



IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES DE *ALICYCLIPHILUS* SP. BQ1 INVOLUCRADOS EN LA DEGRADACIÓN DE POLIURETANO

Claudia Julieta Solís González², Nancy Barajas¹, Patricia Coello Coutiño², Jesús Campos García¹ y Herminia Loza Tavera^{2*}

¹ Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, Universidad Michoacana, Edif. B-3, Ciudad Universitaria, CP 58030, Morelia, Michoacán ² Facultad de Química, Depto. de Bioquímica. UNAM. Ciudad Universitaria, México D.F. CP 04510 * tel. (55) 56 22 52 80, correo electrónico: hlozat@unam.mx

Palabras clave: *poliuretano*, *biodegradación*, *Alicyclophilus*.

Introducción. El poliuretano (PU) es un polímero sintético utilizado ampliamente en la industria y en la vida diaria. Sus desechos se han acumulado en el ambiente debido a que los tratamientos químicos y físicos resultan ineficientes y costosos. Los PUs de tipo poliéster tienen mayor susceptibilidad al ataque microbiano siendo la biodegradación una alternativa en desarrollo para el tratamiento de estos desechos¹. Actualmente, se sabe que actividades enzimáticas de tipo esterasa, lipasa, proteasa y ureasa están involucradas en la biodegradación del PU². En nuestro laboratorio, se identificó una cepa bacteriana, denominada BQ1, como *Alicyclophilus* sp., la cual es capaz de crecer en un medio mínimo cuya única fuente de carbono es un barniz comercial de PU soluble en agua (MM-PUh)³.

Para aclarar las bases bioquímicas y moleculares de la actividad de *Alicyclophilus* sobre PU, el objetivo de este trabajo es generar mutantes incapaces de crecer en PU e identificar los genes afectados por las mutaciones para identificar la vía de degradación de este polímero. En este trabajo se describen los avances logrados hasta el momento.

Metodología. Se generaron clones mutantes mediante la inserción del transposón *Mariner Himar1::Gm^R Ap^R* contenido en el plásmido suicida pFAC⁴. La identificación de las mutantes de BQ1 incapaces de asimilar el PU se realizó mediante su siembra en MM-PUh y en cajas réplica de LB con Sm y Gm. Las secuencias en las que se insertó el transposón fueron identificadas y analizadas utilizando el algoritmo BLAST. A través de RACE (*rapid amplification of cDNA*), se buscará amplificar y obtener las secuencias completas de los genes afectados. Los genes completos serán clonados en un vector de recombinación homóloga para realizar la complementación de las mutantes. Se observará si las mutantes transformadas recuperan su capacidad de crecer en el polímero, comprobando entonces, que los genes aislados están involucrados con la degradación del PU.

Resultados y discusión. Tres clones (8, 9 y 38) incapaces de crecer en MM-PUh Gm³⁰Sm⁵⁰ fueron generadas por el procedimiento anteriormente descrito. Las secuencias afectadas por la inserción presentan similitud con las secuencias de los genes de una transglucosilasa y una óxido-reductasa presentes en

Acidovorax sp., bacteria filogenéticamente relacionada con *Alicyclophilus*, también se encontró similitud con una hidrolasa de *Rodospirillum palustris* (tabla 1).

Hasta hace poco, se aislaron dos genes (*pueA* y *pueB*) que codifican proteínas con actividad lipasa en *Pseudomonas chlororaphis*. Ha sido reportado un cluster génico denominado *PUase gene cluster* empleando *genome walking*. Dentro de este cluster se han encontrados siete genes que codifican diferentes proteínas: una proteína tipo ABC, proteínas de fusión a membranas, los genes *pueA* y *pueB* y dos serina proteasas. Dado que este cluster tiene similitud con clusters de *P. fluorescens*, se ha propuesto que los productos génicos están relacionados con la producción de poliuretanasas y su secreción, a través de un sistema de secreción tipo I². Esta idea nos ha llevado a considerar la existencia de un sistema que involucre diversos genes en la actividad sobre PU en *Alicyclophilus* sp y que pudieran comportarse en forma similar al encontrado en *P. chlororaphis*, razón por la cual, los posibles genes afectados por el transposón han resultado muy interesantes.

Tabla 1. Análisis de las secuencias nucleotídicas de las mutantes

Mutante	Gen mutado	Similitud/organismo
8	Transglucosilasa lítica	92% <i>Acidovorax</i> sp
9	α/β hidrolasa	53% <i>Rodospirillum palustris</i>
38	Deshidrogenasa/reductasa	83% <i>Acidovorax</i> sp

Conclusiones. Hasta el momento tres clones mutantes incapaces de crecer en MM-PUh han sido generadas a través de mutagénesis por transposición.

Bibliografía.

- Morton, L.H., Prince, EL. 1991. Bacterial degradation of polyester polyurethane. *Int Biodeterior*, 27:205-222
- Howard, G.T. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeterior Biodegrad*. 40:245-252
- Oceguera, C. A., Carrillo G. A., López N., Bolaños N. S., Cruz G. M.J., Wachter C. y 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.
- Wong, S.M., Mekalanos J.J. 2000. Genetic footprinting with mariner-based transposition in *Pseudomonas aeruginosa*. *PNAS* 97:10191-10196