentaría en cultivos con diluciones menores.

- 1) Una colonia perfectamente aislada creciendo en medio LB sólido es tomada con un asa bacteriológica y resuspendida en 500 µl de PB estéril.

- 2) Se realizan diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$ , a partir de esta suspensión, 100  $\mu\text{l}$  son tomados de cada dilución y colocados en una caja estéril de LB sólido. El inóculo es esparcido con una varilla de vidrio previamente esterilizada al mechero.
- 3) Las cajas son colocadas en incubación a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 h. Terminado el tiempo de incubación, la morfología de las colonias es observada, en todas las diluciones.

#### 5.4.2 Efecto de la presencia de Hydroform en el medio de cultivo así como del tiempo de incubación, sobre el cambio de morfología

Para determinar si el tiempo de incubación en el medio MM-PUh líquido inducía la formación de colonias con morfologías distintas, se tomó una alícuota del cultivo a diferentes tiempos y se sembró en LB sólido, con el objeto de observar su morfología. Con el fin de asegurar que los cambios observados se debían a la presencia del PU en el medio y no a cambios naturales en el crecimiento de la propia cepa, BQ5 también se sembró en medio LB líquido. El medio LB al ser un medio rico en nutrientes no ejercería de ninguna forma un estrés por fuente de carbono dentro de las células.

- 1) A partir de un cultivo nuevo en medio LB sólido, se tomaron dos colonias perfectamente aisladas y fueron sembradas por separado en un tubo de cultivo con 5 ml de medio MM-PUh al 0.3% y en un tubo con 5 ml de LB líquido. Ambos tubos fueron incubados a  $37^{\circ}\text{C}$  y 200 rpm.
- 2) Después de 19 h de incubación, una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  fue tomada de cada tubo. Esta alícuota fue colocada, por separado, en tubos eppendorf con 450  $\mu\text{l}$  de PB estéril.
- 3) A partir de esta suspensión se realizaron, de manera independiente, diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$  y  $10^{-5}$  en el caso de las muestras provenientes de LB; 100  $\mu\text{l}$  fueron tomados de la última dilución y sembrados en una caja nueva de medio LB sólido, esparcidos con una varilla de vidrio estéril. La caja fue incubada a  $37^{\circ}\text{C}$  por 48 h.

- 4) Este procedimiento se repitió cada 3 horas hasta un tiempo final de incubación de 43 h. La morfología de las colonias fue registrada a diferentes tiempos de incubación en MM-PUh y en medio LB.

### **5.5 Evaluación del crecimiento bacteriano en función de la concentración de sustrato**

Con el fin de demostrar que existe una dependencia de crecimiento de la cepa con respecto a la concentración del sustrato en el medio, se realizaron curvas de crecimiento por medición de peso seco, en medios de cultivo con 0.3, 0.9, 1.5 y 3.0% de Hydroform en MM.

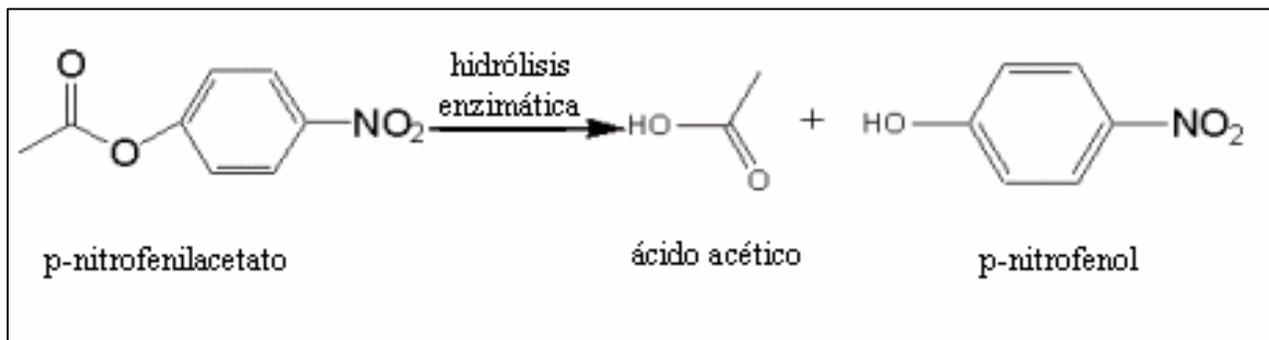
- 1) Para, asegurar tener suficiente cantidad de inóculo para cada uno de los tratamientos a probar se cultivaron, a partir de cuatro gliceroles (1 ml) de la cepa BQ5, cuatro matraces Erlenmeyer con 50 ml de LB. Los matraces fueron incubados durante 12 h en las condiciones antes descritas.
- 2) El contenido de cada matraz fue transferido a un tubo falcon de 50 ml estéril. Los tubos fueron centrifugados a  $7000 \times g$  por 7 min. Se retiró el sobrenadante y el paquete celular de cada tubo fue resuspendido en 500  $\mu$ l de MM y transferidos a un mismo matraz Erlenmeyer con 50 ml de MM, con el objetivo de tener un inóculo homogéneo.
- 3) Para distribuir el inóculo, se agitó el matraz con la suspensión de células de manera circular por 10 s, se tomaron alícuotas de 1 ml y se transfirieron a tubos de cultivo de 16 x 150 mm conteniendo 4 ml de MM-PUh con las diferentes concentraciones a probar. Se establecieron 11 cultivos por cada concentración de Hydroform, correspondientes a las muestras a cuantificar. Se prepararon dos tubos sin inocular por cada concentración de Hydroform probada, que servirían como controles.
- 4) Todos los tubos son colocados en incubación a 37°C y 200 rpm. Cada 24 h, un tubo de cada concentración es retirado de la incubadora. Cada tubo se agita

vigorosamente en un vortex hasta bajar las células que se encontraban creciendo en la pared del tubo. Se toma una alícuota de 50  $\mu\text{l}$  y se coloca en un tubo eppendorf con 450  $\mu\text{l}$  de PB estéril y se realizan diluciones seriadas hasta  $10^{-4}$ . Se transfieren 100  $\mu\text{l}$  de esta última dilución a una caja de LB sólido y se distribuyen con una varilla de vidrio estéril. Este procedimiento se repite para cada concentración. Las cajas son incubadas en las condiciones ya descritas. Después del tiempo de incubación la morfología de las colonias es registrada.

- 5) El resto del contenido de cada tubo de cultivo es transferido a un tubo de vidrio de 13 x 100 mm y centrifugado a 7000 x  $g$  por 7 min. Terminada la centrifugación, el sobrenadante es retirado y conservado en hielo para medir la actividad esterasa. El paquete celular es resuspendido en 400  $\mu\text{l}$  de solución amortiguadora de fosfatos y colocado en una charola de aluminio previamente pesada.
- 6) Las charolas con las células son colocadas en una estufa de vacío a 60 °C aproximadamente por 24 h, hasta peso constante. Las charolas son nuevamente pesadas para determinar el incremento en la biomasa a medida que transcurre el tiempo.
- 7) Los valores de las pendientes obtenidas en las curvas de crecimiento fueron utilizados para establecer una curva de Monod.

### **5.6 Medición de la actividad enzimática de tipo esterasa en el sobrenadante de los cultivos bajo distintas concentraciones de sustrato**

La hidrólisis del p-Nitrofenilacetato (p-NPA) genera como productos p-Nitrofenol (p-NP) y ácido acético (figura 5). El p-NP puede ser cuantificado espectrofotométricamente a una longitud de onda de 405 nm. La aparición de p-NP nos permitirá observar la hidrólisis del sustrato (p-NPA) ocasionada por la actividad enzimática de tipo esterasa liberada en el SN de los cultivos.



**Figura 6. Reacción de hidrólisis del p-NPA.**

- 1) A partir de las muestras de SN, obtenidas en cada tiempo de incubación de los cultivos (punto 6.5), se tomaron 100  $\mu$ l y fueron colocados en una celda de plástico la cual contenía 400  $\mu$ l de agua y 250  $\mu$ l de solución PB 200 mM, [pH 7] (anexo).
- 2) La celda se colocó en un baño de agua a 37°C y se le añadieron 250  $\mu$ l de una solución de p-NPA 20 mM (anexo), en este momento se comienza a medir el tiempo de reacción.
- 3) La absorbancia que presenta la celda es leída a los 30, 90 y 180 s de reacción, a una longitud de onda de 405 nm.
- 4) Debido a que el p-NPA sufre hidrólisis química, el procedimiento es realizado también utilizando una alícuota de 100  $\mu$ l de medio de cultivo sin inocular tratado de manera simultánea a las muestras de cultivo. Los valores obtenidos en esta curva blanco, son restados de los valores que presentan las muestras problema.
- 5) El coeficiente de extinción molar utilizado para la transformación de los valores de absorbancia en unidades de concentración de p-NP es de 0.024  $\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ . Este valor fue obtenido a partir de una curva patrón realizada previamente en nuestro laboratorio (Oceguera-Cervantes, 2005).

### **5.7 Medición de la actividad enzimática de tipo esterasa asociada a la membrana de las células**

- 1) Para evaluar la existencia de esterasa asociada a la membrana de las células, se desarrolló una curva de crecimiento en MM-PUh al 0.3% siguiendo los pasos antes descritos.
- 2) En cada determinado tiempo de muestreo un tubo fue retirado de la incubación y su contenido centrifugado a 7,500 x g durante 7 min. El paquete celular se recolectó y se le agregó 1 ml de solución de extracción (anexo) por cada 0.05 g de células obtenidas.
- 3) Para disgregar el paquete celular y facilitar su interacción con la solución de extracción, se utilizó un homogenizador manual para romper los grumos formados. El paquete celular ya disgregado se transfirió a un tubo falcon de 15 ml y se puso en agitación durante 1 hora en vortex a una temperatura de 5°C.
- 4) Pasado el tiempo de agitación, el tubo se centrifugó a 10 000 x g durante 10 min. El SN se recuperó y se cuantificó la actividad de esterasa por el método de hidrólisis del p-NPA siguiendo la metodología indicada en el punto anterior.

### **5.8 Evaluación del efecto bacteriano sobre laminillas de Hydroform sólidas**

- 1) El contenido de un glicerol con la cepa BQ5 almacenada a -70°C es colocado en un matraz Erlenmeyer de 125 ml, con 50 ml de medio LB. El matraz es incubado a 37°C y 200 rpm por 12 h.
- 2) Después del tiempo de incubación el contenido del matraz es transferido a un tubo falcon estéril y centrifugado a 7,000 x g por 7 min. El sobrenadante es retirado mientras que el paquete celular es resuspendido en 500 µl de MM-PUh y transferido a un matraz Erlenmeyer de 125 ml con 50 ml de MM-PUh al 0.3%, junto con un par de laminillas de Hydroform sólidas. Para observar el cambio que sufre el polímero después de la incubación con la cepa, un matraz Erlenmeyer

con 50 ml de MM-PUh y un par de laminillas sin inóculo también es preparado. Estas muestras nos servirán como control.

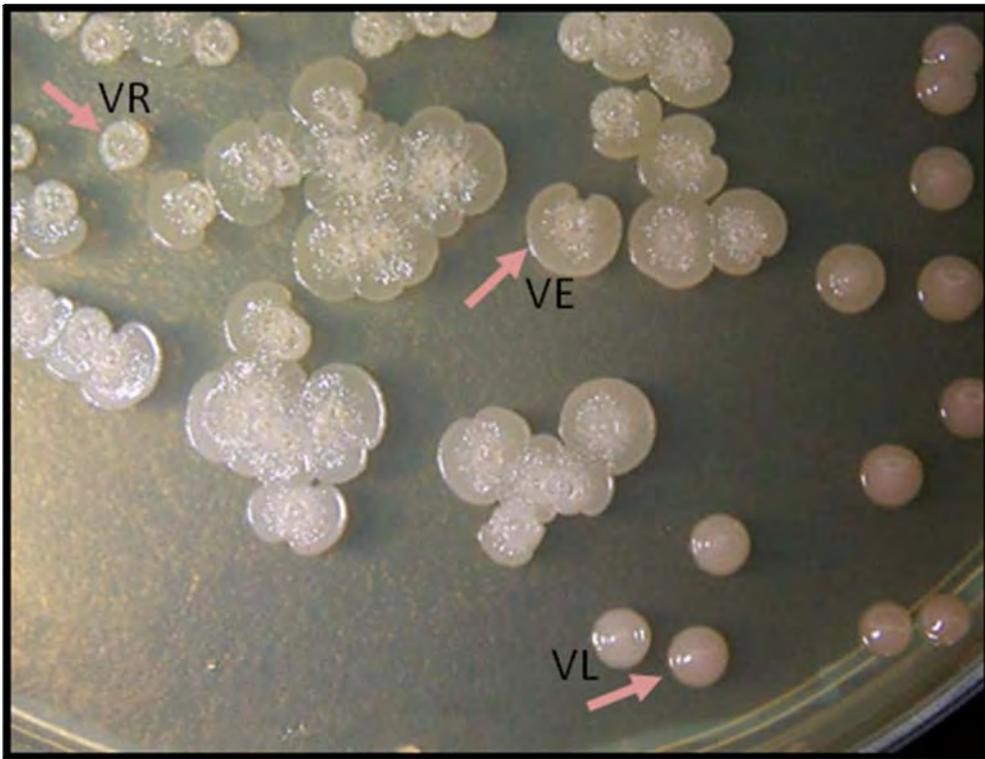
- 3) Las laminillas de Hydroform fueron previamente preparadas extendiendo una capa delgada (~ 3 mm) de Hydroform puro sobre una caja Petri. La película fue secada en una estufa a 60°C y posteriormente cortada en laminillas de 2 cm<sup>2</sup>.
- 4) El cultivo con las laminillas y el matraz control son incubados a 37°C y 200 rpm por 15 días. Terminado el tiempo de incubación, las laminillas son retiradas del cultivo, lavadas con agua destilada y secadas para su análisis por microscopía electrónica de barrido utilizando el equipo JEOL 5900 LB en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 Los primeros cultivos a partir de gliceroles con la cepa BQ5 presentaron tres variantes en la morfología de las colonias**

En el inicio de este proyecto, cuando se realizaron los primeros cultivos de la cepa BQ5, la morfología que presentaban las colonias en medio LB sólido era de tipo pequeña y rugosa (Oceguera-Cervantes, 2005). Sin embargo, al comenzar los estudios para este trabajo, la cepa BQ5 obtenida a partir de gliceroles almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  y sembradas en medio LB sólido, presentó otras dos morfologías en las colonias que formaba (figura 7). Se denominó variante rugosa (VR) a la morfología pequeña, de aproximadamente 0.8 mm de diámetro, plana, seca, rugosa o con halos concéntricos y con bordes irregulares, esta variante es idéntica a la que se tenía originalmente. La variante lisa (VL) presentó colonias con morfología pequeña, de 1 mm, lisa, brillante, amarillenta, convexa y con bordes regulares. Por último, la variante extendida (VE), denominada así porque sus colonias crecían y se extendían a lo largo del medio de cultivo, llegando a tener hasta dos o tres veces el diámetro de la VR. Esta variante no es completamente circular ya que presenta una o varias zonas en las que pareciera que el crecimiento fue menor a las de las zonas aledañas produciendo una hendidura. El centro de este tipo de colonia es rugoso y hacia la periferia presenta una textura lisa (figura 8).

Puesto que en un principio se pensó que la presencia de las tres morfologías era causada por una contaminación en los cultivos, se comenzó la resiembra de cada variante, de manera independiente.



**Figura 7. Presencia de tres variantes morfológicas en los primeros cultivos de la cepa BQ5. Estas morfologías fueron observadas a las 48 h de cultivo en LB sólido.**

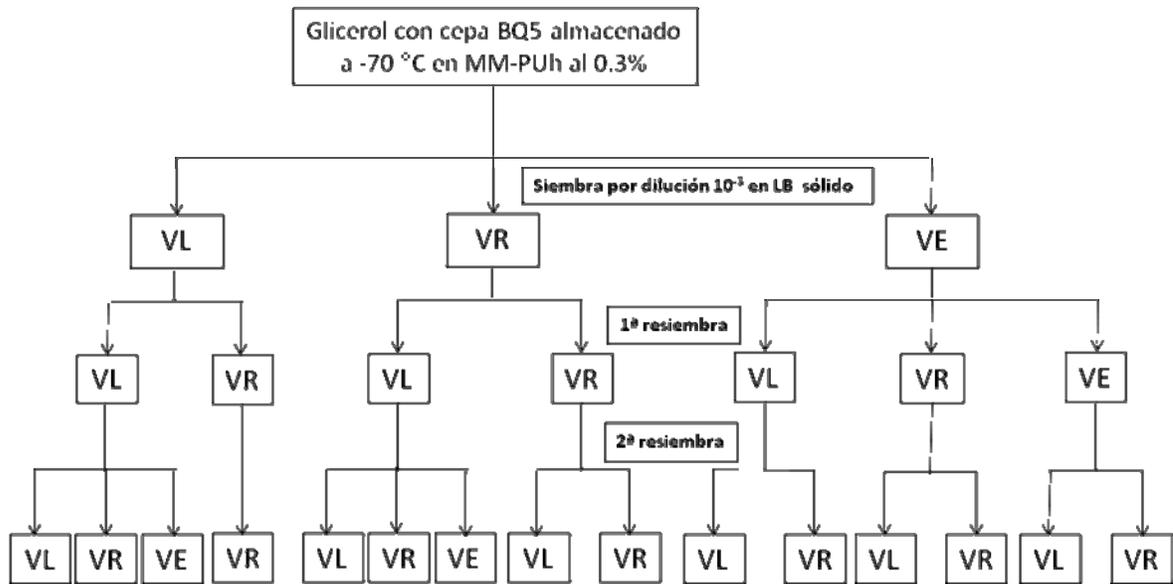


**Figura 8. Tres tipos de morfología de la cepa BQ5 en medio LB sólido.** Variante rugosa (VR), variante lisa (VL) y variante extendida (VE). Las fotos fueron tomadas a un mismo aumento.

## **6.2 Cada una de las tres variantes produce los tres tipos de morfología**

Con el propósito de obtener cultivos con una sola morfología, se realizaron una serie de resiembras por estría cruzada o agotamiento, a partir de cada una de las tres variantes morfológicas antes descritas.

Después de resembrar por varias generaciones cada tipo de colonia, jamás se logró obtener un cultivo que solamente presentara una sola morfología. Cada variante era capaz de originar colonias con las otras dos morfologías y éstas a su vez, daban origen a la primera y a las otras dos variantes (figura 9), lo cual implicaba que las tres eran variantes de un mismo tipo de bacteria y no contaminación debida a otro tipo de bacteria. Sin embargo, fue posible observar que la morfología VE se presentaba con menor frecuencia que las VR y VL.

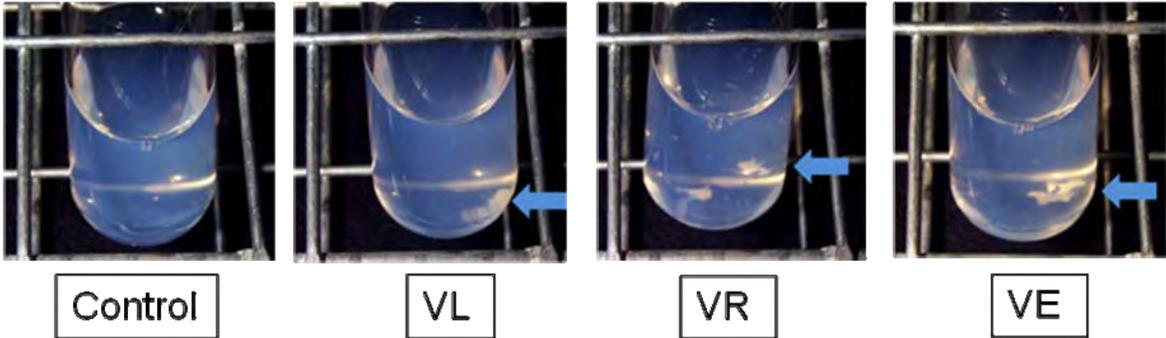


**Figura 9. Siembra de la cepa BQ5 por estría cruzada.** Los tres tipos de morfología se intercambian entre sí. (VL) variante lisa, (VR) variante rugosa y (VE) variante extendida.

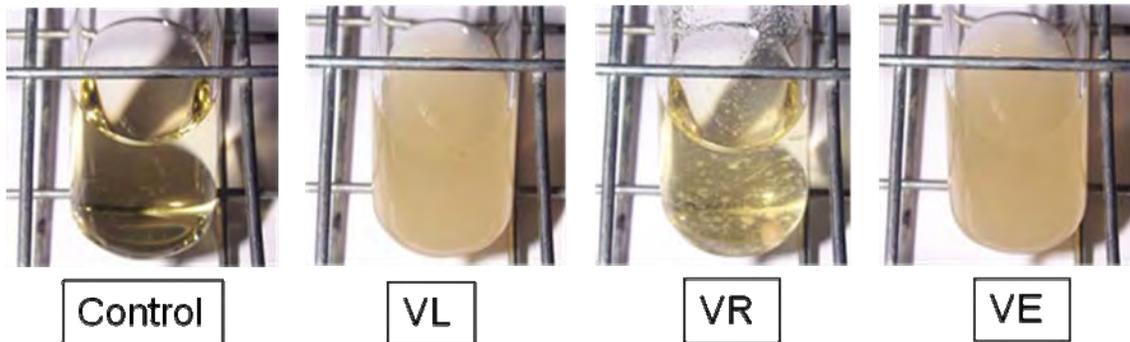
La tinción con colorantes de Gram para cada variante mostró que los tres tipos de morfología corresponden a bacilos cortos Gram negativos sin ningún tipo de asociación.

Para conocer cómo se desarrollaban las tres morfologías en medio líquido, cada variante fue inoculada en los medios MM-PUh y LB. Independientemente del tipo de colonia que se inoculara en medio MM-PUh líquido, las tres variantes crecían en forma de agregados que se depositaban en el fondo del tubo. En medio LB, tanto la VL como la VE crecen generando turbidez en el medio, mientras que la VR crece en forma de agregados. Además, las tres morfologías fueron capaces de formar biopelículas sobre la superficie de los tubos y matraces en ambos medios (figura 10).

Crecimiento en MM-PUh 37°C/18h



Crecimiento en LB 37°C/18h



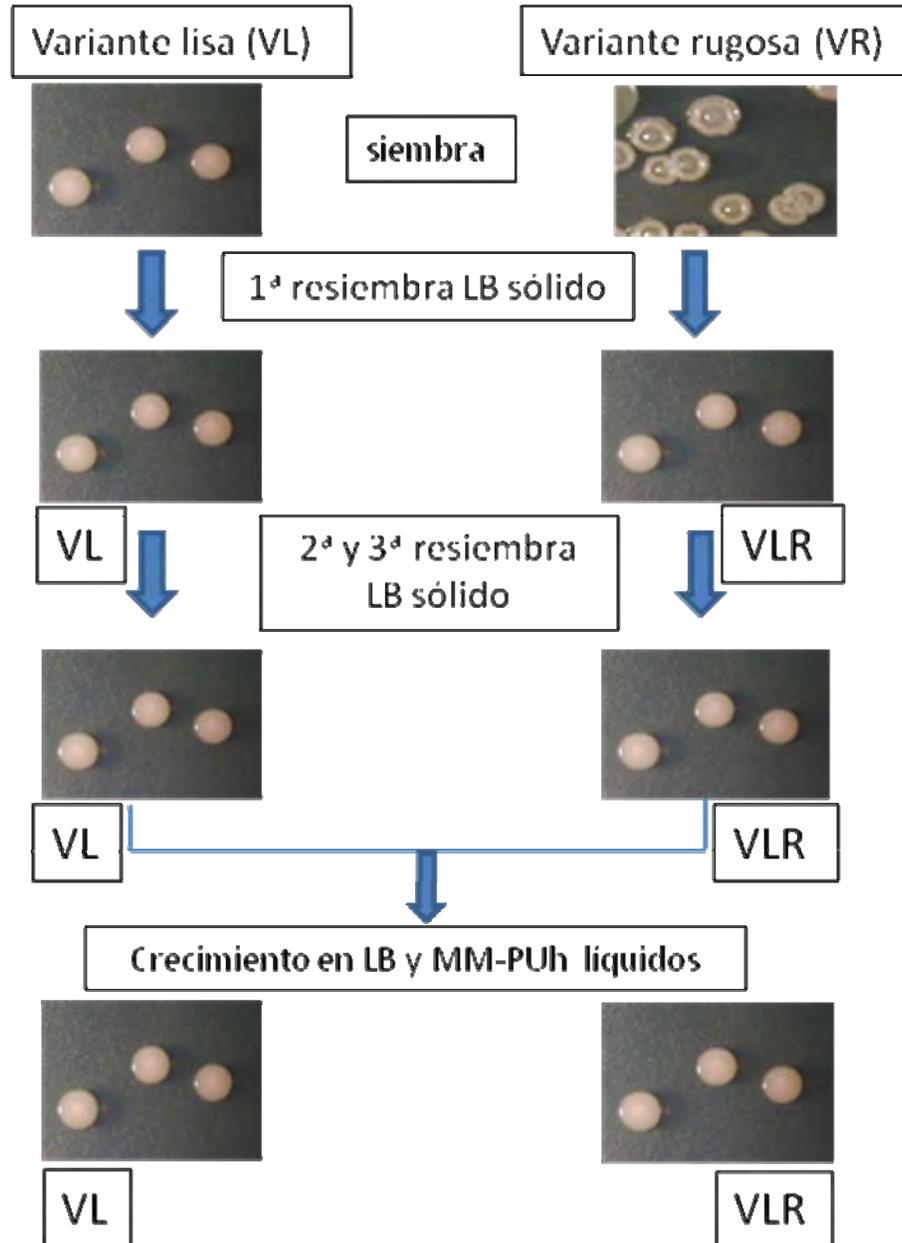
**Figura 10. Crecimiento en medio líquido de las tres variantes encontradas en la morfología colonial de la cepa BQ5. Las flechas indican los agregados formados después de 18 h en MM-PUh.**

### **6.3 Al establecer condiciones de cultivo más homogéneas únicamente se obtuvieron las VL y VR**

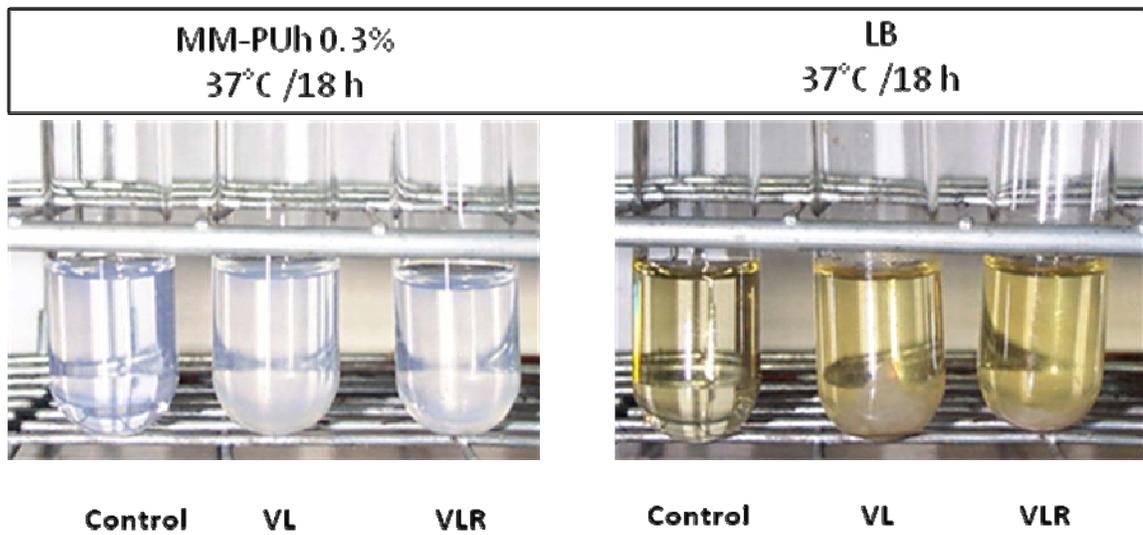
En vista de que la resiembra por estría cruzada no permitió que se obtuvieran colonias que mantuvieran la misma morfología a través de varias generaciones y observando que la VR se presentaba en donde la estría mostraba amontonamiento de colonias, se pensó que quizás el amontonamiento estuviera siendo la causa de este tipo de morfología. Dado que nuestro objetivo era tener una condición en la cual se presentara una sola morfología para poder continuar con el análisis del efecto de esta bacteria sobre el Hydroform, se decidió probar si la siembra por dilución, que permite que todas las células tengan condiciones homogéneas en medio sólido, permitiría obtener un solo tipo de morfología. Para esto, un glicerol fue inoculado en MM-PUh líquido y después de 16 a 18 h se realizaron diluciones hasta  $10^{-3}$ . Esta dilución se plaqueó en LB sólido.

En esta ocasión únicamente se obtuvieron las VR y VL en la primera generación, no apareciendo la VE. En la primera resiembra, las colonias VR originaron colonias VL, mientras que, las colonias VL originales mantuvieron su morfología. Durante la segunda y tercera resiembra todas las colonias presentaron la morfología VL (figura 11). Estos resultados nos hicieron pensar que se había logrado obtener las condiciones para que solo apareciera un tipo de morfología, por lo que esta metodología fue la utilizada durante los siguientes experimentos.

Después de haberse resembrado en tres ocasiones en medio LB sólido y obtenido únicamente morfología VL, las colonias se sembraron en medio MM-PUh y medio LB líquido desarrollando biopelículas y agregados en ambos medios (figura 12). Estos cultivos mostraron la misma morfología VL cuando fueron cultivados en LB sólido (figura 11, paneles inferiores).



**Figura 11. Siembra de cepa BQ5 por dilución.** Las colonias VL originaron colonias idénticas, mientras que las colonias VR también originaron colonias lisas (VLR).



**Figura 12. Crecimiento de las colonias VL y VLR en medio LB y MM-PUh después de 18 h.** En el fondo del tubo se observa el desarrollo de agregados y biopelículas que se desprendieron de la superficie del cultivo.

## 6.4 Identificación de *Alicyclophilus sp.* mediante la secuenciación del rRNA 16S

El DNA genómico de la cepa BQ5 fue extraído y empleado como molde para la amplificación del gen del rRNA 16S. Esta secuencia fue comparada con la base de datos del Genbank y se encontró un 100% de homología con la secuencia del gene 16S rRNA de la cepa R-24604 de *Alicyclophilus sp.* (figura 13).

Query	12	CTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACAGATCGTC	71
Sbjct	316	CTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCCTCTCAGACCAGCTACAGATCGTC	257
Query	72	GGCTTGGTAAGCTTTTATCCCACCAACTACCTAATCTGCCATCGGCCGCTCCGTCCGCGC	131
Sbjct	256	GGCTTGGTAAGCTTTTATCCCACCAACTACCTAATCTGCCATCGGCCGCTCCGTCCGCGC	197
Query	132	GAGGTCCGAAGA TCCCCCGCTTTTCATCCGTAGATCGTATGCGGTTAGCAAAGCTTTTCG	191
Sbjct	196	GAGGTCCGAAGATCCCCCGCTTTTCATCCGTAGATCGTATGCGGTTAGCAAAGCTTTTCG	137
Query	192	CTCCGTTATCCCCACGATCGGGCACGTTCCGATGTATTACTCACCCGTTCCGCCACTCGT	251
Sbjct	136	CTCCGTTATCCCCACGATCGGGCACGTTCCGATGTATTACTCACCCGTTCCGCCACTCGT	77
Query	252	CAGCATCCGAAGACCTGTTACCGTTTCGACTTGCA TGTGTAAGGCATGCCGCCAGCGTTCA	311
Sbjct	76	CAGCATCCGAAGACCTGTTACCGTTTCGACTTGCA TGTGTAAGGCATGCCGCCAGCGTTCA	17
Query	312	ATCTGAGCC	320
Sbjct	16	ATCTGAGCC	8

**Figura 13. Alineamiento de secuencias del gen del rRNA 16S de la cepa BQ5 y de *Alicyclophilus sp.* R-24604.** Query, secuencia de BQ5; Sbjct, secuencia obtenida del Genbank.

## 6.5 Pruebas para tratar de identificar que factor induce el cambio de morfología en la bacteria

### 6.5.1 Efecto de la densidad bacteriana sobre el cambio de morfología

Con el fin de saber si la VR se presentaba cuando la densidad de siembra en el cultivo sólido era alta, alícuotas de diferentes diluciones, provenientes de un cultivo líquido en MMPUh de 18 h, fueron sembradas en LB sólido.

En todas las diluciones probadas ( $10^{-1}$  –  $10^{-4}$ ), únicamente se obtuvieron colonias con morfología lisa (Tabla 1).

Tabla 1. Registro de variantes obtenidas en diferentes diluciones

Dilución probada	Variante
$10^{-1}$	Lisa
$10^{-2}$	Lisa
$10^{-3}$	Lisa
$10^{-4}$	Lisa

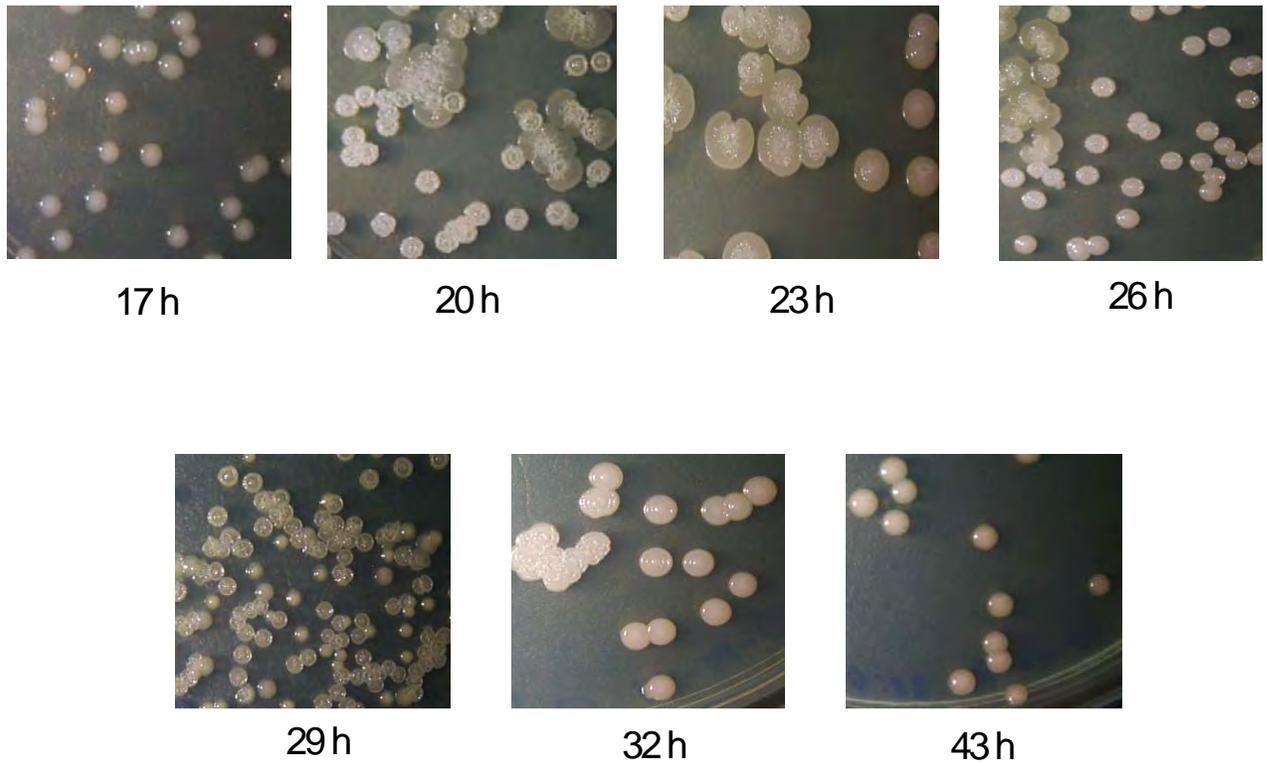
#### 6.5.2 Efecto de la presencia de Hydroform en el medio de cultivo así como del tiempo de incubación sobre el cambio de morfología

Para conocer si la aparición de la VR en los cultivos en medio sólido estaba relacionada con el tiempo de incubación del cultivo líquido, se tomó una muestra del cultivo líquido a diferentes tiempos y se registró el tipo de variante que se presentaba en medio LB sólido. Simultáneamente, para determinar si la presencia de Hydroform era la causa del cambio de morfología, un cultivo en medio LB sometido a las mismas condiciones fue utilizado como control. Si los cambios sufridos en la morfología de la cepa surgieran únicamente como resultado de la presencia del polímero en el medio, se esperaría que la VR no se presentara en el cultivo en medio LB.

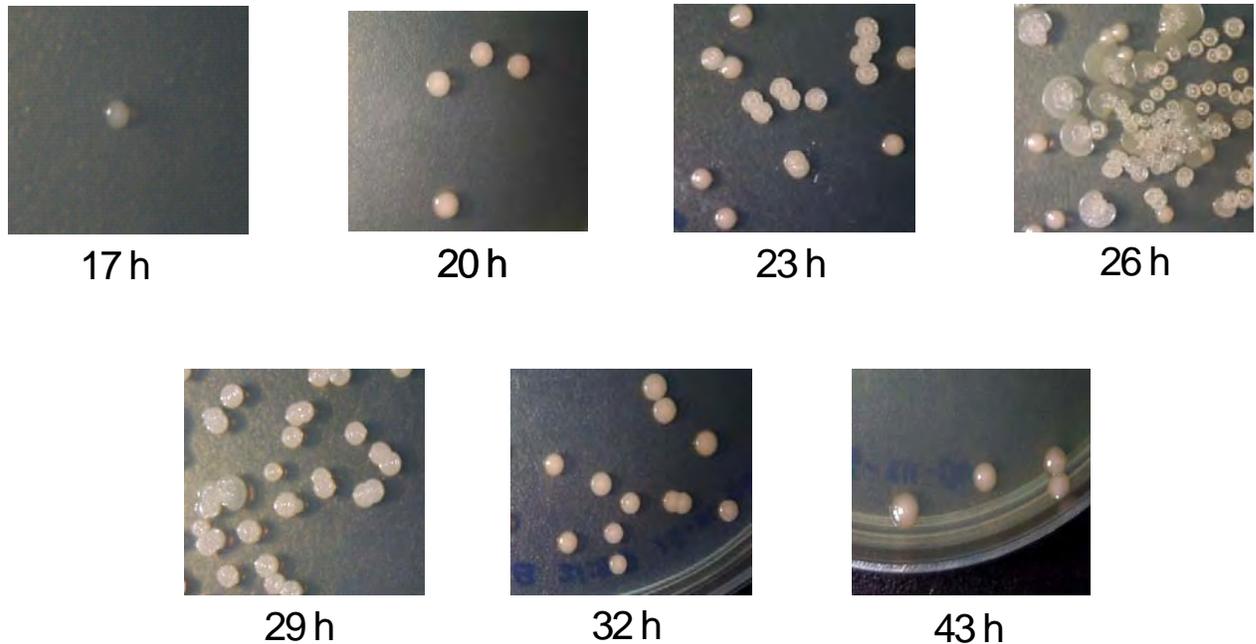
Durante las primeras 17 h del cultivo en medio MM-PUh, sólo se observó la presencia de la variante lisa, después de 20 h de incubación se presentaron colonias tipo VR y tipo VE. La presencia de ambas variantes se incrementó a medida que avanzó el tiempo de incubación; sin embargo, interesantemente a partir de las 32 h de incubación y hasta el final del experimento, las colonias de tipo VR y VE dejaron de presentarse, mientras que las colonias de tipo VL predominaron en el cultivo (figura 14).

Por su parte, las colonias obtenidas a partir del cultivo en LB líquido presentaron un patrón de crecimiento similar al obtenido en presencia del polímero; sin embargo, el cambio de morfología se dio en un tiempo ligeramente menor (tres horas antes) cuando la cepa fue cultivada en medio MM-PUh. Esto sugiere entonces que los cambios morfológicos están relacionados con la fase de crecimiento de la bacteria, es decir, este

comportamiento es parte natural de su ciclo de vida; si bien es cierto que la presencia del polímero en el medio no influye directamente sobre esta forma de desarrollo sí es capaz de acelerar los cambios en la morfología de las colonias (figura 15).



**Figura 14. Efecto del poliuretano sobre la morfología de BQ5 a través del tiempo.** A las 17 h sólo se observa la morfología VL. Después de 20 h de incubación aparecen colonias tipo VR y VE. La variante VL predomina nuevamente en el cultivo a partir de las 32 h de incubación.

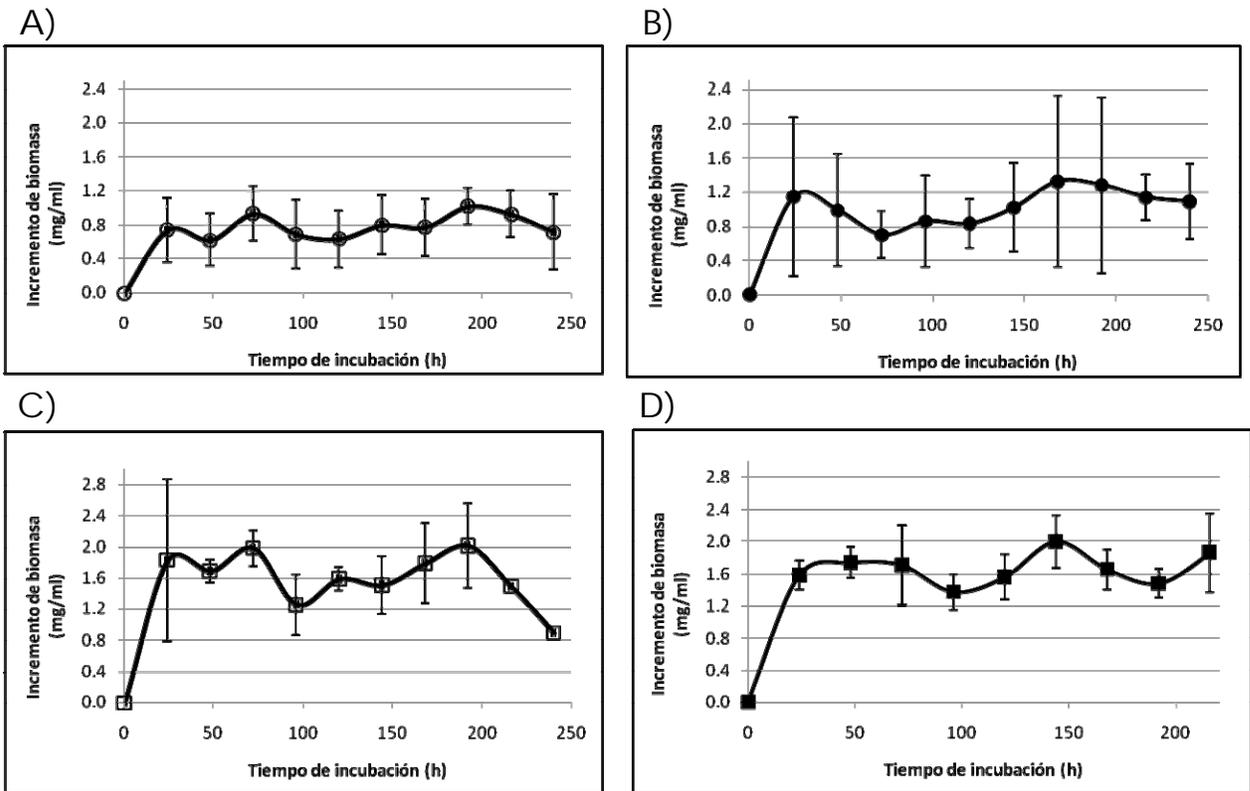


**Figura 15. Los cambios de morfología se observaron también en cultivos en LB.** En este medio se repite el mismo patrón de crecimiento pero las morfologías VR y VE se presentan tres horas más tarde del tiempo en el que se presentan en MM-PUh.

### **6.6 Evaluación del crecimiento de *Alicyclophilus sp.* BQ5 en función de la concentración de sustrato**

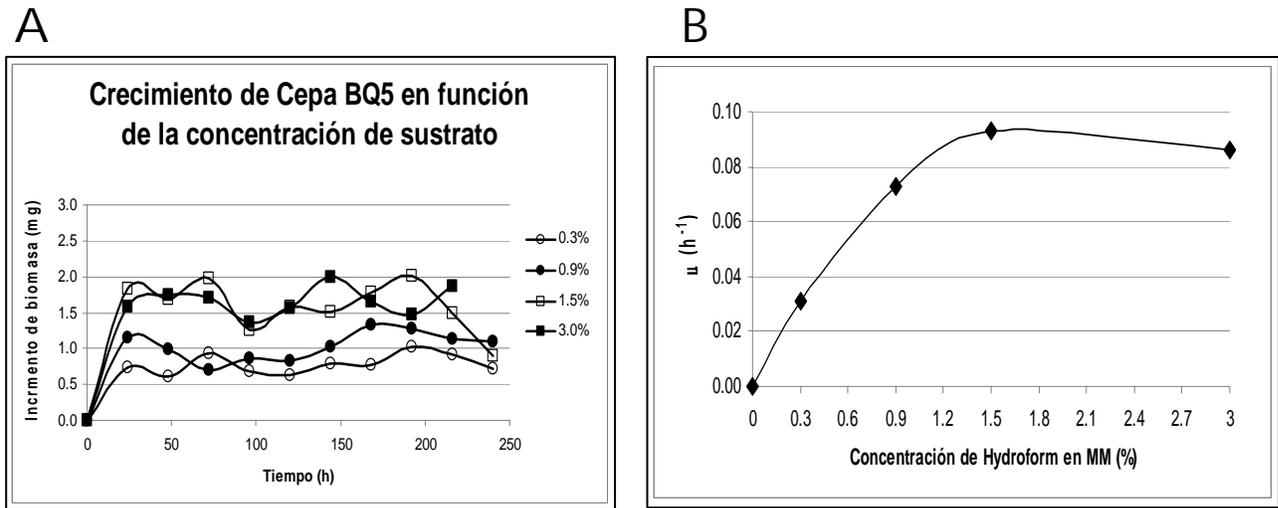
Con el fin de conocer si existe una relación entre el crecimiento bacteriano y la concentración de sustrato en el medio, se realizaron curvas de crecimiento por peso seco utilizando cuatro distintas concentraciones de Hydroform en el medio de cultivo. Las concentraciones utilizadas fueron 0.3, 0.9, 1.5 y 3.0%.

El crecimiento de la bacteria se observa en forma de oscilaciones a lo largo de todo el tiempo de incubación; sin embargo, es posible apreciar una fase logarítmica y una fase estacionaria para las distintas concentraciones probadas. La fase lag en estos cultivos es demasiado corta para distinguirse en los gráficos (figura 16).



**Figura 16. Incremento del peso seco de la cepa BQ5 en distintas concentraciones de sustrato.** (A) 0.3%, (B) 0.9%, (C) 1.5% y (D) 3.0 %. Las curvas se realizaron por 11 días. Los puntos representan el promedio de tres repeticiones.

El logaritmo de las pendientes de 0 a 24 h, obtenidas a partir de las curvas de crecimiento, es graficado en función de la concentración de sustrato aplicando el modelo de Monod (figura 17). De acuerdo a esta curva, existe una relación entre el crecimiento de la cepa y la concentración de Hydroform en el medio de cultivo, siendo 1.5% la concentración en la que se observa el máximo crecimiento. A una concentración mayor el crecimiento disminuye ligeramente.



**Figura 17. Crecimiento de la cepa BQ5 en función de la concentración de MM-PUh.** (A) Curvas de crecimiento con diferentes concentraciones de sustrato determinadas por peso seco. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones. (B) Curva de Monod construida a partir de los valores de peso seco medidos en la fase exponencial del crecimiento (0-24 h).

Además, se analizó la morfología que presentaba la cepa a lo largo de los 11 días de incubación en las cuatro distintas concentraciones de MM-PUh. Antes de centrifugar el contenido de cada tubo, se tomó una alícuota y se diluyó hasta  $10^{-3}$ , 100  $\mu$ l de esta dilución fueron sembrados en una caja con LB sólido. El procedimiento fue repetido para todas las concentraciones probadas en cada tiempo de muestreo. Los resultados se presentan en la tabla 2.

Las morfologías VL y VR se observaron desde el inicio del cultivo y hasta las 24 horas. Después de ese tiempo y hasta el final del experimento únicamente se presenta la variante lisa. La morfología VE no se presentó en ninguno de los cultivos probados. La concentración del polímero en el medio no tiene efecto sobre el tipo de morfología desarrollada por la cepa ya que se obtiene el mismo comportamiento en todas las concentraciones probadas.

**Tabla 2. Tipo de variantes presentadas en distintas concentraciones de MM-PUh**

<b>Tiempo (h) Hyd</b>	<b>0.3 %</b>	<b>0.9%</b>	<b>1.5 %</b>	<b>3.0 %</b>
0	Lisa Rugosa	Lisa Rugosa	Lisa Rugosa	Lisa Rugosa
24	Lisa	Lisa Rugosa	Lisa	Lisa Rugosa
48	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
72	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
96	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
120	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
144	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
168	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
192	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
216	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa
240	Lisa	Lisa	Lisa	Lisa

## 6.7 Medición de la actividad enzimática de tipo esterasa en el sobrenadante de los cultivos bajo distintas concentraciones de sustrato

Dado que se tienen reportes de la producción de esterasas extracelulares involucradas con la degradación de PU (Nakajima-Kambe *et al.*, 1997), y que previamente en el laboratorio se determinó esta actividad para los cultivos de las cepas BQ1 y BQ8 (Oceguera-Cervantes, 2005), la actividad enzimática de tipo esterasa fue medida en el SN de los cultivos de la cepa BQ5 en distintas concentraciones a lo largo de 11 días de incubación. Esta determinación se realizó midiendo la hidrólisis de p-NPA a una longitud de onda de 405 nm.

La actividad esterasa en el SN se observó en los medios con las cuatro concentraciones probadas. Al igual que el peso seco, que refleja el cambio en la biomasa, la actividad enzimática se mantuvo oscilando durante el tiempo de cultivo. La máxima actividad presentada por la enzima fue de 150 nmol de p-NP  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$  y es alcanzada a un tiempo de incubación entre 120 y 144 h en los medios conteniendo 0.9, 1.5 y 3.0% de Hydroform. Después de 144 h todas las actividades disminuyeron. En el medio de cultivo con Hydroform al 0.3%, la máxima actividad fue de 50 nmol de p-NP  $\text{min}^{-1} \text{ml}^{-1}$  a las 144 h de incubación manteniéndose por 72 h más. La actividad decreció cuando el cultivo llegó a 220 h de incubación (figura 18).

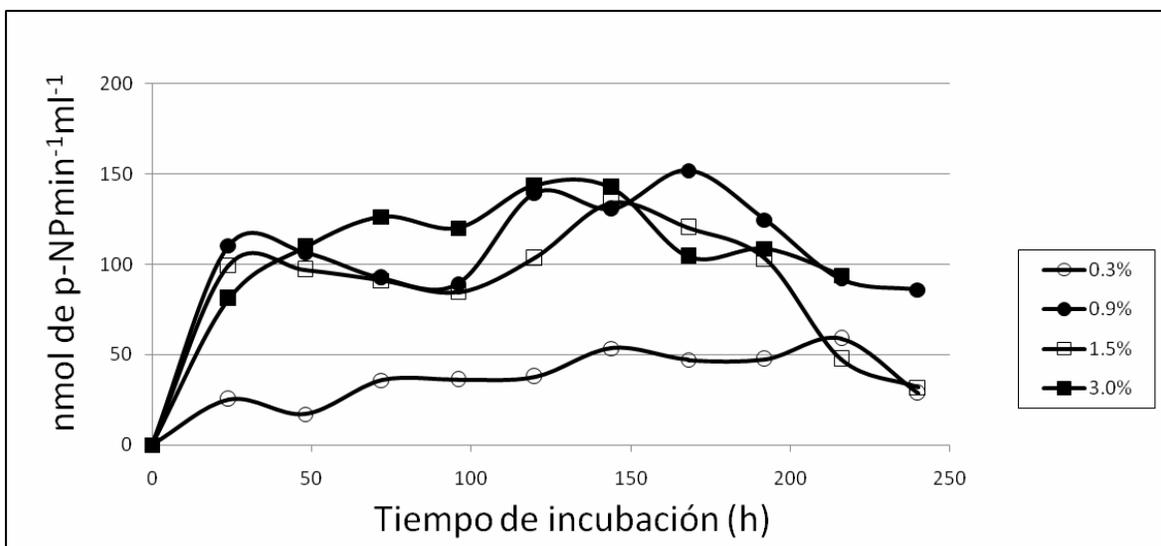


Figura 18. Actividad esterasa medida en el SN de los cultivos en diferentes concentraciones de MM-PUh por el método de hidrólisis del p-NPA.

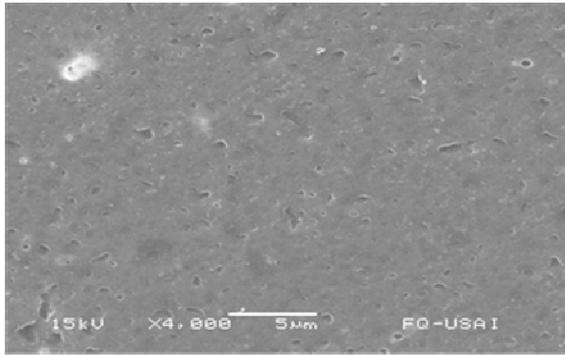
En un solo experimento, a partir de cultivos en MM-PUh al 0.3%, se determinó en un mismo cultivo la actividad esterasa asociada a membrana celular, así como la del SN. La extracción de la enzima asociada a membrana se realizó utilizando el detergente Zwittergent 3-12<sup>®</sup>. Ambas actividades fueron cuantificadas utilizando el método de hidrólisis de p-NPA.

A pesar de que se encontró actividad de tipo esterasa en los extractos de las células en algunas muestras, los valores no fueron constantes, por el contrario la variación fue tan grande entre ellos que no permitió definir el comportamiento de dicha actividad en los cultivos de la cepa. Extrañamente, los valores de actividad enzimática en el SN y en los extractos celulares se incrementan y disminuyen alternadamente en cada tiempo de muestreo.

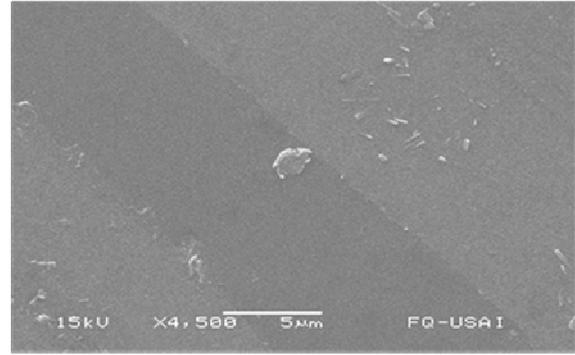
### **6.8 Efecto del crecimiento bacteriano sobre Hydroform sólido**

Para observar el efecto que la bacteria pudiera tener sobre el PU sólido, laminillas de Hydroform fueron expuestas durante 50 días dentro de un cultivo en MM-PUh inoculado con la cepa BQ5. Se realizaron dos muestras y un cultivo control para analizar y comparar la superficie del polímero antes y después de la exposición a las células. Después del tiempo de exposición, todas las laminillas fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido.

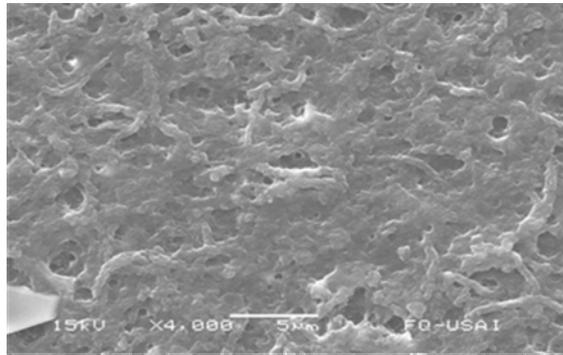
Las microfotografías obtenidas revelaron que una de las laminillas expuestas al cultivo bacteriano presentó un daño bastante notorio sobre su superficie en comparación con la muestra control, sin embargo, la segunda muestra de exposición no presentó ningún cambio e inclusive su superficie lució idéntica a la de la laminilla utilizada como control (figura 20). Este resultado se ha presentado en las tres ocasiones que hemos realizado el experimento.



Control



Laminilla expuesta A



Laminilla expuesta B

**Figura 19. Fotografías obtenidas por microscopía electrónica de barrido de las laminillas expuestas al cultivo de la cepa BQ5 en MM-PUh durante 50 días. Sólo una de las laminillas expuestas presenta cambio en su superficie en comparación con el control. Todas las fotografías tienen un aumento de 4,500X.**

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1 Origen y características particulares de la cepa BQ5

El poliuretano (PU), al igual que otros polímeros, ha sido utilizado ampliamente en la industria debido a la enorme versatilidad que presenta. Sin embargo, la generación y liberación en el ambiente de sus residuos también se ha incrementado en los últimos años provocando un serio problema de contaminación. Por otro lado, la acumulación de estos desechos en el medio ambiente ha resultado en que diversos microorganismos sean capaces de utilizarlos como fuentes de energía necesarias para su reproducción y supervivencia.

Basados en esta idea, en el año 2002, se comenzó un proyecto en el laboratorio de la Dra. Loza-Tavera enfocado en el estudio de los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la biodegradación del PU (Carrillo García, 2004, Ocegüera Cervantes, 2005). Durante estas investigaciones se logró aislar ocho cepas bacterianas a partir de PU en descomposición (Carrillo-García, 2004). Tres de las cepas (BQ1, BQ5 y BQ8) fueron identificadas como miembros del género *Alicyclophilus sp.* Las cepas BQ1 y BQ8 han demostrado tener una gran capacidad de utilizar al PU como única fuente de carbono mediante cambios en los espectros de Infrarrojo del PU presente en el medio de cultivo y por la observación de la aparición de agujeros en la superficie del polímero a través de microscopía electrónica. La actividad enzimática involucrada en la degradación del PU es de tipo esterasa, sin embargo, aún no se ha determinado claramente si dicha actividad es liberada por las bacterias en el sobrenadante de los cultivos, o bien, está involucrada con la enzima asociada a la membrana de las células (Ocegüera *et al.*, 2007).

Si bien es cierto que las cepas BQ1, BQ5 y BQ8 tienen un origen común y que las tres pertenecen a un mismo género, es necesario resaltar que la cepa BQ5 presenta características de crecimiento diferentes a las presentadas por las otras dos cepas. Durante las primeras horas de cultivo en medio líquido, el crecimiento de las cepas BQ1 y BQ8 se observa mediante la turbidez del medio. Sin embargo, a partir de las 17 horas

de incubación, el crecimiento de ambas cepas se da mediante la formación de agregados. En el caso de la cepa BQ5, la formación de los agregados se observa desde el inicio de los cultivos. A diferencia de los grumos formados por las otras cepas, los agregados de BQ5 son mucho más difíciles de disgregar, razón por la cual se ha dificultado el uso de la técnica espectrofotométrica para medir el crecimiento de esta cepa durante este trabajo. Por otro lado, la cepa BQ5 es capaz de desarrollar una película adherida a las paredes del tubo y en la superficie del cultivo, es decir, esta cepa presenta la capacidad de formar *biofilm*. Por último, la mayor diferencia es la capacidad de la cepa BQ5 para presentar tres diferentes variantes en la morfología de sus colonias al crecer en medio LB sólido (figura 7).

## **7.2 La presencia de variantes en la morfología de las colonias bacterianas surge como respuesta a diversos factores**

La variación en el fenotipo de las colonias, también llamado variación de fase, es un fenómeno utilizado por ciertas especies bacterianas para generar diversidad en la población, resultando en un incremento en las aptitudes a determinadas circunstancias y es importante en la adaptación a diversos ambientes (Van den Broek *et al.*, 2005).

La variación de fase es uno de los mecanismos utilizados por patógenos para sobrevivir en el hospedero mediante la evasión de los mecanismos de la respuesta inmune. Sin embargo, la presencia de distintas variantes también está involucrada en otros fenómenos como la producción de exo enzimas y metabolitos secundarios por parte de bacterias colonizantes de raíces (Van den Broek *et al.*, 2003).

Distintos causantes de estrés como la variación de temperatura y pH así como la presencia de cromo (VI) en aguas contaminadas inducen cambios morfológicos en las bacterias. Estos cambios se deben quizás a las alteraciones que sufre la membrana celular para lograr la supervivencia del organismo dentro de ambientes adversos (Thongbai *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2005).

Los mecanismos involucrados en la expresión de variantes morfológicas aún no se conocen con claridad, sin embargo, existen distintos reportes que describen el uso de rearrreglos genómicos, metilación diferenciada y variación de fase no programada vía mutaciones espontáneas (Van den Broek *et al.*, 2005).

Actualmente existe una gran diversidad de bacterias que llevan a cabo una variación en la morfología de sus células y colonias. Por ejemplo, *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de formar colonias con variantes de tipo lisa y rugosa provenientes de cultivos en forma de biofilm (Kirisits *et al.*, 2005). Este mismo fenómeno sucede con algunas colonias de *Streptococcus pneumoniae* (Allegrucci y Sauer, 2006) y con cultivos de *Serratia marcescens* (Koh *et al.*, 2007). Por su parte, distintas cepas de micobacterias presentan también colonias con morfologías rugosa y lisa (Belisle y Brennan, 1989).

Otros estudios nos hablan de cambios morfológicos en *Helicobacter pylori* y *Salmonella typhimurium* apreciados mediante microscopía electrónica, posiblemente relacionados con las fases de crecimiento (Mulugeta *et al.*, 1999; Thonbai *et al.*, 2006).

Durante este trabajo se determinó que, lejos de una contaminación en los cultivos, como se pensaba en un inicio, la cepa BQ5 tiene la capacidad de presentar tres tipos de colonias con morfologías distintas cuando la cepa es cultivada en LB sólido (figura 7).

Una de las morfologías encontradas es de textura lisa, mucoide, brillante y con bordes definidos. Actualmente se conoce que la morfología de tipo mucoide está determinada por la gran cantidad de glicopeptidolípidos (GPL) presentes en la pared celular de las bacterias (Belisle y Brennan, 1989) y se ha descrito que, en algunas cepas de micobacterias la producción de GPLs está asociada con la motilidad de las células y la capacidad para formar biopelículas (Carter *et al.*, 2000).

La segunda morfología observada es de tipo rugosa, seca y con bordes irregulares; además, se presenta en forma de círculos concéntricos dentro de la colonia. A pesar de

que muchas bacterias presentan también morfologías rugosas no hemos encontrado en la literatura algún fenotipo parecido al de la cepa BQ5.

Por último, la tercera morfología encontrada en los cultivos presenta un tamaño mayor a las anteriores y tiene una estructura de serpentina, es decir, crece en forma de cordones o filamentos paralelos que se pliegan en rizos alrededor de un punto central. Esta estructura se encuentra inmersa en una película de tipo mucoide y delgada dando el aspecto de que esta colonia se está extendiendo, razón por la cual hemos llegado a considerar que este tipo de morfología está asociado más directamente con una forma móvil de la cepa. La estructura tipo serpentina ya se ha reportado para algunas formas denominadas rugosas del género *Mycobacterium* (Fregnan y Smith, 1961; Howard *et al.*, 2006).

### **7.3 Las tres morfologías observadas se comportan como formas revertantes de las colonias**

Al intentar obtener cultivos con un solo tipo de variante morfológica observamos que cada una de las variantes siempre daba origen a las otras dos sin encontrar algún patrón específico para este fenómeno. Es decir, cada variante era capaz de revertir en las otras dos (figura 9).

Algunos reportes han descrito la capacidad de reversión o *phenotypic switching* en bacterias a través del uso de los mecanismos descritos anteriormente. La mayoría de ellos apoya la idea basada en que esta reversión está involucrada en la relación entre colonizar y persistir en una infección dentro del organismo hospedero. Por ejemplo, una cepa de *Mycobacterium abscessus* que originalmente presentaba morfología rugosa fue capaz de mostrar, de manera espontánea, una morfología de tipo lisa. Esta segunda morfología debida a una gran cantidad de GPLs, le permitió desplazarse y establecerse mediante la formación de biofilm. Sin embargo, después de 3 días de incubación la cepa revierte a colonias con variante rugosa. La forma revertida le permitió recuperar su capacidad de infectar y mantenerse en el hospedero (Howard *et al.*, 2006).

En nuestro caso, no logramos relacionar algún fenotipo con una capacidad específica adquirida por la cepa para su supervivencia, ya que todas las variantes se presentaron de manera indistinta y con buen crecimiento. Sin embargo, es posible que la presencia de algún factor externo, productor de estrés, influya en el cambio del fenotipo colonial.

#### **7.4 La variación fenotípica se presenta como un fenómeno natural de la cepa BQ5**

Debido a que quizás el cambio de morfología se debiera a condiciones de estrés, se evaluó si la densidad de células, la presencia del PU en el medio de cultivo o el tiempo de incubación fueran las causas para la formación de las variantes morfológicas. La densidad celular puede llegar a ser un factor importante de estrés que influye en muchos aspectos del metabolismo y de la expresión genética en los cultivos bacterianos (Liu y Ferenci, 2000). Debido a esto, se conoce que muchas especies bacterianas son capaces de tener un tipo de comunicación intercelular o *Quorum sensing* que les permite identificar estados metabólicos en bacterias aledañas estableciendo de esta manera una regulación entre ellas.

El quorum sensing es un mecanismo utilizado tanto por bacterias gram positivas como por Gram negativas para coordinar un ambiente comunal. En este fenómeno se encuentra involucrada la regulación de genes específicos en respuesta a densidad poblacional. Esta expresión coordinada de genes es llevada a cabo por la producción, liberación y detección de pequeñas moléculas señalizadoras llamadas autoinductores. Cuando los cultivos tienen una baja densidad poblacional las cantidades de autoinductores generadas se encuentran en sus niveles basales y se dispersan en el medio; sin embargo, cuando la densidad poblacional se incrementa, los niveles de autoinductores aumentan y logran activar específicamente reguladores transcripcionales que interactúan con secuencias de DNA. Esto lleva a un aumento o bloqueo de la transcripción de los genes reguladores del quorum sensing, resultando en la activación sincronizada de ciertos fenotipos en la población bacteriana (González y Keshavan, 2006).

Las bacterias utilizan el quorum sensing para regular una variedad de fenotipos como la formación de biofilm, producción de toxinas, producción de exopolisacáridos, producción de factores de virulencia y su movilidad, los cuales son esenciales para el establecimiento de la bacteria (González y Keshavan, 2006). Siguiendo la idea de esta comunicación intercelular y dado que en muchos de nuestros cultivos sólidos observamos que dentro de las estrías más cerradas las colonias VR se presentaban con una mayor frecuencia, llegamos a considerar que la bacteria sufría un tipo de estrés debido a una alta densidad poblacional, el cual podría ser la causa de los cambios en la morfología colonial. Decidimos entonces, probar distintas diluciones del cultivo bacteriano en medio LB sólido, pensando en que si la VR era un fenotipo que permitiera un mejor crecimiento en condiciones de estrés, colonias con esta morfología se observarían en diluciones menores. Sin embargo, la variante rugosa no se observó en ninguna de las diluciones probadas, mostrando que la cepa no cambia su morfología como respuesta a la cantidad de células presentes en el cultivo (tabla 1).

Por otro lado, se estudió la posibilidad de que la presencia de PU en el medio de cultivo fuera la causa del cambio de morfología. Para esto, muestras del cultivo con PU tomadas a diferentes tiempos de incubación fueron colocadas en LB sólido para observar las morfologías de sus colonias. La VL se aprecia en las primeras horas del cultivo mientras que la VR y la VE se observan a partir de las 20 h de incubación. Interesantemente la VL se presenta nuevamente a medida que el tiempo de incubación aumenta (figura 14). Este patrón de crecimiento también es presentado cuando la cepa es colocada en medio LB líquido (figura 15).

El hecho de que la cepa tuviera un patrón de crecimiento similar al ser cultivada tanto en medio LB, rico en nutrientes, como en MM-PUh, nos hace pensar que los cambios de morfología, lejos de ser una consecuencia del estrés por fuente de carbono (MM-PUh) parece ser un comportamiento que la bacteria tiene de manera natural, el cual también se presenta en un medio rico en nutrientes (LB). Es importante mencionar que si bien es cierto que la presencia de PU en el medio no es la razón para el cambio

en la morfología, sí es capaz de acelerar este cambio ya que puede observarse tres horas antes en comparación con los cultivos provenientes de LB líquido.

No hemos podido establecer con claridad los tiempos exactos en los que se presenta este intercambio de morfología pero consideramos que la presencia de las distintas variantes obedece a un patrón desarrollado a través de sus fases de crecimiento. Se ha observado, que en muchos otros microorganismos la presencia de un tipo de morfología durante la fase lag está involucrada en un incremento en la movilidad y adherencia, mientras que otro tipo de morfología observada durante la fase exponencial y estacionaria está relacionada con la presencia de cápsula y por lo tanto, con un incremento en la virulencia de la cepa (Mulugeta *et al.*, 1999; Niehus *et al.*, 2002).

### **7.5 La cepa BQ5 forma autoagregados y biofilm en medio líquido**

A diferencia de las otras cepas aisladas (BQ1 y BQ8), la cepa BQ5 es capaz de formar agregados en medio líquido desde el inicio del cultivo en MM-PUh. Sin embargo, al cultivarse en LB, las colonias VL y VE crecen de manera distinta (turbidez del medio) a las de tipo VR (formación de agregados) (figura 10). De manera similar a nuestro trabajo se ha reportado que una variante colonial de *P. aeruginosa* denominada *Sticky* o pegajosa (la cual corresponde a colonias pequeñas y rugosas) es capaz de formar agregados en cultivos líquidos estáticos, mientras que la variante silvestre (colonias grandes y lisas) crece generando turbidez en el medio de cultivo. Interesantemente, cuando los cultivos son incubados bajo agitación, únicamente se encuentra la variante silvestre (Kirisits *et al.*, 2005).

Los autores señalan además que esta variante *Sticky* mostró hiperadherencia, un incremento en la hidrofobicidad, reducción en la motilidad de las células y una mejor capacidad para la formación del biofilm. Debido a estos resultados se considera entonces que las condiciones hostiles de cultivo llevaron a la bacteria a desarrollar un fenotipo que le permitiera adaptarse y crecer mejor mediante la formación de estructuras como los biofilms (Kirisits *et al.*, 2005).

A pesar de que la formación de agregados es un fenómeno muy notorio en el crecimiento de BQ5, se ha considerado que este hecho debe ser parte natural del género puesto que las otras cepas también son capaces de formar agregados a partir de las 17 horas de incubación.

Esto se observó a través de la medición, por peso fresco, de la biomasa en cultivos con las cepas BQ1 y BQ8 durante 5 días de incubación. Los resultados mostraron que, mientras que la densidad óptica de los cultivos disminuía a partir de las 17 h, la cantidad de biomasa se incrementaba con el tiempo. Mostrando entonces que estas cepas son capaces de cambiar su forma de crecimiento al cultivarse en medio líquido (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007)

La habilidad de las bacterias para agregarse es de gran importancia para la biorremediación de compuestos tóxicos, particularmente en procesos que involucran el uso de lodos activados. Los organismos capaces de agregarse tienen distintas ventajas sobre aquellos que no lo hacen, ya que pueden permanecer dentro de los lodos activados durante períodos de reciclaje mucho más largos. Por otro lado, los flóculos forman una protección contra algunos protozoarios cuya alimentación principal son microorganismos que se desplazan libremente (Van Limbergen y Verstraete, 1998).

Un buen número de hipótesis han sido propuestas para explicar la autoagregación de los microorganismos, incluyendo la presencia de gradientes de sustratos, estrés físico y químico así como la evasión a la depredación, sin embargo, aún no se conoce con claridad los mecanismos involucrados en este proceso (Brossier y Verstraete, 1996). Por otro lado, se ha encontrado que existe un aumento de la hidrofobicidad en la superficie celular de bacterias capaces de autoagregarse al crecer en presencia de clorofenoles como fuente de carbono, siendo esta característica una razón muy fuerte para que se lleve a cabo la agregación de las células (Farrel y Quilty, 2002).

Durante este trabajo, no pudimos determinar la causa de la aglomeración de nuestra cepa, ni tampoco si este fenómeno tiene efecto alguno sobre el uso de PU

como fuente de carbono puesto que se comporta de la misma manera cuando crece en MM-PUh y en medio LB. Sin embargo, dado las características hidrofóbicas del polímero, posiblemente ésta sea una razón que facilite el uso del PU como fuente de carbono.

Por otro lado, una característica más del crecimiento de la cepa BQ5, es su capacidad de formar *biofilm* (biopelícula) adheridas en la superficie de los tubos y matraces al crecer en ambos medios de cultivo (MM-PUh y LB). Claramente, no conocemos si esta característica tiene relación con la presencia de PU como fuente de carbono, sin embargo, hemos observado que la formación de estas estructuras aumenta cuando la bacteria es cultivada en medio MM-PUh. Con base en lo anterior, y, debido a que se conoce que este tipo de estructuras son formadas en muchos casos cuando las células sufren condiciones de estrés, como un recurso para garantizar su supervivencia, hemos llegado a considerar que la presencia de PU en el medio influye de alguna manera para una formación mucho más eficaz del biofilm.

Interesantemente, existen muchos reportes que relacionan la presencia de distintas variantes morfológicas con la formación de biofilm en cultivos de *P. aeruginosa* y *S. neumoniae* (Kirisits *et al.*, 2005; Allegrucci y Sauer, 2006). En muchos casos, se ha observado que cada tipo de morfología colonial se presenta en una determinada etapa de formación del biofilm indicando que la producción de estas estructuras genera una diversificación en los fenotipos coloniales (Koh *et al.*, 2007).

Tanto la agregación de las células como la capacidad para formar biofilm están estrechamente relacionadas con la adherencia que presentan las bacterias. La adherencia es un proceso complejo que depende de las diversas características del medio de cultivo, del sustrato y de la superficie de las células.

En nuestro caso, no hemos establecido alguna relación entre los distintos tipos de variantes morfológicas observadas con la capacidad de la cepa para formar biofilm ni con su capacidad para generar agregados o para utilizar el PU como fuente de carbono. Para realizar este tipo de estudios se requeriría de un reactor para la formación de

biofilm mediante flujo celular o *Flow cell biofilm reactor*, este es un equipo especializado que consta básicamente de canales inoculados con una cepa, a través de los cuales se hace pasar medio de cultivo en forma de un flujo, generalmente laminar. Con el paso del tiempo, la cantidad de células adheridas se incrementa hasta formar las estructuras complejas que integran el biofilm. La ventaja de estos equipos es que se encuentran acoplados a un microscopio confocal que permite monitorear las etapas involucradas en la formación de estas estructuras, así como los tipos de células que las conforman (Kikerlund *et al.*, 2007).

### **7.6 Identificación de la cepa BQ5 de *Alicycliphilus sp.***

Mediante la secuenciación del gene 16S rRNA se logró identificar a la cepa BQ5, con un 100% de homología, como parte del género *Alicycliphilus sp.* (figura 13). Poco se conoce sobre este género puesto que ha sido reportado recientemente. Sin embargo, se ha descrito que *Alicycliphilus denitrificans*, la primera bacteria identificada como miembro de este género, es un microorganismo desnitrificante y degradador de ciclohexanol (Mechichi *et al.*, 2003). Este género está filogenéticamente relacionado con *Acidovorax defluvii* y *Comamonas denitrificans* las cuales son bacterias aisladas a partir de lodos activados (Gumaelius *et al.*, 2001; Schulze *et al.*, 1999). También está relacionado con *Comamonas acidovorans* TB35, la cual es una bacteria capaz de utilizar PU como fuente de carbono (Nakajima-Kambe *et al.*, 1997). Además, las cepas BQ1 y BQ8 ya han sido reportadas como miembros de este género (Oceguera Cervantes *et al.*, 2007)

### **7.7 Caracterización del crecimiento en función de la concentración de sustrato**

El crecimiento de la cepa con distintas concentraciones de PU en el medio fue cuantificado durante 11 días. El crecimiento en MM-PUh presenta una fase exponencial corta que termina cuando el cultivo llega a las 24 h de incubación. Interesantemente se observa un desarrollo en oscilaciones durante todo el tiempo del experimento (figura 16). En un principio, consideramos que estas formas de crecimiento eran adaptaciones al medio que la cepa sufría durante los primeros días de cultivo, sin embargo, el mismo

patrón de crecimiento se observó durante toda la fase estacionaria. Hasta el momento, no hemos podido explicar con claridad esta forma de crecimiento, sin embargo, existen investigaciones enfocadas en el comportamiento de bacterias en fase estacionaria durante circunstancias de inanición.

Cuando los cultivos tienen suficiente cantidad de nutrientes, las condiciones son propicias para el crecimiento exponencial en la mayoría de las bacterias. Sin embargo, al existir una escasa disponibilidad de nutrientes, los periodos de crecimiento exponencial tienden a ser de corta duración y las bacterias deben hacer frente a períodos prolongados de hambre. La mayoría de las bacterias enfrentan la inanición mediante el desarrollo de una mayor resistencia al estrés ambiental. Debido a esto, la inanición prolongada conduce inevitablemente a poblaciones heterogéneas en las que algunas células mueren, mientras que otras sobreviven llevando a la manifestación de un comportamiento cíclico observado durante la fase estacionaria. Las células que lograron sobrevivir son la progenie mutante de las subpoblaciones que tienen una ventaja de crecimiento en fase estacionaria o *Growth advantage in stationary phase* (denominadas mutantes con fenotipo GASP) (Zambrano y Kolter, 1996).

La hipótesis central planteada a partir de estos estudios sugiere que, al haber condiciones de estrés, algunas bacterias mueren de hambre, sin embargo, existen otras poblaciones bacterianas que pueden sobrevivir y evolucionar al adquirir un fenotipo GASP encontrando en el medio nutrientes esenciales proporcionados principalmente por las células muertas o bien, por componentes en el medio de cultivo que antes no podían utilizarse (Zambrano y Kolter, 1996; Finkel y Kolter, 1999).

Con base en esta idea, hemos llegado a considerar que, debido a las condiciones de estrés provocadas por la fuente de carbono (PU), la cepa mantiene una fase exponencial muy corta (24 h), y que, al llegar a la fase estacionaria muchas células mueren y se lisan. Esto explicaría las caídas observadas a lo largo de las curvas; sin embargo, una pequeña población sobrevive, se adapta al medio y crece nuevamente.

Al parecer este fenómeno se estaría repitiendo originando las oscilaciones observadas en cada tiempo de muestreo.

Si bien esta es una idea que ha resultado muy interesante para nosotros, los valores tan altos en las desviaciones estándar, nos hacen pensar también en la posibilidad de que nuestros resultados surgen debido a problemas ocasionados con la aglomeración de las células durante su cultivo. Es decir, es probable que la naturaleza misma de la cepa evitara un reparto inicial de células totalmente homogéneo provocando que los valores obtenidos no reflejaran los cambios reales en la biomasa generada.

Por otro lado, el crecimiento de la cepa mostró una relación directa con la concentración de sustrato, permitiendo que se pudiera aplicar el modelo de Monod a los datos obtenidos (figura 17B). La dependencia del crecimiento bacteriano muestra un comportamiento hiperbólico alcanzando una  $\mu_{\max}$  aproximada de 0.09. Al comparar con los valores obtenidos para las otras cepas, las cuales presentan una  $\mu_{\max}$  de 3.94 para la cepa BQ1 y de 4.55 para la cepa BQ8 (Oceguera *et al.*, 2007), la cepa BQ5 presenta un valor  $\mu_{\max}$  menor, indicando que tiene una velocidad de crecimiento mucho mayor que las otras dos cepas.

El máximo crecimiento se alcanzó con una concentración de 1.5 % de PU en el medio. Cuando la concentración de PU en el medio fue del 3% el crecimiento disminuyó ligeramente, lo que sugiere que tal vez a esta concentración el polímero ejerza un efecto tóxico en las células.

## **7.8 Determinación de la actividad enzimática de tipo de esterasa en el sobrenadante de cultivos con MM-PUh**

Uno de los mecanismos propuestos para la degradación del PU por microorganismos, es la capacidad de éstos para presentar actividad enzimática de tipo esterasa. La acción de esta enzima se centra en la hidrólisis de los enlaces tipo éster presentes a lo largo de la estructura del polímero. La liberación de compuestos con

menor tamaño facilitaría entonces su utilización como una fuente de carbono para los microorganismos.

En la cepa de *C. acidovorans* TB35 se ha reportado la existencia de dos tipos de esterases, una que es extracelular y una que se mantiene unida a la membrana plasmática de las células (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). Sin embargo, únicamente se encontró que la actividad asociada a membrana fue capaz de atacar al PU mientras que la del sobrenadante, la cual presentó también actividad sobre pNPA, no tuvo efecto sobre el polímero (Akutsu *et al.*, 1997)

En un trabajo previo y basados en esta información, se determinó que la cepa BQ5 tenía actividad enzimática de tipo esterasa, debido a la formación de un halo de precipitación alrededor del crecimiento bacteriano en un medio diferencial con Tween 80<sup>®</sup>. Sin embargo, al cuantificar la actividad en el SN de los cultivos a las 12 h de incubación, no se encontró actividad alguna, razón por la cual se consideró que esta enzima pudiera estar asociada a la membrana de las células (Oceguera, 2005).

Con base en esta consideración se buscó si existía una posible actividad de tipo esterasa asociada a la membrana celular mediante la extracción de la enzima utilizando un detergente. Los resultados de estos experimentos fueron muy variables entre sí ya que se lograba cuantificar actividad en un determinado tiempo del cultivo pero ésta se perdía en el siguiente punto de muestreo. Por lo tanto, no estamos seguros si el detergente fue eficiente en la extracción de la enzima, así como tampoco podemos definir con claridad su comportamiento. Durante este experimento también se determinó la esterasa presente en el SN de los cultivos. A diferencia de los resultados obtenidos con anterioridad (Oceguera, 2005), se encontró actividad esterasa a las 6 h de cultivo. Sin embargo, no se observó ni a las 0 y 3 h, ni a las 23 y 29 h y en este trabajo no se midió a las 12 h, por lo que el resultado observado por Oceguera (2005) no puede ser descartado; quizá a las 12 h efectivamente no se pueda detectar actividad de esterasa en el SN.

Un punto interesante que debemos mencionar es que los valores para ambos tipos de actividad enzimática se incrementaban y disminuían de una manera alterna en cada tiempo de muestreo. Este hecho pareciera indicar que en un determinado momento la célula exhibe una esterasa asociada a su membrana pero, al pasar el tiempo, dicha actividad se pierde y sólo la podemos encontrar en el SN del cultivo. Por supuesto, antes de aventurarse a proponer alguna relación entre estas observaciones, es necesario repetir la medición de la actividad enzimática en los extractos celulares y asegurar que el detergente cumple su objetivo con el fin de confirmar si en verdad las células presentan actividad de esterasa asociada a la membrana.

Posteriormente, en un nuevo experimento, se cuantificó actividad enzimática en el SN de cultivos con cuatro distintas concentraciones de PU en el medio (figura 18). En esta ocasión los valores obtenidos fueron mucho más consistentes entre sí y mucho más reproducibles. La actividad enzimática fue monitoreada cada 24 h de incubación. El valor máximo de actividad se alcanza entre las 120 y 144 h, pasando este tiempo, la actividad en todas las concentraciones probadas disminuye. Nuevamente, la actividad enzimática total oscila a lo largo de todo los tiempos de muestreo

Si bien Ocegüera (2005) no encontró actividad a las 12 h de incubación, mientras que en este trabajo los valores de actividad se encontraron a las 24 h de cultivo, es importante señalar que los resultados logrados no contradicen de ninguna manera lo obtenido previamente, puesto que los tiempos en los que se cuantificó la actividad mantuvieron 12 h de diferencia. Es decir, es muy probable que si se hubiera probado una concentración de PU distinta a 0.3% o si se hubiera medido la actividad a un tiempo mayor a las 12 horas de cultivo, la actividad de tipo esterasa en el SN también se hubiera reportado antes para la cepa BQ5.

## **7.9 Efecto bacteriano sobre laminillas de Hydroform sólido**

A diferencia de las cepas BQ1 y BQ8, las cuales mostraron capacidad para producir agujeros en la superficie del polímero (Ocegüera, 2007), en este trabajo no se

observó efecto sobre todas las laminillas colocadas en contacto con las células, por lo tanto, no podemos asegurar que la cepa realmente esté atacando al PU sólido.

Debido a que no observamos un claro efecto sobre el PU sólido y dada la forma de las curvas de crecimiento de la cepa (la cual ya discutimos como una posible respuesta a circunstancia de inanición en la que las células sobrevivientes pueden utilizar los compuestos liberados por la lisis de otras bacterias como fuentes esenciales de nutrientes), hemos llegado a plantear la posibilidad de que BQ5 realmente no sea capaz de atacar al polímero ni de utilizarlo como fuente de carbono a pesar de pertenecer al mismo género que las otras dos cepas.

Hemos considerado que quizás el crecimiento exponencial que tiene la bacteria durante las primeras 24 h de cultivo se deba a la presencia de una fuente de carbono alterna que la cepa sí puede utilizar. En el caso de las cepas BQ1 y BQ8 ya se reportó que también son capaces de utilizar como fuente de carbono un compuesto que se encuentra en la formulación comercial del polímero. Se ha visto que este compuesto llamado N-metilpirrolidona (NMP) sostiene el crecimiento de las cepas durante las primeras 12 h de cultivo y que es pasando ese tiempo cuando las cepas comienzan a utilizar al PU como fuente de carbono (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007).

En el caso de la cepa BQ5, quizás la NMP sostenga el crecimiento bacteriano durante las primeras 24 h de incubación y después de ese tiempo parte de las células mueran, se lisen y sirvan de nutrientes para sostener el crecimiento de aquéllas que lograron sobrevivir, con lo cual se explicaría los distintos ciclos que presenta la curva de crecimiento.

Para determinar con certeza si el PU es o no atacado, debemos analizar si sufre cambios en su estructura mediante estudios de espectroscopía de infrarrojo los cuales serán parte de los experimentos que deberán realizarse como continuación de este trabajo.

## 8. CONCLUSIONES

1. La cepa BQ5 es capaz de presentar, de manera natural, tres tipos diferentes de colonias, cuyos fenotipos se intercambian entre sí. Estos cambios morfológicos son observados sobre cultivos sólidos de medio LB.
2. El crecimiento en medio líquido se genera en forma de agregados y como *biofilm* adherido a las paredes del tubo.
3. Se identificó a la cepa BQ5 como miembro del género *Alicyclophilus sp.* mediante la secuenciación del gene 16S rRNA.
4. Se observaron oscilaciones en el crecimiento de la cepa BQ5 en MM-PUh a lo largo del tiempo de muestreo. Las curvas obtenidas muestran una relación directa entre el crecimiento de la cepa y la concentración de sustrato en el medio, siguiendo el modelo de Monod. El máximo crecimiento se obtiene cuando la concentración de PU en el medio es del 1.5%.
5. Se determinó actividad enzimática de tipo esterasa en el sobrenadante de los cultivos al utilizar distintas concentraciones de PU en el medio. Los valores de actividad también oscilan durante todo el tiempo en que se cultivó la cepa. La máxima actividad presentada por la enzima fue de  $150 \text{ nmol de p-NP min}^{-1} \text{ ml}^{-1}$  y es alcanzada entre 120 y 144 h de incubación cuando se tiene una concentración alta de PU en el medio (0.9, 1.5 y 3.0%).
6. Se evaluó la presencia de actividad enzimática de tipo esterasa asociada a la membrana de las células. Sin embargo, los datos no han sido concluyentes, razón por la cual, no podemos definir claramente el comportamiento de dicha actividad en los cultivos.
7. No se observó efecto bacteriano en la totalidad de las laminillas de PU sólido probadas, razón por la cual consideramos que el Hydroform no es la única fuente de carbono utilizada por la cepa durante su desarrollo en MM-PUh.

## 9. ANEXO

### 9.1 Formulación de medios de cultivo

**MEDIO MÍNIMO** (Basado en el medio empleado por Nakajima-Kambe *et al.*, 1995)

Composición por litro.

#### **Solución A (10X)**

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>                      20.0 g

K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>                      70.0 g

#### **Solución B (100X)**

NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>                      100.0 g

MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O                10.0 g

#### **Solución de elementos traza (1000X)**

ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O                1.0 g

CuSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O                0.10 g

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O                10.0 g

MnSO<sub>4</sub>·4-6H<sub>2</sub>O              2.0 g

Nota: omitir el NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub> si se prueba PU como única fuente de nitrógeno.

#### Preparación

1. Preparar las soluciones A y B y esterilizar en autoclave a 120°C/15 minutos.
2. Preparar la solución de elementos traza y esterilizar por filtración (filtros Whatman de 0.22 µm).
3. 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 y llevara un volumen final de un litro. En caso de adicionar Hydroform como única fuente de

carbono, sustituir 100 ml de agua estéril por 100 de solución 10X de Hydroform previamente esterilizada por filtración (ver siguiente receta).

4. Por último, si se preparan placas de agar MM esterilizar el agua con el equivalente a 1.5 % de concentración final de agar.

### **Solución de Hydroform 10X**

El Hydroform es un barniz comercial soluble en agua producido por Polyform® de México y tiene una concentración de sólidos al 30%, por lo que debe diluirse 1:100 para ajustar la concentración final del medio al 0.3%.

#### Preparación

1. Realizar una dilución 1:10 de Hydroform comercial en agua desionizada, con lo cual se obtiene una solución 10X de Hydroform con 3% de sólidos.
2. Filtrar la solución 10X recién preparada a través de una membrana de fibra de vidrio Whatman GF/C con un poro de 0.45µm. Esta filtración se realiza para retirar los oligómeros formados en la polimerización espontánea del Hydroform y evitar así tapar la membrana de la siguiente filtración.
3. Filtrar nuevamente en condiciones completamente asépticas utilizando una membrana con poro de 0.22µm. Es importante que no transcurra más de 1 hora entre la filtración anterior y esta ya que los oligómeros se formarían nuevamente.

Esta solución estéril se adiciona al medio de cultivo después de haber agregado las soluciones A, B y solución de elementos traza.

### **MEDIO LURIA BERTANI**

Composición por litro

Peptona	10.0 g
Extracto de levadura	5.0 g
NaCl	10.0 g
Agar	16.0 g

## Preparación

1. Disolver todos los componente en el orden que se indica en 700 ml de agua desionizada. Cuando la solución esté totalmente cristalina aforar hasta un volumen final de un litro. Ajustar a pH 7. Cuando se preparen placas de LB sólido, el agar se agrega en el volumen final aforado.
2. Esterilizar por autoclave 120°C/15 minutos
3. Las placas de LB sólido se preparan vertiendo el medio ya estéril y caliente sobre cajas petri estériles desechables. Se deja enfriar y solidificar el medio por 20-30 minutos. Este procedimiento se realiza en condiciones de asepsia. Tapar las cajas cuando el medio esté totalmente solidificado y frío.
4. Mantener en refrigeración

Nota: El medio LB convencional fue modificado ya que se adicionó el doble de sal para reducir la probabilidad de contaminación ambiental. También se agregó un gramo más de agar para evitar que este se rasgara cuando se inocularan las cajas.

## **9.2 Formulación de soluciones**

### **Solución PB pH 7**

Composición por 100 ml

$\text{KH}_2\text{PO}_4$                       2.0 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4$                       7.0 g

### Preparación

1. Disolver las sales en el orden indicado en un volumen un poco menor a 100 ml
2. Aforar hasta el volumen de 100 ml y ajustar el pH hasta un valor de 7.
3. Esterilizar por autoclave 120°C/15 minutos

### **Solución PB 200 mM pH 7**

Composición por 500 ml

4. $\text{KH}_2\text{PO}_4$ (1M)	38.5 ml
5. $\text{K}_2\text{HPO}_4$ (1M)	61.5 ml

#### Preparación

1. Preparar las soluciones Stock, adicionar el volumen adecuado de cada componente en 500 ml de agua.
2. Ajustar el pH a 7.0. Almacenar a temperatura ambiente

### **Solución PB 20 mM con 0.22 % Zwittergent 3-12<sup>®</sup> (solución de extracción)**

#### Preparación

1. Para un volumen final de 200 ml, diluir 20 ml de la solución PB 200 mM en 180 ml de agua desionizada.
2. Adicionar 0.44 g del detergente Zwittergent 3-12.
3. Almacenar a temperatura ambiente.

### **Solución de Lisozima $20\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$**

#### Preparación

1. Preparar una solución Stock de lisozima a una concentración de 50 mg/ml en agua desionizada.
2. Distribuir en alícuotas y diluir hasta una concentración de  $20\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ , almacenar a  $-20^\circ\text{C}$ . Desechar cada alícuota después de utilizar.

## **Solución de p-NPA**

### Preparación

1. Disolver 181.1 mg de p-NPA en 50 ml de acetonitrilo.
2. Mezclar bien, mantener perfectamente cerrada y en un lugar seco puesto que el p-NPA se hidroliza con facilidad.

## **Solución de proteinasa K ( $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ )**

### Procedimiento

3. Preparar una solución Stock con una concentración de 20 mg/ml con agua desionizada
4. Distribuir y diluir en alícuotas de  $10 \mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ . Almacenar a una temperatura de  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **Solución sodium dodecyl sulfate (SDS) 10 %**

### Preparación

1. Disolver 100 g de SDS en 900 ml de agua desionizada.
2. Calentar a  $68^{\circ}\text{C}$  hasta disolver. Ajustar a pH 7.2 adicionando gotas de HCl.
3. Ajustar el volumen final con agua hasta un litro.

## **Solución amortiguadora TES**

10mM TrisCl, pH 7.5

10 mM NaCl

1 mM EDTA, pH 8.0

### Preparación

1. Disolver en el volumen deseado de agua las cantidades necesarias para alcanzar la concentración indicada de cada componente.
2. Esterilizar en autoclave 120°C/15 minutos.
3. Conservar a Temperatura ambiente

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. Akutsu Y., T. Nakajima-kambe. N. Nomura y T.Nakahara. 1998. Purification and properties of a polyester polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. Appl Environ Microbiol. 64:62-67.
2. Akutsu Y., T. Nakajima-kambe. N. Nomura y T.Nakahara. 1999. Purification and properties of cultura -broth- secreted esterasa from the polyurethane degrader *Comamonas acidovorans* TB-35. J Biosci Bioeng. 88:484-487.
3. Allegrucci M. y K. Sauer. 2007. Characterization of colony morphology variants isolated from *Sreptococcus* Biofilm. J Bacteriol. 189:2030-2038.
4. Bassier, B.L. 2002. Small talk: cell to cell communication in Bacteria Minireview. Cell. 109:421-424.
5. Basson A., L.A. Fleming y H.Y. Chenia. 2007. Evaluation of adherence, hydrophobicity, aggregation, and biofilm development of *flavobacterium johnsoniae*-like isolates. Microb Ecol. 55:1-14.
6. Belisle, J.T. y P.J.Brennan. 1989. Chemical basis of rough and smooth variation in mycobacteria. J Bacteriol. 171:3465-3470.
7. van den Broek, D., G.V. Bloemberg y B. Lugtenberg. 2005. The role of phenotypic variation in rhizosphere *Peudomonas* bacteria. Minireview Environ Microbiol. 7:1686-1697.
8. Carrillo-García A. 2004. Tesis de maestría Facultad de Química, UNAM. Identificación de una esterasa extracelular cuya actividad está relacionada con el crecimiento de *Acinetobacter sp.* en poliuretano.
9. Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Sorber y H.M. Lappi-Scott. 1995. Microbial biofilms. Annu Rev Microbiol. 49:711-45.

10. Farrell, A. y B. Quilty. 2002. Substrate-dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. *J Ind Microbiol Biotech.* 28:316-324.
11. Finkell, S.E. y R. Kolter. 1999. Evolution of microbial diversity during prolonged starvation. *PNAS.* 96:4023-4027.
12. Fregnan, G.B. y D.W. Smith. 1961. Description of various colony forms of mycobacteria. *J Bacteriol.* 83:819-827.
13. González, J.E. y N.D. Keshavan. 2006. Messing with bacterial Quorum Sensing. *Review. Microbiol Mol Biol. Rev.* 70:859-870
14. Howard, G.T. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 40:245-252.
15. Howard, S.T., E. Rhoades, J. Recht, X. Pang, A. Alsup, R. Kolter, C.R. Lyons y T.F. Byrd. 2006. Spontaneous reversion of *Mycobacterium abscessus* from a smooth to a rough morphotype is associated with reduced expression of glycopeptidolipid and reacquisition of an invasive phenotype. *Mycrobiology.* 152:1581-1590.
16. Hutson, R. A., Thompson, D. E. & Collins, M. D. (1993). Genetic interrelationships of saccharolytic *Clostridium botulinum* types B, E and F and related clostridia by small-subunit rRNA gene sequences. *FEMS Microbiol Lett* 108, 103–110.
17. Juhas, M., L. Eberl y B. Tümmer. 2005. Quorum sensing: the power of cooperation in the world of *Pseudomonas*. *Minireview. Environ Microbiol.* 7:459-471.
18. Kirisits, M.J., L. Prost, M. Starkey y M.R. Parsek. 2005. Characterization of colony morphology variants isolated from *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 71: 4809-4821.

19. Kirkelund, H.S., P.B. Rainey, J.A.J. Haagensen y S. Molin. 2007. Evolution of species interactions in a biofilm community. *Nature*. 445:533-536.
20. Koh, R.S., K.W. Lam, M. Alhede, S.Y. Queck, M. Lobbate, S. Kjelleberg y S.A. Rice. 2007. Phenotypic diversification and adaptation of *Serratia marcescens* MG1 Biofilm-derived morphotypes. *J Bacteriol*. 189:119-130.
21. Lin Z., Y. Zhu, T.L. Kalabegishvili, N.Y. Tsiabkhashvili, H.Y. Holman. 2006. Effect of chromate action on morphology of basalt inhabiting bacteria. *J MSEC*. 26: 610-612.
22. Liu, X., C. NG y T. Ferenci. 2000. Global adaptation resulting from high population densities in *Escherichia coli* cultures. *J Bacteriol*. 182:4158-4164.
23. Nakajima-Kambe, T., F. Onuma, N. Kimpara y T. Nakahara. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS*. 129:39-42.
24. Nakajima-Kambe, T., F. Onuma, Y. Akutsu y T. Nakajara. 1997. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. *J Ferment Bioeng*. 83:456-460.
25. Nakajima-Kambe, T., Y. Shigeno-Akutsu, N. Nomura, F. Onuma y T. Nakahara. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Minireview Appl Microbiol Biotech*. 51: 134-140.
26. Nomura, N., Y. Akutsu, T. Nakajima-Kambe y T. Nakahara. 1998. Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35. *J Ferment Bioeng*. 86:339-345.
27. Ocegüera-Cervantes, A. 2005. Tesis de licenciatura Facultad de Química, UNAM. Aislamiento de bacterias capaces de crecer en un medio con poliuretano

(Hydroform) como única fuente de carbono y caracterización de las actividades enzimáticas relacionadas con su degradación

28. Ocegüera, C. A., Carrillo G. A., López N., Bolaños N. S., Cruz G. M.J., Wachter C. y Loza T. H. 2007. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. Strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl Environ Microbiol.* 73:6214-6223.
29. Rowe L., G.T. Howard. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodeterior Biodeg.* 50:33-40.
30. Thonbai, B., P. Gasaluck y W.M. Waites. 2006. Morphological changes of temperature and pH stressed *Salmonella* following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin. *LWT.* 39:1180-1188.
31. Vlamakis, H., C. Aguilar, R. Losick y R. Kolter. 2008. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Genes & Dev.* 22:945-953.
32. Weiser, J.N., Z. Markiewicz, E. I. Tuomanen y J.H. Wani. 1996. Relationship between phase variation in colony morphology, intrastrain variation in cell wall physiology, and nasopharyngeal colonization by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun.* 64: 2240-2245.
33. Worku, M.L., R.L. Sidebotham, M.M. Walker, T. Keshavarz y Q.N. Karim. 1999. The relationship between *Helicobacter pylori* motility, morphology and phase of growth: implications for gastric colonization and pathology. *Microbiolgy.* 145:2803-2811.
34. Zambrano M.M. y R. Kolter. 1996. GASping for life in stationary phase. Minireview *Cell.* 86:181-184.