



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

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

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUIMICO DE ALIMENTOS
P R E S E N T A :
Alejandro Ocegüera Cervantes



MÉXICO, D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA

2005

m350891



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).

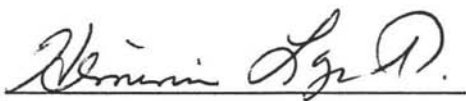
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Raúl Aguilar Caballero
Vocal	Profa. Rosario Muñoz Clares
Secretario	Profa. Herminia de Jesús Loza Tavera
1er Suplente	Profa. Ma. Eugenia de la Torre
2do Suplente	Profa. Perla D. Maldonado Jiménez

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio 105. Edificio "E",
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas
Facultad de Química, UNAM



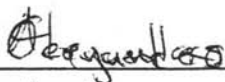
Asesora:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera



Supervisor Técnico:

Dr. M. Javier Cruz Gómez



Sustentante:

Alejandro Ocegüera Cervantes

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Herminia Loza Tavera por invitarme a formar parte de su equipo de trabajo, así como por el tiempo dedicado a mi formación profesional. Y sobre todo, por iniciarme en el camino de la investigación.

Al Dr. M. Javier Cruz Gómez del Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Química, UNAM, ya que el apoyo técnico y económico brindado hicieron posible llevar a cabo este trabajo.

Al Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas de la Facultad de Química, UNAM por permitirme llevar a cabo este trabajo en sus instalaciones.

Al equipo de trabajo de Dr. M. Javier Cruz Gómez; M. en C. L. Fernando Pérez Lara, Dr. Néstor Noé López Castillo y M. en C. Brenda Porta Briseño, ya que su apoyo y asesoría han sido de gran valor e importancia.

A Dr. Martín Vargas Suárez por su apoyo consejos y amistad.

Este trabajo fue apoyado parcialmente por el Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado No. 6290-04 de la Facultad de Química otorgado a Herminia Loza Tavera.

Dedicatoria y agradecimientos

A mis padres:

Pedro Ocegüera Castillo, el más audaz: Me has enseñado a tener una mentalidad libre y que soy capaz de hacer lo que sea con solo imaginarlo. Gracias por apoyarme siempre en llevar a cabo mis sueños.

B. Alejandra Cervantes Sánchez: Aquí está realizado uno de nuestros sueños debido a tu ejemplo de trabajo, disciplina, esfuerzo y sobre todo de vivir con amor. Gracias por haberme dado esta vida y conducirme por el camino que hoy me tiene aquí.

A mi hermana:

Gabriela Ocegüera Cervantes: Me siento orgulloso de que seas mi hermana, siempre valiente. Se que valoras este esfuerzo tanto como yo. Gracias porque se que siempre cuento contigo.

A Viridiana Olin Sandoval: Hemos vivido juntos esta etapa de nuestras vidas y sabes cuanto nos ha costado llegar hasta aquí. Gracias por todo tu apoyo, creo que hemos hecho un buen quipo. Pero sobre todo, gracias por que siempre has creído en mi.

A mi familia: A los que no están y a todos los que este logro los hace tan felices como a mi.

A mis amigos: Su apoyo y compañía han hecho mi vida mas feliz. Gracias por todos los momentos que he disfrutado con ustedes.

A mis maestros: A todos los que no solo me han instruido y me han sabido mostrar la belleza del conocimiento. Gracias porque así he encontrado mi vocación.

Abreviaturas

Abs.	Absorbancia
D.O.	Densidad óptica
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GPC	Cromatografía de permeación en gel
IR	Infra Rojo
LB	Luria Bertani
MB+PURh	Medio Basal con Hydroform® como única fuente de carbono
ME	Microscopía electrónica
NMP	N-metil-2-pirrolidona
PE-PUR	Poliéter Poliuretano
PHA	Poli hidroxí alcanoatos
p-NP	Para-nitrofenol
p-NPA	Acetato de para-nitrofenilo
PS-PUR	Poliéster Poliuretano
PUR	Poliuretano
PURasa	Poliuretanasas
sn	Sobrenadante
TDI	2,4- diisocianato de tolueno
YES	Sales y extracto de levadura

Índice

Abreviaturas	iv
Contenido	v
Índice de tablas y figuras	viii
1. Resumen	1
2. Antecedentes	2
2.1. Poliuretano	2
2.2. Biodegradación de poliuretano	3
2.2.1. Proteasas	4
2.2.2. Ureasas	4
2.2.3. Esterasas	4
2.3. Aislamiento y caracterización de bacterias "poliuretanolíticas"	5
3. Hipótesis	7
4. Objetivos	8
5. Estrategia experimental	9
6. Materiales y métodos	11
6.1. Aislamiento de "bacterias poliuretanolíticas"	11
6.2. Determinación del crecimiento de las cepas aisladas	11
6.2.1. Medición de densidad óptica de cultivos en medio LB	12
6.2.2. Medición de crecimiento en MB+PURh	12
6.2.3. Medición de peso seco de cultivos en MB+PURh	13
6.3. Identificación de las actividades enzimáticas	13
6.3.1. Actividad proteasa	13
6.3.2. Actividad ureasa	14
6.3.3. Actividad esterasa	14
6.4. Medición de la actividad esterasa	15
6.5. Medición de la concentración de proteína en cultivos con PUR	19
6.6. Medición de la actividad esterasa a distintos tiempos de incubación	20

6.7. Análisis de los productos presentes en el sobrenadante del medio de cultivo (MB+PURh) después de cinco días de incubación con las cepas 1 y 8	20
6.7.1. Análisis por extracción clorofórmica y cromatografía	20
6.7.2. Determinación del tamaño de las moléculas de poliuretano por cromatografía de permeación en gel (GPC)	21
6.7.3. Análisis del sólido obtenido por evaporación del sobrenadante del medio de cultivo (MB+PURh) empleando espectroscopía de infrarrojo (IR)	22
6.7.4. Determinación de la relación de la NMP con la polimerización del PS-PUR del Hydroform®	22
7. Resultados	24
7.1. Aislamiento de cepas bacterianas	24
7.2. Caracterización del crecimiento	25
7.3. Identificación de actividades enzimáticas producidas por las bacterias que crecen en PUR, empleando medios diferenciales	28
7.4. Actividad de esterasa en el sobrenadante del medio de cultivo de las cepas esterasa positivas con mayor crecimiento en MB+PURh	31
7.5. Actividad de esterasa a diferentes tiempos de cultivo	31
7.6. Análisis de los compuestos presentes en el sobrenadante del MB-PURh después de cinco días de incubación con las cepas 1 y 8	33
7.6.1. Identificación por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS), de los compuestos solubles en cloroformo	33
7.6.2. Determinación del tamaño de los oligómeros de poliuretano (Hydroform®) por cromatografía de permeación en gel (GPC)	33
7.6.3. Análisis por espectroscopía de infrarrojo (IR) del sólido obtenido por evaporación del sobrenadante del MB+PURh	35
7.7. Determinación de la relación de la NMP con la polimerización del PS-PUR del Hydroform®	36
8. Discusión	39
8.1. Aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de poliuretano	39
8.2. Actividades enzimáticas relacionadas con la degradación del PUR	40
8.3. Caracterización de la actividad de esterasa detectada en las cepas con mayor crecimiento (1, 5 y 8)	42
8.4. Efectos de la acción bacteriana sobre el Hydroform®	44
8.5. Un modelo para explicar el crecimiento de las cepas 1 y 8 en Hydroform	47

9. Conclusiones	49
10. Anexo	50
11. Bibliografía	54

Índice de tablas y figuras

- Figura 1. Reacción de síntesis de poliuretano.
- Figura 2. Posibles sitios de reconocimiento de actividades enzimáticas capaces de atacar la estructura del poliuretano.
- Figura 3. Reacción de hidrólisis del p-NPA.
- Figura 4. Curva patrón de p-NP.
- Figura 5a. Curso temporal de hidrólisis enzimática de p-NPA correspondiente a la Cepa 1.
- Figura 5b. Medición de la actividad esterasa de la Cepa 1 a diferentes concentraciones de enzima.
- Figura 5c. Curso temporal de hidrólisis enzimática de p-NPA correspondiente a la Cepa 8.
- Figura 5d. Medición de la actividad esterasa de la Cepa 8 a diferentes concentraciones de enzima.
- Figura 6. Curva patrón de BSA en MB+PURh
- Figura 7. Crecimiento en medio Luria Bertani líquido, determinado por absorbancia de los cultivos a D.O.660.
- Figura 8. Crecimiento de *Comamonas testosteroni* o *Pseudomonas alcaligenes* (cepas 1 y 8) en MB+PURh líquido.
- Figura 9. Crecimiento de *Ochrobactrum anthropi* (cepas 2, 3, 4 y 6) y *Pseudomonas* sp. (cepa 7) en MB+PURh líquido.
- Figura 10. Medición del crecimiento por peso seco de las cepas 1 y 5.
- Figura 11. Detección de actividad de proteasa en bacterias que crecen en Hydroform®.
- Figura 12. Detección de la actividad de ureasa en agar Urea de Christensen.
- Figura 13. Prueba de actividad esterasa en medio de Tween 80®.
- Figura 14. Actividad de esterasa en el sobrenadante del medio de cultivo.
- Figura 15. Actividad enzimática de esterasa para las cepas 1 y 8 a diferentes tiempos de incubación.
- Figura 16. Cromatograma del cultivo control sin inocular (a) y de los cultivos inoculados con las cepas 1 (b) y 8 (c).
- Figura 17. Distribución de tamaños en el Hydroform®.
- Figura 18. Espectros de IR del sólido del cultivo control sin inocular (a) y de los cultivos con las cepas 1 (b) y 8 (c).
- Figura 19. Medios de cultivo después de esterilización.
- Figura 20. Metabolismo de 2-pirrolidona por *Pseudomonas aeruginosa*
- Tabla 1. Microorganismos capaces de utilizar poliuretano y actividades enzimáticas relacionadas.
- Tabla 2. Identificación de las cepas bacterianas con capacidad de crecer en MB-PUR.
- Tabla 3. Actividades enzimáticas correspondientes para cada cepa.

1. RESUMEN

El poliuretano (PUR) es un polímero artificial desarrollado hace 68 años y que es utilizado ampliamente en la fabricación de accesorios para la industria automotriz, materiales de construcción y en muchos otros sectores industriales. La producción masiva de PUR ha traído consigo la generación de grandes cantidades de desechos para los cuales no existen métodos eficientes de reciclaje, ni adecuados de eliminación. Una alternativa para aliviar este problema, la cual sería de gran importancia dado el interés en desarrollar industrias limpias, es la implementación de métodos de degradación biológicos, mejor conocidos como biodegradación, que son llevados a cabo por organismos vivos o sus enzimas. En ese sentido, un primer paso en el desarrollo de estos procesos es la identificación y caracterización de los microorganismos capaces de utilizar el PUR como fuente de carbono o nitrógeno, lo cual implicaría que poseen la capacidad de atacar algunos de sus enlaces y por lo tanto llevar a cabo parte de su degradación.

En este trabajo se aislaron y caracterizaron ocho cepas bacterianas a partir de muestras de PUR en proceso de deterioro. Estas cepas fueron seleccionadas por su capacidad de crecer en un medio basal que solo contenía sales y 3% de PUR hidrosoluble (Hydroform[®]) (MB+PURh). Cuatro de éstas pertenecen a la especie *Ochrobactrum anthropi* (cepas 2, 3, 4 y 6), tres a la especie *Comamonas testosteroni* o *Pseudomonas alcaligenes* (cepas 1, 5 y 8) y una al género *Pseudomonas sp.* (cepa 7). A pesar de que algunas cepas fueron identificadas como de una misma especie, cada una mostró morfología diferente en comparación a las de la misma especie.

Por cultivo en medios selectivos se determinó que las cepas de la especie *O. anthropi* poseen actividad de ureasa, las de la especie *C. testosteroni* presentaron actividad de esterasa y la cepa *Pseudomonas sp.* resultó esterasa y proteasa positiva

Las cepas de *C. testosteroni* presentaron un crecimiento diez veces más alto en MB+PURh que las otras cepas aisladas. Las cepas 1 y 8 presentaron actividad esterasa extracelular inducible que se detectó después de 10 h de incubación.

El efecto que producen las cepas 1 y 8 sobre el Hydroform[®] se determinó después de cinco días de incubación. Un análisis por GC-MS mostró que en las primeras horas de cultivo ambas cepas consumen N-metilpirrolidona, compuesto presente en el Hydroform[®]. El análisis por IR reveló que la cepa 1 hidroliza los enlaces éster del PUR y que la cepa 8 no produce cambios sobre el Hydroform[®].

En conclusión, en este trabajo se aisló y caracterizó una cepa bacteriana (cepa 1) capaz de degradar y utilizar el Hydroform[®] como fuente de carbono para sostener su crecimiento.

2. ANTECEDENTES

2.1. Poliuretano

El poliuretano (PUR) es un polímero sintetizado mediante la reacción entre polioles y diisocianatos, cuyo producto genera enlaces carbamato (uretano). Los polioles pueden ser de dos tipos: polioliol-poliéster o polioliol-poliéter. Dependiendo del polioliol que se utilice se generan poliéster poliuretanos (PS-PUR) o poliéter poliuretanos (PE-PUR) (Figura 1).

La reacción básica de poliadición de isocianatos y polioles fue descubierta en 1937 por Otto Bayer y sus colegas en los laboratorios de investigación de la Compañía Bayer(<http://www.bayermaterialsscience.com>).

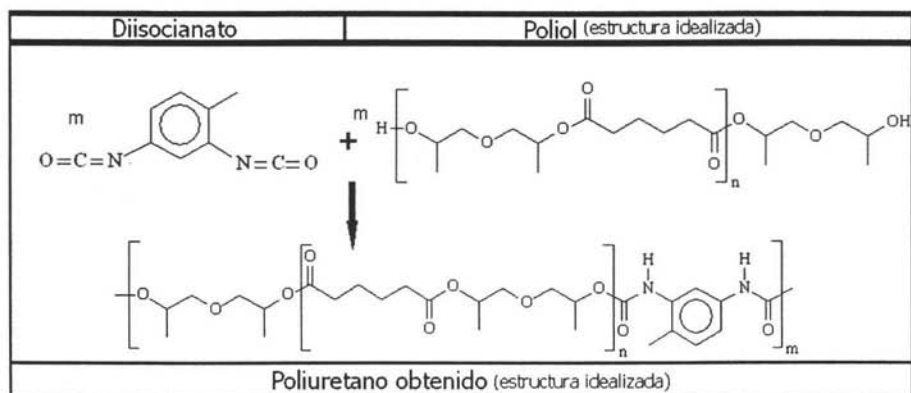


Figura 1. Reacción de síntesis de poliuretano. Ejemplificada con 2,4-diisocianato de tolueno (TDI) y (adipato de dipropilenglicol).

El uso de los diferentes tipos de PUR varía de acuerdo a las características o propiedades de éste. Estas características son debidas a distintos factores como son, el tipo de materias primas que se utilicen y las condiciones a las que el proceso de síntesis se lleve a cabo. Las estructuras que se generan pueden ser desde redes entrecruzadas hasta fibras lineales o elastómeros. Dentro de la gran diversidad de poliuretanos se encuentran los de baja densidad que se emplean como "esponjas" y materiales amortiguadores; de alta densidad, los cuales se utilizan como materiales para la construcción; y líquidos, que se emplean en la industria de pinturas y recubrimientos. La diversidad de estructuras y características del PUR, que permite su utilización en diferentes áreas y procesos, ha tenido repercusiones importantes ya

que en muchos casos ha logrado sustituir la madera o el metal por polímeros fácilmente moldeables obtenidos a bajo costo, lo cual implica un uso más eficiente de otros recursos naturales, pues evita la tala de árboles.

A pesar de las ventajas ambientales mencionadas, la generación de este tipo de materiales que facilitan la vida humana trae consigo nuevas complicaciones, como la eliminación de los desechos generados después de su uso. Por ejemplo, en México se han producido las siguientes cantidades en toneladas por año: 60,992 (1997); 65,091 (1998); 74,099 (1999); 69,152 (2001); lo cual representa un gran problema en términos de la generación de desechos, debido a que no es posible reciclarlo en su totalidad y mucho menos destruirlos por completo.

2.2. Biodegradación del poliuretano

Aunque de manera general los plásticos, grupo al que pertenece el PUR, no son biodegradables, recientemente han aparecido trabajos en los que se reporta que los PS-PUR son más sensibles a la biodegradación que los PE-PUR (Darby y Kaplan 1968). Varios artículos reportan la degradación microbiana del PUR, especialmente por hongos, aunque la degradación por parte de bacterias también ha sido estudiada. Entre los hongos involucrados se sabe que algunas cepas de *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium funiculosum*, *Aureobasidium pullulans*, *Trichoderma sp.* y *Chaetomium globosum* pueden degradar diferentes tipos de PUR. Por otro lado, entre las bacterias en las que se ha reportado "actividad poliuretanolítica" (PURasa) se encuentran cepas de *Pseudomonas sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Enterobacter agglomerans* y *Comamonas acidovorans* (Kay et al. 1991). Debido a que las características fisicoquímicas del PUR difieren en gran medida en función de su composición y debido a que el tipo de PUR utilizado en cada investigación es diferente, es difícil comparar las actividades degradadoras de los diferentes microorganismos estudiados (Nakajima-Kambe et al., 1999).

Se ha propuesto que, dada la estructura del PS-PUR las actividades enzimáticas que podrían actuar sobre los diferentes enlaces del PUR serían de tipo proteasa, ureasa, esterasa y lipasa (Nakajima-Kambe et al., 1999). En la Figura 2 se muestran los sitios de la molécula de PUR en los cuales podrían actuar estas actividades enzimáticas.

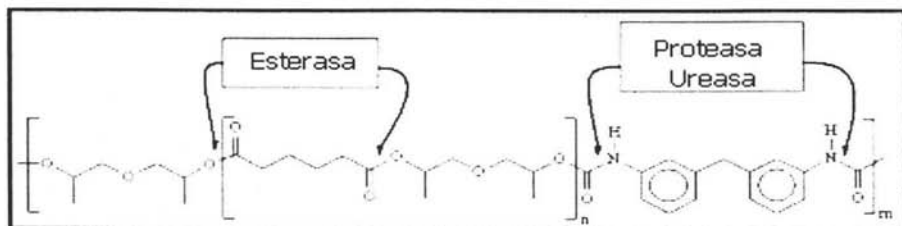


Figura 2. Posibles sitios de reconocimiento de actividades enzimáticas capaces de atacar la estructura del poliuretano.

2.2.1. Proteasas

Darby y Kaplan (1968) reportaron que diversas especies de hongos estaban involucradas en la degradación de PUR. Santerre *et al.* (1994) describieron, a partir de un estudio de mejoramiento de PUR con fines médicos, que enzimas proteolíticas, tales como la papaína, eran capaces de atacar el poliuretano *in vitro*, pero que este ataque no era considerable. Howard y Blake (1998) fueron los primeros en identificar una actividad extracelular de tipo proteasa en *P. fluorescens*.

2.2.2. Ureasas

Pathirana y Seal (1983) detectaron actividades de tipo ureasa relacionadas con la degradación de PUR en hongos. Sin embargo, no existen reportes de actividades de este tipo detectadas en bacterias. Un estudio posterior demostró que este tipo de enzimas fúngicas son capaces de degradar PUR, pero hasta ahora no se ha reportado su purificación (Santerre *et al.*, 1994).

2.2.3. Esterasas

En *Commamonas acidovorans* cepa TB35 se han descrito dos esterazas capaces de atacar PS-PUR: una extracelular detectada en el sobrenadante del medio de cultivo y otra unida a la membrana plasmática de la bacteria. La pérdida de peso de cubos de PUR incubados con la enzima de membrana, extraída con detergente fue diez veces mayor (1.3 mg) que la obtenida con la enzima extracelular (0.1 mg) (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). Ambas enzimas ya han sido purificadas y se ha determinado que atacan la porción éster del PUR. Sin embargo, la actividad que se encuentra unida a la membrana es capaz de atacar los enlaces éster dentro de la

molécula de PUR, mientras que la esterasa extracelular ataca las porciones éster de la materia prima en la molécula de poli-adipato de polietilenglicol, y no cuando ya se ha polimerizado (Akutsu *et al.*, 1998).

Al clonar el gene que codifica a la enzima asociada a membrana y expresar la proteína recombinante en *Escherichia coli* se observó la presencia de la enzima extracelular, lo cual indica que ambas enzimas provienen del mismo gene, sólo que la extracelular ha sido liberada al medio de cultivo debido a alguna modificación postraduccional desconocida aún (Shigeno-Akutsu *et al.*, 1999).

En la Tabla 1 se presentan las actividades y los genes que codifican a las enzimas involucradas con la degradación del PUR que han sido identificados en algunos microorganismos.

Tabla 1. Bacterias capaces de utilizar poliuretano y actividades enzimáticas relacionadas.

Microorganismo	Actividad enzimática	Gen	Referencia
<i>C. acidovorans</i>	Esterasa	<i>PudA</i>	Allen <i>et al.</i> , 1999
<i>P. fluorescens</i>	Esterasa	<i>PulA</i>	Ruiz y Howard,1999
<i>P. clororaphis</i>	Esterasa	<i>PueB</i>	Howard <i>et al.</i> , 2001.
<i>Bacillus subtilis</i>	Lipasa	<i>LipB</i>	Rowe y Howard,2002

2.3. Aislamiento y caracterización de bacterias "poliuretanolíticas"

En el año 2002 se inició un proyecto en el que se ha planteado estudiar los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la biodegradación del PUR. Este proyecto fue iniciado en el laboratorio de la Dra. Loza-Tavera en colaboración con el Dr. Javier Cruz del Departamento de Ingeniería Química, de la Facultad de Química (UNAM). En un primer trabajo (Carrillo-García, 2004) se aislaron dos cepas bacterianas identificadas como *Acinetobacter* sp., capaces de crecer en un medio de cultivo que solo contenía sales y un PS-PUR comercial llamado Hydroform[®], como fuente de carbono. El Hydroform[®] fue seleccionado para realizar este trabajo por ser soluble en agua, lo que facilita la preparación de medios de cultivo y su

disponibilidad en el mismo. Algunos trabajos de este tipo, realizados por el grupo de Howard reportan el empleo del Impranil® que es un PUR que presenta esta característica de ser hidrosoluble (Howard y Hilliard, 1999). En las cepas aisladas por Carrillo-García (2004) se identificó una actividad de esterasa extracelular, cuya producción aumentó en presencia del Hydroform®.

3. HIPÓTESIS

Dado que el PUR es una molécula artificial que recientemente se ha liberado a la naturaleza es posible que algunos organismos que han sido expuestos a este compuesto puedan utilizarlo como fuente de carbono, por lo que estos organismos producirán enzimas relacionadas con la degradación de este compuesto.

4. OBJETIVOS

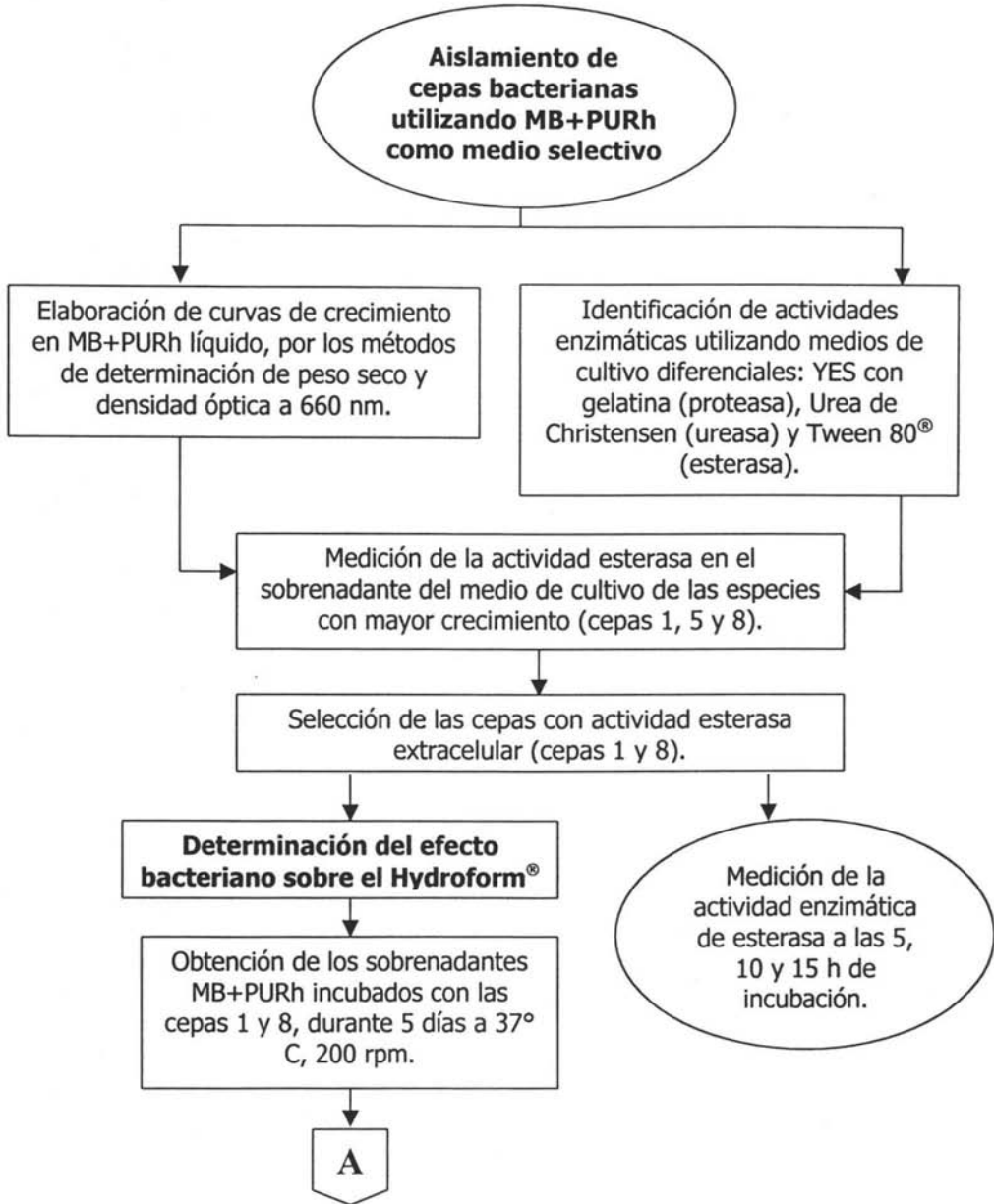
Objetivo general

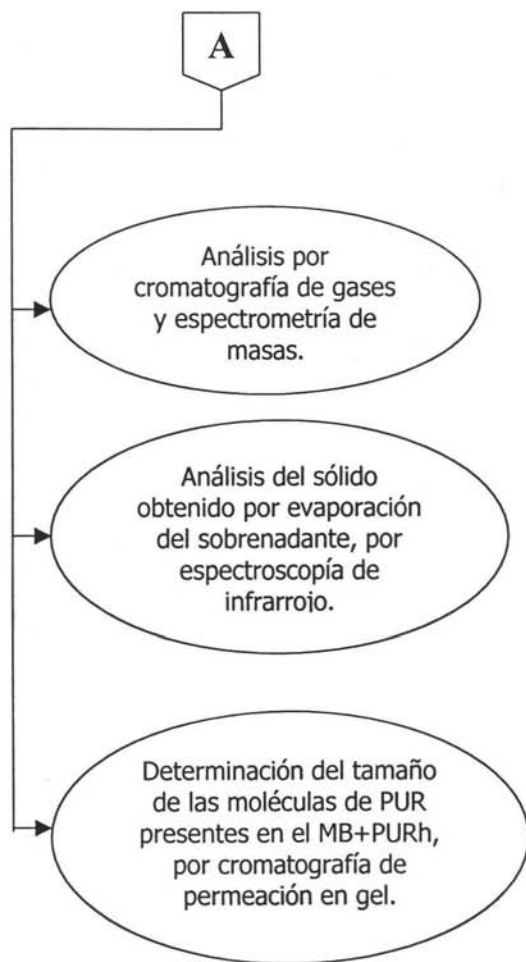
Aislar y caracterizar cepas bacterianas capaces de degradar poliuretano poliéster

Objetivos particulares

1. Aislar bacterias capaces de crecer en medio de cultivo suplementado con PUR (Hydroform®) como única fuente de carbono.
2. Caracterizar las bacterias aisladas midiendo su crecimiento.
3. Identificar las posibles actividad(es) enzimática(s) involucradas con la utilización del PUR.
4. Caracterizar algunas de las actividades enzimáticas detectadas.
5. Identificar los cambios que sufre el PUR después de ser incubado con algunas de las cepas aisladas.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Aislamiento de "bacterias poliuretánolíticas"

1. Las bacterias fueron obtenidas a partir de muestras de PUR en proceso de deterioro que fueron colectadas en un basurero. Dichas muestras fueron colocadas en matraces con medio basal conteniendo PUR hidrosoluble (Hydroform®) (MB+PURh) líquido, a 37 °C, con agitación (200 rpm) y cultivadas durante 5 días (Carrillo-García, 2004). La formulación del medio se detalla en el anexo. Después de la incubación, el cultivo fue colocado en tubos eppendorf con glicerol al 30% (v/v) y congelados a -70 °C para su conservación.
2. A partir de uno de estos tubos, los cuales contenían una mezcla de bacterias, se tomó una muestra y se sembró en cajas Petri con MB+PURh sólido (formulación en el anexo). Las cajas inoculadas se incubaron a 37 °C durante 2 días, obteniéndose el crecimiento de colonias bacterianas muy parecidas entre sí (blancas, pequeñas, húmedas con borde definido, etc), por lo que fue necesario sembrar cada colonia en medio Luria-Bertani (LB). Con ello, se obtuvieron colonias con características morfológicas diferentes, lo cual permitió distinguir entre cada colonia obtenida con mayor facilidad. Una vez que se obtuvieron colonias visiblemente puras en medio LB, éstas fueron inoculadas nuevamente en medio MB+PURh sólido, para comprobar su capacidad para crecer en dicho medio de cultivo.
3. Finalmente, las cepas obtenidas se inocularon en MB+PURh líquido y se incubaron a 37° C y 200 rpm durante 2 días para conocer y comparar cualitativamente su crecimiento por observación del enturbiamiento del medio de cultivo.

6.2. Determinación del crecimiento de las cepas aisladas

Para comparar la capacidad de crecimiento de las cepas aisladas en medio MB+PURh era necesario iniciar los cultivos con inóculos semejantes tanto metabólicamente como en número de células. Ésto permitiría hacer comparaciones certeras del comportamiento de estas bacterias en el medio con PUR. Para ésto,

primeramente se elaboraron curvas de crecimiento de cada una de las cepas aisladas en medio LB. Ésto se realizó tanto por el aumento de la densidad óptica determinada a 660 nm ($D.O_{.660}$), como por la medición del peso seco, en algunos cultivos.

6.2.1. Medición de densidad óptica de cultivos en medio LB

1. Se inoculó una colonia de cada cepa en 5 mL de medio LB y se incubó durante 12 h a 37 °C, agitándose a 200 rpm.
2. Concluido este tiempo, se midió la $D.O_{.660}$ de los cultivos y se re-inocularon 5 mL de medio LB con una alícuota de cultivo correspondiente a $D.O_{.660}$ de 0.05. Estos cultivos se incubaron a 37 °C y 200 rpm, y se les midió la $D.O_{.660}$ cada hora hasta llegar a un valor de 0.5.
3. Una vez alcanzada esta condición se re-inocularon 30 mL de medio LB a una $D.O_{.660}$ de 0.1. Estos cultivos se incubaron a 37° C y 200 rpm, y se les midió la $D.O_{.660}$ cada hora, hasta llegar al inicio de su fase estacionaria.
4. Con los datos obtenidos se elaboraron las curvas de crecimiento con las que se definió el momento en el que cada cepa se encontraba en la mitad de su fase exponencial de crecimiento.

6.2.2. Medición de crecimiento en MB+PURh

1. Estos análisis se iniciaron inoculando una colonia de cada cepa en 5 mL de medio LB, incubando durante 12 h a 37° C y 200 rpm.
2. Concluido este tiempo se midió la $D.O_{.660}$ y se re-inocularon 5 mL de medio LB, a una $D.O_{.660}$ de 0.1. Estos cultivos se incubaron a 37° C y 200 rpm, durante el tiempo que cada cepa requiere para llegar a la mitad de su fase exponencial (según las curvas elaboradas previamente en LB) y una vez alcanzada esta condición, que se corroboró por la medición de $D.O_{.660}$, se re-inoculó la misma cantidad de células ($D.O_{.660} = 0.02$) en 50 mL de MB-PUR para cada cepa.
3. Se inició la incubación de estos cultivos a 37 °C y 200 rpm y se midió la $D.O_{.660}$ cada hora hasta que cada cepa alcanzó su fase estacionaria. Este experimento fue llevado a cabo por triplicado.
4. Con estos datos se elaboró una curva de crecimiento en MB+Pur.

6.2.3. Medición de peso seco de cultivos en MB+PURh

1. A partir de cultivos sólidos en MB+PURh se tomó una colonia de la cepa 1 y de la cepa 5 y se inoculó en tubos con 5 mL de medio LB líquido, los cuales se incubaron durante 12 h a 37 °C con agitación a 200 rpm. Una vez transcurrido este tiempo, se tomó una alícuota de 1.5 mL de cada uno de los cultivos para inocular un matraz con un volumen final de 150 mL de MB+PURh por cada cepa, estos cultivos fueron distribuidos en 10 tubos con 5 mL en cada tubo. Estos cultivos fueron incubados a 37° C con agitación a 200 rpm durante seis días.
2. Durante este tiempo, se tomó un tubo de cada cepa cada 24 h, se centrifugó a 3000 rpm y el precipitado se resuspendió en un volumen total de 400 µL de MB+PURh y se colocó en un trozo de papel aluminio (previamente pesado). Esta muestra se secó en una estufa de vacío a 60 °C hasta alcanzar peso constante. Una vez seco se pesó y a la medición se le restó el peso del papel y el peso de los sólidos contenidos en el MB+PURh. Este último dato se obtuvo por medición del peso seco de 400 µL MB+PURh sin inocular, el cual llevó el mismo tratamiento de incubación que los tubos inoculados.

6.3. Identificación de las actividades enzimáticas

6.3.1. Actividad de proteasa

La detección de la actividad de proteasa se lleva a cabo incubando a las bacterias en medio YES con gelatina y tiñendo después de la incubación con azul de Coomassie, el cual se une a las proteínas. Halos transparentes alrededor de las colonias bacterianas indican zonas de hidrólisis de la gelatina por acción de las proteasas.

1. Para detectar la actividad de proteasa, se cultivaron cada una de las 8 cepas en medio YES sólido, con gelatina (formulación en el anexo).
2. Después de 48 h de incubación a 37 °C se realizó la tinción de las placas aplicando una solución de azul de Coomassie R-250 al 0.1% en ácido acético-metanol 3:1 (v/v) y se dejó en reposo durante 30 min.

3. Posteriormente se realizó un lavado de la placa con una solución de ácido acético:MetOH 3:1 (v/v) para retirar el colorante no asociado a la gelatina.
4. Para esta prueba se utilizaron cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli* DH5 α como controles positivo y negativo respectivamente.

6.3.2. Actividad de ureasa

Para la detección de la actividad de ureasa, se utilizó el medio de Urea de Christensen, el cual contiene urea y rojo de fenol. Éste actúa como indicador de hidrólisis de la urea por medio de un cambio de color amarillo a rojo, debido al aumento de pH en el medio de cultivo provocado por la generación de amoníaco durante la hidrólisis de la urea.

1. Después de 48 h de incubación a 37 °C en el medio de Christensen (ver formulación en el anexo) se observó una coloración rosada alrededor de las colonias que presentaron actividad de ureasa y permanencia del color amarillo alrededor de las colonias sin dicha actividad.
2. Para esta prueba se utilizaron cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli* DH5 α como controles positivo y negativo respectivamente.

6.3.3. Actividad de esterasa

Para la detección de la actividad de esterasa se utilizó el medio de Tween80[®], el cual contiene este detergente además de CaCl₂ (formulación en el anexo). El Tween80[®] es una molécula anfipática, que contiene ésteres de ácidos grasos y el CaCl₂ se encuentra disociado en el medio de cultivo en forma de Ca²⁺ y 2 Cl⁻. La hidrólisis de los enlaces éster del Tween80[®] genera como productos un grupo alcohol y un grupo ácido. Al asociarse dos moléculas de ácido a un ión Ca²⁺ se produce una precipitación de este complejo, la cual es observada alrededor de las colonias con actividad de esterasa como un halo de precipitación.

1. Después de 120 h de incubación a 37 °C se observó la aparición de halos blanquecinos de precipitación alrededor de las colonias con actividad de esterasa.
2. Para esta prueba se utilizaron cepas de *P. aeruginosa* y *E. coli* DH5 α como controles positivo y negativo respectivamente.

6.4. Medición de la actividad esterasa

Para esta medición se empleó el método de hidrólisis del p-nitrofenilacetato (p-NPA) que genera ácido acético y para-nitrofenol (p-NP) como productos (Figura 3). Este último tiene una λ_{\max} de absorción a 405 nm, por lo que el transcurso de la reacción de puede ser medido por la aparición de producto (p-NP).

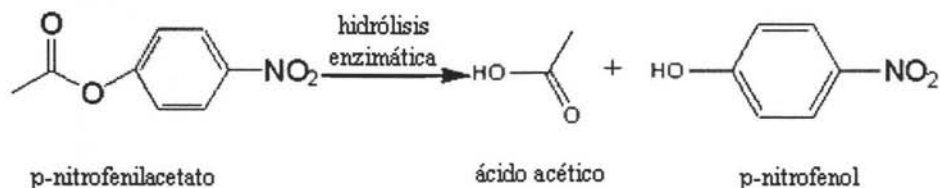


Figura 3. Reacción de hidrólisis del p-NPA.

Reactivos:

1. Ya que el p-NPA se hidroliza en presencia de agua, éste se disolvió en acetonitrilo (CH₃CN), a una concentración de 20 mM.
2. Solución amortiguadora de fosfato de potasio, 200 mM, pH 7

Método:

1. La preparación enzimática se obtuvo a partir de cultivos en MB+PURh con 16 h de incubación, centrifugando el medio de cultivo a 5,000 g durante 5 min. Una vez decantadas las bacterias se toma el sobrenadante (sn) (preparación enzimática) y se desecha el precipitado.
2. En una celda espectrofotométrica de 1 mL se colocan:

Agua	400 μ L
Amortiguador	250 μ L
Preparación enzimática	100 μ L
p-NPA	250 μ L
3. Una vez agregados los primeros tres componentes en el orden indicado, se inicia la reacción agregando el substrato p-NPA. La lectura de Abs. a 405 nm se registra a los

primeros 30 s y posteriormente cada minuto hasta los 5 min, si es que la absorbancia no ha pasado de 1, en cuyo caso la medición llega a su fin. La reacción se lleva a cabo a 37° C

4. Dado que la reacción se lleva a cabo en un ambiente 75% acuoso, el p-NPA sufre hidrólisis química, por lo que es necesario medir una reacción blanco agregando medio de cultivo sin inocular, tratado de manera semejante que el medio de cultivo inoculado. Posteriormente, los valores correspondientes a la hidrólisis química se restan al valor obtenido en el ensayo con preparación enzimática.
5. Para transformar las lecturas de absorbancia a unidades de concentración de p-NP se obtuvo el coeficiente de extinción molar a partir de una curva patrón (Figura 4). Para ello se prepararon soluciones con diferentes concentraciones de p-NPA y se incubaron a las condiciones que se emplearon en el ensayo enzimático, más la adición de 100 μL de NaOH 1M para garantizar la hidrólisis total del p-NPA. El coeficiente de extinción molar obtenido fue de $0.024 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$.

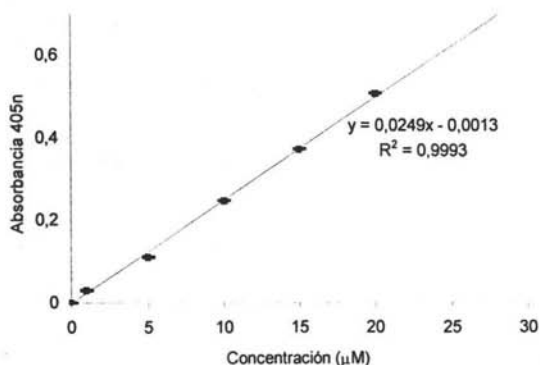


Figura 4. Curva patrón de p-NP. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones, las barras representan la desviación estándar.

Se comprobó que el ensayo de medición de esterasa tuviera un comportamiento lineal con respecto a la concentración de enzima, para lo cual se realizaron ensayos con diferentes cantidades de enzima desde 50 hasta 300 μL (Figura 5).

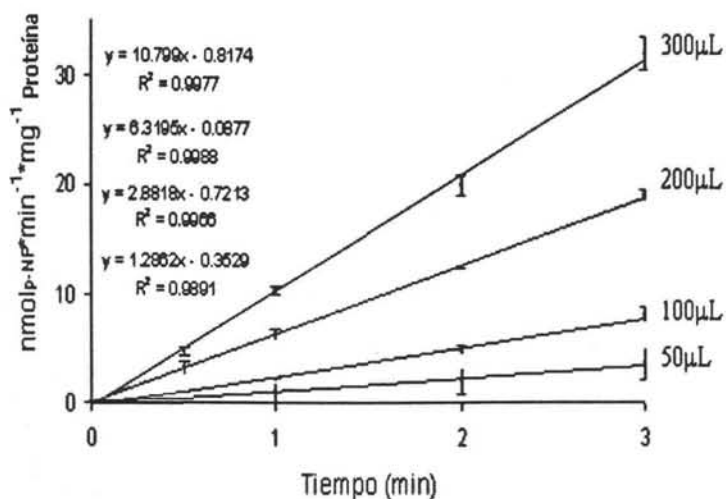


Figura 5a. Curso temporal de hidrólisis enzimática de p-NPA correspondiente a la Cepa 1. A 50, 100, 200 y 300 μL de preparación enzimática. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones, las barras representan la desviación estándar.

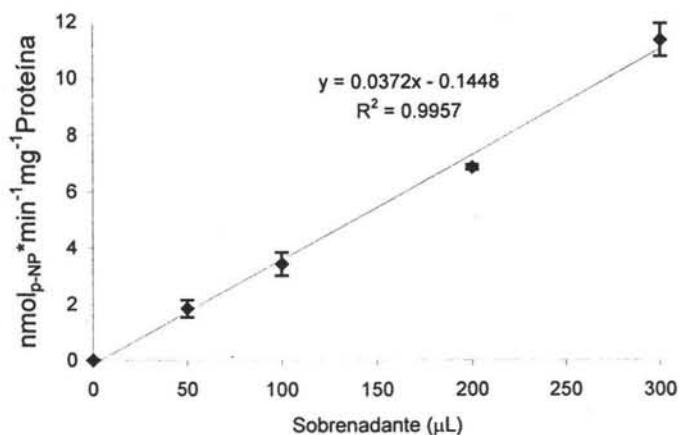


Figura 5b. Medición de la actividad esterasa de la Cepa 1 a diferentes concentraciones de enzima. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones, las barras representan la desviación estándar.

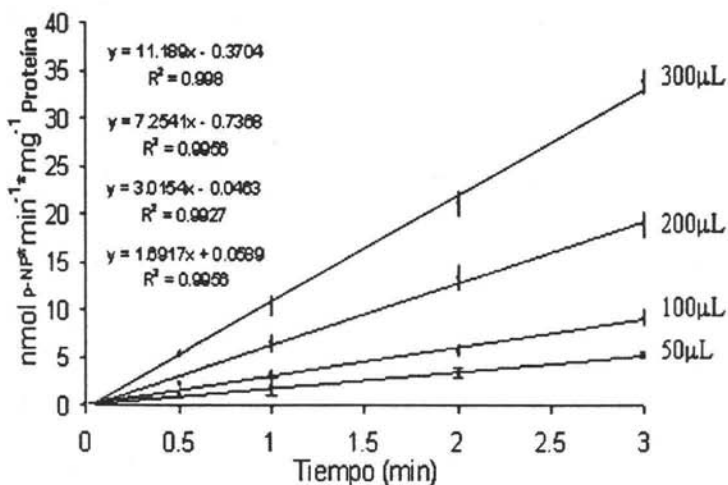


Figura 5c. Curso temporal de hidrólisis enzimática de p-NPA correspondiente a la Cepa 8. A 50, 100, 200 y 300 µL de preparación enzimática. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones, las barras representan la desviación estándar.

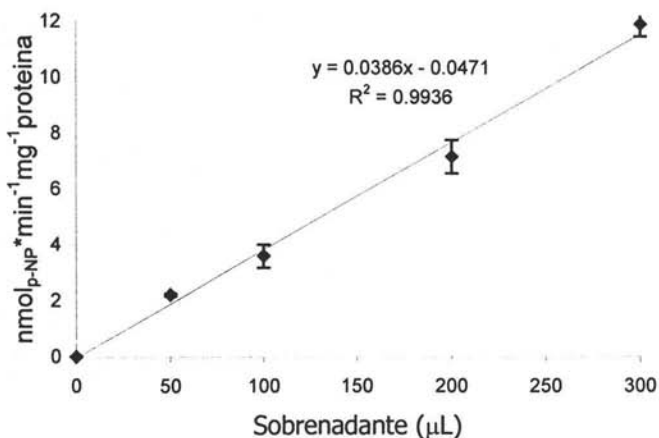


Figura 5d. Medición de la actividad esterasa de la Cepa 8 a diferentes concentraciones de enzima. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones, las barras representan la desviación estándar.

6.5. Medición de la concentración de proteína en cultivos con PUR

Se intentó medir la concentración de proteína presente en las muestras donde se determinó la actividad de esterasa empleando el método de Bradford (BioRad). Sin embargo, al agregar el reactivo, el PUR presente en las muestras precipitaba junto con la proteína, generando dos fases, una completamente transparente y otra color blanco con aspecto coloidal. Además, también se intentó separar la proteína del PUR, empleando diferentes concentraciones de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, pero el PUR se precipitaba junto con la proteína. Por lo anterior, la concentración de proteína en los sn de los cultivos de MB+PURh se determinó por Abs. a 280 nm, comparando contra las lecturas de una curva patrón preparada con diferentes concentraciones de albúmina de bovino (fracción V GIBCO 11018-017) disuelta en MB+PURh. Esta curva se preparó adicionando cantidades conocidas de albúmina en MB+PURh y midiendo la Abs. a 280 nm (Figura 6).

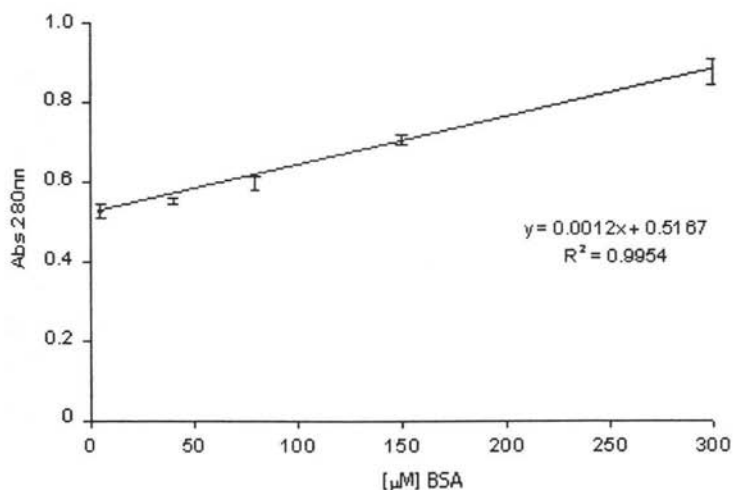


Figura 6. Curva patrón de BSA en MB+PURh.

6.6. Medición de la actividad esterasa a distintos tiempos de incubación

La actividad esterasa se midió en el sn del medio de cultivo incubado a distintos tiempos: 5, 10 y 15 h, empleando el método de p-NPA (punto 6.4.). En el caso de la medición a las cinco horas de incubación, la posibilidad de que la concentración de proteína en el sn del medio de cultivo fuera tan baja que no se pudiera detectar actividad a pesar de que estuviera presente, fue eliminada al concentrar cinco veces la alícuota del sn utilizando un sistema de concentración por filtración Centricon con una membrana de corte de 10 kDa (Centricon 10, Millipore).

Como control se realizaron mediciones de la actividad de esterasa en el sn de medio LB líquido a las 8 y 12 h de incubación, realizando una concentración del sn del medio de cultivo, de cinco veces, por el mismo sistema de concentración descrito anteriormente.

6.7. Análisis de los compuestos presentes en el sn del medio de cultivo (MB+PURh) después de cinco días de incubación con las cepas 1 y 8

6.7.1. Análisis por extracción clorofórmica y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Con el fin de determinar los efectos de la bacteria sobre los compuestos que constituyen el Hydroform[®], presentes en el sn del medio de cultivo y que pudieran ser detectables por cromatografía de gases, se realizaron extracciones clorofórmicas del sn de cultivo en MB+PURh a los cinco días de incubación. La fase orgánica fue analizada por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS).

1. A 4 mL del sn de cultivo se le adicionó 1 mL de cloroformo y se agitó en vortex evitando que se formara una emulsión estable.
2. Se dejó reposar y se extrajo cuidadosamente la fase orgánica con una pipeta Pasteur. Se colocó en otro tubo y se adicionó una pequeña cantidad de sulfato de sodio para quitar el agua y se pasó a otro tubo limpio.

3. La muestra se analizó en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (HP 6890Series GC System, HP 5973 Mass Selective Detector), de acuerdo a los siguientes parámetros:

Columna	Capilar 5% fenil metil siloxano
Temperatura inicial	50 °C
Temperatura final	100 °C
Rampa	20 °C/min
Gas acarreador	Helio
Flujo	1.8 mL/min
Volumen de inyección	1 µL

4. El ensayo también se realizó con el sn de medio de cultivo sin inocular con las mismas condiciones de incubación, el cual se utilizó como control.

6.7.2. Determinación del tamaño de las moléculas de poliuretano por cromatografía de permeación en gel

Para determinar si la bacteria tenía algún efecto relacionado con la hidrólisis de moléculas constitutivas del polímero de Hydroform[®], se determinó la distribución de tamaño de los oligómeros presentes, por medio de cromatografía de permeación en gel (GPC). Para este experimento se utilizó un equipo de cromatografía de líquidos de alto desempeño (HPLC) (Alltech 2000, Evaporative Light Scattering Detector).

1. Alícuotas de 10 mL de los sn de medio de cultivo de un control (medio de cultivo sin inocular), y de cultivos de las cepas 1 y 8 con cinco días de incubación a 37° C y a 200 rpm fueron centrifugados para eliminar las células.
2. Las muestras se analizaron en un cromatógrafo de gases de acuerdo a los siguientes parámetros:

Columna	HP Mixed-B 10 µm
Eluyente (Fase móvil)	Metanol (99.99%) a un flujo de 0.6 mL/min
Detector	Dispersión de luz
Gas de arrastre	N ₂ (calidad HPLC) a un flujo de 1.8 L/min.
Volumen de inyección	20 µL

Temperatura de la columna 40 °C

Temperatura del detector 80 °C

3. La inyección de la muestra se realiza tomando el sn del medio de cultivo, el cual se introduce directamente al cromatógrafo sin realizar diluciones previas.

6.7.3. Análisis del sólido obtenido por evaporación del sn del medio de cultivo (MB+PURh) empleando espectroscopía de infrarrojo (IR)

Este análisis se realizó debido a que cuando se esterilizan medios de cultivo sin inocular e inoculados con las cepas 1 y 8 cultivados por cinco días de incubación a 37° C y 200 rpm, el medio de cultivo sin inocular presenta polimerización del Hydroform® mientras que el sn de los cultivos con las cepas 1 y 8 no presentaron polimerización. Ésto podría deberse a un cambio en la composición o en la estructura de los compuestos precursores del polímero.

1. Se obtuvo el sn del medio de cultivo de un control (medio de cultivo sin inocular) y de cultivos de las cepas 1 y 8 con cinco días de incubación a 37° C y a 200 rpm.
2. Se eliminó el agua del sn por medio de secado en rotavapor.
3. El sólido se recolectó raspando las paredes del matraz, una vez que se eliminó toda el agua.
4. El sólido obtenido fue enviado a la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Fac. de Química de la UNAM, en donde se realizó el análisis de espectroscopía de infrarrojo empleando un FTIR (Fourier Transformed Infra Red) 1605 Perkin-Elmer de intervalo: 4000-400 cm^{-1} de infrarrojo medio.

6.7.4. Determinación de la relación de la NMP con la polimerización del PS-PUR del Hydroform®

Para descartar la posibilidad de que la no polimerización en los cultivos se debiera a la desaparición de la N-metilpirrolidona (NMP) presente en el Hydroform® y no a un cambio en la composición o estructura de los compuestos precursores del polímero, se analizó también el sn de un cultivo que contenía Hydroform® al que se le había eliminado la NMP por medio de diálisis. La diálisis se llevó a cabo de la siguiente manera:

1. Una dilución 1:10 del Hydroform[®] en agua se coloca en una membrana de diálisis con corte de 6 kDa y se sumerge en agua destilada con agitación constante durante 24 h.
2. Para comprobar que el NMP había sido eliminado totalmente por la diálisis se realiza una nueva dilución 1:10 en agua del PUR dializado y una extracción clorofórmica como se describió en el punto 6.7.1. y se inyecta el extracto clorofórmico al cromatógrafo.
3. Una vez que se comprobó que la NMP desapareció por completo, se utilizó este PUR sin NMP para preparar MB+PURh para su esterilización en autoclave.

7. RESULTADOS

7.1. Aislamiento de cepas bacterianas

A partir de una muestra de MB+PURh con glicerol, congelado a -70°C , en el que se tenía una mezcla de bacterias provenientes de trozos de PUR en proceso de deterioro tomados de un basurero, se realizaron resiembras selectivas en Medio MB+PURh sólido y en agar Luria Bertani (LB), para identificar la morfología de las colonias. Se lograron obtener ocho cepas bacterianas axénicas con capacidad para crecer en Medio Basal suplementado con Hydroform[®] como única fuente de carbono.

La identificación para asignarles género y especie se llevó a cabo en el cepario de la Facultad de Química (Q.F.B. Alejandro Camacho), en el cual se establecieron los siguientes géneros y especies para las ocho cepas bacterianas aisladas (Tabla 2).

Tabla 2. Identificación de las cepas bacterianas con capacidad de crecer en MB+PURh

Cepas	Identificación
1, 5 y 8	<i>Comamonas testosteroni</i> o <i>Pseudomonas alcaligenes</i>
2, 3, 4 y 6	<i>Ochrobactrum anthropi</i>
7	<i>Pseudomonas</i> sp.

A pesar de que las cepas 1, 5 y 8 fueron identificadas como *C. testosteroni* o *P. alcaligenes* y las cepas 2, 3, 4 y 6 fueron clasificadas como *O. anthropi*, la morfología de las colonias de cada cepa fue diferente, ya que en el caso de la cepa 1 y 8 se tuvieron colonias amarillas, con borde y centro oscuro, pero las colonias de la cepa 1 fueron más grandes que las de la 8. Por otra parte la cepa 5 presentó colonias amarillas rugosas, secas y un crecimiento que formaba agregados en medio líquido. Las colonias de las cepas 2, 3, 4 y 6 fueron amarillas y tuvieron morfología parecida con diferencias en tamaño y tono de color. Estas diferencias morfológicas, observadas en las colonias clasificadas como pertenecientes a la misma especie, podría ser debida a que, a pesar de que fueran de la misma especie, correspondieran a cepas distintas o a que fueran de

especies diferentes pero que las técnicas empleadas para su clasificación no permitieran diferenciarlas.

7.2. Caracterización del crecimiento

Con el fin de caracterizar el crecimiento de las diferentes cepas y como un indicador de su capacidad para utilizar PURh, se determinaron las velocidades de crecimiento de cada cepa en MB+PURh, para lo cual fue necesario previamente determinar el crecimiento de cada cepa en medio Luria Bertani por medición de la D.O. a 660 nm.

Considerando su clasificación, se puede observar que el crecimiento de cada cepa es correspondiente al de las otras cepas clasificadas como de su misma especie. Éste es el caso de las cepas 1 y 8 las cuales fueron caracterizadas como *C. testosteroni* o *P. alcaligenes* y presentan velocidades de crecimiento semejantes. Esto también se observa en el crecimiento de las cepas 2, 3, 4 y 6, las cuales fueron clasificadas como *O. anthropi* y por último se observa que la cepa 7, la cual fue caracterizada como *Pseudomonas* sp. presenta un crecimiento muy diferente a todas las demás (Figura 7). No fue posible determinar el crecimiento de la cepa 5 por este método pues esta cepa crece en forma de agregados.

A partir de los datos obtenidos en los cultivos en medio LB se pudieron establecer las condiciones de inoculación para medir el crecimiento de cada cepa en MB+PURh. Para esto se tomó en cuenta que el inóculo proviniera de un cultivo en medio LB que se encontrara a la mitad de su fase exponencial; además de que se empleó una cantidad inicial semejante de inóculo para todas las bacterias, con lo cual se garantizó que el crecimiento fuese comparable entre todas las cepas.

En medio MB+PURh también se puede observar que el crecimiento es semejante entre las cepas correspondientes a la misma especie, aunque con algunas variaciones. Las cepas 1 y 8 caracterizadas como *C. testosteroni* o *P. alcaligenes* presentaron el mayor crecimiento en este medio (Figura 8), siendo entre ocho y diez veces mayor que el de las cepas 2, 3, 4 y 6 caracterizadas como *O. anthropi* (Figura 9). La cepa 7

clasificada como *Pseudomonas* sp. presentó un crecimiento bajo semejante a las cepas de *O. anthropi* (Figura 9).

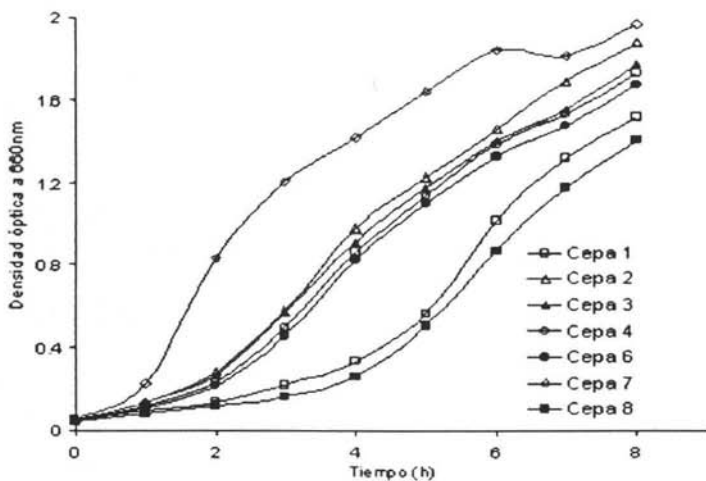


Figura 7. Crecimiento en medio Luria Bertani líquido. Determinado por medición de D. O. a 660nm.

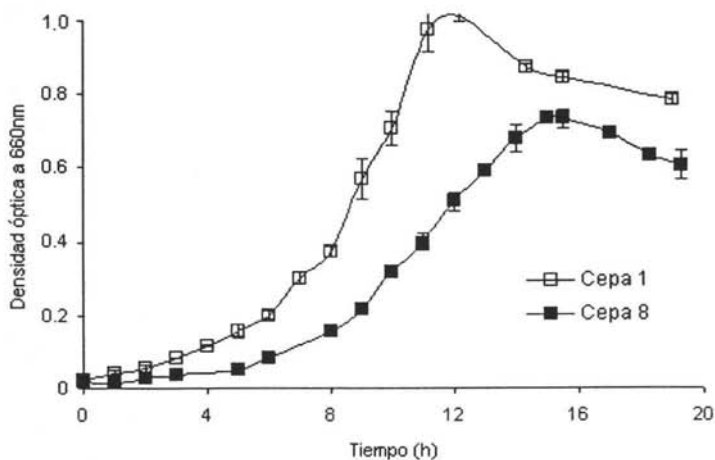


Figura 8. Crecimiento de *C. testosteroni* o *P. alcaligenes* (cepas 1 y 8) en MB+PURh líquido. Determinado por medición de D. O. a 660nm. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones, las barras representan las desviaciones estándar.

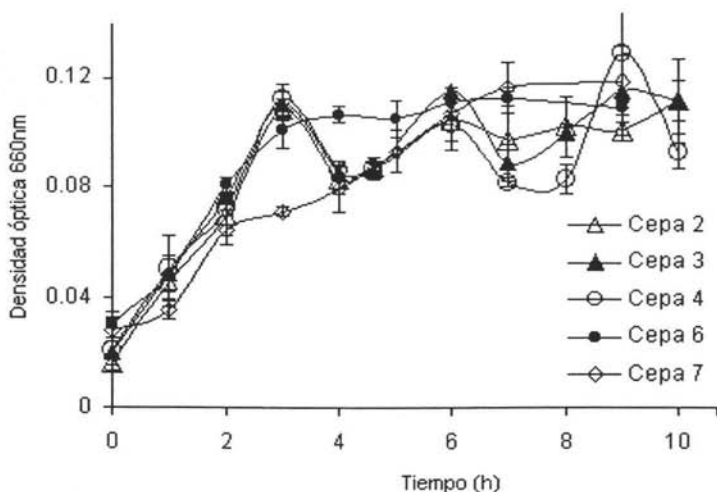


Figura 9. Crecimiento de *O. anthropi* (cepas 2, 3, 4 y 6) y *Pseudomonas* sp. (cepa 7) en MB+PURh líquido. Determinado por medición de D. O. a 660nm. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones, las barras representan las desviaciones estándar.

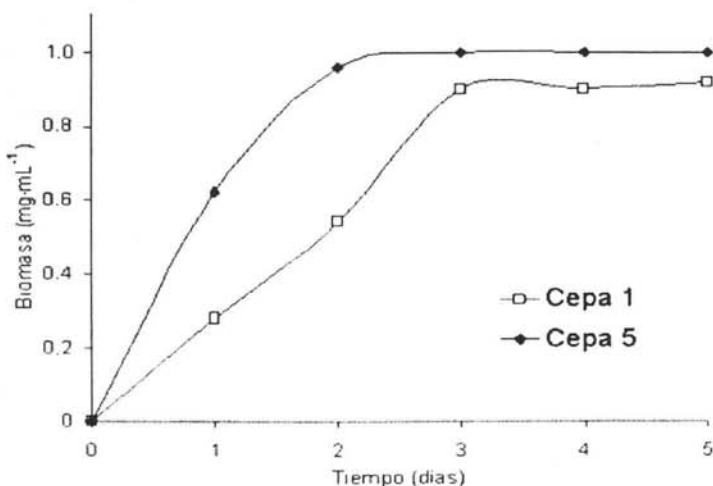


Figura 10. Crecimiento de las cepas 1 y 5. Determinado por peso seco.

Para tener una medida del crecimiento de la cepa 5 se determinó el peso seco de cultivos a diferente tiempo. Se midió el crecimiento de la cepa 1 como comparación, ya

que ésta fue la de mayor crecimiento. Se observó, que la cantidad de biomasa producida fue muy similar en ambas cepas. Esto apoya la posibilidad de que si correspondan al mismo género, aunque debido a la diferente forma de crecimiento podrían ser de especies o cepas distintas (Figura 10).

7.3. Identificación de actividades enzimáticas producidas por las bacterias que crecen en PUR, empleando medios diferenciales

Para conocer qué actividad(es) enzimática(s) relacionada(s) con la degradación del PUR presentaban las bacterias aisladas, cada cepa fue cultivada en tres medios de cultivo diferenciales, para la detección específica de las actividades de proteasa, ureasa y esterasa.

Para la detección de actividad de proteasa, se utilizó el medio YES suplementado con gelatina. Las bacterias fueron sembradas por estría en este medio y la tinción fue aplicada después de 48 h de cultivo. Se utilizó como control positivo una cepa de *P. aeruginosa* (P+), la cual presenta el halo de hidrólisis y como control negativo se utilizó *E. coli* cepa DH5 α (E-), la cual no presenta halo de hidrólisis. Los resultados muestran que de las bacterias aisladas capaces de crecer en Hydroform[®], solamente la cepa 7, identificada como *Pseudomonas* sp., mostró actividad proteolítica[®] al presentar el halo transparente alrededor de su crecimiento (Figura 11).

En la detección de actividad de ureasa se observaron resultados positivos para las cepas 2, 3, 4 y 6 (Figura 12).

La prueba de detección de actividad de esterasa mostró halos de precipitación por hidrólisis de enlaces éster alrededor del crecimiento de las cepas 1, 5, 7 y 8 (Figura 13).

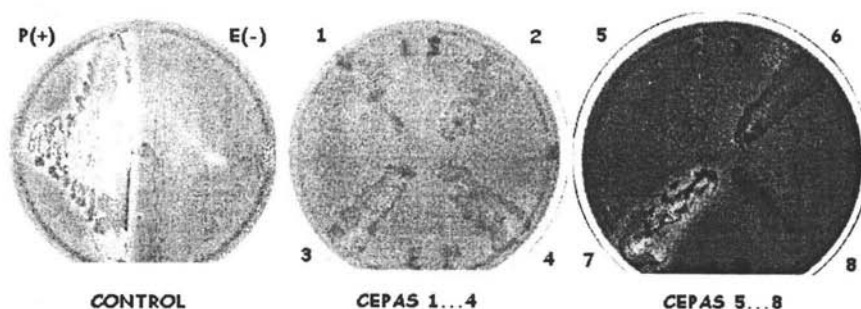


Figura 11. Detección de actividad de proteasa en bacterias que crecen en Hydroform®. La actividad proteasa se determinó por la identificación de halos de hidrólisis en medio YES + gelatina, revelado con azul de Coomassie. El revelado se realizó después de 48 h de incubación a 37 °C. Control positivo, *P. aeruginosa* (P+); control negativo, *E. coli* DH5α (E-).

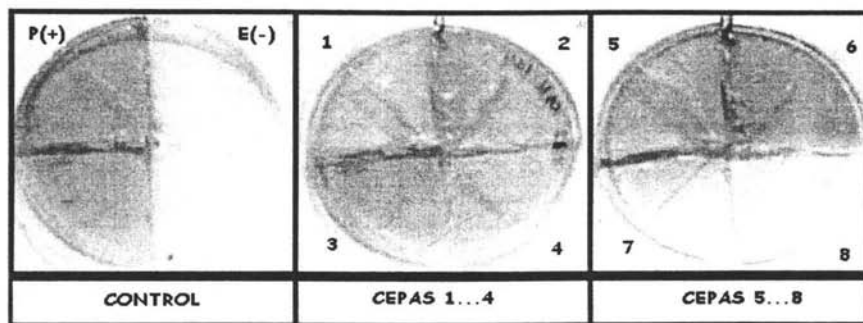


Figura 12. Detección de la actividad de ureasa en agar Urea de Christensen. Revelado después de 48 h de incubación a 37 °C. Esta figura es una composición a partir de cajas inoculadas únicamente con una cepa. Un cuadrante fue recortado de la caja correspondiente y colocado en la posición correspondiente para presentar los resultados observados. Control positivo, *P. aeruginosa* (P+); control negativo, *E. coli*, DH5α (E-).

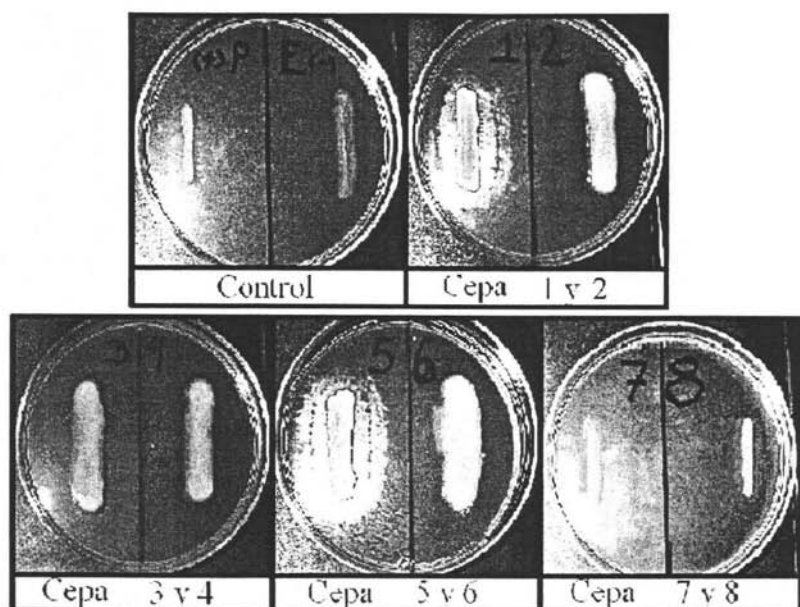


Figura 13. Prueba de actividad esterasa en medio de Tween80®. Los cultivos fueron incubados 120 h a 37 °C. Control positivo, *P. aeruginosa* (P+); control negativo, *E. coli*, DH5α (E-).

En la Tabla 3 se muestran las actividades presentes en cada cepa con respecto a la caracterización por medios diferenciales.

Tabla 3. Actividades enzimáticas correspondientes para cada cepa.

Cepa	Caracterización	Actividades		
		Proteasa	Ureasa	Esterasa
1, 5 y 8	<i>C. testosteroni</i> o <i>P. alcaligenes</i>			+
2, 3, 4 y 6	<i>O. anthropi</i>		+	
7	<i>Pseudomonas sp.</i>	+		+

7.4. Actividad de esterasa en el sobrenadante del medio de cultivo de las cepas esterasa positivas con mayor crecimiento en MB+PURh

Dado que las cepas con actividad de esterasa son las que presentaron mayor crecimiento y existen reportes acerca de esterasas extracelulares involucradas con la degradación de PS-PUR (Nakajima-Kambe *et al.*, 1997), se realizó la búsqueda de actividad esterasa en el sn del medio de cultivo.

Ésta determinación se realizó a las 12 h de incubación para las cepas 1, 5 y 8. Sólo se observó actividad en el sobrenadante del medio de cultivo de las cepas 1 y 8, pero no en el de la cepa 5 (Figura 14).

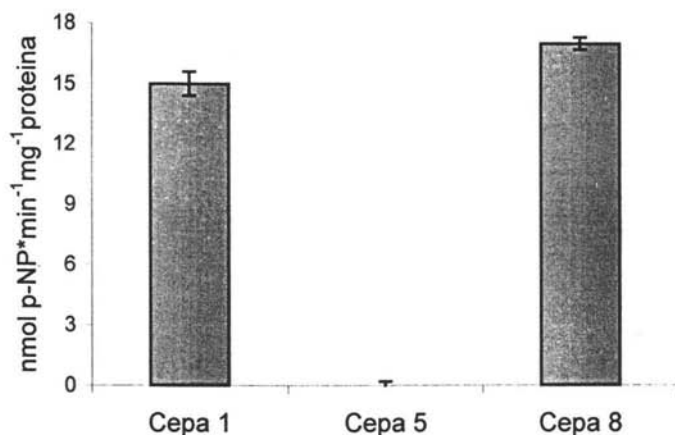


Figura 14. Actividad de esterasa en el sobrenadante del medio de cultivo. A las 12 h de incubación a 37 °C y 200 rpm. Cada columna representa el promedio de tres repeticiones y las barras superiores las desviaciones estándar.

7.5. Actividad de esterasa a diferentes tiempos de cultivo

Para saber si la actividad enzimática era constitutiva o inducible, se realizó la medición de la actividad de esterasa en el sobrenadante de los cultivos de las cepas 1 y 8 a las 5, 10 y 15 h de incubación en medio MB+PURh.

No se detectó actividad a las cinco horas de incubación a pesar de haberse concentrado el sobrenadante 5 veces. Solo a las 15 h se detectó actividad en ambas cepas, lo cual indica que dicha actividad no es constitutiva (Figura 15) (n = 3).

La medición de actividad de esterasa en el sn también se determinó en estas cepas cultivadas en medio LB a las 8 y 16 h de incubación. Para este experimento el sn se concentró cinco veces. En ninguna de las mediciones se detectó actividad.

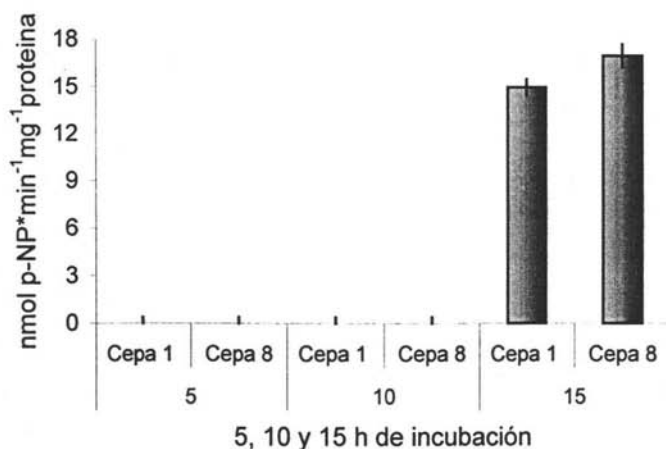


Figura 15. Actividad enzimática de esterasa para las cepas 1 y 8 a diferentes tiempos de incubación. 5, 10 y 15h. Cada columna representa el promedio de tres repeticiones, las barras representan la desviación estándar.

7.6. Análisis de los compuestos presentes en el sobrenadante del MB-PURh después de cinco días de incubación con las cepas 1 y 8.

7.6.1. Identificación por cromatografía de gases y espectrometría de masas de los compuestos solubles en cloroformo

Con el fin de determinar de qué forma son afectados por la bacteria los componentes del Hydroform[®] se realizó una extracción clorofórmica al sn del medio de cultivo, la cual fue analizada por cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS). Los cromatogramas correspondientes al control, el cual consistió en medio de cultivo sin inocular (Figura 16a) mostró señales correspondientes a N-metilpirrolidona (NMP), dipropilenglicolmetiléter (DPGME) y 2-propanol,1-(2-metoxi-1-metiletoxi) (DPGME2).

Los cromatogramas correspondientes a los extractos de los cultivos de las cepas 1 y 8 después de 5 días de incubación siguen presentando las señales correspondientes al DPGME y DPGME2 pero no muestran la señal de la NMP, lo cual sugiere que este compuesto está siendo consumido por la bacteria (Figura 16b y 16c).

7.6.2. Determinación del tamaño de los oligómeros de poliuretano (Hydroform[®]) por cromatografía de permeación en gel

Dado que en el Hydroform[®] deben estar presentes oligómeros del mismo, se analizó, por cromatografía de permeación en gel (GPC), la distribución de tamaño de estos oligómeros para determinar si disminuye por la actividad bacteriana.

Este análisis se realizó inyectando tres veces cada extracto. En las tres repeticiones se obtuvieron resultados semejantes. Sólo se muestra una gráfica representativa de las tres repeticiones (Figura 17), en la que se observa la distribución de tamaño de los oligómeros presentes en el Hydroform[®]. En la cepa 1 se observó que la distribución del tamaño de oligómeros disminuye por su lado derecho con respecto al control, lo cual indica que los oligómeros de tamaño menor desaparecen.

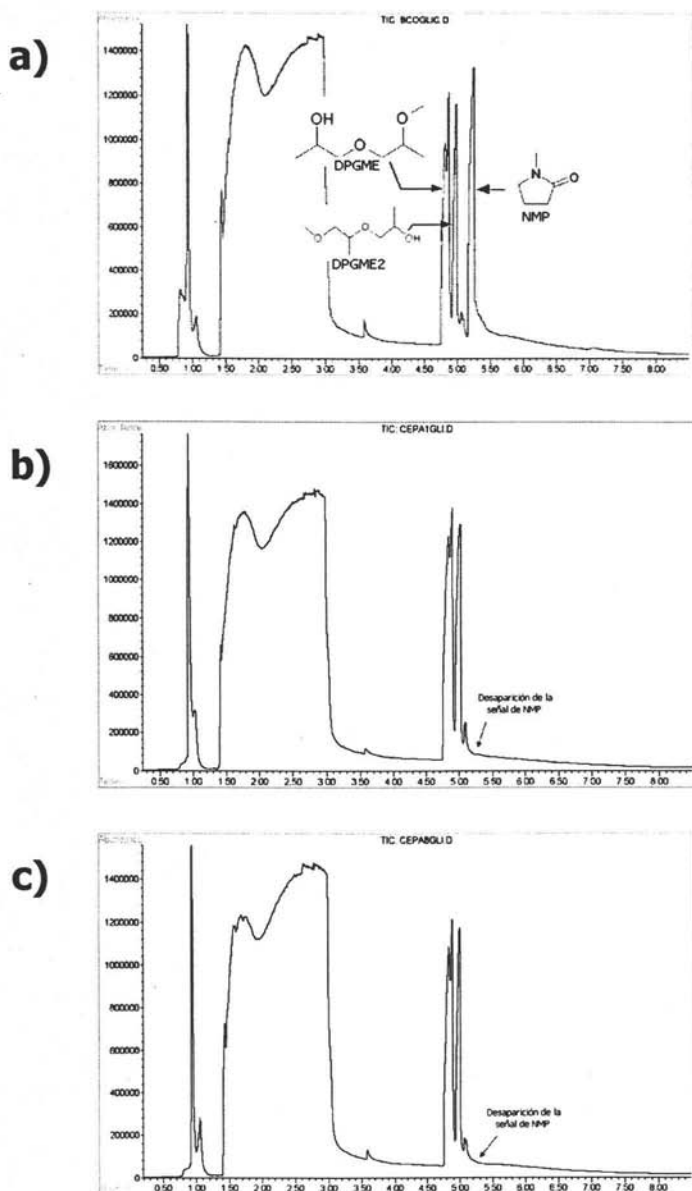


Figura 16. Cromatograma del cultivo control sin inocular (a) y de los cultivos inoculados con las cepas 1 (b) y 8 (c). Incubación por 5 días a 37 °C y a 200 rpm.

Este análisis se realizó inyectando tres veces cada extracto. En las tres repeticiones se obtuvieron resultados semejantes. Sólo se muestra una gráfica representativa de las tres repeticiones (Figura 17), en la que se observa la distribución de tamaño de los oligómeros presentes en el Hydroform®. En la cepa 1 se observó que la distribución del tamaño de oligómeros disminuye por su lado derecho con respecto al control, lo cual indica que los oligómeros de tamaño menor desaparecen.

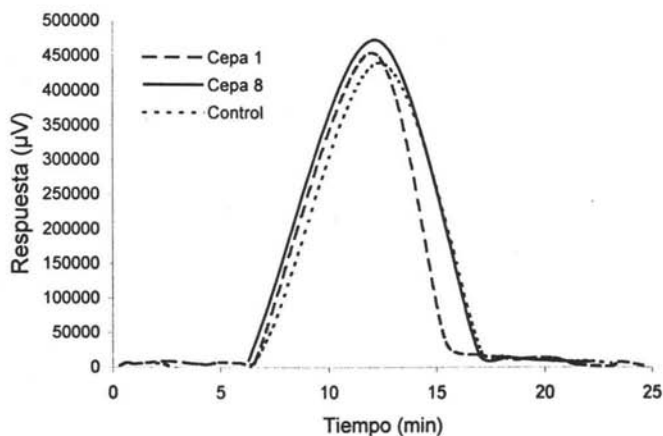


Figura 17. Distribución de tamaños en el Hydroform®. Representación de una serie de tres repeticiones

7.6.3. Análisis por espectroscopía de infrarrojo del sólido obtenido por evaporación del sobrenadante del MB+PURh

Para determinar cuáles son los grupos funcionales presentes en el Hydroform® y cuáles de éstos se ven afectados por la acción bacteriana, se llevó a cabo el análisis por IR de los sólidos obtenidos por la evaporación del sn del medio de cultivo. El análisis de los espectros muestra que, en el caso del control, existen bandas características de grupos éster y del grupo carbamato, indicando que se trata de un PUR de tipo poliéster. En el caso del espectro obtenido del cultivo con la cepa 1 de *C. testosteroni*, las señales de grupos éster presentes en el control desaparecieron (1330-1050) y por contraparte

aparecieron bandas características de grupos ácido (1440-1210). En el caso del espectro obtenido del cultivo con la cepa 8 de *C. testosteroni*, no hay cambios con respecto al espectro del control, ya que aparecen las mismas bandas características de grupos éster y carbamato (Figura 18).

7.7. Determinación de la relación de la NMP con la polimerización del PS-PUR del Hydroform®

Se había observado que el medio de cultivo de un control sin inocular sometido a esterilización (121 °C durante 15 min) mostraban polimerización del Hydroform®, mientras que en de cultivos de las cepas 1 y 8, todos con cinco días de incubación, no polimerizaban después de ser esterilizados. Esto sugería que la acción bacteriana había provocado cambios en la estructura o en la composición de los compuestos presentes en el Hydroform® que impedía que ocurriera la polimerización, lo cual era un indicio más de que la bacteria era capaz de atacar al Hydroform®.

Sin embargo, se sabe por los experimentos de GC-MS que a los cinco días de incubación desaparece la NMP presente en el Hydroform®, la cual podría ser responsable o participante en la polimerización. Por lo tanto, su ausencia en el medio de cultivo podría ser el origen de la no polimerización en el sn del medio cultivado con bacterias. Para descartar esta posibilidad, se preparó un control en el cual la NMP se extrajo del Hydroform® por diálisis en agua y su ausencia se comprobó analizando una alícuota por medio de GC-MS. Con este Hydroform® se preparó MB-PURh y se incubó, sin inocular, en las mismas condiciones que los cultivos anteriores.

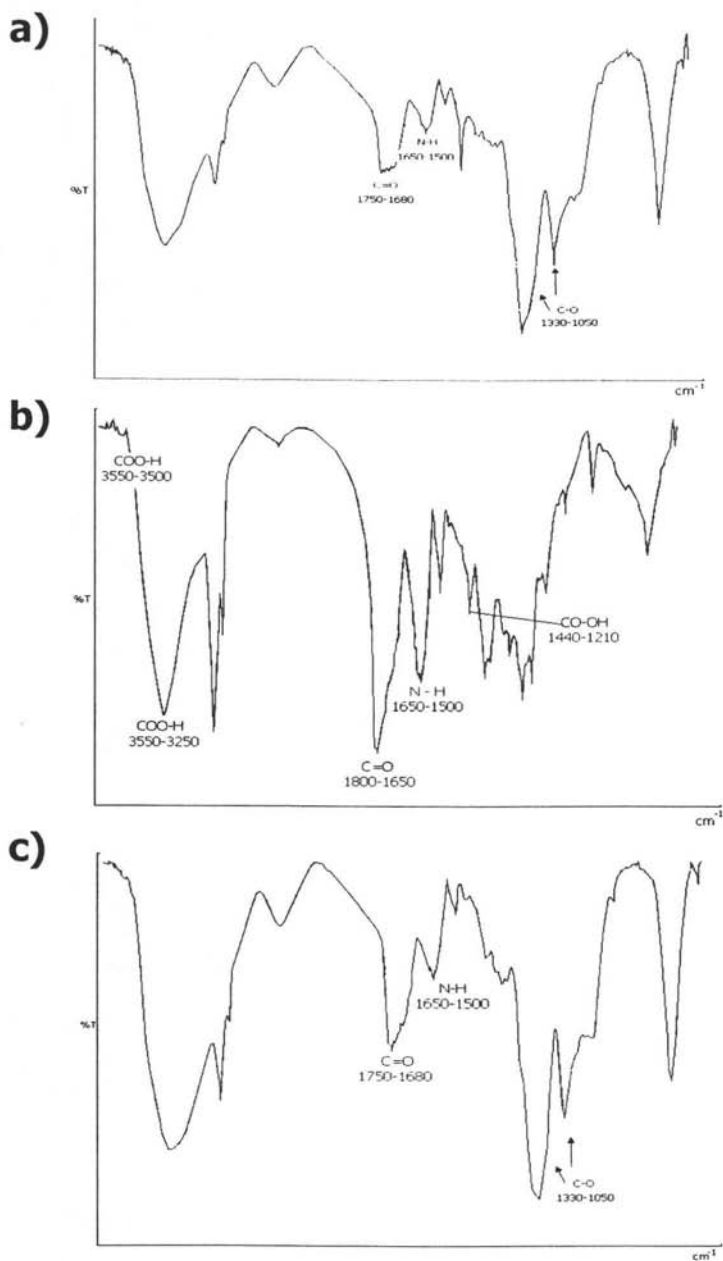


Figura 18. Espectros de IR del sólido del cultivo control sin inocular (a) y de los cultivos con las cepas 1 (b) y 8 (c). Incubación por 5 días a 37 °C y a 200 rpm.

Después de esterilizar este medio de cultivo, se observó que el Hydroform[®] si se polimerizó, lo cual indica que la NMP no está involucrada en la polimerización (Figura 19) y que la no polimerización en los medios incubados con bacterias es el resultado de la actividad bacteriana.

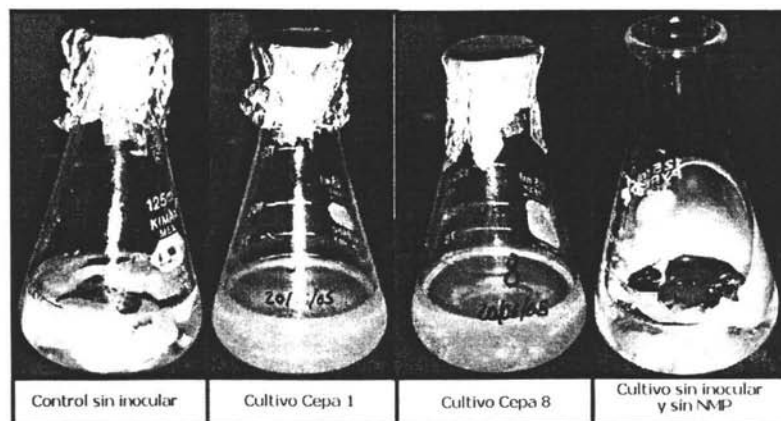


Figura 19. Medios de cultivo después de esterilización. Autoclave 121° C, 15 min.

8. DISCUSIÓN

8.1. Aislamiento de cepas bacterianas degradadoras de poliuretano

El PUR es un polímero artificial que fue sintetizado por primera vez hace 68 años (<http://www.bayermaterialscience.com>). A partir de ese tiempo, este material ha sido expuesto al ambiente por lo que, muy probablemente, ciertos microorganismos saprófitos pudieron haberse ido seleccionado para utilizarlo como fuente de carbono y/o nitrógeno. Ésto implicaría que estos microorganismos poseen algunas actividades enzimáticas que les permiten atacarlo o degradarlo de manera más eficiente que otros que no han sido capaces de hacerlo. Siguiendo esta idea, se colectaron en un basurero, trozos de PUR en estado de deterioro y se emplearon como inóculo en un medio de selección que contenía PUR como única fuente de carbono (MB+PURh), para obtener bacterias capaces de degradar PUR.

Utilizando esta estrategia se lograron aislar ocho cepas bacterianas correspondientes a tres especies diferentes: *P. alcaligenes* o *C. testosteroni* (cepas 1, 5 y 8), *O. anthropi* (cepas 2, 3, 4 y 6) y *Pseudomonas* sp. (cepa 7). Las características presentadas por cada cepa tanto en crecimiento (Figuras 7, 8, 9 y 10) como en tipo de actividades enzimáticas que presentaban (Figuras 11, 12 y 13) coincidieron con la caracterización por pruebas bioquímicas realizada en el cepario de la Facultad de Química. Sin embargo, se observaron diferencias tanto morfológicas como en forma de crecimiento entre las cepas caracterizadas como de la misma especie. Ésto puede deberse a dos razones: que se trate de bacterias de la misma especie pero de cepas distintas, o que sean cepas de especies que no pudieron ser diferenciadas por las técnicas bioquímicas empleadas en su identificación. Será necesario secuenciar el gen del RNA ribosomal 16S para obtener una caracterización más precisa.

Compuestos xenobióticos de una gran variedad de estructuras y composiciones capaces de ser degradados e incluso asimilados por bacterias van desde herbicidas y solventes orgánicos, hasta polímeros como poliésteres, poliuretanos, etc. Por ejemplo, se ha reportado la degradación de fenilcarbamato por cepas de *P. alcaligenes* (Marty *et*

al., 2002), clorobencenos por *Pseudomonas alcaligenes* (Carnye *et al.*, 1989) y clorofenoles por *Pseudomonas putida* (Farrel, 2002). Además, se ha descrito la degradación de recubrimientos de PUR por biofilms constituidos por *O. anthropi*, *P. aeruginosa*, *Alcaligenes denitrificans*, *Xanthomonas maltophila* y *Vibrio harveyi* (Ji-DongGu y Monsi, 1997). Las bacterias encontradas en este trabajo pertenecen a géneros en los que algunos de sus miembros presentan la propiedad de utilizar compuestos xenobióticos.

8.2. Actividades enzimáticas relacionadas con la degradación del PUR

Si las cepas bacterianas aisladas en este trabajo son capaces de degradar PUR, éstas deben poseer actividades enzimáticas relacionadas con la ruptura de los enlaces presentes en el PUR. Con base a su estructura, se ha propuesto que las actividades enzimáticas que podrían atacar al PS-PUR (como el Hydroform®) son las actividades de tipo proteasa, ureasa y esterasa (Figura 2). Para la detección de estas actividades se emplearon medios de cultivo diferenciales que mostraron que todas las bacterias aisladas presentaron por lo menos alguna de las actividades propuestas, y que estos resultados también fueron coincidentes con la identificación (Tabla 3).

A pesar de que en el PUR no se tienen enlaces peptídicos propiamente, actividades enzimáticas de tipo proteasa y ureasa podrían atacar los enlaces uretano (carbamato). Sin embargo, ninguna de las dos actividades encuentran en el poliuretano un sustrato específico, ya que el enlace uretano solo coincide con la urea en el enlace carbono-nitrógeno y difiere de un enlace peptídico en que posee un átomo de oxígeno en lugar de tener un carbono en la posición α . En este trabajo se aislaron cuatro cepas (2, 3, 4 y 6) de *O. anthropi* que mostraron actividad de ureasa en el medio diferencial (Figura 12), pero cuyo crecimiento fue muy bajo (Figura 9). Tratando de explicar el bajo crecimiento presentado por estas bacterias en relación a la actividad enzimática detectada, se puede pensar en varias posibilidades. La primera y más general es que, dado que el enlace uretano no es exactamente un enlace peptídico, ni un enlace C-N de

urea, la actividad detectada en estas bacterias fue capaz de atacarlo con una frecuencia muy baja. Otra posibilidad estaría relacionada con el hecho de que en el PUR el número de enlaces uretano es mucho menor que el de los enlaces éster, por lo que esos enlaces no se encontrarían en disponibilidad de ser atacados fácilmente. Además, dada esta menor frecuencia de enlaces uretano, la hidrólisis de estos enlaces genera fragmentos de polioles muy grandes, los cuales probablemente no podrían ser utilizados por las bacterias. Actividades de tipo ureasa relacionadas con la degradación de PUR se han reportado solamente en hongos (Pathirana *et al.*, 1983) y no en bacterias. Por lo tanto sería muy importante determinar con precisión si efectivamente una actividad ureasa está involucrada en sustentar el crecimiento de estas cepas de *O. anthrophii* en medio con PUR.

En este trabajo se aisló una cepa de *Pseudomonas* sp. (cepa 7) que presentó actividad enzimática de proteasa (Figura 11). Actividades de tipo proteasa producidas por *P. fluorescens* y *P. chlororaphis* han sido descritas como capaces de atacar al Impranil DLN[®], un PS-PUR hidrosoluble (Ruiz *et al.*, 1999). A pesar de que esta bacteria presentaba también actividad de esterasa, su crecimiento en MB-PURh fue muy bajo. Esto sugiere que no todas las actividades que pudieran estar relacionadas con la hidrólisis de enlaces presentes en el PUR son capaces de atacarlo ó que si lo son, es posible que la bacteria que las produce no sea capaz de utilizarlo como fuente de carbono.

Actividades de esterasa son las que más comúnmente se han descrito en estudios de degradación de PUR, debido probablemente a que en estos trabajos se ha empleado poliuretano de tipo poliéster para la selección y el análisis (Ruiz y Howard, 1999; Howard y Blake, 1998; Nakajima-Kambe *et al.*, 1995) y también al hecho de que en el PUR los enlaces éster se presentan en mayor proporción que los enlaces carbamato. En este trabajo encontramos que las cepas de *P. alcaligenes* o *C. testosteroni* (cepas 1, 5 y 8) presentaron actividad de esterasa y mostraron un alto crecimiento en MB+PURh (diez veces mayor con respecto a las otras cepas). Muy probablemente estas esterases deben tener la capacidad de romper los enlaces éster

dentro de sustratos alifáticos, como el PUR, lo cual podría ser un indicio de que se trata de esterases de tipo lipasa. A diferencia de estas esterases, la esterasa de *Pseudomonas* sp. (cepa 7) (Figura 13) podría no ser capaz de hidrolizar enlaces éster dentro de sustratos alifáticos como lo es el PUR, lo cual podría explicar el bajo crecimiento de esta cepa en el medio MB-PURh. Al respecto, se ha descrito la existencia de una esterasa extracelular en *C. acidovorans* que no es capaz de hidrolizar al PUR, mientras que una esterasa asociada a membrana plasmática si lo es (Akutsu *et al.*, 1998)

8.3. Caracterización de la actividad de esterasa detectada en las cepas con mayor crecimiento (1, 5 y 8)

Como las cepas con crecimiento más alto (cepas 1, 5 y 8) (Figuras 8 y 10) presentaron actividades de tipo esterasa (Figura 13) se llevó a cabo su cuantificación. Dado que esta actividad podría ser de tipo extracelular o asociada a la membrana (Nomura *et al.*, 1998) ésta se buscó en el sobrenadante de cultivos líquidos. Actividad extracelular de esterasa se detectó en el sn de los cultivos de las cepas 1 y 8 pero no de la cepa 5 (Figura 14). Análisis de los sn de cultivos de estas cepas en medio LB no mostraron actividad esterasa ni a las 8, ni a las 16 h de incubación, a pesar de que los sobrenadantes fueron concentrados cinco veces, lo que indica que la actividad de esterasa no es constitutiva. Adicionalmente, el ensayo de medición de actividad en el sn de cultivos de MB+PURh a diferentes tiempos de incubación mostró que la actividad aparece después de las 10 h de cultivo, momento en el que la bacteria está en su fase exponencial tardía e inicia su fase estacionaria (Figura 8). Este resultado conduce a la idea que si la bacteria expresa la esterasa a partir de ese momento, entonces el crecimiento inicial que presenta no es debido a la utilización del PUR como fuente de carbono, sino que debió haber utilizado otra fuente de carbono sencilla presente en el medio de cultivo.

Debido a que en la cepa 5 se detectó la actividad esterasa en agar Tween 80® (Figura 13) pero no en el sn del medio de cultivo (Figura 14), se sugiere que en esta cepa esta actividad pudiera estar asociada a la membrana celular. Como se mencionó

anteriormente, en *C. acidovorans* TB35 se han descrito dos tipos de actividades esterasa asociadas a la degradación del PUR. En dicho trabajo se encontró que la actividad asociada a membrana, es capaz de atacar los enlaces éster presentes en el polímero. Dada su localización, se ha propuesto que esa esterasa posee dominios hidrofóbicos a los lados del sitio catalítico, que le permiten asociarse a la superficie del polímero para acercar el sitio catalítico lo suficiente para que actúe (Akutzu *et al.*, 1998).

Asimismo, la aparición de los halos de precipitación alrededor de las colonias, característicos de actividad esterasa, después de 5 días de cultivo en el medio Tween 80[®], sugiere que la actividad esterasa podría estar apareciendo una vez que se terminara el extracto de levadura presente en ese medio. Esto sugiere que la actividad de esterasa se induce en presencia de sustratos con enlaces éster como el Tween 80[®] o el Hydroform[®].

Por otra parte, una característica bacteriana que pudiera estar relacionada con la capacidad de utilizar el PUR es que la cepa 5 presentó crecimiento en forma de agregados, tanto en medio LB como en MB+PURh. Se ha observado que algunas bacterias adoptan este tipo de crecimiento como un mecanismo de protección ante condiciones de estrés (Verstraete y Bossier, 1996). Este crecimiento en forma de agregados se sustenta en un aumento en la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, que se ha medido en bacterias degradadoras de clorofenoles, las cuales presentan este mecanismo de auto-agregación al cultivarse en presencia de estos compuestos (Farrel y Quilty, 2002). Aunque en este caso la cepa 5 presentaba crecimiento en agregados aún en medio LB, podría ser que esta característica favoreciera su crecimiento en medio MB+PURh, ya que esta cepa presentó un crecimiento semejante en cantidad al de la cepa 1, que fue el mayor. Así, al observar el comportamiento de esta cepa se propone que, por su capacidad de agregarse posiblemente por medio de interacciones hidrofóbicas, podría también agregarse sobre superficies hidrofóbicas como el PUR, permitiéndole su utilización como fuente de carbono.

8.4. Efectos de la acción bacteriana sobre el Hydroform®

La determinación del efecto que causan las cepas 1 y 8 sobre el Hydroform® fue el punto más importante de este trabajo, para lo cual se realizaron ensayos que permitieran detectar cambios en la estructura, composición y el tamaño de los oligómeros del PUR.

El análisis de un extracto clorofórmico del sn del medio de cultivo, utilizando GC-MS mostró la presencia de dos isómeros de DPGME y NMP (Figura 16a). Posteriormente se analizó el extracto clorofórmico del sn de medios de cultivo con cinco días de cultivo con las cepas 1 y 8 (Figuras 16b y 16c), observándose que la señal de NMP desapareció por completo en ambos casos. Esto indica que, dado que la estructura de la NMP es muy sencilla y de bajo peso molecular, la bacteria la podría estar utilizando como fuente de carbono que le permitiera iniciar el crecimiento en MB-PURh.

Este tipo de cultivo, en el que se tiene una fuente de carbono de fácil asimilación además del PUR, parece ser una estrategia efectiva en la degradación del polímero. En un estudio en el que 16 cepas bacterianas fueron cultivadas en medios de cultivo minerales con PUR como única fuente de carbono no se detectó degradación después de un período de 12 semanas, pero tras la preparación de nuevos medios de cultivo con PUR, adicionados con 1% de extracto de levadura, se encontró un significativo efecto en la degradación de PUR por cinco de las 16 cepas (Morton y Prince 1991). Ésto sugiere que, debido a que el PUR es un polímero sintético y difícil de atacar enzimáticamente, el establecimiento de la capacidad "poliuretanolítica" de las bacterias puede requerir de una fuente de carbono sencilla que les permita iniciar el crecimiento y desarrollarse eficientemente en ese medio. La posibilidad de que ciertas bacterias puedan utilizar pirrolidona es sustentada en el trabajo publicado por Noe y Nickerson (1958) en el que se describe que *Pseudomonas aeruginosa* es capaz de metabolizar 2-pirrolidona, para obtener ácido glutámico y succinaldehído (Figura 20). Aunque esta bacteria no fue capaz de metabolizar N-metil-2-pirrolidona, no se pudo descartar la posibilidad de que alguna otra bacteria sí sea capaz de utilizarla.

Un resultado semejante a lo descrito anteriormente se presentó en un trabajo previo en el que se reporta que una cepa de *Acinetobacter* sp., capaz de crecer en Hydroform®, también era capaz de utilizar la NMP en etapas tempranas de crecimiento. En ese caso se determinó que a las 22 horas de cultivo la NMP ya había sido totalmente consumida por la bacteria (Carrillo-García, 2004).

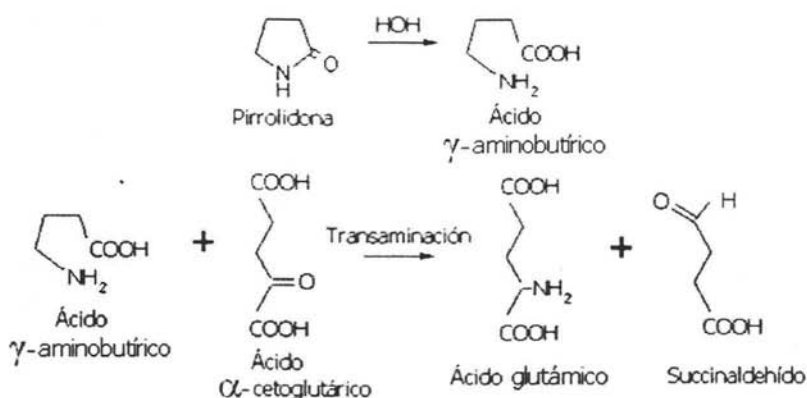


Figura 20. Metabolismo de 2-pirrolidona por *P. aeruginosa*

Estos resultados, así como la observación de que la actividad esterasa es inducible, al ser analizados a la luz de los resultados publicados, permiten sugerir que al inicio del crecimiento las cepas 1 y 8 pudieran estar utilizando a la NMP como fuente de carbono y posteriormente, inducir la expresión de la actividad de esterasa para utilizar otros sustratos como el PS-PUR, cuando la NMP se agota. Para comprobar que la aparición de actividad esterasa está relacionada con el término de la NMP como fuente de carbono será necesario realizar un ensayo de monitoreo de la aparición de actividad de esterasa en el sobrenadante, comparándola con la desaparición de la NMP durante las primeras fases de establecimiento del cultivo.

La siguiente parte de este análisis se basó en la observación de que al esterilizar por autoclave medios MB-PURh sin inocular se observaba polimerización, mientras que, al esterilizar los sobrenadantes de los medios MB-PURh cultivados con las cepas 1 y 8

durante 5 días, no se observaba polimerización. Esta observación hizo suponer que en el medio inoculado con las bacterias, los grupos funcionales que por condensación dan origen al poliuretano (alcohol e isocianato), pudieron haber sufrido un cambio en su estructura, lo que impidió la polimerización. Por lo tanto, la determinación de la presencia de los grupos funcionales en el Hydroform® antes y después de la acción bacteriana proporcionaría información acerca de cuál es el efecto bioquímico que tiene la bacteria sobre el Hydroform®.

Con esta idea, se analizaron por espectroscopia de infrarrojo los sólidos obtenidos por desecación de los sobrenadantes del medio de cultivo inoculado y sin inocular. La comparación de estos espectros mostró que en el medio inoculado con la cepa 1 ocurrió la desaparición de la señal correspondiente al grupo éster, el mantenimiento de la señal correspondiente al grupo carbamato, la aparición de señales correspondientes al grupo carboxilo y la deformación de la señal del grupo alcohol (Figuras 18a y 18b). Esto indica que la acción bacteriana sobre el Hydroform® fue una hidrólisis de los enlaces éster, dando por resultado la producción de grupos ácido y alcohol. En un estudio en el que se analizaron los productos de degradación de PUR por la actividad de *C. acidovorans* se detectaron los compuestos ácido y alcohol utilizados como materias primas (Nakajima-Kambe *et al.*, 1997).

Otra prueba que se empleó en este trabajo para identificar la acción de la bacteria sobre el PUR fue la determinación de la distribución de tamaños de partículas de polímero empleando un sistema de GPC. Estos análisis mostraron que, en el medio en el que se cultivó la cepa 1 hubo una desaparición de oligómeros en la zona de bajo peso molecular, lo que sugiere que estas partículas están siendo hidrolizadas y utilizadas por la bacteria ya que a pesar de que la distribución se ve afectada por una disminución de la cantidad de oligómeros pequeños, no se ve afectada por la aparición de moléculas más pequeñas (Figura 17). Un estudio semejante fue realizado al determinar la acción de la bacteria *P. chlororaphys* sobre el Impranil DLN®, un PS-PUR hidrosoluble que, al igual que en Hydroform®, se encuentra en suspensión coloidal. Los resultados

mostraron una disminución de tamaño de estas partículas después de someterse a la acción bacteriana (Howard y Blake, 1998).

Por parte de la cepa 8 no se observaron cambios en su espectro de IR (Figura 18c) con respecto al control, esto podría indicar que no hay hidrólisis de enlaces éster o que ésta es tan baja que no es detectable por este método. Ésto coincide con el ensayo en GPC, que indicó que posiblemente la bacteria utilice moléculas muy pequeñas las cuales no afectan de ninguna manera la distribución de tamaños de los oligómeros y que además las asimile por completo con lo que no se generarían productos de degradación como lo serían los ácidos y alcoholes.

Otra posibilidad es que, dado que el Hydroform[®] es un producto comercial que contiene aditivos como retardadores de flama, abrillantadores, etc. (los cuales no se detectaron en este análisis), la cepa 8 esté empleando estos compuestos como fuente de carbono. En un estudio realizado recientemente en el que se cultivó esta cepa durante 15 días, en ocho diferentes PUR (sintetizados sin ningún aditivo), como única fuente de carbono, se observó crecimiento de la bacteria. Más aún, por análisis de microscopía electrónica fue posible demostrar que después de ese tiempo de cultivo ocurrió erosión de la superficie de las partículas de PUR (Pérez 2005). Ésto indica que la cepa 8 fue capaz de atacar el PUR.

8.5. Un modelo para explicar el crecimiento de las cepas 1 y 8 en Hydroform

A partir de los resultados observados en este estudio es posible proponer el desarrollo de una serie de procesos bioquímicos que deben estar sucediendo durante el crecimiento de la cepa 1 en MB+PURh. Así, estos procesos podrían describirse como sigue: en la primera etapa del cultivo y durante la fase exponencial (primeras 12 horas), el crecimiento es sostenido por la NMP, la cual es consumida por completo por la bacteria. Cuando la NMP se termina, la bacteria expresa la actividad esterasa para comenzar a hidrolizar el PUR, lo cual sucede después de las 10 h de incubación. Ya que el PUR no es una fuente de carbono que se pueda utilizar fácilmente se observa una

caída del crecimiento alrededor de las 12 h de incubación, en lugar de un comportamiento diáuxico típico, por lo cual el crecimiento se detiene y comienza a disminuir lentamente, sin presentar una fase estacionaria típica. A diferencia de la fase de muerte que se presenta normalmente en cultivos con fase estacionaria, en la que el crecimiento presenta una caída muy pronunciada, esta cepa presenta una disminución del crecimiento prolongada, lo cual indicaría que está utilizando una fuente de carbono nueva que no metaboliza fácilmente.

En el caso de la cepa 8, se propone un comportamiento inicial parecido al de la cepa 1, en el que en la primera etapa utiliza la NMP como fuente de carbono, y una vez que se termina, expresa su actividad de esterasa. Tomando en cuenta que la actividad de esta cepa no altera el espectro de IR del PUR, ni la distribución de tamaños de los oligómeros presentes, pero si genera la no polimerización por calor en el Hydroform[®], se propone que la esterasa que produce esta cepa solo rompe los enlaces que se encuentran en los extremos del polirol, con lo cual generaría una cantidad de grupos carboxilo muy pequeña en relación con la abundancia de enlaces éster presentes, los cuales no serían detectables por IR y no afectarían la distribución de tamaños de los oligómeros.

9. CONCLUSIONES

1. El uso de restos de poliuretano en deterioro como fuente de bacterias poliuretanolíticas y de MB+PURh como medio de selección es un sistema efectivo en el aislamiento de este tipo de bacterias.
2. Las bacterias aisladas a partir de poliuretano en deterioro poseen actividades enzimáticas (esterasa, proteasa o ureasa) que pueden estar relacionadas con la degradación de este polímero.
3. Las cepas 1 y 8, identificadas como *C. testosteronii* o *P. alcaligenes*, expresan una actividad enzimática extracelular de tipo esterasa inducible por la presencia de compuestos con enlaces éster como el Tween80[®] o el PS-PUR.
4. Al inicio del crecimiento, las cepas 1 y 8 utilizaron la N-metilpirrolidona presente en el Hydroform[®] como fuente de carbono.
5. El PS-PUR del Hydroform[®] es susceptible de sufrir degradación por acción de cepas bacterianas de la especie *C. testosteronii* o *P. alcaligenes* aisladas en este trabajo.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

10. ANEXO

10.1. FORMULACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

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

Composición por litro.

Solución A (10X)

KH_2PO_4 20.0 g

K_2HPO_4 70.0 g

Solución B (100X)

NH_4NO_3 100.0 g Ver nota.

$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.0 g

Solución elementos traza (1000X)

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g

$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.10 g

$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.0 g

$\text{MnSO}_4 \cdot 4-6\text{H}_2\text{O}$ 2.0 g

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

Preparación

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 0.2 μ).
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 llevar a un volumen final de un litro. En caso de adicionar Hydroform[®] como 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 MB esterilizar el agua con el equivalente a 1.5 % de concentración final de agar.

SOLUCIÓN DE Hydroform® 10X

El Hydroform®, que es un barniz comercial hidrosoluble producido por la compañía Polyform (No. de producto?), tiene una concentración de sólidos del 30%, por lo que se deberá diluir 1:100 para ajustar la concentración final del medio a 0.3%.

Procedimiento

Realizar una dilución 1:10 de Hydroform® en agua desionizada, con lo cual se obtiene una solución 10X de Hydroform® con 3% de sólidos.

Esterilización

1. Filtrar la solución 10X utilizando una membrana de fibra de vidrio Whatman GF/C sobre una membrana con poro de 0.45 µm. Esta filtración se realiza para eliminar los oligómeros que se forman debido a la polimerización espontánea del Hydroform® que pueden tapar por completo la membrana en la siguiente filtración.
2. Filtrar nuevamente en condiciones de esterilidad se emplea una membrana con poro de 0.22 µm (no se debe dejar pasar más de una hora entre la filtración anterior y ésta, para evitar nuevamente la formación de oligómeros).

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

MEDIO YES (Howard *et al.*, 1999)

Composición por litro.

Solución A

K ₂ HPO ₄	50	g
KH ₂ PO ₄	25	g

Solución B

MgSO ₄ • 7H ₂ O	50	g
---------------------------------------	----	---

Solución C

MnCl ₂ • 4H ₂ O	2.000	g
CuCl ₂ • 2H ₂ O	0.028	g
ZnCl ₂	0.022	g

CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.040 g
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.026 g
FeCl ₃ • 6H ₂ O	0.150 g

Preparación

Preparar y las soluciones B y C, filtrar y esterilizar. Guardar a temperatura ambiente. Preparar la solución A y diluirla 1:50 con agua destilada. Adicionar 0.4 g de NH₄Cl, 4.0 g de gelatina y 20 mg de extracto de levadura por litro y esterilizar. A un litro de la preparación de la solución A, adicionar 10 mL de solución B y 1 mL de solución C. Adicionar 15g/L de agar. El pH final debe ser 7.2.

MEDIO DE HIDRÓLISIS DE Tween80®

(<http://www.protocol-online.org/forums/index.php?showtopic=9068>)

Composición por litro.

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

Preparación

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

AGAR UREA DE CHRISTENSEN

(<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail?ProdNo=27048&Brand=FLUKA>)

Composición por litro.

Urea	20.0 g
------	--------

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

Preparación

Adicionar todos los componentes, excepto el agar, a 100 mL de agua deionizada, agitar hasta disolver y esterilizar por filtración (solución A). Aparte, adicionar el agar en 900 mL de agua deionizada y calentar a ebullición, agitando hasta disolver. Esterilizar en autoclave a 121 °C, durante 15 minutos. Enfriar a 50 °C y adicionar la solución A, en forma aséptica. Mezclar y distribuir en cajas.

11. BIBLIOGRAFÍA

- Allen AB, Hilliard N, Howard GT. 1999. Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans*. Int Biodetrior Biodeg, 43: 37-41.
- Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T. 1998. Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Comamonas acidovorans* TB-35. Appl Environ Microbiol, 64: 62-67.
- Carnye BF, Lothar K, Leary JV, Fotch DD. 1989. Identification of *Pseudomonas alcaligenes* chromosomal DNA in the plasmid DNA of the Clorobanzane-Degrading Recombinant *Pseudomonas putida* strain CB1-9. Appl Environ Microbiol, 55: 1037-1039.
- Carrillo-García, 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.
- Darby RT, Kaplan AM. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. Appl Microbiol, 16: 900-905.
- Farrel A, Quilty B. 2002. Substrate dependent autoaggregation of *Pseudomonas putida* CP1 during the degradation of mono-chlorophenols and phenol. J. Ind Microbiol Biotech, 28: 316 - 324
- Howard GT, Blake RC. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. Int Biodetrior Biodeg, 42: 213-220.
- Howard GT, Crother B, Vicknair J. 2001. Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas chlororaphis*. Int Biodetrior Biodeg, 47: 141-149.
- Howard GT, Hilliard NP. 1999. Use of Coomassie blue-polyurethane interaction in screening of polyurethanase proteins and polyurethanolytic bacteria. Int Biodetrior Biodeg, 43: 23-30.
- Ji- Dong Gu, Monsi R. 1997. The role of microbial biofilms in deterioration of space station candidate materials. Int Biodet Biodeg, 41(1): 25-33.
- Kay MJ, Morton LHG, Prince EL. 1991. Bacterial degradation of polyester polyurethane. Int Biodeterior, 27: 205-222.

- Marty JI, Khafif T, Danielle V, Bastide. 2002. Degradation of phenyl carbamate herbicides by *Pseudomonas alcaligenes* isolated from soil J Ind Microbiol Biotech, 28: 316 – 324.
- Morton LH, Prince EL. 1991. Bacterial degradation of polyester polyurethane. Int Biodeterior, 27: 205-222.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Akutsu Y, Nakahara T. 1997. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. J Ferm Bioeng, 83: 456-460.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. FEMS Microbiol Lett, 129: 39-42.
- Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara, T. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. Appl Microbiol Biotech, 51: 134-140.
- Noe FF, Nickerson WJ. 1958. Metabolism of 2-pyrrolidone and γ -aminobutyric acid by *Pseudomonas aeruginosa*. J Bacteriol, 75: 674-681.
- Nomura N, Shigeno-Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nakahara T. 1998. Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB35. J Ferm Bioeng, 86: 339-345.
- Pathirana RA, Seal KJ. 1983. A potential biodeteriogen of polyester-polyurethane elastomers. Int Biodeterior, 5: 679-689.
- Pérez-Lara F, 2005 Tesis de maestría Facultad de Química, UNAM. Síntesis y estudio de biodegradación de dos familias de poliuretanos de estructura conocida.
- Rowe L, Howard GT. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. Int Biodeterior Biodeg, 50: 33-40.
- Ruiz C, Howard GT. 1999. Nucleotide sequencing of a polyurethanase gene (*puIA*) from *Pseudomonas fluorescens*. Int Biodeterior Biodeg, 44: 127-131.

- Ruiz C, Main T, Hilliard NP, Howard GT. 1999. Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. Int Biodeterior Biodeg, 43: 43-47.
- Santerre JP, Labow RS, Duguay DG, Erfle D, Adams GA. 1994. Biodegradation evaluation of polyether and polyester-urethanes with oxidative and hydrolytic enzymes. J Biomed Mater Res, 28: 1187-1199.
- Shigeno-Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nomura N, Nakahara T. 1999. Purification and properties of culture-broth-secreted esterase from the polyurethane degrader *Comamonas acidovorans* TB-35. J Biosc Bioeng, 88: 484-487.
- Verstraete W, Bossier P. 1996. *Comamonas testosterini* colony phenotype influences exopolysaccharide production and coaggregation with yeas cells. Appl Environ Microbiol, 62: 2687-2691.

<http://www.bayermaterialsscience.com>

<http://www.emea.eu.int/pdfs/vet/mrls/045798en.pdf>

http://www.ine.gob.mx/ueajei/publicaciones/gacetitas/422/envases.html?id_pub

<http://www.protocol-online.org/forums/index.php?showtopic=9068>

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/search/ProductDetail?ProdNo=27048&Brand=FLUKA>