



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS
FACULTAD DE QUÍMICA**

Caracterización de la actividad de esterasa relacionada con la capacidad de una cepa bacteriana de crecer en poliuretano

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRO EN CIENCIAS**

PRESENTA:

ALEJANDRO OCEGUERA CERVANTES

Directora de Tesis:
DRA. HERMINIA DE JESÚS LOZA TAVERA
Facultad de Química, UNAM

Miembros del comité:

Dr. Luís Servín González Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Dr. Juan Pablo Pardo Vázquez Facultad de Medicina, UNAM

Ciudad Universitaria, Cd. Mx.

Febrero, 2019



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.

CARACTERIZACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE ESTERASA RELACIONADA CON LA CAPACIDAD DE UNA CEPA BACTERIANA DE CRECER EN POLIURETANO

RECONOCIMIENTOS

Este trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Herminia Loza Tavera en el laboratorio 105, del Departamento de Bioquímica, en el Conjunto E de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Se agradece la colaboración del 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.

A la Dra. Rosario A. Muñoz Clares del Departamento Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, por la asesoría y apoyo técnico brindados ya que una gran parte del trabajo de purificación de las proteínas de interés se llevó a cabo en su laboratorio.

Al M. en C. Carlos Mújica Jiménez por su asesoría y ayuda en el desarrollo del trabajo experimental para la purificación de las proteínas de interés.

Al Dr. Guillermo Mendoza (QEPD) de la Fac. de Medicina por llevar a cabo el análisis de LC-MS-MS para la identificación de las proteínas de interés.

Este proyecto contó con el financiamiento del Programa de Apoyo a la Investigación e Innovación Tecnológica de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico, UNAM (DGAPA-PAPIIT-UNAM IN 223317) y del Programa de Apoyo a la Investigación y el Posgrado, Facultad de Química, UNAM (PAIP-FQ-UNAM 5000-9117). Durante mis estudios de maestría gocé de una beca otorgada por CONACYT (205352) y con el apoyo económico por parte del Programa de Apoyo a los Estudios de Posgrado (PAEP-UNAM) para la asistencia a un congreso nacional.

El Jurado de Examen de Maestría estuvo constituido por:

Presidente	Dra. Rosario Adelaida Muñoz Clares	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dra. Amelia María de Guadalupe Farrés González Sarabia	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Luís Servín González	Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM
Vocal	Dra. María Del Carmen Wachter Rodarte	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dr. Francisco Ruiz Terán	Facultad de Química, UNAM

Índice

Contenido

Índice de tablas y figuras

Abreviaturas

1. Resumen	1
2. Antecedentes	2
2.1. Poliuretano	2
2.2. Polímeros biodegradables	4
2.3. Degradación microbiana de poliuretano	5
2.4. Actividades enzimáticas asociadas a la degradación de poliuretano	8
3. Hipótesis	11
4. Objetivos	12
5. Estrategia experimental	13
6. Materiales y métodos	14
6.1. Identificación por secuenciación de rDNA 16S	14
6.2. Caracterización del crecimiento bacteriano a largo plazo	15
6.3. Determinación de los efectos bacterianos sobre Hydroform sólido	16
6.4. Detección de la actividad de esterasa asociada a membrana y selección del detergente adecuado para su extracción	16
6.5. Medición de la actividad de esterasa asociada a membrana durante el crecimiento en MM-PUh	17
6.6. Detección de la actividad de esterasa por zimografía	17
6.7. Purificación de la actividad de esterasa asociada a membrana, a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh, al 8.3% de Hydroform	18
6.8. Identificación de la proteína con actividad esterasa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 8.3% de Hydroform	19
6.9. Exposición de láminas de Hydroform sólido a la actividad de esterasa de bacterias cultivadas en MM-PUh al 8.3% (v/v) de Hydroform	20
6.10. Purificación de la actividad de esterasa asociada a membrana, a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh, al 1% de Hydroform	20
6.11. Determinación del efecto sobre Hydroform sólido de la esterasa de 55 kDa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 1% de Hydroform	22
7. Resultados	23
7.1. Identificación de las bacterias BQ1 y BQ8	23
7.2. Caracterización del crecimiento a largo plazo	24
7.3. Determinación de parámetros de crecimiento en MM-PUh	26

7.4. Determinación de los efectos bacterianos sobre Hydroform sólido	27
7.5. Detección de la actividad de esterasa asociada a membrana y selección del detergente adecuado para su extracción	28
7.6. Medición de la actividad de esterasa asociada a membrana durante el crecimiento en MM-PUh	30
7.7. Detección de la actividad esterasa por zimografía	32
7.8. Purificación de la actividad de esterasa asociada a membrana, de bacterias cultivadas en Hydroform 8.3%	33
7.9. Identificación de la actividad de esterasa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 8.3% de Hydroform	34
7.10. Determinación de los efectos bacterianos y enzimáticos sobre Hydroform sólido en MM-PUh al 8.3%	35
7.11. Purificación de la actividad de esterasa asociada a membrana, a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh, al 1% de Hydroform	35
7.12. Efecto de la esterasa de 50 kDa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 1% de Hydroform sobre láminas de Hydroform sólido	40
Datos publicados	
8. Discusión	41
8.1. Identificación por secuenciación de rDNA 16S	41
8.2. Caracterización del crecimiento a largo plazo	41
8.3. Determinación de parámetros de crecimiento en MM-PUh	42
8.4. Determinación de los efectos bacterianos sobre Hydroform sólido	43
8.5. Detección de la actividad de esterasa asociada a membrana y selección del detergente adecuado para su extracción	43
8.6. Medición de la actividad esterasa asociada a membrana durante el crecimiento en MM-PUh	44
8.7. Detección de la actividad esterasa por zimografía	44
8.8. Purificación de la actividad esterasa asociada a membrana, a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh, al 8.3% de Hydroform	45
8.9. Identificación de la actividad esterasa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 8.3% de Hydroform	46
8.10. Exposición de Hydroform sólido a la actividad de esterasa de bacterias cultivadas en MM-PUh al 8.3% de Hydroform	47
8.11. Purificación de la actividad esterasa asociada a membrana a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 1% de Hydroform	47
8.12. Determinación del efecto sobre Hydroform sólido de la esterasa de 55 kDa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 1% de Hydroform	48
9. Conclusiones	49
10. Anexos	50

Índice de tablas y figuras

- Figura 1. Cinética de crecimiento durante cinco días de incubación.
- Figura 2. Dependencia del crecimiento de *Alicyclophilus* sp. de la concentración de Hydroform.
- Figura 3. Micrografía electrónica de Hydroform sólido incubado en MM-PUh sin inocular (a), inoculado con BQ1 (b) y con BQ8 (c).
- Figura 4. Actividad de esterasa asociada a membrana extraída con ocho detergentes diferentes.
- Figura 5. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie del extracto proteico obtenido con cada detergente.
- Figura 6. Crecimiento y actividad enzimática de BQ1 y BQ8.
- Figura 7. Zimograma de la actividad de esterasa asociada a membrana a lo largo del tiempo de cultivo, Cepa BQ1 (a) y BQ8 (b).
- Figura 8. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (izquierdo) y previamente revelado con MUF-Butirato para la detección de actividad de esterasa (derecho).
- Figura 9. SDS-PAGE y zimograma específico para actividad de esterasa de las fracciones obtenidas de la cromatografía en Phenyl Sepharose.
- Figura 10. SDS-PAGE y zimograma específico para actividad de esterasa de las fracciones obtenidas de la cromatografía en Q-fastflow.
- Figura 11. Cromatograma de la elución en MonoQ-10/10.
- Figura 12. SDS-PAGE teñido con plata y zimograma específico para actividad de esterasa de las fracciones eluidas de la cromatografía de MonoQ a) BQ1 y b) BQ).
- Figura 13. Micrografía electrónica de Hydroform sólido incubado con la esterasa purificada de BQ1 y BQ8.
- Tabla 1. Bacterias capaces de degradar poliéster-poliuretano (PS-PU) y actividades relacionadas con esta capacidad.
- Tabla 2. Purificación de las esterases asociadas a membrana de las cepas BQ1 y BQ8 cultivadas en MM-PUh con 8.3% de Hydroform.
- Tabla 3. Purificación de las esterases asociadas a membrana de de BQ1 y BQ8 cultivada en MM-PUh con 1% de Hydroform.

Abreviaturas

Abs.	Absorbancia
CMC	Concentración miscelar crítica
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
HDI	Diisocianato de hexano
IR	Infrarrojo
LB	Luria Bertani
LC-MS-MS	Cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem
MDI	4,4-metilen-bis-(fenildiisocianato)
MM-PUh	Medio Mínimo con Hydroform como única fuente de carbono
MUF-butyrate	butirato de metil umbeliferona
NMP	N-metil-2-pirrolidona
PFF	proteína de la Familia de las Fasinas
PHA	polihidroxialcanoatos
PHB	polihidroxibutirato
p-NP	paranitrofenol
p-NPA	paranitrofenilacetato
PU	Poliuretano
PU-PE	Poliuretano poliéter
PU-PS	Poliuretano poliéster
PUR	Poliuretano rígido
SEM	Microscopía electrónica de barrido
SN	Sobrenadante
TDI	Diisocianato de tolueno
UV	Ultravioleta

1. RESUMEN

El poliuretano (PU) es un polímero artificial desarrollado en 1937, que hasta el día de hoy es ampliamente utilizado en la fabricación de accesorios para la industria automotriz, materiales de construcción y muchos otros sectores industriales. La producción masiva de PU ha traído consigo la generación de grandes cantidades de desechos para los cuales no existen métodos eficientes de reciclaje o eliminación. Una alternativa para solucionar este problema es la implementación de métodos de biodegradación, que son llevados a cabo por organismos vivos o sus enzimas. En este sentido, un primer paso en el desarrollo de estos procesos es la identificación y caracterización de los microorganismos capaces de utilizar el PU como fuente de carbono y/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 proceso de degradación.

En este trabajo se realizó la caracterización del crecimiento de dos cepas bacterianas (BQ1 y BQ8) capaces de crecer en PU, así como de las actividades enzimáticas relacionadas con dicha capacidad. La secuenciación del gen del rDNA 16S de estas cepas indicó que ambas pertenecen al género *Alicyclophilus*.

La búsqueda de posibles actividades de esterasa asociadas a la membrana externa reveló que estas cepas bacterianas producen dos proteínas con actividades esterasa diferentes, dependiendo de la concentración de PU en el medio de cultivo. La primer actividad purificada e identificada es una esterasa de 19 kDa que se encuentra cuando se cultivan en Hydroform al 8.3%; dicha enzima ha sido identificada por cromatografía de líquidos acoplada a espectrometría de masas en tándem (LC-MS-MS) como una proteína de la familia de las fasinas. La segunda enzima purificada es una esterasa de 55 kDa que se encuentra cuando se cultiva en 1% de Hydroform. Las pruebas de degradación *in vitro* realizadas mostraron que solo la actividad de 55 kDa es capaz de generar cambios en la superficie de PU sólido.

2. ANTECEDENTES

2.1. Poliuretano

El desarrollo tecnológico del siglo XX trajo consigo el inicio de tendencias nuevas que cambiarían por completo el ritmo y la forma de la vida humana. Dentro de estos grandes avances destaca la invención del poliuretano (PU). Otto Bayer (1902-1982) desarrolló el proceso de polimerización de polioles con diisocianatos para formar PU. La idea básica fue documentada en marzo de 1937 y está relacionada con la ramificación de productos hechos de 1,6-diisocianato de hexano (HDI) registrado en la patente alemana DRP-728981 como "Un proceso para la producción de poliuretanos y poliureas" en noviembre de 1937. El PU es un polímero que se sintetiza mediante la reacción de condensación entre los grupos oxhidrilo de moléculas de polioles y el grupo isocianato de moléculas de diisocianatos generando enlaces carbamato (uretano). Los polioles empleados pueden ser de dos tipos: polioliol-poliéster o polioliol-poliéter, generando poliuretanos poliéster (PU-PS) o poliuretanos poliéter (PU-PE).

Los usos que tienen los diferentes tipos de PU varían de acuerdo a las características físicas que poseen, las cuales dependen de las materias primas que se emplean y las condiciones a las que se lleva a cabo el proceso de síntesis. La producción de polímeros de uretano de alto peso molecular a partir de monómeros líquidos transcurre generalmente a temperatura ambiente, dando lugar a productos que van desde redes entrecruzadas hasta fibras lineales y elastómeros (Kirk-Othmer, 1987). Dentro de la gama de PUs se encuentran los de baja densidad, que se emplean como "esponjas" y materiales amortiguadores; de alta densidad, que se utilizan en el campo de la construcción; y líquidos, principalmente usados como pinturas y recubrimientos. El PU de baja densidad se obtiene generando dióxido de carbono durante el proceso de síntesis mediante la adición de agua, que reacciona con parte del diisocianato. Mientras que el PU de alta densidad se obtiene empleando diisocianatos con grupos aromáticos o polioles ramificados (Kirk-Othmer, 1987). La versatilidad del PU ha tenido un gran impacto a nivel mundial, ya que en muchos casos se ha logrado sustituir la madera o el metal por PUs fácilmente moldeables y de bajo costo, propiciando un uso más eficiente y moderado de los recursos naturales.

A pesar de las ventajas ambientales mencionadas, la generación de este tipo de materiales que facilitan la vida humana trae consigo nuevas complicaciones, ya que en términos de la generación de desechos la mayoría del PU no se recicla y mucho menos se destruye a corto plazo. Esto es un aspecto preocupante dada la contaminación que el PU genera, ya que tan solo en los últimos años su demanda ha aumentado de 35 a 38 millones de toneladas en 2015 y 2016, respectivamente (PlasticsEurope 2017-2018).

Para enfrentar este problema, se han desarrollado métodos de reciclado químico o quimiólisis, mediante los cuales el PU de alto peso molecular es degradado a sus componentes químicos, obteniéndose materiales que pueden ser re-usados para fabricar PU nuevo con las propiedades y funcionalidad del original (Stone *et al.*, 2000; Neuray *et al.*, 2000). Entre estos métodos está la hidrólisis, en el que la espuma de PU se hace reaccionar con agua bajo presión y temperatura elevadas. Este proceso genera los polioles originales junto con diaminas. Posteriormente, estos componentes son separados para permitir su reprocesamiento y reuso. Los polioles también pueden ser usados como combustibles y las aminas para producir otras materias primas para producción de PU (You *et al.*, 1997). La pirólisis emplea un ambiente libre de oxígeno a altas temperaturas para degradar el PU y otros plásticos en gases, aceites y sólidos. Hidrogenación es un proceso de pirólisis mejorado que permite la obtención de gases puros y aceites a través de una combinación de calor, presión e hidrógeno. Este método requiere resolver dos aspectos importantes: la pureza de los gases y aceites derivados de la pirólisis e hidrogenación y los costos asociados al proceso de los productos finales funcionales (Weigand *et al.*, 1993). Otras aplicaciones incluyen la obtención de PU en hojuelas para su uso en derrames químicos, o la glicólisis, que es la reacción de PU con dioles o con 4,4-metilen-bis-(fenildiisocianato) (MDI) a temperaturas por arriba de 200 °C, reacción para la producción de materiales de recubrimiento (Stone *et al.*, 1995; Naber *et al.*, 1995).

Dadas las ventajas que brinda el PU a la vida humana y el problema de la disposición de los desechos que genera, se han buscado soluciones que procuren un equilibrio entre los costos y los beneficios que el PU aporta. Dentro de las

alternativas que se han explorado están la producción de PUs biodegradables y la biodegradación de los existentes. Ambas son estrategias que no sustituyen una a la otra, ni a las tecnologías ya existentes para el reciclado del PU y que deben ser contempladas como paralelas, dado que el estudio de la biodegradación de los PUs existentes puede dar una visión clara de los mecanismos a emplear en el proceso de fabricación de los nuevos (Kroesen *et al.*, 1992). Intentos recientes por generar PU biodegradable contrastan con aquellos orientados a obtener materiales con menor vulnerabilidad a la biodegradación y aunque el fin es distinto, los estudios han ayudado a determinar algunos procesos relacionados con la biodegradación de un material inicialmente considerado no biodegradable (Lee *et al.*, 2002; Anderson *et al.*, 1998).

2.2. Polímeros biodegradables

Los polihidroxicanoatos (PHA) son poliésteres biodegradables que poseen propiedades termo-plásticas similares a las de los plásticos comerciales, por lo que han atraído considerablemente el interés académico e industrial durante las últimas dos décadas (Madison y Huisman, 1999). Estos plásticos son sintetizados por diversas bacterias como una estrategia de almacenamiento de nutrientes (Cornibert y Marchessault. 1975), estas bacterias transforman dichos nutrientes solubles en polímeros que son insolubles, evitando el exceso de agua intracelular manteniendo así la presión osmótica (Jendrosseck, 2002). El PHA producido por la mayoría de bacterias es el poli-(3-hidroxibutirato) (PHB), que actualmente se comercializa bajo la marca de BIOPOL. Además de éste, se han identificado alrededor de 150 ácidos hidroalcanoicos diferentes como constituyentes de los PHA (Kim y Lenz, 2001; Steinbüchel y Hein; 2001).

Los PHA forman gránulos dentro de la célula bacteriana, la cual emplea un sistema conformado de tres tipos de proteínas para su utilización: una polimerasa que emplea hidroxiacidos de bajo peso molecular como sustratos para la formación de poliésteres (Qun-Ren *et al.*, 2005); un grupo de proteínas de la familia de las fasinas (PFF), que presentan diferentes funciones, y una PHA-despolimerasa con actividad esterasa de tipo serina-hidrolasa, capaz de degradar poliésteres, la cual se encarga de la degradación del gránulo (Shimao, 2001).

Las PFF son proteínas de baja masa molecular que participan en la síntesis de PHA (Pieper-Fürst *et al.*, 1995; Steinbüchel *et al.*, 1995; Wieczorek *et al.*, 1995). Se han propuesto tres mecanismos de acción diferentes para las PFF. Primero, pueden promover la producción de PHA mediante su unión a los gránulos, aumentando su tamaño. Segundo, pueden incrementar la tasa de síntesis de PHA por la interacción directa con la polimerasa de PHA (Wieczorek *et al.*, 1995). Tercero, pueden promover la síntesis de PHA indirectamente previniendo defectos de crecimiento asociados con la unión de otras proteínas celulares a los gránulos (Maehara *et al.*, 1999). También han sido propuestas como proteínas de almacenamiento (McCool y Cannon, 1999), un papel que también podría afectar la síntesis de PHA.

En los estudios acerca de la despolimerización de PHA se ha encontrado que existe degradación intra- y extracelular (Jendrossek, 2002). La degradación intracelular se refiere a la movilización (hidrólisis) del polímero por la misma bacteria. En el caso de la degradación extracelular, el PHA es utilizado por medio de PHA-despolimerasas extracelulares que son secretadas por los microorganismos degradadores de PHA, empleando como fuente de PHA los gránulos que liberan las células muertas (Mayer *et al.*, 1996, Steinbüchel *et al.*, 1995).

2.3. Degradación microbiana de poliuretano

Aunque de manera general los plásticos no son biodegradables han aparecido trabajos que reportan la biodegradación de PU describiendo una mayor susceptibilidad de los PU-PS que de los PU-PE (Darby y Kaplan, 1968). Esta vulnerabilidad de los PU-PS al ataque microbiano está relacionada con la capacidad de algunos microorganismos para degradar poliésteres naturales como los PHA (Jendrossek, 2002) o diversos substratos con grupos éster.

En nuestro laboratorio se inició un proyecto en el que se planteó estudiar los mecanismos bioquímicos y moleculares involucrados en la biodegradación del PU. Inicialmente, Carrillo-García (2004) logró aislar dos cepas bacterianas del género *Acinetobacter* sp. capaces de crecer en un medio mineral con un barniz de PU-PS (Hydroform) como única fuente de carbono (MM-PUh). Estas cepas

presentaron actividad esterasa, detectable cuando las bacterias se cultivaron en sustratos con enlaces éster como el barniz Hydroform o en Tween 80.

Posteriormente, se aislaron y caracterizaron otras ocho cepas bacterianas utilizando el mismo medio, MM-PUh (Oceguera-Cervantes, 2005). La identificación por pruebas bioquímicas indicó que cuatro de estas cepas pertenecían a la especie *Ochrobactrum anthropi*, tres a la especie *Comamonas testosteroni* o *Pseudomonas alcaligenes* (cepas 1, 5 y 8) y una al género *Pseudomonas* (cepa 7). A pesar de que algunas cepas fueron identificadas como de una misma especie, éstas mostraron diferentes morfologías.

Empleando medios de cultivo diferenciales se determinaron los tipos de actividad(es) enzimática(s) que pudieran estar relacionadas con la degradación de PU. Estas pruebas indicaron que las cepas de la especie *O. anthropi* poseen actividad de ureasa, las de la especie *C. testosteroni* o *P. alcaligenes* presentaron actividad de esterasa y la cepa *Pseudomonas sp.* esterasa y proteasa (Oceguera-Cervantes, 2005).

Las cepas de *C. testosteroni* o *P. alcaligenes* presentaron un crecimiento diez veces más alto en MM-PUh que las otras cepas aisladas, por lo que se continuó con su estudio. Las cepas 1 y 8 presentaron actividad esterasa en el sobrenadante del medio de cultivo después de 10 h de incubación en MM-PUh, mientras que la cepa 5 no presentó actividad en el sobrenadante. El efecto que producen las cepas 1 y 8 sobre el Hydroform se determinó después de cinco días de incubación. Un análisis por cromatografía de gases- espectrometría de masas (GC-MS) mostró que en las primeras horas de cultivo ambas cepas consumen *N*-metilpirrolidona (NMP), compuesto presente en el Hydroform. Por análisis de infrarrojo (IR) del sólido residual de Hydroform, se determinó que la cepa 1 es capaz de hidrolizar los enlaces éster del PU mientras que la cepa 8 no produce cambios detectables por este método.

Al respecto de la biodegradación de PU, existe una gran cantidad de reportes acerca de diversas bacterias y hongos que tienen la capacidad de degradar PU. La Tabla 1 muestra algunos de los reportes de bacterias capaces de atacar al PU y las actividades enzimáticas relacionadas con su degradación.

Tabla 1. Bacterias capaces de degradar poliéster-poliuretano (PS-PU) y actividades relacionadas con esta capacidad.

Bacteria	Actividad enzimática identificada	Referencia
<i>Corynebacterium</i> sp	Esterasa	Kay <i>et al.</i> , 1991
<i>Comamonas acidovorans</i> TB35	Esterasa (asociada a membrana)	Akutz <i>et al.</i> , 1998
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Esterasa, proteasa	Ruiz <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Esterasa, Proteasa	Ruiz <i>et al.</i> , 1999
<i>Comamonas acidovorans</i> TB35	Esterasa (extracelular)	Akutz <i>et al.</i> , 1998; Allen <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	Esterasa y proteasa	Rowe <i>et al.</i> , 2002
<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	Esterasa y proteasa	Teeraphatpornchai <i>et al.</i> , 2003
<i>Rhodococcus equi</i> TB-60	Ureanasa	Akutz <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus pumilus</i>	Lipasa	Nair <i>et al.</i> , 2007
<i>Arthrobacter</i> sp. AF11 y <i>Corynebacterium</i> sp.	Esterasa	Shah <i>et al.</i> , 2007
<i>Alicyclophillus</i> sp. BQ1	Esterasa	Oceguera-Cervantes <i>et al.</i> , 2007
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Esterasa	Mukherjee <i>et al.</i> , 2010
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> MZA-85	Esterasa	Shah <i>et al.</i> , 2013
<i>Pseudomonas putida</i>	Esterasa	Peng <i>et al.</i> 2014
<i>Bacillus safensis</i>	Esterasa	Nakkabi <i>et al.</i> , 2015
<i>Pseudomonas protegens</i> Pf-5	Esterasa	Hung <i>et al.</i> , 2016

2.4. Actividades enzimáticas asociadas a la degradación de poliuretano

El proceso de degradación microbiana de PU puede ser analizado desde dos puntos de vista: la degradación de los enlaces uretano y la degradación de los segmentos poliol. Sin embargo, la degradación del poliol depende de la estructura química de los segmentos de éste, ya sea de tipo poliéster o poliéter (Darby y Kaplan 1968). Dada la estructura del PS-PU, se ha propuesto que las actividades enzimáticas que podrían actuar sobre los diferentes enlaces del PU serían de tipo proteasa, ureasa y esterasa (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999). La hidrólisis del enlace uretano se debe a una enzima de tipo esterasa, pero esta hidrólisis sólo es observada en componentes de baja masa molecular y aunque existen reportes de degradación de enlaces uretano en PU, no es claro si éstos son hidrolizados cuando aún forman parte del polímero o sobre compuestos de bajo peso molecular generados por un paso de hidrólisis previo sobre la fracción del poliol (Matzumura *et al.*, 1985; Marty y Vouges 1987; Pohlenz *et al.*, 1992; Owen *et al.*, 1996; Ohshiro *et al.*, 1997).

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

Santerre *et al.* (1994) describieron a partir de un estudio de mejoramiento de poliuretano con fines médicos, que enzimas hidrolíticas tales como la papaína o la colesterol-esterasa eran capaces de atacar al PU *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* y posteriormente Ruiz y Howard (1999) describieron sus características a partir de la enzima purificada. Más tarde Ruiz *et al.* (1999) reportan una actividad proteasa en *P. chlororaphis*, aunque no se ha descrito su purificación. Pathirana y Seal (1983) detectaron actividades de tipo ureasa presentes en la degradación de PU por hongos. Akutsu-

Shigeno y colaboradores (2006) demostraron que existen enzimas con actividad amidasa/esterasa con capacidad de hidrolizar enlaces uretano en compuestos de bajo peso molecular como tolueno-2,4-ácido carbámico dibutil éster, diamino tolueno. Un estudio posterior demostró que también este tipo de enzimas fúngicas son capaces de degradar el PU, pero hasta ahora no se ha reportado su purificación (Santerre *et al.*, 1994).

Debido a que la proporción de enlaces de tipo éster es de un millón por cada enlace de tipo uretano en el PU-PS, algunos autores han nombrado a la fracción poliéster del PU-PS "la fracción suave". Dado que el enlace éster es el sustrato específico de las estererasas, es más frecuente encontrar microorganismos productores de estererasas con capacidad degradadora de PU que microorganismos que producen proteasas y/o ureasas que ataquen los enlaces uretano.

Se ha reportado la purificación de dos actividades enzimáticas de tipo esterasa provenientes de *Comamonas acidovorans* TB35 (Shigeno-Akutsu *et al.*, 1999): una extracelular y otra asociada a la membrana. Se ha demostrado la capacidad de la enzima asociada a membrana de hidrolizar los enlaces éster presentes en el PU-PS, incluso cuando la enzima se produce de manera recombinante. La pérdida de peso de cubos de PU-PS incubados con la enzima de membrana, fue diez veces mayor (1.3 mg) que la generada con la enzima extracelular (0.1 mg) (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999). Se ha determinado que ambas enzimas atacan la porción éster del PU. Sin embargo, la esterasa unida a la membrana es capaz de atacar los enlaces éster dentro de la molécula de PU, mientras que la esterasa extracelular ataca los enlaces éster de la materia prima en la molécula de poli-adipato de polietilenglicol, y en menor proporción cuando éste se ha polimerizado (Akutsu *et al.*, 1998). Al clonar el gen que codifica a la enzima asociada a membrana y expresar la proteína recombinante en *Escherichia coli* se observó también la presencia de la enzima extracelular, lo cual indica que ambas enzimas provienen del mismo gen, sólo que la extracelular se libera al medio de cultivo debido a alguna modificación postraducciona desconocida aún (Shigeno-Akutsu *et al.*, 1999).

También se ha reportado la purificación de una esterasa y una proteasa extracelulares de *P. chlororaphis* (Ruiz *et al.*, 1999), una lipasa extracelular de

Bacillus subtilis (Rowe y Howard, 2002), una proteasa de *P. fluorescens* (Howard y Blake, 1998) y una esterasa de *C. acidovorans* (Allen *et al.*, 1999). Cada una de estas actividades se clasificó como poliuretanasas ya que, al incubar las preparaciones enzimáticas en una placa con medio sólido que contenía el barniz Impranol DLN (dispersión acuosa de PS-PU), se observó un halo claro alrededor de la zona donde se depositó la enzima, cuando la placa se teñía con azul de Coomassie lo cual implica la degradación del PU.

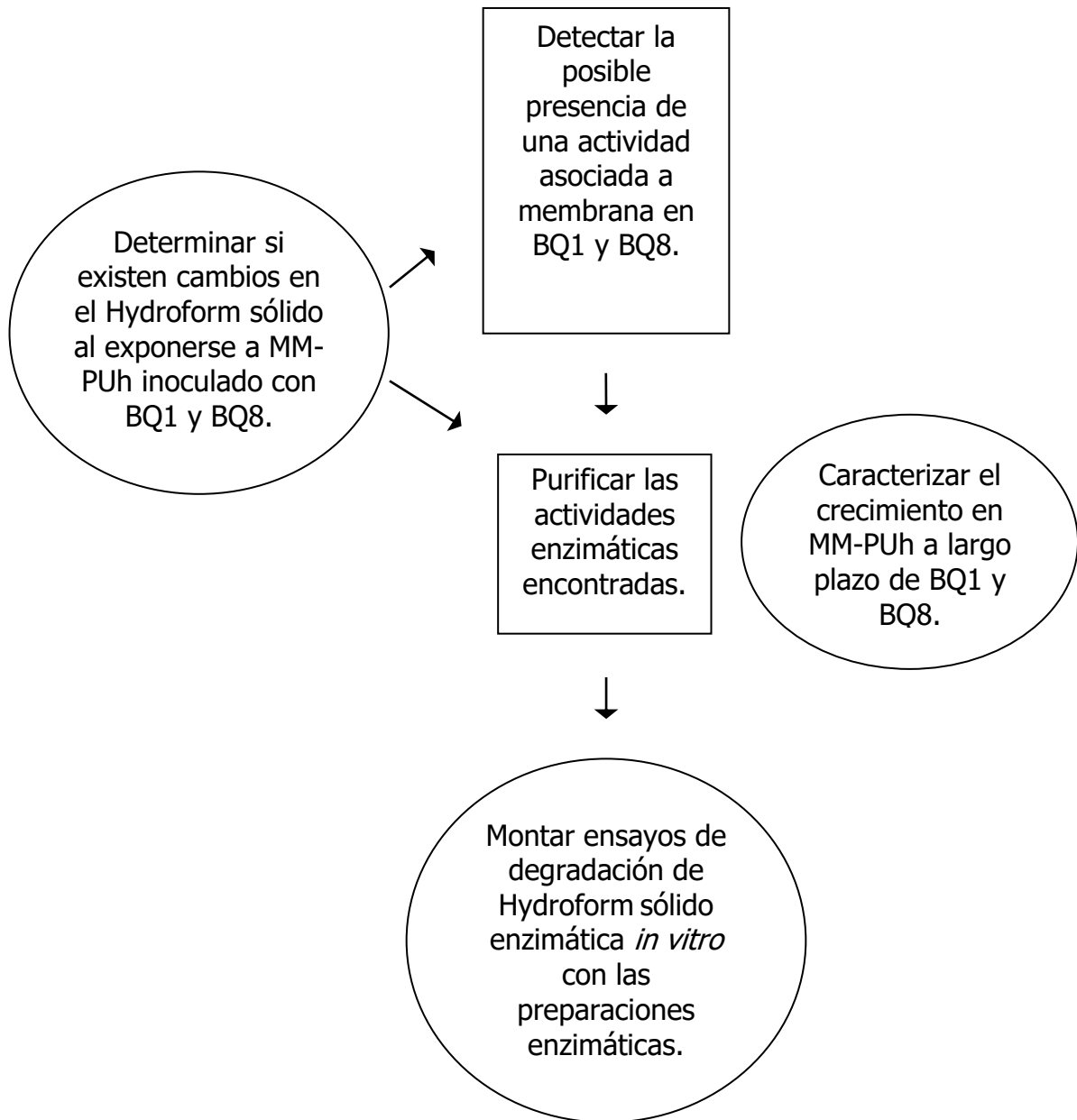
3. HIPÓTESIS

Dado que las cepas bacterianas BQ1 y BQ8 son capaces de crecer en un medio mineral con un barniz de PU poliéster (Hydroform) (MM-PUh) como única fuente de carbono, generar cambios en las propiedades del poliuretano y expresar una actividad de esterasa en presencia del mismo, se propone que esta actividad está relacionada con la degradación del PU.

4. OBJETIVOS

- Identificar por técnicas moleculares, la especie a la que pertenecen las cepas BQ1 y BQ8.
- Caracterizar el crecimiento de BQ1 y BQ8 a largo plazo en MM-PUh.
- Determinar el efecto que tiene el crecimiento de las cepas BQ1 y BQ8 sobre Hydroform sólido.
- Detectar la posible presencia de una actividad esterasa asociada a la membrana, en ambas cepas.
- Purificar las actividades enzimáticas de tipo esterasa encontradas.
- Determinar el efecto que tienen las actividades esterasa purificadas sobre Hydroform sólido *in vitro*.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Identificación por secuenciación de rDNA 16S

Se aisló el DNA cromosomal de las cepas bacterianas BQ1 y BQ8 empleando el siguiente método. Cada una de las cepas se sembró en una caja Petri con medio Luria Bertani (LB) (Anexo). Después de incubarlas durante 48 h a 37 °C, se tomó una muestra de bacterias del tamaño de un grano de arroz y se depositó en un tubo con 500 µL de amortiguador Tris-EDTA (TE) estéril (Anexo). Se adicionaron 20 µL de solución de lisozima (L7001 Sigma-Aldrich) [20 µg·µL⁻¹] y se incubó a 37 °C durante 15 min. Se adicionaron 8 µL de solución de proteinasa K (P2308-25MG Sigma-Aldrich) [10 µg·µL⁻¹] y 16 µL de RNAasa (10109169001 Roche Applied Science) [10 µg·µL⁻¹]. Los tubos se agitaron y se incubaron a 65 °C durante 1 h. Se adicionaron 120 µL de solución SDS al 10% (p/v) y se incubó nuevamente a 65 °C durante 10 min. Se dejaron enfriar las muestras a temperatura ambiente, se les adicionaron 600 µL de mezcla de fenol-cloroformo (25:24) y se agitaron vigorosamente hasta obtener una emulsión. Se centrifugaron a 20,800 x *g* durante 10 min, obteniéndose tres fases. Se recuperó la fase superior (fase acuosa) y se colocó en un tubo nuevo. A ésta 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 y el precipitado se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez seco, se resuspendió en 50 µL de agua desionizada estéril y se congeló a -20 °C (Lawson, 1993).

Debido a que las preparaciones de DNA obtenidas presentaron contaminación por polisacáridos, se adaptaron los siguientes pasos al método anterior. Después de la incubación con SDS al 10% se ajustó el volumen a 600 µL con amortiguador TE y se adicionaron 110.7 µL de NaCl 5 M y 88.5 µL de solución de bromuro de cetil trimetil amonio (CTAB)/NaCl [10% (p/v)/0.7 M], se agitó y se incubó a 65 °C por 10 min (Ausubel, 1994). Terminada la incubación se continuó con el paso de adición de fenol-cloroformo, siguiendo con el protocolo original. Para comprobar la pureza del DNA extraído se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% (p/v) y se determinó la relación de Absorbancia $(Abs)_{260nm}/(Abs)_{280nm}$ y $(Abs)_{260nm}/(Abs)_{230nm}$. Se determinó su concentración considerando que una unidad de $(Abs)_{260nm}$ equivale a 50 µg·mL⁻¹ de DNA.

El DNA obtenido se utilizó para realizar la amplificación por PCR de un fragmento del gen del rDNA 16S (correspondiente a la posición 750 del gen de *E. coli*), usando los cebadores cercanos a los extremos 3' y 5' de dicho fragmento pA (5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3') y pH (5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3') respectivamente. Se secuenció directamente una cadena del producto de este PCR utilizando un secuenciador automático de DNA (ABI Prism 3100 genetic analyzer; Foster City, CA) y empleando los cebadores gamma (5'ACTGCTGCCTCCCGTAGGAG3'), pD* (5'GTATTACCGCGGCTGCTG3'), ANTIgamma (5'CTCCTACGGGAGGCAGCAGT3') y ANTIKK (5'CGTGCCAGCAGCCGCGGTAAT3'). La identificación se basó en la comparación de las secuencias obtenidas con las secuencias parciales de este gen reportadas en el GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), empleando el algoritmo BLAST. Las secuencias se alinearon usando el editor de alineamiento de secuencias BioEdit y se revisaron visualmente. Este análisis fue llevado a cabo por la estudiante de doctorado Sandra Bolaños bajo la dirección de la Dra. Carmen Wachter, del Departamento de Alimentos, Facultad de Química, UNAM.

6.2. Caracterización del crecimiento bacteriano a largo plazo

Se inoculó una colonia en 5 mL de medio LB y se incubó durante 12 h a 37 °C y 200 rpm. Concluido este tiempo, se midió la densidad óptica a 660 nm (DO_{660nm}) del cultivo y se re-inoculó en 5 mL de medio LB con una DO_{660nm} inicial de 0.1. Este cultivo se incubó a 37 °C y 200 rpm hasta llegar a un valor de DO_{660nm} de 0.8. Una vez alcanzada esta condición se re-inoculó en 50 mL de medio mínimo al 1% (10.5 mg·mL) (que equivale a 0.3% de sólidos) de Hydroform como única fuente de carbono (MM-PUh) (Anexo), a una DO_{660nm} inicial de 0.02. Hydroform es un barniz de PU base agua con 30% de sólidos (p/v), que se usa para el recubrimiento de superficies de madera.

Para la cuantificación del crecimiento bacteriano se prepararon cultivos en MM-PUh por triplicado y se les midió la DO_{660nm} durante cinco días. Se observó que a partir de las 16 h de incubación ocurrió un cambio en la morfología del cultivo ya que las células se agregaron, por lo que el valor de DO_{660nm} disminuyó hasta cero transcurridos cuatro días. Por lo tanto, fue necesario determinar el crecimiento por cuantificación del peso húmedo durante cinco días de incubación.

Para ello se prepararon 200 mL de MM-PUh en las condiciones mencionadas anteriormente. El cultivo se repartió en 30 tubos de ensayo de 16 x 150 mm, colocando 5 mL de MM-PUh inoculado en cada tubo. Los tubos se mantuvieron en incubación a 37 °C y 200 rpm durante seis días, tiempo durante el cual se midió el peso húmedo cada 6 y 12 h. La medición se realizó centrifugando el contenido de cada tubo a 5,000 x *g* durante 5 min, se eliminó el sobrenadante y se midió el peso de la pastilla formada. Cada medición se realizó por triplicado. Los parámetros del crecimiento en Hydroform (μ y K_s) de BQ1 y BQ8 se determinaron variando la concentración del mismo en MM-PUh de 10.5 a 105 mg·mL⁻¹. Para la construcción del gráfico de Monod, se emplearon los valores de peso húmedo medido en la fase exponencial de crecimiento (0 a 12 h de incubación).

6.3. Determinación de los efectos bacterianos sobre Hydroform sólido

Se prepararon láminas de Hydroform colocando una capa de 3 mm de éste en una caja Petri y se secó en estufa a 65 °C durante 3 días. Una vez que estuvo completamente seco se formó una película sólida de aproximadamente 1 mm de espesor que se cortó en láminas de 1 x 2 cm. Se adicionaron cinco láminas a MM-PUh inoculado con cada una de las cepas y a un matraz con medio sin inocular. Estos matraces se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 15 días. Transcurrido dicho tiempo, se recuperaron las láminas, se lavaron con agua desionizada y se analizaron por microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un microscopio JEOL 5900 LB a 500 aumentos.

6.4. Detección de la actividad de esterasa asociada a membrana y selección del detergente adecuado para su extracción

A partir de cultivos con 16 h de incubación se obtuvieron células por centrifugación a 5000 x *g* durante 5 min. Se colocaron 50 mg de células en un tubo Eppendorff y se resuspendieron en 1 mL de solución amortiguadora de fosfatos 20 mM, pH 7 con una cantidad de veinte veces la concentración miscelar crítica (CMC) de cada detergente utilizado. Se agitó vigorosamente durante 1 h, se centrifugó a 20,800 x *g* durante 10 min y se midió actividad de esterasa en el sobrenadante, empleando el método del para-nitrofenilacetato (*p*-NPA) (Anexo) (Desphande *et al.*, 1984) (todos los pasos de extracción se realizaron a 4 °C). Los detergentes utilizados y sus concentraciones (% p/v) fueron: Zwittergent 3-12

(0.22), Octil- α -D-glucósido (14.6), Tritón X-100 (0.4), Deoxicolato de sodio (0.42), Tween80 (0.04), Digitonina (0.4 (seleccionado arbitrariamente)), n-Dodecil- β -D-maltósido (0.1) y n-Octil- β -D-glucósido (14.6).

6.5. Medición de la actividad de esterasa asociada a membrana durante el crecimiento en MM-PUh

Se inocularon 400 mL de cultivo MM-PUh con las bacterias BQ1 y BQ8 con las condiciones de cultivo mencionadas en el punto 6.2., excepto que la concentración de Hydroform empleada cambió de 1% a 8.3% ($87.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) ó 2.5% de sólidos. Esta condición de cultivo se eligió con base en la determinación de parámetros de crecimiento, pues en ella se observó una mayor velocidad de crecimiento que en 1% de Hydroform. Este cultivo se repartió en matraces de 125 mL colocando 30 mL en cada uno. Estos cultivos se incubaron a 37 °C y 200 rpm durante 140 h. Periódicamente se extrajo un matraz por cada cepa y el contenido se centrifugó a $5,000 \times g$ durante 5 min, se desechó el sobrenadante (SN) y se pesó la pastilla. La pastilla se resuspendió en solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM pH 7 con 0.22% de Zwittergent 3-12 (solución de extracción), en una proporción de 1 mL de solución de extracción por cada 50 mg de células. La pastilla se agitó en vortex durante una hora, se centrifugó a $20,800 \times g$ por 10 min y se colectó la fracción líquida. En esta fracción se midió la actividad esterasa empleando el método del *p*-NPA (Anexo). Además, cada extracto se analizó por zimografía para actividad de esterasa (Sección 6.7). Todo el procedimiento se realizó por triplicado para cada uno de los diez puntos obtenidos a través del tiempo.

6.6. Detección de la actividad de esterasa por zimografía

Después de separar el extracto proteico obtenido de la membrana por tratamiento con detergente en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE), éste se lavó en una solución de Tritón X-100 al 2.5% durante 30 min, se enjuagó durante 1 min en amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7 y posteriormente se agregó butirato de metilumbeliferona (MUF-butyrate), el cual es sustrato de esterasas. Éste se preparó en solución stock 50 mM en dimetilsulfóxido (DMSO). Al momento de usarse se diluyó en amortiguador de fosfatos 50 mM para tener una concentración final de 1.6 mM. El gel se expuso a luz ultravioleta (UV) un

minuto después de haber adicionado el sustrato, donde se observó fluorescencia de las bandas de proteínas con actividad de esterasa (Díaz *et al.* 1999). Se empleó como control positivo en cada gel, una lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (Sigma).

6.7. Purificación de la actividad de esterasa asociada a membrana a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh, al 8.3% de Hydroform

A partir de 4.2 L de MM-PUh al 8.3% de Hydroform se obtuvieron 23 g de células por centrifugación a 5,000 x *g*, las cuales se resuspendieron en 460 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7 con Zwittergent 3-12 al 0.22% (solución de extracción) y se agitaron en vórtex durante 1 h. La suspensión se filtró con membrana de 0.22 μm de corte y se centrifugó a 20,800 x *g* durante 10 min. La pastilla formada se desechó y el SN fue dializado durante 12 h con solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7, en bolsas de diálisis con corte de 6 kDa para retirar el detergente (extracto crudo). El extracto crudo se llevó al 50% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, se agitó por 30 min y se centrifugó a 7,000 x *g* durante 10 min. La pastilla obtenida se resuspendió en solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM pH 7 con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 12.5% (500 mM). Esta solución se fraccionó por cromatografía de interacción hidrofóbica empleando la resina Phenyl Sepharose CL-4B (P7892-10ML Sigma-Aldrich). Se utilizaron 20 mL de resina, la cual previamente se había lavado con agua destilada y equilibrado con una solución de fosfato de potasio 20 mM, pH 7 al 12.5% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. La mezcla se agitó suavemente en un agitador giratorio durante 10 min, se centrifugó a 5,000 x *g* durante 5 min y se retiró la fase líquida (fracción no unida). La resina se eluyó usando un gradiente de detergente Zwittergent 3-12 en amortiguador de fosfato de potasio 20 mM pH 7. El gradiente de detergente fue de 0 a 0.4% en incrementos de 0.01% en la concentración de detergente. Se agregaron 20 mL de la solución con 0.01% de detergente, se agitó suavemente durante 10 min y se centrifugó a 5,000 x *g* durante 5 min y se retiró la fase líquida (primera fracción de elución). El procedimiento se repitió agregando en orden consecutivo en concentración de detergente las soluciones preparadas, obteniéndose 40 fracciones de elución. A todas las fracciones se les midió actividad de esterasa empleando el método del *p*-NPA. La fracción con mayor

actividad de esterasa obtenida de la cromatografía anterior se separó mediante la resina de intercambio aniónico Q-Fast flow (Amersham Biosciences ABS-751 82). Se emplearon 10 mL de esta resina previamente lavada con 100 mL de agua destilada, regenerada con 100 mL KCl 1 M, nuevamente lavada con 100 mL de agua y finalmente equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 20 mM pH 7.

Una vez cargada la muestra de 20 mL se agitó suavemente durante 10 min, se centrifugó a 5,000 X *g* durante 5 min y se retiró la fase líquida. La resina se eluyó con un gradiente de fosfato de potasio de 0.02 a 1 M, aplicado en 20 pasos con incrementos de 50 mM entre cada fracción. Cada paso de elución se realizó agregando 15 mL de amortiguador de fosfatos 50 mM, pH 7, se centrifugó a 5,000 x *g* durante 5 min, se separó la fase líquida obteniendo la fracción de elución uno; nuevamente se agregaron 15 mL de amortiguador de fosfatos ahora a una concentración 100 mM, pH 7 y se repitió la centrifugación. Esta secuencia se repitió aumentando la concentración en 50 mM cada vez, hasta alcanzar 0.95 M. Después de haber eluído con el gradiente de fosfatos se agregaron 15 mL de solución de KCl 1 M para eluir por completo la resina obteniéndose veintidós fracciones en total.

A todas las fracciones se les midió la actividad de esterasa empleando el método de *p*-NPA. La fracción con mayor actividad de esterasa (fracción 5) se almacenó a -70 °C. La pureza de la preparación de enzima se verificó con una SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie y la identificación de la banda de proteína con actividad de esterasa se realizó mediante zimografía para esterasa (Sección 6.6).

6.8. Identificación de la proteína con actividad esterasa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 8.3% de Hydroform

A partir del SDS-PAGE mediante el cual se analizó la última fracción del proceso de purificación, se cortaron las bandas de 19 kDa correspondientes a la proteína con actividad de esterasa de cada cepa y se enviaron a identificación por cromatografía de líquidos y espectrometría de masas en tandem (LC-MS-MS). La secuenciación fue realizada por el Dr. Guillermo Mendoza Hernández (Facultad de Medicina, UNAM).

6.9. Exposición de láminas de Hydroform sólido a la actividad de esterasa de bacterias cultivadas en MM-PUh al 8.3% (v/v) de Hydroform

Se prepararon láminas de Hydroform como se describió en la sección 6.3. A partir de la película formada se recortaron piezas de 0.5 x 0.5 cm con grosor aproximado de 0.5 mm. Se introdujeron tres de estas láminas en un tubo eppendorf con 500 μ L de extracto crudo que contenía Zwittergent 3-12 y otras tres láminas en otro tubo que contenía extracto crudo al cual se le había retirado el Zwittergent 3-12 por diálisis. Estos tubos se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 15 días. El extracto crudo en ambos casos, se renovó cada 24 h a partir de alícuotas del mismo que se mantuvieron congeladas a -70 °C hasta el momento de su uso. Como control, se introdujeron tres láminas en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7 con y sin Zwittergent 3-12 al 0.22% y se incubaron bajo las mismas condiciones. Transcurrido dicho tiempo, se recuperaron las láminas, se lavaron con agua desionizada y se analizaron por SEM con un microscopio JEOL 5900 LB a 10,000 aumentos. También, se adicionaron tres láminas de Hydroform a MM-PUh al 8.3% (v/v) de Hydroform inoculado con cada una de las cepas a un matraz con medio sin inocular. Las láminas fueron extraídas y analizadas por MEB después de 15 días de incubación a 37 °C con agitación de 200 rpm.

6.10. Purificación de la actividad esterasa asociada a membrana a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh, al 1% de Hydroform

A partir de 8 L de MM-PUh con 0.3% de Hydroform ($10.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) se obtuvieron 12 g de células por centrifugación a 5,000 x *g*, las cuales se resuspendieron en 240 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7, con Zwittergent 3-12 al 0.22% (solución de extracción) y se agitaron en vórtex durante 1 h. La suspensión se filtró a través de una membrana de 0.22 μ m de corte y se centrifugó a 20,800 x *g* durante 10 min.

La pastilla formada se desechó y el sobrenadante se dializó durante 12 h con solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7, en bolsas de diálisis con corte de 6 kDa para retirar el detergente (extracto crudo). El extracto crudo se separó por cromatografía de interacción hidrofóbica eluida en un solo paso de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Para esta cromatografía se emplearon 10 mL de resina Phenyl Sepharose CL-4B, los cuales se empacaron en una columna de 2.5 cm de diámetro

x 2.5 cm de alto. La columna previamente se había lavado con 100 mL de agua desionizada para eliminar el etanol y posteriormente se equilibró con solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7 al 12.5% de saturación de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (solución de equilibrio). El extracto crudo se llevó al 12.5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ y se pasó por la columna, obteniéndose la fracción no unida. La columna se lavó con 100 mL de solución de equilibrio obteniéndose la fracción de lavado. La fracción unida se eluyó de la resina con 50 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH7, sin $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (solución de elución). De estas tres fracciones se tomó la fracción no unida, ya que en ella se detectó la actividad esterasa y se separó usando una cromatografía de intercambio aniónico eluida por adición de KCl 1 M. Para esta cromatografía se emplearon 10 mL de resina catiónica (Q-Fast Flow), los cuales se empacaron en una columna de 2.5 cm de diámetro x 2.5 cm de alto. La columna previamente se lavó con 100 mL de agua desionizada para eliminar el etanol y posteriormente se lavó con 100 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7 con KCl 1 M (solución de elución II). La resina se volvió a lavar con 100 mL de agua desionizada y posteriormente se equilibró con 100 mL de solución amortiguadora de fosfato de potasio 20 mM, pH 7 (solución de equilibrio II). La fracción no unida de la cromatografía de interacción hidrofóbica se pasó por la columna de Q-Fast Flow, obteniéndose la fracción no unida. La columna se lavó con 100 mL de solución de equilibrio II obteniéndose la fracción de lavado. La fracción unida se eluyó de la resina con 50 mL de solución de elución II. La fracción unida a la columna de Q-Fast Flow se separó nuevamente por cromatografía de intercambio aniónico eluida con gradiente de fosfato de potasio. Para esta cromatografía se empleó una columna pre-empacada Mono-Q 10/10, equilibrada con solución amortiguadora de fosfatos 20 mM, pH 7. Se desechó la fracción no unida y se eluyó a $0.5 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ con un gradiente de fosfato de potasio de 20 a 500 mM. Las fracciones con mayor cantidad de proteína se desalaron con Centricon con corte de 10 kDa y se analizaron por zimografía para detectar actividad de esterasa.

6.11. Determinación del efecto sobre Hydroform sólido de la esterasa de 55 kDa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 1% de Hydroform

Para esta prueba se emplearon láminas preparadas en la misma forma que se mencionó en la Sección 6.9. Se introdujeron tres de estas láminas en tubos eppendorf con 40 μ L de la preparación enzimática de cada cepa obtenida en el último paso de purificación la cual contenía 0.22 y 0.23 U de actividad de esterasa medidas con el método de *p*-NPA, correspondientes a las bacterias BQ1 y BQ8 respectivamente. Estos tubos se incubaron a 37 °C con agitación a 200 rpm durante 10 días. La preparación enzimática fue renovada cada 24 h a partir de alícuotas de la fracción original que se mantuvieron congeladas a -70 °C hasta el momento de su uso. Como control, se introdujeron tres láminas en amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 7 y se incubaron bajo las mismas condiciones. Transcurrido este tiempo, se recuperaron las láminas, se lavaron con agua desionizada y se analizaron por MEB usando un microscopio JEOL 5900 LB a 10,000 aumentos.

7. RESULTADOS

7.1. Identificación de las bacterias BQ1 y BQ8

De acuerdo con la caracterización bioquímica realizada previamente empleando el sistema de clasificación API20NE, las dos cepas bacterianas (BQ1 y BQ8) aisladas en un medio mínimo con un barniz de PU Hydroform como única fuente de carbono (MM-PUh) fueron identificadas como *Comamonas tetosteroni* (Oceguera Cervantes, 2005), especie perteneciente a la familia *Comamonadaceae*. Sin embargo, aunque ambas cepas fueron positivas para las pruebas de reducción de nitratos, asimilación de ácido adípico, málico y actividad de citocromo oxidasa, mostraron diferencias en la prueba de arginina hidrolasa, que fue positiva para BQ1 y negativa para BQ8, y en la prueba de asimilación de gluconato de potasio en la que la cepa BQ1 fue negativa y la BQ8 positiva.

Para tener una identificación más precisa de estas dos cepas, en este trabajo se llevó a cabo el análisis de la secuencia parcial del gen del rDNA 16S de BQ1 y BQ8 encontrando que pertenecen al género *Alicyclophilus*. Las secuencias parciales de los dos genes de las cepas BQ1 y BQ8 fueron depositadas en el GenBank con los números de acceso EF463077 y EF463078, respectivamente. El género *Alicyclophilus* está estrechamente relacionado con los géneros *Acidovorax* y *Comamonas*, todos pertenecientes a la familia *Comamonadaceae*, en el grupo de las β -proteobacterias. Las secuencias del rDNA 16S de BQ1 y BQ8 presentaron 100 y 99% de identidad respectivamente con *Alicyclophilus* sp. cepa R-24611 (GenBank accession no. AM084014), la cual fue aislada de lodo activado y cultivada en medio con etanol y succinato como fuente de carbono y con nitrato como fuente de nitrógeno (Heylen *et al.*, 2006). Además, presentaron 99 y 98% de identidad respectivamente, con la cepa K601, que corresponde a la especie *Alicyclophilus denitrificans* (GenBank accession no. AJ418042), la cual es la especie de referencia con la que se nombró a este nuevo género de bacterias (Mechichi *et al.*, 2003).

7.2. Caracterización del crecimiento a largo plazo

En un primer estudio se midió el crecimiento de BQ1 y BQ8 en MM-PUh por $D.O_{.660nm}$ durante 20 h de incubación y también se observó que el Hydroform presente en el cultivo inoculado con estas cepas sufrió cambios en sus propiedades después de 5 días de incubación (Oceguera Cervantes, 2005). Por lo tanto, en este estudio se decidió determinar el crecimiento bacteriano en este período de tiempo, observándose una fase exponencial de 4 a 12 y de 6 a 14 h de incubación para BQ1 y BQ8 respectivamente, alcanzando valores máximos de $D.O_{.660nm}$ de 1.0 y 0.71, respectivamente. Después de estos tiempos, los valores de $D.O_{.660nm}$ comenzaron a descender sin que se observara una fase de crecimiento estacionaria. Este descenso continuó hasta llegar a un valor de densidad óptica de cero a los cuatro días de incubación (Figura 1). Se observó que simultáneamente con la disminución de $D.O_{.660nm}$ se inició una formación de agregados celulares, por lo que se decidió determinar el crecimiento midiendo el peso húmedo de la biomasa bacteriana. Esta determinación mostró una fase exponencial entre 4 y 12 h y fase estacionaria a partir de alrededor de 60 h, alcanzándose un crecimiento máximo después de 100 h de 17.8 ± 0.6 y 14.0 ± 0.6 $mg \cdot mL^{-1}$ para BQ1 y BQ8, respectivamente (Figura 1).

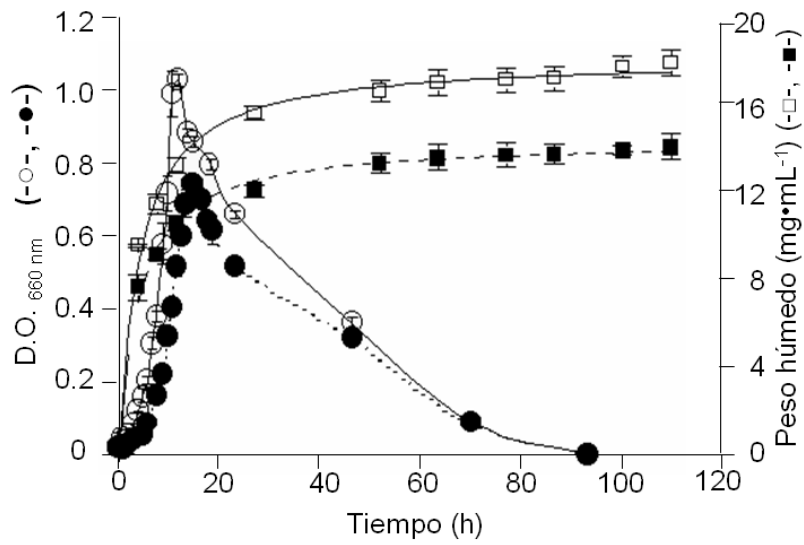


Figura 1. Cinética de crecimiento de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ8 durante cinco días de cultivo en medio MM-PUh con $10.5 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (1%) de Hydroform. Medición del crecimiento por densidad óptica a 660 nm de cepas BQ1(○) y BQ8(●) y por peso húmedo cepas BQ1(□) y BQ8(■). Cada punto representa el promedio de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

7.3. Determinación de parámetros de crecimiento en MM-PUh

La dependencia del crecimiento bacteriano con respecto a la concentración de Hydroform (de 10.2 a 105 mg·mL⁻¹ o de 1 a 10%) mostró un patrón hiperbólico (Figura 2). El cálculo de los valores de μ_{\max} fue de 3.94 ± 0.2 y 4.55 ± 0.6 h⁻¹ y de K_s de 16.9 ± 3.5 y 27.7 ± 1.9 mg·mL⁻¹ para BQ1 y BQ8, respectivamente. Las K_s mostraron diferencias significativas ($P = 0.05$), lo cual sugiere una mejor utilización del Hydroform por BQ1, ya que alcanza velocidades de crecimiento mayores a concentraciones más bajas.

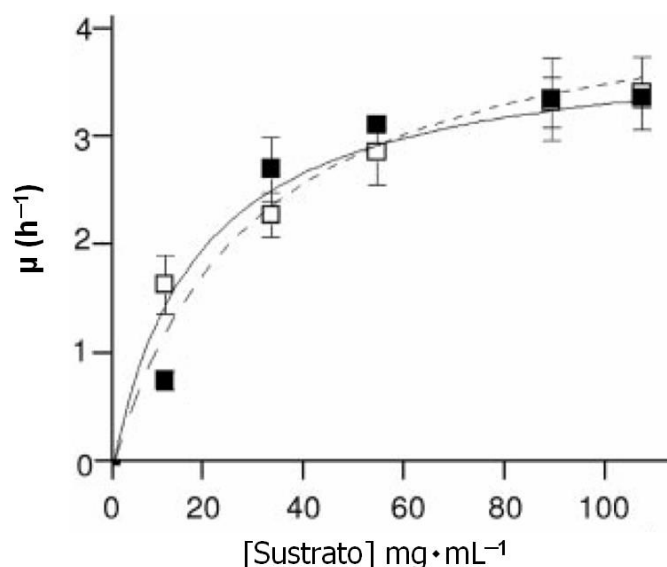


Figura 2. Dependencia del crecimiento de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ8 de la concentración de Hydroform. Se emplearon concentraciones de Hydroform de 10.5 a 105 mg·mL⁻¹ (1 a 10%) como única fuente de carbono. La gráfica de Monod se construyó con los valores de peso húmedo de la fase exponencial de 0 a 12 h de las cepas BQ1 (□) y BQ8 (■). Cada punto representa el promedio de tres repeticiones y las barras representan la desviación estándar.

7.4. Determinación de los efectos bacterianos sobre Hydroform sólido

La determinación de los efectos de *Alicyclophilus* sp. sobre Hydroform sólido es una de las pruebas más importantes en este trabajo, pues a pesar de que ya se demostró que son capaces de alterar las propiedades del Hydroform líquido (Oceguera Cervantes, 2005), es necesario demostrar que éste es atacado por las bacterias una vez que se ha polimerizado por completo. Las microfotografías muestran la formación de orificios en la superficie de láminas de Hydroform expuestas durante 15 días al crecimiento bacteriano en MM-PUh al 1%. En contraste, las láminas control que se incubaron en MM-PUh sin inocular conservaron su superficie lisa (Figura 3).

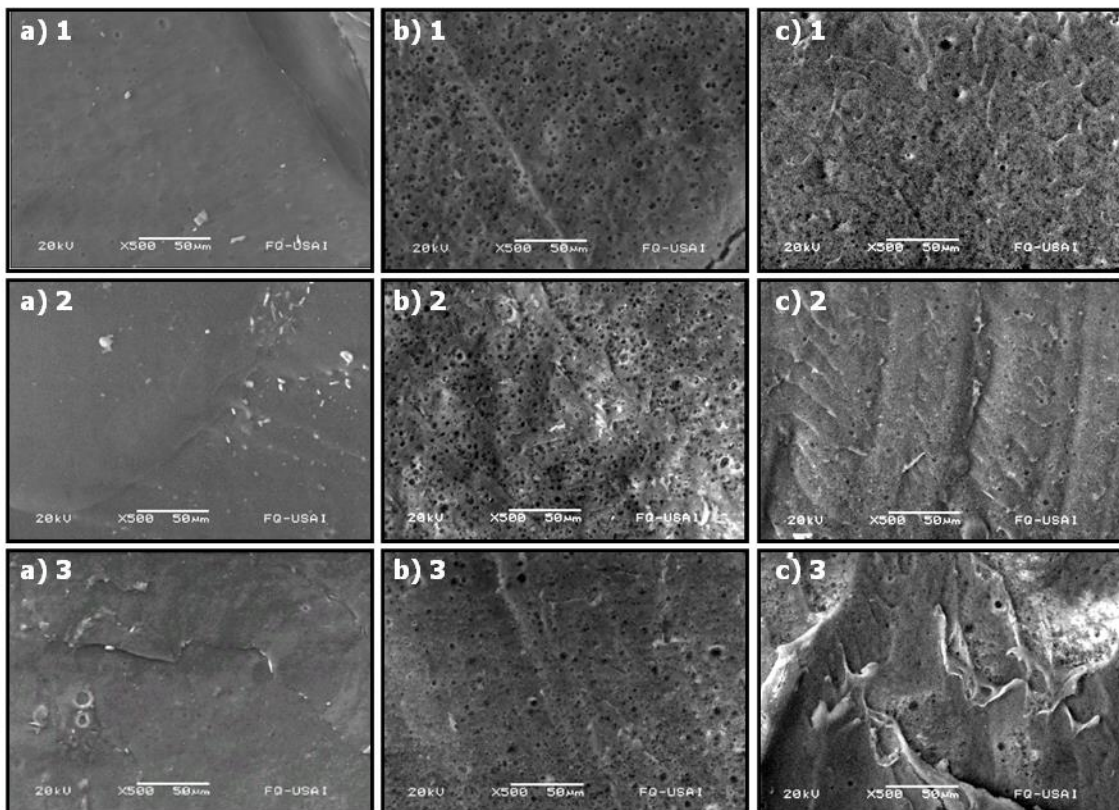


Figura 3. Micrografía electrónica de Hydroform sólido incubado en MM-PUh al 1% sin inocular (a), inoculado con BQ1 (b) y con BQ8 (c). Cada prueba se realizó por triplicado.

7.5. Detección de la actividad de esterasa asociada a membrana y selección del detergente adecuado para su extracción

Se ha reportado que la cepa *C. acidovorans* TB35 posee una actividad esterasa asociada a membrana que es capaz de atacar los enlaces éster del PU rígido (PUR) (Akutsu *et al.*, 1998), y una esterasa extracelular, que sólo ataca los enlaces éster cuando forman parte del poliéster, pero no del PUR (Shigeno-Akutsu *et al.*, 1999). En un trabajo previo, reportamos la existencia de una actividad esterasa extracelular en los cultivos de *Alicyclophilus* sp. (Oceguera Cervantes, 2005). En este trabajo exploramos la posibilidad de que en *Alicyclophilus* sp. cepas BQ1 y BQ8, también exista una actividad esterasa asociada a membrana que pudiera ser la responsable del ataque al PU sólido y generar los cambios descritos anteriormente. Así, células de BQ1 y BQ8 se sometieron a un tratamiento de extracción de proteínas de membrana, en el que se probaron ocho detergentes diferentes esperando obtener la posible actividad de esterasa asociada a membrana. La actividad de esterasa fue medida por el método de *p*-NPA en la solución de detergente después de tratar las células (Figura 4).

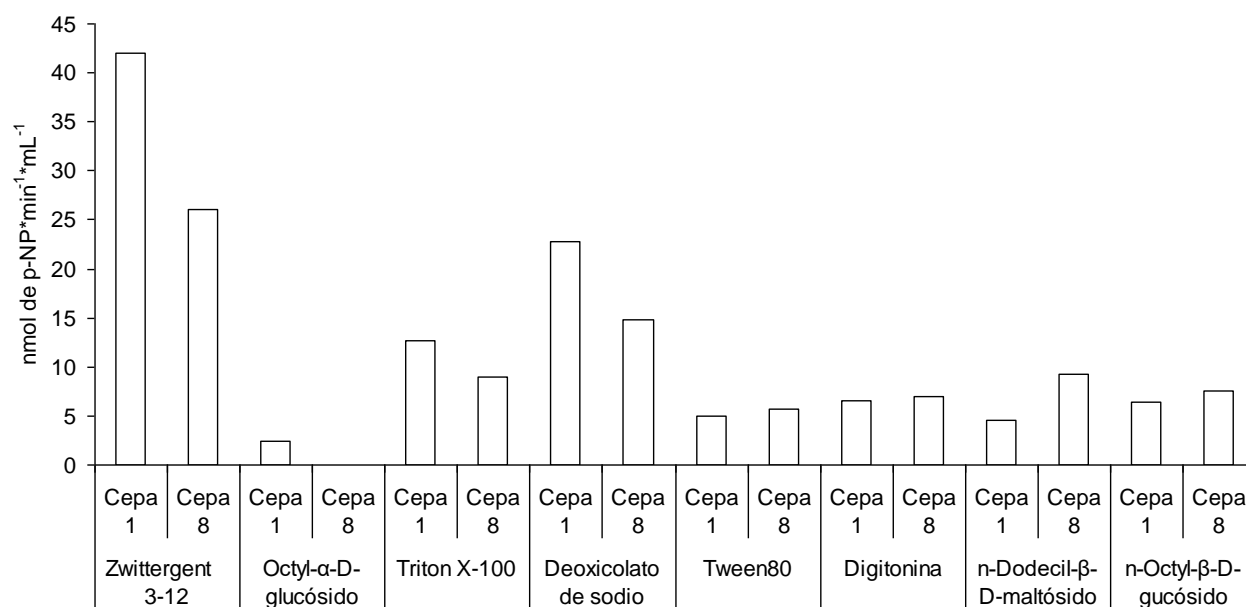


Figura 4. Actividad esterasa asociada a membrana extraída con ocho detergentes diferentes de *Alicyclophilus* sp. cepas BQ1 (Cepa 1) y BQ8 (Cepa 8).

En el análisis electroforético de las proteínas extraídas empleando los diferentes detergentes se observó que Zwittergent 3-12 fue el que logró extraer mayor cantidad de proteína (Figura 5) y al mismo tiempo una mayor actividad de esterasa por volumen de extracto (0.042 y 0.026 U·mL⁻¹ para BQ1 y BQ8 respectivamente) (Figura 4). El tratamiento con Deoxicolato de sodio fue el segundo mejor, obteniendo actividades de 0.022 y 0.015 U·mL⁻¹, para BQ1 y BQ8 respectivamente. Con los demás detergentes se obtuvieron resultados muy similares entre si, presentando actividad esterasa por debajo de las 0.01 U·mL⁻¹.

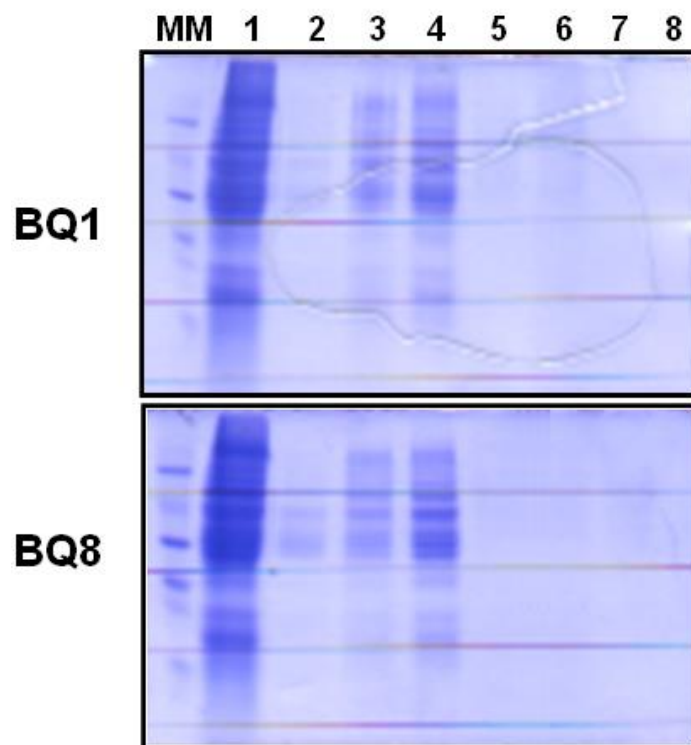


Figura 5. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie del extracto proteico de membranas obtenido con cada detergente, de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ8. MM (Marcador de Masa molecular), 1 (Zwittergent 3-12), 2 (Octil- α -D-glucósido), 3 (Tritón X-100), 4 (Deoxicolato de sodio), 5 (Tween80), 6 (Digitonina), 7 (n-Dodecil- β -D-maltósido) y 8 (n-Octil- β -D-glucósido). En cada carril se cargaron 25 μ L de extracto.

7.6. Medición de la actividad de esterasa asociada a membrana durante el crecimiento en MM-PUh

Previamente se observó la aparición de una actividad esterasa extracelular en cultivos de BQ1 y BQ8 después de 12 h de incubación, la cual permaneció durante 120 h de cultivo (Ocegüera Cervantes, 2005). En este trabajo se midió la actividad esterasa asociada a membrana a lo largo del mismo tiempo de cultivo (120 h). Esta determinación se realizó en cultivos de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ8 en MM-PUh con una concentración de Hydroform de 8.3% (87.15 mg·mL⁻¹). Esta mayor concentración de PU se eligió con base en los parámetros de crecimiento, pues se observó una mayor velocidad de crecimiento y una mayor producción de biomasa al 8.3 que al 1% de Hydroform. La medición de la actividad esterasa asociada a membrana, extraída con el tratamiento con Zwittergent 3-12, mostró que está presente desde el tiempo cero (9.96 y 8.35 nmol·min⁻¹·mL⁻¹ para BQ1 y BQ8 respectivamente) e incrementa después de 6 h, llegando a un máximo entre las 18 y 48 h de cultivo (38.3 y 49.7 nmol·min⁻¹·mL⁻¹ para BQ1 y BQ8, respectivamente). Posteriormente disminuye abruptamente para llegar casi a cero a las 63 h de incubación (Figura 6a y 6b). Ambas cepas fueron capaces de sostener su crecimiento por más de 120 h presentando una máxima producción de biomasa después de las 44 h de incubación (74 y 68 mg·mL⁻¹ para BQ1 y BQ8 respectivamente). El crecimiento en la fase estacionaria es coincidente con la caída de la actividad (Figuras 6a y 6b) y con un cambio en la organización celular, que es la formación de agregados.

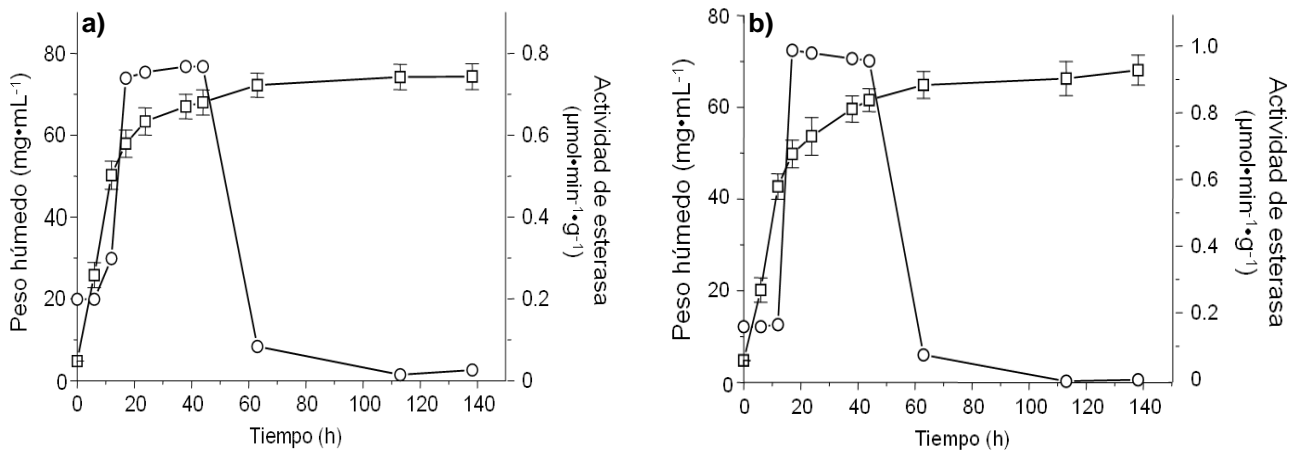


Figura 6. Crecimiento (□) de *Alicyclophilus* sp. BQ1(a) y BQ8(b) y actividad de esterasa asociada a membrana (○) en MM-PUH conteniendo 8.3% (87.15 mg·mL⁻¹) de Hydroform. Cada valor de crecimiento representa el promedio de tres repeticiones, las barras indican la desviación estándar. La actividad esterasa se midió por el método de (p-NPA).

7.7. Detección de la actividad esterasa por zimografía

La actividad esterasa de membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ8 cultivadas en Hydroform 8.3% fue analizada a través del tiempo de cultivo empleando zimografía. Con este ensayo se detectó en un gel desnaturalizante de poliacrilamida al 12% (SDS-PAGE) una sola banda de 19 kDa con actividad esterasa (Figura 7). Al igual que cuando se midió la actividad espectrofotométricamente con pNPA (Figura 6a y 6b), en la zimografía se observó que después de las 44 h de incubación la señal de proteína con actividad esterasa desapareció, quedando solo un remanente a las 63 h. Esto confirma que el cambio en la actividad esterasa medida con el método de *p*-NPA es verdadero (Figura 7).

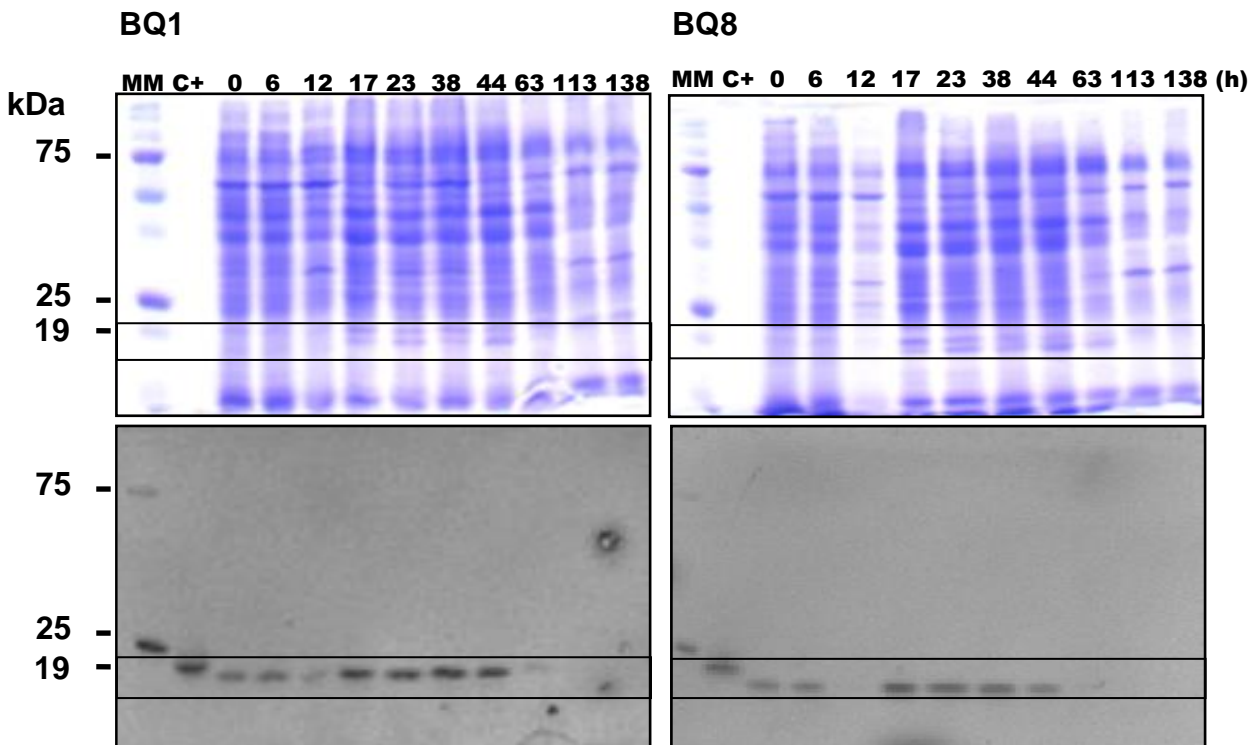


Figura 7. Zimogramas de la actividad esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ8 a diferentes horas de cultivo en Hydroform 8.3%. C+, control positivo, 0.5 U de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

7.8. Purificación de la actividad de esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ8 cultivadas en Hydroform 8.3%

La purificación se llevó a cabo con los extractos membranales de ambas cepas, obtenidos empleando Zwittergent 3-12 y posteriormente una precipitación con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de 0 a 50% de saturación, en la que se observó una gran pérdida de la actividad total, recuperándose solo el 30% de la actividad esterasa inicial. Posteriormente se realizaron dos cromatografías, una de interacción hidrofóbica empleando Phenyl Sepharose CL-4B con un gradiente de elución de detergente y posteriormente una de intercambio aniónico Q-Fast Flow, en la cual se usó un gradiente de elución de fosfatos. El análisis de la purificación (Tabla 2) muestran que en ambos pasos de cromatografía se pierde una gran cantidad de proteína, teniendo un rendimiento final de actividad de 0.207 y 0.203% para BQ1 y BQ8, respectivamente. Además, se observó un incremento muy pobre de la actividad específica, lo cual indica que los métodos empleados poseen baja selectividad por la proteína de interés.

Tabla 2. Purificación de las estererasas asociadas a membrana de las cepas BQ1 y BQ8 cultivadas en MM-PUh con 8.3% de Hydroform. Las mediciones de actividad se realizaron por el método de p-NPA.

		Volumen (mL)	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica ($\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
BQ1	Extracto crudo	1518	2015	74.5	0.037	1	100
	Precipitación con $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$	200	506	22.35	0.044	1.2	30
	Phenyl Sepharose	20	15.18	1.82	0.12	3.2	2.4
	Q-Fast Flow	15	1.21	0.154	0.127	3.4	0.21
BQ8	Extracto crudo	1130	1476	72.5	0.049	1	100
	Precipitación	200	370	21.75	0.059	1.2	30
	Phenyl Sepharose	20	25.9	1.761	0.068	1.4	2.4
	Q-Fast Flow	15	2.04	0.147	0.072	1.5	0.2

Con estos tres pasos de purificación se logró obtener una fracción que al analizarse por un SDS-PAGE mostró siete bandas, de las cuales, la banda de 19 kDa correspondía a un 40% de la proteína total de cada fracción. Empleando un zimograma se confirmó que la banda de 19 kDa presentó la actividad esterasa (Figura 8), previamente detectada en los extractos iniciales de proteínas de membrana.

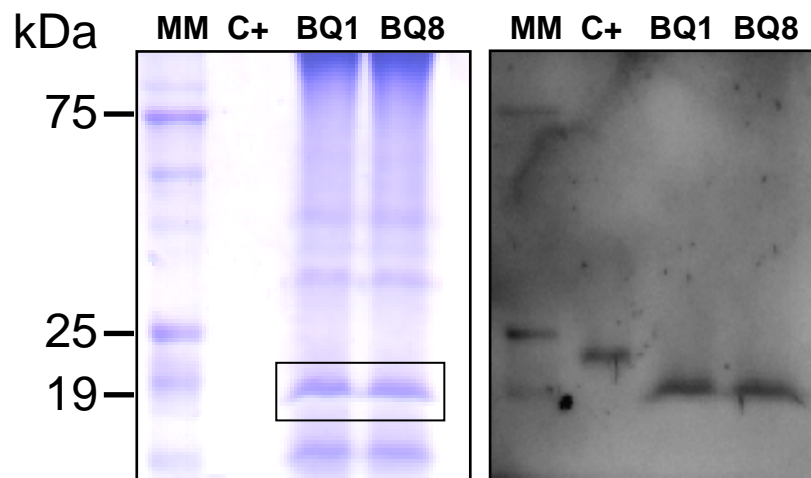


Figura 8. SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (izquierdo) y previamente revelado con MUF-butyrate para la detección de actividad de esterasa (derecho). Se empleó la fracción eludida de la resina Q-Fastflow a 250 mM de fosfato de potasio (fracción 5) cargando 20 μ g de proteína en cada carril.

7.9. Identificación de la actividad de esterasa purificada de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ8 cultivadas en MM-PUh al 8.3% de Hydroform

El método de cromatografía de líquidos acoplada a espectroscopía de masas en tándem (LC-MS-MS) mostró que las bandas con actividad esterasa de 19 kDa correspondían, tanto para BQ1 como para BQ8, a tres proteínas. Este análisis indicó que estas proteínas son homólogos a una superóxido dismutasa, una proteína de la familia de las fasinas, ambas de *Acidovorax* sp. JS42, y a un factor de reciclaje del ribosoma de *C. testosteroni* KF-11. Debido a que las tres proteínas detectadas en la banda son de ubicación intracelular, es probable que durante el proceso de extracción de proteínas de membrana con detergente existiera ruptura de las células. Además, esto muestra que la banda obtenida al final de la purificación no corresponde a una proteína pura.

7.10. Determinación de los efectos bacterianos y enzimáticos sobre Hydroform sólido en MM-PUh al 8.3%

Los ensayos de degradación *in vitro* de láminas de PU sólido expuesto a la actividad bacteriana y enzimática purificada se llevaron a cabo exponiendo láminas de Hydroform al medio de cultivo durante cinco días y en un ensayo adicional se también se expusieron láminas de Hydroform nuevas al extracto de la purificación enzimática a partir de cultivos en MM-PUh al 8.3% de Hydroform. Las fotografías de microscopía electrónica mostraron que no hubo cambios en la superficie del polímero que pudieran indicar degradación (datos no mostrados).

7.11. Purificación de la actividad de esterasa asociada a membrana, a partir de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ8 cultivadas en MM-PUh al 1% de Hydroform

Debido que no se observaron actividades bacterianas que indicaran degradación del PU sólido en el cultivo al 8.3% de Hydroform, se decidió volver a utilizar el medio de cultivo al 1% para tratar de purificar la actividad esterasa de membrana, ya que bajo estas condiciones sí se observaron cambios en la superficie de láminas de Hydroform sólido (Ver Resultados sección 7.4). Para esta purificación se eliminó el paso de precipitación con $\text{NH}_4(\text{SO}_4)_2$ ya que se perdía un 70% de actividad esterasa. A partir de la cromatografía de interacción hidrofóbica como primer paso de purificación se obtuvieron tres fracciones proteicas (fracción unida, fracción de lavado y fracción no unida). El análisis de estas fracciones por SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie mostró patrones de bandas muy similares entre la fracción no unida y la fracción de lavado, indicando que la fracción de lavado corresponde al remanente de proteínas no unidas a la resina. Por otro lado, se observó un patrón de bandas diferente entre la fracción unida y la no unida, indicando que hubo una separación selectiva de proteínas, basada en sus propiedades hidrofóbicas (Figura 9). Antes de realizar la tinción con Coomassie del SDS-PAGE se realizó el zimograma para actividad esterasa. En el caso de BQ1 se observó una banda con actividad esterasa de alrededor de 55 kDa en los tres carriles. Aún cuando la actividad detectada en las fracciones de lavado y unida fue mucho menor que la detectada en la fracción no unida. En el zimograma correspondiente a BQ8 se observó solo una banda con actividad esterasa en la

fracción no unida a la resina (Figura 9). Por lo tanto, en ambos casos (BQ1 y BQ8) se decidió continuar la purificación con la fracción no unida.

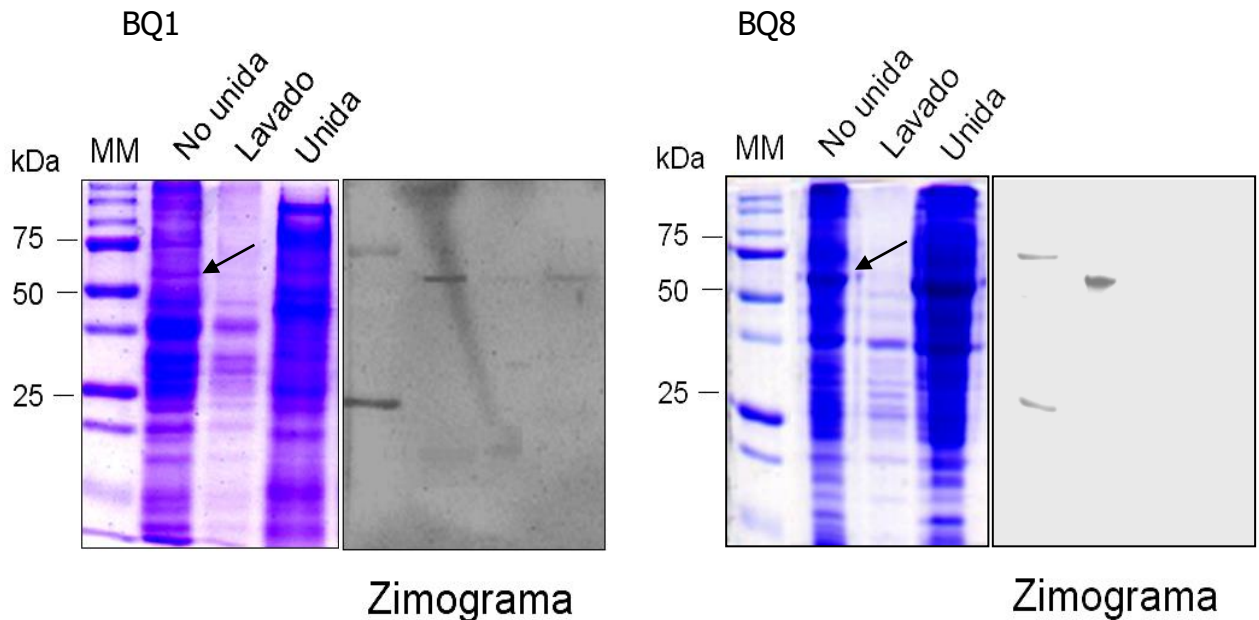


Figura 9. SDS-PAGE y zimograma para esterasa de las fracciones obtenidas de la cromatografía en Phenyl Sepharose. Se usó un gel de acrilamida al 12%.

La fracción no unida del paso de purificación anterior se separó por cromatografía de intercambio aniónico empleando la resina Q-Fast Flow. De esta cromatografía también se obtuvieron tres fracciones (fracción no unida, de lavado y unida) que se analizaron por SDS-PAGE. La tinción con azul de Coomassie mostró que, a diferencia de la cromatografía anterior, se logró una mejor separación proteica, ya que se observó la desaparición de unas bandas y el enriquecimiento de otras en cada fracción. En las fracciones no unida y de lavado se observaron predominantemente proteínas de entre 50 y 20 kDa, mientras que en la fracción unida se observaron una banda de alrededor de 55 y otra de 10 kDa. Nuevamente se observó que la fracción de lavado correspondió al remanente de proteínas no unidas (Figura 10). El zimograma de estos geles mostró en ambos casos (BQ1 y BQ8) que la actividad esterasa se encontraba en la fracción unida a la resina, correspondiendo a la banda de 55 kDa enriquecida en dicha fracción (Figura 10).

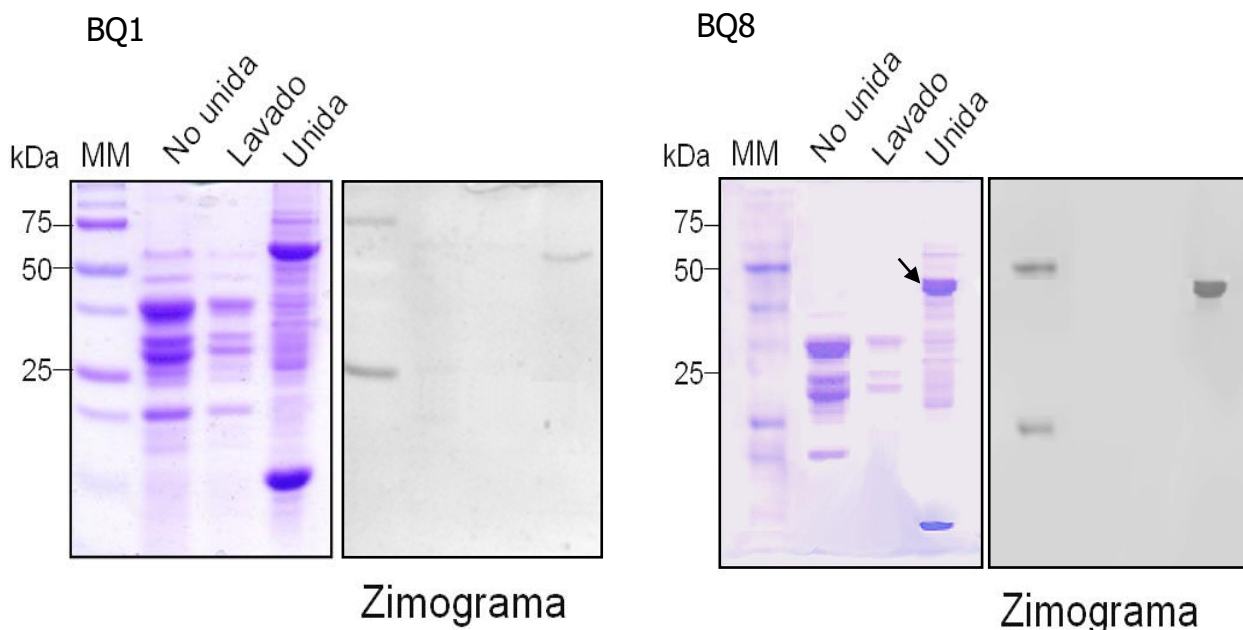


Figura 10. SDS-PAGE y zimograma para esterasa de las fracciones obtenidas de la cromatografía en Q-Fast flow. Se usó un gel de acrilamida al 12%.

Finalmente, la fracción unida a la resina Q-Fast Flow se separó en una segunda cromatografía de intercambio aniónico. En ésta se empleó una columna pre-empacada con la resina Mono-Q 10/10 que se eluyó con gradiente de fosfato de potasio, obteniéndose 95 fracciones. El cromatograma obtenido mostró las primeras señales de presencia de proteínas a partir de la fracción 40, observándose en el cromatograma correspondiente a BQ1 dos señales principales alrededor de la fracción 73, 74 y finalmente un pico en la fracción 89. El cromatograma de BQ8 mostró gran similitud con el de BQ1, aunque en este caso la señal mayor se modificó, observándose sólo un pico en la fracción 73 (Figura 11). Las fracciones con señales correspondientes a los picos más notables se analizaron en un SDS-PAGE al que se le realizó un zimograma para esterasa y finalmente se reveló con plata.

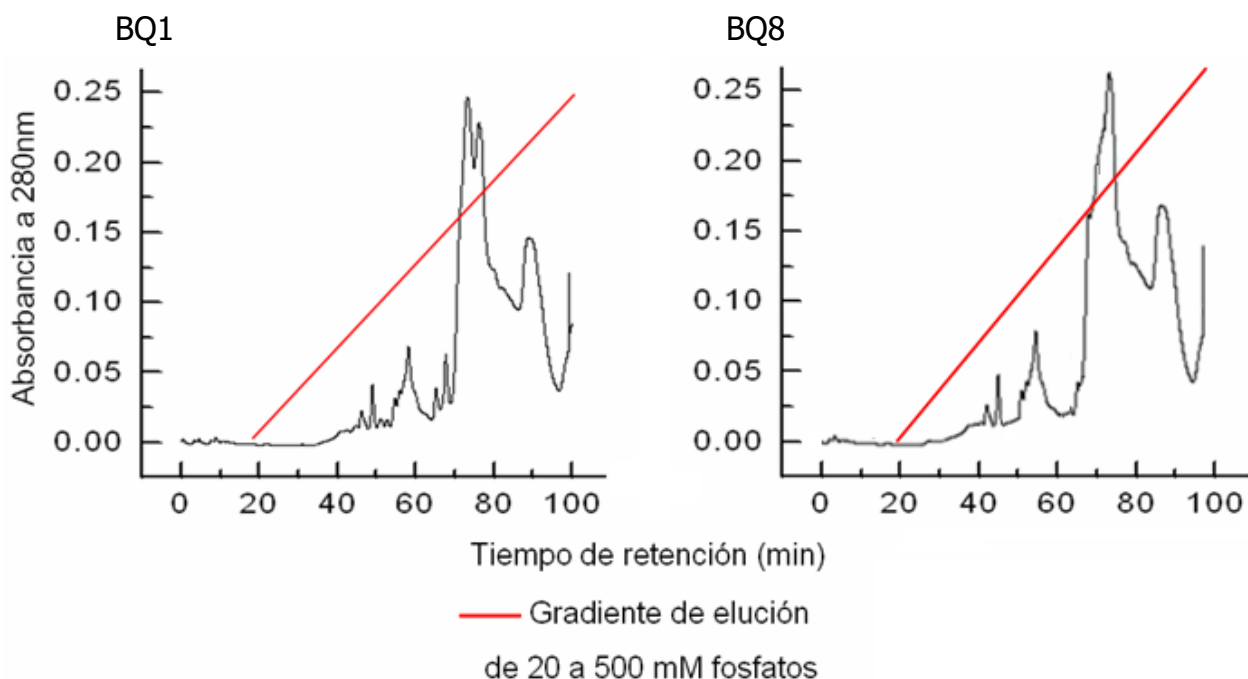


Figura 11. Cromatograma de la elución de la columna MonoQ-10/10.

En el caso de BQ1, el revelado con plata del SDS-PAGE mostró la presencia de tres bandas en la fracción 73 y una banda en la fracción 74, el análisis por zimografía mostró que la actividad esterasa correspondía a la banda de 55 kDa. El SDS-PAGE de BQ8 mostró solo una banda en las fracciones 73 y 74, ambas con actividad esterasa, siendo la señal de la fracción 73 más intensa (Figura 12).

En la Tabla 3 se incluyen los resultados obtenidos en los pasos de purificación de la actividad esterasa de membrana de BQ1 y BQ8 cultivadas en Hydroform 1%. Se observó que al eliminar la precipitación con sulfato de amonio se logró eliminar la pérdida de 70% observada en la purificación previa. Además, el nuevo paso con la columna MonoQ también ayudó a incrementar de 80 a 100 veces la purificación.

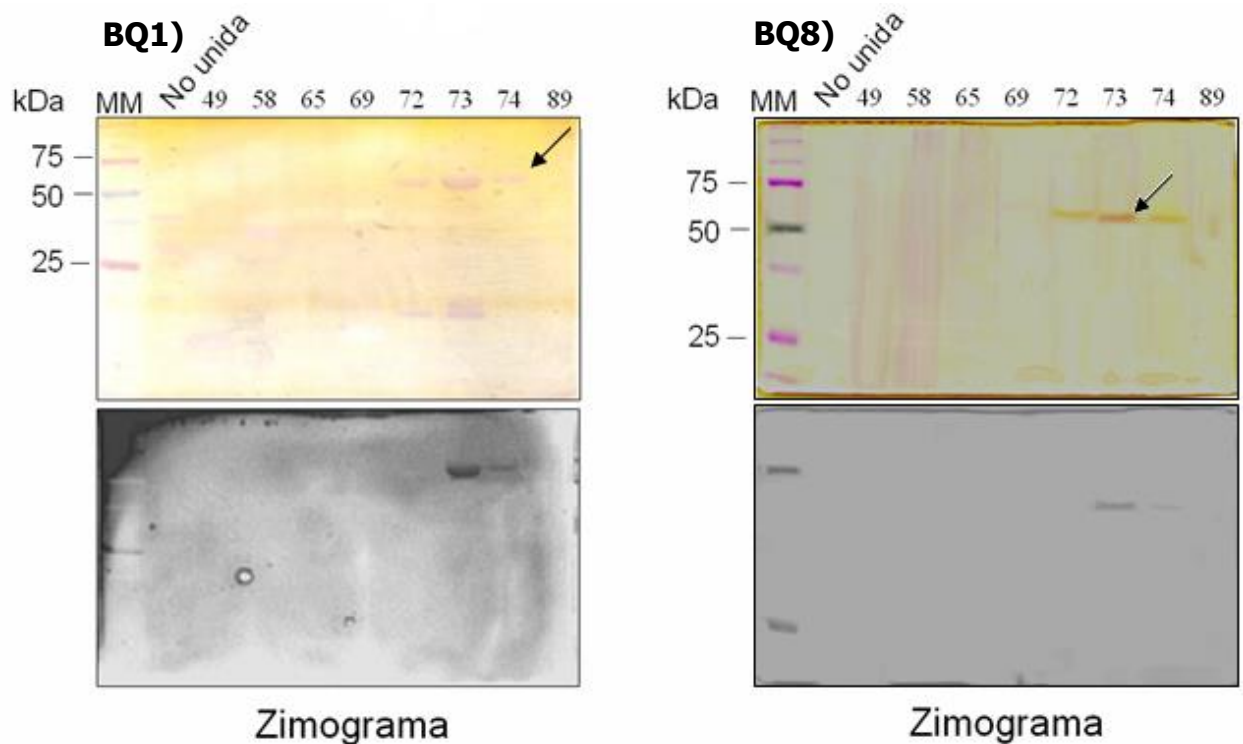


Figura 12. SDS-PAGE teñido con plata y zimograma para esterasa de las fracciones eluidas de la cromatografía de MonoQ a) BQ1 y b) BQ). Se usó un gel de acrilamida al 12%.

Tabla 3. Purificación de las esterasas asociadas a membrana de BQ1 y BQ8 cultivadas en MM-PUh con 1% de Hydroform. Las mediciones de actividad se realizaron por el método de p-NPA.

		Volumen (ml)	Proteína (mg)	Actividad total (U)	Actividad específica (U·mg ⁻¹)	Veces de purificación	Rendimiento (%)
BQ1	Extracto crudo	160	287	9.45	0.03	1	100
	Fenil sefarosa	160	193	8.82	0.04	1.4	93.33
	Q-Fast Flow	20	43.7	4.21	0.1	3	44.55
	Mono-Q	0.5	0.84	2.74	3.26	101.8	28.99
BQ8	Extracto crudo	150	270	10.85	0.04	1	100
	Fenil sefarosa	150	179	9.27	0.05	1.27	85.43
	Q-Fast Flow	20	40.5	3.98	0.1	2.4	36.68
	Mono-Q	0.5	0.9	3.01	3.3	83.5	27.74

7.12. Efecto de la esterasa de 50 kDa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 1% de Hydroform sobre láminas de Hydroform sólido

Las pruebas de degradación enzimática *in vitro* se realizaron sobre láminas de Hydroform que se expusieron a la actividad esterasa de 50kDa purificada en las fracciones obtenidas del último paso de purificación fracciones 74 y 73 de BQ1 y BQ8, respectivamente. Después de 10 días de exposición a 37 °C y agitación a 200 rpm, las láminas se analizaron por SEM. Se observó que las láminas control que sólo se expusieron a solución amortiguadora, presentaron una superficie lisa, mientras que las que se expusieron a la actividad esterasa purificada, mostraron una superficie con aspecto áspero, el cual sólo fue posible observar a 10,000 aumentos (Figura 13).

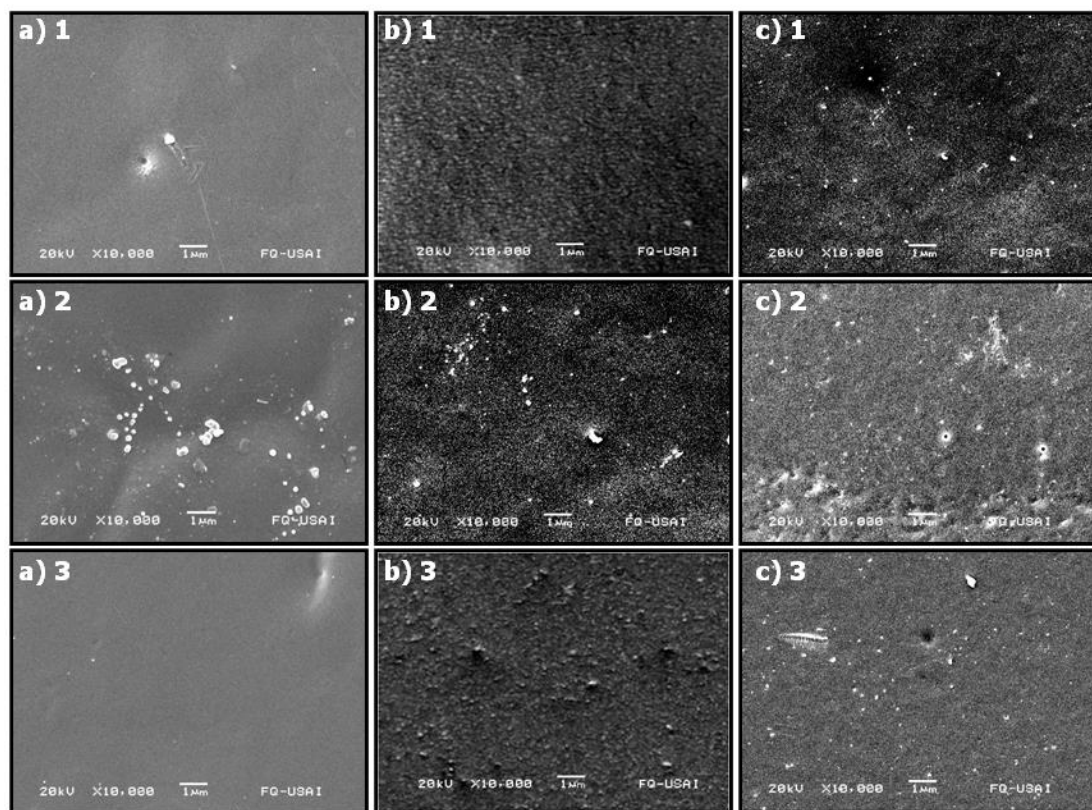


Figura 13. Micrografía electrónica de Hydroform sólido. Incubado en solución amortiguadora de fosfato (a), incubado con la esterasa purificada de BQ1 (b) y BQ8 (c). Cada prueba se realizó por triplicado.

Characterization of the Polyurethanalytic Activity of Two *Alicyclophilus* sp. Strains Able To Degrade Polyurethane and *N*-Methylpyrrolidone[†]

Alejandro Ocegüera-Cervantes,¹ Agustín Carrillo-García,¹ Néstor López,² Sandra Bolaños-Núñez,³ M. Javier Cruz-Gómez,² Carmen Wachter,³ and Herminia Loza-Tavera^{1*}

Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510 México, D.F. México¹; Departamento de Ingeniería Química, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510 México, D.F. México²; and Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510 México, D.F. México³

Received 1 June 2007/Accepted 1 August 2007

Two bacterial strains (BQ1 and BQ8) were isolated from decomposed soft foam. These were selected for their capacity to grow in a minimal medium (MM) supplemented with a commercial surface-coating polyurethane (PU) (Hydroform) as the carbon source (MM-PUh). Both bacterial strains were identified as *Alicyclophilus* sp. by comparative 16S rRNA gene sequence analysis. Growth in MM-PUh showed hyperbolic behavior, with BQ1 producing higher maximum growth ($17.8 \pm 0.6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) than BQ8 ($14.0 \pm 0.6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) after 100 h of culture. Nuclear magnetic resonance, Fourier transform infrared (IR) spectroscopy, and gas chromatography-mass spectrometry analyses of Hydroform showed that it was a polyester PU type which also contained *N*-methylpyrrolidone (NMP) as an additive. *Alicyclophilus* sp. utilizes NMP during the first stage of growth and was able to use it as the sole carbon and nitrogen source, with calculated K_s values of about $8 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Enzymatic activities related to PU degradation (esterase, protease, and urease activities) were tested by using differential media and activity assays in cell-free supernatants of bacterial cultures in MM-PUh. Induction of esterase activity in inoculated MM-PUh, but not that of protease or urease activities, was observed at 12 h of culture. Esterase activity reached its maximum at 18 h and was maintained at 50% of its maximal activity until the end of the analysis (120 h). The capacity of *Alicyclophilus* sp. to degrade PU was demonstrated by changes in the PU IR spectrum and by the numerous holes produced in solid PU observed by scanning electron microscopy after bacterial culture. Changes in the PU IR spectra indicate that an esterase activity is involved in PU degradation.

Polyurethane (PU) was developed by Otto Bayer as a substitute for rubber at the beginning of World War II (1938). Due to its range of properties, the polymer is widely used, for example, in liquid coatings and paints, adhesives, sealants, flexible and rigid foams, and elastomers (7). Since PU is such a versatile polymer, PU production has increased, but this has brought with it the problem of safe disposal. Each year, more than 5 million tons of shredder residue containing different plastics and PU foams is generated in the United States and Canada (6). Several mechanical processes, such as regrinding, flexible foam bonding, adhesive pressing, and compression molding, as well as chemical techniques, such as glycolysis, hydrolysis, pyrolysis, and hydrogenation, are used for the recovery of the starting materials or in the production of other PU types (8). Recently, the development of new strategies based on the utilization of biopolymers such as poly[(R)-hydroxyalkanoic acids] (21), the enzymatic polymerization of polyesters and degradation of PU (28), and the discovery of microorganisms (fungi and bacteria) able to utilize PU as a

source of carbon and nitrogen (12, 31, 32) is leading the move to a greener chemical industry.

A number of bacterial strains, such as *Corynebacterium* sp., *Pseudomonas fluorescens*, *P. chlororaphis*, and *Bacillus subtilis*, have been reported to grow in PU media supplemented with yeast extract or glucose (18, 19, 20, 22, 35). However, only *Comamonas acidovorans* TB-35 has the ability to attack solid PU and use it as a carbon source (31). Protease, urease, and esterase activities have been associated with the degradation of polyester PU by fungi and bacteria (12, 18, 31, 32, 34, 39). Polyurethanase protease activities have been reported for *Pseudomonas fluorescens* and *P. chlororaphis* (19, 36), polyurethanase lipase activity has been detected in *Bacillus subtilis* strains (35), and polyurethanase esterase activities have been reported for *Corynebacterium* sp., *Comamonas acidovorans* TB-35, and *P. chlororaphis* (20, 22, 30). Membrane-bound esterase activity produced by the *Comamonas acidovorans* TB-35 strain, which is able to attack solid PU (1, 30), is the best characterized of these.

N-Methylpyrrolidone (NMP), the lactam of 4-methylamino-butyric acid, is an organic solvent for natural (waxes and resins) and synthetic (polystyrene, polyesters, and polyvinyl chloride) polymers. It is chemically stable, and it is used in a variety of industrial chemical reactions and in paints, surface coatings, paint strippers, and cleaners, as well as for the recovery of pure hydrocarbons in petrochemical processing, desulfurization of

* Corresponding author. Mailing address: Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Cd. Universitaria, 04510 México, D.F. México. Phone: (52) (55) 5622-5280. Fax: (52) (55) 5622-5329. E-mail: hlozat@servidor.unam.mx.

[†] Published ahead of print on 10 August 2007.

gases, and manufacture of electronic equipment. It has been used as an additive in the manufacture of PU finishes for the last 25 years. Additionally, it is used in agrochemicals, such as insecticides, fungicides, herbicides, seed treatment products, and bioregulators. It has been regarded as having a favorable toxicological and environmental profile in comparison to other, more toxic solvents (5), for which reason it has been used extensively. However, recent findings indicate that NMP has aquatic toxicity for *Daphnia magna*, with a 50% lethal concentration at 24 h of 1.23 mg · liter⁻¹, and only certain pesticides have greater toxicity than this compound (23). NMP has been reported to be teratogenic in rats when administered orally (38) but not by inhalation (16, 25, 37), although a reduction in fetal weight has been observed to occur in the absence of obvious maternal effects at certain doses (37, 43). It has also been correlated with stillbirth in a woman working in a laboratory where NMP was used routinely (42) and with the poisoning of an agricultural worker by an insecticide in which it was a major component (44). Although NMP was listed in 1994 in the Environmental Protection Agency Emergency Planning and Community Right-to-Know Act, section 313 (d)(2)(B) (14), as having serious or irreversible chronic health effects, it is still used broadly. Its extensive use in different industries, its excellent miscibility with water and most organic solvents, and its high percutaneous absorption (4) make the use of NMP potentially hazardous to humans (23). Even though NMP has been reported as being biodegradable (5, 10), there have been no reports on the identification of microorganisms with such a capacity.

In this paper we describe the isolation and characterization of two *Alicyclophilus* sp. strains featuring two remarkable capacities: to use NMP as a carbon and nitrogen source and to degrade PU with an esterase activity. We also identified an inducible extracellular esterase activity which might be responsible for the polyurethanolytic activity.

MATERIALS AND METHODS

Isolation of bacterial strains able to grow in Hydroform as the only carbon source. Samples of deteriorated PU were collected from an open-air refuse dump (Bordo de Nochiaca, Nezahualcoyotl, Edo. de México, México). The samples were flexible PU foam pieces collected from the ground or deteriorated upholstery. They were carried in plastic bags to the laboratory, and portions were introduced to 125-ml Erlenmeyer flasks containing 50 ml minimal medium (MM) at pH 7.2 (composition in g · liter⁻¹: KH₂PO₄, 2.0; K₂HPO₄, 7.0; NH₄NO₃, 1.0; MgSO₄ · H₂O, 0.1; ZnSO₄ · 7H₂O, 0.001; CuSO₄ · 7H₂O, 1 × 10⁻⁴; FeSO₄ · 7H₂O, 0.01; MnSO₄ · 6H₂O, 0.002) plus Hydroform (1.0%, vol/vol; 10.5 mg · ml⁻¹) as the carbon source (MM-PUh). Hydroform (PolyForm, México) is an aliphatic PU water-based coating similar to Impranal DLN (Bayer Corp.), which has been employed in other experimental work to characterize polyurethanolytic bacteria (2, 19, 20, 35, 36). The inoculated media were incubated for 5 days at 37°C and at 200 rpm. Aliquots (100 µl) were taken at different incubation times, inoculated into MM-PUh agar plates, and incubated at 37°C for 48 h, after which colonies were isolated and subcultured in the same medium. In order to obtain axenic cultures, subculturing was performed alternately in MM-PUh agar and Luria-Bertani (LB) agar. Bacterial stocks were prepared in glycerol (30%) and stored at -70°C.

Identification of the isolated strains. Bacterial strains able to grow in MM-PUh were characterized using biochemical tests (MacConkey and potato agars, nitrate broth, *Salmoneella* Shigetella, cetrimide, sulfate-indol-mouilly, mouilly-indol-ornitine, urea, arginine, and oxide fermentation glucose media) (9, 27) and an API ZONE test (bioMérieux GmbH, Nürtingen, Germany). The two bacterial strains that showed the most growth in MM-PUh were selected for study and identified by 16S rRNA gene sequence comparison. DNA was extracted from colonies growing in LB agar (24), except that after the phenol-chloroform ex-

traction procedure, polysaccharides were eliminated by adding 110.7 µl of 5 M NaCl plus 88.5 µl of cetyltrimethylammonium bromide (10%, w/vol) in solution in 0.7 M NaCl. The mixture was shaken thoroughly and incubated at 65°C for 10 min (3). DNA integrity was analyzed by agarose electrophoresis and the amount and purity estimated by spectrophotometry. A fragment of the 16S rRNA gene (corresponding to positions 30 to 750 of the *Escherichia coli* 16S rRNA gene) was amplified by PCR with the following conserved primers close to the 3' and 5' ends of the fragment, respectively: pA (5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3') and pB (5' AAGGAGGTGATCCAGCCGCA 3'). A single strand of the PCR product was directly sequenced using an automatic DNA sequencer (ABI Prism 3100 genetic analyzer, Foster City, CA) with primers gamma (5' ACTGCTGC CTCCCGTAGGAG 3'), pD* (5' GTATTACCGCGGCTGCTG 3'), ANTIgamma (5' CTCCTACGGGAGGCGAGCAGT 3'), and ANTIK (5' CGTGCCCA GCAGCCGCGTAAT 3'). Identification was based on partial sequence comparisons (720 bp). Closely matching sequences were found in the GenBank database using the BLAST algorithm (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Sequences were aligned using BioEdit sequence alignment editor and visually inspected. Phylogenetic analysis was performed using the MEGA program, version 3.1. The Kimura two-parameter method was used to calculate evolutionary distances, and dendrograms were constructed according to the neighbor-joining method. Bootstrap values were calculated using 500 replicates.

Bacterial growth. A portion of glycerol stock was inoculated into LB agar. After 2 days of incubation at 37°C, one isolated colony was inoculated into 5 ml LB broth and incubated at 37°C and 200 rpm. After 12 h, 5 ml of fresh LB was inoculated with cells of this culture to reach an optical density at 660 nm (OD₆₆₀) of 0.1. The new culture was incubated at 37°C and 200 rpm for the time needed to reach exponential growth, approximately 6 h. This culture was used to start growth in MM-PUh by inoculating fresh medium with the quantity of cells needed to reach an OD₆₆₀ of 0.02. Incubation was conducted at 37°C and 200 rpm. Similar cultures were established to monitor the increase in wet weight. For this, 50 ml of MM-PUh inoculated with cells to give an OD₆₆₀ of 0.02 was introduced into glass tubes (16 by 150 mm) in 5-ml aliquots and incubated at 37°C and 200 rpm. At various times over 5 days, the contents of one tube were poured into a preweighed tube and centrifuged at 5,000 × g for 5 min. The wet weight of the cell pellet at each time interval was measured, and each experiment was performed in triplicate. To determine the dependence of bacterial growth on Hydroform concentration, the wet weights of bacterial cultures growing in MM with different amounts of Hydroform (from 10.5 to 105 mg · ml⁻¹) were measured. The growth kinetic parameters maximum growth rate (µ_{max}) and K_s were calculated from the exponential phase of growth (between 0 and 12 h) and a Monod plot produced. Growth kinetic parameters were also calculated for bacteria growing in MM with various concentrations of NMP (from 0.5 to 25 mg · ml⁻¹) as the sole carbon and nitrogen source. All experiments were performed in triplicate, and comparisons between measured values were performed using the Student *t* test.

Hydroform characterization. The components present in Hydroform were separated by vacuum distillation. The system was heated to 120°C, and two liquid fractions, at 30°C and 60°C, and a residual solid were obtained. The liquid fractions were analyzed by gas chromatography coupled to a mass spectrometry detector (GC-MS) (HP 6890 series and HP 5973, respectively) with a 5% phenyl methyl siloxane capillary column (30 m by 0.25 mm by 20 µm). The oven was heated from 50°C to 100°C at 20°C · min⁻¹. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 1.8 ml · min⁻¹, and the injection volume was 1 µl. The residual solid was analyzed by nuclear magnetic resonance (¹H NMR and ¹³C NMR) (Unity Inova model, 300 MHz; Varian) and by infrared spectroscopy (IRS) (4,000 to 400 cm⁻¹) in a Fourier transform infrared (FTIR) 1605 Perkin-Elmer apparatus.

Identification of bacterial enzymatic activities related to PU degradation. (i) **Microbiological tests.** Three different microbiological media were used to determine which enzymatic activity (protease, urease, or esterase activity) related to PU degradation *Alicyclophilus* sp. strains were able to produce. To detect protease activity, the strains were subcultured in YES medium plates (composition in g · liter⁻¹: K₂HPO₄, 1.0; KH₂PO₄, 0.5; MgSO₄ · 7H₂O, 0.5; MnCl₂ · 4H₂O, 0.001; CaCl₂ · 2H₂O, 1.4 × 10⁻²; ZnCl₂, 1.1 × 10⁻²; CoCl₂ · 6H₂O, 2 × 10⁻²; Na₂MoO₄ · 2H₂O, 1.3 × 10⁻²; FeCl₃ · 6H₂O, 7.5 × 10⁻²; agar, 15; and gelatin, 0.02; pH 7). After 48 h of incubation at 37°C, the plates were stained with Coomassie blue R-250 (0.1% in acetic acid:methanol, 3:1, vol/vol) for 30 min and washed with acetic acid:methanol (3:1, vol/vol). A clear, nonstained zone of degradation was observed around colonies exhibiting proteolytic activity (19). To detect urease activity, the strains were subcultured in Christensen's urea agar (11) (composition in g · liter⁻¹: urea, 20; agar, 15; NaCl, 5; KH₂PO₄, 2; peptone, 1; glucose, 1; and phenol red, 0.012). After 48 h of incubation at 37°C, a pink coloration was observed around colonies showing

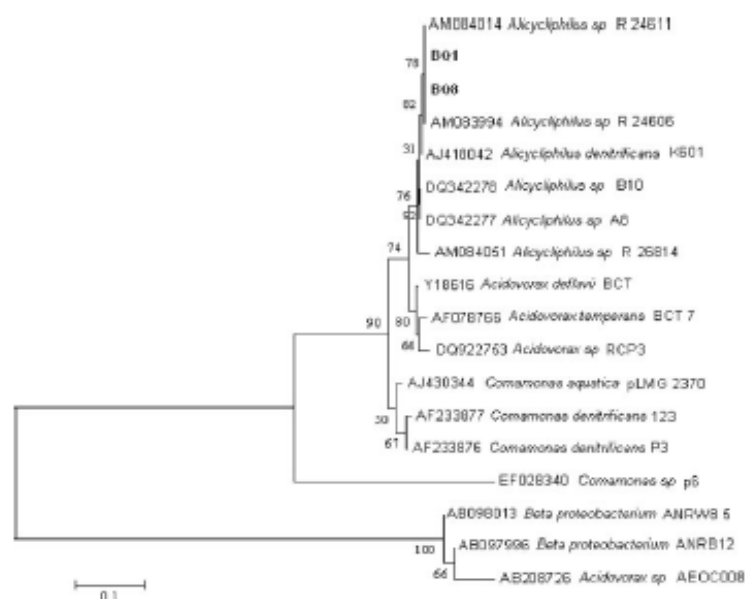


FIG. 1. Dendrogram showing the phylogenetic relationships of strains BQ1 and BQ8 to *Alicyclophorus* sp. A phylogenetic analysis of a 720-bp fragment (corresponding to positions 30 to 750 of the *E. coli* 16S rRNA gene) of the 16S rRNA gene was performed with the MEGA program, version 3.1. The Kimura two-parameter method was used to calculate evolutionary distances, and dendrograms were constructed according to the neighbor-joining method. Bootstrap values were calculated by using 500 replicates. Numbers at branching points refer to bootstrap values (500 resamplings).

urease activity. To identify esterase activity, the strains were subcultured in Tween 80 agar (41) (composition in g · liter⁻¹: peptone, 30; NaCl, 5; CaCl₂, 0.1; and agar, 12 [plus Tween 80, 10.0 ml · liter⁻¹]) and incubated for 120 h at 37°C. A white precipitation halo was observed around colonies showing esterase activity. A *Pseudomonas* sp. culture was used as a positive control for the three tests.

(ii) **Enzymatic assays.** To determine the presence of extracellular enzymatic activities related to PU degradation, protease, urease, and esterase activities were measured in cell-free supernatant (SN) portions of MM-PUh bacterial cultures, after different times of incubation, obtained by centrifugation at 5,000 × g for 5 min (Sorval RCS PLUS). Linearity of the enzymatic assays had been tested previously by using different reaction times and enzyme amounts. Protease activity was determined spectrophotometrically by measuring casein hydrolysis (26). Casein buffer solution (400 μl) (1% casein in 50 mM potassium phosphate buffer, pH 7) was preincubated at 37°C for 3 min. The reaction was started with 100 μl of enzyme extract, and after 10 min of incubation, 500 μl of 100% trichloroacetic acid was added. The tubes were centrifuged at 5,000 × g for 5 min. The SNs were collected and the absorbance measured at 280 nm with a UV-VIS Ultraspec 2000 instrument (Pharmacia-Biotech). For blank tubes, the enzyme extract was added after trichloroacetic acid. A protease activity standard curve was constructed by incubating different amounts (1 to 20 mU) of fungal proteinase K (product no. 5530UA; Gibco BRL) under similar conditions. Urease activity was determined by a phenol hypochlorite assay (45). Potassium phosphate buffer (180 μl) (50 mM, pH 7) plus 100 μl of 5 M urea was preincubated at 37°C for 3 min. The reaction was started by the addition of 20 μl of enzyme extract and incubated for 3 min. After incubation, 100 μl of phenol solution [7% phenol, 0.34% sodium nitroprussiate [Na₂Fe(CN)₅NO · 2H₂O]] was added, followed by 200 μl of NaClO solution (0.37 M NaOH, 1 M Na₂HPO₄ · 12H₂O, 1% NaClO; pH 12). Immediately after the addition of these solutions, the absorbance was read at 639 nm with a UV-visible Ultraspec 2000 instrument (Pharmacia-Biotech). Blank tubes were prepared for each sample by addition of the enzyme after the NaClO solution. *Proteus mirabilis* culture SN was used as the enzyme source for

positive controls. To determine the amount of NH₄⁺ released in the reaction, a standard curve was performed by using NH₄Cl and phenol and NaClO solutions as described above. Esterase activity was measured spectrophotometrically by a *p*-nitrophenyl acetate (*p*-NPA) hydrolysis method (13). The reaction was carried out at 37°C at 1 ml final volume containing 250 μl reaction buffer (200 mM phosphate, pH 7.5), 100 μl enzyme extract, 400 μl of water, and 250 μl of a 20 mM solution of *p*-NPA in acetonitrile. The reaction was started by adding the substrate and the A₄₀₅ recorded 30 s after the start of the reaction and at further 1-min intervals for 5 min. *p*-NPA chemical hydrolysis was calculated from blank experiments performed with SN from a noninoculated MM-PUh. The measurements of chemical hydrolysis were subtracted from those from experiments with enzyme preparation. A standard curve was constructed to measure the hydrolysis of *p*-NPA by incubating different concentrations of the reagent under conditions similar to those used for the enzymatic assay but using 100 μl 1 M NaOH.

GC-MS analysis of the MM-PUh SN after bacterial culture. Cell-free SNs of MM-PUh cultures (2 ml) taken at different incubation times were extracted with chloroform (1 ml). The organic phase was recovered using a Pasteur pipette and transferred to a fresh tube. A small amount of sodium sulfate was added to eliminate water. The sample was analyzed in a GC-MS system as described in "Hydroform characterization" above. The concentration of NMP in the samples was quantified based on a standard curve (0.6 to 24.6 mM) constructed with pure NMP (catalog no. M6762; Sigma). The measurements were performed in triplicate.

IRS-FTIR analysis of PU after bacterial growth. Three samples of solid PU were obtained from the SNs of 5-day MM-PUh cultures inoculated with the bacterial strains by using noninoculated MM-PUh cultures as the control. The solid obtained from SNs by drying in vacuo was pelleted and analyzed by IRS-FTIR as described in "Hydroform characterization" above.

SEM. Solid PU sheets 3 mm thick were prepared by pouring Hydroform into a petri dish, drying in an oven at 65°C, and then cutting into 1-cm² pieces. Five pieces were incubated in MM-PUh inoculated with each bacterial strain for 15 days at 37°C. The same number of polymerized PU pieces was incubated in

noninoculated MM-PUh under similar conditions. After incubation, sheets were recovered, rinsed with water, gold coated by evaporation, and analyzed by scanning electron microscopy (SEM) using a JEOL 5900 LB microscope at $\times 500$ magnification.

RESULTS

Two *Alicyclophilus* sp. strains were isolated by using MM-PUh. Inoculation of deteriorated flexible PU foam pieces, collected from a refuse dump, in MM-PUh and subsequent rounds of selection in MM-PUh agar allowed us to obtain several bacterial isolates. The two bacterial strains (BQ1 and BQ8) which showed the best growth in MM-PUh were selected for study. According to biochemical characterization, both strains were identified as members of the *Comamonadaceae* family. However, although both were positive for reduction of nitrate, adipic and malic acid assimilation, and cytochrome oxidase, small differences, such as the arginine dihydrolase test positive for strain BQ1 and negative for BQ8 and BQ8 positive but BQ1 negative for assimilation of potassium gluconate, were observed. Analysis of the partial 16S rRNA gene sequence confirmed the observation that strains BQ1 (GenBank accession no. EF463077) and BQ8 (GenBank accession no. EF463078) cluster with the family *Comamonadaceae* of *Betaproteobacteria* and showed that, although they are closely related to the members of this family *Acidovorax* sp. and *Comamonas* sp., they cluster with the genus *Alicyclophilus* (Fig. 1). Strain BQ1 had 100% identity and strain BQ8 99% identity with *Alicyclophilus* sp. strain R-24611 (GenBank accession no. AM084014) and 99% and 98%, respectively, with strain K601 (GenBank accession no. AJ418042). Strain K601, *Alicyclophilus denitrificans*, is the type species, a new genus and new species (29). Strain R-24611 was isolated from activated sludge and cultivated in growth media with ethanol or succinate as the carbon source and with nitrate as the nitrogen source (17) (Fig. 1). Some branching patterns (those with bootstrap values lower than 75%) cannot be considered stable. It is possible that higher bootstrap values would be obtained if more members of this species were sequenced and included in the analysis.

Growth in MM-PUh showed a hyperbolic behavior, with an exponential growth phase between 4 and 12 h and the stationary phase starting around 60 h of incubation (Fig. 2A). BQ1 showed a higher maximum growth ($17.8 \pm 0.6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) than BQ8 ($14.0 \pm 0.6 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) after 100 h of culture. The dependence of bacterial growth on the Hydroform concentration (from 10.5 to 105 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) showed a hyperbolic pattern (Fig. 2B), with μ_{max} values of 3.94 ± 0.2 and $4.55 \pm 0.6 \text{ h}^{-1}$ for BQ1 and BQ8, respectively, and K_s values of 16.9 ± 3.5 and $27.7 \pm 1.9 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ for BQ1 and BQ8, respectively. Statistically significant differences ($P = 0.05$) between K_s values were observed, suggesting that BQ1 is more efficient than BQ8, since it reached half of the maximum growth with a lower concentration of Hydroform.

Hydroform is a polyester PU. Since the Hydroform chemical composition has not been published, analyses to determine the type of compounds and the nature of the PU present were performed. Hydroform was vacuum distilled and two liquid fractions, corresponding to 71.5% of the total volume, were obtained, together with a solid residue. GC-MS analysis of the distilled fractions showed that the larger of these (50% of the

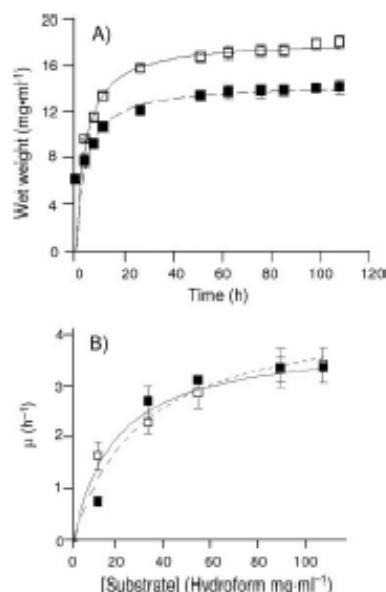


FIG. 2. Growth of *Alicyclophilus* sp. in MM-PUh. (A) Wet weight was recorded during 115 h of culture in an MM with 1% (vol/vol) ($10.5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) of Hydroform (MM-PUh) as the only carbon source (BQ1, \square ; BQ8, \blacksquare). The experiments were performed in triplicate. Bars indicate standard deviations. (B) Dependence of *Alicyclophilus* sp. growth on Hydroform concentration. MM with different concentrations of Hydroform (10.5 to $105 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) as the sole carbon source were used to cultivate BQ1 (\square) and BQ8 (\blacksquare) strains. Wet weight values measured at the exponential growth phase (0 to 12 h) were used to construct the Monod plot. The experiments were performed in triplicate. Bars indicate standard deviations.

total volume) was water. The remaining 20% comprised a mixture of NMP and two dipropylene glycol methyl ether isomers (DPGME and DPGME2) (Fig. 3A). NMR analysis from the solid residue (Fig. 3B) showed the presence of ester bonds at peaks 3.6 to 3.9, 7.9, and 8.4 ppm in the ^1H NMR spectrum and at 44 to 50, 63, and 66 to 70 ppm in the ^{13}C NMR spectrum (Table 1). The IRS-FTIR analyses of the solid residue confirmed the ester bond at peak 979 cm^{-1} , the amide group at $1,534$ to $1,547 \text{ cm}^{-1}$, and the carbonyl group of the ester bond at $1,722$ to $1,735 \text{ cm}^{-1}$, characteristic of PU (data not shown). Data obtained from these analyses allow us to propose that PU in Hydroform is a polyester type and has the structure presented in Fig. 3C.

***Alicyclophilus* sp. was able to utilize NMP.** To determine whether the *Alicyclophilus* sp. strains were able to utilize the other carbon compounds differently than the PU (NMP or DPGME) present in the Hydroform, chloroform extracts of the MM-PUh cell-free SNs were analyzed by GC-MS after different incubation times (0, 3, 6, 9, and 12 h). Analyses showed that NMP, but not the DPGME isomers, was consumed during the growth of the bacteria in inoculated media (Table 2). BQ1 consumed NMP at a higher rate (0.34

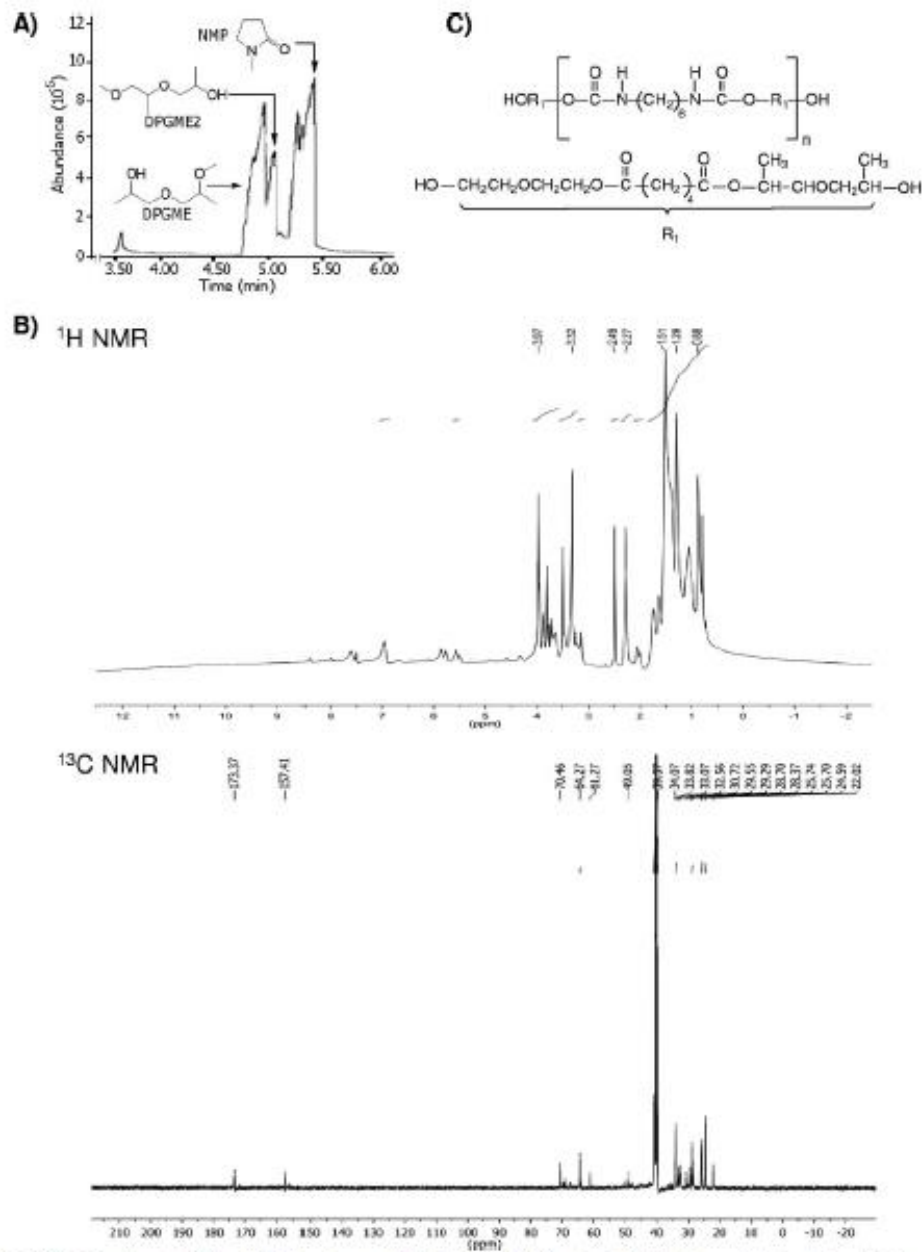


FIG. 3. Hydroform characterization. (A) Chromatogram obtained from GC-MS analysis of chloroform-extracted cell-free SNs from noninoculated MM-PUh cultures. (B) $^1\text{H NMR}$ and $^{13}\text{C NMR}$ spectra of PU present in Hydroform. An analysis of the spectra is presented in Table 1. (C) Proposed chemical structure of PU present in Hydroform.

TABLE 1. NMR spectrum analysis of solid Hydroform

NMR analysis	Displacement (ppm)	Functional group	Multiplicity	Integration
¹ H NMR	0.88	CH ₃	Doublet	3
	1.29	HO-CH-	Single	1
	1.51		Quintuplet	3
	2.27		Triplet	1
	2.49		Single	3
	3.32	CH ₂ -N	Single	1
	3.97	HO-CH ₂ -	Doublet	3
	5.57	Acid		Traces
6.96	Acid		Traces	
¹³ C NMR	24.59	CH ₃		
	25.70	CH ₂		
	28.70	C-N		
	33.82	HO-CH ₂		
	61.27	CH ₂ -C-N		
	39.5-41			

$\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$) than BQ8 ($0.16 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{ml}^{-1}$). Both NMP and DPGME remained in incubated and noninoculated media during this period.

To demonstrate that *Alicyclophilus* sp. strains were able to utilize NMP as their sole carbon and nitrogen source, the dependence of their growth on NMP concentration (from 0.5 to 25 $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) in an MM without other sources of carbon or nitrogen was determined by recording wet weight increases during the exponential growth phase (between 0 and 12 h). μ_{max} values were 0.87 ± 0.04 and $0.94 \pm 0.08 \text{ h}^{-1}$ for BQ1 and BQ8, respectively, and K_s values were 7.0 ± 0.9 and $8.9 \pm 1.9 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$ for BQ1 and BQ8, respectively. No statistically significant differences between them were observed. Calculated values denote that both strains were able to sustain their growth based on NMP. Experiments testing the capacities of BQ1 and BQ8 to sustain their growth by using 2-pyrrolidone (2-P), an NMP-related compound, showed that none of the *Alicyclophilus* sp. strains were able to do it (data not shown).

Esterase activity, but not protease or urease activity, is induced in *Alicyclophilus* sp. growing in MM-PUh. Protease, urease, esterase, and lipase activities identified in polyurethano-lytic microorganisms have previously been shown to be

TABLE 2. Concentrations of NMP in the SNs of MM-PUh during the growth of *Alicyclophilus* sp.

Time (h)	NMP concn ($\mu\text{mol} \cdot \text{ml}^{-1}$) (SD)	
	BQ1	BQ8
0	4.225 (0.21)	3.204 (0.60)
3	4.118 (0.30)	2.539 (0.07)
6	2.719 (0.21)	2.111 (0.38)
9	1.322 (0.18)	1.682 (0.36)
12	0.142 (0.00)	1.307 (0.02)

associated with PU degradation (18, 19, 20, 30, 35, 36). To determine which activity was displayed by *Alicyclophilus* sp. strains, the strains were grown in three differential media. Growth in YES-gelatin and Christensen agar indicated that both strains were protease and urease negative. However, growth in Tween 80 medium showed precipitation around the colonies, indicating that the strains were esterase positive (data not shown). To detect the presence of extracellular esterase activity, cell-free SNs of inoculated MM-PUh cultures were used to measure this activity by the *p*-NPA method. Esterase activity was not detected after 6 and 10 h, even when the SN was concentrated 5 \times , but was clearly detected after 12 h of incubation. At 18 h, the maximum activity presented by the

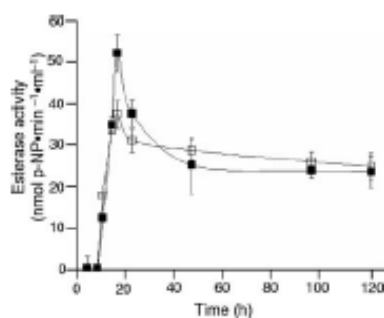


FIG. 4. Esterase activity in culture medium SN. Cell-free SNs (100 μl) of BQ1 (\square) and BQ8 (\blacksquare) cultures grown in MM-PUh were used to measure esterase activity by the *p*-NPA method. The experiments were performed in triplicate for each point. Bars indicate standard deviations.

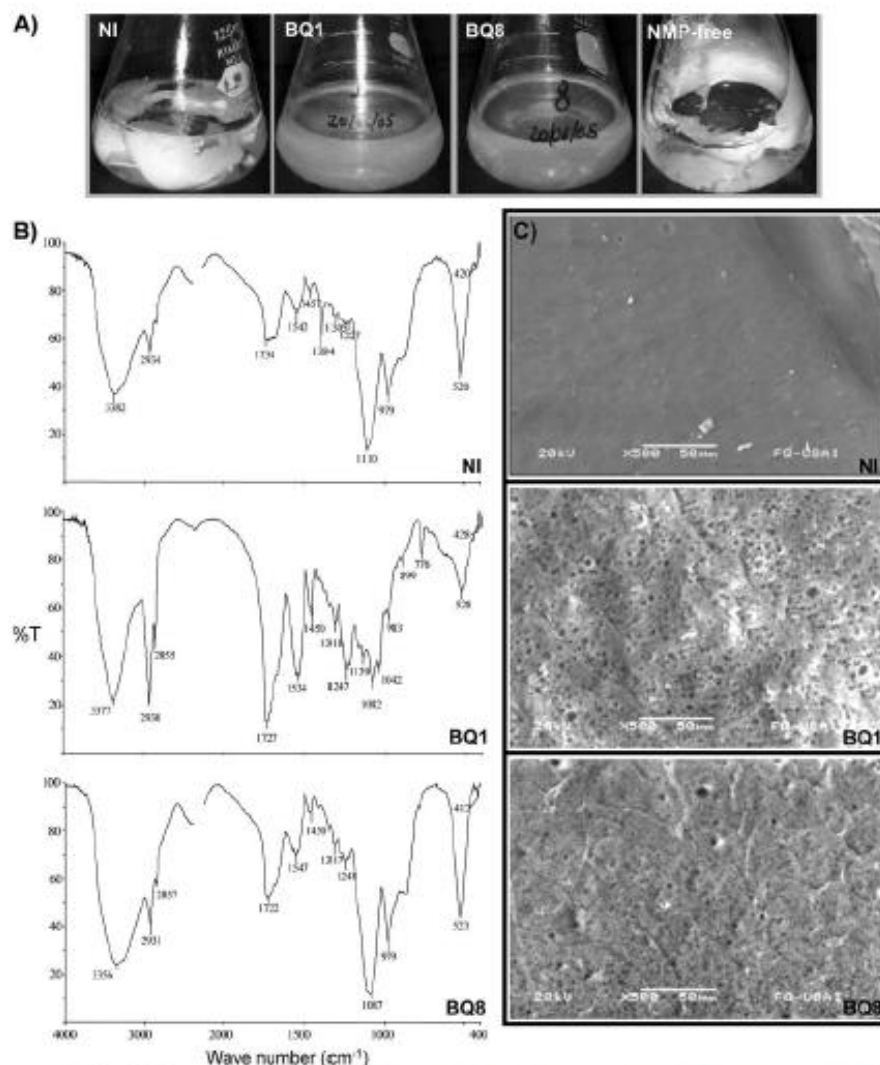


FIG. 5. Effect of *Alicyclophilus* sp. culture on PU characteristics. (A) Inhibition of polymerization. MM-PUh noninoculated (NI) or inoculated with BQ1 or BQ8 and NMP-free MM-PUh were incubated at 37°C for 5 days in a rotary shaker incubator. After that time, cell-free SNs were sterilized. NMP-free MM-PUh was prepared using dialyzed Hydroform (analyzed by GC-MS to confirm that no NMP was present). The figure depicts the SNs of each culture after sterilization. (B) IR-FTIR analysis. MM-PUh NI or inoculated with *Alicyclophilus* sp. strain BQ1 or BQ8 was incubated at 37°C for 120 h. Cell-free SNs were vacuum dried to obtain the solid component (PU). PU was analyzed by IR-FTIR. Relevant peaks are indicated. (C) SEM analysis of polymerized Hydroform sheets. MM-PUh containing 3-mm-thick sheets (1 cm by 1 cm), NI or inoculated with BQ1 or BQ8. After 15 days of culture, the sheets were recovered, rinsed with water, gold coated by evaporation, and analyzed by SEM. Five sheets were incubated and analyzed for each culture. Representative results are shown.

esterase was 25% higher for BQ8 (52 ± 3.6 nmol *p*-NP · min⁻¹ · ml⁻¹) than for BQ1 (38 ± 2.2 nmol *p*-NP · min⁻¹ · ml⁻¹). Beyond this point, activity began to decrease, remaining at 120 h of culture at approximately at 46%

and 68% of the maximum (24 ± 4.0 and 26.5 ± 4.0 nmol *p*-NP · min⁻¹ · ml⁻¹) for BQ8 and BQ1, respectively (Fig. 4). Esterase activity was not detected in SNs of LB broth cultures at 8 or 16 h, even if the SN at 8 h was concentrated 5× (data

not shown). These results demonstrate that esterase activity was induced by the presence of compounds having ester linkages, such as Tween 80 or polyester PU. Protease and urease activities were also measured in cell-free SNs of inoculated MM-PUH cultures at the same times and during the same period as for esterase. None such activities were detected even though the assays were performed with 10 \times -concentrated SN.

Effect of *Alicyclophilus* sp. growth on PU. To determine if these strains were also able to attack the PU component of Hydroform, a number of aspects were analyzed. The effect of *Alicyclophilus* sp. on the PU present in the liquid MM-PUH was determined by analyzing the polymerization of PU after bacterial growth. Inoculated and noninoculated MM-PUH were incubated for 5 days, after which the cell-free SN was sterilized. After this treatment, the PU present in noninoculated medium was found to have polymerized (white precipitate), while PU from inoculated media had not (Fig. 5A, left three panels). To demonstrate that the absence of NMP in the inoculated media caused by early bacterial growth was not the cause of the loss of polymerizing properties in PU, MM-PUH was prepared using NMP-free Hydroform. The latter was obtained by dialysis and analyzed by GC-MS to confirm the absence of NMP. This medium was incubated for 5 days without inoculation and then sterilized. After incubation, it was found that NMP-free MM-PUH did in fact polymerize, indicating that the absence of NMP was not the cause of the lack of polymerization observed (Fig. 5A, far-right panel). These results indicate that bacterial activity had changed the properties of the PU present in the inoculated media, as a result inhibiting its polymerization.

The chemical composition of solid PU after bacterial growth was therefore analyzed. For this, bacteria were cultured in MM-PUH for 5 days, after which the SN was removed and vacuum dried and the residual solid analyzed by IRS-FTIR. Analysis revealed that carbonyl (1,734 cm⁻¹) of the ester signal (979 cm⁻¹), observed in solid PU not exposed to bacterial growth (Fig. 5B, top), increased in the solid obtained from the SN after culture with BQ1 (1,727 cm⁻¹); at the same time, the ester signal decreased, and other signals corresponding to ether, methyl, methylene, and terminal alcohols (983 to 1,450 cm⁻¹) appeared (Fig. 5B, middle). These changes indicate that ester bonds were hydrolyzed, producing increases in the signals of the indicated groups, in BQ1-exposed media. The amide signal (1,530 to 1,550 cm⁻¹) increased in BQ1-exposed PU, discarding the hypothesis of hydrolysis of this group by a protease or urease activity. The spectrum presented by BQ8-exposed PU showed less ester hydrolysis than BQ1-exposed PU (Fig. 5B, bottom). These results indicate that BQ1 growth affects PU-ester bonds but not urethane bonds and that BQ8 growth does not affect them to the same extent.

To study the effect of growth of *Alicyclophilus* strains on polymerized PU, thin polymerized Hydroform sheets were incubated for 15 days in liquid media inoculated with the two bacterial strains. After that time, sheets were viewed by SEM, which showed that sheets exposed to BQ1 had numerous holes on their surface (Fig. 5C, middle), whereas those exposed to BQ8 had few holes (Fig. 5C, bottom). These results clearly indicate that BQ1 can attack solid PU and that, while BQ8 also attacks PU, it does so to a lesser extent.

DISCUSSION

In this work, two strains able to grow in PU were isolated by several rounds of selection in a medium comprising Hydroform, a commercial aliphatic, water-based PU, as the only carbon source. By sequencing of the 16S rRNA gene, the two strains were identified as *Alicyclophilus* sp. *Alicyclophilus denitrificans*, the first bacterium classified in this genus, is a new genus and new species reported as a denitrifying and cyclohexanol-degrading bacterium (29) belonging to the *Comamonadaceae* family in the *Beta*proteobacteria class. The name *Alicyclophilus* means alicyclic compound liking, referring to the substrates used for the isolation of this organism (29). This genus is phylogenetically related to *Acidovorax defluvi* and *Comamonas denitrificans*, which have previously been isolated from activated sludge (15, 40). Moreover, another bacterium of the *Comamonadaceae* family, *C. acidovorans*, has been reported as being able to use various types of PU to sustain its growth (2, 30).

Chemical characterization of Hydroform by NMR, IRS, and GC-MS showed that it was composed of a polyester-type PU, NMP, and two DPGME isomers. We found that *Alicyclophilus* sp. consumed NMP present in Hydroform during its early phase of growth. Moreover, we were able to confirm that NMP was utilized by the isolated bacteria, since both strains were found to grow in an MM with NMP as the sole carbon and nitrogen source. *Pseudomonas aeruginosa* was reported as being able to use 2-P, an NMP-related compound, as the nitrogen and carbon source, but it was unable to use NMP (33). On the contrary, *Alicyclophilus* sp. was able to use NMP but not 2-P. As far as is known, this is the first report of a bacterium being able to utilize NMP to sustain growth. Since the toxicity of NMP has been recognized, our finding that *Alicyclophilus* sp. is able to consume NMP could be of great relevance in biotechnology research directed towards avoiding the toxic consequences of its release into the environment.

Experiments with differential media and by measurements of protease and urease activities in SNs of MM-PUH inoculated with these bacteria at different growing times demonstrated that the isolated *Alicyclophilus* sp. strains did not exhibit protease or urease activity. However, esterase activity was detected in Tween 80 media, and by using the *p*-NPA assay, the esterase activity secreted to the culture medium was measured. A lipase activity has been identified in *Bacillus subtilis* (35), and extracellular esterase activities have been reported for *Pseudomonas chlororaphis* and *Comamonas acidovorans* growing in media with Impranal (2, 20, 36). In *C. acidovorans* TB-35, an extracellular esterase and a membrane-associated esterase have been identified (30). Analysis of these esterase activities on solid PU and poly(diethylenglycol adipate) has demonstrated that only the membrane-associated esterase was able to degrade poly(diethylenglycol adipate) and PU, this being the one with polyurethanololytic activity (1). Based on the changes observed in the IR spectra of the solid PU obtained from the SN of MM-PUH after culture with strain BQ1 (Fig. 5B), we determined that it was ester groups that were being affected by a bacterial esterase activity. Whether the extracellular esterase activity detected in *Alicyclophilus* sp. was responsible for the PU attack or whether there was membrane-associated esterase activity will be the subject of further investigation. The absence

of an extracellular esterase activity when *Alicyclophorus* sp. grows in LB broth and detection of this activity at 12 h of culture in MM-PUh, by which time NMP has greatly diminished in the culture medium, suggest that esterase activity is induced in response to the chemical composition of the medium. In previous studies, a medium containing Impranal supplemented with yeast extract has been used to characterize polyurethanololytic bacteria (2, 19, 20, 35, 36). It might be possible that the presence of molecules more easily consumed than PU and which could also be utilized as a carbon source could help in the establishment of polyurethanololytic bacteria in PU media. This early growth might activate the expression of genes encoding proteins involved in the efficient utilization of PU, for example, esterase and other proteins needed for the uptake and metabolism of molecules produced after breakdown of PU-ester bonds. In this work, the presence of NMP and its utilization during early growth of *Alicyclophorus* sp. might provide an easily used carbon source, but after it has been exhausted, esterase activity has to be induced to allow the bacteria to utilize PU, a more complex carbon source.

Various data demonstrate the capacity of *Alicyclophorus* sp. to degrade PU, including a loss of polymerizing ability of PU after exposure to bacteria culture, indicating the loss of groups needed for the polymerization reaction. These groups could be lost by cleavage of ester bonds, generating carboxyl groups and short-chain alcohols unsuitable for polymerization. IRS analysis, in which the PU-ester bond peaks disappeared and carbonyl group signals increased in the PU spectrum after culture with the BQ1 strain, supports this suggestion. More work might be done to confirm this reaction. A more graphic demonstration was the observation of the numerous holes produced in polymerized PU after bacteria culture. Despite the fact that both *Alicyclophorus* strains share certain characteristics, such as the ability to grow in MM-PUh and NMP, the production of extracellular esterase activity when they grow in MM-PUh, and loss of the polymerizing capacity of PU after their growth, the action of BQ1 on PU seems to be more effective than that of BQ8. A more detailed analysis demonstrates that, although BQ8 showed higher extracellular esterase activity (measured by the *p*-NPA method) than BQ1, it reached a lower maximum growth in MM-PUh (10.5% Hydroform), it had larger K_s values for PU, it almost did not alter ester bond signals in IR spectrum after its growth, and it did not produce as many holes in polymerized PU as BQ1. These observations reflect the distinct genetic and biochemical backgrounds of both strains and suggest that differences, for example, in biochemical mechanisms of the esterase activity over PU, existence of other degradative activities for PU attack, diverse transporters of PU breakdown products, or different catabolic pathways inside the cell, might exist between the two strains. Work is being performed in our laboratory to identify the enzymes and the genes encoding them which participate in the different pathways involved in PU degradation. In conclusion, in this paper we report two important findings: the ability of *Alicyclophorus* sp. to utilize NMP as a carbon and nitrogen source, which is the first report of a microorganism able to do this, and the capacity of *Alicyclophorus* sp. to attack PU due to an esterase activity.

ACKNOWLEDGMENTS

NMR, IRS-FTIR, and SEM techniques were performed at Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI), Facultad de Química, UNAM. Biochemical tests for strain identification were performed by Alejandro Camacho, Facultad de Química, UNAM. We are grateful to Fernando Pérez Lara and Brenda Porta-Briseno for their help with GC-MS, NMR, and IRS-FTIR analyses and to León Patricio Martínez for his assistance with the phylogenetic analysis.

This study was partially supported by a PAIP-FQ-UNAM 6290-04 grant to H.L.-T. A.O.-C., A.C.-G., and S.B.-N. are grateful to CONACYT for scholarships.

REFERENCES

1. Akutsu, Y., T. Nakajima-Kambe, N. Nomura, and T. Nakahara. 1998. Purification and properties of a polyester polyurethane-degrading enzyme from *Coscinomonas acidovorans* TB-35. *Appl. Environ. Microbiol.* 64:62-67.
2. Allen, R. A., N. P. Hilliard, and G. T. Howard. 1999. Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Coscinomonas acidovorans*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 43:37-41.
3. Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1994. Current protocols in molecular biology, vol. 1, p. 2.4.1-2.4.4. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
4. Badier, M., S. A. Keener, and R. Wrbitzky. 2005. Dermal absorption and urinary elimination of N-methyl-2-pyrrolidone. *Int. Arch. Occup. Environ. Health* 78:673-676.
5. BASF Intermedialen. 1994. N-Methylpyrrolidone biodegradability. BASF Intermedialen, Ludwigshafen, Germany. http://www.basf.com/diols/pdfs/nmp_brochure_biod.pdf.
6. Center for the Polyurethanes Industry. 2006. Year in review. Center for the Polyurethanes Industry, Arlington, VA. http://www.polyurethane.org/s_apl/bn.asp?CID=820&DID=4985&DOC=FILE.PDF.
7. Center for the Polyurethanes Industry. 2007. Polyurethane: history. Center for the Polyurethanes Industry, Arlington, VA. http://www.polyurethane.org/s_apl/sec.asp?CID=853&DID=3487.
8. Center for the Polyurethanes Industry. 2007. Recycling and waste reduction. Center for the Polyurethanes Industry, Arlington, VA. http://www.polyurethane.org/s_apl/sec.asp?CID=867&DID=3520.
9. Chapin, K. C., and P. R. Murray. 1995. Media, p. 1687-1707. In P. R. Murray, E. J. Baron, M. A. Tenover, F. C. Tenover, and R. H. Tenover (ed.), *Manual of clinical microbiology*, 7th ed. ASM Press, Washington, DC.
10. Chow, S. T., and T. L. Ng. 1983. The biodegradation of N-methyl-2-pyrrolidone in water by sewage bacteria. *Water Res.* 17:117-118.
11. Christensen, W. B. 1946. Urea decomposition as a means of differentiating *Proteus* and paracolon cultures from each other and from *Salmonella* and *Shigella* types. *J. Bacteriol.* 52:461-466.
12. Darby, R. T., and A. M. Kaplan. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *Appl. Microbiol.* 16:900-905.
13. Desphande, M. V., K. E. Eriksson, and L. G. Petersson. 1984. An assay for selective determination of exo-1,4- β -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Anal. Biochem.* 138:481-487.
14. Federal Register. 1994. Addition of certain chemicals; toxic chemical release reporting; community right-to-know. *Fed. Regis.* 59:61432-61485.
15. Gumaellus, L., G. Magnusson, B. Petersson, and G. Dalhammar. 2001. *Coscinomonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:999-1006.
16. Hass, U., B. M. Jakobsen, and S. P. Lund. 1995. Developmental toxicity of inhaled N-methylpyrrolidone. *Pharm. Toxicol.* 78:406-409.
17. Heylen, K., B. Vanparys, L. Wittebolle, W. Verstraete, N. Boon, and P. de Vos. 2006. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:2637-2643.
18. Howard, G. T. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 40:245-252.
19. Howard, G. T., and R. C. Blake. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethane-protease enzyme. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 42:213-220.
20. Howard, G. T., C. Rutz, and N. P. Hilliard. 1999. Growth of *Pseudomonas chlorocephala* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethane-esterase enzyme. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 43:7-12.
21. Jendrussek, D. 2001. Microbial degradation of polyesters, p. 293-325. In T. Scheper (ed.), *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, vol. 71. Springer-Verlag, Berlin, Germany.
22. Kay, M. J., R. W. McCabe, and L. H. G. Morton. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 31:209-225.
23. Lan, D.-H., C.-Y. Peng, and T.-S. Lin. 2004. Acute aquatic toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone to *Daphnia magna*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 73:392-397.
24. Lawson, P. A., P. Llap-Perez, R. A. Hutson, H. Hippe, and M. D. Collins.

1993. Towards a phylogeny of the Clostridia based on 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett.* 113:87-92.
25. Lee, K. P., N. C. Chromey, R. Cullik, J. R. Barnes, and P. W. Schneider. 1987. Toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone (NMP): teratogenic, subchronic, and two-year inhalation studies. *Fundam. Appl. Toxicol.* 9:222-235.
 26. Lovrien, R., and D. Marulis. 1995. Assays for total protein, unit 3.4, p. 3.4.4-3.4.24. In J. E. Coligan, B. M. Dunn, H. L. Ploegh, D. W. Speicher, and P. T. Wingfield (ed.), *Current protocols in protein science*. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.
 27. Malloy, P. J., and J. J. Bradna. 1992. Interpretation of aerobic bacterial growth on primary culture media, p. 1.6.1-1.7.1. In H. D. Isenberg (ed.), *Clinical microbiology procedures handbook*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
 28. Matsumura, S., Y. Soeda, and K. Toshima. 2006. Perspectives for synthesis and production of polyurethanes and related polymers by enzymes directed toward green and sustainable chemistry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 70: 12-20.
 29. Mochichi, T., E. Stuckebrandt, and G. Fuchs. 2003. *Alicyclophilus douajiriensis* gen. nov., sp. nov., a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing β -proteobacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53:147-152.
 30. Nakajima-Kambe, T., F. Onuma, Y. Akutsu, and T. Nakahara. 1997. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Cosmovers acidovorans* strain TB-35. *J. Ferment. Bioeng.* 83:456-460.
 31. Nakajima-Kambe, T., F. Onuma, N. Kimura, and T. Nakahara. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. *FEMS Microbiol. Lett.* 129:39-42.
 32. Nakajima-Kambe, T., Y. Shigeno-Akutsu, N. Nomura, F. Onuma, and T. Nakahara. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51:134-140.
 33. Nee, F. F., and W. J. Nickerson. 1958. Metabolism of 2-pyrrolidone and γ -aminobutyric acid by *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 75:674-681.
 34. Pathirana, R. A., and K. J. Seal. 1984. Studies on polyurethane deteriorating fungi. Part 2. An examination of their enzyme activities. *Int. Biodeterior.* 20:229-235.
 35. Rowe, L., and G. T. Howard. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lyase enzyme. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 50:33-40.
 36. Ruiz, C., T. Main, N. P. Hilliard, and G. T. Howard. 1999. Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlorocephala*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 43:43-47.
 37. Sallentfart, A. M., F. Gallissot, and G. Morel. 2003. Developmental toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone in rats following inhalation exposure. *Food Chem. Toxicol.* 41:583-588.
 38. Sallentfart, A. M., F. Gallissot, I. Langonne, and J. P. Sabate. 2002. Developmental toxicity of N-methyl-2-pyrrolidone administered orally to rats. *Food Chem. Toxicol.* 40:1705-1712.
 39. Santerre, J. P., R. S. Labow, D. G. Duguay, D. Erle, and G. A. Adams. 1994. Biodegradation evaluation of polyether and polyester-urethanes with oxidative and hydrolytic enzymes. *J. Biomed. Mater. Res.* 28:1187-1199.
 40. Schütze, R., S. Spring, R. Amann, I. Huber, W. Ludwig, K. H. Schlieffer, and P. Kampfer. 1999. Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax deffauvi* sp. nov. *Syst. Appl. Microbiol.* 22:205-214.
 41. Sierra, G. 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie Leeuwenhoek* 23:15-22.
 42. Solomon, G. M., E. P. Morse, M. J. Garbo, and D. K. Milton. 1996. Stillbirth after occupational exposure to N-methyl-2-pyrrolidone: a case report and review of the literature. *J. Occup. Environ. Med.* 38:705-713.
 43. Solomon, H. M., B. A. Burgess, G. L. Kennedy, and R. E. Staples. 1995. 1-Methyl-2-pyrrolidone (NMP): reproductive and developmental toxicity study by inhalation in the rat. *Drug Chem. Toxicol.* 18:271-293.
 44. Wen, W.-L., L.-J. Jiang, and C.-E. Tsung. 2001. Acute poisoning with the neonicotinoid insecticide imidacloprid in N-methyl pyrrolidone. *J. Toxicol. Clin. Toxicol.* 39:617-621.
 45. Witte, C.-P., and N. Medina-Escobar. 2001. In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Anal. Biochem.* 290:102-107.

8. DISCUSIÓN

8.1. Identificación por secuenciación de rDNA 16S

Las cepas bacterianas BQ1 y BQ8, capaces de crecer en PU fueron aisladas a partir de trozos de espuma de PU colectados en el basurero Bordo de Xochiaca y sembrados en un medio mineral con el barniz de PS-PU Hydroform como única fuente de carbono. Por secuenciación parcial del gen de rDNA 16S ambas cepas fueron identificadas como pertenecientes al género *Alicycliphilus* sp., mostrando estrecha relación con bacterias que degradan compuestos xenobióticos. *Alicycliphilus denitrificans* K601 fue la primera cepa asignada a este género y es la única especie descrita (Mechichi et al., 2003). Esta cepa es capaz de desnitrificar y degradar ciclohexanol. El nombre *Alicycliphilus* significa afinidad por compuestos alicíclicos, haciendo referencia a los compuestos utilizados en su aislamiento. *Alicycliphilus* está relacionado filogenéticamente con *Acidovorax defluvii* y *Comamonas denitrificans*, las cuales habían sido aisladas previamente a partir de lodos activados (Gumaelius et al., 2001, Schulze et al., 1999). Adicionalmente, otra bacteria de la familia *Comamonadaceae*, *Comamonas acidovorans*, ha sido reportada como capaz de usar varios tipos de PU para sostener su crecimiento (Allen et al., 1999, Nakajima-Kambe et al., 1997).

8.2. Caracterización del crecimiento a largo plazo

Al determinar el crecimiento de BQ1 y BQ8 midiendo D.O.₆₆₀ se observó un descenso a partir de las 13 y 16 h de incubación respectivamente, llegando hasta cero alrededor de las 96 h. Este comportamiento podría significar la muerte de las bacterias, sin embargo, la falta de una fase estacionaria (Figura 1) y la formación de agregados celulares a partir de las 13 y 16 h, sugirieron que dicho fenómeno corresponde a un cambio en su forma de organización celular. Debido a esto, el crecimiento de los cultivos se cuantificó midiendo el peso húmedo de la biomasa bacteriana. Esta medición mostró una fase exponencial entre las 4 y 12 h. A partir de esta etapa la velocidad de crecimiento disminuyó entrando en fase estacionaria y continuó así hasta las 120 h cuando se terminó el experimento.

Previamente se demostró que el Hydroform contiene *N*-metilpirrolidona (NMP), un solvente orgánico de bajo punto de ebullición, que BQ1 y BQ8 son

capaces de utilizar como fuente de carbono y nitrógeno. Durante las primeras horas de incubación en MM-PUh, BQ1 y BQ8 consumen NMP, la cual se termina alrededor de las 16 h (Oceguera-Cervantes, 2005). Este comportamiento indica que en la etapa inicial el crecimiento en suspensión de estas cepas y su velocidad de duplicación podrían sustentarse en el consumo de NMP. Una vez que ésta se agota, el crecimiento depende por completo del PU, el cual, al ser polímero alifático de alto peso molecular, es una fuente de carbono de baja bio-disponibilidad que requerirá de mecanismos de asimilación diferentes a los de compuestos en solución como la NMP. El cambio morfológico que presentan ambas cepas pudiera generar una mayor afinidad de la superficie celular por moléculas alifáticas grandes como el PU, facilitando así su consumo. Esto implicaría la necesidad de un cambio drástico en la red de vías metabólicas que se reflejará en la disminución de la velocidad de crecimiento. El comportamiento de BQ1 con respecto al de BQ8 muestra una pendiente de crecimiento ligeramente mayor en la fase exponencial, indicando una velocidad de crecimiento mayor y por lo tanto, mayor asimilación de los compuestos presentes en el Hydroform. En el caso de BQ1 esto se refleja en que la NMP se termina primero y da lugar a la formación de agregados celulares antes que BQ8. Además de que el consumo de NMP es más rápido por parte de la bacteria BQ1, esta bacteria alcanza un crecimiento mayor en todas las etapas, lo cual sugiere una mejor utilización de Hydroform que la bacteria BQ8.

8.3. Determinación de parámetros de crecimiento en MM-PUh

Se midió el crecimiento de BQ1 y BQ8 en cultivos de MM-PUh con diferentes concentraciones de Hydroform. Empleando la pendiente de la fase exponencial de crecimiento de cada cultivo se construyó el gráfico de Monod para ambas cepas. Los valores de μ_{\max} y K_s indican que la velocidad de crecimiento de BQ1 con respecto a la de BQ8 es mayor a concentraciones de Hydroform bajas y menor a concentraciones de Hydroform altas. BQ1 requiere menores concentraciones de Hydroform que BQ8 para alcanzar su máxima velocidad de crecimiento. Estos datos también apoyan la idea de que BQ1 utiliza el Hydroform como fuente de carbono de una manera más eficientemente que BQ8. A pesar de esto BQ8

alcanza velocidades de crecimiento mayores que BQ1 a concentraciones altas de Hydroform.

8.4. Determinación de los efectos bacterianos sobre Hydroform sólido

Además de las evidencias que se tienen sobre los efectos de BQ1 y BQ8 sobre el Hydroform líquido (Oceguera Cervantes, 2005) en este trabajo analizamos si también son capaces de atacar PU en su estado sólido, ya que es este estado al que el PU debe sus propiedades como material tan versátil. Se detectó que las láminas expuestas a BQ1 presentaron mayor número de poros, mismos que además fueron de mayor tamaño que los formados en las láminas expuestas a BQ8 (Figura 3). Este análisis demostró la capacidad que estas bacterias poseen para atacar PU sólido. Como se ha observado en estudios previos (Oceguera Cervantes, 2005) la capacidad de BQ1 para generar cambios físicos en el Hydroform ha sido más evidente que la de BQ8. En este análisis la observación vuelve a indicar que BQ1 es una cepa con mayor capacidad poliuretanolítica que BQ8.

8.5. Detección de la actividad de esterasa asociada a membrana y selección del detergente adecuado para su extracción

BQ1 y BQ8 fueron sometidas a un tratamiento de extracción proteica con ocho detergentes diferentes, para determinar la eficiencia de extracción de cada uno utilizando en cada caso una concentración equivalente a veinte veces la concentración miscelar crítica (CMC). Los análisis de actividad enzimática y de cantidad de proteína extraída indicaron la presencia de actividad esterasa en la mayoría de los extractos. Dicha actividad fue proporcional a la cantidad de proteína extraída por cada detergente.

Zwittergent 3-12 y desoxicolato de sodio fueron los detergentes que lograron extraer mayor cantidad de proteína y actividad. A diferencia de los demás detergentes empleados, éstos presentan una estructura esteroide de manera expuesta y sin modificaciones. Por lo tanto, es de esperarse que posean gran capacidad para disolver membranas, debido a que moléculas con estructura esteroide o de ciclopentanoperhidrofenantreno se encuentran intercaladas de manera natural entre los fosfolípidos de las membranas celulares. Dada la

presencia de una actividad esterasa en el extracto membranal de BQ1 y BQ8, se continuó con su purificación empleando Zwittergent 3-12 para su extracción.

8.6. Medición de la actividad esterasa asociada a membrana durante el crecimiento en MM-PUh

Tomado en cuenta los resultados de la cinética de crecimiento, en donde se observó mayor producción de biomasa a concentraciones de Hydroform altas, se decidió usar MM-PUh con 8.3% de Hydroform ($87.15 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ ó 2.5% de sólidos) para obtener una mayor cantidad de células en menor tiempo. Empleando estas condiciones se midió la actividad esterasa asociada a membrana a través del tiempo de cultivo. A partir del primer punto se detectó actividad de esterasa en ambos cultivos, dicha actividad se mantuvo en el mismo nivel (0.2 U) durante las primeras 10 h y posteriormente presentó un aumento súbito entre las 12 y 16 h a 0.8 U para luego decrecer por completo después de las 50 h de cultivo, lo cual sugiere que es una actividad inducible y que posteriormente desaparece porque ya no es necesaria.

8.7. Detección de la actividad esterasa por zimografía

La identificación de la actividad de esterasa en un SDS-PAGE es una herramienta muy útil a través de la marcha de purificación que ayuda a monitorear la presencia de la proteína de interés en las diferentes fracciones obtenidas en cada paso de purificación. Además, esta técnica posee la ventaja intrínseca de indicar que la proteína de interés que se trata de una enzima, aún posee actividad. Al usar el butirato de metil umbeliferona como sustrato de una actividad esterasa se generan dos productos de hidrólisis, el ácido butírico y el umbeliferol, éste tiene la propiedad de emitir fluorescencia azul al exponerse a luz ultra violeta (UV). Así, es posible observar bandas de proteína fluorescentes en un SDS-PAGE en los casos en que haya una actividad esterasa presente (Diaz *et al.*, 1999).

La efectividad del ensayo se comprobó empleando una esterasa comercial de *Pseudomonas fluorescens* como control positivo, observándose la presencia de bandas fluorescentes en los carriles correspondientes a los extractos con actividad esterasa. Empleando este ensayo de zimograma se monitoreó la actividad de esterasa de membrana a través del tiempo de cultivo. Al realizar el análisis por zimograma de los extractos proteicos también se midió la actividad de esterasa

por el método de *p*-NPA. La medición de la actividad de esterasa por el método de *p*-NPA fue coincidente con la intensidad de la fluorescencia detectada por zimograma que solo mostró una banda con actividad de esterasa Figura 5 y 6. Esto indicó que la actividad detectada por zimograma es la misma que se mide con *p*-NPA y que probablemente corresponda a una sola enzima.

8.8. Purificación de la actividad esterasa asociada a membrana, a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh, al 8.3% de Hydroform

Hasta este punto los resultados indicaron que en el extracto proteico de membranas de BQ1 y BQ8, existe una actividad esterasa con un tamaño aproximado de 19 kDa. Por lo tanto, se continuó con la purificación de esta actividad, en un proceso de tres pasos. El primero consistió en una precipitación con sulfato de amonio, reduciendo la cantidad de proteína total en un 75% y la actividad total en alrededor de 70% en ambos casos (BQ1 y BQ8). Esta relación resultó en aumento en actividad específica de 19%. A pesar de haber disminuido la cantidad de proteína total en una buena cantidad, la precipitación presentó la desventaja de disminuir la actividad total casi en la misma proporción. Esto pudo deberse a que, al cambiar la fuerza iónica y las condiciones de solubilidad, pudieron haberse generado alteraciones estructurales y químicas irreversibles que disminuyen la actividad sin posibilidad de ser recuperada a pesar de que se retiró todo el sulfato de amonio por diálisis.

La purificación continuó con una cromatografía de interacción hidrofóbica en Fenil Sefarosa CL-B4. A través de este paso, la proteína total disminuyó alrededor de un 99% y la actividad en un 97%. Este resultado indicó que la separación proteica que se obtuvo empleando esta resina fue muy poco selectiva, ya que la pérdida de actividad es proporcional a la disminución de proteína total. Esto puede deberse a la presencia de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ o a que la unión de la proteína a la resina fue muy débil y se fue perdiendo actividad en cada fracción eluida. Finalmente, se llevó a cabo una cromatografía de intercambio aniónico empleando la resina Q-Fast Flow, en este paso la cantidad de proteína total se redujo en un 99.9% y la actividad total en un 99.7%. Esto indica nuevamente que la unión a la resina es de baja especificidad y que finalmente solo se alcanzó una fracción que contiene mayor actividad que las demás fracciones obtenidas. La tabla de

purificación (Tabla 2) muestra que los resultados fueron similares en ambos casos. Debido a la estrecha relación filogenética que poseen BQ1 y BQ8 es de esperarse que las proteínas involucradas en la actividad de esterasa posean características similares y por lo tanto se comporten de manera similar a través del proceso de purificación.

8.9. Identificación de la actividad esterasa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 8.3% de Hydroform

La fracción con mayor actividad esterasa obtenida del proceso de purificación fue separada en un SDS-PAGE y posteriormente revelada empleando zimografía para actividad de esterasa (Figura 8). Se detectó una banda de alrededor de 19 kDa que fue enviada para su identificación por LC-MS-MS. El análisis mostró que las bandas con actividad esterasa de 19 kDa contenían, en ambos casos, tres proteínas. La comparación de secuencias obtenidas indicó que estas proteínas correspondían a una superóxido dismutasa, una proteína de la familia de las fasinas, ambas de *Acidovorax* sp. JS42 y un factor de reciclaje de ribosoma de *Comamonas testosteroni* KF-11. Estos resultados hacen referencia a proteínas pertenecientes a especies estrechamente relacionadas con *Alicyclophilus* sp. La proteína de la familia de las fasinas, está presente en gránulos de polihidroxicanoatos (PHA), los cuales son poliésteres. Estos gránulos se sintetizan en las bacterias como sistemas de almacenamiento de carbono. Dichos sistemas constan de tres tipos de proteínas: una polimerasa de PHA, una depolimerasa y una proteína de la familia de las fasinas. Las fasinas son proteínas estructurales del gránulo de PHA a las que además se les ha encontrado diferentes funciones, ninguna de ellas relacionada con actividad enzimática: i) activan la depolimerización de PHA, ii) incrementan la expresión y actividad de las PHA sintasas, iii) participan en la segregación del gránulo de PHA hacia las células hijas y iv) tienen actividad de chaperonas tanto *in vivo* como *in vitro* (Mezzina and Pettinari, 2016). Tomando en cuenta que en la banda analizada se detectaron tres proteínas y ninguna de ellas posee actividad esterasa, concluimos que la proteína responsable de esa actividad no pudo identificarse.

8.10. Exposición de Hydroform sólido a la actividad de esterasa de bacterias cultivadas en MM-PUh al 8.3% de Hydroform (v/v)

Las fotografías de microscopía electrónica mostraron en todos los aumentos obtenidos (500 a 10,000 X) que no hubo cambios en la superficie del polímero entre las láminas de prueba y las del control. Este resultado se observó tanto en las láminas expuestas al extracto membranal (que contenía la esterasa de 19 kDa y sin Zwittergent 3-12), como las que se expusieron al cultivo bacteriano. Estos resultados indican que BQ1 y BQ8 no se comportan de la misma manera en MM-PUh a diferentes concentraciones de Hydroform, ya que a 8.3% no presentan la capacidad poliuretanolítica que se observó al cultivarlas en MM-PUh al 1%. Por lo que, no se esperaría que la actividad esterasa de 19 kDa purificada posea capacidad poliuretanolítica como lo mostró la prueba de exposición de láminas de PU al extracto crudo, ya que a pesar de la presencia de una actividad enzimática de esterasa, ésta no es capaz de atacar PU sólido.

Es posible que al aumentar la concentración de Hydroform y por lo tanto de NMP en el medio de cultivo, no se requiera de la expresión de los mecanismos poliuretanolíticos y en cambio se active el mecanismo de almacenamiento energético por parte del sistema de formación de gránulos, el cual requiere de la presencia de la proteína de la familia de las fasinas. Sin embargo, este resultado mantiene la incógnita acerca de cuál es el sistema enzimático responsable de la degradación de PU de BQ1 y BQ8, por lo que se decidió continuar con esa búsqueda en cultivos de MM-PUh al 1%.

8.11. Purificación de la actividad esterasa asociada a membrana, a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 1% de Hydroform

En la purificación a partir de cultivos en MM-PUh al 1% se observó que, en comparación con la purificación anterior, se logró una menor pérdida de actividad, debido a los cambios en el proceso. Posteriormente se empleó una cromatografía de intercambio aniónico con la resina Q-Fast Flow en la que a pesar de que la actividad total disminuyó en un 56% se logró reducir la cantidad de proteína total en 85%, logrando así un aumento de actividad específica de 100%. Entre la cromatografía de interacción hidrofóbica y la Q-Fast Flow, se realizó una diálisis de doce horas a 4 °C, lo cual puede ser la razón de la pérdida de actividad

presentada. Finalmente se empleó otra cromatografía de intercambio aniónico con la resina Mono-Q, que se eluyó con un gradiente de fosfatos, logrando disminuir la cantidad de proteína total en un 99.7% obteniendo 29% de actividad final, alcanzando un aumento en actividad específica del 100%. La mayor eficiencia de purificación que se logró en este proceso con respecto al anterior puede deberse a varios factores, como no someter la actividad a precipitación con sulfato de amonio y el uso de un equipo de HPLC en la cromatografía en columna de Mono-Q. En esta purificación se identificó solamente una proteína de 55 kDa con actividad esterasa tanto por ensayos espectrofotométricos como por zimografía para esterasa.

8.12. Determinación del efecto sobre Hydroform sólido de la esterasa de 55 kDa purificada a partir de bacterias cultivadas en MM-PUh al 1% de Hydroform

Nuevamente se expusieron láminas de Hydroform a solución amortiguadora de fosfatos (control) y a la última fracción obtenida de la purificación, que contenía la actividad de esterasa de 55 kDa, tanto de BQ1 como de BQ8. Se observó que las láminas control presentaron una superficie lisa, mientras que las láminas expuestas a la actividad de esterasa, mostraron una superficie rugosa y erosionada en todas las repeticiones y en ambas cepas. A diferencia de las láminas expuestas a los cultivos bacterianos, los cambios en la superficie de las láminas expuestas a la actividad purificada sólo se observaron a 10,000 aumentos. La diferencia en la magnitud del efecto que tiene el cultivo bacteriano sobre las láminas de Hydroform y el de la actividad purificada, puede deberse a que, al estar fuera de su ubicación celular, la enzima sufre cambios en su conformación que le impiden alcanzar su actividad poliuretanolítica más alta, o quizá a que la cantidad de actividad poliuretanolítica a la que se expone la lámina en el cultivo es mayor a la que se expuso con la enzima purificada. Queda pendiente la identificación de esta banda con actividad de esterasa, que dará información acerca de la proteína responsable de la degradación del PU.

9. CONCLUSIONES

1. BQ1 y BQ8 son dos cepas bacterianas que tienen la capacidad de degradar poliuretano (PU) sólido y que por secuenciación de rDNA 16S fueron identificadas como pertenecientes al género *Alicyclophilus*.
2. Estas bacterias producen dos actividades de esterasa diferentes (19 y 55 kDa) dependiendo de la concentración de Hydroform en el medio de cultivo.
3. La capacidad poliuretanolítica de BQ1 y BQ8 cambia dependiendo de la concentración de Hydroform en el medio de cultivo.
4. BQ1 y BQ8 cambian la manera en que crecen dependiendo de la concentración de Hydroform y la presencia de *N*-metilpirrolidona en el medio de cultivo.

10. ANEXOS

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

Composición por litro.

Solución A (10X)

KH₂PO₄ 20.0 g

K₂HPO₄ 70.0 g

Solución B (100X)

NH₄NO₃ 100.0 g Ver nota.

MgSO₄• 7H₂O 10.0 g

Solución elementos traza (1000X)

ZnSO₄• 7H₂O 1.0 g

CuSO₄• 7H₂O 0.10 g

FeSO₄• 7H₂O 10.0 g

MnSO₄• 4-6H₂O 2.0 g

Nota: omitir el NH₄NO₃ 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 Whattman 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, 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.

Solución amortiguadora TE (pH 7)

Tris(hidroximetil)aminometano (Tris) 10 mM

Ácido etilendiaminotetracético (EDTA) 1mM

Medio Luria-Bertani (LB) (g·L⁻¹)

NaCl	5
Triptona	10
Extracto de levadura	5
Agar (medio sólido)	15

Método de *p*-nitrofenilacetato (*p*-NPA) para la medición de actividad de esterasa (Desphande et al., 1984)

Reactivos

1. Solución de *p*-NPA en acetonitrilo (CH₃CN) 20 mM
2. Solución amortiguadora de fosfato de potasio 200 mM, pH 7.

Método

1. En una celda espectrofotométrica de 1 mL se colocan:

Agua	400 µL
Amortiguador	250 µL
Preparación enzimática	100 µL
<i>p</i> -NPA	250 µL

2. Una vez agregados los primeros tres componentes en el orden indicado, se inicia la reacción agregando el sustrato *p*-NPA. La lectura de absorbancia a 405 nm se registra a los primeros 30 s y posteriormente cada minuto hasta los 5 min, si es que la absorbancia no es superior a uno, en cuyo caso la medición llega a su fin. La reacción se lleva a cabo a 73° C.
3. Dado que la reacción se lleva a cabo en un ambiente 75% acuoso, el *p*-NPA inicia un proceso de hidrólisis química, por lo que es necesario medir una reacción blanco agregando solución amortiguadora. Posteriormente, los valores correspondientes a la hidrólisis química se restan al valor obtenido en el ensayo con preparación enzimática.
4. Para transformar las lecturas de absorbancia a unidades de concentración se obtuvo el coeficiente de extinción molar que fue de 0.024 M⁻¹cm⁻¹.

11. BIBLIOGRAFÍA

Akutsu Y, Adachi Y, Yamada C, Toyoshima K, Uchiyama H, Nakajima-Kambe T, Nomura N. **2006**. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of urethane hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70: 422-429.

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.

Allen AB, Hilliard N, Howard GT. **1999**. Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans*. *Int Biodeterior Biodegr*, 43: 37-41.

Anderson J, Anne H, Michael W, Mark S, Terry C, John K, Anshu M. **1998**. Recent advances in biomedical polyurethane biostability and biodegradation. *Polym Int*, 46:163-171.

Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. **1994**. *Current protocols in molecular biology*, vol. 1, p.2.4.1–2.4.4. John Wiley & Sons, Inc., New York, NY.

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.

Cornibert J, Marchessault H. **1975**. Conformational Isomorphism. A General 21 Helical Conformation for Poly(β -alkanoates). *Macromolecules*, 8: 296-305.

Darby RT, Kaplan AM. **1968**. Fungal susceptibility of polyurethanes. *Appl Microbiol*, 16: 900-905.

Desphande MV, Eriksson KE, Pettersson LG. **1984**. An assay for selective determination of exo-1,4- α -glucanases in a mixture of cellulolytic enzymes. *Anal Biochem*, 138:481–487.

Diaz N, Prim FI, Pastor J. **1999**. Direct fluorescent-based lipase activity assay. *Biotechniques*, 27: 697-700.

Gumaelius L, Magnusson G, Pettersson B, Dalhammar G. **2001**. *Comamonas denitrificans* sp. nov., an efficient denitrifying bacterium isolated from activated sludge. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, 51: 999–1006.

Heylen K, Vanparys B, Wittebolle L, Verstraete W, Boon N. **2006**. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl. Environ. Microbiol*, 72: 2637–2643.

Howard GT, Blake RC. **1998**. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. *Int Biodeterior Biodegr*, 42: 213-220.

Howard GT, Hilliard NP. **1999**. Use of Coomassie blue-polyurethane interaction in screening of polyurethanase proteins and polyurethanolytic bacteria. *Int Biodeterior Biodegr*, 43: 23-30.

Hung C, Sandra Z, Lloyd N, Justin B, Carrie D, Audra C, Daniel B, John R, Wendy J, Crookes-Goodson. **2016**. Carbon Catabolite Repression and Impranil Polyurethane Degradation in *Pseudomonas protegens* Pf-5. *Appl Environ Microbiol*, 82: 6080 - 6090.

Jendrossek D. **2002**. Microbial degradation of polyesters, *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 71: 293–325.

Kay MJ, Morton LHG, Prince EL. **1991**. Bacterial degradation of polyester polyurethane. *Int Biodeterior*, 27: 205-222.

Kim B, and Lenz W. **2001**. Polyesters from microorganisms, *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*, 71: 51-79.

Kirk-Othmer, Kroschwitz I, Howe-Grant M, The Kirk-Othmer. **1987**. *Encyclopedia of Chemical Technology*. Wiley Interscience, 15: 445.

Kroesen F, Hopper G, Thorpe D, Kirk A, Parrinello G. **1992**. Developments in the recycling of polyurethanes and design of foams for easier recycling. *Proceedings of the SPIE-34th Annual Polyurethane Technical/Marketing Conference*, 577-582.

Lawson PA, Llop-Perez P, Hutson RA, Hippe H, Collins MD. **1993**. Towards a phylogeny of the Clostridia based on 16S rRNA sequences. *FEMS Microbiol. Lett*, 113: 87–92.

Lee S, Teramoto Y, Shirahisi N. **2002**. Biodegradable polyurethane foam from liquefied waste paper and its thermal stability, biodegradability, and genotoxicity. *J App Polym Sc*, 83: 1482-1489.

Madison L, and Huisman G. **1999**. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol and Mol Biol Rev*, 63: 21–53.

Maehara A, Seiichi T, Tatsuaki N, Tsuneo Y, and Yoshiharu D. **1999**. A repressor protein, PhaR, regulates polyhydroxyalkanoate (PHA) synthesis via its direct interaction with PHA. *J Bact*, 48: 3992–4002.

Marty L and Vouges J. **1987**. Purification and properties of a phenylcarbamate herbicide degrading enzyme of *Pseudomonas alcaligenes* isolated from soil. *Agricultural and Biol Chem*, 51: 3287-3294.

Matsumura E, Shin T, Murao S, Sakaguchi M, Kawano T. **1985**. A novel enzyme, Nabenzoyloxycarbonyl amino acid urethane hydrolase IV. *Agricultural Biol Chem*, 49: 3643-3645.

Mayer F, Mohamed M, Ursula Pieper-Furst, Roman W, Matthias L, Alexander S. **1996**. Electron microscopic observations on the macromolecular organization of the boundary layer of bacterial PHA inclusion bodies. *J Gen Appl Microbiol*, 42, 445-455.

McCool GJ, Cannon MC. **1999**. Polyhydroxyalkanoate inclusion body-associated proteins and coding region in *Bacillus megaterium*. *J Bacteriol*, 181: 585-92.

Mechichi T, Stackebrandt E, Fuchs G. **2003**. *Alicycliphilus denitrificans* gen nov, sp nov, a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing proteobacterium. *Int J Syst Evol Microbiol*, 53:147–152.

Mezzina M, Pettinari M. **2016**. Phasins, Multifaceted Polyhydroxyalkanoate Granule-Associated Proteins, 82: 5060-5067.

Mukherjee S, Naba K, Bardolui, Sajjad K, Varsha P, Ranjan N, Prasanta B. **2010**. Isolation and characterization of a monoaromatic hydrocarbon-degrading bacterium, *Pseudomonas aeruginosa* from crude oil. *J Environ Sci and Health*, 45: 1048–1053.

Naber, Neiss V, Gassan M. **1995**. New polyols made by glycolysis from pur and pir rigid foam scrap and their applications. *Proceedings of the Polyurethane Conference*, 287-290.

Nair S, Kumar P. **2007**. Molecular characterization of a lipase-producing *Bacillus pumilus* NMSN-1d utilizing colloidal water-dispersible polyurethane. *World J Microbiol Biotechnol*, 23: 1441–1449.

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* TB-35. *J Ferment 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 Biotechnol*, 51: 134–140.

Nakkabi A, Moulay S, Saad I, Mohammed F. **2015**. Biological degradation of polyurethane by a newly isolated wood bacterium, 2: 0222-0225.

Neuray J, Wirth J, Sulzbach HM. **2000**. Methods for the recycling of polyurethane and polyurethane composites. *Proc Poly Conf*, 37-48.

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.

Oceguera-Cervantes A. **2005**. Tesis de licenciatura, 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. Fac. Química, UNAM.

Oceguera-Cervantes A, Carrillo-García A, López N, Bolaños-Nuñez S, Cruz-Gómez MJ, Wachter C, Loza-Tavera H. **2007**. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *App Environ Microbiol*, 73: 6214-6223.

Ohshiro T, Shinji M, Morita Y, Takayama Y, Izumi Y. **1997**. Novel specific cleavage of the urethane bond of t-butoxycarbonylamino acids by whole cells of *Corynebacterium aquaticum*. *App Microbiol Biotech*, 48: 546-548.

Owen S, Otani T, Masaoka S, Ohe T. **1996**. The biodegradation of low-molecular-weight urethane compounds by a strain of *Exophiala jeanselmei*. *Bioscience Biotech & Biochem*. 60: 244-248.

Pathirana RA, Seal KJ. **1983**. A potential biodeteriogen of polyester-polyurethane elastomers. *Int Biodeterior*, 5: 679-689.

Peng YH, Shih YH, Lai YC, Liu YZ, Liu YT, Lin NC. **2014**. Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. *Environ Sci Pollut Res Int*, 21: 9529-9537.

Pieper-Fürst, Mohamed M, Frank M, Alexander S. **1995**. Identification of the Region of a 14-kilodalton protein of *Rhodococcus ruber* that is responsible for the binding of this phasin to polyhydroxyalkanoic acid granules. *J Bact*, 2513–2523

PlasticsEurope, Annual Review, 2017-2018

Pohlenz H, Boidol , Schittke I, Streber R. **1992**. Purification and properties of an *Arthrobacter oxydans* P52 carbamate hydrolase specific for the herbicide phenmedipham and nucleotide sequence of the corresponding gene. *J Bact*, 174: 6600-6607.

Qun R, Beilen JB, Siervo N, Zinn M, Kessler B, Witholt B. **2005**. Expression of PHA polymerase genes of *Pseudomonas putida* in *Escherichia coli* and its effect on PHA formation. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 87: 91–100

Rowe L, Howard GT. **2002**. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodeterior Biodegr*, 50: 33-40.

Ruiz C, Howard GT. 1999. Nucleotide sequencing of a polyurethanase gene (pula) from *Pseudomonas fluorescens*. *Int Biodeterior Biodegr*, 44: 127-131.

Ruiz C, Main T, Hilliard NP, Howard GT. 1999. Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int Biodeterior Biodegr*, 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.

Schulze R, Spring S, Amann R, Huber I, Ludwig W, Schleifer KH, Kampfer P. 1999. Genotypic diversity of *Acidovorax* strains isolated from activated sludge and description of *Acidovorax defluvii* sp. nov. *Appl Microbiol*, 22: 205-214.

Shah A, Fariha H, Lee K, Deniz F, Aamer A. 2013. Degradation of polyester polyurethane by newly isolated *Pseudomonas aeruginosa* strain MZA-85 and analysis of degradation products by GCeMS. *Int Biodeterior Biodegr*, 77: 114 - 122.

Shah A., Fariha H, Javed I, Abdul H, Safia A. 2007. Degradation of polyurethane by novel bacterial consortium isolated from soil. *Annals Microbiol*, 58: 381-386.

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.

Shimao, Masayuk. 2001. Biodegradation of plastics. *Current Opinion in Biotechnology*, 12: 242-247.

Steinbüchel A, Henry E, Valentin. 1995. Diversity of bacterial polyhydroxyalkanoic acids. *FEMS Microbiology Letters*, 128: 219-228.

Steinbüchel A. 2001. Perspectives for biotechnological production and utilization of biopolymers: Metabolic engineering of polyhydroxyalkanoate biosynthesis pathways as a successful example. *Macromol Biosci*, 1: 1-24.

Stone R, Villwock M. 2000. Recent technical advances in recycling of scrap polyurethane foam as finely ground powder in flexible foam. *Proc Polyurethane Conf*, 3-10.

Stone, Lichvar S, Sweet F. 1995. Commercial potential for recycling of finely ground foam in flexible polyurethane foam. *Proce Polyurethane Conf*, 244-252.

Teeraphatpornchai T, Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nakayama M, Nomura N. 2003. Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnol Lett*, 25: 23-28.

Weigand W, Rasshofer H, Baumann G, Nakamura M. **1993**. Recycling of polyurethanes put into practice. Proceedings of the Polyurethanes World Congress 199. pp. 211-217.

Wieczorek R, Pries A, Steinbüchel A, Mayer F. **1995**. Analysis of a 24-kilodalton protein associated with the polyhydroxyalkanoic acid granules in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol*, 177: 2425-2435.

You DT, Durocher, Kierkus PCh, Fishback TL. **1997**, Chemical recycling of polyurethanes and applications for the recyclates. Proceedings Polyurethanes World Congress. 598-602.