



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

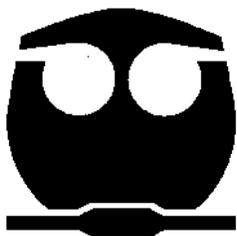
Comparación de la cepa tipo
Alicyclophilus denitrificans K601^T con las
cepas de *Alicyclophilus sp.* BQ1 y BQ5
capaces de crecer en poliuretano como
única fuente de carbono

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

Luz Elena Moreno González



MÉXICO, D.F.

2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **Herminia de Jesús Loza Tavera**

VOCAL: **Profesor:** **J. Eleazar Martínez Barajas**

SECRETARIO: **Profesor:** **Eduardo Bonilla Espinoza**

1er. SUPLENTE: **Profesor:** **María Eugenia Torres Espinoza**

2do SUPLENTE: **Profesor:** **Martha Giles Gómez**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

Asesor del tema:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera

Supervisor técnico

Dr. Martín Pedro Vargas Suárez

Sustentante:

Luz Elena Moreno González

Agradecimientos Técnicos

A la UNAM por haberme abierto sus puertas y permitirme crecer como miembro de su comunidad.

A la Facultad de Química donde se me ha brindado la oportunidad de aprender una profesión tan interesante y completa.

A la Dra. Herminia Loza Tavera por el apoyo y la confianza que me brindó durante la realización de este trabajo.

Al apoyo brindado por CONACYT (No. 82881) y DGAPA (No. 222811-3) al proyecto “Caracterización de las enzimas y los genes responsables de la actividad biodegradativa de *Alicyclophilus sp.* sobre poliuretano”

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, en donde se desarrolló este trabajo y en donde siempre encontré un apoyo incondicional.

A la Dra. Patricia Coello por prestarme su sonicador y a la M. en C. Carmen Parra por enseñarme a utilizarlo, así como por todo el apoyo que me brindaron.

Al cepario de la Facultad de Química en especial al Q.F.B. Alejandro Camacho por su apoyo en las pruebas bioquímicas y por donar la cepa de *Serratia marcescens*.

Al Dr. Martín Vargas Suárez, por ser conmigo un gran amigo, compañero y por orientarme siempre que lo necesité.

A mis compañeros del lab. 105, Sonia y Julieta por sus enseñanzas y paciencia, a los chicos de servicio social Adrián, Joyce, Jaz y Wendy por apoyarme siempre con todo, en especial a Fabiola por ayudarme con los experimentos con medio diferencial de Tween 80, a Mariana y Yazmín por su compañía.

Al Dr. Elpidio García y sus compañeros del lab. 114, quienes fueron muy amables, al brindarme su amistad y apoyo siempre que necesité algo.

Dedicatorias y agradecimientos

A Dios por darme la fortaleza para poder seguir adelante cada día.

A mis padres María de la Luz González y Victor Manuel Moreno, por darme la vida, amarme e impulsarme siempre a conseguir mis sueños.

A mis abuelos Martha Andonaegui y Marcos González por estar siempre conmigo, cuidarme y quererme como si fuese su hija.

A mis hermanas Renata y Patricia, por que siempre han estado para mí cuando las he necesitado y por que son un ejemplo de perseverancia, las quiero.

A mi hermano Victor y a mis sobrinos Charly, Ame, Ingrid, Saí y Luis, por ser mi mayor motivación, espero poder ser un buen ejemplo y un apoyo para ustedes, los quiero mucho.

A mi compañero, amigo y gran amor Alejandro, gracias por la confianza, cariño y a las palabras de aliento que me haz dicho, este triunfo no sería lo mismo sin ti.

A mis cuñados Carlos e Israel, que los considero como mis hermanos, gracias por todo el apoyo y cariño que me han brindado.

A mis tías, tíos, primas y primos por ser parte mi familia, gracias por apoyarme siempre, aconsejarme y abrirme las puertas de su casa.

A mis amigos de toda la vida Jorge quien cuida de mi alma y reza por que este bien, Edgar cómplice y confidente de mis travesuras, Mauricio y Efraín por estar ahí y darme grandes consejos e incluso regañarme cuando lo he necesitado, Maye y Laura por recordarme que ni el tiempo y las distancia importan cuando una amistad es verdadera.

A mis compañeras y amigas de la carrera, Ara, Chuy, Bere, Ofe, Edith, Karla, y Ericka, gracias por su amistad y compañía.

A mis mejores amigas Ángela, Janeritte y Miriam, por compartir conmigo grandes momentos, apoyarme y creer en mí, las quiero, gracias por existir.

A Roque y Quique gracias por acompañarme en esta etapa de mi vida.

A todas las personas que he tenido el placer de conocer, que me han ayudado, apoyado y motivado a salir adelante, muchas gracias.

Abreviaturas

DO	Densidad óptica
MM-NK	Medio mínimo utilizado por Nakajima-Kambe
MM-DSMZ	Medio mineral sugerido por la “Colección alemana de microorganismos y cultivos celulares”
MM-M	Medio mínimo sugerido por Mechichi
MM-PUh	Medio mínimo con poliuretano-Hydroform®
PU	Poliuretano
ON	overnight
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
<i>p</i>-NPA	<i>p</i> -Nitrofenil acetato
UV	Ultravioleta
Tween 80	Polisorbato 80, polioxietilen sorbitano monooleato, mono-oleato de polietilen sorbitan
TGA	Triacilgliceroles o triglicéridos
p/v	Peso/volumen

ÍNDICE

Abreviaturas	v
Índice	vi
Índice de tablas y figuras	viii
1. Resumen	1
2. Antecedentes	3
2.1. Poliuretano (PU)	3
2.2 Biodegradación del poliuretano	5
2.3 Características del género <i>Alicyclophilus</i>	9
2.3.1 Antecedentes del proyecto. Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas BQ1 y BQ5 de <i>Alicyclophilus sp.</i>	10
2.4 Actividad enzimática de tipo esterasa	11
2.4.1. Clasificación de esterasas	11
2.4.2. Determinación y cuantificación de la actividad esterasa	12
3. Hipótesis	14
4. Objetivo	15
3.1. Objetivos particulares	15
5. Estrategia experimental	16
6. Materiales y métodos	18
6.1. Reactivación de células	18
6.2. Preparación del inóculo para las curvas de crecimiento	18
6.3. Curvas de crecimiento de la cepa BQ1 en diferentes medios mínimos adicionados con Hydroform [®] (PUh) como única fuente carbono	19

6.4. Curvas de crecimiento en MM-NK con PUh al 0.3% para las cepas K601 ^T , BQ1 y BQ5	20
6.5. Crecimiento de las cepas BQ1, BQ5 y K601 ^T , en MM NK con diferentes fuentes de carbono	21
6.6. Esterasas extra-celulares, prueba de hidrólisis de Tween 80	21
6.7. Extracción de proteínas totales	22
6.7.1. Ultrasonificación y separación de fracciones	22
6.7.2. Cuantificación de proteínas	22
6.8. Zimograma	24
6.9. Tinción de Coomasie y patrón de proteínas	25
6.10. Cuantificación de la actividad esterasa por curso temporal de crecimiento	25
7. Resultados y discusión	28
7.1. Medio mineral para trabajar con poliuretano-Hydroform [®] como única fuente de carbono	28
7.2. Crecimiento en poliuretano como única fuente de carbono	31
7.3. Crecimiento de <i>Alicyclophilus</i> en fuentes de carbono diferentes al poliuretano	32
7.4. Pruebas bioquímicas y de asimilación de sustratos	35
7.5. Proteínas y esterazas	38
7.5.1. Esterasas extra-celulares	38
7.5.2. Patrón de proteínas y esterazas celulares	39
7.6. Caracterización de la actividad esterasa de la cepa BQ1 cultivada en MM-PUh a través del tiempo de cultivo	45
8. Conclusiones	50
9. Perspectivas	51
9. Anexo	52
10. Bibliografía	66

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

Tabla 1	Algunos de los monómeros utilizados en la síntesis de poliuretanos	4
Tabla 2	Microorganismos relacionados con la capacidad de degradar poliéster-poliuretano y actividades enzimáticas relacionadas.	8
Tabla 3	Preparación de una curva patrón con albúmina sérica bovina, para determinación de proteínas por el método de Bradford.	23
Tabla 4	Preparación de muestras (extractos proteicos) para cuantificar proteínas por el método de Bradford.	23
Tabla 5	Distribución de reactivos en la celda de reacción, para la determinación espectrofotométrica de la hidrólisis de <i>p</i> -NPA.	27
Tabla 6	Composición de los medios minerales utilizados para el crecimiento de <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1 con PUh al 0.3%.	28
Tabla 7	Test API 20 NE aplicado en la cepa tipo <i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601 ^T y en las cepas BQ1 y BQ5 de <i>Alicyclophilus sp.</i>	37
Figura 1	Reacción de síntesis del poliuretano.	3
Figura 2	Clasificación del poliuretano dependiendo del tipo de poliol utilizado en su síntesis.	4
Figura 3	Posibles sitios de acción de las actividades enzimáticas relacionadas con la capacidad de degradación del poliuretano.	7
Figura 4	Reacción de hidrólisis del 4-metilumbeliferil butirato.	25
Figura 5	Reacción de hidrólisis del <i>p</i> -NPA.	27
Figura 6	Crecimiento de <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1 en tres diferentes medios mínimos.	30
Figura 7	Crecimiento en MM-PUh al 0.3% de <i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601 ^T , <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1 y BQ5.	31
Figura 8	Crecimiento de <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1 y <i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601 ^T en medio Luria-Bertani.	33

Figura 9	Crecimiento en glucosa 2 mM de <i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601 ^T , <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1 y BQ5.	34
Figura 10	Crecimiento en malato 10 mM de <i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601 ^T , <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1 y BQ5.	34
Figura 11	Crecimiento en acetato 1 mM de <i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601 ^T , <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1 y BQ5.	35
Figura 12	Producción de esterasas extra-celulares en medio Tween 80.	38
Figura 13	Patrón de proteínas y zimograma para actividad esterasa de extractos de proteínas totales de cultivos en medio LB cosechados a finales de la fase logarítmica de crecimiento a una DO _{660 nm} de 1.9.	40
Figura 14	Patrón de proteínas y zimograma para actividad esterasa de <i>Alicyclophilus denitrificans</i> K601 ^T y de <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1 y BQ5 en diferentes fracciones celulares, en fase estacionaria de crecimiento a una DO _{660 nm} de 2.4.	42
Figura 15	Patrón de proteínas y zimograma para actividad esterasa, comparación de esterasas en medio LB y MM-PUh para A) <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1. y B) <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ5.	44
Figura 16a	Curva de crecimiento de <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1 medida por peso fresco.	46
Figura 16b	Figura 16b. Relación membrana/biomasa de <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1 cultivado en MM-PUh 0.3%.	46
Figura 17	Patrón de proteínas y zimograma para actividad esterasa en A) extracto citosólico y B) extracto de membrana, de la cepa BQ1 de <i>Alicyclophilus sp.</i> , crecimiento seguido por curso temporal de 8 a 120 h	48
Figura 18	Actividad específica en extractos de membrana y citosol de <i>Alicyclophilus sp.</i> BQ1, por curso temporal de cultivo de 8 a 120 h.	49

1. RESUMEN

El poliuretano (PU) es un polímero que se sintetiza a partir de la condensación de un diisocianato y un poliol. Dependiendo de éstos, se pueden clasificar como poliésteres (PS)-PUs o poliéteres (PE)-PUs, dando una gran variedad de estructuras por lo que se han considerado los polímeros de mayor versatilidad. Sin embargo, sus desechos se han convertido en un grave problema por la falta de un adecuado manejo. Actualmente existen mecanismos de degradación para PUs como la hidrólisis química, destrucción mecánica y térmica, aunque la biodegradación también ha surgido como una posibilidad de tratamiento complementario o incluso alternativo. Ésta es llevada a cabo por microorganismos o enzimas como proteasas, uretanasas o esterases. El PU utilizado en esta investigación es un PS-PU comercial, Hydroform. Se ha demostrado que este PU puede sufrir hidrólisis de sus enlaces éster después de haber sido expuesto al crecimiento de *Alicyclophilus* BQ1, por lo que se ha propuesto que una actividad esterasa está involucrada en su degradación

El objetivo de este trabajo es comparar el crecimiento de *Alicyclophilus* sp. cepas BQ1 y BQ5 con la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T y determinar, a través del patrón de esterases, si existe alguna esterasa diferente que explique la capacidad de BQ1 y BQ5 de crecer en PUh como única fuente de carbono.

Se comparó el crecimiento de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ5 capaces de utilizar al Hydroform (PUh) como única fuente de carbono, con la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T, encontrando que la cepa tipo no es capaz de crecer en poliuretano como única fuente de carbono. Se probaron otras fuentes de carbono diferentes al PUh, glucosa 2 mM, malato 10 mM y acetato 1 mM, encontrándose que el crecimiento es hasta 10 veces menor en glucosa y malato comparado con el crecimiento en MM-PUh y que con acetato las bacterias no son capaces de crecer.

Por otra parte se realizó una caracterización bioquímica utilizando un kit comercial (API 20 NE), encontrando pocas diferencias entre las tres cepas, la cepa BQ1 produce arginina hidrolasa que las otras cepas no, la cepa K601^T degrada triptófano y también asimila glucosa y gluconato pero BQ1 y BQ5 no.

A través del patrón de proteínas se confirmó que las tres cepas pertenecen al mismo género al ser éste muy similar entre ellas.

La prueba para producción de esterasas extracelulares con el medio Tween 80, fue positiva para las tres cepas sugiriendo que las esterasas extracelulares no son las responsables del crecimiento en MM-PUh, ya que la cepa tipo K601^T no crece con PUh.

Al comparar la presencia de esterasas por zimograma, usando como sustrato butirato de 4-metilumbeliferil, en extractos celulares a partir de cultivos en medio LB, se observó que las tres cepas tienen esterasas de 62, 36 y 20 kDa y que la cepa tipo K601^T tiene esterasas extra de 75, 50 y 19 kDa, que en BQ1 y BQ5 no se encuentran. Dado el resultado anterior, se comparó a las esterasas presentes en las cepas BQ1 y BQ5 cultivadas en medio LB y en MM-PUh, tomando a las células en fase logarítmica de crecimiento, y se encontró una esterasa de 24 kDa en las células cultivadas en MM-PUh que no está presente en LB, la cual podría estar relacionada con la capacidad de crecimiento en MM-PUh.

Finalmente se siguió la producción de esterasas en MM-PU de la cepa BQ1, a través de un análisis por curso temporal de crecimiento, para lo cual se determinó la actividad específica espectrofotométricamente usando *p*-NPA como sustrato y se realizó zimograma para actividad esterasa a las dos fracciones celulares, citosol y membrana. La actividad específica para esterasa encontrada en las dos fracciones es muy similar excepto a las 8 horas en donde el citosol tiene una actividad 5 veces mayor que en membrana. Los zimogramas muestran como a través de las diferentes fases de crecimiento la presencia de esterasas cambia en las dos fracciones, siendo en la fase estacionaria donde hay mayor presencia de esterasas.

2. ANTECEDENTES

2.1. Poliuretano (PU)

El poliuretano (PU) es un polímero sintético el cual se desarrolló y patentó en el año de 1937 por Otto Bayer y colaboradores, fue utilizado para recubrimientos de aviones durante la segunda guerra mundial. La producción industrial de este polímero comenzó en la década de los 50's y es considerado como el polímero de mayor gama de aplicaciones, ya que es utilizado en diversas industrias.

Los poliuretanos son el producto de la condensación de un isocianato con un diol (tabla 1), en presencia de otras sustancias. Dentro de esa reacción de policondensación, se produce una serie de reacciones químicas complejas que ocasionan la formación de muchos enlaces químicos, entre ellos el del grupo uretano (carbamato), que es el principal y resulta de la reacción entre poliisocianatos y polialcoholes mediante la siguiente ecuación general (figura 1):

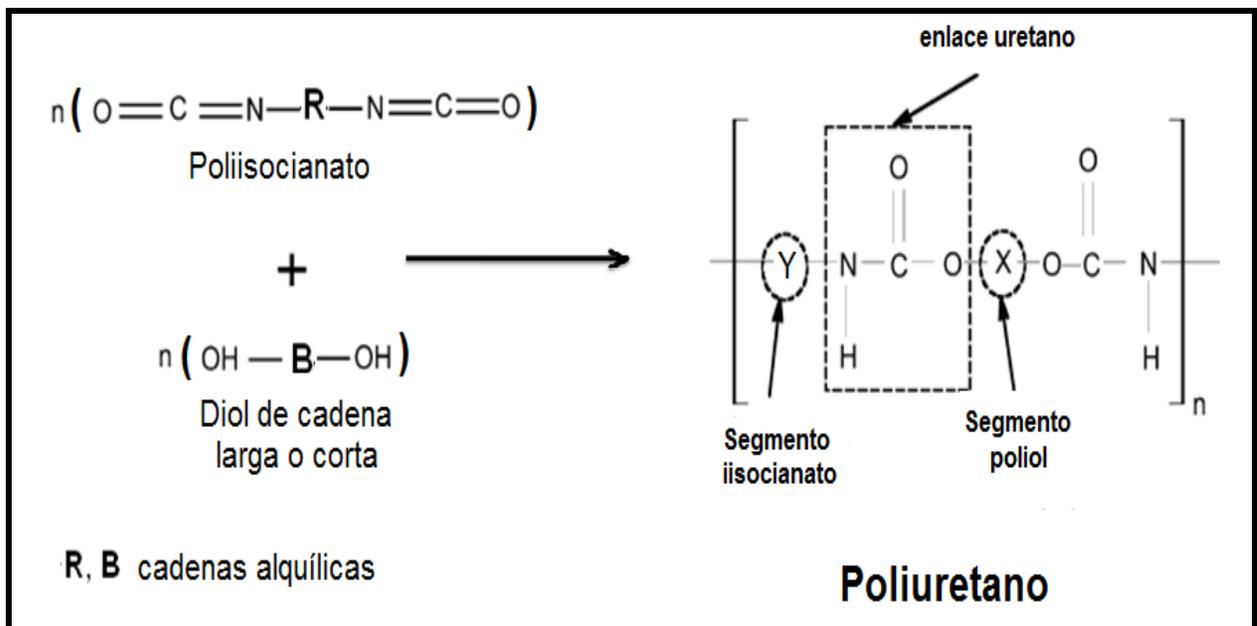


Figura 1. Reacción de síntesis del poliuretano (Modificado de Gautam *et al.*, 2007)

Tabla 1. Algunos de los monómeros utilizados en la síntesis de poliuretanos.

Dioles	Diisocianatos
1,4 Butanodiol	4,4-Diisocianato de difenilmetano
Sacarosa	2,4-Diisocianato de difenilmetano
Hexacetato de sacarosa	2,2-Diisocianato de difenilmetano
Polietilenglicol	2,4-Diisocianato de Tolueno
Polidimetilsiloxano	2,6-Diisocianato de Tolueno
Sorbitol	1,3-Diisocianato de xileno
MOCA	1,5-Diisocianato de Naftaleno

Dependiendo del tipo de polioliol (figura 2), el PU puede ser de tipo poliéster PS-PU o poliéter PE-PU. Los poliuretanos se clasifican en dos formas principalmente: rígidos y flexibles (TecnaPol, 2008).

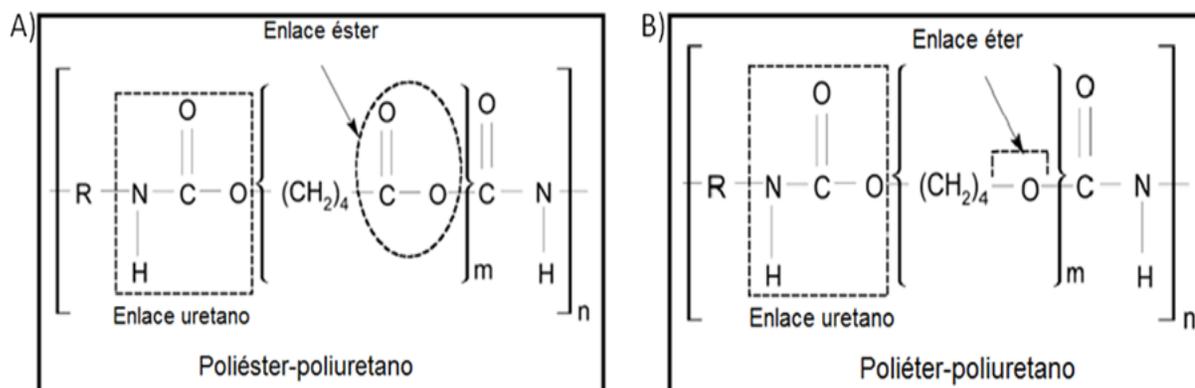


Figura 2. Clasificación del poliuretano dependiendo del tipo de polioliol utilizado en su síntesis. A) Poliéster-Poliuretano. B) Poliéter-Poliuretano. (Gautam *et al.*, 2007).

Los PU flexibles son ampliamente usados en espumas resilientes, elastómeros durables, adhesivos y selladores de alto rendimiento, pinturas, fibras, sellos, empaques, juntas, condones, alfombras, partes automotrices, industria de la construcción, del mueble y miles de aplicaciones más (TecnaPol, 2008)

Los PU rígidos o RIM (Rigid Injection Molding), son de densidad más elevada, pero tienen características muy parecidas, se pueden formar paneles que son usados

ampliamente para el aislamiento térmico. La capacidad térmica del poliuretano se debe al gas aprisionado en las celdillas cerradas del entramado del polímero (TecnaPol, 2008).

Por otro lado, los barnices de PU se usan como revestimiento para pisos de madera y vehículos, mientras que la espuma de PU reticulada se emplea extensivamente para mejorar la seguridad en aviones, vehículos terrestres y barcos.

Sin embargo, pese a los beneficios que tiene el uso de PU como sustituto de materiales naturales como el metal, madera y resinas, entre otros; también ha traído consigo un grave problema de contaminación causado por un ineficiente manejo de residuos, ya que las características propias de este material refieren a una gran resistencia a la fricción, calor, humedad y solventes.

Las técnicas más utilizadas para tratar residuos sólidos poliméricos son el reciclaje, el compostaje, la incineración y el relleno sanitario (Ren, 2003) Actualmente se aceptan algunos mecanismos básicos de degradación para el tratamiento de residuos sólidos de PU como son: la fotodregradación, oxidación mediante aditivos químicos, pirólisis, degradación térmica y mecánica (Gregorí *et al.*, 2007). Una posible vía de minimización de este residuo, ya sea antes o después de su disposición en relleno sanitario, consistiría en recurrir a la biorremediación (Carrasco, 1991; Morton y Surman, 1996). La biorremediación es la destrucción o transformación de contaminantes peligrosos a compuestos menos peligrosos, por acción de microorganismos, con el fin de limpiar un sitio contaminado.

2.2. Biodegradación del poliuretano

La biodegradación es el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de compuestos orgánicos llevados a cabo por microorganismos (Branco, 1984), que en última instancia conduce a la mineralización y a la producción de biomasa; siendo la mineralización la conversión natural de material orgánico a material inorgánico y/o gases (Zee, 2001).

Los polímeros como el PU son sustratos potenciales para los microorganismos heterótrofos (Gu *et al.*, 2000). Sin embargo, se deben considerar algunos factores que

influyen para que un polímero como el PU sea biodegradable, como son las condiciones del medio: temperatura, humedad y pH; las características propias del polímero: presencia de enlaces químicos susceptibles a la hidrólisis, hidrofiliidad, estereoquímica, peso molecular, cristalinidad, superficie específica, temperatura de transición vítrea y de fusión, presencia de monómero residual o aditivos y distribución de la secuencia; y finalmente las características del microorganismo: cantidad, variedad, fuente y actividad (Gregorí *et al.*, 2007; Raju, *et al.*, 2002).

Se ha propuesto que el ataque microbiano a los polímeros ocurre en dos fases a) despolimerización o erosión superficial y b) hidrólisis enzimática, la cual produce intermediarios solubles que son asimilados por los microorganismos (Zheng *et al.*, 2005; Muller *et al.*, 2001). El ataque enzimático por hidrólisis a un polímero (de tipo poliéster) se da en dos pasos, primero la enzima se une al sustrato-polímero y segundo cataliza una ruptura, llevándose a cabo por dos mecanismos conocidos como exo y endo ataques, los cuales difieren en el sitio en que rompen el polímero así como en los productos de degradación que se producen (Lenz, 1993). El ataque de tipo exo ocurre estrictamente en la porción terminal del polímero y es más afín por algunos grupos funcionales que por otros (Gianfreda y Rao, 2004). En cambio el ataque endo ocurre a lo largo de la cadena del polímero, generando fragmentos cada vez más pequeños y de diferente estructura. Estos dos ataques pudieran estar trabajando de manera sinérgica (Huang, 1989; Lenz, 1993).

Aunque por mucho tiempo se consideró al PU como un material no biodegradable se han reportado estudios en los que se muestra que este tipo de material es susceptible al ataque de microorganismos como hongos (Darvy y Kaplan, 1968; Crabbe *et al.*, 1994) y bacterias (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995; Kay *et al.*, 1991; Morton y Surman, 1994). Sin embargo, los mecanismos por los que es posible la biodegradación del PU aún son inciertos, se ha observado que el PS-PU es más susceptible que el PE-PU a la degradación biológica (Darvy y Kaplan, 1968; Nakajima-Kambe, *et al.*, 1999). Se ha propuesto con base en la estructura del PS-PU, que las actividades enzimáticas que podrían actuar sobre la estructura de este tipo de polímeros serían de tipo proteasa, ureasa y esterasa/lipasa (Nakajima-Kambe, *et al.*,

1999) (figura 3). En la tabla 2, se muestran algunos hongos y bacterias en los que se han detectado actividades enzimáticas relacionadas con la degradación de PU.

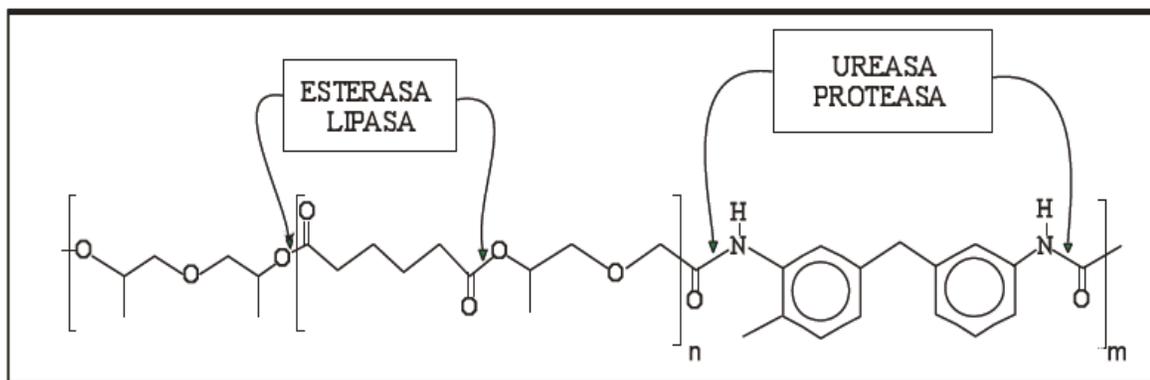


Figura 3. Posibles sitios de acción de las actividades enzimáticas relacionadas con la capacidad de degradación del poliuretano (Oceguera-Cervantes, 2005).

Vega y colaboradores (1999), describen una esterasa en *Pseudomonas fluorescens* de un tamaño aproximado de 48 kDa que presenta una secuencia conservada de tipo serina-hidrolasa, sin embargo este microorganismo no mostró capacidad de crecer en PU como única fuente de carbono (Ruiz *et al.*, 1999).

En *Pseudomonas chlororaphis* se han identificado tres proteínas extracelulares con características de esterasa (Ruiz *et al.*, 1999). Se han logrado clonar los genes *PueA* (Stern y Howard, 2000) y *PueB* (Howard *et al.*, 2001) que codifican a dos proteínas con actividad poliuretanolítica con tamaños de 65 y 60 kDa respectivamente, demostrando que ambas presentan actividad lipasa.

En la cepa de *Comamonas acidovorans* TB-35 se ha reportado la existencia de dos tipos de esterases, una extracelular y otra unida a la membrana plasmática (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995). Sin embargo, aunque las dos proteínas tienen actividad esterasa capaz de utilizar al *p*-nitrofenilacetato (*p*-NPA) como sustrato, únicamente la actividad asociada a la membrana es capaz de atacar al PU sólido (Akutsu *et al.*, 1998), dicha poliuretano-esterasa se encuentra codificada por el gen *PudA* y tiene un tamaño aproximado de 62 kDa (Nomura *et al.*, 1998).

Rowe y Howard (2002), caracterizaron e identificaron una poliuretanasas de tipo lipasa en *Bacillus subtilis*, la cual presenta un tamaño aproximado de 28 kDa, la

actividad de lipasa fue medida con varios compuestos derivados de *p*-nitrofenil, siendo el *p*-NPA el mejor sustrato.

Tabla 2. Microorganismos relacionados con la capacidad de degradar poliéster-poliuretano y actividades enzimáticas relacionadas.

Microorganismo	Actividad enzimática	Referencia
Hongos		
<i>Aspergillus niger</i> and <i>Cladosporium herbarum</i>	Esterasa	Filip Z, 1979
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Esterasa	Pathirana y Seal, 1984
<i>Gliocadium roseum</i>	Esterasa, proteasa, ureasa	Pathirana y Seal, 1984
<i>Penicillium citrium</i>	Esterasa, proteasa, ureasa	Pathirana y Seal, 1984
<i>Chaetomium globosum</i> y <i>Aspergillus terreus</i>	Esterasa y uretano hidrolasa	Boubendir, 1993
<i>Curvularia senegalensis</i>	Esterasa	Crabbe <i>et al.</i> , 1994
<i>Alternaria solani</i>	Proteasa	Ibrahim <i>et al.</i> , 2009
Bacterias		
<i>Corynebacterium</i> sp.	Esterasa extracelular	Kay <i>et al.</i> , 1993
<i>Comamonas acidovorans</i> TB 35	Esterasa extracelular, esterasa unida a membrana	Nakajima-Kambe <i>et al.</i> , 1997
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Proteasa	Howard y Blake, 1999
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Esterasa extracelular	Vega <i>et al.</i> , 1999
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Proteasa Esterasa	Ruiz <i>et al.</i> , 1999a
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	Esterasa/proteasa, Esterasa	Ruiz <i>et al.</i> , 1999b
<i>Comamonas acidovorans</i>	Esterasa soluble	Allen <i>et al.</i> , 1999
<i>Bacillus subtilis</i>	Esterasa y lipasa	Rowe <i>et al.</i> , 2002
<i>Rhodococcus equi</i> TB-60	Uretano hidrolasa (amidasa/esterasa)	Shigeno <i>et al.</i> , 2006
<i>Bacillus pumilus</i>	Lipasa	Nair y Kumar, 2007

Actualmente existe poca información sobre las actividades de tipo proteasas y uretanasas sobre el PU. Howard y Blake (1998) purificaron una proteína extracelular de 29 kDa con actividad proteasa en *P. fluorescens* capaz de atacar PU (Impranil®). Posteriormente se reportó la purificación de una poliuretanasas (PUasa) de 63 kDa con actividad tanto de proteasa como de esterasa en *P. chlororaphis* (Ruiz *et al.*, 1999).

En el caso de actividades de tipo uretanasas, se ha logrado purificar una uretano hidrolasa con un peso molecular de 55 kDa de la cepa TB-60 de *Rhodococcus equi*. Esta enzima es capaz de romper los enlaces uretano presentes en el ácido 2,4-tolueno dicarbámico dibutil éster (TDCB) utilizado como única fuente de carbono durante el aislamiento de la cepa TB-60 (Akutsu *et al.*, 2006).

2.3. Características del género *Alicyclophilus*

Uno de los géneros recientemente descritos con capacidad de degradar xenobióticos es *Alicyclophilus* (Mechichi *et al.*, 2003), anteriormente clasificado como *Pseudomonas sp.* Estas bacterias pertenecen a la familia *Comamonadaceae* de la sub-clase β -*Proteobacteria*, son bacterias anaerobias facultativas, Gram negativas y tienen forma de bacilos cortos.

Alicyclophilus denitrificans K601^T fue la primera cepa descrita de este género. Fue aislada de una muestra líquida de una planta de tratamiento de aguas residuales en Alemania, llamando la atención por tener la capacidad de crecer en compuestos alifáticos como el ciclohexanol, como única fuente de carbono y por su capacidad desnitrificante (Mechichi *et al.*, 2003).

Otra cepa perteneciente a la misma especie, *Alicyclophilus denitrificans* BC, se aisló de una mezcla de aguas residuales y suelo contaminado con benceno, teniendo un 99.7% de similitud en el gen que codifica el rRNA 16S con la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T (Weelink, *et al.*, 2008). Esta cepa muestra características fisiológicas diferentes a la K601^T, ya que la cepa BC no es capaz de crecer en ciclohexanol como única fuente de carbono. Aunque ambas cepas utilizan nitratos y oxígeno como aceptores de electrones, solo la cepa BC es capaz de utilizar clorato como aceptor de electrones a la vez que degrada benceno (Oosterkamp *et al.*, 2011).

Se han reportado otras cepas de *Alicyclophilus* las cuales se identificaron por la secuencia parcial del gen rRNA 16S. Sin embargo, no se han caracterizado y no existe mayor información que la capacidad desnitrificante que poseen. Algo en lo que coinciden estas cepas es que han sido encontradas en lodos activados en plantas de tratamiento de agua residuales en Bélgica (Heylen *et al.*, 2006) y Arizona (Sun *et al.*, 2011).

2.3.1. Antecedentes del proyecto. Aislamiento, identificación y caracterización de las cepas BQ1 y BQ5 de *Alicyclophilus sp.*

En trabajos anteriores en el laboratorio se obtuvieron muestras de espuma de PU en proceso de descomposición del tiradero “Bordo de Xochiaca” en el Municipio de Netzahualcóyotl estado de México (Carrillo, 2004). A partir de estas muestras se aislaron cepas bacterianas capaces de crecer en un medio mineral con un barniz comercial de PU llamado Hydroform[®] (Poly Form, México) como única fuente de carbono (MM-PUh). Tres de las cepas aisladas mostraron el mejor crecimiento en el medio MM-PUh, cepas BQ1, BQ5 y BQ8 (Oceguera-Cervantes, 2005). También se demostró que las cepas BQ1 y BQ8 (no. Taxonómico 449664 y 449665, respectivamente) atacaban los enlaces éster presentes en el PU, a través de estudios de espectroscopía de infrarojo (IRS) en laminillas de Hydroform[®] y por microscopía electrónica de barrido (SEM) se observó ataque por parte de las bacterias en la estructura del polímero. A través de la secuenciación de gen rRNA 16S las tres cepas se identificaron como pertenecientes al género *Alicyclophilus sp.* (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007; Solís, 2008).

BQ1 y BQ8 muestran un comportamiento microbiológico muy similar, sus colonias son pequeñas (BQ8) y medianas (BQ1), redondas con formas definidas, brillosas, color crema y el crecimiento en medio líquido es planctónico las primeras 16 h, con formación de biofilm posteriormente (Oceguera-Cervantes, 2005) lo que hace pensar que podría tratarse de la misma cepa. Sin embargo, en el caso de la cepa BQ5 sus colonias muestran tres distintas morfologías, su color es crema y el crecimiento en líquido tiende a formar biofilm desde un inicio (Solís, 2008).

Se usaron medios selectivos para identificar las actividades enzimáticas extracelulares que pudieran estar relacionadas con la capacidad de crecer en un medio mínimo con PU (Hydroform) como única fuente de carbono, tomando en cuenta que las actividades relacionadas con la degradación del PU son de tipo lipasa/esterasa, proteasa y ureasa, encontrando que la actividad presente en las tres cepas es la de esterasa (Oceguera-Cervantes, 2005).

Se encontró que por lo menos existe una esterasa que es excretada al sobrenadante ya que resultó positiva la actividad medida con *p*-NPA en el sobrenadante del cultivo de las tres cepas creciendo en MM-PUh (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007; Solís, 2008).

Por otro lado ya se ha identificado, purificado y secuenciado una esterasa de membrana de la cepa BQ1, la cual falta demostrar si tiene acción sobre PU (Sánchez-Tafolla, 2010). Esta esterasa, que resultó ser una porina de la familia GDSL, también se encuentra en el genoma de *Alicyclophilus denitrificans* cepas K601^T y BC, por lo que parte de este proyecto es averiguar si la cepa tipo K601^T también comparte la característica de crecer en un MM-PUh.

2.4. Actividad enzimática de tipo esterasa

Las esterases son definidas como enzimas que tienen actividad sobre los enlaces acil-éster de ácidos grasos de cadena corta, como el metil-butirato, etil-butirato y triacetina, que son poco hidrolizados por lipasas. En contraste con las clásicas lipasas, una esterasa típica no es activada interfacialmente, es decir, no muestran un incremento abrupto en la actividad con sustratos que exceden el límite de solubilidad. Las esterases son inactivadas agonistamente en emulsiones de ácidos grasos de cadenas largas (triacilgliceroles o TAG) (Chahinian, 2002).

2.4.1. Clasificación de esterases

Las esterases o carboxiléster hidrolasas (EC 3.1.1.) catalizan la ruptura de enlaces éster mediante la adición de una molécula de agua. Las esterases por lo general tienen una amplia especificidad de sustrato y se dividen en varias clases. Las carboxiléster hidrolasas (EC 3.1.1) se encuentran clasificadas en por lo menos 50

diferentes clases, por ejemplo; las lipasas (triacilglicerol lipasa EC 3.1.1.3) son esterasas que hidrolizan sustratos insolubles en agua tales como triglicéridos de cadena larga en la interfase entre el sustrato y el agua. Por el contrario, las esterasas típicas como carboxil-esterasas (CE 3.1.1.1) se limitan a atacar compuestos solubles en agua, como ésteres de ácidos carboxílicos de cadena corta. Existen esterasas que tienen la capacidad para hidrolizar ésteres de ácidos grasos de los esteroides, las colesterol-esterasas (EC 3.1.1.13). La mayoría de las esterasas presentan actividad hidrolítica hacia una amplia variedad de ésteres, por ejemplo, algunas lipasas a menudo tienen otras actividades como la esterol-esterasa, fosfolipasa (CE 3.1.1.4) o cutinasa (CE 3.1.1.74) (NC-IUBMB, 2011).

Por lo tanto, las esterasas no pueden ser clasificadas únicamente con base en su especificidad por el sustrato, es necesario el análisis de su secuencia y la estructura que poseen.

2.4.2. Determinación y cuantificación de la actividad esterasa

La actividad esterasa más general puede determinarse empleando como sustratos los ésteres de cadena acíclica del *p*-nitrofenol o del α/β -naftol, siguiendo la liberación de la base alcohólica por métodos espectrofotométricos logrando así una cuantificación ya que siguen una cinética Michaelleana. Deben considerarse los distintos coeficientes de extinción del *p*-nitrofenol a diferentes valores de pH, la ausencia de absorbancia a pH ácido y la ocurrencia de hidrólisis espontánea a pH básico (De Caro *et al.*, 1986; Gupta *et al.*, 2003).

Una forma sencilla de determinar y poner de manifiesto de manera cualitativa la actividad de esterasa es por medio de un zimograma (Díaz *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 2006)

Es importante también considerar que algunas sustancias o reactivos, utilizados en la extracción de proteínas, podrían estar afectando la actividad de las esterasas. Los detergentes pueden influir sobre las propiedades estereoselectivas (Tsai *et al.*, 1996). El efecto de los detergentes no es homogéneo para todas las enzimas, ni éstas son afectadas del mismo modo por todos los surfactantes (Aloulou *et al.*, 2007). Además, la influencia de estos compuestos sobre la actividad es dependiente de la dosis

(Sonesson *et al.*, 2006). El SDS, conocido por su efecto desnaturizante sobre las proteínas, también puede activar a determinadas lipasas e inhibir a otras (Wu *et al.*, 1996). Algunos detergentes no iónicos previenen la formación de agregados enzimáticos (Palomo *et al.*, 2003) y estabilizan estructuralmente a la molécula (Guisán *et al.*, 1996b). El Triton-X100 es un detergente no iónico conocido por su capacidad de estimular la actividad de las lipasas y esterasas (Sharma *et al.*, 2002).

3. HIPÓTESIS

Dado que las cepas BQ1 y BQ5 de *Alicyclophilus sp.* son capaces de crecer con PUh como única fuente de carbono y se ha propuesto que esto es debido a la presencia de esterasas, al comparar el crecimiento en MM-PUh, el patrón de proteínas y de esterasas, con la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T, se podrá determinar si existe(n) alguna(s) esterasa(s) que contribuyan a otorgar la capacidad de crecimiento en poliuretano.

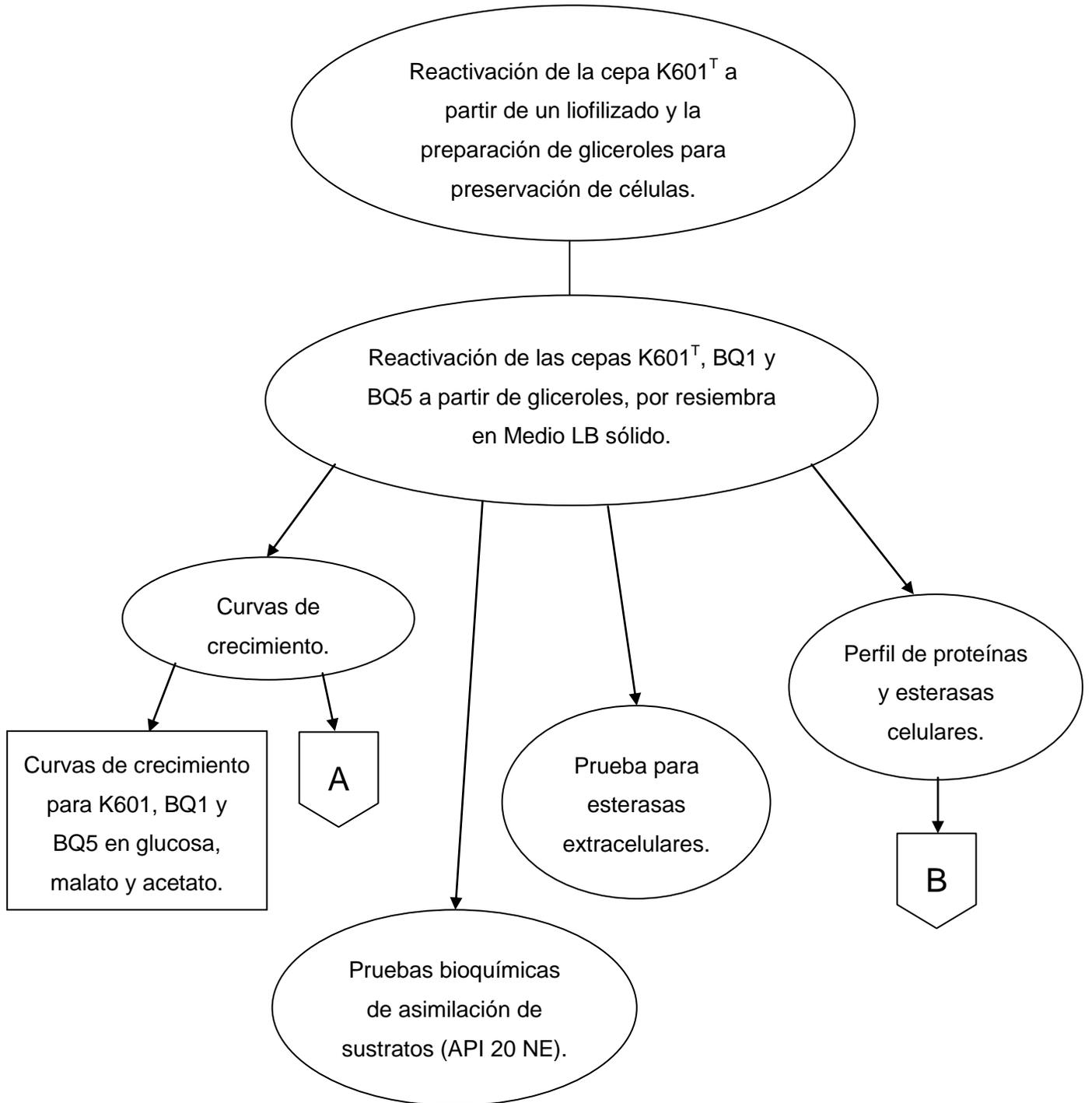
3. OBJETIVO GENERAL

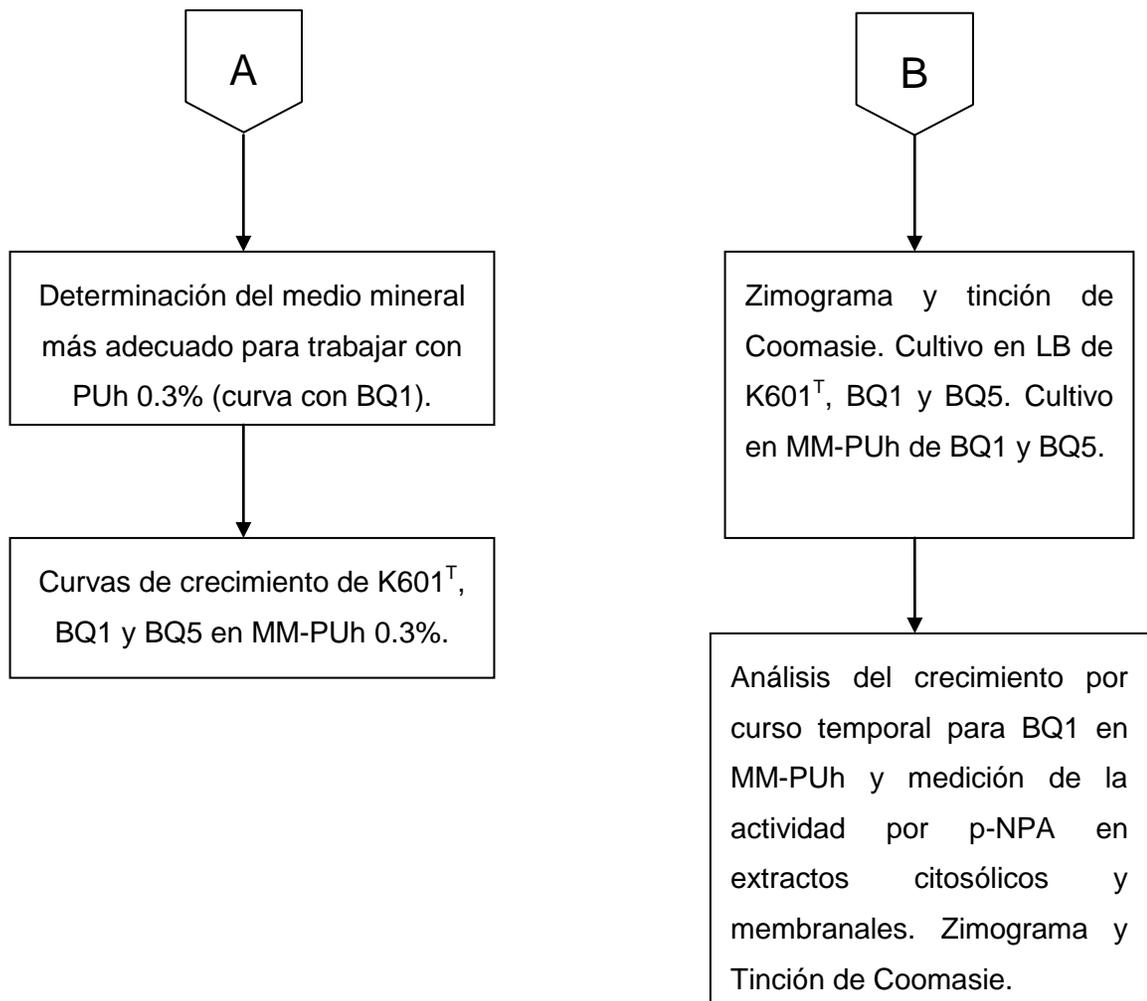
Comparar dos cepas de *Alicyclophilus sp.* BQ1 y BQ5 capaces de crecer PUh como única fuente de carbono, con la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T, a través de su comportamiento microbiológico, características bioquímicas, patrón de proteínas y perfil de esterasas.

3.1. Objetivos particulares

1. Determinar que medio mínimo de los sugeridos permite un mejor crecimiento de las bacterias usando Hydroform[®] como fuente de carbono.
2. Comparar la capacidad de la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T para crecer en MM-PUh con las cepas BQ1 y BQ5 de *Alicyclophilus sp.*
3. Realizar curvas de crecimiento en medios mínimos con fuentes de carbono diferentes al PUh, para las tres cepas.
4. Hacer pruebas bioquímicas y de asimilación de sustratos a través de un Kit comercial llamado API 20 NE.
5. Identificar y caracterizar el patrón de proteínas de las tres cepas.
6. Caracterizar el patrón de esterasas por zimograma de las tres cepas cultivadas en medio LB.
7. Comparar el patrón de esterasas por zimograma de las cepas BQ1 y BQ5, cultivadas en medio LB y MM-PUh.
8. Caracterizar la producción de esterasas de la cepa BQ1 en MM-PUh en un análisis curso temporal.

5. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL





6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Reactivación de células

La cepa K601^T de *Alicyclophilus denitrificans* se considera la cepa tipo ya que fue la primera cepa descrita en su género (Mechichi, *et al.*, 2003), la cual fue aislada de lodos activados en una planta de tratamiento de agua. Esta cepa fue obtenida del banco DSMZ (No. 14773). La cepa se reactiva a partir de un liofilizado, de acuerdo a las instrucciones del proveedor, el cual se hidrata con 5 mL de medio R2A (ver anexo) por 30 min a temperatura ambiente. Se toman 100 µL y se siembran por agotamiento en una caja con medio R2A sólido, se deja incubar por 48 h a 30 °C. Tomar una colonia y sembrar en medio R2A e incubar a 37 °C y 200 rpm durante una noche (overnight, ON). Para conservar las células y preservar su viabilidad y vitalidad se preparan gliceroles al 30% y se almacenan a -70 °C.

Las tres cepas de *Alicyclophilus* K601^T, BQ1 y BQ5 se encuentran conservadas en gliceroles a -70 °C, para reactivarlas es necesario descongelar y sembrar por estría cruzada en medio LB-agar para obtener colonias aisladas.

6.2. Preparación del inóculo para las curvas de crecimiento

La preparación del inóculo consiste en poner en un tubo con 5 mL de medio LB una colonia aislada a partir de una caja de LB y dejarla en cultivo ON a 37 °C con agitación a 200 rpm (entre 14 y 16 h). Una vez transcurrido el tiempo de incubación se mide la densidad óptica a 660 nm (DO_{660}) y se toma el volumen necesario para inocular un matraz de 125 mL, con 25 mL de medio LB y ajustarlo a una DO_{660} de 0.1, éste es un precultivo, el cual se deja incubar a 37 °C y 200 rpm, aproximadamente 3 h o el tiempo necesario para alcanzar una DO_{660} no mayor a 0.8. Una vez obtenido este crecimiento se calcula el volumen necesario de cultivo para inocular el medio a trabajar, se centrifuga este volumen a 7500 rpm por 15 min, para cosechar las células, el sobrenadante se desecha, las células son lavadas con un poco de amortiguador de fosfatos estéril 20 mM pH 7 (ver anexo) y se centrifuga una vez más en las mismas condiciones, el pellet es resuspendido en un poco de medio, del mismo tipo que se va a inocular y finalmente se agrega al total de medio a evaluar.

6.3. Curvas de crecimiento de la cepa BQ1 en diferentes medios mínimos adicionados con Hydroform® (PUh) como única fuente carbono

Con la finalidad de determinar que medio mineral resulta ser más adecuado para trabajar con PUh como única fuente de carbono, se prueban tres distintos medios mínimos de los sugeridos en la literatura para este tipo de ensayos: el descrito por Mechichi y colaboradores (2003) (MM-M), el recomendado por la DSMZ, (2008) (MM-DSMZ) y el descrito por Nakajima-Kambe y colaboradores (1995) (MM-NK). Dado que ya se tienen antecedentes del crecimiento de la cepa *Alicyclophilus sp.* BQ1 en MM-PUh (Oceguera, 2005; Sánchez, 2011) ésta es la cepa de elección para probar los medios mínimos sugeridos.

Se preparan 275 ml de cada uno de los medios mínimos adicionados con PUh como única fuente de carbono (ver anexo) y se toman seis alícuotas de 25 ml colocándolos en matraces estériles de 125 mL, uno será el blanco para medir la DO_{660} (dejar en refrigeración 4 °C) y los otros serán el muestras control que se incubará en las mismas condiciones que la curva, el resto de medio (125 mL) será inoculado con el precultivo (punto 6.2) de *Alicyclophilus sp.* BQ1 previamente preparado a una DO_{660} de 0.02, se homogeniza lo más posible durante 1 min y se reparte en alícuotas de 25 mL en 5 matraces de 125 mL etiquetados con las horas designadas para la curva (0-20, 20, 24, 48 y 92 h).

Para muestrear se sigue el crecimiento por DO_{660} las primeras 8 h, tomando lecturas cada 2 h y una última a las 20 h, a partir de las 20 h, el crecimiento se determina por peso seco.

Para las mediciones en peso seco centrifugar los 25 mL en un tubo falcon de 50 mL a 7500 rpm por 15 min en un rotor SL-510 (centrifuga, Sorvall super T21), desechar el sobrenadante y resuspender en 2 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7, transferir a un tubo eppendorf previamente pesado y centrifugar a 7500 rpm por 15 min en una centrifuga Eppendorf 5417-C, desechar el sobrenadante y retirar lo más posible la humedad del pellet, dejar secar en una estufa conectada al vacío y pesar diariamente hasta llegar a peso constante, para hacer los cálculos es necesario que en cada punto sea restado el peso de los sólidos obtenidos en las muestras control.

6.4. Curvas de crecimiento en MM-NK con PUh al 0.3% para las cepas K601^T, BQ1 y BQ5

Estas curvas se realizan de manera simultánea para las tres cepas esto garantiza que las condiciones en las que se lleva a cabo el experimento son iguales. Se prepara el total de medio (ver anexo) necesario para cuatro curvas (200 mL para cada curva). Una vez que se tiene el medio total, se reparte en cuatro matraces de 500 mL.

El medio contenido en los matraces de 500 ml será inoculado con cada una de las cepas (ver punto 6.2 para BQ1 y K601^T). En el caso de la cepa BQ5 debido a que en su crecimiento tiende a la formación de agregados (Solís, 2008), la preparación del inóculo es con base en el crecimiento de la cepas BQ1 y K601^T, las células con las que se inocula el medio deben ser previamente pesadas y con esto hacer un promedio, el cual nos va a ayudar a estandarizar el inóculo necesario para el caso de la cepa BQ5 (peso de células en fresco). La cuarta curva no se inocula pues se usa como control para determinar los sólidos que se precipitan del MM-PUh.

Una vez que se ha inoculado el medio con cada una de las cepas, se homogenizan lo mejor posible con movimientos circulares del matraz, por 1 min. Se separa el volumen en matraces de 125 mL con 25 mL de cultivo cada uno y se etiquetan de acuerdo a los tiempos en los que se tomarán las mediciones (0, 12, 24, 48, 72, 96 y 120 h) y a la cepa con la que fue inoculado.

Se incuban a 37 °C y 200 rpm, con excepción de los matraces correspondientes a las 0 h; para el primer punto de la curva de cada una de las cepas, se filtra a través de una membrana (Millipore tipo HAWP02500) de 0.45 µm previamente pesada, una vez que se ha filtrado todo el contenido del matraz de 0 h se pone a secar en un horno conectado a vacío a una temperatura de 45 °C, la membrana es pesada todos los días hasta alcanzar un peso constante.

Los siguientes puntos de la curva se determinan a los tiempos correspondientes. Para ello, centrifugar los 25 mL de cultivo en tubos falcon a 7500 rpm por 15 min, re-suspender en 2 mL de amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7 y colocar en tubos eppendorf de 2 mL previamente pesados, volviéndolos a centrifugar a las mismas condiciones, desechar el sobrenadante, retirando lo más posible la humedad del pellet, colocar el tubo en una estufa conectada al vacío y monitorear el peso hasta llegar a ser

constante. Para determinar el peso de la biomasa también es necesario considerar en los cálculos la resta de los sólidos obtenidos en los matraces con medio sin inocular.

6.5. Crecimiento de las cepas BQ1, BQ5 y K601^T, en MM NK con diferentes fuentes de carbono

Para comparar el crecimiento entre las tres cepas se prueban fuentes de carbono diferentes al PUH: glucosa, malato y acetato, para lo cual también se realizan curvas de crecimiento.

Se prepara el medio de cultivo (ver anexo) necesario para realizar el experimento (200 mL x cepa). Utilizar el punto 6.4 para guiarse en la distribución e inoculación del medio.

Las determinaciones de crecimiento se llevan a cabo por peso seco en el tiempo indicado para cada punto. Se realiza la filtración del cultivo a través de membranas de 0.45 µm de poro (Millipore tipo HAWP02500) previamente pesadas. Una vez que se ha filtrado el contenido de cada matraz se colocan en una estufa conectada al vacío y se monitorea el peso hasta llegar a ser constante.

6.6. Esterasas extracelulares, prueba de hidrólisis de Tween 80.

La capacidad para hidrolizar el Tween 80 (mono-oleato de polietilen sorbitan) pone de manifiesto la actividad de esterasa extracelular (Lovell y Bibel, 1977). Para ello los microorganismos se hacen crecer en un agar nutritivo que contiene Tween 80 y CaCl₂. Si el microorganismo es capaz de hidrolizar el Tween 80 aparece en el medio de cultivo un precipitado alrededor del crecimiento bacteriano debido a la combinación del Ca²⁺ y los ácidos grasos liberados por la hidrólisis. Cuando la bacteria no posee la capacidad para hidrolizar el Tween 80 no se observa ningún tipo de precipitado.

En el ensayo, se inoculó una caja con medio Tween 80 (ver anexo) con cinco cepas, un control positivo *Serratia marcescens* (Lelliot y Stead, 1987) (amablemente donada por el cepario de la Facultad de Química), *Escherichia coli* DH5α (control negativo), *Alicyclophilus denitrificans* K601^T y *Alicyclophilus* sp. cepas BQ1 y BQ5. Se dejó incubando a 37 °C de 96 a 120 h y se analizó el resultado.

6.7. Extracción de proteínas totales

Se parte un cultivo (ON) en medio LB (50 mL, 37 °C/200 rpm) para las tres cepas, se centrifuga a 7500 rpm 15 min (centrifuga, Sorvall super T21), para cosechar las células, se desecha el sobrenadante y se hace un lavado a las células con amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7, se centrifuga nuevamente a las mismas condiciones. Descartar el sobrenadante y con las células hacer una suspensión 10% p/v con amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7. Someter a ultrasonicación.

6.7.1. Ultrasonicación (modificado de Kermasha, *et al.*, 2000) y separación de fracciones

La suspensión de células al 10% se coloca en un tubo de plástico en un baño con hielo y se somete a disrupción celular en un equipo de sonicación (Vibra Cell, sonics) por 6 ciclos de 15 seg de disrupción por 15 seg de descanso, a una amplitud del 21%. Una vez sonicado, se aparta una alícuota de 500 µL en hielo a 4 °C, este es el extracto total, y el resto de la suspensión se centrifuga a 14,000 rpm/15 min (centrifuga Eppendorf 5417-C) en tubos previamente pesados. Con mucho cuidado se separa el sobrenadante el cual corresponde a las proteínas solubles o extracto de citosol.

El pellet se lava con amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7, se centrifuga nuevamente a 14,000 rpm/15 min y se descarta el sobrenadante. Pesar el pellet y preparar una suspensión al 5% w/v con amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7. Someter nuevamente a sonicación en dos ciclos de 15 seg por 15 seg, esto es para facilitar la dispersión de la membrana; esta fracción corresponde a las proteínas insolubles o extracto membranal (el volumen mínimo para sonicar en el equipo es de 2.5 mL). A los tres extractos, total, citosólico y membranal, se les determina la cantidad de proteína.

6.7.2. Cuantificación de proteínas (Bradford, 1976)

Para determinar la cantidad o concentración de proteína en los extractos con los que se va a trabajar, se utiliza el método de microensayos de Bradford (Bio-Rad). Para ello se debe preparar una curva patrón o estándar con una solución 1 mg/mL de

albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) En tubos eppendorf de 1.5 mL, se prepara la curva de acuerdo a la tabla 3.

Tabla 3. Preparación de una curva patrón con albúmina sérica bovina, para determinación de proteínas por el método de Bradford.

Punto	BSA (μL)	Proteína (μg)	Agua Desionizada	Reactivo de Bradford (μL)
1	1	1	799	200
2	2	2	798	200
3	4	4	796	200
4	6	6	794	200
5	8	8	792	200
6	10	10	790	200
Blanco	-	-	800	200

Leer en el espectrofotómetro (Ultrospec, 2000) a 595 nm utilizando una cubeta de plástico de 1 mL. Con los Absorbancias registradas, formar la curva patrón, graficar la Absorbancia contra la cantidad de proteína, determinar la linealidad de los valores y obtener la ecuación de la recta ($y = mx + b$), donde y = Absorbancia, x = Concentración de proteína ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) de la muestra y b = la ordenada al origen.

Se preparan las muestras o extractos a los que se les cuantifica la proteína en tubos eppendorf de 1.5 mL de acuerdo a la tabla 4. Esta medición se realiza midiendo cuatro diferentes cantidades de extracto de cada muestra.

Tabla 4. Preparación de muestras (extractos proteicos) para cuantificar proteínas por el método de Bradford.

No. Muestra	μL de muestra	Agua desionizada (μL)	Reactivo de Bradford (μL)
1	1	799	999
2	2	798	998
3	4	796	996
4	8	792	992

Se grafican los resultados obtenidos para confirmar linealidad entre los datos y se calcula la cantidad de proteína de acuerdo con la ecuación obtenida con la curva patrón (ecuación de la recta).

6.8. Zimograma

Para determinar el tamaño de las proteínas con actividad esterasa se realiza un zimograma para esta actividad. Para ello se utiliza el reactivo butirato de 4-metilumbeliferil para poner de manifiesto la actividad de esterasa a través de la acción de ésta sobre el enlace éster del butirato permitiendo la aparición del producto fluorescente 4-metilumbiliferona, al revelarse con luz ultravioleta (UV) (Díaz *et al.*, 1999) (figura 4).

El zimograma se lleva a cabo en un gel desnaturizante de poliacrilamida al 15% (SDS-PAGE) (Laemmli, 1970) (ver anexo). Los extractos (15 µg de proteína) son colocados en el gel al igual que 5 µL del marcador de peso molecular (Precision Plus Protein Standards, Dual Color de Bio-Rad) y 3 µL (stock 0.4 µg/µL) de un control positivo para la actividad de esterasa que en este caso se trata de la lipasa de *Pseudomonas fluorescens* (0.05 U) (Sigma, No Cat 95608).

El gel SDS-PAGE se corre en un equipo Mini Protean III (Bio-Rad) a 125 V por 2 h, transcurrido el tiempo el gel se coloca en una charola para hacerle 2 lavados, con 15 mL de una solución al 2.5% de Tritón X-100 (Sigma, No. Cat. 9002-93-1) por 20 min cada uno, esto con el fin de eliminar el SDS y las proteínas se puedan renaturalizar, por lo tanto recuperen su actividad. Se retira el Tritón y se enjuaga con amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7 por 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se incuba en ausencia de luz, con agitación media con el sustrato (solución 1.6 mM de butirato de 4-metilumbeliferil, ver anexo) de 20-30 min a temperatura ambiente y se revela con ayuda de un transiluminador UV. Las proteínas que tengan actividad de esterasa se verán de color blanco intenso sobre un fondo negro. Se toma una foto en el equipo Kodak Image Station- Molecular Imaging System.

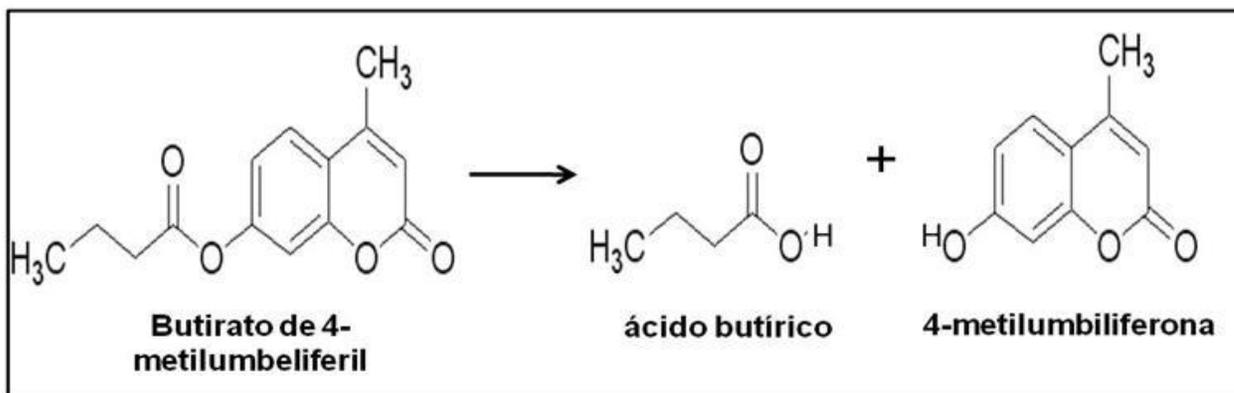


Figura 4. Reacción de hidrólisis del butirato 4-metilumbeliferil. Reacción en la que se basa el método de zimograma para medir la actividad de tipo esterasa. La enzima rompe el enlace éster en el butirato liberando una molécula de 4-metilumbiliferona la cual presenta fluorescencia por acción de luz UV.

6.9. Tinción de Coomassie y patrón de proteínas

Una vez que se ha corrido el gel y después de haber hecho el zimograma, se lava con amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7 por 5 min y se tiñe con una solución de azul de Coomassie al 0.05% por 1 h. Transcurrido el tiempo se quita el colorante y se agrega desteñidor-fijador hasta que únicamente se observen las bandas teñidas correspondientes a las proteínas presentes, si es necesario se puede cambiar la solución desteñidora varias veces. Se toma la imagen en el equipo Kodak Image Station-Molecular Imaging System.

6.10. Cuantificación de la actividad esterasa por curso temporal de crecimiento

Con la finalidad de caracterizar y analizar la actividad de esterasa en las distintas fracciones (membrana y citosol) durante las fases de crecimiento, se midió por el método de hidrólisis del *p*-NPA que genera ácido acético y *p*-nitrofenol el cual guarda equilibrio con el ión *p*-nitrofenóxido (figura 5).

Se hace una curva de crecimiento para la cepa BQ1 semejante a la descrita en el punto 6.4, los puntos de esta curva serán tomados a las 8, 16, 24, 48, 72, 96 y 120 h, con un volumen de cultivo de 200 mL por cada punto en matraces de 1 L.

Transcurrido el tiempo al que se debe de incubar, cosechar las células por centrifugación a 7500 rpm por 15 min, desechar el sobrenadante, hacer un lavado de las células con amortiguador 20 mM pH 7 a 4 °C y centrifugar nuevamente. Si el sobrenadante es translúcido proceder a quitar lo más posible la humedad de las células y pesarlas o bien, si el sobrenadante sigue turbio, lavar nuevamente con amortiguador de fosfatos.

Con el paquete celular pesado hacer una disolución al 10% p/v con amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7 y someter a ultrasonificación por 6 ciclos de 15 seg de disrupción por 15 seg de descanso.

Una vez sonicado, se centrifuga por 15 min a 14,000 rpm, en tubos eppendorf previamente pesados. Las dos fracciones que se obtienen son separadas, el sobrenadante será la fracción del citosol y el pellet la de la membrana, al pellet se le hace un lavado con amortiguador de fosfatos 20 mM y posteriormente se le quita la mayor cantidad de humedad, se pesa y se hace una disolución al 5% p/v, se somete a sonicación por 30 seg en dos ciclos de 15 seg, esto únicamente para facilitar la dispersión de la membrana.

A las dos fracciones, citosol y membrana, se les mide la cantidad de proteína (ver punto 6.7). Una vez medida la cantidad de proteína se debe ajustar la concentración de ésta a ~0.1 µg/µL para poder medir la actividad; también se guarda una alícuota sin ajustar con amortiguador de carga a 4 °C para usarse en un gel SDS-PAGE al 15%. Cada carril se carga con 20 µg de proteína, para hacer zimograma y tinción de Coomasie.

Para medir la actividad espectrofotométricamente a 405 nm, se prepara un stock de *p*-NPA 100 mM en acetonitrilo justo antes de empezar. Se corre un blanco de reacción sin enzima ya que el *p*-NPA tiende a hidrolizarse en ambientes acuosos. Cada cubeta se incuba a 37 °C por 3 min antes de ser agregado el sustrato. Preparar las cubetas para las reacciones como indica la tabla 5.

Tabla 5. Distribución de reactivos en la celda de reacción, para la determinación espectrofotométrica de la hidrólisis de *p*-NPA. La medición se realiza a 450 nm.

Reactivo	Cantidad (μL)			
	Blanco	Rx 1	Rx 2	Rx 3
Amortiguador de fosfatos 200 mM pH 7	950	950	900	850
Extracto	0	50	100	150

Se agregan 50 μL de solución stock de *p*-NPA 100 mM al mismo tiempo en que comienza a correr el cronómetro, se agita la reacción por 5 seg con un agitador y se toman lecturas a los tiempos 10, 20, 30, 40, 50, 60, 90, 120 y 180 seg.

Se hacen los cálculos pertinentes para determinar la actividad específica de cada extracto.

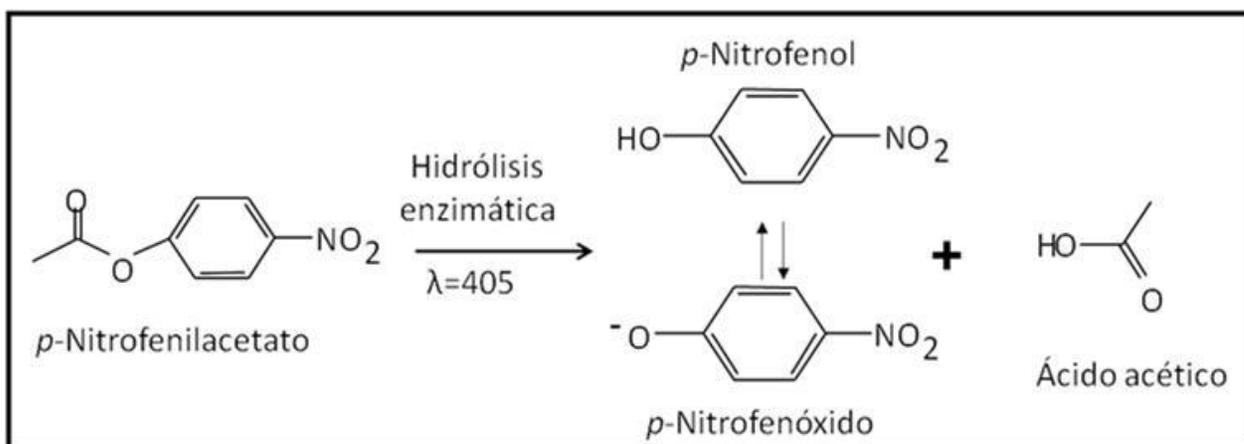


Figura 5 Reacción de hidrólisis del *p*-NPA. Reacción en la que se basa el método espectrofotométrico para medir la actividad enzimática de tipo esterasa. La enzima rompe el enlace éster del *p*-NPA liberando una molécula de *p*-NP y otra de *p*-NPO⁻, siendo detectado el *p*-NP a 405 nm.

7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. Medio mineral para trabajar con poliuretano-Hydroform[®] como única fuente de carbono

Un medio de cultivo artificial adecuado para que crezcan bacterias debe contener como mínimo, una fuente de carbono, nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas (Cl^- , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+}). En algunos casos serán también necesarias ciertas vitaminas y otras sustancias inductoras del crecimiento (elementos traza; Co, Cu, Zn, Mo, etc.). Se recomienda además, la presencia de electrolitos para ejercer de donantes o captadores de electrones para las reacciones químicas que tengan lugar.

Los tres medios que se evaluaron contienen los requerimientos mínimos necesarios para que crezcan las bacterias, la diferencia entre éstos radica en su composición en cuanto a micronutrientes y factores de crecimiento (Tabla 6).

Tabla 6. Composición de los medios minerales utilizados para el crecimiento de *Alicyclophilus sp.* BQ1 con PUh al 0.3%.

MM-M	MM-DSMZ	MM-NK
KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	Na ₂ HPO ₄ • 2H ₂ O KH ₂ PO ₄	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄
NH ₄ Cl CaCl ₂ •2H ₂ O MgSO ₄ •7H ₂ O NaNO ₃	(NH ₄) ₂ SO ₄ MgCl ₂ • 6H ₂ O Ca(NO ₃) ₂ • 4 H ₂ O	NH ₄ NO ₃ MgSO ₄ • 7H ₂ O
H ₃ BO ₃ CuCl ₂ • 2H ₂ O	EDTA FeSO ₄ • 7H ₂ O	ZnSO ₄ • 7H ₂ O CuSO ₄ • 7H ₂ O FeSO ₄ • 7H ₂ O MnSO ₄ • 6H ₂ O
NaOH Na ₂ SeO ₃ • 5H ₂ O Na ₂ WO ₄ • 2H ₂ O	ZnSO ₄ • 7H ₂ O MnCl ₂ • 4H ₂ O H ₃ BO ₃ CoCl ₂ • 6H ₂ O CuCl ₂ • 2H ₂ O	
Biotina Pantotenato de calcio Ácido nicotínico Tiamina Piridoxamina Ácido <i>p</i> -aminobenzoico	NiCl ₂ • 6H ₂ O Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	

MM-M contiene cloruro de calcio que es poco soluble, también elementos traza y una serie de vitaminas como factores de crecimiento, el MM-DSMZ contiene una serie de electrolitos y un agente quelante, el EDTA, finalmente el medio MM-NK tiene como elementos traza algunas sales, resaltando la falta de cloruros y sodio. En los tres medios la fuente de nitrógeno es similar pues se encuentra en forma de nitratos (NO_3^-) y del ión amonio (NH_4^+).

La comparación entre los medios mínimos permitió determinar en cuál de éstos se obtiene un mejor crecimiento usando el barniz de PU Hydroform[®] como única fuente de carbono. El Hydroform[®] es un barniz de poliéster-PU base agua, la formulación de este tipo de material se hace a través de dos sistemas ya sea por dispersión de resinas de PU con ayuda de un cosolvente o utilizando isocianatos bloqueados que permiten la solubilidad parcial en agua (Henderson, 1999), ya que químicamente el PU no es compatible o soluble en agua. Un barniz de PU es una suspensión coloidal, la cual puede ser alterada si se encuentra en presencia de otros compuestos como metales y algunos tipos de sales, provocando así su precipitación e inestabilidad en la suspensión.

Siendo que los tres medios mínimos aquí evaluados han sido propuestos para trabajar con bacterias del género *Alicyclophilus* (Mechichi *et al.*, 2003; DSMZ; Ocegüera-Cervantes *et al.*, 2007), era necesario que se analizara el efecto que tenían sobre el poliuretano Hydroform[®] (PUh) y cuál era la repercusión sobre la producción de biomasa. Para ello se midió el crecimiento de la cepa BQ1 de *Alicyclophilus sp.*, las primeras 20 h por DO ya que crece de manera planctónica al inicio, a partir de esta misma hora y hasta las 96 h se determinó por peso seco la producción de biomasa.

El análisis de los resultados obtenidos mostró que en el MM-NK se tiene el mejor crecimiento, mientras que el MM-DSNZ mostró un crecimiento semejante al MM-NK aunque ligeramente menor hacia los tiempos más tardíos y el MM-M presentó la menor producción de biomasa (figura 6). Es importante señalar que en cada punto de análisis, los sólidos obtenidos en cultivos sin inocular fueron restados de las mediciones problema. También durante este experimento se observó que el MM-DSNZ cambiaba de coloración de blanco a amarillo-verdoso, lo cual podría ser indicativo de una fuerte

oxidación de los compuestos contenidos en el medio. Los medios MM-M y MM-DSMZ presentaron una mayor precipitación del polímero observado en los controles sin inocular lo cual es indicativo de que la formulación de estos medios afecta la estabilidad del Hydroform®, dificultando así la separación de la biomasa bacteriana del polímero. Por lo anterior, se consideró al MM-NK como el medio de cultivo más adecuado para continuar trabajando en este proyecto, además de que resulta ser el medio de más fácil acceso y de menor costo. Por otro lado, se puede observar con este experimento que la cepa BQ1 no requiere de factores de crecimiento como vitaminas para su cultivo, ya que el MM-NK no contiene este tipo de componentes.

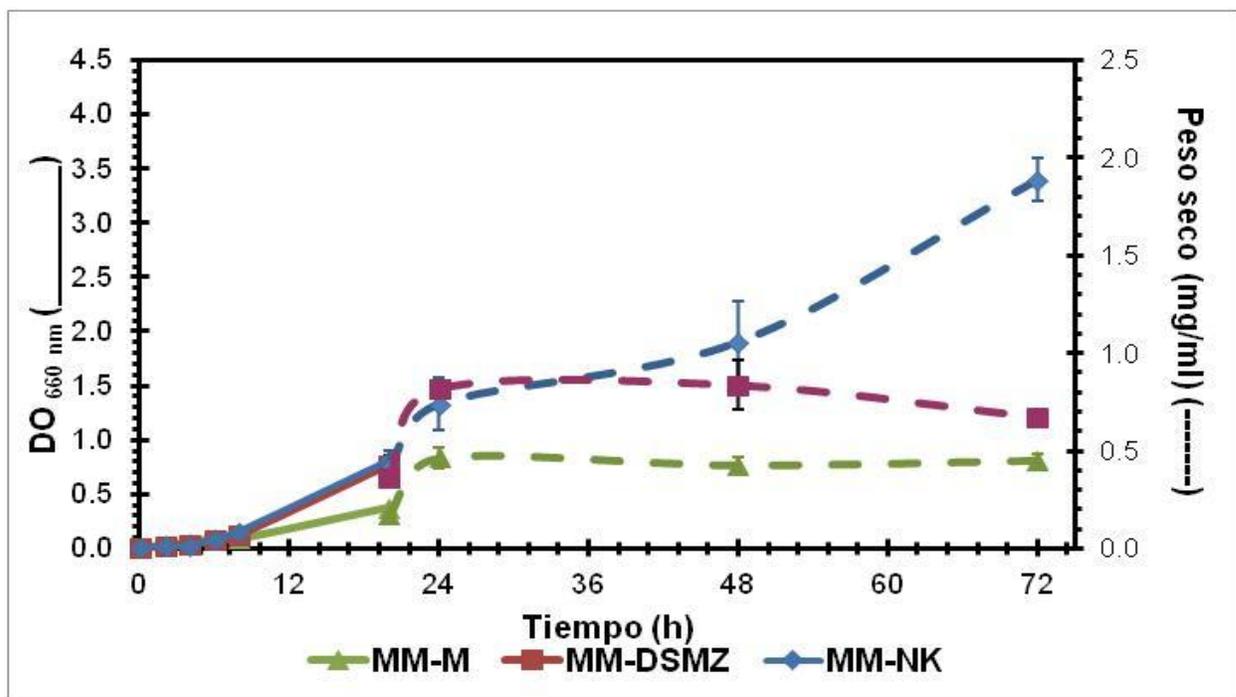


Figura 6. Crecimiento de *Alicyclophilus sp.* BQ1 en tres diferentes medios mínimos. La línea continua representa el crecimiento determinado por DO_{660nm}, la línea discontinua es la medición del crecimiento por peso seco. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones y las barras representan la desviación estándar. En cada punto se restó el valor de una medición control sin inocular, se incubaron a 37°C y 200 rpm, al tiempo cero la DO es igual a 0.02 para los tres medios mínimos.

7.2. Crecimiento en poliuretano como única fuente de carbono

El PU es un compuesto xenobiótico, el cual tiene poco más de 50 años de existir en el ambiente y dada su difícil degradación se ha convertido en un problema de contaminación. Sin embargo, ya que es un compuesto a base de carbono se le puede considerar con potencial a ser biodegradado por bacterias heterótrofas (Gu *et al.*, 2000).

Anteriormente en nuestro laboratorio se había demostrado el crecimiento de las cepas BQ1 y BQ5 de *Alicyclophilus sp.* en MM-PUh (Oceguera-Cervantes, 2005; Solís, 2008), y el efecto sobre la estructura del PU de un barniz comercial Hydroform[®] generado por la cepa BQ1 (Oceguera-Cervantes *et al.*, 2007). Sin embargo, estas cepas no han sido identificadas a nivel de especie, por lo que se decidió compararlas con la única especie descrita del género *Alicyclophilus*, siendo la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T.

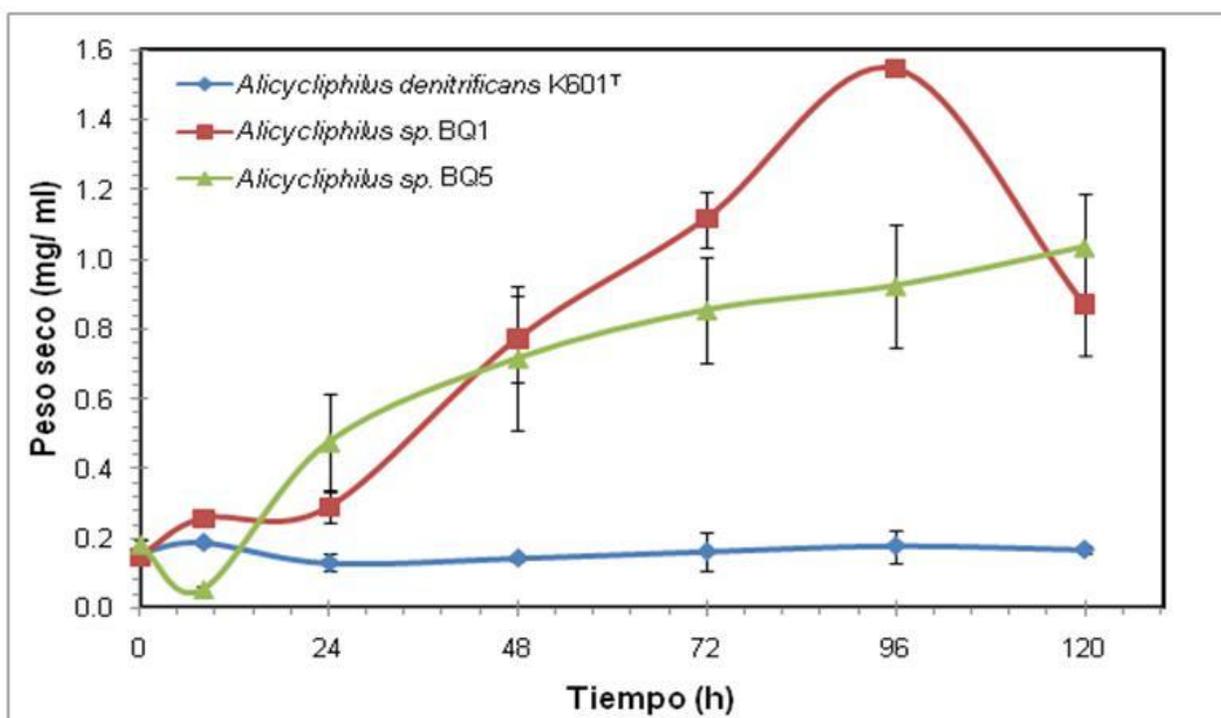


Figura 7. Crecimiento en MM-PUh al 0.3% de *Alicyclophilus denitrificans* K601^T, *Alicyclophilus sp.* BQ1 y BQ5. Se comparó la producción de biomasa por peso seco. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones y las barras representan la desviación estándar. En cada punto se restó una medición control sin inocular y se incubaron a las condiciones estándar (37°C y 200 rpm). Se observa que la cepa K601^T mantiene la cantidad de biomasa lo que es indicativo de que no es capaz de reproducirse en este medio.

Para ello, se determinó el crecimiento de las tres cepas en MM-PUh al 0.3% como única fuente de carbono, ya que es la principal característica en la que se basa nuestra investigación. En este experimento se observó que la cepa K601^T no creció, ya que no hubo un aumento en la biomasa, pues se mantuvo constante durante los cinco días que duró el experimento (figura 7).

7.3. Crecimiento de *Alicyclophilus* en fuentes de carbono diferentes al poliuretano

Se realizaron curvas de crecimiento usando otras fuentes de carbono para comparar el comportamiento microbiológico entre las tres cepas. Primeramente se determinó el crecimiento para las cepas BQ1 y K601^T, por medio de DO_{660 nm}, en medio LB, que es un medio rico en nutrientes (figura 8). No se determinó para la cepa BQ5 ya que en su crecimiento forma agregados y/o biofilm. Además, su crecimiento en este medio registrando el peso seco ya fue descrito previamente (Oceguera, 2006; Solís, 2008).

El crecimiento en medio LB (figura 8) es más acelerado que en MM-PUh (figura 7) ya que mientras en medio LB se alcanza la fase estacionaria a las 11 h, en MM-PUh deben transcurrir 72 h para alcanzarla. Esto podría deberse a que el medio LB es un medio rico en nutrientes los cuales facilitan el crecimiento.

Mechichi y colaboradores en 2003, cuando describieron a la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T, hicieron referencia a una serie de sustratos en los cuales es capaz de crecer en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, por lo que en este trabajo se eligieron algunos de ellos como glucosa 2 mM, malato 10 mM y acetato 1 mM para registrar el crecimiento en condiciones aeróbicas. Como se puede observar en las figuras 9 y 10 (glucosa y malato), el crecimiento es casi 10 veces menor al obtenido con el medio MM-PUh (figura 7). El inicio de la fase logarítmica se aprecia a partir de las 48 h y hasta las 96 h cuando inicia la fase estacionaria. En medio con acetato como única fuente de carbono, la producción de biomasa se mantiene constante, siendo un indicativo de que las bacterias no se están reproduciendo (figura 11).

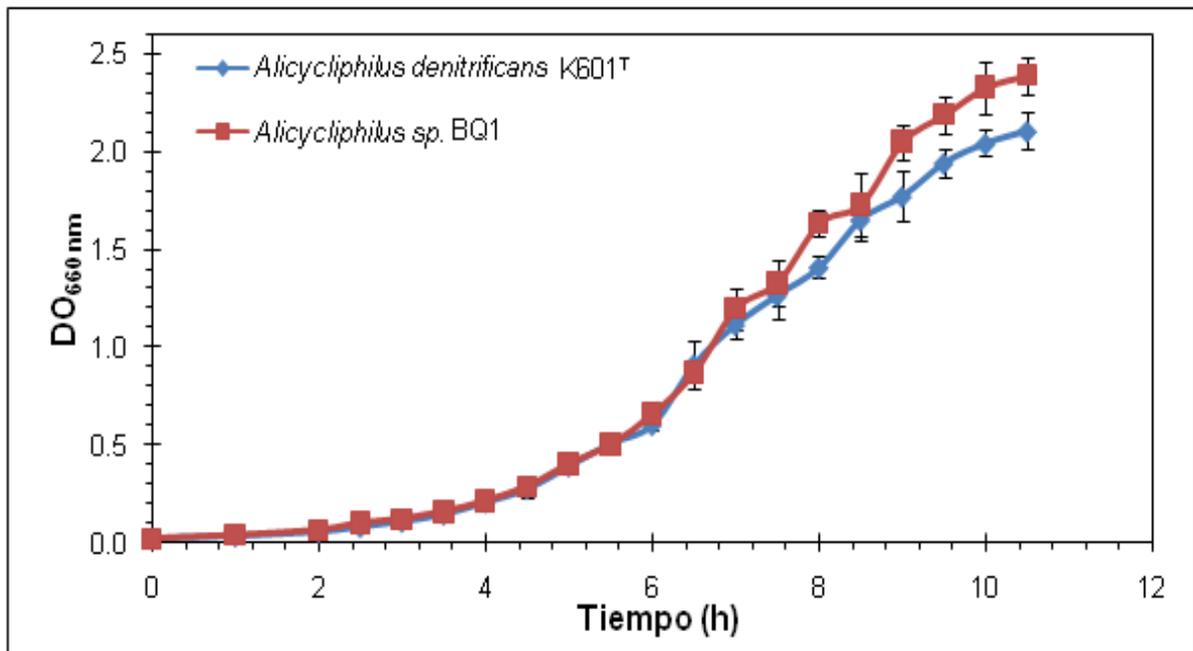


Figura 8. Crecimiento de *Alicyclophilus sp.* BQ1 y *Alicyclophilus denitrificans* K601^T en medio Luria-Bertani. Determinación del crecimiento por DO_{660 nm}. Los puntos corresponden al promedio de tres repeticiones, las barras representan la desviación estándar. El inicio de las determinaciones fue a partir de ajustar la DO_{660nm} a 0.02 en los cultivos, la incubación se llevó a cabo en condiciones estándar: 37°C y 200 rpm. El comportamiento es similar entre las dos cepas alcanzando el inicio de la fase estacionaria a las 10 h.

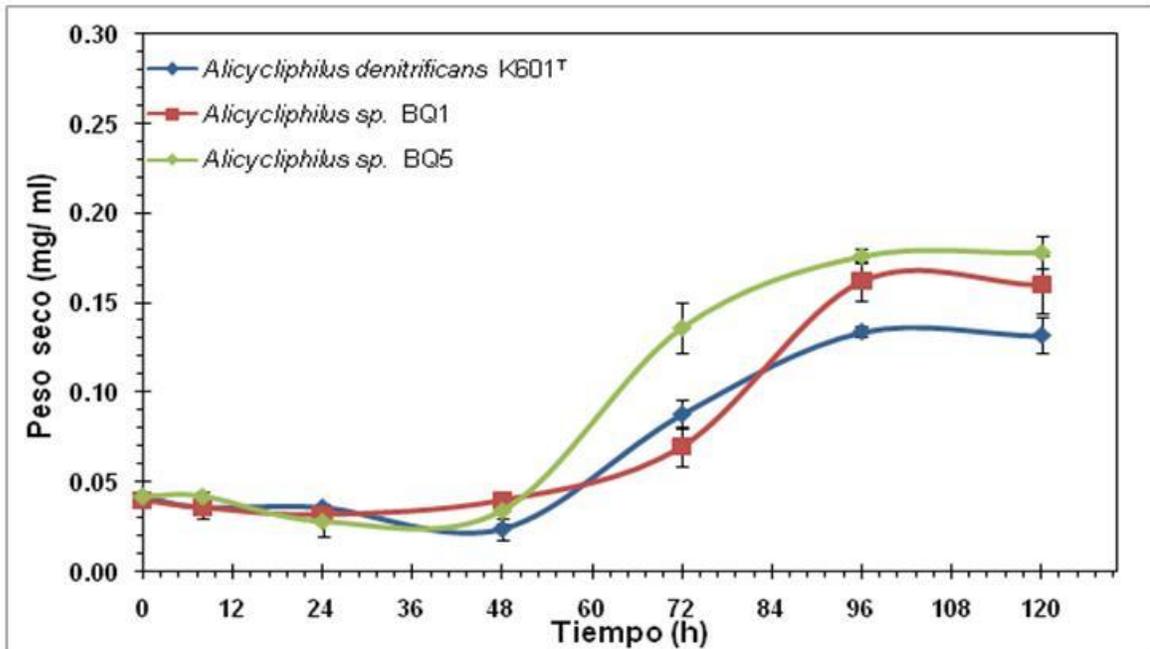


Figura 9. Crecimiento en glucosa 2 mM de *Alicyclophilus denitrificans* K601^T, *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ5. Determinación de biomasa por peso seco. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones y las barras representan la desviación estándar.

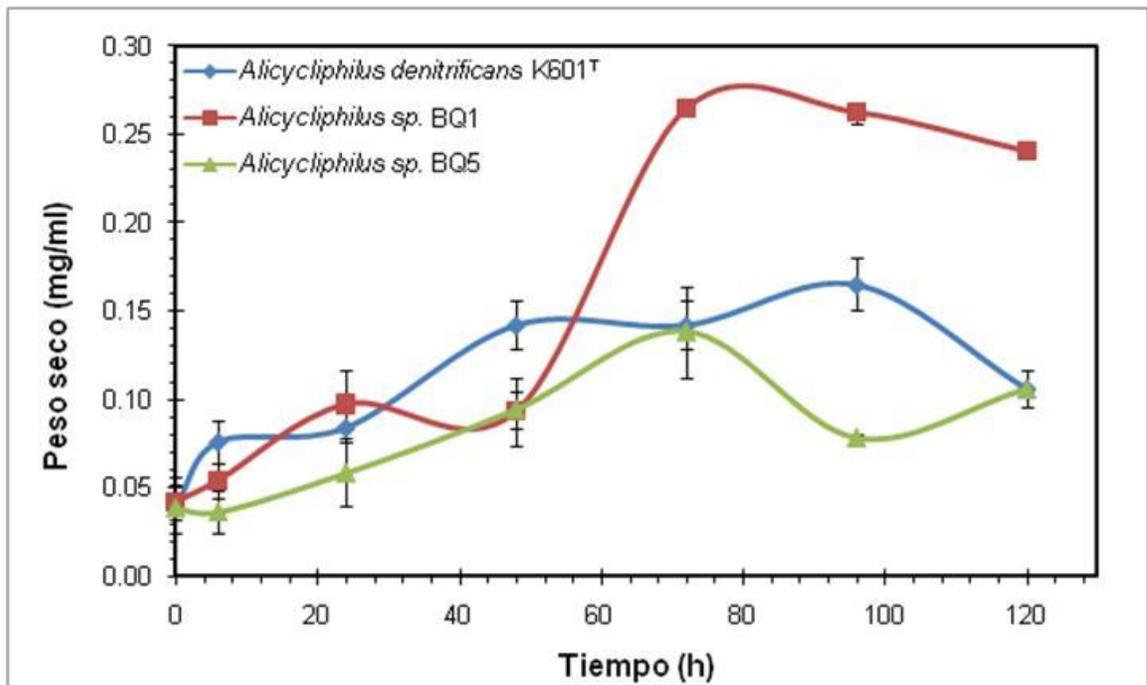


Figura 10. Crecimiento en malato 10 mM de *Alicyclophilus denitrificans* K601^T, *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ5. Determinación de biomasa por peso seco. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones y las barras representan la desviación estándar. Se incubaron a 37 °C y 200 rpm.

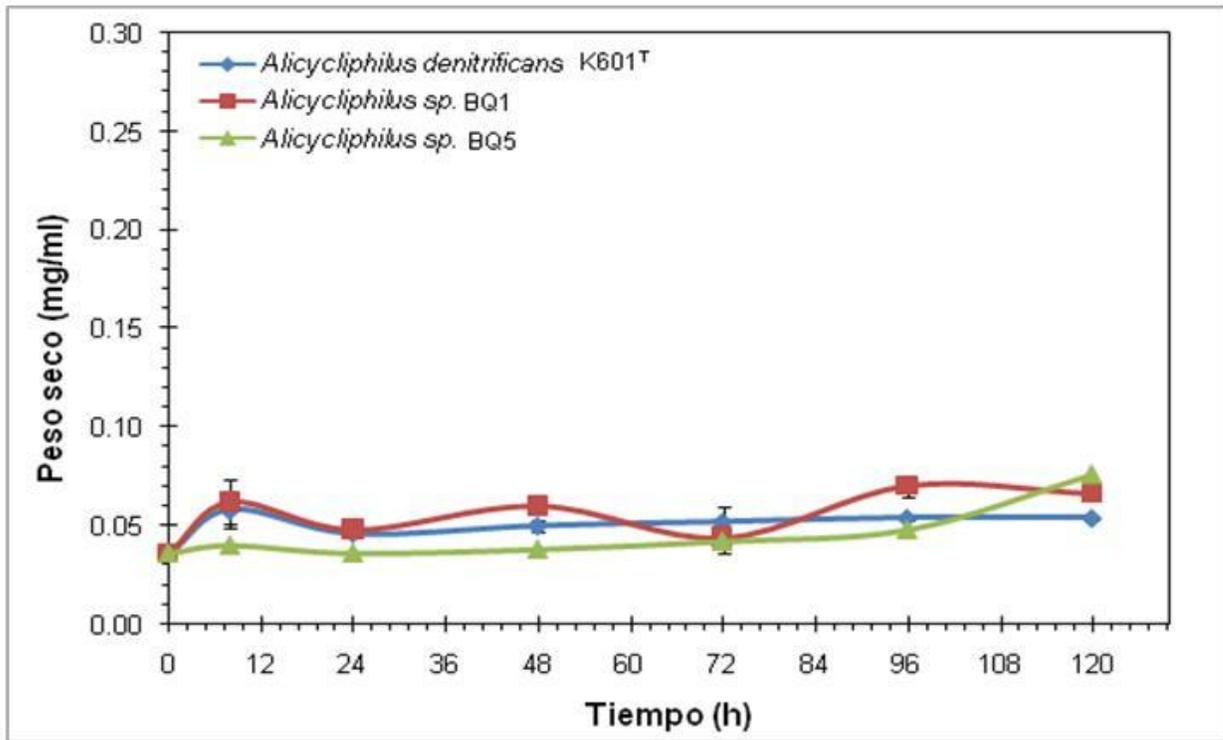


Figura 11. Crecimiento en acetato 1 mM de *Alicyclophilus denitrificans* K601^T, *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ5. Determinación de biomasa por peso seco. Cada punto corresponde al promedio de tres repeticiones y las barras representan la desviación estándar. Se incubaron a 37 °C y 200 rpm.

7.4. Pruebas bioquímicas y de asimilación de sustratos

Para hacer la caracterización bioquímica de las tres cepas analizadas se utilizó el kit comercial API 20 NE. Éste es un sistema para la identificación de bacilos gram-negativos (no enterobacterias). El sistema está estandarizado y combina 8 pruebas convencionales y 12 de asimilación. Consta de una galería con 20 microtubos conteniendo medios y/o sustratos en forma deshidratada. Las pruebas convencionales se inoculan con una suspensión bacteriana de la cepa a analizar en solución salina. Tras un período de incubación de 24-48 horas a 30 °C se pueden observar virajes de color en el medio directamente o después de la adición de reactivos. Las pruebas de asimilación se inoculan con un medio mínimo, observándose crecimiento bacteriano si la cepa es susceptible de utilizar el sustrato correspondiente.

Aunque este tipo de pruebas se utilizan para la identificación de microorganismos, a través de la lectura de los resultados comparándolos con un código,

Alicyclophilus sp. no se encuentra caracterizada. El objetivo de hacer este test es determinar el grado de similitud entre las cepas a través de una comparación bioquímica, de su capacidad de asimilar los sustratos y de presentar los tipos de metabolismo probados en el test.

En los resultados obtenidos se observó que las tres cepas tienen la capacidad de reducir NO_3^- lo que las convierte en bacterias desnitrificantes, la principal característica de la cepa K601^T. Además, se confirma la naturaleza anaeróbica de las tres cepas, al poseer actividad de oxidasas. También son capaces de asimilar sustratos como malato y adipato los cuales dentro de su estructura poseen uno y dos enlaces éster respectivamente (tabla 7).

La cepa BQ1 es positiva para la producción de arginina hidrolasa mientras que las cepas BQ5 y K601^T no la producen. La arginina hidrolasa pertenece a la familia de las hidrolasas (desaminidasa, EC. 3.5.3.6), sus principales sustratos son la L-arginina y H_2O , produciendo L-citrulina y NH_3 (Mac Faddin, 2003). Esta enzima actúa sobre los enlaces carbono-nitrógeno no peptídicos, en especial las aminas lineales.

La cepa K601^T dió positivo a las pruebas, de degradación de triptófano, asimilación de glucosa y gluconato, mientras que las que BQ1 y BQ5 fueron negativas. El triptófano es un aminoácido aromático el cual consta de dos anillos unidos a una molécula de indol, el rompimiento de esta molécula se lleva a cabo por una serie de enzimas intracelulares que en conjunto se denominan complejo triptofanasa (Mac Faddin, 2003). La asimilación de glucosa indica que la bacteria obtiene energía de este carbohidrato a través de una de las vías de la glucólisis, como podría ser la vía Embden-Meyerhof-Parnas (Mac Faddin, 2003). El gluconato de potasio es una sal derivada del ácido glucónico, en muchas bacterias con metabolismo oxidativo, el catabolismo de D-gluconato, vía gluconato-6-fosfato, se lleva a cabo principalmente por las enzimas de la vía de Entner-Doudoroff (García y Ponce, 2003), la cual es una vía alternativa para el metabolismo de carbohidratos (Conway, 1992), que aunque muchos autores mencionan que es exclusiva para bacterias con respiración aerobia estricta, se ha encontrado que en microorganismos como *Zymomonas mobilis* (Viikari, 1988; Doelle, 1982) se lleva a cabo anaeróbicamente o que en bacterias anaerobias

facultativas como *Neisseria gonorrhoeae* (Hebeler y Morse, 1976) se puede inducir el uso de esta vía.

Tabla 7. Test API 20 NE aplicado en la cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T y en las cepas BQ1 y BQ5 de *Alicyclophilus* sp. **Estas pruebas se realizaron en el cepario de la Facultad de Química, a cargo del QFB Alejandro Camacho.**

Prueba	K601 ^T	BQ1	BQ5
NO₃ (reducción de NO ₃ , producción de N ₂)	+	+	+
TRP (degradación de triptófano)	+	-	-
GLU (fermentación de glucosa)	-	-	-
ADH (producción de arginina hidrolasa)	-	+	-
URE (producción de ureasas)	-	-	-
ESC (producción de β-glucosidasas)	-	-	-
GEL (producción de proteasas)	-	-	-
PNPG (producción de β-galactosidasa)	-	-	-
GLU (glucosa)	+	-	-
ARA (arabinosa)	-	-	-
MNE (manosa)	-	-	-
MAN (manitol)	-	-	-
NAG (N-acetilglucosamida)	-	-	-
MAL (maltosa)	-	-	-
GNT (gluconato)	+	-	-
CAP (caproato)	-	-	-
ADI (adipato)	+	+	+
MLT (malato)	+	+	+
CIT (citrato)	-	-	-
PAC (fenil acetato)	-	-	-
OX (presencia de oxidasas)	+	+	+

7.5. Patrón de proteínas y esterasas

7.5.1. Esterasas extracelulares

En trabajos publicados sobre la degradación de PU se han reportado actividades de esterasas extracelulares en *Corynebacterium* sp. (Kay *et al.*, 1993), *Comamonas acidovorans* TB35 (Nakajima-Kambe *et al.*, 1997), *Pseudomonas chlororaphis* (Ruiz *et al.*, 1999) y en *Pseudomonas fluorescens* (Vega *et al.*, 1999). Sin embargo, en el caso de *Corynebacterium* sp. y *Pseudomonas fluorescens* no es clara su participación en la biodegradación del PU, mientras que en *Pseudomonas chlororaphis* las tres enzimas que se han encontrado mostraron tener actividad sobre el PU.

Anteriormente en nuestro laboratorio se había demostrado que las cepas BQ1 y BQ5 de *Alicyclophilus* sp., presentaban actividad de esterasa extracelular (Oceguera-Cervantes, 2005). Para determinar si esta actividad podría estar relacionada con la capacidad de crecer en MM-PUh, se determinó la capacidad de producir esterasas extracelulares de la cepa K601^T de *Alicyclophilus denitrificans*, que no es capaz de crecer en MM-PUh. La prueba de hidrólisis de Tween 80 pone de manifiesto la presencia de esterasas extracelulares. El resultado obtenido muestra que la cepa tipo K601^T también presenta esta actividad (figura 12), lo que sugiere que la capacidad de crecimiento en MM-PUh podría no depender de la generación de esterasas extracelulares o que no es suficiente la producción de esterasas extracelulares para el crecimiento en PUh

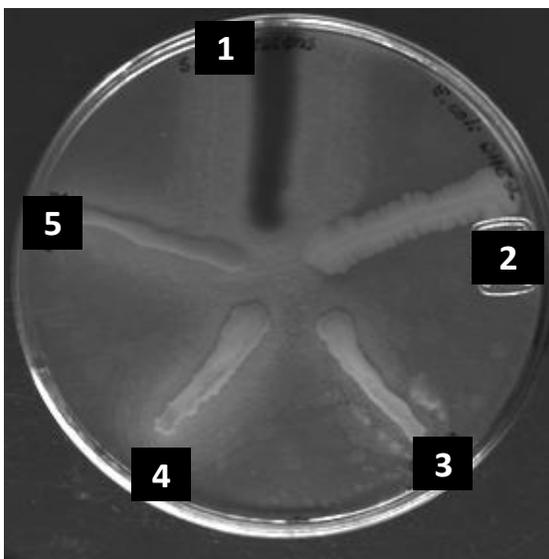


Figura 12. Producción de esterasas extracelulares en medio Tween 80. Al hidrolizarse el Tween 80 se precipita el CaCl_2 formándose un halo blanquecino alrededor del crecimiento. **1)** Control positivo *Serratia marcescens* (Lovell, 1977), **2)** control negativo *Escherichia coli* DH5 α , **3)** *Alicyclophilus* sp. BQ5, **4)** *Alicyclophilus* sp. BQ1 y **5)** *Alicyclophilus denitrificans* K601^T.

7.5.2. Proteínas y esterasas celulares

El patrón de proteínas generado en una electroforesis unidimensional (1D) es utilizado para comparar cepas bacterianas de una forma rápida, en el área clínica cuando se duda entre especies o cepas se puede hacer el patrón electroforético de proteínas para distinguirlas (Costas *et al.*, 1987; Costas *et al.*, 1989). Sin embargo, éste es un método poco sensible y se requiere de controles muy bien establecidos y a menudo para hacer un diagnóstico se debe combinar con pruebas inmunológicas (Plugge *et al.*, 2000). En la investigación científica el uso de patrones electroforéticos de proteínas es de gran ayuda cuando se requiere comparar varias cepas de un mismo género, aunque no es una prueba definitiva o muy sensible, permite tener una idea clara de lo que se trabaja sobre todo si es combinada con un análisis computacional (Berber, 2004).

En este trabajo, se realizó un perfil electroforético de proteínas para comparar a las tres cepas de *Alicyclophilus*. También se incluyeron dos cepas de diferentes géneros para comparación, se cultivaron en medio LB y se hizo la extracción de proteínas totales a partir de un cultivo ON de 16 h. En la figura 13, se muestran los patrones de proteínas de las cinco cepas encontrando una gran similitud entre las cepas del género *Alicyclophilus sp.* BQ1, BQ5 y la cepa K601^T de *Alicyclophilus denitrificans*; y una marcada diferencia con las cepas utilizadas como comparación, *Pseudomonas putida* KT2440 y *Escherichia coli* DH5 α .

Para identificar proteínas con actividad esterasa presente en estos extractos se llevó a cabo la técnica de zimograma para esterasas usando como sustrato butirato de 4-metilumbeliferil (Díaz *et al.*, 1999). Este análisis puso de manifiesto la presencia de estas enzimas al revelar el producto fluorescente resultante de la actividad esterasa, por medio de luz UV. Con esta técnica se observó que los extractos proteicos totales de las tres cepas de *Alicyclophilus* cultivadas en medio LB y analizadas al final de la fase logarítmica de crecimiento cuando presentaban una DO_{660nm} de 1.9, presentaron tres esterasas con tamaños aproximados de 62, 20, 19 kDa. *Pseudomonas putida* KT2440 tiene tres esterasas de 62, 26 y 17 kDa, mientras que *Escherichia coli* DH5 α tan sólo muestra la presencia de una esterasa de 18 kDa (figura 13).

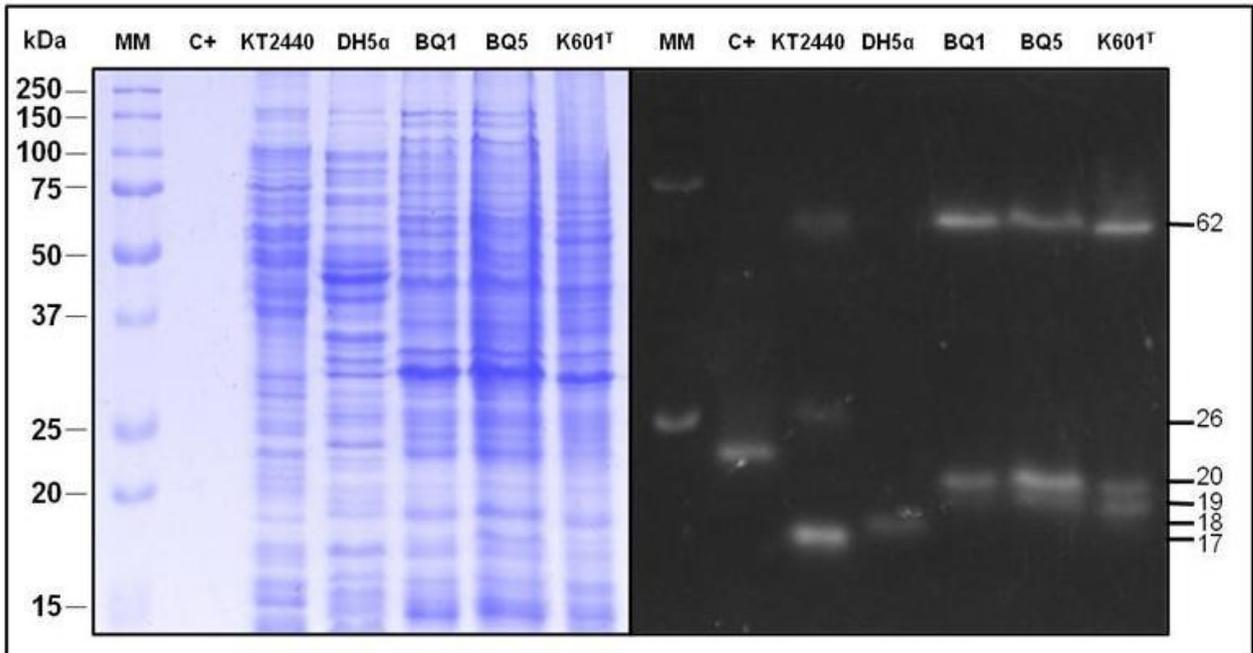


Figura 13. Patrón de proteínas y zimograma para actividad esterasa de extractos de proteínas totales de cultivos en medio LB cosechados a finales de la fase logarítmica de crecimiento a una $DO_{660\text{ nm}}$ de 1.9. A la izquierda SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomasie y a la derecha zimograma para actividad esterasa, utilizando como sustrato butirato de 4-metilumbeliferil. **MM** marcador de peso molecular, **C+**, control positivo (0.05 U de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*). Para cada cepa se cargaron 15 μg de proteína de extracto total, cepas: *Pseudomonas putida* (**KT2440**), *Escherichia coli* (**DH5 α**), *Alicyclophilus* sp. (**BQ1** y **BQ5**), *Alicyclophilus denitrificans* (**K601^T**). Los números a la derecha del zimograma indican el tamaño aproximado de las esterases observadas.

Se ha reportado que *Comamonas acidovorans* TB 35 además de tener una esterasa extra-celular tiene otra asociada a membrana, demostrándose que esta última tiene una mayor actividad y efecto sobre el PU que la esterasa extra-celular (Nakajima-Kambe *et al.*, 1997; Akutsu *et al.*, 1998). Por esta razón se analizó la localización subcelular de las esterases observadas en *Alicyclophilus*. Para ver en que fracción celular se encontraban las esterases en las tres cepas de *Alicyclophilus* se llevó a cabo el mismo experimento, cultivando en LB cosechando las células a $DO_{660\text{ nm}}$ 2.4 encontrándose en fase estacionaria; los extractos totales se fraccionaron en fracción citosólica (fracción soluble) y fracción membranal (fracción insoluble).

En la figura 14 se muestran los resultados obtenidos, encontrando que las esterases de 62 y 20 kDa se encuentran presentes tanto en la fracción de membrana como de citosol en las tres cepas, aunque presentan mayor actividad en el extracto de membrana. En esta condición se observa, en las tres cepas, una señal correspondiente a una esterasa de 36 kDa, que no se observó en la fase logarítmica tardía, analizada en el experimento anterior (figura 13). En la cepa tipo K601^T, se presentó también la esterasa de 19 kDa (encontrada en la fracción del citosol), que no la presentaron BQ1 y BQ5 en este estadio. Además, K601^T también presentó otras dos esterases de aproximadamente 75 y 50 kDa que no tienen BQ1 y BQ5, que no se detectaron en el ensayo anterior y éstas se encuentran en la fracción membranal. La razón de que en el ensayo de extractos totales no se hayan detectado las esterases de 75,50 y 36 KDa posiblemente sea porque los cultivos se encontraban en fases de crecimiento diferentes (determinación de la fase de crecimiento por DO 660 nm). La esterasa de 19 kDa en las cepas BQ1 y BQ5 desaparecen en la fase estacionaria de crecimiento (fig 14) esto puede deberse a que ya no es necesaria para la célula y deja de expresarse. Estos ensayos fueron repetidos por lo menos tres veces.

Con estos resultados no se puede concluir que alguna actividad esterasa sea la responsable de la capacidad de crecer en PUh, ya que no existe una diferencia entre las cepas de *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ5, comparadas con la cepa de *Alicyclophilus denitrificans* K601^T, que sugiera que alguna esterasa sea la responsable de la capacidad de crecimiento en MM-PUh.

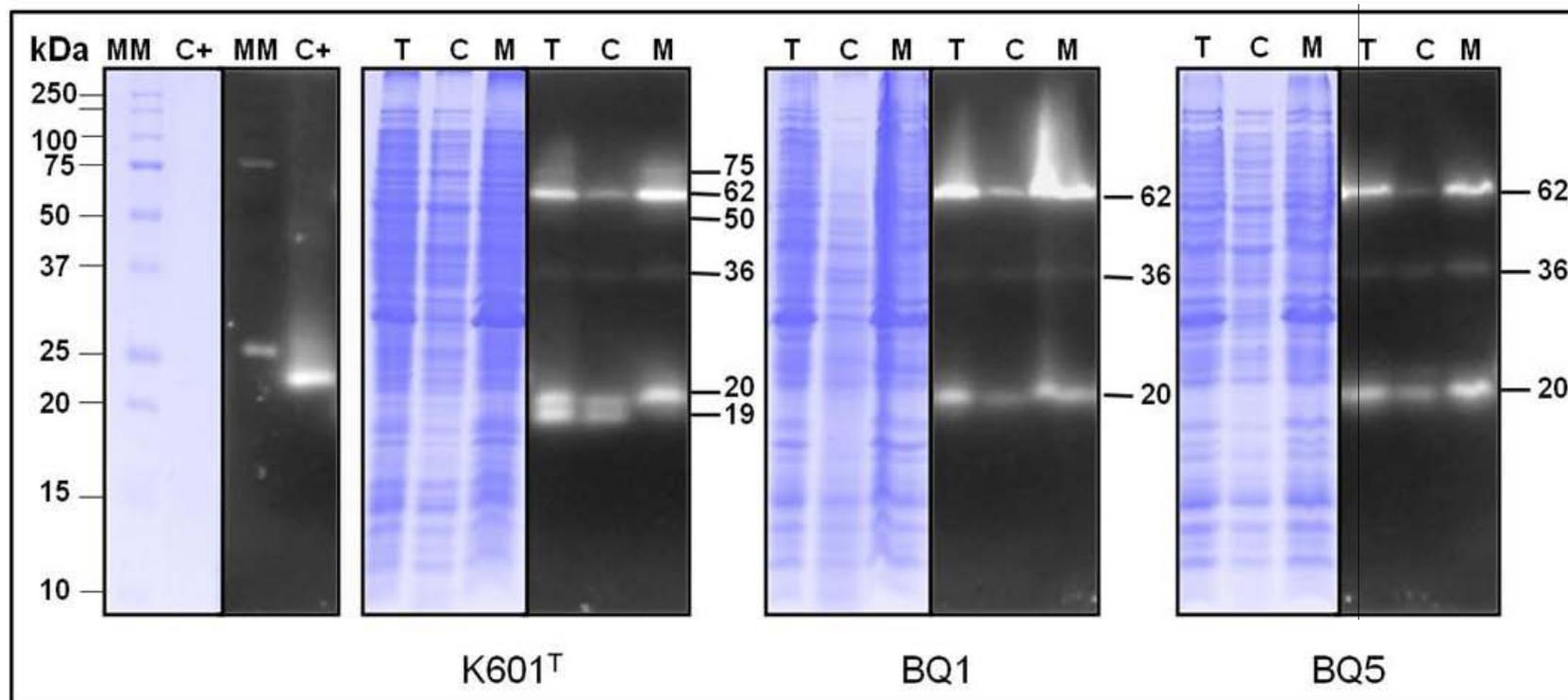


Figura 14. Patrón de proteínas y zimograma para actividad esterasa de *Alicyclophilus denitrificans* K601^T, *Alicyclophilus* sp. BQ1 y BQ5 en diferentes fracciones celulares en fase estacionaria de crecimiento a una $DO_{660\text{ nm}}$ de 2.4. A la izquierda SDS-PAGE al 15 % teñido con azul de Coomasie y a la derecha zimograma, utilizando como sustrato butirato de 4-metilumbeliferil. MM marcador de peso molecular, C+, control positivo (0.05 U de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*). T es el extracto total, C extracto de citosol y M extracto de membrana. En cada carril se cargaron 15 μg de proteína. Los números a la derecha del zimograma indican el tamaño aproximado de las esterases encontradas.

Con base en el resultado anterior, se decidió explorar la posibilidad de que existiera alguna diferencia en la expresión de esterases en respuesta a la fuente de carbono del medio de cultivo, específicamente a la presencia de PUh. Por lo tanto, se compararon las esterases que se presentan cuando las cepas BQ1 y BQ5 crecen en LB, con las que se presentan cuando crecen en MM-PUh. Habiendo observado previamente (figura 6) que el crecimiento en medio LB era más rápido (por ser un medio rico), que en MM-PUh, se decidió elegir un momento en el que los dos cultivos se encontraran en la misma fase de crecimiento, eligiéndose para ello la etapa exponencial. Esta etapa se presentaba a las 7 h en LB ($DO_{660\text{ nm}} = 1.5$), mientras que en MM-PUh se presentaba a las 36 h. En las figuras 15-A y 15-B se muestran los resultados obtenidos para las cepas BQ1 y BQ5 respectivamente. Se observó que en MM-PUh se expresa una esterasa de 50 kDa para la cepa BQ1, que anteriormente ya había observado en la cepa K601^T en medio LB y una esterasa de 24 kDa que en medio LB no se presentaba en las dos cepas, lo cual sugiere que ésta última podría estar siendo inducida por la presencia de PUh y podría considerarse como candidata para ser la responsable del crecimiento en PUh. La propuesta a desarrollarse en un futuro, es purificarla, caracterizarla y demostrar su efecto sobre los enlaces éster presentes en PS-PU.

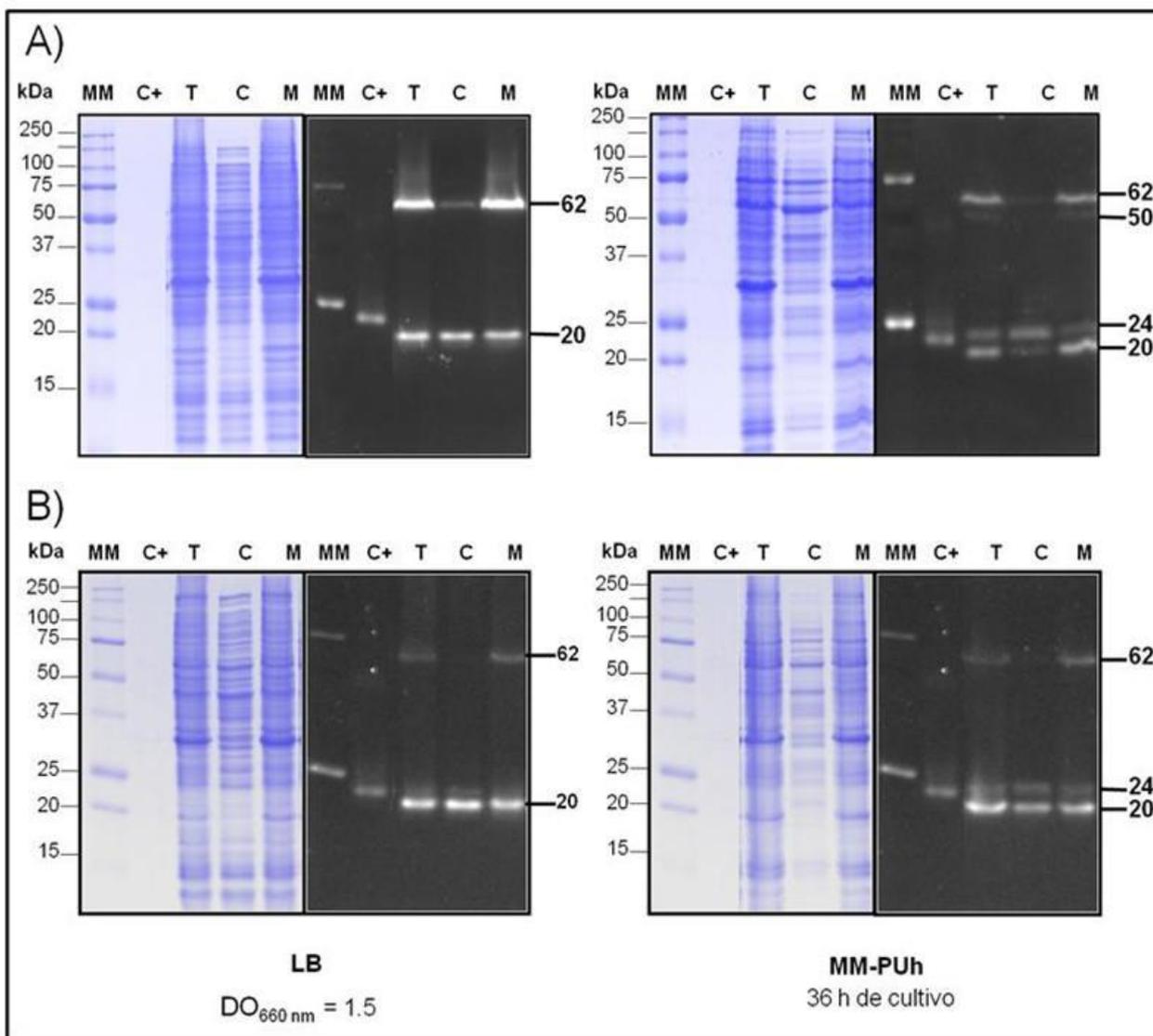


Figura 15. Patrón de proteínas y zimograma para actividad esterasa, comparación de esterases en medio LB y MM-PUh para A) *Alicyclophilus sp.* BQ1. y B) *Alicyclophilus sp.* BQ5. Proteína (15 μg) de cada extracto obtenido de cultivos en fase exponencial, extracto total (T), de citosol (C) y de membrana (M) fueron cargados en cada carril de un SDS-PAGE (15 %). A la izquierda gel teñido con azul de Coomasie y a la derecha zimograma para esterases, utilizando como sustrato butirato de 4-metilumbeliferil. MM marcador de peso molecular, C+, control positivo, 0.05 U de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*. Los números a la derecha del zimograma representan el tamaño aproximado de las esterases encontradas.

7.6. Caracterización de la actividad esterasa de la cepa BQ1 cultivada en MM-PUh a través del tiempo de cultivo

La cepa BQ1 de *Alicyclophilus sp.* es la que más se ha estudiado en el laboratorio, debido a que es más fácil de manejar que la cepa BQ5, ya que ésta forma agregados durante su crecimiento. Por tal motivo se realizó la caracterización de la actividad de esterasa por curso temporal de crecimiento con la cepa BQ1, pues podría ser que la expresión de esterases se deba a la fase de crecimiento en la que se encuentre la bacteria, así como para determinar si la esterasa de 24 kDa se expresa de manera constante.

Se realizó una curva de crecimiento midiendo el peso fresco de las células cosechadas en cada punto. De las 8 a las 48 h se observa la fase logarítmica y a partir de las 48 horas la fase estacionaria (figura 16a). También se graficó la relación membrana/biomasa mostrando la proporción que presentan éstas dependiendo de la fase de crecimiento. Se observó que en la fase estacionaria esta relación es menor lo que indica que las células son más grandes con respecto a la fase logarítmica (figura 16b).

Se realizaron zimogramas para actividad de esterasa a cada una de las muestras obtenidas en el crecimiento por curso temporal. El extracto total, se separó en fracciones de citosol y membrana. En el extracto citosólico se encontraron esterases de 62, 50, 31, 24 y 20 kDa (figura 17-A). La actividad observada en la esterasa de 62 kDa es variable siendo más intensa a las 16 h; la esterasa de 50 kDa tiene una señal muy débil encontrándose a las 72, 96 y 120 h (fase estacionaria); la de 31 kDa sólo se observa a las 72 y 96 h. En cuanto a la esterasa de 24 kDa la señal permanece constante conforme transcurre el tiempo y finalmente la esterasa de 20 kDa disminuye su actividad conforme transcurre el tiempo siendo mayor a las 16 h.

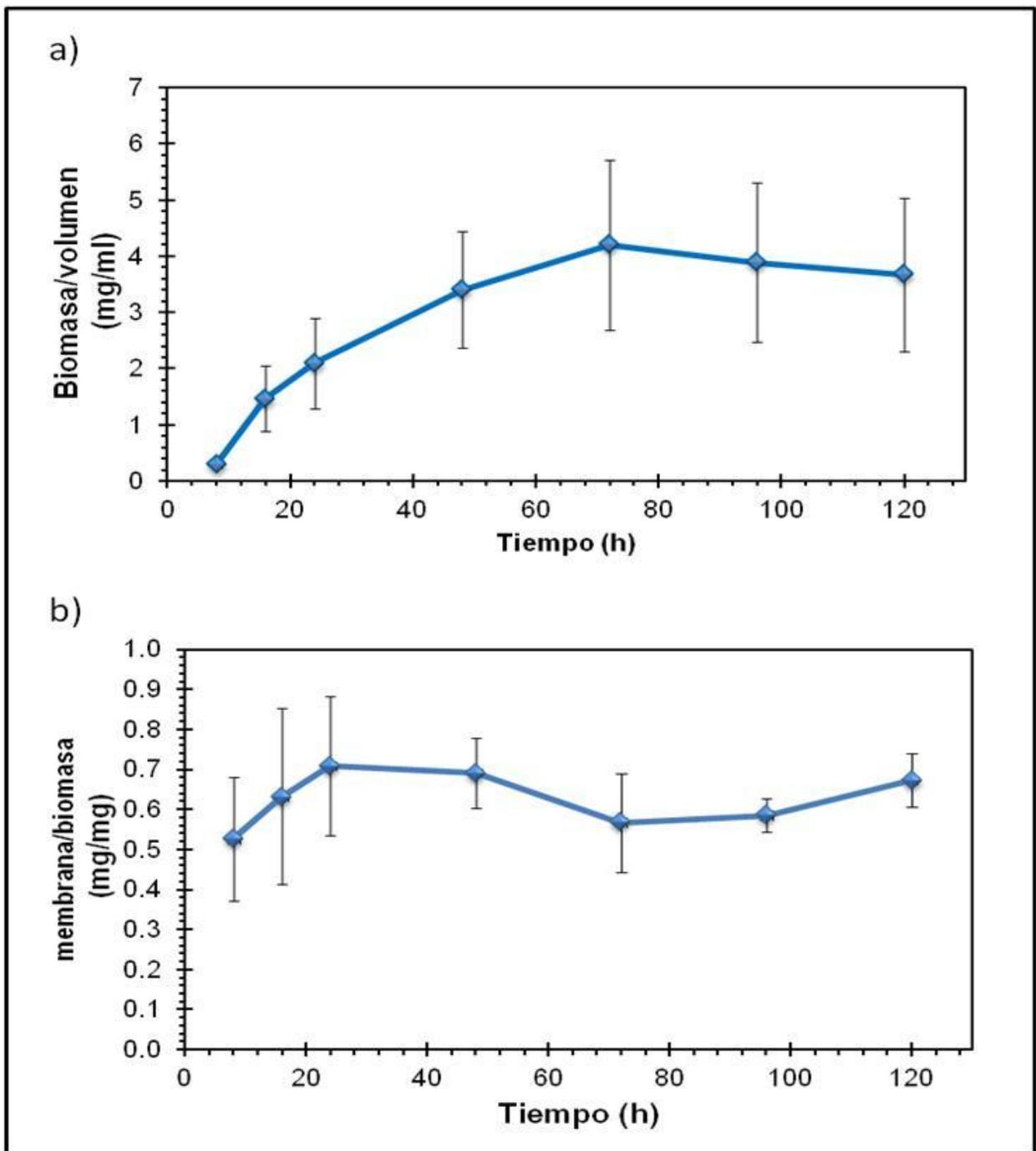


Figura 16a. Curva de crecimiento de *Alicyclophilus sp.* BQ1 medida por peso fresco. **Figura 16b.** Relación membrana/biomasa de *Alicyclophilus sp.* BQ1 cultivado en MM-PUh 0.3%. Un cultivo de 1.4 L fue inoculado a una $DO_{660\text{ nm}}$ de 0.02; alícuotas de 200 ml de este cultivo fueron colocadas en matraces de 1 L y cultivadas 37 °C y 200 rpm durante los tiempo señalados. En cada tiempo analizado, un matraz fue cosechado para determinar peso fresco de la biomasa y posteriormente de las membranas, en tubos eppendorf previamente pesados y se calculó la relación entre los parámetros. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones y las barras la desviación estándar.

En el extracto de membrana se observan esterases de 62, 50, 36, 31, 24 y 20 kDa (figura 17-B). La esterasa de 62 kDa se mantiene presente durante todo el tiempo, al igual que la esterasa de 50 kDa, aunque esta última muestra una señal muy tenue apenas apreciable. Las esterases de 36 y 31 kDa muestran actividad a partir de las 48 h y hasta las 96 h, indicando que se trata de esterases características de la fase estacionaria. Finalmente las esterases de 20 y 24 kDa se presentan con muy baja actividad durante todo el estudio mostrando su mayor actividad a las 16 h.

Con los resultados obtenidos se puede ver que la esterasa de 24 kDa es expresada durante todo el crecimiento, sin embargo es más factible purificarla de la fracción soluble o de citosol a partir de las 48 h, ya que muestra una mayor actividad.

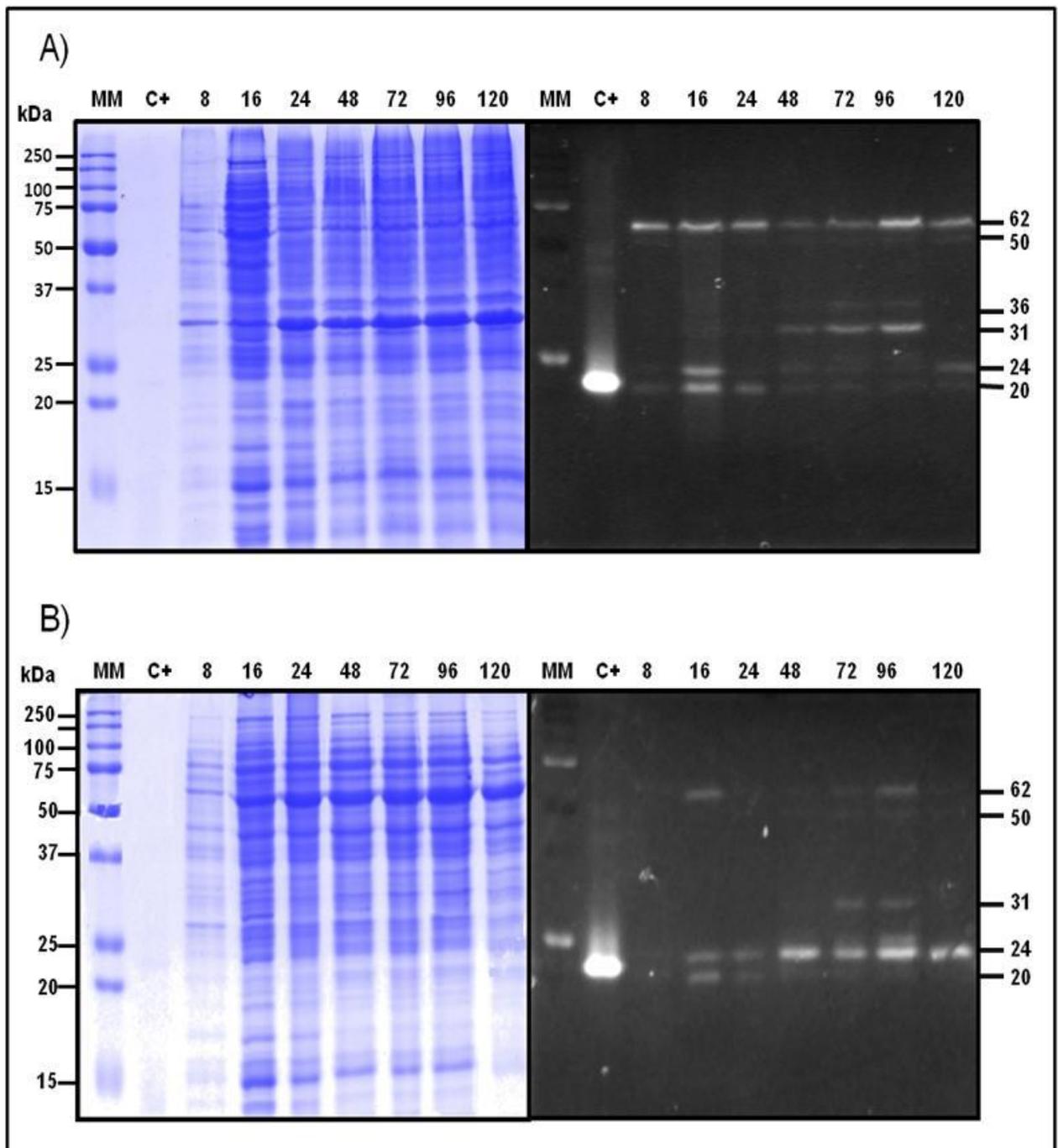


Figura 17. Patrón de proteínas y zimograma para actividad esterasa en A) extracto citosólico y B) extracto de membrana, de la cepa BQ1 de *Alicyclophilus sp.*, crecimiento seguido por curso temporal de 8 a 120 h. A la izquierda SDS-PAGE al 15% teñido con azul de Coomasie y a la derecha zimograma, utilizando como sustrato butirato de 4-metilumbeliferil. En cada carril fueron cargados 20 μ g de proteína. **MM** marcador de peso, **C+**, control positivo (0.05 U de lipasa de *Pseudomonas fluorescens*). Los números a la derecha indican los tamaños de las esterases encontradas.

Finalmente a los extractos de citosol y de membrana se les midió la actividad de esterasa por hidrólisis de *p*-NPA medida espectrofotométricamente a 405 nm y se determinó la actividad específica. La actividad específica (figura 18) es similar en los dos extractos. Sin embargo, a las ocho horas en el citosol es mayor aproximadamente 5 veces lo que sugiere que en fase lag y al inicio de la fase exponencial las bacterias requieren de esterasas para la síntesis de metabolitos que les permiten reproducirse. En cuanto a la tendencia presentada por la actividad, ésta coincide con las fases de crecimiento pues aumenta en la fase logarítmica y se mantiene en la fase estacionaria similar a lo encontrado en los zimogramas (figura 17) en donde aumenta la aparición de esterasas en la fase estacionaria.

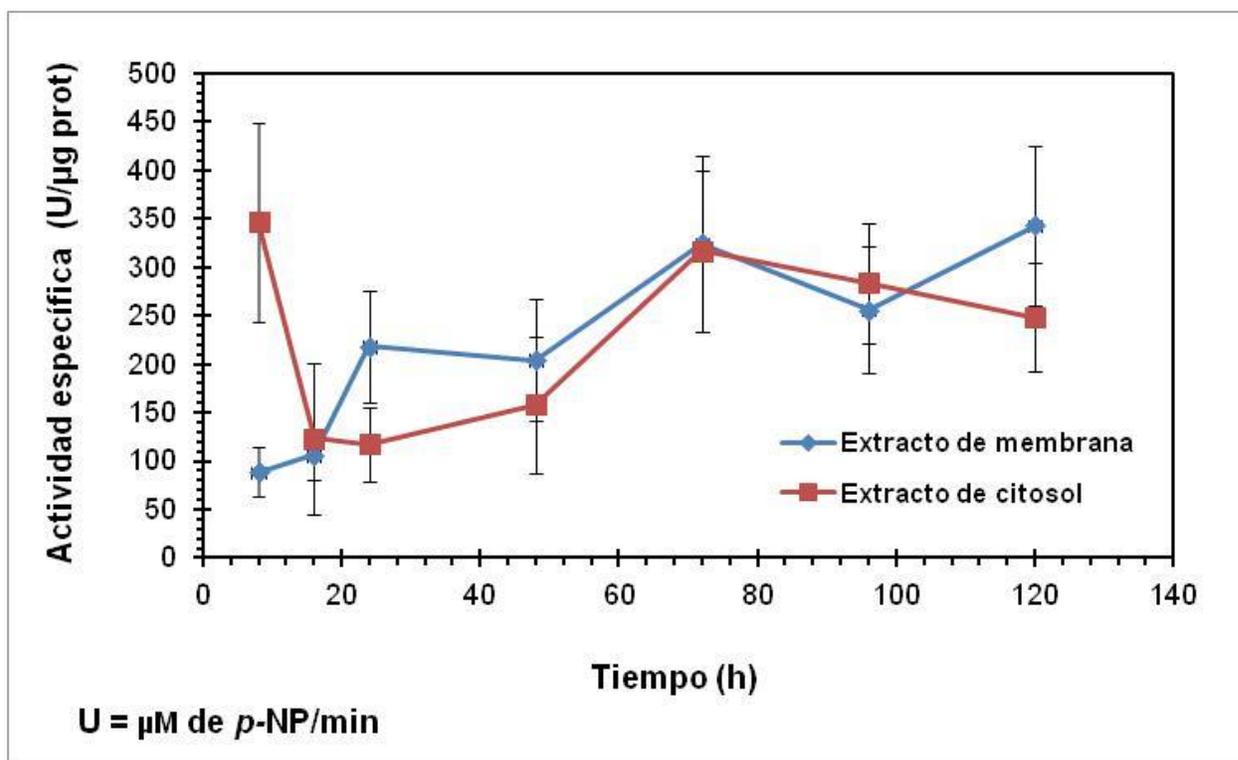


Figura 18. Actividad específica en extractos de membrana y citosol de *Alicyclophilus sp. BQ1*, por curso temporal de cultivo de 8 a 120 h. Determinada espectrofotométricamente a 37 °C, cuando el *p*-NPA es hidrolizado en presencia de una esterasa, es posible detectar uno de sus productos (*p*-NP) a 405 nm. Cada punto representa el promedio de tres repeticiones y las barras corresponden a la desviación estándar.

8. CONCLUSIONES

- El medio mínimo propuesto por Nakajima-Kambe *et al.* (1995) (MM-NK), es en el que se genera una mayor producción de biomasa de *Alicyclophilus sp.* BQ1, hay menor interferencia con el PUh y es el más accesible en su preparación.
- La cepa tipo *Alicyclophilus denitrificans* K601^T no es capaz de crecer en PUh como única fuente de carbono.
- En los MM's con glucosa 2 mM y malato 10 mM el crecimiento de *Alicyclophilus sp.* cepa BQ1 es 10 veces menor al obtenido con PUh y en acetato 1 mM no crece,
- El patrón de proteínas totales de las tres cepas es muy parecido lo que confirma que pertenecen al mismo género.
- En el perfil de esterasas para las tres cepas cultivadas en LB se encontraron en común esterasas con tamaños aproximados de 62, 36, 20 y 19 kDa.
- En la cepa K601^T se encontraron esterasas de 75 y 50 kDa que no se presentaron en BQ1 ni en BQ5 cultivadas en LB.
- BQ1 cultivada en MM-PUh presenta esterasas adicionales de 50 y 24 kDa; mientras que BQ5 solo una de 24 kDa, por lo que la esterasa de 24 kDa podría estar relacionada con la capacidad para degradar PUh.
- La producción de esterasas depende de la fase de crecimiento en la que se encuentre el cultivo.
- La esterasa de 24 kDa se detectó durante todo el cultivo, tanto en citosol como en membrana, siendo más abundante en la fracción citosólica.
- La actividad específica de esterasas es similar entre las fracciones membranal y de citosol, siendo a las ocho horas mayor la de citosol.

9. PRESPECTIVAS

- Purificar la esterasa de 24 kDa, obtener su secuencia, ya sea por espectrometría de masas o por secuenciación directa, caracterizarla y demostrar su efecto sobre la estructura del PUh.
- Mutar el gen que codifica a la esterasa de 24 kDa en BQ1 y/o BQ5 y probar su crecimiento en MM-PUh.
- Hacer un análisis de proteómica comparativa entre las tres cepas de *Alicyclophilus* e identificar diferencias en sus patrones de proteínas.
- Realizar la comparación proteómica de las cepas de *Alicyclophilus sp.* BQ1 y BQ5 cultivadas en PUh y medio LB para determinar que proteínas se expresan específicamente en esta condición.

10. ANEXO

10.1. Formulación de medios de cultivo

Medio Luria Bertani (LB)

Peptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agar	16 g
Agua c.b.p.	1 L

1. Disolver en 700 mL de agua desionizada la peptona.
2. Agregar el extracto de levadura y el NaCl agitar hasta disolver completamente.
3. Ajustar el pH=7 y aforar a 1000 mL con agua desionizada.
4. Se esteriliza por autoclave a 121°C/15 min.
5. En el caso de necesitar medio sólido se agregan los 4 g de agar por cada 250 mL, después de haber aforado y se procede a esterilizar.

Nota: Para preparar cajas de LB sólido Nota: El medio se vierte en las cajas de petri cuando aún esté tibio, evitando la presencia de grumos, se deja solidificar y se invierten. Todo se hace en área aséptica.

Medio R2A (DSMZ GmbH, 2008)

Extracto de levadura	0.50 g
Peptona	0.50 g
Caseína hidrolizada	0.50 g
Glucosa	0.50 g
Almidón soluble	0.50 g
Piruvato de sodio	0.30 g
K_2HPO_4	0.30 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	0.05 g
Agar	16 g
Agua c.b.p.	1 L

1. Disolver en 700 mL de agua desionizada cada uno de los ingredientes con excepción del agar.
2. Ajusta el pH a 7.2 y llevar a un volumen de 1000, para ajustar se deben utilizar cristales de K_2HPO_4 o KH_2PO_4 .
3. Se esteriliza en autoclave 15 min a 121°C.
4. Para preparar el medio sólido se agrega el agar antes de esterilizar y seguir con el procedimiento (4g de agar por cada 250 mL).

Nota: El medio se vierte en las cajas de petri cuando aún esté tibio, evitando la presencia de grumos, se deja solidificar y se invierten. Todo se hace en área aséptica.

Medio mineral de NK (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995)

Solución A (10X) para 1L

KH_2PO_4	20 g
K_2HPO_4	70 g

Solución B (100X) para 1L

NH_4NO_3	100 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g

Solución C (1000X) para 1L

$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 g
$\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 mg
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	10 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	10 g

1. Preparar las soluciones A y B, esterilizar en autoclave 121°C/15 min.
2. Preparar la solución C (elementos traza) y esterilizar por filtración utilizando membranas de poro 0.22 μm (Millipore).
3. A un volumen de 800 mL de agua estéril adicionar en condiciones asépticas 100 mL de solución A, 10 mL de Solución B y 1 ml de solución C.
4. Llevar a un aforo de 1000 mL.

Nota: Dependiendo de la fuente de carbono con la que se va a trabajar se debe hacer una disolución 10X esterilizada por filtración (membranas de poro 0.45 μm , Millipore) y se sustituyen por 100 mL de agua de la preparación anterior.

Medio mineral DSMZ (DSMZ GmbH, 2008)

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	3.50 g
KH_2PO_4	1.00 g
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0.50 g
$\text{MgCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	0.10 g
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	0.05 g
Solución de elementos traza SL-4	1 mL
Agua c.b.p	1 L

1. Pesar y disolver los ingredientes en 800 mL de agua desionizada.
2. Llevar a un volumen total de 1 L
3. Ajustar el pH a 7.25.

Nota: Dependiendo de la fuente de carbono con la que se va a trabajar se debe hacer una disolución 10X esterilizada por filtración (membranas de poro 0.45 μm , Millipore) y se sustituyen por 100 mL de agua de la preparación anterior.

Solución de elementos traza SL-4:

EDTA	0.50 g
$\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0.20 g
Solución de elementos traza SL-6	100 mL
Agua c.b.p.	1 L

1. Preparar la solución SL4 (elementos traza) y esterilizar por filtración utilizando membranas de poro 0.22 μm (Millipore).

Solución de elementos traza SL-6:

ZnSO ₄ • 7 H ₂ O	0.10 g
MnCl ₂ • 4 H ₂ O	0.03 g
H ₃ BO ₃	0.30 g
CoCl ₂ • 6 H ₂ O	0.20 g
CuCl ₂ • 2 H ₂ O	0.01 g
NiCl ₂ • 6 H ₂ O	0.02 g
Na ₂ MoO ₄ • 2 H ₂ O	0.03 g
Agua c.b.p.	1 L

Medio Mineral M (Mechichi *et al.*, 2003)

KH ₂ PO ₄	1.08 g
K ₂ HPO ₄	5.6 g
NH ₄ Cl	0.54 g
CaCl ₂ • 2H ₂ O	0.15 g
MgSO ₄ • 7 H ₂ O	0.2 g
NaNO ₃	1.27 g
Sol. elementos traza SL-10	1 mL
Sol. de selenito/tungsteno	1 mL
Sol. Vitaminas VL-7	1 mL
Agua c.b.p.	1 L

1. Disolver las sales de potasio y el cloruro de amonio en 400 mL de agua desionizada.
2. Disolver en 400 ml el cloruro de calcio, una vez disuelto agregar el sulfato de magnesio y el nitrato de sodio.
3. Mezclar las dos disoluciones, esterilizar en autoclave 121°C/15 min. Dejar enfriar.
4. Agregar la solución de elementos traza, la solución de vitaminas y la solución de selenito/tungsteno.
5. Adicionar la solución 10X de la fuente de carbono que se vaya a utilizar. (ver nota).
6. Llevar a un volumen total de 1 L con agua desionizada estéril y ajustar el pH a 7.3±0.1

Nota: La disolución 10X de la fuente carbono se esterilizada por filtración (membranas de poro 0.45 µm, Millipore).

Solución de elementos traza SL-10 (Widdel *et al.*, 1983)

H ₃ BO ₃	6 mg
CuCl ₂ • 2H ₂ O	2 mg
Agua c.b.p.	1 L

Nota: Esterilizar por filtración (membranas de poro 0.45 µm, Millipore). Aplicar 1 mL por 1 L de medio.

Solución de selenito/tungsteno (Tschech & Pfennig, 1984)

NaOH	0.50 g
Na ₂ SeO ₃ • 5H ₂ O	3 mg
Na ₂ WO ₄ • 2H ₂ O	4 mg
Agua c.b.p.	1 L

Nota: Esterilizar en autoclave a 121°C/15 min.

Solución de vitaminas VL-7 (Pfennig, 1978)

Biotina	10 mg
Pantotenato de calcio	25 mg
Ácido nicotínico	100 mg
Tiamina	50 mg
Piridoxamina	250 mg
Ácido p-aminobenzoico	50. mg
Agua c.b.p.	1 L

Nota: Esterilizar por filtración (membranas de poro 0.22 µm, Millipore)

Medio Tween 80 (Lelliott y Stead, 1987)

Peptona	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.1 g
Agar	15 g
Tween 80	10 mL
Agua destilada c.b.p.	1L

1. Disolver en 800 mL de agua destilada la peptona, cloruro de calcio y el cloruro de sodio.
2. Ajustar el pH a 7.4
3. Agregar el tween 80.
4. Aforar a 1 L
5. Agregar el agar
6. Esterilizar por autoclave a 121 °C por 15 min.
7. Vaciar en cajas petri cuando este casi frío y se vea translúcida la solución.

Nota: La presencia de esterazas se observa cuando alrededor de las colonias es hidrolizado el tween 80 y por consecuencia se precipita el cloruro de calcio, observándose una coloración blanquecina alrededor.

10.2. Formulación de las soluciones

Solución amortiguadora de fosfatos pH 7 (1 L)

KH_2PO_4 136.09 g

$\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 240.70 g

1. Disolver el KH_2PO_4 en 300 ml de agua desionizada y en otros 300 mL disolver el $\text{K}_2\text{HPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$.
2. Mezclar las dos disoluciones anteriores. Ajustar el pH a 7 y aforar a 1L.

Solución amortiguadora de fosfatos 200 mM pH 7 (500 mL)

1. Tomar 100 ml del buffer de fosfatos 1 M pH 7 y aforar a 500 mL.
2. Rectificar pH y si es necesario ajustarlo

Solución de p-NPA 100 mM en acetonitrilo (500 μL)

1. Pesar 9.05 mg de p-NPA en un tubo eppendorf.
2. Llevar a 500 μL con acetonitrilo.
3. Mantener en hielo hasta ser utilizado.

Nota: este reactivo se debe preparar hasta que ya se vaya a utilizar ya que sufre hidrólisis espontánea y es poco estable, si la solución stock, presenta coloración amarilla, se debe desechar pues ya no sirve.

Solución Butirato de 4-metilumbeliferil (50 mM)

1. Disolver 74 mg del 4-metilumbeliferil butirato en 6 mL de dimetilsulfóxido (DMSO).
2. Separar en alícuotas de 1 ó 2 mL y etiquetar con la fecha y concentración (50 mM)
3. Almacenar a $-20\text{ }^\circ\text{C}$. Deja de ser estable si se descongela más de 5 veces.
4. Para realizar la dilución a 1.6 mM se utiliza etilenglicol. Preparar sólo lo necesario para un gel (3 mL).

10.3 Gel desnaturizante de poliacrilamida (SDS-PAGE)

10.3.1 Preparación de soluciones

Acrilamida 30% para 100 mL

acrilamida	30 g
bisacrilamida	0.8 g

1. Precaución: la acrilamida es neurotóxica cuando no se ha polimerizado por lo tanto siempre usar guantes para manejarla. Se supone que ya polimerizada no es venenosa pero podrían quedar moléculas sin polimerizar. Por lo tanto siempre usar guantes, aunque esté polimerizada.
2. Pesar los compuestos, disolverlos en 80 mL de agua en una parrilla con agitación y un poco de calor. Aforar a 100 mL con agua desionizada en una probeta, filtrar la mezcla en un embudo con un filtro Whatman No. 1 u otro de poro grande, después de que se haya disuelto completamente se almacena a 4°C

Buffer separador para 100 mL

Tris-base	18.17 g
SDS al 20%	2 mL

1. Pesar el Tris, disolverlo en 80 mL de agua desionizada y ajustar el pH. Agregar el SDS y aforar a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Nota: Ajustar el pH a 8.8 con HCl 12 N

Buffer apilador para 100 mL

Tris-base	6.06 g
SDS al 20%	2 mL

1. Pesar el Tris disolverlo en 80 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 6.8
2. Agregar el SDS y aforar con agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

Nota: Ajustar el pH a 6.8 con HCl 12N

Buffer de carga 5X para 10 ml

Tris 1M pH 6.8	3.125 mL
glicerol	5.0 mL
SDS (1% final)	0.5 g
azul de bromofenol 10%	0.2 mL
β -mercaptoetanol	(ver nota)

1. Pesar y medir los ingredientes y llevarlos a 10 mL con agua desionizada.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

Nota: Inmediatamente antes de usar agregar 4 μ L de β -mercaptoetanol por 20 μ L de buffer de carga. El buffer de esta receta es 5 veces concentrado es decir debes usar 1/5 de buffer de carga por 1 volumen de tu muestra.

Buffer de corrida 10X para 1 Litro

Tris-base (NO Tris-HCl)	30 g
glicina	144 g
SDS	10 g

1. Disolver en 600 mL de agua desionizada la glicina, calentar un poco y agitar.
2. Agregar el Tris y esperar a que casi por completo este solubilizado.

3. Checar el pH, debe estar entre 8.3 y 8.8. No ajustarlo, si no está a ese pH es que se peso mal el Tris o se uso Tris-HCl. Volver a pesar, pero correctamente.
4. Agregar el SDS en polvo, disolverlo y ajustar el volumen a 1000 mL en una probeta. Almacenar a temperatura ambiente.
5. Antes de usarlo para correr tu gel, medir 70 mL de este buffer 10X y llevarlo a 700 mL con agua desionizada.

Persulfato de amonio al 20% (10 mL)

persulfato de amonio	200 mg
----------------------	--------

1. Pesar el reactivo, disolverlo en 10 mL de agua desionizada.
2. Hacer alícuotas de 500 µL en tubos eppendorf, etiquetarlas y congelarlas a -20°C. Al momento de usar, descongelar un tubo
3. Se puede descongelar hasta 3 ó 4 veces más. Después es mejor desecharlo y usar otro nuevo.

Nota: Este reactivo es higroscópico y puede deteriorarse creando problemas de gelificación. Se recomienda mantenerlo guardado en un desecador a temperatura ambiente.

Colorante Coomassie para teñir geles (100 mL).

Coomassie 0.05% en 50% metanol:10% ácido acético glacial

Coomassie brilliant blue R250	0.05 g
Metanol QP	50 mL
Agua	45 mL
Ácido acético glacial	10 mL

1. Pesar y medir los reactivos, disolverlos en vaso de precipitado de vidrio (no usar de plástico).

2. Almacenar a temperatura ambiente

Nota: El coomasie se une a proteínas por lo cual se recomienda usar guantes para prepararlo.

Fijador y desteñidor para 250 mL

20% Metanol: 7.5% ácido acético

Ácido acético glacial	18.75 mL
Metanol grado técnico	50 mL

1. Medir los reactivos. Aforar a 250 mL.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

10.3 2 Preparación del gel al 15%

Gel Separador (2 geles)

H ₂ O desionizada	2.5 mL
Buffer separador	2.5 mL
Acrilamida al 30%	5 mL
Persulfato de amonio al 20%	62.5 µL
TEMED	6.2 µL

1. Armar al equipo de Bio-Rad para preparación de geles, utilizar los cristales de 1 mm de espesor, asegurarse que se encuentren completamente limpios y desengrasados.
2. Mezclar, el agua, el buffer separador y la acrilamida (30%).
3. Agregar casi al mismo tiempo el persulfato y el TEMED, agitar un poco y verter entre los cristales.

4. Poner inmediatamente un poco de etanol encima, esto para facilitar la polimerización y alinear el gel.
5. Dejar polimerizar y quitar perfectamente todo el etanol.

Gel apilador (2 geles)

H ₂ O desionizada	2.4 mL
Buffer apilador	1.04 mL
Acrilamida al 30%	700 µL
Persulfato de amonio al 20%	30 µL
TEMED	5 µL

1. Se prepara de la misma forma que el gel apilador.
2. Se verte encima del gel separador y se le coloca inmediatamente el peine separador.
3. Dejar polimerizar para poder desprender el peine.

11. BIBLIOGRAFÍA

- 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.
- Akutsu-Shigeno Y, Adachi Y, Yamada C, Toyoshima K, Nomura N, Uchiyama H, Nakajima-Kambe T. 2006. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70:422–429.
- Allen A, Hilliard N, Howard G. (1999). Purification and characterization of a soluble polyurethane degrading enzyme from *Comamonas acidovorans*. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* 43:37-41.
- Aloulou A, Rodriguez J, Fernandez S, Oosterhout V, Puccinelli D, Carriere F. 2006. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochim Biophys.* 1761:995-1013.
- Berber I. 2004. Characterization of *Bacillus* species by numerical analysis of their SDS-PAGE protein profiles. *J Cell Mol Biol.* 3:33-37.
- Boubendir A. 1993. Purification and biochemical evaluation of polyurethane degrading enzymes of fungal origin. *Dissertation Abstracts Internacional.* 53:1206-1255.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254.
- Branco S. 1984. Limnología sanitaria, estudio de la polución de aguas continentales. *Monografía Científica. Biol, OEA.* 28:119.
- Carrasco F. 1991. Residuos plásticos: Reciclaje y medio ambiente. *Ingeniería química.* 23:181-185
- Carrillo A. 2004. Identificación de una esterasa extracelular cuya actividad esta relacionada con el crecimiento de *Acinetobacter* sp. en Poliuretano. Tesis de Maestría en Ciencias (Bioquímicas). Facultad de Química. UNAM. pp. 82
- Cashion P, Holder-Franklin M, McCully J, Franklin M. 1977. A rapid method for base ratio determination of bacterial DNA. *Anal Biochem.* 81:461–466.
- Chahinian H, Ninib L, Boitard E, Dubésc J, Comeaub L, Sardad L. 2002. Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids.* 37:653-662.
- Conway T. 1992. The Entner-Doudoroff pathway: history, physiology and molecular biology. *FEMS Microbiol Rev.* 103:1-28
- Costas M, Leach R, Mitchelmore D. 1987. Numerical analysis of PAGE protein patterns and taxonomic relationships within the "*Mycoplasma mycoides* Cluster". *J Gen Microbiol.* 133:3319-3329.

- Costas M, Sloss L, Owen R, Gaston M. 1989. Evaluation of numerical analysis of SDS-PAGE of protein patterns for typing *Enterobacter cloacae*. *Epidem Inf.* 103:265-274.
- Crabbe J, Campbell J, Thompson L, Walz S, Schultz W. 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *Int Biodeterior Biodegrad.* 33:103-113.
- Darvy R, Kaplan A. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *Appl Microbiol* 16:900-905.
- De Caro J, Rouimi P, Rovey M. 1986. Hydrolysis of *p*-nitrophenyl acetate by the peptide chain fragment (336-449) of porcine pancreatic lipase. *Eur J Biochem* 158:601-607.
- Deckwer W, Hanert H. 2003. Investigations on the biodegradation of polyesters by isolated mesophilic microbes. Tesis para obtener el título de doctor en Ciencias Naturales. Facultad de Ciencias. Universidad Técnica Carolo-Wilhelmina de Brunswick. pp. 139
- Diaz P, Prim N, Pastor F. 1999. Direct fluorescent-based lipase activity assay. *Biotech.* 27:696-698.
- Doelle H. 1982. The existence of two separate constitutive enzymes for glucose and fructose in *Zymomonas mobilis*. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol.* 15:20-24.
- DSMZ, 2008. Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH.
- Filip Z. 1979. Polyurethane as the sole nutrient source for *Aspergillus niger* and *Cladosporium herbarum*. *European J Appl Microbiol Biotechnol.* 7:277-280.
- García A, Ponce E. 2003. Metabolismo del carbono en microorganismos de interés biomédico y biotecnológico: Vía de Entner-Doudoroff. *Biotecnología Aplicada.* 20:85-94.
- Gautam R, Bassi A, Yanful E. 2007. A review of biodegradation of synthetic plastic and foams. *Appl Biochem and Biotechnol.* 141:85-105.
- Gianfreda L, Rao M. 2004. Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enz Microbiol Microbiol.* 35:339-354.
- Gregorí B, Alba L, Brown A, Fernández M, Moura B, Hoz Y. 2007. Los poliuretanos biodegradables. Estudio bibliográfico de su síntesis y aplicaciones. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=223114970002>
- Gu J, Ford T, Mitton D, Mitchell R. 2000. Microbial degradation and deterioration of polymeric materials. *In: W. Revie (Ed.), The Uhlig Corrosion Handbook (2nd Edition), Wiley, New York.* pp. 439-460.
- Guisan J, Fernandez-Lafuente R, Bastida A, Blanco R, Soler G, García-Junceda E. 1996. Modulation of activity/stability properties of lipase from *Pseudomonas fluorescens* by multipoint covalent immobilization on glyoxyl-supports. *In: Malcata F.X. Engineering of / with lipases.* Netherlands: Kluwer Academic Publishers. 243-456.

- Gupta A, Khare S. 2009. Enzymes from solvent-tolerant microbes: Useful biocatalysts for non-aqueous enzymology. *Crit Rev Biotechnol.* 29:44-54.
- Hebeler B, Morse S. 1976. Physiology and metabolism of pathogenic *Neisseria*: Tricarboxylic acid cycle activity in *Neisseria gonorrhoeae*. *J Bacteriol.* 128:192-201.
- Henderson R. (1999). Waterborne Polyurethanes: One and Two Component Systems. 42nd Annual Technical Symposium Waterborne Coatings. Cleveland, Ohio. USA
- Heylen K, Vanparys B, Wittebolle L, Verstraete W, Boon N, Paul De Vos. 2006. Cultivation of denitrifying bacteria: optimization of isolation conditions and diversity study. *Appl Environ Microbiol.* 72:2637-2643.
- Hincapié G, Ramírez M. 2009. Evaluación de la biodegradación aerobia de poliuretano residual generado en la industria de fabricación de refrigeradores. *Investigaciones Aplicadas* 5:15-25.
- Howard G, Blake R. 1999. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. *Int Biodet Biodeg.* 42:213-220.
- Howard G, Crother B, Vicknair J. 2001. Cloning, nucleotide sequencing and characterization of a polyurethanase gene (*pueB*) from *Pseudomonas chlororaphis*. *Int Biodeterior Biodeg.* 47:141-149.
- Huang S. 1989. Biodegradation. In: Allen G, Bevington J, editors. *Comprehensive Polymer Science: The Synthesis, Characterization, Reactions and Applications of Polymers.* Oxford, UK: Pergamon Press. 6:597-606
- Ibrahim N, Maraqa A, Hameed K, Saadoun I, Maswadeh H, Nakajima-Kambe T. 2009. Polyester-polyurethane biodegradation by *Alternaria solani*, isolated from Northern Jordan. *Adv Environ Biol.* 3:162-170.
- Kay M, Morton L, Prince E. 1991. Bacterial degradation of polyester polyurethane. *Int Biodeterior.* 27:205-222.
- Kay M, Mc Acabe R, Morton L. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *Int. Biodet. Biodeg.* 31:209-225.
- Kermasha S, Bisakowski B, Morin A. 2000. The effect of physical and chemical treatments on the esterase activity from *Pseudomonas fragi* CRDA 037. *Food Res Intl.* 33:767-774.
- Laemmli U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- Lelliott R, Stead D. 1987. Methods for the diagnosis of bacterial diseases of plants. In: Preece TF, Editor. *Methods in Plant Pathology.* Blackwell Scientific Press, London, UK. Vol. 2 p. 216.
- Lenz R. 1993. Biodegradable polymers. In: Langer R, Peppas N. (eds.) *Advances in Polymer Science.* 107:1-40.
- Lovell D, Bibel D. 1977. Tween 80 medium for differentiating nonpigmented *Serratia* from other *Enterobacteriaceae*. *J Clin. Microbiol.* 5:245-247.

- MacFaddin JF. (2003). Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3ra ed. Editorial Médica Panamericana. México. pp 850.
- Mechichi T, Stackebrandt E, Fuchs G. 2003. *Alicyclophilus denitrificans* gen. nov., sp. nov., a cyclohexanol-degrading, nitrate-reducing *b-proteobacterium*. Int J System Evol Microbiol. 53:147–152.
- Mesbah M, Premachandran U, Whitman W. 1989. Precise measurement of the G+C content of deoxyribonucleic acid by high performance liquid chromatography. Int J Syst Bacteriol 39:159–167.
- Miller I. 1982. Single derivation method for routine analysis of bacterial whole-cell, fatty acids methyl esters, including hydroxy acids. J Clin Microbiol. 16:584-586.
- Morton L, Surman S. 1994. Biofilms in biodeterioration-a review. Int Biodet Biodeg. 32:203-221.
- Morton L, Surman S. 1996. The involvement of biofilms in biodeterioration processes. Biodeg Biodet Latin America. 1:85-90.
- Muller R, Kleeberg I, Deckwer W. 2001. Biodegradation of polyesters containing aromatic constituents. J Biotechnol. 86:87–95.
- Nair S, Kumar P. 2007. Molecular characterization of a lipase-producing *Bacillus pumilus* strain (NMSN-1d) utilizing colloidal water-dispersible polyurethane. World J Microbiol Biotechnol. 23:1441-1449.
- 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, Nonuma N, Akutsu Y, Nakajima T. 1997. Determination of the polyester polyurethane breakdown products and distribution of the polyurethane degrading enzyme of *Comamonas acidovorans* strain TB-35. J Ferment Bioeng. 83:456-460.
- 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.
- NC-IUBMB, 2011. Enzyme Nomenclature: Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes by the Reactions they Catalyse.
- Nomura N, Shigeno-Akutsu Y, Nakajima-Kambe T, Nakahara T. 1998. Cloning and sequence analysis of a polyurethane esterase of *Comamonas acidovorans* TB-35. J Ferment Bioeng. 86:339-345.
- Oceguera-Cervantes A, Carrillo-García A, López N, Bolaños S, Cruz M, Wachter C, Loza-Tavera H. 2007. Characterization of the Polyurethanolytic Activity of Two *Alicyclophilus* sp. Strains Able To Degrade Polyurethane and N-Methylpyrrolidone. Appl. Environ. Microbiol. 73:6214-6223.

- Oceguera-Cervantes. 2005. Aislamiento de bacterias capaces de crecer en medio con poliuretano (Hydroform) como única fuente de carbono y caracterización de las actividades enzimáticas relacionadas con su degradación. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM. pp 56.
- Oosterkamp M, Veuskens T, Plugge C, Langenhoff A, Gerritse J, Berkel W, Pieper D, Junca H, Goodwin L, Daligault H, Bruce D, Detter J, Tapia R, Han C, Land M, Hauser L, Smidt H, Stams A. 2011. Genome sequences of *Alicyclophilus denitrificans* strain BC and K601^T. *J Bacteriol.* 193:5028-5029.
- Palomo J, Segura R, Fernández-Lorente G, Pernas M, Rúa M, Guisan J, Fernández-La Fuente R. 2004. Purification, immobilization and stabilization of a lipase from *Bacillus thermocatenuatus* by interfacial adsorption on hydrophobic supports. *Biotechnol Prog.* 20:630-635.
- Pathirana R, Seal K, 1984. *Gliocladium roseum* (Bainier), a potential biodeteriogen of polyester polyurethane elastomers. *Biodet.* 5: 679–689.
- Pfennig, N, (1978). *Rhodocyclus purpureus* gen. nov. and sp. nov., a ring shaped, vitamin B12-requiring member of the *Rhodospirillaceae*. *Int J Syst Bacteriol* 28:283–288.
- Plugge C, Zoetendal E, Stams J. 2000. *Caloramator coolhaasi* sp. nov., a glutamate degrading, moderately thermophilic anaerobe. *Int J System Evol Microbiol.* 50:1155–1162.
- Raju A, Pathiraja A, Gunatillake, Mc Carthy S, Meijs G, 2002. Low-modulus siloxane based polyurethane. Effect of the chain extender 1,3-bis(4-hydroxybutyl) 1,1,3,3-tetramethyldisiloxane (BHTD) on properties and morphology. *J Applied Pol Sci* 83:736-746.
- Ren X. 2003. Biodegradable plastics: a solution or a challenge? *J Clean Prod.* 11:27-40.
- Rowe L, Howard T. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodet Biodeg.* 50:33-40.
- Ruiz C, Hilliard N, Howard G, 1999a. Growth of *Pseudomonas chlororaphis* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *International Biodeterioration & Biodegradation* 43, 7–12.
- Ruiz C, Main T, Hilliard N, Howard T. 1999b. Purification and characterization of two polyurethanase enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. *Inter Biodet Biodeg.* 43: 43-47.
- Sanchez-Tafolla. 2010. Purificación y caracterización de una enzima de tipo esterasa asociada a membrana de *Alicyclophilus* sp. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. pp 63.
- Sharma A, Tiwari R, Hoondal G. 2002. Properties of a thermostable and solvent stable extracellular lipase from a *Pseudomonas* sp. AG-8. *Biotechnol Bioeng* 77:693-703.
- Shigeno Y, Tsukuba-shi I, Kambe T. 2006. Novel bacteria capable of breaking urethane bond. *Jap Sci Technol Agen.* EP1621608:001-0047.

- Singh R, Gupta N, Goswami V, Gupta R. 2006. Synthesis activity-based zymography for detection of lipases and esterases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70:679–682.
- Solís-González J. 2008. Caracterización del crecimiento de *Alicyclophilus* sp. BQ5 en poliuretano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. pp 69.
- Sonesson A, Elofsson U, Brismar H, Callisen T. 2006. Adsorption and mobility of a lipase at a hydrophobic surface in the presence of surfactants. *Langmuir* 22:5810-5817.
- Stern R, Howard T. 2000. The polyester polyurethanase gene (*puDA*) from *Pseudomonas chlororaphis* encodes a lipase. *FEMS Microbiol Lett.* 185:163-168.
- Sun W, Sierra-Alvarez R, J. 2011. Long term performance of an arsenite-oxidizing-chlorate-reducing microbial consortium in an up flow anaerobic sludge bed (UASB) bioreactor. *Bioresource Technology.* 102:5010-5016.
- TecnaPol S. A. de C. V. 2008. <http://www.tecnapol.com/content/view/42/41/lang.es/>
- Tsai S, Lu C, Chang C. 1996. Surfactant enhancement of (S)-naproxen ester productivity from racemic naproxen by lipase in isooctane. *Biotech Bioeng* 51:148-56.
- Tschech A, Pfennig N. 1984. Growth yield increase linked to caffeate reduction in *Acetobacterium woodii*. *Arch Microbiol* 137:163–167.
- Vega R, Main T, Howard T. 1999. Cloning and expression in *Escherichia coli* of a polyurethane-degrading enzyme from *Pseudomonas fluorescens*. *Int Biodet Biodeg.* 43:49-55.
- Viikari, L. 1988. Carbohydrate metabolism in *Zymomonas*. *Crit Rev Biotechnol.* 7, 237-261.
- Weelink S, Tan N, Broeke H, Kieboom C, Doesburg W, Langenhoff A, Gerritse J, Junca H, Stams A. 2008. Isolation and characterization of *Alicyclophilus denitrificans* strain BC, which grows on benzene with chlorate as the electron acceptor. *App Environ Microbiol.* 74:6672–6681.
- Widdel F, Kohring G, Mayer F. 1983. Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids III. Characterization of the filamentous gliding *Desulfonema limicolagen. nov., sp. nov.,* and *Desulfonema magnum sp. nov.* *Arch Microbiol.* 134:286–294.
- Wu X, Jaaskelainen S, Linko Y. 1996. Purification and partial characterization of *Rhizomucormiehei* lipase for ester synthesis. *Appl Biochem Biotech.* 59:145-158.
- Zee M. 2001. Cap. 4. Biodegradation of polymeric materials. In: Chiellini E, Gil Helena, Braunegg G, Buchert J, Gateriholm Paul, editors. *Biorelated polymers: Sustainable polymer science and technology*, Kluwer Academic/Plenum Publishers. Pp 391.
- Zheng Y, Bassi A, Yanful E. 2005. A review of plastic waste biodegradation. *Crit. Rev. Biotechnol.* 25:243-250.