



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA.

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACIÓN METABÓLICA DE LAS BACTERIAS
QUE HIDROLIZAN LA UREA CONTENIDA EN LA ORINA HUMANA**

Para obtener el grado de Maestría en Biotecnología

Presenta:

I.B.I. María Concepción Romero Serrano

2113801159

Directora: Dra. Florina Ramírez Vives

Asesoras: Dra. : Carmen Fajardo Ortíz

Dra. : María del Rocío Torres Alvarado

Laboratorio W-106

CBS

Diciembre. 2013

México D.F. a 19 de Diciembre del 2013

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas de la Salud de la Unidad Iztapalapa aprobó la tesis.

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION METABOLICA DE LAS BACTERIAS
QUE HIDROLIZAN LA UREA CONTENIDA EN LA ORINA HUMANA**

Presentó

María Concepción Romero Serrano

Comité Tutorial:

Director: Dra. Florina Ramírez Vives



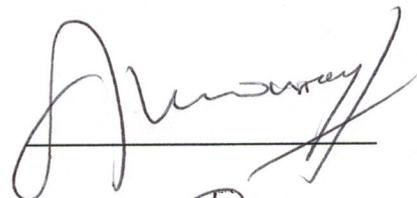
Asesor: Dra. María del Carmen Fajardo Ortíz

Asesor: Dra. María del Rocío Torres Alvarado

Jurado:

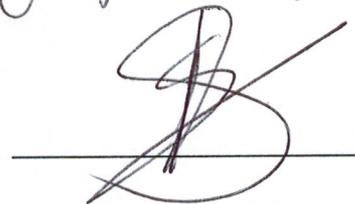
Presidente: Dr. Óscar Armando Monroy Hermosillo

Universidad Autónoma Metropolitana



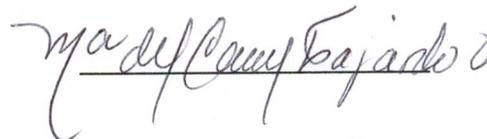
Secretario: Dr. Sergio Huerta Ochoa

Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal: Dra. María del Carmen Fajardo Ortíz

Universidad Autónoma Metropolitana



Vocal: Dra. María del Rocío Torres Alvarado

Universidad Autónoma Metropolitana



AGRADECIMIENTOS

Agradezco el apoyo recibido de la **UAM-I. CONACYT (266054)**

Agradezco la beca otorgada por **ICYTDF (PICSO 12-106. 113 004)/SECITI**

A mis padres Consuelo Serrano y Luis Alberto Romero, que han sido los principales promotores de la formación de mi persona en todos los ámbitos. A mis hermanos Pepe, Nicky y Caro por ser mi compañía.

A mi directora la Dra. Florina Ramírez por su paciencia, asesoría, apoyo y conducción en este proyecto. A las doctoras Carmen Fajardo y Rocío Torres por su colaboración constante, apoyo e inspección en este proyecto. A los doctores Oscar Monroy y Sergio Huerta por sus observaciones, comentarios y apoyo.

A mis compañeros de laboratorio con los que me he formado paralelamente en el aspecto profesional y humano, me refiero a Carlos, Reyna, Adriana, Belem, Rigo, Pepe Calderón, Priscila, Iris, y Alex. Agradezco a mis amigos de la UAM Rosita, Jaky, Wylma, Lao, Ramón Soriano, Josefa, Cali; entre otros afortunadamente tantos.

Agradezco a Ramón Gutiérrez por su apoyo y cariño.

ÍNDICE

RESUMEN	9
1 INTRODUCCIÓN	10
1.1 Composición química de la orina.....	11
1.2 Hidrólisis de urea.....	12
1.3 Enzima ureasa.	12
1.3.1 Estructura de la ureasa	13
1.3.2 Mecanismo de reacción de la ureasa.	13
1.4 Microorganismos productores de ureasa.....	15
1.5 Energía de activación.....	17
1.6 Curva de crecimiento.....	19
1.6.1 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de crecimiento.	20
1.7 JUSTIFICACIÓN.....	22
1.8 HIPÓTESIS.....	22
1.9 OBJETIVOS	22
1.9.1 Objetivo General.....	22
1.9.2 Objetivos Particulares.....	22
2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	23
2.1 Caracterización de orina	23
2.2 Selección y tratamiento de Inóculos	26
2.3 Medio de Cultivo	26
2.3.1 Medio Óxico.....	27
2.3.2 Medio Anóxico.....	27
2.4 Actividad ureásica	28
2.5 Inoculación.....	28
2.6 Enriquecimientos.....	28
2.7 Aislamiento.....	28
2.7.1 Aislamiento de bacterias aerobias.....	28
2.7.2 Aislamiento de bacterias anaerobias	29
2.8 Medios de cultivo alternos	29
2.9 Propagación.....	30
2.10 Aislamiento y conservación de las Cepas.	31
2.11 Morfología microscópica y tinción de Gram.....	31
2.12 Prueba de la actividad de ureasa en los cultivos.	32

2.13 Efecto de la Temperatura en la hidrólisis de la urea de los cultivos.....	32
2.14 Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de la urea de los cultivos....	33
2.15 Producción de amonio como respuesta a la hidrólisis de urea en orina humana....	34
3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	35
3.1 Caracterización fisicoquímica de la orina humana.....	35
3.2 Metabolitos producidos de la hidrólisis de la urea en los tres enriquecimientos.....	35
3.2.1 Primer enriquecimiento	35
3.2.2 Segundo enriquecimiento	37
3.2.3 Metabolitos producidos de la hidrólisis de la urea en el tercer enriquecimiento..	37
3.2.3.1. Metabolitos producidos de la hidrólisis de urea en los cultivos con orina del	
tercer enriquecimiento.....	38
3.2.3.2. Metabolitos producidos de la hidrólisis de urea en los cultivos con estiércol del	
tercer enriquecimiento.....	39
3.2.3.3. Metabolitos de la hidrólisis de urea en un tercer enriquecimiento con lodos	
granulares como inóculo.....	41
3.3 Estimación de amonio libre formado durante el enriquecimiento en los tres	
enriquecimientos.....	43
3.4 Aislamiento	46
3.5 Propagación de las cepas aisladas	47
3.5 .1 Características macroscópicas y microscópicas de los cultivos aislados.....	47
3.6 Pruebas de la actividad ureásica en los cultivos puros y mixtos.....	48
3.7 Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de urea.....	51
3.7.1 Efecto de la temperatura en la hidrólisis de urea para el cultivo EGO ₂ en medio	
Stuart.....	51
3.7.2 Efecto de temperatura en la hidrólisis de urea para el cultivo LO ₂ en medio 2. .	53
3.7.3 Efecto de la temperatura en la hidrólisis de urea para el cultivo LO ₂ en medio	
Stuart.....	55
3.8 Determinación de la energía de activación para los consorcios EGO ₂ y LO ₂	56
3.9 Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de urea.	58
3.9 Hidrólisis de urea en orina humana.....	61
4. CONCLUSIONES	63
RECOMENDACIONES.....	63
REFERENCIAS	64
Páginas web consultadas:	69
ANEXO 1	70
ANEXO 2.....	70
ANEXO 3.....	78

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.

Figura 1.Fórmula de la Urea..... 10

Figura 2. a) Estructura química de la ureasa b) Sitio activo 13

Figura 3. Mecanismo de acción de ureasa..... 14

Figura 4. Diagrama de coordenada de reacción de una reacción química..... 17

Figura 5. Diagrama de la coordenada de reacción con enzima y sin catalizar. 18

Figura 6. Método gráfico para la determinación de Ea. 18

Figura 7. Curva de crecimiento..... 19

Figura 8. Gráfico de Monod 21

Figura 9. Diseño experimental para condiciones de cultivo 27

Figura 10. Tubo inclinado 31

Figura 11. Perfiles de pH y amonio, 3er. enriquecimiento de orina 38

Figura 12. Perfiles de pH y amonio, 3er. enriquecimiento de estiércol 40

Figura 13. Perfiles de pH y amonio, 3er. enriquecimiento de lodo granular.. ... 41

Figura 14. Colonias de bacterias que hidrolizan urea (aerobias)..... 46

Figura 15. Crecimiento de colonias del lodo granular (medio 2)..... 47

Figura 16. Crecimiento de colonias del lodo granular (medio Luria Bertani). . 47

Figura 17. Crecimiento de colonias del estiércol (medio 2). 47

Figura 18. Perfil de pH y producción de amonio, 1er. enriquecimien EGO₂. 52

Figura 19. Perfil de pH y producción de amonio, 2do. enriquecimiento EGO₂. 52

Figura 20. Perfil de pH y producción de amonio, 3er. enriquecimiento EGO₂. . 52

Figura 21. Temperatura óptima del cultivo EGO₂, en medio Stuart 52

Figura 22. Perfil de pH y producción de amonio, 1er. enriquecimiento LO₂ 53

Figura 23. Perfil de pH y producción de amonio, 2do. enriquecimiento LO₂.... 54

Figura 24. Perfil de pH y producción de amonio, 3er. enriquecimiento LO₂ 54

Figura 25. Temperatura óptima del cultivo LO₂, en medio 2..... 54

Figura 26. Perfil de pH y producción de amonio, 1er. enriquecimiento LO₂ en medio Stuart 55

Figura 27. Perfil de pH y producción de amonio, 2do. enriquecimiento LO₂ en medio Stuart 55

Figura 28. Perfil de pH y producción de amonio, 3er. enriqueimiento LO₂ en medio Stuart 56

Figura 29. Temperatura óptima del cultivo LO₂, en medio Stuart 56

Figura 30. Linearización (Ea)..... 57

Figura 31. a) Producción de amonio , b) Dobles recíprocos, primer cultivo..... 59

Figura 32. a) Producción de amonio, b) Dobles recíprocos. segundo cultivo .. 59

Figura 33. pH y producción de amonio en controles de orina humana estéril .. 61

Figura 34. pH y producción de amonio en orina humana	62
Figura 35. a) Temperatura 1 _s . EO ₂ G b) Ea 1 _s . EO ₂ G.....	71
Figura 36. a) Velocidad 2 _s . EGO ₂ , b) Ea.....	72
Figura 37. a) Velocidad 3 _s . EGO ₂ , b) Ea	73
Figura 38. a) Velocidad 1 ₂ .LO ₂ , b) Ea.....	73
Figura 39. a) Velocidad 2 ₂ .LO ₂ , b) Ea.....	74
Figura 40. a) Velocidad 3 ₂ .LO ₂ , b) Ea.....	75
Figura 41. a) Velocidad 1 _s .LO ₂ , b) Ea.	76
Figura 42. a) Velocidad 2 _s .LO ₂ , b) Ea....	76
Figura 43. a) Velocidad 3 _s .LO ₂ , b) Ea.	77
Figura 44. EGO ₂ - sustrato; a) 1er. enriquecimiento y b) 2do. enriquecimiento. 78	
Figura 45. LO ₂ - sustrato; a) 1er. enriquecimiento y b) 2do. enriquecimiento... 80	
Figura 46. Amonio: a) Nessler, b) Electrodo selectivo de amonio	82
Figura 47. Curva de calibración de CO ₂ , cromatografía de gases.....	82
Figura 48. Curva de calibración de proteínas método de Lowry.....	82
Figura 49. Curva de calibración de Urea por HPLC.....	83

Tabla 1. Composición de orina	11
Tabla 2. Bacterias Productoras de Ureasa	15
Tabla 3. Continuación Bacterias Productoras de Ureasa.	16
Tabla 5: Parámetros de caracterización de orina y técnicas analíticas.	23
Tabla 6. Composición del medio de cultivo Stuart y col. (1945).	26
Tabla 7. Medios de cultivo empleados.....	30
Tabla 8. Cultivos con diferente relación C/N.....	32
Tabla 9. Diseño experimental para evaluar el efecto de la temperatura.....	33
Tabla 10. Diseño experimental para evaluar el efecto del sustrato	34
Tabla 11 . Caracterización Fisicoquímica de una mezcla de orina humana.	35
Tabla 12. Hidrólisis de la urea, primer enriquecimiento	36
Tabla 13. Hidrólisis de la urea, segundo enriquecimiento	37
Tabla 14. Producción de CO ₂ en los cultivos en el tercer enriquecimiento.....	38
Tabla 15. Producción de amonio y pH del tercer enriquecimiento	38
Tabla 16. Resumen de los tres enriquecimientos con orina como inóculo	39
Tabla 17. Producción de amonio y pH en el tercer enriquecimiento con estiércol como inóculo	40
Tabla 18. Resumen de los tres enriquecimientos con estiércol como inóculo. 40	
Tabla 19. Producción de amonio y pH en el tercer enriquecimiento con lodos como inóculo.	41
Tabla 20. Resumen de los tres enriquecimientos con lodo como inóculo	42
Tabla 21. Estimación teórica de amoniaco.	43
Tabla 22. Amonio y amoniaco de los tres enriquecimientos.....	44
Tabla 23. Ajuste de especies amonio – amoniaco.	45
Tabla 24. Características morfológicas de bacterianas aisladas aeróbicas.....	46

Tabla 25. Características de las bacterias aisladas.....	48
Tabla 26. Producción de amonio de los cultivos puros, C/N = 3.....	49
Tabla 27. Producción de amonio de cultivos puros, C/N = 1.3.....	49
Tabla 28. Producción de amonio de los cultivos enriquecidos, C/N = 1.3.....	50
Tabla 29. Energía de activación E_a para los consorcios EGO_2 y LO_2	57
Tabla 30. Energías de activación de otras hidrolasas.....	58
Tabla 31. Concentraciones de Urea ensayadas.....	58
Tabla 32. Estimaciones fisiológicas de los consorcios LO_2 y EO_2G	60
Tabla 33. Valores de K_m de ureasas reportados en la literatura.....	60
Tabla 34. Eficiencias de amonio en orina humana.....	62
Tabla 35. Estimaciones teóricas de la hidrólisis de urea.....	70
Tabla 36. Máxima producción de amonio y temperaturas 1_s . EGO_2	71
Tabla 37. Máxima producción de amonio y temperaturas 2_s . EGO_2	72
Tabla 38. Máxima producción de amonio y temperaturas 3_s . EGO_2	72
Tabla 39. Máxima producción de amonio y temperaturas 1_2 . LO_2	73
Tabla 40. Máxima producción de amonio y temperaturas 2_2 . LO_2	74
Tabla 41. Máxima producción de amonio y temperaturas 3_2 . LO_2	75
Tabla 42. Máxima producción de amonio y temperaturas 1_s . LO_2	75
Tabla 43. Máxima producción de amonio y temperaturas 2_s . LO_2	76
Tabla 44. Máxima producción de amonio y temperaturas 3_s . LO_2	77
Tabla 45. Urea, producción de amonio e inversos del cultivo EGO_2 , primero y segundo enriquecimientos.....	79
Tabla 46. Urea, producción de amonio e inversos del cultivo LO_2 , primero y segundo enriquecimientos.....	81

RESUMEN

La orina humana contiene alrededor del 2% de urea, la cual es hidrolizada por la enzima ureasa; produciendo amonio e incrementando el pH a valores superiores a 9. En este trabajo se aislaron y caracterizaron cultivos puros y mixtos de tres diferentes fuentes de inóculo, de acuerdo a su capacidad de hidrolizar urea. Las fuentes de inóculo evaluadas fueron: estiércol de vaca fresco, lodo granular anaerobio y orina humana. Para cada uno de los inóculos se llevaron a cabo tres enriquecimientos en un medio selectivo (Stuart) para el aislamiento de bacterias productoras de ureasa, y en el que se presente la actividad ureásica. De los cultivos mixtos enriquecidos a partir de lodo granular, se aislaron 3 cepas de bacterias aerobias y una cepa a partir de estiércol de vaca, por medio de la técnica de dilución en superficie. Con los cultivos mixtos obtenidos, se realizaron cinéticas para probar el efecto de la temperatura y la concentración de sustrato en la hidrólisis de urea. Se obtuvo que los cultivos mixtos provenientes del estiércol enriquecido con glucosa y oxígeno (EGO₂) alcanzaron la mayor velocidad de producción de amonio a los 40°C, mientras que los cultivos mixtos provenientes del lodo enriquecido con oxígeno (LO₂) favorecen la producción de amonio a los 28°C y 30°C. A partir de los resultados obtenidos se determinaron las constantes cinéticas ($\mu_{m\acute{a}x}$ y K_s) y la energía de activación. Para los cultivos EGO₂ y LO₂ las energías de activación en medio Stuart fueron de 9.75 y 9.16 Kcal/mol; valores que son similares en orden de magnitud a los reportados en la literatura. Para el cultivo EGO₂ se obtuvo una $\mu_{m\acute{a}x}$ de 0.01 mM NH₄⁺/h y una K_s de 0.19 mM y de 0.28mM en un segundo enriquecimiento. En el caso del cultivo LO₂ se obtuvo una $\mu_{m\acute{a}x}$ de 0.06 mM NH₄⁺/h y una K_s de 4.94 mM. Finalmente los cultivos EGO₂ y LO₂ fueron capaces de hidrolizar la urea en orina humana, con eficiencias de 0.46 gNH₄⁺/ g urea y de 0.19 gNH₄⁺/ g, respectivamente.

En este trabajo se aislaron bacterias productoras de ureasa a partir de lodos granulares y de estiércol de vaca, pero mostraron actividad ureásica en consorcio. Estos consorcios favorecieron la hidrólisis de urea a temperaturas entre los 28°C y 40°C, respectivamente. Así mismo se logró hidrolizar la urea contenida en la orina humana por vía bacteriana.

1. INTRODUCCIÓN

La orina humana fresca tiene un intervalo de pH comprendido entre 5.6 a 6.8, contiene altas concentraciones de cloruro de sodio, urea, fosfato, potasio; niveles traza de calcio, sulfato y magnesio, siendo la urea la principal forma de nitrógeno en ésta (Larsen y Gujer, 1996; Fittschen y Hahn, 1998). Los compuestos de nitrógeno (urea y amonio) así como el fósforo tienen un valor como compuestos fertilizantes, pudiendo ser otra opción respecto a los fertilizantes químicos y de esta manera el nitrógeno recuperado de la orina puede resultar en una disminución de la carga ecológica en comparación con el uso de fertilizantes químicos (Pronk y Koné, 2008). La urea también denominada carbamida, o carbonildiamida, es un metabolito excretado en la orina por todos los mamíferos como un producto de detoxificación del metabolismo de las purinas, también puede ser liberada a partir de la degradación de compuestos nitrogenados como arginina (Mobley y Hausinger, 1989). La urea es un compuesto nitrogenado cuya fórmula química es $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (Figura 1).

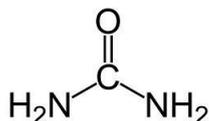


Figura 1. Fórmula de la Urea.

La urea excretada es de corta duración debido a la acción de la enzima ureasa, también conocida como urea amido hidrolasa. Esta enzima es producida por bacterias, plantas, semillas y hongos. La ureasa cataliza la hidrólisis de urea para obtener amonio y bicarbonato (Mobley y col. 1995).

Siendo el amonio un compuesto nitrogenado con un alto impacto al ambiente, se hace necesario implementar métodos para eliminar este contaminante de las aguas residuales. Muchas técnicas de recuperación de nutrientes incluyen la precipitación de amonio como fosfato de amonio-magnesio hexahidratado (estruvita, $\text{MgNH}_4\text{PO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ MAP) (Maurer y col., 2006; Ronteltap y col., 2007; Wilsenach y col., 2007), remoción por Nitrificación-Anammox (Udert y col., 2003; Udert y col., 2008), completa remoción autotrófica de nitrógeno (Wilsenach 2007), así como la absorción extracción (Basakcildan-Kabakci y col., 2007), que han sido desarrolladas para la recuperación de nitrógeno, fósforo y potasio. El proceso de nitrificación también ha sido usado para la oxidación de amonio a nitrato como vía para la estabilización de la orina (Kangning X. y col., 2011).

1.1 Composición química de la orina

La orina humana es un líquido producido en los riñones como vehículo para eliminar productos de desecho del torrente sanguíneo. Está constituida principalmente de agua (95%) y solutos orgánicos como urea (2%), creatinina, ácido úrico, enzimas, carbohidratos, hormonas, ácidos grasos, pigmentos, iones inorgánicos como sodio (Na^+), potasio (K^+), cloruros (Cl^-), magnesio (Mg^{2+}), calcio (Ca^{2+}), amonio (NH_4^+), sulfatos (SO_4^{2-}), y fosfatos (PO_4^{3-}) (Tabla 1).¹

De acuerdo con estudios previos la orina humana contribuye aproximadamente con el 1% del volumen total de las aguas residuales municipales, presenta elevadas concentraciones de nutrientes: $8 \pm 1.3 \text{ g NL}^{-1}$, $0.6 \pm 0.2 \text{ g PL}^{-1}$ y $2.2 \pm 0.3 \text{ g KL}^{-1}$, además de ser una fuente potencial de microorganismos patógenos (Larsen y Gujer, 1996; Larsen y col., 2001; Fittschen y Hahn, 1998; Otterpohl, 2002; Rauch y col., 2003; Ronteltap y col., 2007). Actualmente se considera la recuperación de nutrientes así como la eliminación de contaminantes de la orina humana (Kangning y col., 2011). La tabla 1 muestra la composición de orina humana almacenada por un período de 24h.

Tabla 1. Composición de orina (almacenada 24 h) (Kuntke. 2011)²

Parámetro	Concentración(g/L)
DQO	9.6
DBO	6.4
CT- COT	9.6
NH_4^+	0.3
N - Total	7.4
Proteínas	0.1
Ácidos Grasos	0.04
Cl^-	4.4
SO_4^{2-}	3
PO_4^{3-}	4
Na^+	3
K^+	2
Mg^{2+}	0.1
Ca^{2+}	0.1

¹ <http://chemistry.about.com/od/biochemistry/f/What-Is-The-Chemical-Composition-Of-Urine.htm>

² <http://www.ete.wur.nl/UK/Research/Urban+Environmental+Technology+and+Management/Recovery+of+Nutrients+and+Energy+from+Source+Separated+Urine/>

1.2 Hidrólisis de urea

La ureasa (urea amidohidrolasa) es una metaloenzima que cataliza la hidrólisis de urea produciendo amoníaco y carbamato (Ecuación 1), este último compuesto se hidroliza espontáneamente produciendo a su vez otra molécula de amoníaco y ácido carbónico (Ecuación 2).



En solución se disocia el ácido carbónico y las dos moléculas de amoníaco establecen equilibrio con sus formas protonadas y desprotonadas (Ecuación 3 y Ecuación 4). El efecto neto de estas reacciones se refleja en un incremento en el pH (Mobley y col., 1995).



1.3 Enzima ureasa.

La enzima ureasa EC 3.5.1.5 (*Enzyme Commission numbers*) recibe esta clasificación debido a las reacciones que cataliza³.

3 – Hidrolasa.

3.5 – Acción sobre enlaces carbono nitrógeno (salvo enlaces peptídicos).

3.5.1. – Sobre amidas lineales.

3.5.1.5 – Ureasa

Una gran variedad de ureasas han logrado aislarse de diversas fuentes tales como algas, plantas hongos y bacterias. Muchos eucariotas sintetizan la ureasa y también se ha observado la actividad de la ureasa entre procariontes.

Independientemente de las diferencias estructurales y de la ureasa microbiana, se deduce el mismo patrón de catálisis, principalmente a causa de la secuencia similar de aminoácidos y a la presencia de dos iones de Ni^{2+} en el sitio activo de la enzima (Hanif y col. 2012).

Las ureasas de hongos y plantas son proteínas homo – oligoméricas de 90 KDa, mientras que las ureasas bacterianas son multímeros de dos o tres subunidades complejas. Los residuos amino terminales de los monómeros de las ureasas de plantas y enzimas son similares en secuencia a las pequeñas subunidades de las enzimas bacterianas (Olivera y col., 2006). La ureasa mejor caracterizada es la que se obtiene de las plantas de semillas de chícharo (*Canavalia Ensiformis*), otras

³ http://www.ebi.ac.uk/thornton-srv/databases/cgi-bin/enzymes/GetPage.pl?ec_number=3.5.1.5

ureasas bien caracterizadas son las que provienen de morera (*Morus alba*) así como las plantas de los frijoles de soya (*Glycine max*) y las del género *Arabidopsis*. Las ureasas en la mayoría en los tejidos vegetativos se encuentran en bajas concentraciones (Olivera y col., 2006).

Las ureasas bacterianas desempeñan roles de virulencia humana y animal. Bacterias productoras de ureasa consideradas patológicas son: *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophiticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella aerogenes* y *Ureaplasma urealiticum*, entre otras (Sirko y Brodzik 2000). Otra de las ureasas frecuentemente mencionada en la literatura es la proveniente de *Helicobacter pylori*, la cual coloniza la mucosa estomacal y es el principal factor de riesgo en enfermedades como úlceras duodenales y estomacales, carcinomas gástricos y linfomas (Olivera y col., 2006).

1.3.1 Estructura de la ureasa

La ureasa está unida a dos iones de níquel por subunidad, tiene cuatro histidinas un aspartato y una molécula de carbamato – lisina que sirve como ligando para estos metales, una histidina adicional está involucrada en el mecanismo catalítico. El dominio de la ureasa forma una estructura de barril (α , β) con una estructura similar a la de otras hidrolasas (Carlsson y Nordlander, 2010).

La estructura cristalina del centro activo de la ureasa contiene probablemente dos moléculas de agua y un puente OH⁻. El sitio de unión de la ureasa está perfectamente construido. La especificidad de la enzima está fuertemente relacionada a la forma del centro activo (Figura 2).

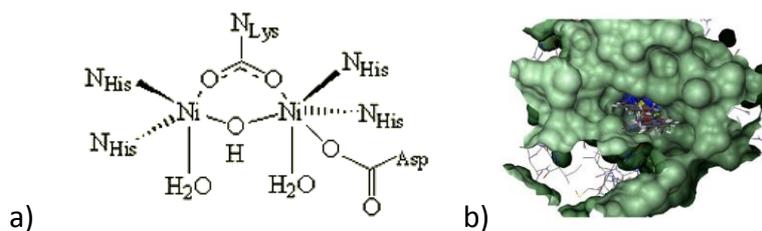


Figura 2. a) Estructura química de la ureasa y b) ureasa de chícharo donde se muestra el sitio activo (hueco)⁴.

1.3.2 Mecanismo de reacción de la ureasa.

El mecanismo de reacción es una interacción cooperativa entre los dos iones del níquel. Uno de los iones de níquel actúa como un ácido de Lewis. El ión metálico

⁴ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3425833/figure/fig2/>

polariza el grupo carbonil de la urea e induce el ataque nucleofílico. En el proceso las dos moléculas de agua son reemplazadas por urea. El otro ión de níquel se une a un ión hidróxido (Carlsson y Nordlander, 2010).

El ión hidróxido (OH⁻) ataca al carbono del carbonilo parcialmente positivo de la molécula de urea. Uno de los dos grupos amino (NH₂) de la urea es protonado. Se postula que la histidina es el ácido (Nelson y col 2005). Como resultado de la reacción se forma amoníaco y carbamida ácida (Carlsson y Nordlander, 2010).

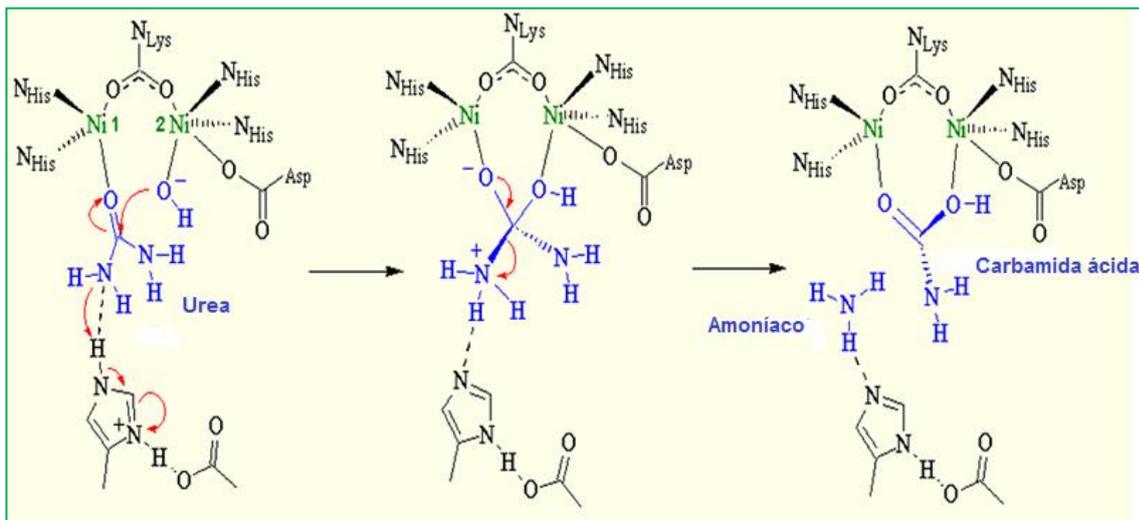


Figura 3. Mecanismo de acción de la ureasa⁵.

La carbamida ácida se descompone espontáneamente para formar amoníaco y dióxido de carbono.



En solución acuosa se presenta el siguiente equilibrio:



La ureasa es una enzima absolutamente específica por su substrato la urea, y compuestos análogos estructurales como la thiourea, no son degradados por esta enzima (Mobley y Hausinger, 1989).

⁵http://www.uniregensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Urease-e.htm

1.4 Microorganismos productores de ureasa.

Tabla 2. Bacterias Productoras de Ureasa (Broomfield y col., 2009; Mobley y Hausinger 1989).⁶

Género	Microorganismo (s) Productor (es) de ureasa	T (°C)	pH	Información adicional
<i>Clostridium</i>	<i>Clostridium beijerinckii</i> <i>Clostridium innocuum</i> <i>Clostridium symbiosum</i>	37	7-7.4	Gram positiva. Anaerobio obligado. Tracto Gastrointestinal. Heces fecales, suelo.
<i>Coprococcus</i>	<i>Coprococcus catus</i>	37		Gram positiva. Heces fecales e intestino grueso.
<i>Eubacterium</i>	<i>Eubacterium aerofaciens</i> <i>Eubacterium lentum</i>	37	7	Gram positiva. Anaerobio estricto. Heces fecales, alcantarillas, rumen bovino, suelos.
<i>Peptostreptococcus</i>	<i>Peptostreptococcus productus</i>	37	7-7.5	Gram positiva. Anaerobia. Mucosas membranales, y tracto intestinal de mamíferos.
<i>Ruminococcus</i>	<i>Ruminococcus albus</i>	40	6.5	Gram positivas y Gram negativas. Anaerobio estricto. Intestino humano grueso, heces fecales.
<i>Sporosarcina</i>	<i>Sporosarcina ureae</i>	15-37	8.5	Gram positiva. Anaerobio estricto. Amplia distribución en suelos, suelos urbanos y estiércol líquido

⁶ Bergey's manual of systematic Bacteriology 1994.
Bergey's manual of determinative bacteriology 2000.
Bergey's manual of systematic Bacteriology 2005.

Tabla 3. Continuación Bacterias Productoras de Ureasa (Broomfield y col., 2009; Mobley y Hausinger 1989).⁷

Género	Microorganismo (s) Productor (es) de ureasa	T (°C)	pH	Información adicional
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus faecium</i> <i>Streptococcus mitis</i>	37		Gram positiva. Anaerobio facultativo (5% CO ₂). Parásitos de vertebrados, boca y tracto superior respiratorio.
<i>Bacteroides</i>	<i>Bacteroides multiacidus</i> <i>Bacteroides bifidum</i> <i>Bacteroides ruminicola</i>	37	7	Gram negativa. Anaerobio obligado. Cavidades humanas y animales. Intestino grueso humano.
<i>Enterobacter</i>	<i>Enterobacter cloacae</i>	37		Gram negativa. Anaerobio facultativo. Células intestinales humanas, tracto urinario, orina, agua, suelo.
<i>Fusobacterium</i>	<i>Fusobacterium necrophorum</i> <i>Fusobacterium prausnitzii</i> <i>Fusobacterium varium</i>	37	7	Gram negativa. Anaerobio obligado. Cavidades humanas y animales, así como heces fecales humanas.
<i>Mycoplasma</i>	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> . <i>Mycoplasma hominis</i> <i>Mycoplasma genitalium</i>	36-37	6-8	Gram negativa. Anaerobio facultativo. Distribuida en tracto respiratorio, tracto urogenital.
<i>Helicobacter</i>	<i>Helicobacter pilory</i>	37	6.9-8	Gram negativa. Micro aerófila. Distribuida en mucosa gástrica, heces fecales.

⁷ Bergey's manual of systematic Bacteriology 1994.
Bergey's manual of determinative bacteriology 2000.
Bergey's manual of systematic Bacteriology 2005.

1.5 Energía de activación.

La trayectoria de una reacción entre reactivos y productos transcurre prácticamente invariable a través de una barrera energética, denominada barrera de activación, que debe ser superada para que tenga lugar la reacción. La rotura y formación de enlaces implica generalmente y de manera previa la distorsión de los enlaces existentes, lo que genera un estado de transición de mayor energía libre que reactivos o productos. El punto más alto en un diagrama de coordenadas de reacción representa el estado de transición y la diferencia de energía entre un reactivo en su estado fundamental y en su estado de transición se denomina energía de activación (Nelson y col., 2005). Las enzimas catalizan reacciones proporcionando un entorno más confortable para el estado de transición: una superficie complementaria a su estereoquímica, polaridad o carga. La unión de una enzima al estado de transición es exergónica y la energía liberada por esa unión reduce la energía de activación de la reacción incrementando de modo muy importante su velocidad (Nelson y col., 2005).

En la figura 4 se representa la energía libre del sistema frente al progreso de la reacción $S \rightarrow P$. Un diagrama de este tipo constituye una descripción de los cambios energéticos durante la reacción y el eje horizontal (coordenada de reacción) refleja los cambios químicos progresivos a medida que S se convierte en P. Se indican las energías de activación, ΔG^\ddagger , para las reacciones $S \rightarrow P$ y $P \rightarrow S$. $\Delta G'^\circ$ es la variación de energía libre estándar global en la dirección $S \rightarrow P$ (Nelson y col., 2005).

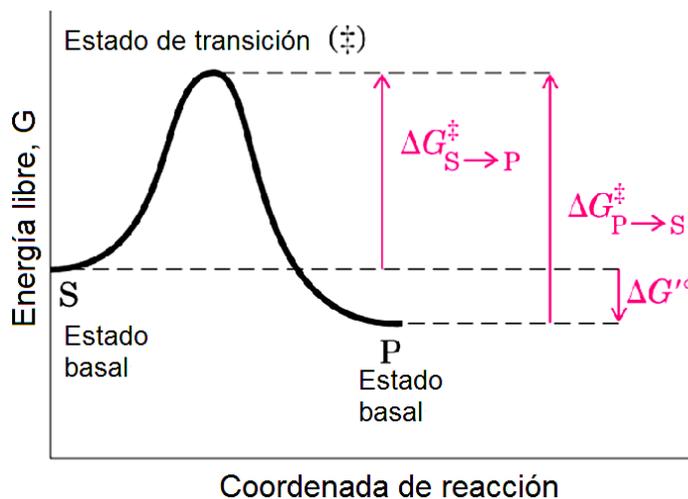


Figura 4. Diagrama de coordenada de reacción de una reacción química.

En la figura 5 se presenta la reacción $S \rightarrow P$, los intermediarios ES y EP ocupan mínimos en la curva de progreso energético de la reacción catalizada enzimáticamente. Los términos ΔG^\ddagger no cat y ΔG^\ddagger cat corresponden a las energías

de activación de las reacciones sin catalizar y catalizada, respectivamente. La energía de activación del proceso global es menor cuando la enzima cataliza la reacción (Nelson y col., 2005).

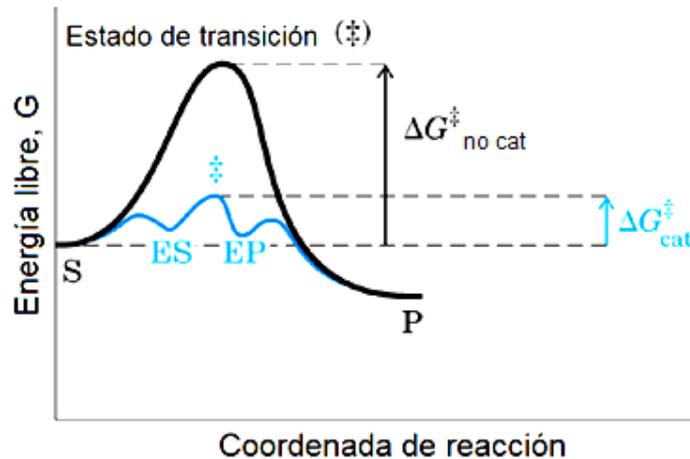


Figura 5. Diagrama de la coordenada de reacción dónde se comparan las reacciones catalizadas por enzima y sin catalizar.

En 1889 Arrhenius expresó la relación entre velocidad de reacción y temperatura de la siguiente forma (Ecuación de Arrhenius):

$$k = Ae^{\frac{-Ea}{RT}} \quad \text{Ecuación 7}$$

En dónde:

- Ea = Energía de activación
- R = Constante de la ley de los gases
- A = Factor de frecuencia
- T = Temperatura absoluta

La forma logarítmica de la ecuación de Arrhenius es:

$$\ln k = \ln A - \frac{Ea}{RT} \quad \text{Ecuación 5}$$

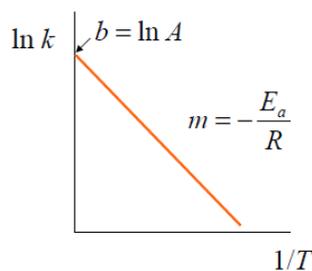


Figura 6. Método gráfico para la determinación de Ea .

El factor de frecuencia A depende de la temperatura. Sin embargo, para un intervalo limitado de temperaturas, i.e ≤ 50 °K, A puede considerarse constante y la variación de la constante de velocidad con la temperatura está dada únicamente por el factor exponencial.⁸

1.6 Curva de crecimiento

El crecimiento se define como un incremento ordenado de los principales constituyentes de un organismo. Involucra síntesis de estructuras celulares, ácidos nucleicos, proteínas y otros componentes celulares a partir de nutrientes. La curva de crecimiento representa el comportamiento del microorganismo a través del tiempo. Con base en ella se determina cuando se produce la mayor cantidad de biomasa o de metabolitos (Brock y Madigan, 1991). En la figura 7 se muestran las diferentes fases de crecimiento de un microorganismo.

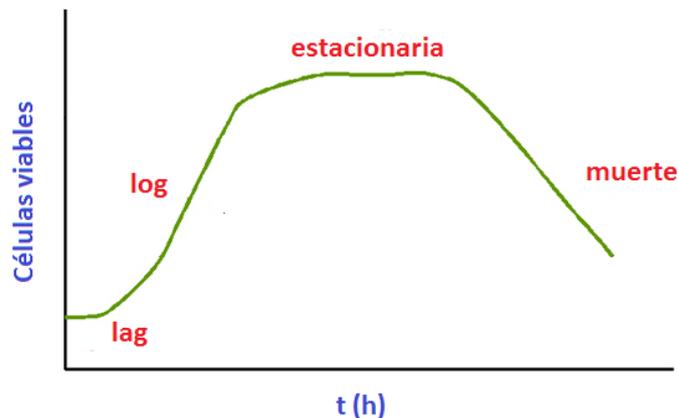


Figura 7. Gráfico de la curva de crecimiento

La fase de latencia o fase lag es un período de adaptación, se presenta después de la inoculación cuando un cultivo de un microorganismo es llevado de un ambiente a otro y; depende del estado fisiológico de la célula inoculada y de las condiciones ambientales. Si el microorganismo se encuentra en su fase logarítmica antes de la inoculación, la fase lag es muy pequeña o puede no presentarse. Los microorganismos sufren una reorganización tanto en su velocidad de crecimiento como en sus constituyentes macromoleculares (Brock y Madigan, 1991).

Fase logarítmica, log ó exponencial es un período de balance o de estado estacionario en el crecimiento, durante el cual las células se multiplican a la máxima velocidad. La velocidad específica de crecimiento es constante y es

⁸ http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/apuntesparte7_10181.pdf

independiente de la concentración de sustrato. La composición química del medio de cultivo está cambiando debido a que los nutrientes se están consumiendo y productos metabólicos son producidos. La fase logarítmica termina cuando los nutrientes se agotan, las condiciones indispensables para la célula se modifican o cuando la célula produce metabolitos tóxicos o que inhiben su reproducción. En la fase estacionaria la velocidad de crecimiento del microorganismo es igual a la velocidad de muerte y se llega a un equilibrio celular. En la fase de decaimiento o muerte un gran número de células muere. Los nutrientes se agotan y productos tóxicos se acumulan (Brock y Madigan. 1991).

1.6.1 Efecto de la concentración de sustrato sobre la velocidad de crecimiento.

La ecuación de Monod describe la velocidad de crecimiento en relación a la concentración de nutrientes.

$$\mu = \mu_{m\acute{a}x} \frac{S}{K_s + S} \quad \text{Ecuación 6}$$

La velocidad de crecimiento de un microorganismo es el aumento en la cantidad de microorganismos por unidad de tiempo y se expresa matemáticamente como dX/dt ; sus unidades son (g/Lh). Es proporcional al número de células presentes; alcanza un valor máximo y constante, siempre y cuando no haya un sustrato que limite su crecimiento (Roels J., 1983).

La velocidad específica de crecimiento (μ), es la velocidad de aumento de la concentración celular por unidad de tiempo y se expresa en h^{-1} . Se mantiene constante en la fase logarítmica, y en la curva de crecimiento, se presenta por la pendiente de la línea que simboliza la fase logarítmica.

La velocidad específica de crecimiento máxima ($\mu_{m\acute{a}x}$) es la velocidad máxima de multiplicación que puede alcanzar el microorganismo en las condiciones en las que está creciendo. Esta velocidad es igual a la velocidad específica de crecimiento μ , cuando el microorganismo está en la fase logarítmica.

El sustrato limitante (S), es el que debido a su concentración va a ser el que restrinja el crecimiento de los microorganismos. Este sustrato puede ser también la fuente de carbono y de energía.

La constante específica de cada sustrato (K_s), es la constante de utilización del sustrato limitante y representa la afinidad de los microorganismos por ese sustrato. Si el microorganismo tiene gran afinidad por el sustrato limitante el valor de K_s es bajo. Los valores de K_s de diferentes sustratos oscilan en un intervalo entre 1.1×10^{-3} y 25 mg/L para varios de los microorganismos.

La gráfica que describe el crecimiento de acuerdo a la ecuación de Monod se muestra en la figura 8 (Roels J., 1983).

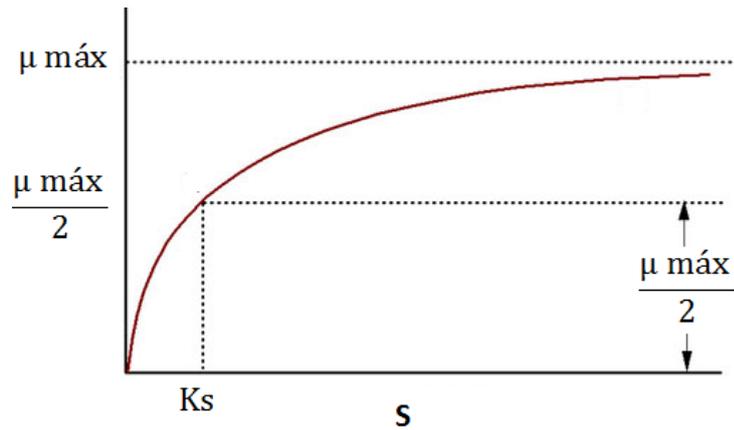


Figura 8. Gráfico de Monod

Con base a la ecuación de Monod se puede observar que:

Si la concentración de sustrato limitante (S) es cero, la velocidad específica de crecimiento también lo es. Cuando S es muy grande, la velocidad específica de crecimiento tiende a la velocidad máxima; el microorganismo se encuentra en la fase logarítmica. Si por el contrario, S es muy pequeña, la velocidad específica de crecimiento depende de S (Roels J., 1983).

1.7 JUSTIFICACIÓN

La orina humana contiene altas concentraciones de cloruro de sodio, urea, fosfato, potasio; niveles traza de calcio, sulfato y magnesio, siendo la urea la principal forma de nitrógeno presente en ésta. La orina es de gran interés porque contiene nutrientes que pueden ser usados como fertilizantes y que son una opción respecto al uso de fertilizantes sintetizados químicamente, lo que disminuye la carga ecológica y el consumo de energía.

El diseño de nuevas tecnologías, que se enfoquen en la recuperación de recursos como el agua, nutrientes y energía en lugar de simplemente disminuir la contaminación es cada vez más importante. Un prometedor enfoque es la separación de la orina desde el origen y su tratamiento específico en reactores descentralizados a través de bacterias que hidrolicen urea como una alternativa aplicable al tratamiento biológico de la orina.

1.8 HIPÓTESIS

Las bacterias ureolíticas tienen una amplia distribución en el ambiente y diferentes tipos de respiración, por lo que es posible aislar bacterias ureolíticas a partir de inóculos de distinta procedencia.

Las bacterias obtenidas en los aislamientos serán capaces de producir ureasa e hidrolizar la urea presente en orina humana.

1.9 OBJETIVOS

1.9.1 Objetivo General

Aislar y caracterizar cultivos puros y mixtos de bacterias productoras de ureasa provenientes de diversos inóculos, que hidrolicen urea presente en orina.

1.9.2 Objetivos Particulares

- Caracterización fisicoquímica de la orina humana.
- Evaluar la hidrólisis de la urea, en muestras de orina fermentadas y con otras fuentes de inóculo (lodos anaerobios y estiércol de vaca), mediante la formación de amoníaco, dióxido de carbono y de la actividad enzimática.
- Enriquecer y aislar las bacterias que presenten la mayor actividad enzimática.
- Caracterizar metabólicamente las bacterias obtenidas
- Determinar parámetros fisiológicos de los cultivos seleccionados.

2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Caracterización de orina

Como primera actividad se realizaron pruebas para determinar algunos componentes de la orina humana. Los parámetros y métodos se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Parámetros de caracterización de orina y técnicas analíticas.

Parámetro	Técnica
DQO	Reflujo cerrado APHA 2005
NH ₄ ⁺	Reacción de Nesslerización APHA 2005 Electrodo Selectivo de amonio (Thermo Scientific Orion High Performance)
pH	Potenciometría
Sólidos	Método gravimétrico APHA 2005
Urea	HPLC

DQO - La demanda química de oxígeno es la cantidad de oxígeno consumido por las materias existentes en el agua que son oxidables. La medida corresponde a una estimación de las materias oxidables presentes en el agua, ya sea su origen

orgánico o inorgánico (Beascochea y col., 2001). La DQO soluble se determinó por el método colorimétrico de reflujo cerrado, a una absorbancia de 620 nm. Se utilizó el procedimiento descrito por HACH. Este ensayo consiste en la digestión con solución de $K_2Cr_2O_7 - H_2SO_4 - AgSO_4$ a $150^\circ C$ durante 2 horas (APHA, 2005).

NH_4^+ - Reacción de Nesslerización. La reacción de Nesslerización hace reaccionar al amonio con el reactivo Nessler que contiene KI y HgI_2 , en presencia de amoníaco o ión amonio adquiere una coloración amarillo-naranja, se mide la absorbancia de 400 a 425 nm (Mobley y Hausinger, 1989).

NH_4^+ - Método del electrodo selectivo de amoníaco. Se utiliza una membrana hidrófoba permeable al gas para separar la solución de muestra de una solución interna del electrodo de cloruro de amonio. El amoníaco disuelto ($NH_{3(ac)}$ y NH_4^+) se convierte en $NH_{3(ac)}$ elevando el pH. El amoníaco acuoso se difunde a través de la membrana y cambia el pH de la solución interna que es detectado por un electrodo de pH. El nivel fijo de cloruro de sodio en la solución interna se detecta por un electrodo selectivo de ión cloruro que sirve de electrodo de referencia. Las determinaciones potenciométricas se hacen con un medidor de pH.

Método del electrodo selectivo de amoníaco con adición conocida: Cuando existe una relación lineal entre concentración y respuesta, es conveniente la adición conocida para medir muestras ocasionales porque no se necesita calibrado. Dado que una medida exacta requiere que la concentración sea aproximadamente el doble como resultado de la adición, se debe de conocer la concentración de la muestra dentro de un factor de tres. La adición conocida es una comprobación adecuada de los resultados de la medición directa (APHA 2005).

pH – Se basa en la capacidad de respuesta del electrodo de vidrio ante soluciones de diferente actividad de iones H^+ . La fuerza electromotriz producida en el electrodo de vidrio varía linealmente con el pH del medio. Se debe tener en cuenta la temperatura de la muestra ya que esta fuerza electromotriz afecta el valor del pH (Beascochea y col., 2001).

Sólidos - Se determinaron sólidos suspendidos totales, sólidos suspendidos fijos, y sólidos suspendidos volátiles, con el fin de conocer la cantidad de compuestos inorgánicos, así como los que pertenecen a biomasa. Los papeles en los que se filtró la muestra fueron puestos a peso constante en estufa a $105^\circ C$, durante 2 horas. Los filtros fueron Whatman de la serie GF/C, de fibra de vidrio de un diámetro de 55mm, con un tamaño de poro de $1,2\mu m$. Este procedimiento se repitió tres veces hasta llegar a un peso constante. Se filtraron 10 mL de muestra y se colocaron de nuevo en la estufa a $105^\circ C$ por 2 horas, se dejaron enfriar en el desecador, se registra el peso (sólidos secos), repitiendo el procedimiento dos veces más, se meten en la mufla durante 30 minutos a $550^\circ C$, después de enfriar en el desecador se registra de nuevo el peso (sólidos fijos). Para obtener los sólidos suspendidos volátiles, se debe restar el valor de los sólidos fijos al de los sólidos totales (APHA, 2005).

Urea - Se determinó la concentración de urea en orina humana, mediante HPLC. Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: HPLC Thermostepparation equipado con una bomba 3200 y detector UV 4100 a una longitud de onda de 210nm, la fase móvil fue agua (1mL/min), la sensibilidad utilizada fue de 0.2 (Thermostepparation 4100); con una columna Symmetry® C₁₈ 3.5µm (4.6 x 75mm) (Application notes, Cogente Bidentate C₁₈).

CO₂- La producción de gas se cuantificó por desplazamiento de una solución salina (300 g/L de NaCl a pH =2.0) y su composición por medio de cromatografía de gases bajo las siguientes condiciones: el cromatógrafo empleado fue un Gow – Mac series 580 con detector de conductividad térmica (TCD), temperatura del horno 140°C, temperaturas del inyector y del detector 120°C, gas acarreador helio (25mL/min); columna Carbosphere 80/100 (González y Durán 2002).

El número de milimoles de CO₂ se calculó usando la ecuación de los gases ideales:

$$PV=nRT.$$

Ecuación 10

En dónde:

P= Presión atmosférica 0.7722 atm (Cd. De México)

R= Constante de gases 0.082 (L atm/ mol K)

T = Temperatura (35°C = 308 K)

V= Volumen (L)

n= milimoles

Proteínas – Se determinó la cantidad de proteínas por el método colorimétrico de Lowry (1951), a una absorbancia de 750 nm. El método de Lowry es un método colorimétrico de valoración cuantitativa de las proteínas. A la muestra se le añade un reactivo a base de cobre que forma un complejo coloreado con las proteínas, siendo la intensidad de color proporcional a la concentración de proteínas, según la ley de Lambert-Beer. Los iones Cu²⁺, se unen a las proteínas formando complejos con los átomos de nitrógeno de los enlaces peptídicos. Estos complejos Cu²⁺ proteína tienen un color azul claro. Además, provocan el desdoblamiento de la estructura tridimensional de la proteína, exponiéndose los residuos fenólicos de tirosina que van a participar en la segunda etapa de la reacción. Se lleva a cabo la reducción del reactivo de Folin-Ciocalteu, por los grupos fenólicos de los residuos de tirosina presentes en la mayoría de las proteínas, actuando el cobre como catalizador. El principal constituyente del reactivo de Folin-Ciocalteu es el ácido fosfomolibdotúngstico, de color amarillo, que al ser reducido por los grupos fenólicos da lugar a un complejo de color azul intenso.

2.2 Selección y tratamiento de Inóculos.

A partir de la revisión bibliográfica se decidió utilizar como inóculos estiércol de vaca fresco, lodos granulares anaerobios y orina humana fermentada.

Estiércol de vaca: el estiércol de vaca fue tomado en fresco, almacenado en múltiples bolsas de plástico semejando una bolsa multicapas; posteriormente fue llevado al laboratorio en donde se colocó en un recipiente de plástico y fue puesto en refrigeración durante 24 h a 4°C. Se pesaron 3 g de estiércol los cuales se diluyeron en 30 mL de agua destilada estéril, posteriormente fueron macerados.

Lodos granulares anaerobios: los lodos anaerobios fueron muestreados de un reactor UASB de una planta de tratamiento de aguas residuales de la industria alimentaria. El lodo fue previamente macerado antes de la inoculación.

Orina humana: la muestra de orina se tomó de una mezcla de 6 voluntarios, la cual se dejó fermentar durante 72 h, a temperatura ambiente.

2.3 Medio de Cultivo

El medio de cultivo fue preparado en presencia y ausencia de oxígeno, para cultivar las poblaciones aerobias y anaerobias. Se empleó el medio selectivo formulado por Stuart y col. (1945), el cual es utilizado para la identificación de microorganismos en base a la actividad ureásica (Tabla 5). En este medio las sales de fosfatos constituyen el sistema buffer, el rojo de fenol es el indicador de cambio de pH y la urea es el sustrato de la enzima ureasa. La concentración de urea (20g/L) es similar a la concentración de urea presente en la orina humana (Koolman y Röhm 2004).

Tabla 5. Composición del medio de cultivo Stuart y col. (1945).

Componente	g/L
Urea	15-20
KH ₂ PO ₄	9.1
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	17.96
Extracto de levadura	0.1
Rojo Fenol	0.01
Glucosa	1-2
pH	6.8 ± 0.2

2.3.1 Medio Óxico.

En el caso del medio con óxico se preparó disolviendo los componentes en agua destilada, distribuyéndolo en botellas serológicas (27 mL) y fue y esterilizado a una temperatura de 121°C durante 15 minutos a una presión de 15 lb/plg². El pH resultante fue de 6.8 ± 0.2.

2.3.2 Medio Anóxico.

Para la preparación del medio anóxico se procedió de la siguiente manera: se disolvieron las sales del medio con un exceso de agua destilada (30%) del volumen requerido, se calentó el medio hasta ebullición bajo una corriente de nitrógeno, una vez que llegó al volumen deseado se retiró de la fuente de calor y se enfrió bajo la corriente de nitrógeno. El medio es distribuido en cada botella serológica con un volumen de 27 mL haciendo pasar nitrógeno en cada una de ellas para evitar la oxigenación del medio. Se taparon con un tapón de neopreno y sello de aluminio. Las botellas se esterilizaron a una temperatura de 121°C durante 15 minutos a una presión de 15lb/plg². El pH resultante fue de 6.8 ± 0.2.

La urea fue adicionada al medio, posterior a la esterilización a partir de una solución al 40%, esterilizada por filtración con una membrana de 0.2 µm estéril.

En algunos ensayos se usó glucosa como fuente adicional de carbono y ésta se añadió bajo condiciones estériles a partir de una solución estéril de glucosa al 10%.

Una vez establecidos el medio de cultivo e inóculos, se realizaron diferentes tratamientos. Los tratamientos fueron: anóxicos sin glucosa y con glucosa; y óxicos sin glucosa y con glucosa. El diseño experimental se presenta en la figura 9.

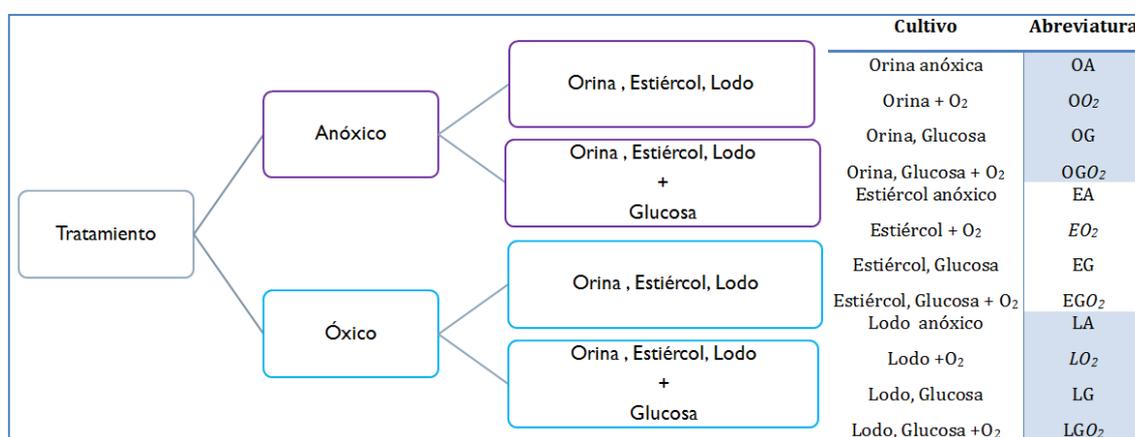


Figura 9. Diseño experimental para condiciones de cultivo

2.4 Actividad ureásica

La determinación de la actividad ureásica se llevó a cabo considerando la presencia de CO₂, el amonio producido y el cambio de pH, con base en la consideración siguiente:

Las bacterias que poseen ureasa, pueden utilizar el nitrógeno de la urea, la hidrolizan, produciendo amoníaco y dióxido de carbono. Estos productos metabólicos alcalinizan el medio, haciendo virar el rojo fenol del naranja (pH = 6.8±0.2) a rosa mexicano (pH = 8-9).

2.5 Inoculación

Se inyectaron 3 mL de los inóculos correspondientes en cada una de las botellas serológicas que contenían 27 mL de medio estéril. Posteriormente se incubaron a 35°C hasta obtener respuesta positiva.

2.6 Enriquecimientos.

Se efectuaron 3 enriquecimientos a partir de las tres fuentes de inóculo (Cesatti 2012).

El primero consistió en inocular los medios de cultivo con 3 mL de cada uno de los tres diferentes inóculos. Los cultivos fueron incubados a 35 °C y se determinó amonio, CO₂ y pH a diferentes intervalos de tiempo hasta obtener respuestas positivas a ureasa en los cultivos.

Los cultivos que presentaron respuesta positiva a la actividad de la ureasa fueron reinoculados, transfiriendo 3 mL en una segunda botella de cultivo y se determinaron las mismas variables de respuesta, además del crecimiento que fue medido como turbidez a 580nm (Madigan y Martinko, 2004).

Para el tercer enriquecimiento de las bacterias con actividad ureásica, se repitió el mismo procedimiento en una tercera botella de cultivo. Cabe destacar que para este enriquecimiento se modificaron las concentraciones de urea y glucosa a 15 g/L y a 2g/L, respectivamente para favorecer el crecimiento de las bacterias.

2.7 Aislamiento.

2.7.1 Aislamiento de bacterias aerobias.

Para el aislamiento de las bacterias aeróbicas, se empleó el mismo medio descrito que se usó para los enriquecimientos, al que se le añadió agar bacteriológico (16 g/L) y fue esterilizado a una temperatura de 121°C durante 15 minutos a una presión de 15 lb/plg². El medio estéril se deja enfriar (50°C) para ser vertido (25 mL) en condiciones estériles en cajas Petri y se dejó solidificar.

Para el aislamiento se hicieron 3 diluciones de aquellos de los cultivos que dieron respuesta positiva en el tercer enriquecimiento. Las diluciones se hicieron en solución salina isotónica estéril (8 g/L de NaCl). Al primer tubo que contenía 9 mL de solución salina se le agregó 1 mL de inóculo, ésta fue la dilución 10^{-1} , de este primer tubo se transfirió 1 mL a un segundo tubo, para dar lugar a la dilución 10^{-2} , y así sucesivamente hasta alcanzar la dilución deseada (Madigan y Martinko, 2004). La inoculación en medio sólido del cultivo original y de cada una de las diluciones se hizo usando la técnica de extensión en superficie, con 0.1 mL de inóculo. Posteriormente las cajas Petri se incubaron a 35 °C de forma invertida hasta la aparición de colonias (Madigan y Martinko, 2004).

2.7.2 Aislamiento de bacterias anaerobias

Para el aislamiento de las bacterias anaerobias se usó la técnica del tubo rodado (Hungate. R. E., 1969). En este procedimiento primero se preparó el medio mineral y se le adicionó 30% más de agua destilada, se puso a ebullición hasta alcanzar el volumen de aforo y bajo una atmósfera de nitrógeno se adicionó el agar en aspersión para evitar grumos. Bajo condiciones anaerobias se adicionó a cada tubo 4.5 mL de medio, desplazando el oxígeno presente en cada tubo por la introducción de nitrógeno, posteriormente se taparon con sellos de neopreno y tapones de rosca horadados y fueron esterilizados. Para la inoculación los tubos se colocaron en un baño María a 48 °C para evitar la solidificación del medio. Se efectuó una inoculación directa con 0.5 mL de inóculo y posteriormente se inocularon en cascada hasta la dilución 10^{-3} siguiendo la metodología realizada para los cultivos aerobios. Una vez efectuadas las diluciones, cada uno de los tubos se colocaron en un rotador giratorio, pasando un cubito de hielo a lo largo del tubo, para la solidificación del medio. Los tubos fueron incubados a 35 °C en forma vertical hasta la aparición de colonias en las paredes del tubo.

2.8 Medios de cultivo alternos

Se empleó el medio selectivo formulado por Stuart y col (1945), sin embargo se efectuaron modificaciones en el contenido de glucosa para establecer relaciones C/N que propicien un adecuado crecimiento e incrementar la biomasa (Narjis y col., 2009). En la tabla 6 se muestra la formulación empleada de los medios.

Tabla 6. Medios de cultivo empleados.

Formulación de medios en g/L

Luria Bertani (LB)		Medio 2		Stuart y col (1945)	
Triptona	10g	Glucosa	10g	Glucosa	10.15 g
				Urea	15.2 g
Extracto de Levadura	5g	Extracto de Levadura	1g	KH ₂ PO ₄	9.1 g
				Na ₂ HPO ₄	9.5 g
NaCl	10g	Peptona	5g	Extracto de Levadura	0.1 g
				Rojo Fenol	0.01 g
C/N	0.52	C/N	5.81	C/N	0.86, 1. 3
pH	7	pH	7	pH	6.8 ± 0.2

2.9 Propagación

Pese a la confirmación de la actividad enzimática observada y reportada en la literatura, se encontró que los cultivos tanto mixtos como puros presentaban dificultades en su crecimiento en el medio trabajado, por lo que se decidió crecer los microorganismos en medios ricos en nutrientes. La estrategia de propagación fue la siguiente:

a) Las colonias obtenidas en el aislamiento provenientes de los inóculos de estiércol y lodo granular (cultivos LO₂ y EGO₂), fueron inoculadas en un volumen de 0.5 mL en los medios Luria Bertani y el Medio 2.

b) Cuando se observó turbidez se tomó una alícuota de 0.25 mL y se reinoculó en un tubo que contenía 2.25 mL de medio fresco, obteniendo un volumen final de 2.5 mL en cada uno de los medios.

c) Se repitió el mismo procedimiento en cuanto se observó turbidez. En este caso se tomó una alícuota de 0.5 mL y se inoculó en un tubo que contenía 4.5 mL de medio fresco, hasta alcanzar un volumen final de 5mL en cada uno de los medios. En esta etapa se leyó la absorbancia a 580 nm (Madigan y Martinko 2004), para confirmar el aumento en la biomasa.

d) Se repitió el paso c) con un inóculo de 1 mL en un volumen de 9 mL, para la obtención de un volumen final de 10 mL. Una vez que este cultivo se encontraba en su fase de crecimiento exponencial, se tomó una alícuota de 2 mL que se transfirió a un volumen total de 18 mL de cada uno de los medios.

e) De tal manera que se fue incrementando el tamaño del cultivo hasta obtener 50 mL.

2.10 Aislamiento y conservación de las Cepas.

Una vez propagados los cultivos se procedió a aislarlos en cajas Petri, los medios empleados en este aislamiento fueron el medio Luria Bertani y el medio 2, más agar bacteriológico (16 g/L). Los medios fueron esterilizados a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos a una presión de 15 lb/plg². Cada uno de los medios estériles se dejó enfriar a 50°C para ser vertidos (25 mL) en condiciones estériles en cada caja de Petri y se dejó solidificar.

Para el aislamiento se hicieron diluciones de los cultivos en solución salina isotónica estéril (8.5 g/L de NaCl). Se realizaron diluciones de 10⁻¹ hasta 10⁻⁵.

La inoculación del cultivo original y de cada una de las diluciones se hizo usando la técnica de extensión en superficie, con 0.1 mL de inóculo. Posteriormente las cajas de Petri se incubaron a 35 °C de forma invertida hasta la aparición de colonias.

Una vez formadas las colonias, éstas se sembraron en tubos inclinados con el fin de preservar las cepas. Para lo cual se emplearon los medios Luria Bertani y el medio 2. Se prepararon los medios con agar (16 g /L) y mientras éstos se encontraban fundidos (50°C) previo a la esterilización, se transfirieron 3 mL de los mismos en tubos con tapa de rosca. Posteriormente fueron esterilizados a una temperatura de 121 °C durante 15 minutos a una presión de 15 lb/plg². Una vez concluida la esterilización, se sacaron los tubos de la autoclave, se dejaron enfriar a temperatura ambiente en posición inclinada, quedando el agar distribuido transversalmente dentro del tubo (figura 10). Posteriormente se sembró por estría cruzada con el asa bacteriológica en la superficie del agar, se cerró el tubo. Se incubaron los tubos a 35°C y en cuanto se observaron colonias se refrigeraron los tubos a 4°C, sellándolos con parafilm.



Figura 10. Tubo inclinado

2.11 Morfología microscópica y tinción de Gram

Una vez obtenidas las colonias en la etapa de aislamiento se procedió a efectuar la tinción de Gram y se observaron en el microscopio óptico.

2.12 Prueba de la actividad de ureasa en los cultivos.

Para evaluar la actividad de la ureasa de los cultivos, se efectuó una resiembra de los mismos en tres los medios (2, LB y medio mineral de Stuart).

Se evaluaron los cultivos provenientes de los aislamientos efectuados en los medios alternos (LB y 2); así como los cultivos mixtos EGO₂ y LO₂.

En la Tabla 7 se detalla el tipo de medio, la clase de cultivo, las concentraciones de urea y glucosa; así como su respectiva C/N.

Tabla 7. Cultivos con diferente relación C/N.

Cultivo	% Urea	% Glucosa	C/N	Medio
Puro	0.5 % U	1.5 %	3	Stuart y col (1945)
	1 % U	1 %	1.29	
Mixto	1%	1%	1.29	
Puro	1%	-	0.45	LB
	2%	-	0.44	
Mixto	1%	-	0.45	LB
	2%	-	0.44	
Puro	1%	1%	1.15	2
	2%	1%	0.61	
Mixto	1 %	1%	1.15	2
	2%	1%	0.61	

Las unidades experimentales fueron botellas serológicas de 60 mL, las cuáles contenían 27 mL de los medios y se les adicionaron 3 mL del inóculo correspondiente.

Para determinar la actividad de la ureasa, se midieron turbidez, proteínas y amonio

2.13 Efecto de la Temperatura en la hidrólisis de la urea de los cultivos.

Se trabajó con los cultivos de enriquecimiento, utilizando el medio Stuart. Los cultivos se sometieron a diferentes temperaturas con el objeto de determinar su energía de activación (Ea). Se efectuaron tres cinéticas por cultivo y en cada una de ellas se probaron 5 temperaturas. Las unidades experimentales fueron botellas serológicas de 60 mL, las que contenían 36 mL de medio y 4 mL de inóculo; el porcentaje de urea fue del 1%. Los ensayos se realizaron por duplicado.

Las temperaturas ensayadas para los cultivos EGO₂ y LO₂ fueron 30°C, 35°C, 37°C, 40°C y 45°C; en el primer enriquecimiento. Para el segundo enriquecimiento la temperatura de 45°C se sustituyó a 42°C en los dos cultivos debido a la poca producción de amonio.

En el caso del cultivo LO₂ se cambió nuevamente la temperatura para el tercer enriquecimiento, ya que con la temperatura a 42 °C no se produjo amonio, por lo cual para el tercer enriquecimiento se trabajaron las temperaturas: 27°C, 30°C, 35°C, 37°C y 40°C. De este experimento se observó que las mayores producciones de amonio se encontraron en el intervalo de 27 a 30 °C por lo que se efectuaron dos cinéticas más con las temperaturas de 22°C. 28°C. 30°C y 35°C.

Adicionalmente se efectuó un control abiótico durante el primer enriquecimiento que consistió en medio con urea sin inóculo, incubado a cada una de las temperaturas mencionadas. Las variables de respuesta para estos ensayos fueron el pH y el amonio medido mediante un electrodo selectivo (Thermo Scientific Orion) (Tabla 8).

Tabla 8. Diseño experimental para evaluar el efecto de la temperatura

Cultivo	Medio	Temperaturas (°C)	Número de enriquecimientos	Variables de respuesta
EGO ₂	Stuart	30, 35, 37, 40, 45* → 42*	3	pH. mg NH ₄ ⁺ /L
LO ₂	2	22, 28, 30, 35, 37 40. 45 → 42* → 27**	3	
LO ₂	Stuart	22, 28, 30, 35, 37 40. 45 → 42* → 27**	2	

2.14 Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de la urea de los cultivos.

Los cultivos enriquecidos se sometieron a diferentes concentraciones de urea que variaron de 0.25 a 2% (tabla 9). El medio que se empleó fue el de Stuart. El cultivo EGO₂ fue incubado a 40°C y el cultivo LO₂ fue incubado a 29°C; las variables de respuesta fueron el pH y el amonio medido mediante un electrodo selectivo (Thermo Scientific Orion). Para ambos cultivos se emplearon dos controles. Todos los ensayos se realizaron por duplicado

Tabla 9. Diseño experimental para evaluar el efecto del sustrato

Cultivo	Medio	Concentración de Urea (%)	Número de enriquecimientos	Variables de respuesta
EGO ₂	Stuart	0.0	2	pH mg NH ₄ ⁺ /L
		0.25		
		0.5		
		0.75		
		1.0		
		1.25		
		1.5		
		1.75		
		2.0		
LO ₂				

2.15 Producción de amonio como respuesta a la hidrólisis de urea en orina humana.

Se esterilizaron por botella serológica 27 mL de una mezcla de orina de 6 voluntarios mediante el uso de un filtro estéril de 0.2µm. Esta orina se colectó en botellas serológicas estériles de 60 mL. Se inocularon con 3 mL de cada uno de los cultivos LO₂ y EGO₂. La orina inoculada con el cultivo LO₂ se incubó a 29°C, y la orina inoculada con el cultivo EGO₂ fue incubada a 40°C.

Para cada cultivo se efectuó un control abiótico que contenían orina estéril, uno de los controles se incubó a 29 °C y el otro a 40°C. Todos los ensayos se realizaron por duplicado y los parámetros a medir fueron pH y la producción de amonio mediante un electrodo selectivo (Thermo Scientific Orion).

3. RESULTADOS Y DISCUSIONES.

3.1 Caracterización fisicoquímica de la orina humana.

En la tabla 10 se presentan algunos de los parámetros analizados en las muestras de orina. Estos resultados son similares en otros estudios.

Tabla 10 . Caracterización Fisicoquímica de una mezcla de orina humana.

Parámetro g/L		Autores	
Obtenido		Reportado	
DQO	8.90 ± 0.10	9.6 – 10	Kuntke 2011
NH₄⁺	0.64 ± 0.02	0.3 a 0.6 L	Liu y col., 2003, 2008, Kuntke 2011
Urea	23.37 ± 1.7	20-25	Koolman y Röhm,2004
pH	6.29 ± 0.38	6.78 a 7.2	Liu y col., 2008; Udert y col., 2003.
Sólidos	ST 0.63 ± 0.06 SV 0.47 ± 0.05 SF 0.17 ± 0.01	ST 1.2 - 3.5 SV 3.25 - 1.05 SF 5.25 – 1.45	Valdez y Vázquez 2003, (aguas residuales municipales).

Los sólidos contenidos en la orina son en comparación con los reportados para aguas residuales municipales de concentración media. Los valores que se muestran en la tabla nos indican que la mayor parte de los sólidos son de origen orgánico o de tipo biológico (bacterias, protozoos) y la menor proporción corresponde a sales inorgánicas (Valdez y Vázquez, 2003).

3.2 Metabolitos producidos de la hidrólisis de la urea en los tres enriquecimientos.

3.2.1 Primer enriquecimiento

En la tabla 11 se presentan los principales resultados obtenidos en esta fase. Se muestra que no hay cambios en la concentración de CO₂ (0.03 M) a las 8 horas de incubación para todos los cultivos, siendo ésta 10 veces menor a la teórica esperada (0.33M). A las 24 horas de incubación no se observó variación de la concentración de CO₂, excepto los cultivos OG, LA y LO₂ en los cuáles no se produjo CO₂. Sin embargo, a las 48 h de incubación con el incremento del pH alrededor de 9 la producción de CO₂ se mantuvo constante. El aumento de pH

podría indicar que la hidrólisis de la urea se está efectuando y que quizá las formas de carbono inorgánicas presentes fueran bicarbonato (HCO_3^-) o carbonato (CO_3^{2-}). La actividad ureolítica se da a pH entre 7 hasta 8.9, obteniéndose como producto final amonio (Liu y col., 2008; Udert y col., 2003). El hecho de que todos los cultivos se comporten de manera similar respecto a la producción de CO_2 , pudiera deberse a que esta especie depende de las condiciones del medio tales como pH y concentración inicial de urea y no con la capacidad ureolítica de los microorganismos.

Los ensayos realizados con estiércol como inóculo presentaron valores de pH entre 9.1 y 9.3 obteniéndose la mayor eficiencia de amonio para el cultivo EA (0.4g NH_4^+ /g Urea). Los cultivos restantes alcanzaron eficiencias desde 0.07 a 0.3 g NH_4^+ /g Urea. En el caso de los cultivos cuyo inóculo fue orina el pH varió entre 7.9-8.9 obteniéndose la mayor eficiencia de amonio 0.2 g NH_4^+ /g Urea a pH= 8.9 para el cultivo OA. El resto de los cultivos provenientes del inóculo orina alcanzaron eficiencias bajas de 0.11 a 0.14 g NH_4^+ /g Urea.

Los ensayos realizados con lodos anaerobios mostraron una alta variación de pH (7.3 – 9.2) a pesar de que se alcanzó un pH de 9.2 las eficiencias de amonio fueron solamente de 0.02 g NH_4^+ /g Urea. Por lo que quizá el tamaño de inóculo no fue el adecuado, o el inóculo no tuvo la capacidad de hidrolizar urea en el medio que tuvieron la orina y el estiércol; reflejando la influencia del nicho ecológico en la respuesta de producción de amonio (tablas 2 y 3).

Tabla 11. Metabolitos producidos de la hidrólisis de la urea en el primer enriquecimiento

Cultivos (35°C)	t (h)	OA	OO ₂	OG	OGO ₂	EA	EO ₂	EG	EGO ₂	LA	LO ₂	LG	LGO ₂
V CO ₂ (mL)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	3.5	3.5	4.0	7.8	3.0	7.0	0.4	10.5	3.7	3.4	6.0	3.3
	24	0.4	0.8	0.0	0.1	1.3	1.6	0.7	0.2	0.0	0.0	2.0	0.1
N CO ₂ =mmoles	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0.107	0.107	0.122	0.238	0.092	0.214	0.012	0.321	0.113	0.104	0.183	0.101
	24	0.012	0.024	0.000	0.003	0.040	0.049	0.021	0.006	0	0	0.061	0.002
n/v CO ₂ = M (mol/L)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	8	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031
	24	0.031	0.031	0.000	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0	0	0.031	0.031
pH	0	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9	6.9
	24	7.1	7.3	7.1	7.0	8.3	7.3	7.9	7.1	6.9	6.9	6.8	6.9
	48	8.9	8.6	8.8	7.9	9.2	9.2	9.3	9.1	9.2	8.7	9.1	7.3
g NH ₄ ⁺ /L	24	0.6	0.8	0.4	0.3	0.8	0.6	1.9	0.6	0.0	0.0	0.0	0.0
	48	2.4	1.6	1.7	1.3	4.8	3.6	1.3	0.8	0.3	0.3	0.2	0.3
Eficiencia (g NH ₄ ⁺ /g Urea)	48	0.20	0.13	0.14	0.11	0.40	0.30	0.11	0.07	0.02	0.02	0.02	0.02

3.2.2 Segundo enriquecimiento

En la tabla 12 se muestran los resultados obtenidos a las 16 horas de incubación del segundo enriquecimiento. Se muestra el comportamiento de pH, la producción de amonio y CO_2 , como respuesta de la hidrólisis de la urea.

En este enriquecimiento se observa que a valores de pH cercanos a la neutralidad, hay una escasa producción de amonio, exceptuando el cultivo OGO_2 que produjo alrededor de $0.4 \text{ g NH}_4^+/\text{L}$ valor que podría deberse a un error experimental respecto al método de determinación de amonio, ya que son las mismas condiciones de cultivo para todos los ensayos. A pH alrededor de 9 se obtuvieron los valores de mayor producción de amonio en los cultivos procedentes del estiércol como inóculo, seguidos de los relativos al lodo granular. En el cultivo EA se determinaron $3.2 \text{ g NH}_4^+/\text{L}$. Se ha reportado que el pH óptimo para la enzima ureasa de la semilla de *Canavalia ensiformis* (jack bean) es de 7.1 a 25°C (Fidaleo y Lavecchia. 2003); mientras que para especies microbianas como *Yersinia enterocolitica* el pH óptimo reportado es de 5.5 a 65°C (Bhagat y Viridi.2009). Otros investigadores como Mobley y Hausinger (1989) proponen que el pH óptimo de poblaciones del líquido ruminal es de 8. Bacterias como *Sporosarcina ureae* tienen un pH óptimo de 8.5 entre los 15 y 37°C (Tablas 2 y 3).

Tabla 12. Indicadores fisiológicos de la hidrólisis de la urea a las 16 horas de incubación para el segundo enriquecimiento

Cultivos	OA	OO ₂	OG	OGO ₂	EA	EO ₂	EG	EGO ₂	LA	LO ₂	LG	LGO ₂
V CO ₂ (mL)	7.1	9.2	0.1	10.1	3.7	5.4	0.0	4.1	2.4	0.0	1.3	4.1
n CO ₂ = mmoles	0.217	0.281	0.003	0.309	0.113	0.165	0.000	0.125	0.073	0.000	0.040	0.125
n/v CO ₂ = M (mol/L)	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.000	0.031	0	0	0.031	0.031
pH	7.1	7.1	7.0	7.0	9.4	9.4	9.3	9.4	9.2	9.3	9.3	7.1
g NH ₄ ⁺ /L	0.1	0.4	0.4	4.8	3.2	2.7	2.5	2.3	1.1	1.2	1.3	0.2
Eficiencia (gNH ₄ ⁺ /gUrea)	0.01	0.03	0.03	0.4	0.27	0.22	0.21	0.19	0.09	0.10	0.10	0.02

3.2.3 Metabolitos producidos de la hidrólisis de la urea en el tercer enriquecimiento.

Para este enriquecimiento se trabajó con una concentración de glucosa de 2 g/L y 1.5% de Urea.

En la tabla 13 se muestra la producción de CO_2 durante las primeras 3.5 h de hidrólisis a pH alrededor de 7, para todos los cultivos. Como puede observarse a pesar de que se produzcan distintos volúmenes de CO_2 , la concentración se conserva, siendo 10 veces menor a la teórica esperada; resultado coincidente con

el primer enriquecimiento. Por tanto el CO_2 que se forma establece equilibrios en formas de bicarbonatos ya que el pKa de estos es de 6.36 (Vega E y col., 2003, anexo 1).

Tabla 13. Producción de CO_2 en los cultivos en el tercer enriquecimiento

Cultivos	OA	OO ₂	OG	OGO ₂	EA	EO ₂	EG	EGO ₂	LA	LO ₂	LG	LGO ₂
V CO ₂ (mL)	1.3	3.9	2.2	3.7	11.0	4.0	2.5	3.6	14.0	18.0	2.2	17.0
n/v CO ₂ = M (mol/L)	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031	0.031

3.2.3.1. Metabolitos producidos de la hidrólisis de urea en los cultivos con orina del tercer enriquecimiento.

En la tabla 14 se muestran los valores obtenidos de producción de amonio y pH para la cinética con orina, así como las eficiencias obtenidas y en la figura 11 se muestran los perfiles de pH y amonio.

Tabla 14. Producción de amonio y pH a las 85 horas de incubación del tercer enriquecimiento con orina como inóculo

Cultivos	OA	OO ₂	OG	OGO ₂
pH	7.3	8.0	8.0	7.6
g NH ₄ ⁺ /L	1.0	2.3	2.0	2.3
Eficiencia (g NH ₄ ⁺ /g Urea)	0.11	0.25	0.22	0.25

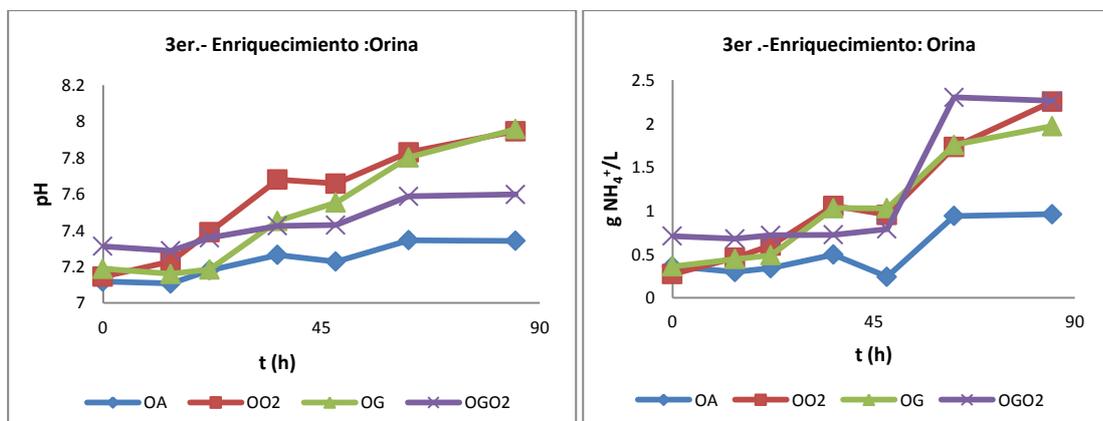


Figura 11. Perfiles de pH y amonio del tercer enriquecimiento con orina como inóculo

Tabla 15. Resumen de resultados de los tres enriquecimientos con orina como inóculo

PRIMER ENRIQUECIMIENTO (48 h de hidrólisis)				
Parámetro	OA	OO ₂	OG	OGO ₂
pH	8.9	8.6	8.8	7.9
g NH ₄ ⁺ /L	2.4	1.6	1.7	1.3
Eficiencia g NH ₄ ⁺ /g Urea	0.20	0.13	0.14	0.11
SEGUNDO ENRIQUECIMIENTO (16 h de hidrólisis)				
pH	7.1	7.1	7.0	7.0
g NH ₄ ⁺ /L	0.1	0.4	0.4	4.8
Eficiencia g NH ₄ ⁺ /g Urea	0.01	0.03	0.03	0.4
TERCER ENRIQUECIMIENTO (85 h de hidrólisis)				
pH	7.3	8.0	8.0	7.6
g NH ₄ ⁺ /L	1.0	2.3	2.0	2.3
Eficiencia g NH ₄ ⁺ /g Urea	0.11	0.25	0.22	0.25

Como se observa en la tabla 15, las mayores eficiencias se obtuvieron en el tercer enriquecimiento, a valores de pH comprendidos entre 7.3 y 8.0; alcanzando concentraciones de 2.3 g NH₄⁺/L para los cultivos OO₂ y OGO₂, y eficiencias de 0.25 gNH₄⁺/gUrea, exceptuando el ensayo OA. Los valores de pH comprendidos entre 7.3 y 8 están próximos a valores de pH reportados como óptimos para diversos géneros: *Mycoplasma*, *Peptostreptococcus* y *Helicobacter* (Tablas 3 y 4). En otros estudios se ha reportado que a valores superiores a pH 8.9 la actividad de la ureasa es muy baja, y que se han logrado producir de 5.5 a 6 g de NH₄⁺/L, reportando eficiencias hidrolíticas del 85 al 95 % utilizando agentes precipitantes (Liu Z., y col. 2008).

Hay una disminución en la producción de amonio durante el segundo enriquecimiento, que se explica por el menor tiempo de hidrólisis y porque el pH cercano a la neutralidad no favorece la hidrólisis de urea para este inóculo; ya que algunas ureasas presentan mayor actividad ureásica en el intervalo de pH de 7.5 – 8.5 (tablas 2 y 3).

3.2.3.2. Metabolitos producidos de la hidrólisis de urea en los cultivos con estiércol del tercer enriquecimiento.

En la tabla 16 se muestran los valores obtenidos de producción de amonio y pH para la cinética con estiércol a 52 horas de incubación, así mismo se muestran también las eficiencias obtenidas en este tercer enriquecimiento. En la figura 12 se muestran los perfiles de pH y amonio.

Tabla 16. Producción de amonio y pH a las 52 horas de incubación en el tercer enriquecimiento con estiércol como inóculo

Cultivos	EA	EO ₂	EG	EGO ₂
pH	8.3	9.2	8.3	9.1
g NH ₄ ⁺ /L	6.9	5.8	6.2	5.9
Eficiencia (g NH ₄ ⁺ /g Urea)	0.76	0.64	0.69	0.66

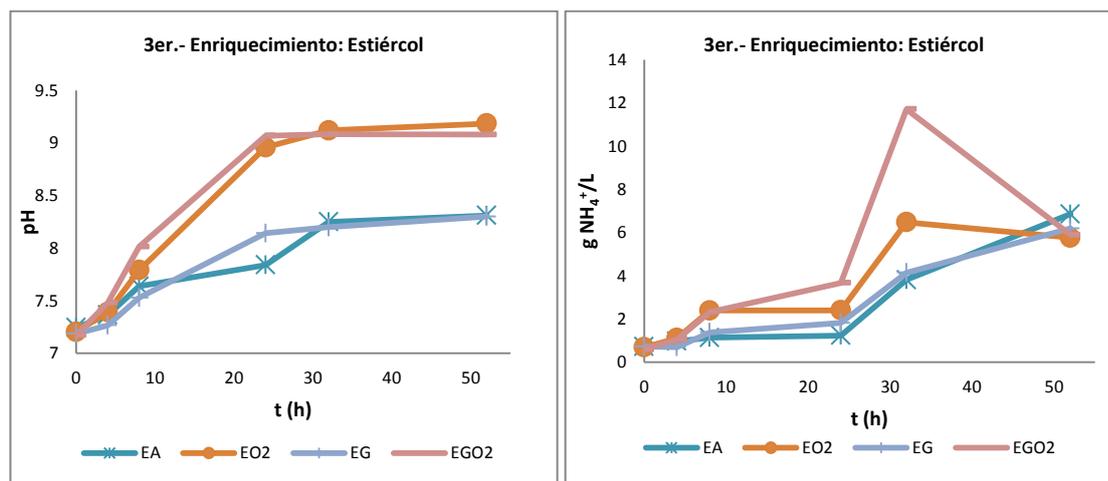


Figura 12. Perfiles de pH y amonio de un tercer enriquecimiento de estiércol como inóculo.

Como se observa en la figura 12 el pH alcanza su valor máximo después de las 24 horas de incubación, siendo este de aproximadamente 8 para los cultivos EA y EG y de 9 para los cultivos EO₂ y EGO₂. Por otro lado la producción de amonio rondó entre 5.8 y 6.9 para todos los tratamientos a las 52 horas.

Tabla 17. Resumen de resultados de los tres enriquecimientos con estiércol como inóculo

PRIMER ENRIQUECIMIENTO (48h de hidrólisis)				
Parámetro	EA	EO ₂	EG	EGO ₂
pH	9.2	9.2	9.3	9.1
g NH ₄ ⁺ /L	4.8	3.6	1.3	0.8
Eficiencia g NH ₄ ⁺ /g Urea	0.40	0.30	0.11	0.07
SEGUNDO ENRIQUECIMIENTO (16 h de hidrólisis)				
pH	9.4	9.4	9.3	9.4
g NH ₄ ⁺ /L	3.2	2.7	2.5	2.3
Eficiencia g NH ₄ ⁺ /g Urea	0.27	0.22	0.21	0.19
TERCER ENRIQUECIMIENTO (85h de hidrólisis)				
pH	8.3	9.2	8.3	9.1
g NH ₄ ⁺ /L	6.9	5.8	6.2	5.9
Eficiencia g NH ₄ ⁺ /g Urea	0.76	0.64	0.69	0.66

En la tabla 17 nuevamente se muestra que las mayores eficiencias se dan durante el tercer enriquecimiento, a valores de pH cercanos a 8 coincidiendo con lo reportado para bacterias del género *Sporosarcina* de amplia distribución en el estiércol (Ver tabla 2). La eficiencia $\text{g NH}_4^+/\text{g Urea}$, alcanzó valores superiores a 0.6 con excepción del cultivo EA cuya eficiencia fue de 0.76. La mejora de las eficiencias del tercer enriquecimiento quizá se explique por la disminución de urea (2 a 1.5%), brindando mayor disponibilidad a los microorganismos presentes para hidrolizarla, pero también se debe a la selección de microorganismos y aumento de la capacidad hidrolítica al forzar por tercera vez a los microorganismos presentes a hidrolizar la urea del medio (Cesatti y col., 2012).

En los enriquecimientos primero y segundo las eficiencias son menores porque el pH al irse incrementando a valores superiores a 9 disminuye la actividad enzimática.

3.2.3.3. Metabolitos de la hidrólisis de urea en un tercer enriquecimiento con lodos granulares como inóculo

En la tabla 18 se muestran los valores obtenidos de producción de amonio y pH para la cinética de los cultivos con lodos granulares como inóculo, se muestran también las eficiencias obtenidas en este tercer enriquecimiento. En la figura 13 se muestran los perfiles de pH y amonio.

Tabla 18. Producción de amonio y pH a las 24 horas de incubación en el tercer enriquecimiento con lodos como inóculo.

Cultivos	LA	LO ₂	LG	LGO ₂
pH	9.0	8.2	9.2	8.9
$\text{g NH}_4^+/\text{L}$	4.7	2.0	6.1	4.2
Eficiencia ($\text{g NH}_4^+/\text{g Urea}$)	0.52	0.23	0.68	0.46

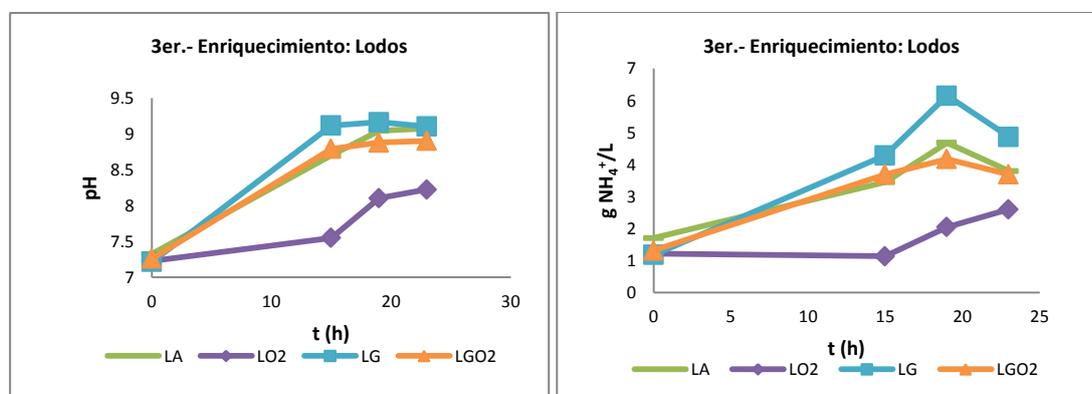


Figura 13. Perfiles de pH y amonio de un tercer enriquecimiento de lodo granular como inóculo.

Para el caso de los tratamientos LA, LG y LGO₂ se alcanzó el valor máximo de pH a las 15 horas de incubación oscilando entre 8.9 a 9.1; mientras que en el caso de LO₂ este alcanzó su valor máximo a las 23 horas de incubación, y fue de 8.2 (figura 13).

La producción de amonio está entre 2.0 hasta 6.1 g NH₄⁺/L. Obteniéndose la mayor concentración de ión amonio (figura 13) ocurrió a la hora 19 de hidrólisis, para los arreglos anóxicos: Lodo anóxico (LA) y Lodo con Glucosa (LG), a un pH alrededor de 9.0 en cada caso. Los cultivos con lodo produjeron menos amonio que los cultivos con estiércol (EO₂ y EGO₂), sin embargo el tiempo de hidrólisis es menor, llevándose a cabo más rápidamente.

Tabla 19. Resumen de resultados de los tres enriquecimientos con lodo granular como inóculo

PRIMER ENRIQUECIMIENTO (48 h de hidrólisis)				
Parámetro	LA	LO ₂	LG	LGO ₂
pH	9.2	8.7	9.1	7.3
g NH ₄ ⁺ /L	0.3	0.3	0.2	0.3
Eficiencia g NH ₄ ⁺ /g Urea	0.02	0.02	0.02	0.02
SEGUNDO ENRIQUECIMIENTO (16 h de hidrólisis)				
pH	9.2	9.3	9.3	7.1
g NH ₄ ⁺ /L	1.1	1.2	1.3	0.2
Eficiencia g NH ₄ ⁺ /g Urea	0.09	0.10	0.10	0.02
TERCER ENRIQUECIMIENTO (24 h de hidrólisis)				
pH	9.0	8.2	9.2	8.9
g NH ₄ ⁺ /L	4.7	2.0	6.1	4.2
Eficiencia g NH ₄ ⁺ /g Urea	0.52	0.23	0.68	0.46

En el caso de los lodos (tabla 19), las eficiencias se favorecieron en el tercer enriquecimiento como consecuencia de la composición del medio y haber forzado al microorganismo por tercera vez a hidrolizar la urea. El pH en el intervalo 8.2 a 9.2 resultó el más favorable, sin embargo debe dilucidarse el pH óptimo de cada uno de los inóculos. Esta reportado que la bacteria *Sporosarcina Ureae* es notablemente tolerante al medio alcalino y se desarrollará en medios cuyos valores de pH sean de 10 hasta 11 (Brock y Madigan, 1991).

3.3 Estimación de amonio libre formado durante el enriquecimiento en los tres enriquecimientos.

Para llevar a cabo el balance de amonio en los cultivos se consideraron los balances teóricos de la hidrólisis de la urea (anexo 1) y se usó la ecuación 10 propuesta por Anthonisen y col. (1976). De acuerdo a esta ecuación es posible estimar la concentración de amonio libre (NH₃) formado, conociendo la concentración inicial de amoníaco, el pH y la temperatura del ensayo.

$$C_{NH_3} = \frac{C_{NH_4}}{\frac{6334}{e^{273+T}} + 10^{pH} + 1} \quad \text{Ecuación 10}$$

Es importante estimar la cantidad de amoníaco ya que está involucrado en mecanismos de inhibición modificando el pH intracelular, incrementando los requerimientos de energía de mantenimiento; además de la inhibición de reacciones enzimáticas específicas. Por otro lado el amoníaco al ser una molécula hidrofóbica, puede difundir pasivamente en la célula causando deficiencia de desequilibrio de protones, y/o potasio. Entre los cuatro tipos de microorganismos anaeróbicos, los metanogénos son los menos tolerantes al amoníaco. Para concentraciones de 4051 – 5734 mg NH₃-N/L, las poblaciones metanogénicas de lodos granulares pierden el 56,5% de actividad (Chen Y y col. 2008).

En el primero y en el segundo enriquecimiento la concentración de urea fue del 2% y se debieron obtener 11.99 g NH₄⁺/L. Para el tercer enriquecimiento la concentración inicial de urea fue del 1.5% y la cantidad de amonio que se debió obtener fue de 9 g NH₄⁺/L. Con lo anterior se calculó la cantidad teórica de amoníaco libre formado a distintos valores de pH a 35°C (tabla 20).

Tabla 20. Estimación teórica de amoníaco a 35°C.

pH	g NH ₄ ⁺ /L	g NH ₃ /L
7.0	9.0	0.104
7.5	9.0	0.322
8.0	9.0	0.944
8.5	9.0	2.433
9.2	9.0	5.850
9.5	9.0	7.087
7.0	11.99	0.139
7.5	11.99	0.428
8.0	11.99	1.257
8.5	11.99	3.241
9.2	11.99	7.793
9.5	11.99	9.442

En la tabla 21 se muestran los valores experimentales obtenidos de amonio, así como los valores estimados de amoníaco.

Tabla 21. Amonio y amoníaco producidos durante los tres enriquecimientos.

Cultivos	Primer enriquecimiento		Segundo enriquecimiento		Tercer enriquecimiento	
	g NH ₄ ⁺ /L	g NH ₃ /L	g NH ₄ ⁺ /L	g NH ₃ /L	g NH ₄ ⁺ /L	g NH ₃ /L
OA	2.443	1.112	0.112	0.002	1.0	0.025
OO₂	1.596	0.526	0.388	0.006	2.3	0.221
OG	1.687	0.762	0.417	0.005	2.0	0.194
OGO₂	1.342	0.124	4.778	0.055	2.3	0.102
EA	4.834	3.232	3.221	2.406	6.9	4.485
EO₂	3.649	2.360	2.684	2.000	5.8	3.770
EG	1.287	0.886	2.491	1.702	6.2	3.695
EGO₂	0.788	0.486	2.291	1.674	5.9	3.516
LA	0.265	0.172	1.106	0.743	4.7	2.536
LO₂	0.277	0.108	1.193	0.843	2.0	0.313
LG	0.188	0.111	1.256	0.894	6.1	3.965
LGO₂	0.258	0.006	0.247	0.003	4.2	2.025

En la tabla 22 se calculó la concentración de amonio ajustada (ecuación 11), y posteriormente la cantidad de amoníaco correspondiente a dicho ajuste.

$$C_{NH_4^+ \text{ ajustada}} = C_{NH_4^+ \text{ teórica}} - C_{NH_4^+ \text{ experimental}} \quad \text{Ecuación 11}$$

Tabla 22. Ajuste de especies amonio – amoníaco.

Tratamientos	Primer enriquecimiento		Segundo enriquecimiento		Tercer enriquecimiento	
	g NH ₄ ⁺ /L	g NH ₃ /L	g NH ₄ ⁺ /L	g NH ₃ /L	g NH ₄ ⁺ /L	g NH ₃ /L
OA	9.547	4.345	11.878	0.168	8.0	0.201
OO₂	10.394	3.426	11.602	0.184	6.7	0.644
OG	10.303	4.654	11.573	0.142	7.0	0.679
OGO₂	10.648	0.982	7.212	0.083	6.7	0.297
EA	7.156	4.785	8.769	6.549	2.1	1.365
EO₂	8.341	5.395	9.306	6.934	3.2	2.080
EG	10.703	7.371	9.499	6.490	2.8	1.669
EGO₂	11.202	6.904	9.699	7.088	3.1	1.847
LA	11.725	7.639	10.884	7.316	4.3	2.320
LO₂	11.713	4.581	10.797	7.630	7.0	1.096
LG	11.802	6.948	10.734	7.641	2.9	1.885
LGO₂	11.732	0.261	11.743	0.162	4.8	2.314

Como se observa en todos los cultivos durante los tres enriquecimientos la producción de amonio en equilibrio con amoníaco está por debajo de los valores teóricos esperados. Sin embargo los valores de pH que se obtuvieron en los enriquecimientos son indicativos de la producción de amonio que resulta no ser coincidente con las mediciones efectuadas, esto indica que el método de determinación de amonio empleado durante los tres enriquecimientos no representa la producción real de amonio.

Otro factor a considerarse en estos valores tan bajos de amonio es una inhibición de la ureasa por fosfatos presentes en el medio de cultivo tal como sugiere Bachan (2012).

3.4 Aislamiento

A partir del tercer enriquecimiento se realizaron aislamientos en condiciones aerobias, obteniéndose colonias positivas a la actividad ureásica provenientes de los cultivos EGO₂ y LO₂ (Figura 14). En la tabla 23 se muestran algunas características, así como su inóculo y tratamiento correspondiente.

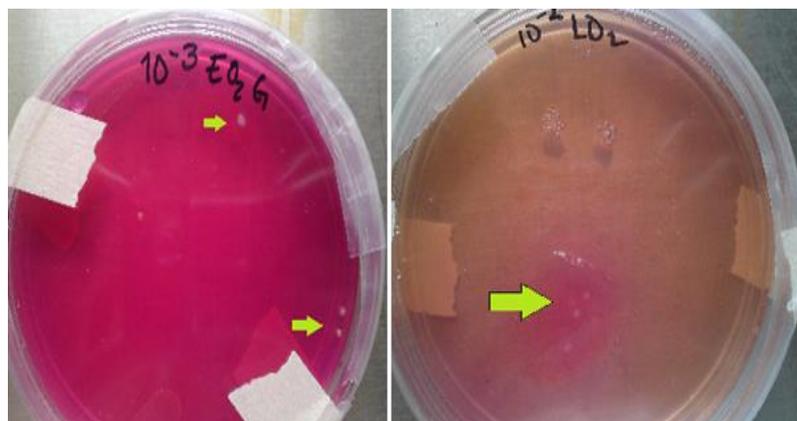


Figura 14. Colonias de bacterias que hidrolizan urea en condiciones aerobias

Tabla 23. Características morfológicas de las colonias bacterianas aisladas en condiciones aeróbicas

Cultivo	Tamaño	Color	Elevación	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Tiempo de aparición
EG O ₂ 10 ⁻³	2 mm	Amarillento-blanquecino	media	Circular irregular	Bacilos Cocobacilos	20 días
LO ₂ 10 ⁻²	1.8 mm	Rosado-blanquecino	media	Circular	Bacilos móviles	20 días

El tiempo prolongado de aparición de las colonias probablemente se debió a la poca disponibilidad la fuente de carbono (1.5 g/L) en el medio para formar biomasa.

En el caso del aislamiento de microorganismos anaerobios fue posible observar colonias del cultivo EA cuyo factor de dilución fue 10⁻¹, pero no fue factible que se continuara con el aislamiento y la propagación, debido al bajo crecimiento presentado. Este aislamiento se efectuó del tercer enriquecimiento.

3.5 Propagación de las cepas aisladas

Se puede observar que los cultivos aislados del lodo granular (figuras 15 y 16) presentan una fase exponencial de crecimiento más rápida (aproximadamente 4 veces) y con mayor concentración de biomasa en comparación con los cultivos aislados del estiércol (figura 17), probablemente debido a las diferencias entre cada especie bacteriana.

Se observa que para el caso del lodo la máxima absorbancia (0.45) se determinó en 6 horas, mientras que para el caso del estiércol la máxima absorbancia (0.25) se obtuvo en 19 horas. En ambos casos no hubo cambios importantes al variar el medio de cultivo.

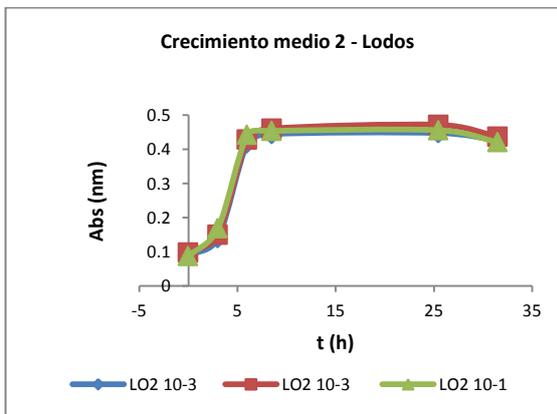


Figura 15. Crecimiento de colonias LO2 10-1 y LO2 10-3 (medio 2)

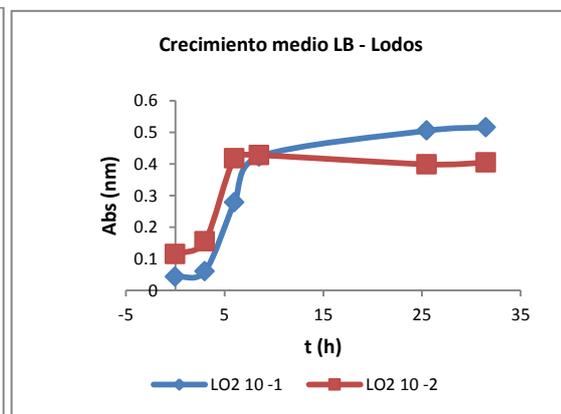


Figura 16. Crecimiento obtenido de colonias LO₂ 10⁻¹ y LO₂ 10⁻² (medio Luria Bertani).

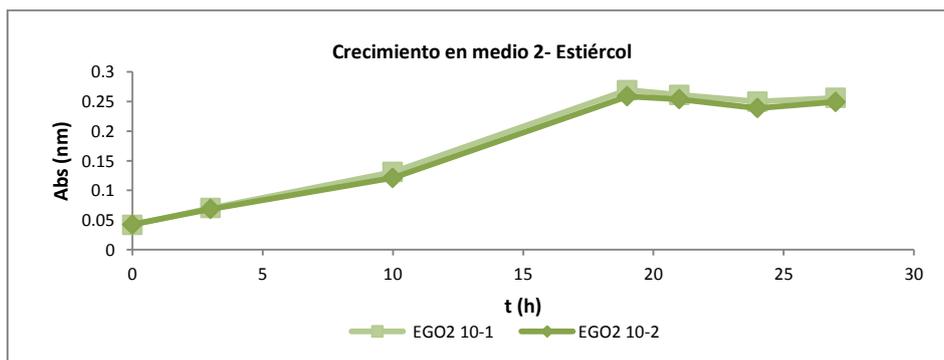


Figura 17. Crecimiento de colonias EGO₂ 10⁻¹ y EGO₂ 10⁻² (medio 2).

3.5 .1 Características macroscópicas y microscópicas de los cultivos aislados.

La tabla 24 presenta la morfología colonial y microscópica de los cultivos aislados del lodo granular presentaron características muy similares, que fueron cocos Gram +, formando colonias blanquecinas, probablemente debido a que se trate de un mismo género bacteriano.

Sin embargo el cultivo proveniente del estiércol de vaca es diferente tanto en su morfología macroscópica como microscópica.

Dentro de los grupos de cocos Gram + bacterianos se encuentran los géneros: *Clostridium*, *Sarcina* y *Streptococcus*. Las bacterias de género *Sarcina* se pueden aislar del suelo, lodo, heces y contenido estomacal. El género *Streptococcus* tiene la tendencia a formar cadenas de cocos y son fácilmente aislables de vías respiratorias, así como de productos lácteos (Brock y Madigan, 1991).

El género *Sporosarcina* forma cocos esféricos Gram +; *S. ureae* se puede enriquecer con facilidad a partir de la tierra ya que es común en suelos que reciben orina. Los *Micoplasmas* parecen estar fuera de las bacterias Gram +, ya que carecen de paredes celulares, por lo que no dan respuesta positiva a la Tinción de Gram, aunque filogenéticamente correspondan a las bacterias Gram +, los *Micoplasmas* poseen lipoglucanos que se asemejan a los lipopolisacáridos de las bacterias Gram - (Brock y Madigan, 1991). También es sabido que las bacterias del género *Ruminococcus* pueden ser Gram + o Gram - lo cual no causaría contradicción con lo obtenido para el cultivo EGO₂.

Tabla 24. Características de las bacterias aisladas

Cultivo	Medio	Tamaño	Color	Elevación	Morfología macroscópica	Morfología microscópica	Tinción Gram.	t aparición (h)
EGO ₂ 10 ⁻²	2	0.6 mm	Amarillento-blanquecino	media	Circular irregular	Estreptococos Formando cadenas	Gram + y Gram - Gram variable	48
LO ₂ 10 ⁻²	2	0.8mm	Blanquecino	media	Circular	Cocos y diplococos	Gram +	48
LO ₂ 10 ⁻³	LB	2 mm	Blanquecino	media	Circular	Cocos en pares y agrupados	Gram +	24 - 48

3.6 Pruebas de la actividad ureásica en los cultivos puros y mixtos

Se determinó la actividad ureásica de los cultivos puros LO₂ y EGO₂, en el medio Stuart con una concentración de urea de 0.5% y glucosa de 1.5 % resultando una C/N de 3 (Tabla 25). La variable de respuesta de esta prueba fue la producción de amonio, la cual fue determinada por medio de un electrodo selectivo.

El tiempo de hidrólisis fue de 120 h, el pH se mantuvo sin cambios (6.4 - 6.8) por lo que no hubo actividad enzimática; la temperatura de hidrólisis fue de

35°C. Las eficiencias de amonio expresadas como (g NH₄⁺/g Urea) obtenidas de los cultivos puros fueron de muy bajos valores.

Tabla 25. Producción de amonio de los cultivos puros durante 120 h de incubación. Relación C/N = 3

Urea 0.5%		mg NH ₄ ⁺ /L			
Medio	Cultivos puros	Inicial	Final	Producido	Eficiencia gNH ₄ ⁺ / g Urea
Stuart	LO ₂ 10 ⁻¹	195.93 ± 1.31	286.74 ± 43.46	90.80	0.03
	LO ₂ 10 ⁻³	243.53 ± 0.65	361.83 ± 48.36	118.30	0.04
	EGO ₂ 10 ⁻¹	227.13 ± 5.55	340.69 ± 22.06	113.56	0.03
	EGO ₂ 10 ⁻²	249.77 ± 12.74	317.01 ± 81.04	67.24	0.02
	LO ₂ 10 ⁻¹	207.72 ± 29.74	344.96 ± 27.77	137.25	0.05
	LO ₂ 10 ⁻²	227.70 ± 5.39	248.84 ± 17.65	21.14	0.01

En la tabla 26 se muestran los resultados obtenidos bajo las siguientes condiciones: 1% de Urea y 1% de glucosa resultando en una C/N = 1.3; 65 h de hidrólisis, T de 35°C, pH de 6.8. No se observó hidrólisis de urea ya que las eficiencias de amonio fueron muy bajas y no hubo aumento en el pH. Sin embargo a menor concentración de urea (tabla 25) se lograron ver eficiencias mayores. Los cultivos LO₂ 10⁻¹ y 10⁻³ en el medio Stuart presentaron las mayores eficiencias (0.006). Es probable que para estos cultivos la enzima no se induzca por las cantidades de sustrato aquí manejadas.

Tabla 26. Producción de amonio de cultivos puros durante 120 h de incubación. Inóculos. Relación C/N = 1.3.

UREA 1%		mg NH ₄ ⁺ /L			
Medio	Cultivos puros	Inicial	Final	Producido	Eficiencia gNH ₄ ⁺ / g Urea
Stuart	LO ₂ 10 ⁻¹	163.59 ± 37.25	199.63 ± 22.87	36.04	0.006
	LO ₂ 10 ⁻³	170.44 ± 30.87	204.94 ± 11.44	34.50	0.006
	EGO ₂ 10 ⁻²	159.66 ± 34.31	184.84 ± 13.07	25.18	0.004
	LO ₂ 10 ⁻¹	125.46 ± 19.28	132.82 ± 33.50	7.36	0.001
	LO ₂ 10 ⁻²	208.86 ± 1.65	240.53 ± 53.26	31.67	0.005

Es importante señalar que al inicio de las pruebas se detectó amonio, el cuál puede provenir del inóculo.

Según lo reportado por Mobley y col. (1995), especies como *Klebsiella aerogenes* no sintetizan la ureasa cuando se les crece en medios ricos en

nitrógeno; como es el caso de los medios empleados que contienen extracto de levadura (2 y LB) y Triptona (LB), estos investigadores reportan que la ureasa es sintetizada cuando los microorganismos crecen en medios mínimos. Esta misma afirmación la hacen Pérez y col. (2007), que mediante el uso de bacterias como *Proteus mirabilis*, han logrado hidrolizar el nitrógeno orgánico presente en efluentes contaminados con urea, con eficiencias superiores al 90 % al cabo de 5 días a un pH de 6.8. Además refieren que *Proteus Mirabilis* degrada en mayor magnitud el nitrógeno orgánico respecto a *Klebsiella pneumoniae*.

La actividad enzimática de los cultivos mixtos enriquecidos en el medio Stuart se presenta en la Tabla 27. Las concentraciones de urea y glucosa fueron del 1%. Las altas eficiencias de hidrólisis que presentan los cultivos mixtos, pueden estar relacionadas con el medio de cultivo (C/N = 1.3) en medio Stuart, o por las relaciones de simbiosis existente entre cada especie del cultivo; en las que los intermediarios del metabolismo de ciertas especies sean sustrato para otras especies. O quizá en un cultivo mixto haya más tipos de ureasas bacterianas lo cual esté relacionado con la eficiencia de hidrólisis (tablas 2 y 3).

Tabla 27. Producción de amonio de los cultivos enriquecidos durante 120 horas de incubación. Relación C/N = 1.3

UREA 1%	mg NH ₄ ⁺ /L				
	Medio de Cultivos	Inicial	Final	Producido	Eficiencia gNH ₄ ⁺ /g Urea
Stuart	L	504.62	5526.80	5022.18	0.84
	LG	582.42	4720.43	4138.01	0.69
	LO ₂	446.16	2454.94	2008.78	0.33
	LO ₂ G	415.90	1981.28	1565.39	0.26
	EGO ₂	479.44	5849.70	5370.26	0.90

Los cultivos mixtos provenientes de los inóculos EGO₂ y L son los que presentan mayor respuesta hidrolítica, con eficiencias de 0.9 y 0.84 respectivamente.

3.7 Efecto de la temperatura sobre la hidrólisis de urea

Con la finalidad de determinar si la temperatura influye sobre la hidrólisis de urea bajo condiciones abióticas, se realizó un ensayo preliminar de controles abióticos en los medios 2 y Stuart. Los resultados obtenidos no mostraron una actividad ureásica a las temperaturas ensayadas: 28°C, 30°C, 35°C, 37°C, 40°C, 42°C y 45°C en los medios Stuart y 2.

3.7.1 Efecto de la temperatura en la hidrólisis de urea para el cultivo EGO₂ en medio Stuart.

Los perfiles de pH y producción de amonio de los tres enriquecimientos se muestran en las figuras 18 a 20.

En la figura 18 se observa una fase de latencia de 40 horas debido al cambio de condiciones para el cultivo EGO₂. Los resultados obtenidos muestran que el pH vario entre 6.8 y 8.3 para las temperaturas inferiores a 45 °C, sin embargo a 45°C no se observa cambio en el pH. Un comportamiento similar se observa para el caso del amonio producido, dónde se registraron valores entre 1075 – 1695 gNH₄⁺/L para las temperaturas inferiores a 45 °C, y en ésta última no se produjo amonio.

En las figuras 19 y 20 se observan los perfiles de hidrólisis de urea, para el segundo y tercer enriquecimiento respectivamente. Es notoria la disminución de la fase de latencia así como un aumento en la producción de amonio (figura 19), alrededor de las 120 h de hidrólisis.

Las mayores producciones de amonio se obtienen a 42°C y 40°C en los dos últimos enriquecimientos, que fueron de 4000 y 2000 mg NH₄⁺/L para segundo y tercer enriquecimiento respectivamente.

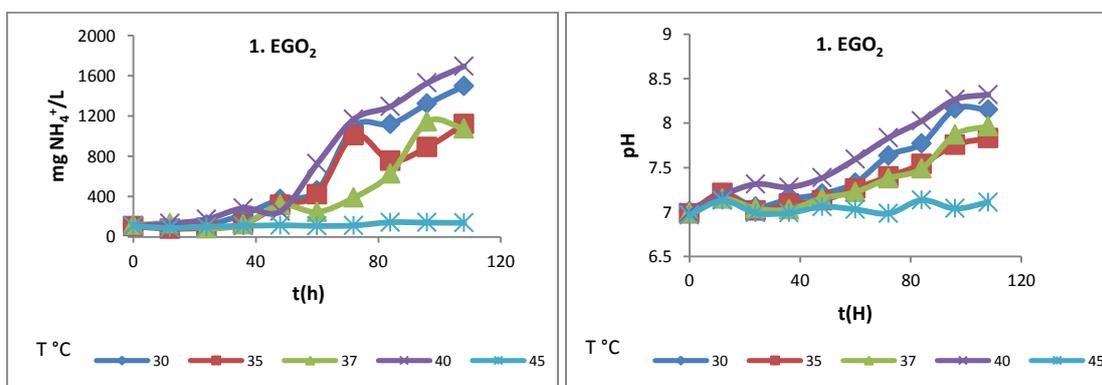


Figura 18. Perfil de pH y producción de amonio del primer enriquecimiento del cultivo EGO₂.

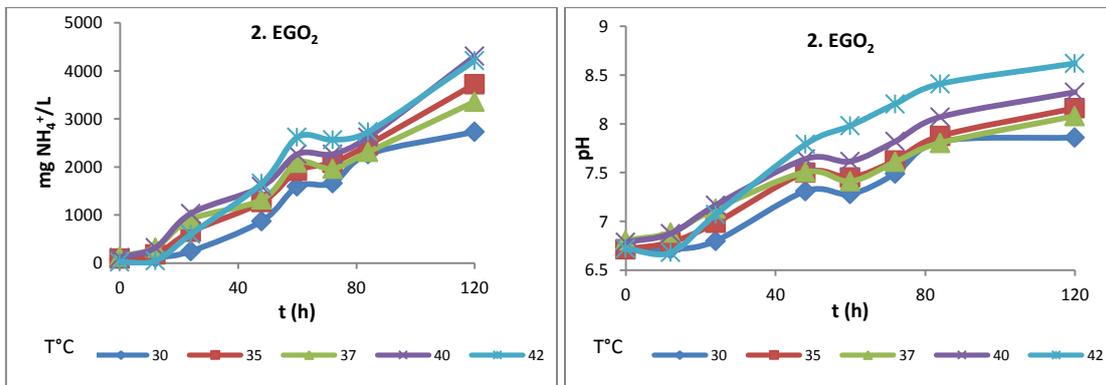


Figura 19. Perfil de pH y producción de amonio en un segundo enriquecimiento con el cultivo EGO₂.

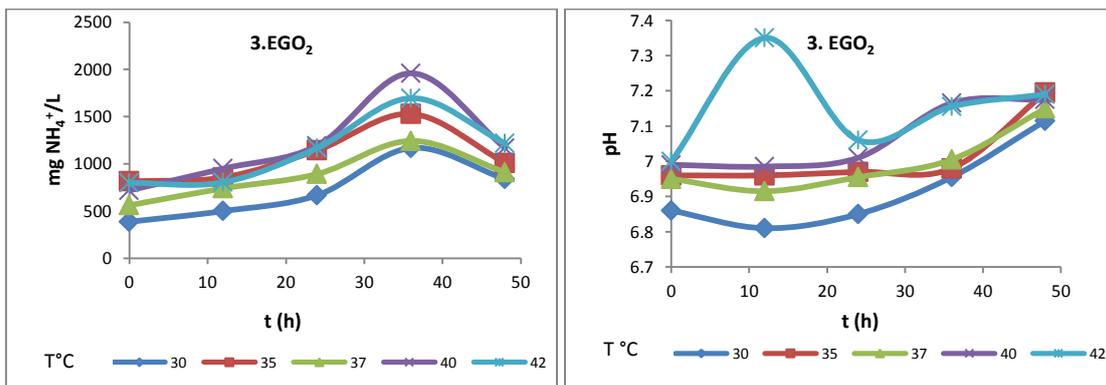


Figura 20. Perfil de pH y producción de amonio en un tercer enriquecimiento con el cultivo EGO₂.

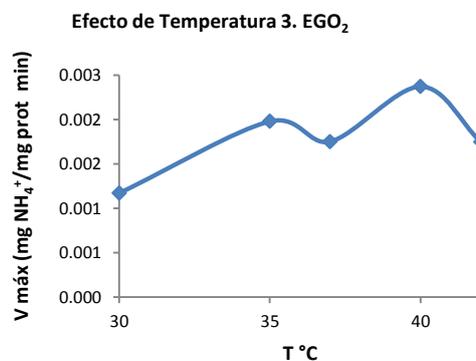


Figura 21. Temperatura óptima del cultivo EGO₂, en medio Stuart

En la figura 21 se muestra que la temperatura en la que se alcanza la máxima velocidad de producción de amonio fue alrededor de los 40°C para el cultivo EGO₂ y fue de $2,37 \times 10^{-3}$ mg NH₄⁺/mg proteína min. Esta temperatura resultó óptima en los tres enriquecimientos (anexo 2), bacterias del género *Ruminococcus* tienen una temperatura óptima de crecimiento a los 40°C (Tabla 3).

3.7.2 Efecto de temperatura en la hidrólisis de urea para el cultivo LO₂ en medio 2.

Para analizar el comportamiento de la actividad ureolítica a diferentes temperaturas en los cultivos mixtos con lodos granulares, se siguió el mismo procedimiento que en el caso de los cultivos provenientes del estiércol.

En el primer y segundo enriquecimiento (figuras 22 y 23) la mayores producciones de amonio se obtuvieron a los 30°C, los valores fueron de 10468 mg NH₄⁺/L y 4072 mg NH₄⁺/L respectivamente, esta producción disminuyó a las temperaturas de 35°C y 37°C, y no hubo respuesta de formación de amonio a temperaturas mayores a 40°C. Por esta razón en el tercer enriquecimiento se disminuyeron las temperaturas del ensayo a 22°C, 28°C 30°C y 35°C.

En relación al pH, en el primer enriquecimiento la respuesta fue homogénea con todas las temperaturas presentando un incremento superior a 9.0 (figura 22); sin embargo en el segundo enriquecimiento (figura 23) el cambio en el pH no fue uniforme; valores cercanos a 8.0 para las temperaturas de 35°C y 37°C, mientras que para a 30°C y 40°C el pH aumentó a 9.0. Con este medio no se logra amortiguar el pH al momento de la inoculación lo cual puede afectar el curso de la hidrólisis.

En el tercer enriquecimiento (figura 24) la mayor producción de amonio se dio a los 30°C y fue de (7373 mg NH₄⁺/L), no obstante no hubo relación entre la cantidad de amonio generada y el cambio del pH, por lo cual se hizo el mismo análisis pero sustituyendo el medio 2 por el medio Stuart.

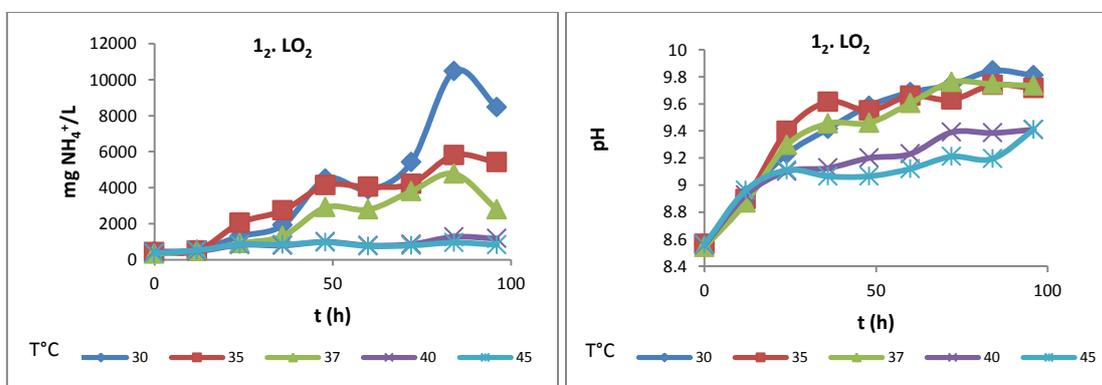


Figura 22. Perfil de pH y producción de amonio en un primer enriquecimiento con el cultivo LO₂

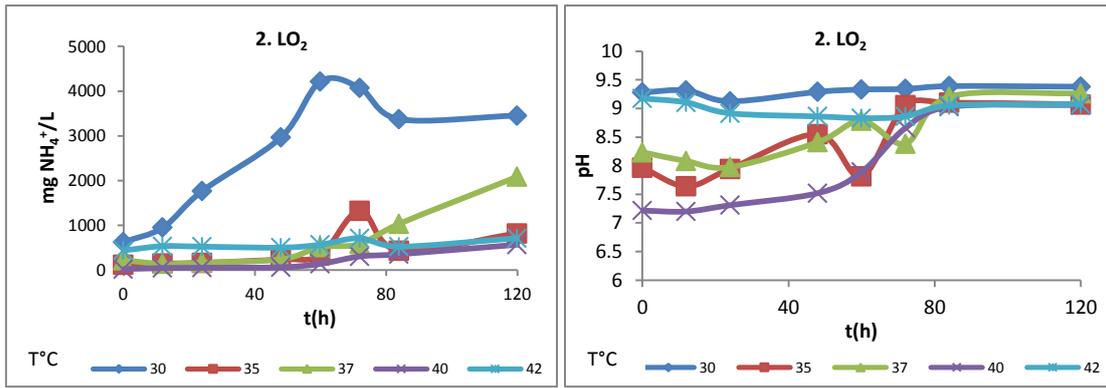


Figura 23. Perfil de pH y producción de amonio en un segundo enriquecimiento con el cultivo LO₂

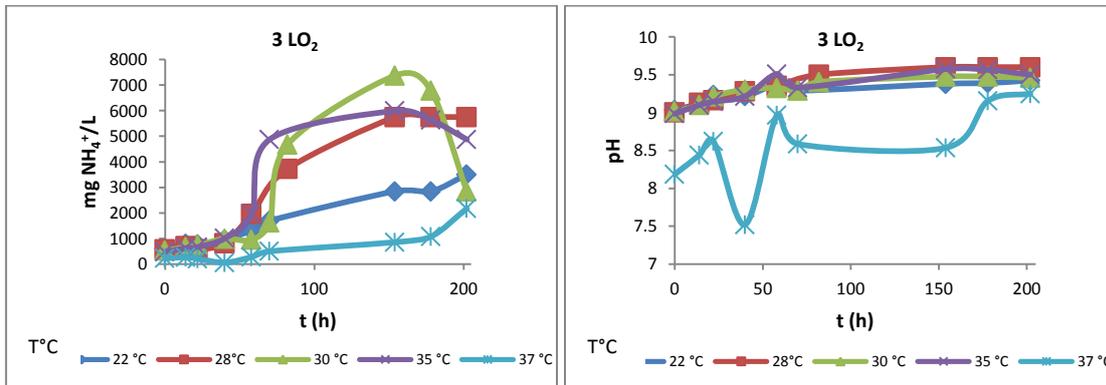


Figura 24. Perfil de pH y producción de amonio en un tercer enriquecimiento con el cultivo LO₂

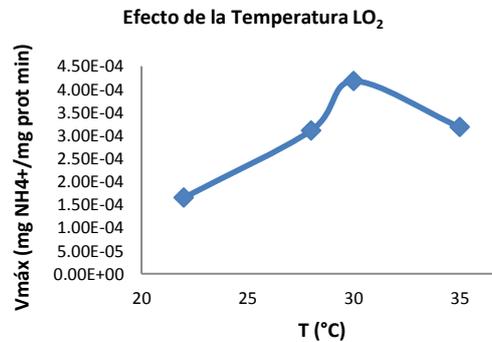


Figura 25. Temperatura óptima del cultivo LO₂, en medio 2

En la figura 25 se observa que la temperatura más favorable para la hidrólisis en el consorcio LO₂ en medio 2 es 30°C, dónde el máximo de velocidad fue de 4.17×10^{-4} mg NH₄⁺/mg prot min.

3.7.3 Efecto de la temperatura en la hidrólisis de urea para el cultivo LO₂ en medio Stuart.

Los resultados obtenidos para el primer y segundo enriquecimiento con este medio muestran que la producción de amonio no sigue una tendencia como se venía observando en los ensayos con el medio 2 para ninguna de las temperaturas probadas (figuras 26 y 27). Se observan incrementos y pérdidas en la producción de amonio. En cuanto al pH solo para el ensayo llevado a cabo a 30 °C (figura 26) se obtiene un pH básico producto de la hidrólisis de la urea, para el resto de las temperaturas el pH se mantiene en un intervalo entre 6.5 y 8.0.

En el tercer enriquecimiento (figura 28) se observa un aumento en el pH, lo cual tiene concordancia con la producción de amonio para todas las temperaturas ensayadas. Se probaron las temperaturas de 22°C y 28°C en función de la pobre respuesta con temperaturas mayores a 37°C. En este enriquecimiento se observó que la mayor producción de amonio fue a 35°C (8348 mg NH₄⁺/L) seguida de 28°C y 30°C. Por lo encontrado en este cultivo se propone un intervalo de temperatura dado entre los 28°C a 35 °C.

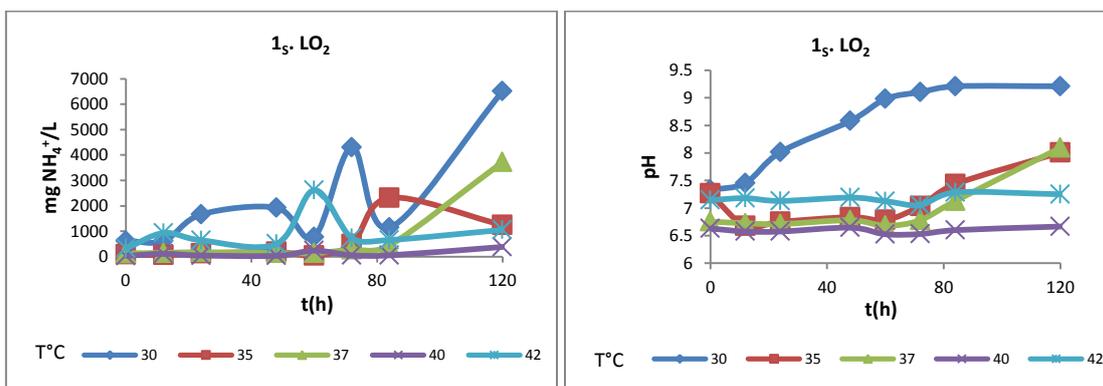


Figura 26. Perfil de pH y producción de amonio en un primer enriquecimiento con lodo en medio Stuart

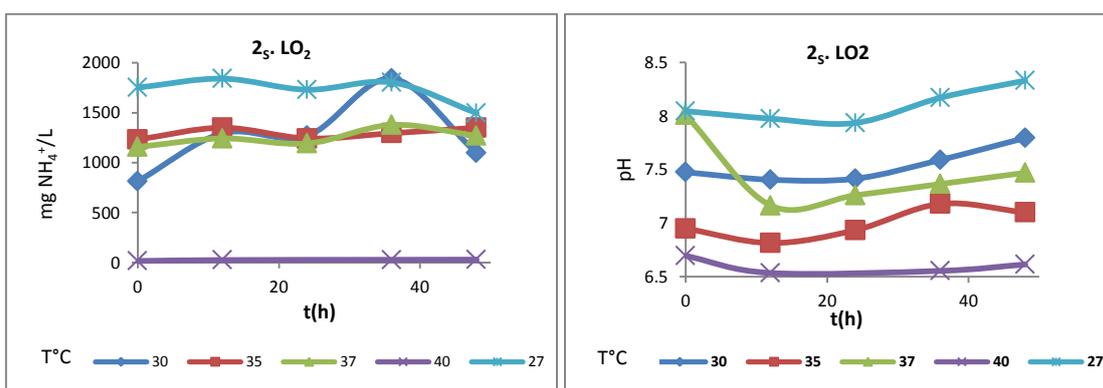


Figura 27. Perfil de pH y producción de amonio en un segundo enriquecimiento con lodo en medio Stuart

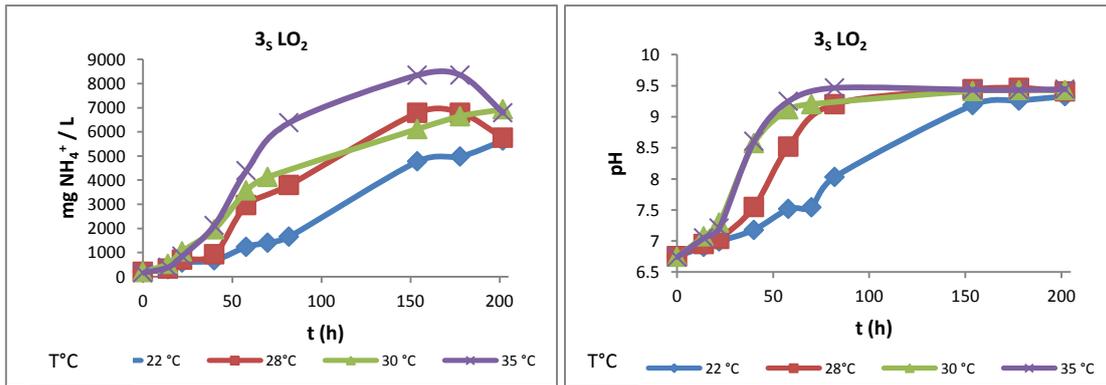


Figura 28. Perfil de pH y producción de amonio en un tercer enriquecimiento con Lodo en medio Stuart

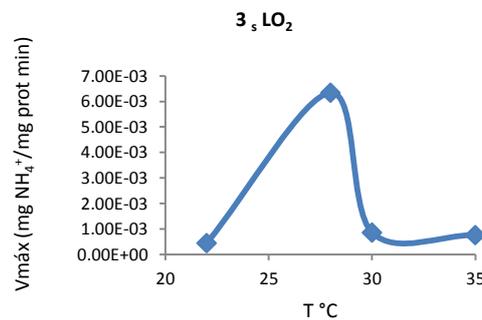


Figura 29. Temperatura óptima del cultivo LO₂, en medio Stuart

En la figura 29 se muestra que la velocidad máxima de producción de amonio en el tercer enriquecimiento para el cultivo LO₂ en medio Stuart se obtuvo a los 28°C; bacterias como *Sporosarcina ureae* tiene buena producción de amonio en el intervalo entre los 15°C y 35°C.

3.8 Determinación de la energía de activación para los consorcios EGO₂ y LO₂.

Para el cálculo de la energía de activación de los cultivos enriquecidos se utilizó el método linealizado propuesto por Arrhenius:

$$\ln k = \ln A - \frac{-E_a}{RT} \quad \text{Ecuación 12}$$

En la figura 30 se muestran las ecuaciones de linealización para obtener la energía de activación para los cultivos enriquecidos LO₂ en medio 2, en medio Stuart y EGO₂ también en medio Stuart.

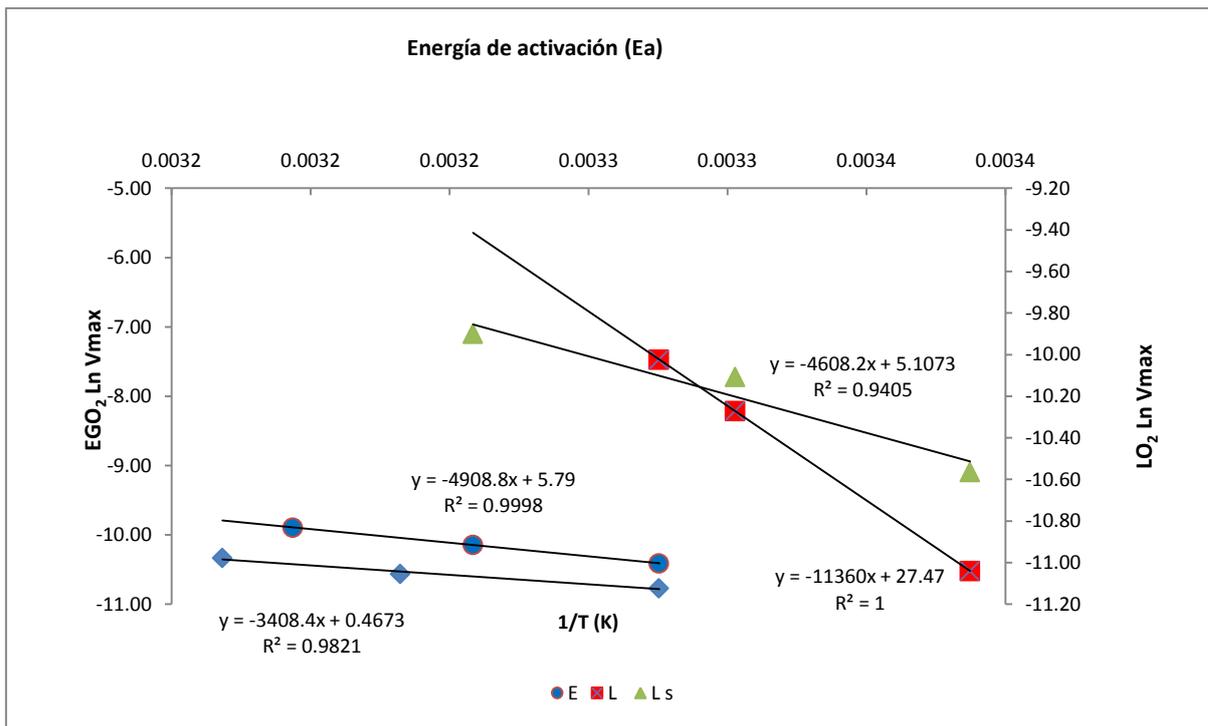


Figura 30. Linearización de velocidades de producción de amonio para la obtención de la energía de activación. En azul se muestran los valores correspondientes a los enriquecimientos segundo (rombos) y tercero (círculos) de EGO₂. Los cuadros rojos representan los valores del tercer enriquecimiento de LO₂ en medio 2 y los triángulos verdes representan los valores del tercer enriquecimiento de LO₂ en el medio Stuart.

A partir de las ecuaciones obtenidas mediante la linearización, la tabla 28 muestra los valores de energía de activación obtenidos para cada cultivo.

Tabla 28. Valores obtenidos de energía de activación E_a para los consorcios EGO₂ y LO₂

$E_a = -mR$ (kcal/mol)	Enriquecimientos			
	Cultivos	1	2	3
R=1.987 cal/molK	EGO ₂ (Medio Stuart)	16.00	6.77	9.75
	LO ₂ (Medio 2)	-	-	22.57
	LO ₂ (Medio Stuart)	-	-	9.16

Se observa gran similitud entre los valores obtenidos para los cultivos EGO₂ (9.74 Kcal/mol) y LO₂ (9.16 Kcal/mol) en su tercer cultivo con medio Stuart, esto puede deberse a que pese a ser consorcios de inóculos de procedencia distinta, las temperaturas de máxima producción de amonio son relativamente cercanas. Para el estiércol 40°C y para el cultivo proveniente de lodos 28°C; en medio Stuart y a 30°C en medio 2. Por otro lado pese a ser consorcios distintos (ya que presentaron características morfológicas distintas) requieren de

condiciones energéticas similares para efectuar la hidrólisis de urea. Los resultados obtenidos son ligeramente superiores a los reportados por Khan y col. (2013), Juan Y. y col. (2010), Fidaleo y Lavecchia (2003) para ureasas (tabla 29).

Tabla 29. Energías de activación de otras hidrolasas.

Enzima	Ea (Kcal/mol)	Autores
Ureasas		
Soybeans	1.4	Khan y col. 2013
Suelo	5.03 – 5.73	Juan Y. col. 2010
Jack Bean- <i>Canavalia ensiformis</i>	7.79 – 8.55	Fidaleo y Lavecchia. 2003
Lipasa		
Lipolase®	1.79 1.2	Jurado y col. 2006 Al -Zuhair y col. 2003
<i>Penicillium citrinum</i>	5.3 5.7	Desnuelle. 1961 Kim y Chung.1989
<i>Rhizopus arrhizus</i>	13.4 7	Fernandes y col. 2004

3.9 Efecto de la concentración de sustrato en la hidrólisis de urea.

Para determinar las constantes cinéticas (μ_{max} y k_s) se llevaron a cabo dos cinéticas con los cultivos LO_2 y EGO_2 , a diferentes concentraciones de sustrato (0% - 2%) y a 29 °C y 40 °C, respectivamente; el medio empleado fue el Stuart. La tabla 30 muestra las concentraciones de urea ensayadas.

Tabla 30. Concentraciones de Urea ensayadas.

% U	U (g /L)	U (mM)
0	0	0.00
0.25	2.5	0.04
0.5	5.0	0.08
0.75	7.5	0.12
1.0	10.0	0.17
1.25	12.5	0.21
1.5	15.0	0.25
1.75	17.5	0.29
2.0	20.0	0.33

En las figuras 31 y 32 se muestran los valores obtenidos de la velocidad de producción de amonio en función de la concentración de urea para la primera y segunda cinética. La velocidad es la pendiente de la parte lineal de los perfiles obtenidos de la producción de amonio (a), se efectuó la estimación con el método de linearización similar al de Lineweaver - Burk, por lo que se presenta el gráfico de dobles recíprocos (b), consultar anexo 3.

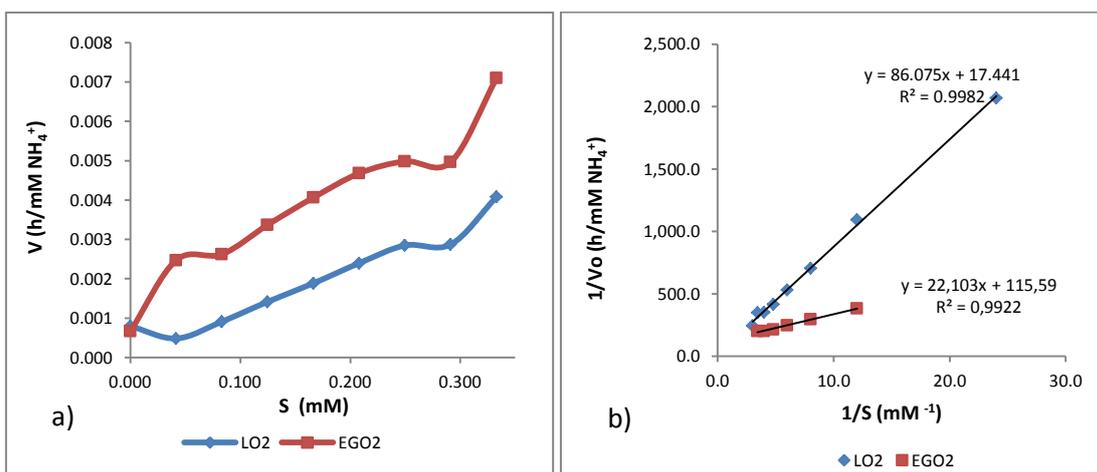


Figura 31. a) Velocidad de producción de amonio en función de la concentración de sustrato, b) Gráfico de dobles recíprocos. Primer cultivo, LO₂ y EGO₂ fueron incubados a 29°C y 40°C, respectivamente

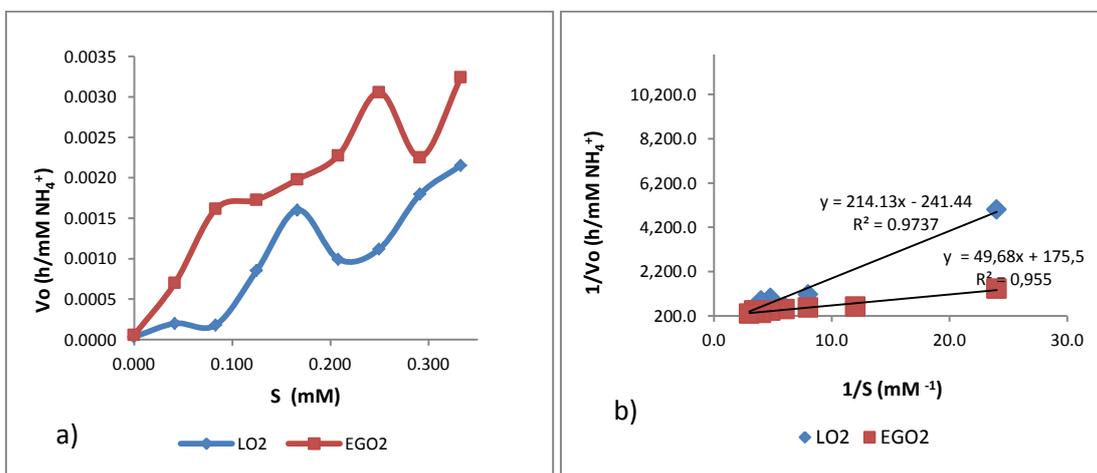


Figura 32. a) Velocidad de producción de amonio en función de la concentración de sustrato, b) Gráfico de dobles recíprocos. Segundo cultivo, LO₂ y EGO₂ fueron incubados a 29°C y 40°C, respectivamente

Con base en lo anterior en la tabla 31 se presenta algunas estimaciones fisiológicas de los consorcios LO₂ y EGO₂.

Tabla 31. Estimaciones fisiológicas de los consorcios LO₂ y EGO₂.

Cinética	Cultivo	1/ $\mu_{\text{máx}}$	ks/ $\mu_{\text{máx}}$	R ²	$\mu_{\text{máx}}$ (mM NH ₄ ⁺ /h)	Ks (mM)
1	LO ₂	17.44	86.08	1.00	0.06	4.94
	EGO ₂	115.59	22.10	0.99	0.01	0.19
2	LO ₂	-241.44	214.13	0.97	-0.004	-0.89
	EGO ₂	175.50	49.68	0.96	0.01	0.28

Como se puede observar en la tabla, para el caso del cultivo EGO₂ se obtuvieron valores de $\mu_{\text{máx}}$ de 0.01 mM NH₄⁺/h y de Ks de 0.19 mM en su primera cinética. Para la segunda cinética se obtuvo el mismo valor de $\mu_{\text{máx}}$ y una Ks de 0.28mM. En cuanto al cultivo LO₂ solamente en la primera cinética se obtuvieron datos congruentes, éstos fueron $\mu_{\text{máx}}$ de 0.06 mM NH₄⁺/h y Ks de 4.94 mM; en la segunda cinética se obtuvieron valores negativos de $\mu_{\text{máx}}$ y Ks con el método de estimación.

Si comparamos entre sí los resultados obtenidos entre los cultivos el cultivo EGO₂ resulta un consorcio de mayor afinidad a la urea en las condiciones ensayadas. Estos datos son inferiores a los reportados por Mobley y Hausinger (1989) para un consorcio ruminal, mientras que para el cultivo LO₂ el valor obtenido de Ks es cercano al reportado por Contreras y colaboradores (2009) para *Brucella suis* (tabla 33). Es importante señalar que los autores referidos en la tabla 32 trabajaron con extractos enzimáticos y condiciones similares. Contreras y col. (2008) trabajaron a un pH de 7 a 25°C. En los casos de Bahagat y Viridi (2009) su pH fue de 5.5 a 37°C y Khan y col. (2013) evaluaron la actividad de la ureasa a pH 8 y 30°C. Por lo anterior las comparaciones efectuadas son un punto de referencia, en vista de que en este trabajo se utilizaron dos consorcios y no extractos enzimáticos.

Tabla 32. Valores de Km de ureasas reportados en la literatura

Microorganismo	Km (mM)	Autor
<i>Bacillus pasteurii</i>	40-130	Mobley y Hausinger 1989
<i>Selenomonas ruminantium</i>	2.2	
<i>Spirulina maxima</i>	0.12	
Población Ruminal	0.83	
<i>Brucella suis</i>	5.6 – 6.29	Contreras y col. 2008
<i>Yersenia enterocolitica</i>	1.7 - 2.1	Bahagat y Viridi. 2009
Soybeans	36.49	Khan y col. 2013

3.9 Hidrólisis de urea en orina humana.

Para saber si los consorcios aislados de LO₂ y EGO₂ podían hidrolizar la urea presente en orina humana se realizó un experimento en presencia de orina humana estéril. La urea de la orina se midió por un método de cromatografía de líquidos de alta resolución HPLC, dando un valor de 23.37 ± 1.69 g Urea/L.

El medio para llevar a cabo la cinética consistió de una mezcla de orina fresca esterilizada por filtración en una membrana de 0.2 µm. Se inocularon con los consorcios LO₂ y EGO₂. Se evaluaron dos controles, los cuáles consistieron en la incubación de muestras de orina estéril, sin inóculo a las temperaturas de 29°C y 40°C respectivamente.

La figura 33 muestra los perfiles de producción de amonio y pH de los controles. En condiciones estériles no se observó un aumento de amonio ni de pH, por lo que se descartó una hidrólisis abiótica de la orina estéril.

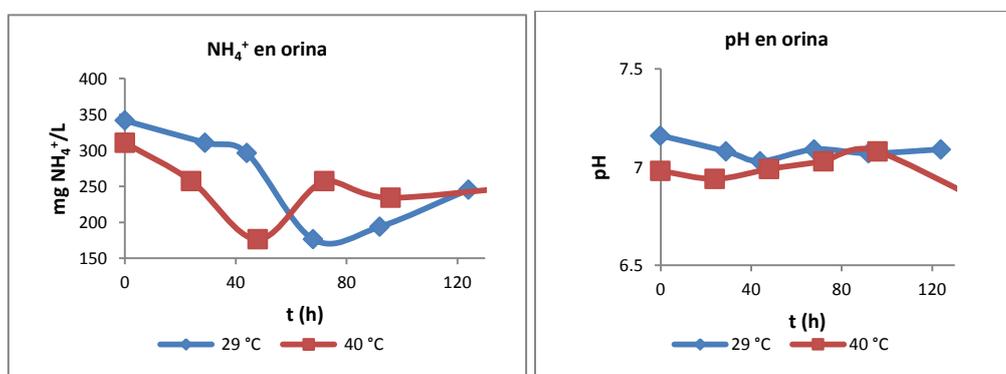


Figura 33. Perfil de pH y producción de amonio en controles de orina humana estéril

Las unidades experimentales fueron botellas serológicas de 60 mL con 27 mL de orina, las cuales fueron inoculadas con 3 mL de los cultivos LO₂ y EGO₂, diluyendo la urea a 21.03 g/L. Se inoculó con una absorbancia de 0.142 nm y 0.307 nm respectivamente. Se observó que los dos cultivos dieron respuesta positiva a la hidrólisis de urea (figura 34); siendo tres veces superior para el cultivo EGO₂ con respecto al cultivo LO₂.

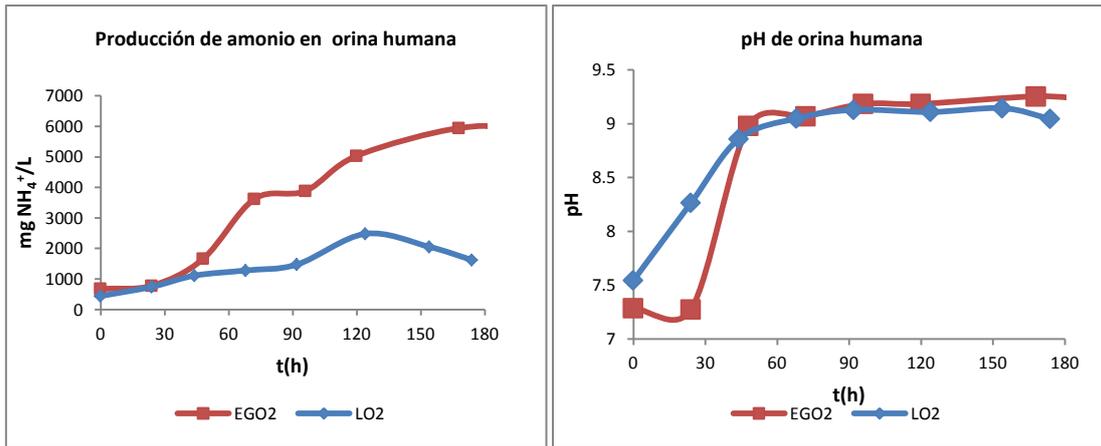


Figura 34. Perfil de pH y producción de amonio en orina humana a partir de los cultivos LO₂ y EGO₂ incubados a 29°C y 40°C, respectivamente.

Eficiencia de hidrólisis de urea en orina humana.

En la tabla 33 se muestran las eficiencias obtenidas de la hidrólisis de urea en orina humana, a las 120 h de incubación. De acuerdo al contenido de urea en las unidades experimentales 21.03 g urea/L se esperaba una concentración de amonio de 12.62 g/L. El cultivo EGO₂ alcanzó un valor máximo de amonio de 5.9 g/L alrededor de la hora 170, el cultivo LO₂ obtuvo su máximo de amonio en un tiempo de 124 horas y fue de 2.5 g/L. Las eficiencias son bajas, debido al cambio de medio, y porque como se encontró en los enriquecimientos con orina; el pH donde se produjo mayor cantidad de amonio estuvo acotado entre 7.3 y 8; por lo que al no controlarse se disminuyó la actividad enzimática. Por otro lado es necesario efectuar cultivos a distintos pH con el objeto de encontrar el pH al que éstos consorcios en orina humana produzcan mayor cantidad de amonio y eleven la eficiencia de urea hidrolizada respecto al amonio producido; según la literatura el intervalo de pH bajo el cual la enzima presenta capacidad ureolítica está comprendido entre 7.5 a 8.9. Fidaleo y Lavecchia (2003) reportan un pH óptimo de 7. También la eficiencia podría incrementarse al incrementarse el número de enriquecimientos (Cesatti y col, 2011).

Tabla 33. Eficiencias de amonio producido por gramo de urea en orina humana.

Cultivos	t (h)	Eficiencia g NH ₄ ⁺ /g Urea
EO ₂ G	168	0.46
LO ₂	124	0.19

4. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones estudiadas fue posible confirmar que se llevó a cabo la hidrólisis de la urea con los consorcios aislados.

- Los cultivos aislados confirmaron la expresión de la actividad ureasa (pH, NH_4^+).
- La mayor producción de amonio la presentaron los cultivos provenientes de inóculo estiércol. alcanzándose concentraciones desde 5.8 g NH_4^+ /L para el cultivo EO_2 hasta 6.9 g NH_4^+ /L para el cultivo EA. en un tiempo de hidrólisis de 32 h.
- Las mayores eficiencias se lograron con los cultivos mixtos EO_2 y LO_2 en medio Stuart con valores de 0.9 y 0.84 respectivamente.
- En los medios 2 y LB las eficiencias fueron mayores en los cultivos mixtos con urea al 1%. después de 30 horas de incubación. Se obtuvieron eficiencias de 0.82 del cultivo LO_2 en medio LB y de este de 0.84 en medio 2.
- La temperatura en la que se alcanza una mayor velocidad de producción de amonio fue de 40°C para el cultivo EO_2 . Para el cultivo LO_2 se encontró la mayor producción de amonio a 30°C en medio 2 y 28°C medio Stuart.
- Las energías de activación para los cultivos EO_2 y LO_2 en medio Stuart fueron de 9.75 y 9.16 Kcal/mol; valores que son similares en orden de magnitud a los reportados en la literatura.
- Para el cultivo EO_2 se obtuvo una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.01 mM NH_4^+ /h y una K_s de 0.19 y 0.28 mM en los enriquecimientos primero y segundo. En el caso del cultivo LO_2 se obtuvo una $\mu_{\text{máx}}$ de 0.06 mM NH_4^+ /h y una K_s de 4.94 mM.
- Los cultivos EO_2 y LO_2 mostraron respuesta ureásica en orina humana con eficiencias de 0.46 y 0.19 respectivamente.

RECOMENDACIONES

- Se debe efectuar un experimento para dilucidar el efecto de pH aunque es sabido que la enzima ureasa trabaja en un intervalo de pH entre 7 y 9; y se reportan valores óptimos de pH para 7 y de inhibición enzimática alrededor de 9; en este trabajo hizo falta proponer un pH de operación de cada uno de los cultivos seleccionados (LO_2 y EO_2).

- Hace falta enriquecer los cultivos en orina humana, ya que se esperaría un aumento en la eficiencia de la hidrólisis de urea.

REFERENCIAS

- Al-Zuhair S., Hasan M., Ramachandran K.B., (2003). Kinetics of the enzymatic hydrolysis of palm oil by lipase. *Process Biochemistry*. 38:1155–1163.
- Anthonisen A., Loehr R., Prakasam T., Srinath E. (1976). Inhibition of nitrification by ammonia and nitrous acid. *Journal Water Pollution Control Federation*. 48: 835 – 852
- APHA .Standard methods for the examination of water and wastewater Eaton A., American Public Health Association, American Water Works Association, Water Environment Federation. (2005) Washington, D.C.: APHA- AWWA-WEF
- Application notes. Analysis of Urea. Fast, Reproducible HPLC Method. Cogent
- Bachan L. (2012). Urease inhibitors: A review. *Indian Journal of Biotechnology*. (11) 381-388
- Basakcildan-Kabakci S., Ipekoglu A N., Talini I. (2007). Recovery of ammonia from human urine by stripping and absorption. *Environmental Engineering Science*. 24(5): 616-624
- Beascoechea E., Muñoz M., Curt M. (2001). Manual de Fitodepuración, Filtros de Macrófitas en Floración. Universidad Politécnica de Madrid. Anexo 1
- Bhagat N., Viridi J. (2009). Molecular and biochemical characterization of urease and survival of *Yersinia enterocolitica* biovar 1A in acidic pH *in vitro*. *BMC Microbiology*. (9) 262
- Bergey's manual of determinative bacteriology (1994). Baltimore : Williams & Wilkins. pp: 604. 631. 742-745. 770.
- Bergey's manual of determinative bacteriology (2000). Baltimore : Williams & Wilkins. pp: 527.530.531.532.566.576.577.
- Bergey's manual of systematic bacteriology.(2005). Garrity. George M. (Ed.). pp: 323-347. 661-666. 685-691. 707-709. 745-751. 753-759. 799-803.
- Bioquímica. Texto y Atlas. (2004). Koolman J., Röhm H. Tercera Edición. Editorial Médica Panamericana. pp 324 y 325.
- Brock. Biología de los Microorganismos. (2004). Madigan M.. Martinko J.. Parker S. Décima Edición. Editorial Prentice-Hall. pp 104. 105.147.147, 606, 832, 834, 837, 844, 846.
- Broomfield R., Morgan S., Khan A., Stickler D. (2009). Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. *Journal of Medical Microbiology*. 58:1367–1375.

Carlsson H., Nordlander E. (2010). Computational Modeling of the Mechanism of Urease. *Bioinorganic Chemistry and Applications*. 10.1155/2010/364891

Cesatti G., Olguín L., Monroy O., Ramírez F. (2012). Producción de metabolitos a partir de un cultivo mixto proveniente de un crudo Mexicano. Tesis Maestría UAM.

Chen Y., Cheng J., Creamer S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: A review. *Bioresourcetechnology*.99: 4044-4064

Contreras A., Quiroz L., Martins A., Peralta H., Avila C., Sriranganathan N., Stephen M.(2008). Enzymatic, immunological and phylogenetic characterization of *Brucella suis* urease. *BMC Microbiol.* 8: 121

Desnuelle P., (1961). Pancreatic lipase. *Advances in Enzymology* 23: 129–161.

Ferrato F., Carriere F., Sarda L., Verger R. (1997). A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation. *Methods in Enzymology*. 286:327–347.

Fernandes M., Krieger N., Baron A., Zamora P., Ramos L., Mitchell D. (2004). Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isooctane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis*. 30: 43-49.

Fidaleo M. y Lavecchia R. (2003). Kinetic Study of Enzymatic Urea Hydrolysis in the pH Range 4–9. *Chemical and Biochemical. Engineering*. 17: 311-318.

Fittschen I., y Hahn H. (1998). Characterization of the municipal wastewater and a preliminary comparison with liquid cattle excretion. *Water Science and Technology*. 38(6): 9–16.

González A., Durán C. (2002). Procesos de separación: Aplicaciones para la cuantificación de biogases producidos en reactores anaerobios. *Tecnología Ciencia Educación (IMIQ)* 17 (2):84-94

Hanif M., Shoaib K., Saleem M., Hasan R., Zaib S., Iqbal J. (2012). Synthesis, Urease Inhibition, Antioxidant, Antibacterial, and Molecular Docking Studies of 1.3.4-Oxadiazole Derivatives. *ISRN Pharmacoly*. 928901.

Hungate R.E. (1969). A roll tube method for cultivation of strict anaerobes. *Methods in microbiology*.(3B): 117 -132.

Ingeniería de los sistemas de tratamiento y disposición de aguas residuales.

Valdez C., Vázquez G. (2003). Fundación ICA. Unidad 1.13

Juan Y., Chen Z., Chen L., Wu Z., Wang R., Sun W., Zhang Y. (2010). Kinetic and thermodynamic behaviors of soil urease as affected by urease inhibitors. *Revista de la ciencia del suelo y nutrición vegetal*.10: 1-11.

Jurado E., Camacho F., Luzón G., Fernández M., García M. (2006). Kinetic model for the enzymatic hydrolysis of tributyrin in O/W emulsions. *Chemical Engineering Science*. 61: 5010-5020.

Kangning X., Chengwen W., Haiyan L., Yi Q. (2011). Simultaneous removal of phosphorus and potassium from synthetic urine through the precipitation of magnesium potassium phosphate hexahydrate. *Chemosphere*. 84: 207-212.

Khan M., Moshin M., Zahoor S., Ul-Haq I. (2013). Kinetics and Thermodynamic Study of Urease Extracted from Soybeans. *Biologia (Pakistan)* 59 (1): 7-14

Kim T., Chung K. (1989). Some characteristics of palm oil kernel olein hydrolysis by *Rhizopus arrhizus* lipase in reversed micelle of AOT in isooctane and additive effects. *Enzyme and Microbial Technology*. 11:528–531.

Kuntke P. (2011). Recovery of Nutrients and Energy from Source Separated Urine. URL¹

La teoría y la práctica en el laboratorio de química analítica 1. Vega E., Verde R., Pérez M. (2003). UAM-I. pp: 119 - 122

Larsen T. A., Gujer W. (1996). Separated management of anthropogenic nutrient solutions (human urine). *Water Science Technology*. 34(3-4): 87–94

Larsen T.A., Peters I., Alder A., Eggen R., Maurer M., Muncke J. (2001). Reengineering the toilet for sustainable wastewater management. *Environmental Science & Technology*. 35: 192A–197A.

Liu Z., Zhao Q., Wang K., Lee D., Qiu W., Wang J. (2008). Urea hydrolysis and recovery of nitrogen and phosphorous as MAP from stale human Urine. *Science Direct*. 20: 1018 – 1024

Lowry O., Rosebrough A., Farr y R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. *The Journal of Biological Chemistry*. 193: 265-275.

Maurer M., Pronk W., Larsen T.A. (2006). Treatment processes for source-separated urine. *Water Research*. 40: 3151–3166.

Microbiología (1991) .Brock T y Madigan T.Sexta Edición. Editorial Prentice-Hall. pp 332. 333.

Mobley H. y R. Hausinger. (1989). Microbial urease: significance. regulation. and molecular characterization. *Microbiological Reviews*. 53: 85–108.

Mobley H., Island M. y R. Hausinger . (1995). Molecular Biology of Microbial Ureases. *Microbiological Reviews*. 59: 451–480.

Narjis H.M., Al-Saddi; Essam., Al-Jumaily; Anis.M., Al-Rawi. (2009). Extraction and purification of Urease from *Proteus mirabilis*. *National Journal of Chemistry*. 33: 138 -145.

Olivera D., Wasserman G., Carlini C. (2006). Ureases display biological effects independent of enzymatic activity. Is there a connection to diseases caused by urease-producing bacteria. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 39: 851-861.

Otterpohl R. 2002. Options for alternative types of sewerage and treatment systems directed to improvement of the overall performance. *Water Science and Technology*. 45 (3): 149–158.

Pérez S.Niño Z., Hernández C. (2007). Uso de enzimas de tipo ureasa en el tratamiento de aguas residuales con alto contenido en Nitrógeno orgánico. *Información tecnológica*. 18(5): 41-48.

Principios de Bioquímica (2005). Nelson. D. y Cox. M. Lehninger. Cuchillo. M. Suau. P. Vendrell. J. (traductores). Cuarta edición. Barcelona: Ediciones Omega. 26p y 194p. ISBN 84-282-1417-7. pp 80. 194.

Pronk W., Koné D. (2008). Options for Urine Treatment in the Developing Countries. *Desalination*. 248 (1-3): 360-368.

Rauch W., Brockmann D., Peters I., Larsen T., Gujer W. (2003). Combining urine separation with waste design: an analysis using a stochastic model for urine production. *Water Research*. 37: 681–689.

Roels J. (1983). Energetics and Kinetics in Biotechnology. *Elsevier Bimedical Press*.

Ronteltap M., Maurer M., Gujer W. (2007). Struvite precipitation thermodynamics in source-separated urine. *Water Research*. 41: 977–984.

Sirko A., Brodzik R. (2000). Plant Ureases: Roles and regulation. *Acta Biochimica polonica*. 47: 4/2000.

Stuart C., Van Stratum E., Rustigian R. (1945). Further studies on urease production by *Proteus* and related organisms. *Journal of bacteriology*. 49(5):437-444.

Torres J., Ramírez E., Gutiérrez R. (2008). Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gatii*. *Revista Iberoamericana de Microbiología*. 25: 27-31.

Udert K., Larsen T., Gujer W., 2003. Estimating the precipitation potential in urine-collecting systems. *Water Research*. (37): 2667–2766.

Udert K., Kind E., Teunissen M., Jenni S., Larsen T. (2008). *Water Science & Technology*. 58 (2): 277–284.

Wilsenach J., Schuurbijs C.; Loosdrecht M. (2007). Phosphate and potassium recovery from source separated urine through struvite precipitation. *Water Research*. (41): 458 – 466

Páginas web consultadas:

¹<http://chemistry.about.com/od/biochemistry/f/What-Is-The-Chemical-Composition-Of-Urine.htm>

²<http://www.ete.wur.nl/UK/Research/Urban+Environmental+Technology+and+Management/Recovery+of+Nutrients+and+Energy+from+Source+Separated+Urine/>

³ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3425833/figure/fig2/>

⁴http://www.uniregensburg.de/Fakultaeten/nat_Fak_IV/Organische_Chemie/Didaktik/Keusch/D-Urease-e.htm

⁵ http://depa.fquim.unam.mx/amyd/archivero/apuntesparte7_10181.pdf

ANEXO 1

HIDRÓLISIS DE UREA.

La reacción global teórica de la hidrólisis de la urea podría representarse a partir de la ecuación número 12. Considerando la formulación del medio de cultivo el balance teórico es el siguiente (tabla 34):



Tabla 34. Estimaciones teóricas de los productos esperados de la hidrólisis de urea.

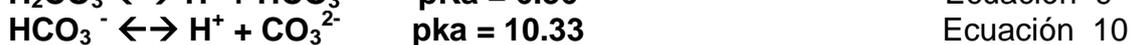
Unidades	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	2NH_4^+	HCO_3^-
g/L	5	3.06	5.083
	10	5.99	9.76
	15	9	15.25
	20	11.99	20.33
M	0.083	0.17	0.083
	0.16	0.33	0.16
	0.25	0.5	0.25
	0.33	0.66	0.33

El equilibrio del ácido carbónico está dado por las siguientes ecuaciones (Vega E. y col., 2003):



El equilibrio entre las fases ecuaciones (Vega E. y col., 2003) se cuantifica mediante la ley de Henry.

$$K = \frac{H_2\text{CO}_3}{P_{\text{CO}_2}}$$



ANEXO 2

Cálculos para determinar la energía de activación.

Con base en los perfiles obtenidos durante los enriquecimientos y a cada una de las temperaturas ensayadas, se determinó el punto de mayor producción de amonio dividido entre el tiempo en el que éste se alcanzó, y a esto se le denominó como una velocidad en la que se produjo la mayor cantidad de

amonio. Una vez obtenidos los valores de velocidad en la que se produjo la mayor cantidad de amonio, se calculó su logaritmo natural y éste se graficó en función del inverso las temperaturas en escala Kelvin. Con este procedimiento se obtuvo una pendiente negativa ($-E_a/RT$).

Cultivo: EGO₂ .

Medio de cultivo: Stuart

Número de enriquecimientos: 3

Primer enriquecimiento (1_s. EGO₂).

Se muestran los valores de velocidad de producción de amonio, temperaturas manejadas (tabla 35) y determinación de la Energía de Activación (figuras 34 y 35). Se siguió el mismo procedimiento para los tres enriquecimientos.

Tabla 35. Valores de máxima producción de amonio y temperaturas 1_s. EGO₂.

T °C	1/T (K)	V máx (M NH ₄ ⁺ /min)	Ln Vmáx
30	0.0033	1.28E-05	-11.26
35	0.0032	9.61E-06	-11.55
37	0.0032	1.10E-05	-11.41
40	0.0032	1.45E-05	-11.14
45	0.0031	1.59E-06	-13.35

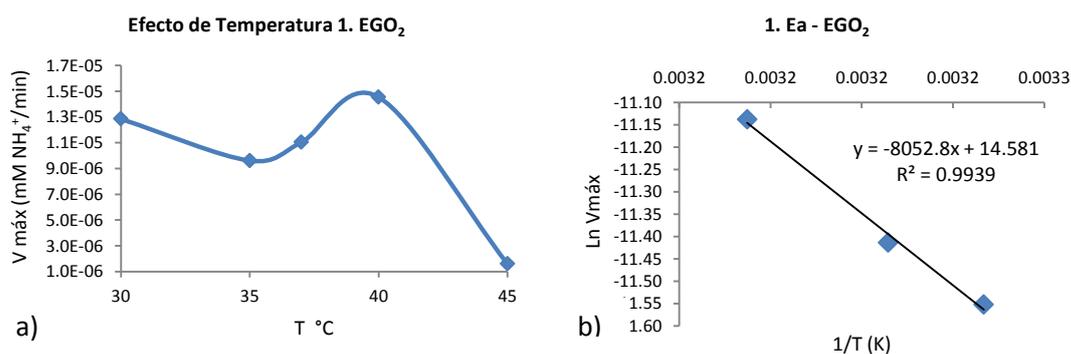


Figura 35. a) Efecto de Temperatura 1_s. EO₂G

b) Determinación de Ea 1_s. EO₂G.

Segundo enriquecimiento (2_S. EGO₂).

Tabla 36. Valores de máxima producción de amonio y temperaturas 2_S. EGO₂

T °C	1/T (K)	V máx (M NH ₄ ⁺ /min)	V máx (mg NH ₄ ⁺ /mg prot min)	Ln Vmáx
30	0.0033	2.11E-05	1.39E-03	-10.77
35	0.0032	2.87E-05	1.18E-03	-10.46
37	0.0032	2.59E-05	2.55E-03	-10.56
40	0.0032	3.32E-05	2.66E-03	-10.31
42	0.0032	3.25E-05	1.82E-03	-10.33

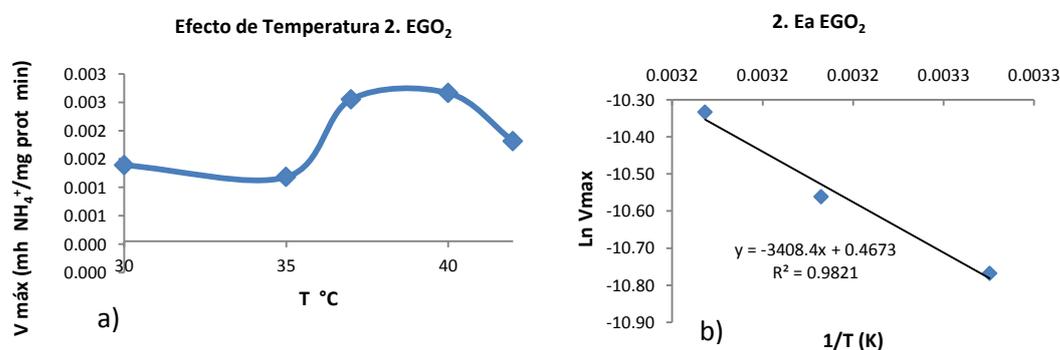


Figura 36. a) Velocidad de producción de amonio 2_S. EGO₂.

b) Linearización Método de Arrhenius 2_S. EGO₂.

Tercer enriquecimiento 3_S. EGO₂.

Tabla 37. Valores de máxima producción de amonio y temperaturas 3_S. EGO₂

T °C	1/T (K)	V máx (M NH ₄ ⁺ /min)	V máx (mgNH ₄ ⁺ / mg prot min)	Ln Vmáx
30	0.0033	3.00E-05	1.17E-03	-10.41
35	0.0032	3.93E-05	1.98E-03	-10.14
37	0.0032	3.20E-05	1.75E-03	-10.35
40	0.0032	5.04E-05	2.37E-03	-9.90
42	0.0032	4.36E-05	1.75E-03	-10.04

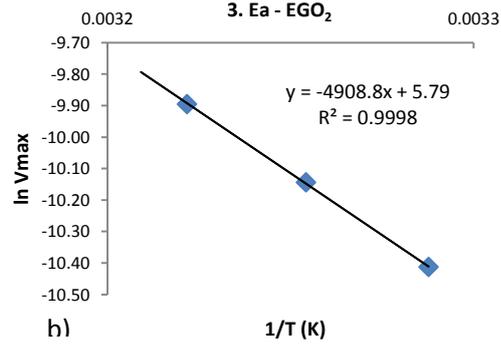
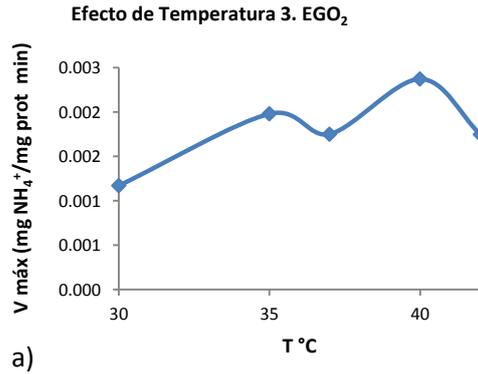


Figura 37. a) Velocidad de producción de amonio 3_S. EGO₂

b) Linearización método de Arrhenius 3_S. EGO₂

Cultivo: LO₂.

Medio de cultivo: 2

Número de enriquecimientos: 3

Primer enriquecimiento para el cultivo 1₂.LO₂.

Tabla 38. Valores de máxima producción de amonio y temperaturas 1₂.LO₂

T °C	1/T (K)	V máx (mM NH ₄ ⁺ /min)	Ln Vmáx
30	3.30E-03	1.15E-04	-9.07
35	3.25E-03	6.40E-05	-9.66
37	3.23E-03	5.26E-05	-9.85
40	3.19E-03	1.40E-05	-11.18
45	3.14E-03	1.05E-05	-11.47

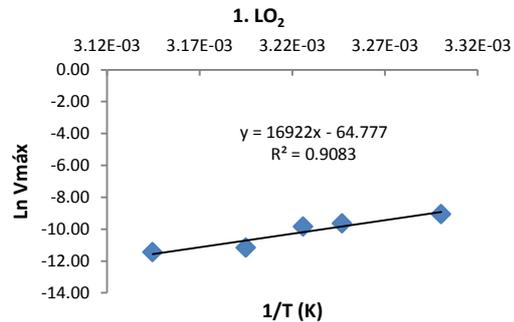
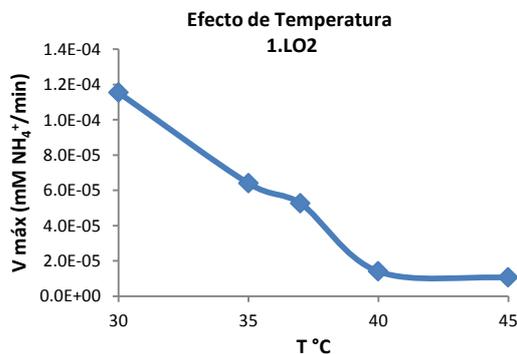


Figura 38. a) Velocidad de producción de amonio 1₂.LO₂

b) Linearización método de Arrhenius 1₂.LO₂

Tal como se observan en las figuras 38 a) y b) no es posible determinar la energía de activación puesto que se obtuvieron las temperaturas en donde la producción de amonio es menor. Por otro lado si la energía de activación se calcula mediante el método gráfico, se observa una pendiente positiva, lo cual se interpreta como una energía de desactivación. Por lo anterior se planteó un segundo enriquecimiento en el que se sustituyeron los 45 °C por 42°C.

Segundo enriquecimiento en medio 2, para el cultivo 2₂.LO₂

Tabla 39. Valores de máxima producción de amonio y temperaturas 2₂.LO₂

T °C	1/T (K)	V máx (mM NH ₄ ⁺ /min)	Ln Vmáx
30	3.30E-03	6.51E-05	-9.64
35	3.25E-03	1.70E-05	-10.98
37	3.23E-03	1.61E-05	-11.04
40	3.19E-03	4.37E-06	-12.34
42	3.17E-03	8.74E-06	-11.65

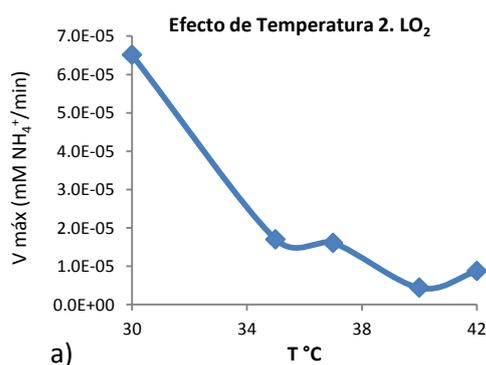
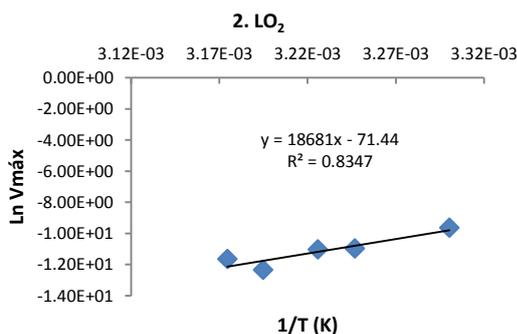


Figura 39. a) Velocidad de producción de amonio 2₂.LO₂



b) Linearización método de Arrhenius 2₂.LO₂

Se observa en las figuras 39 a) y b) que no es posible calcular la energía de activación ya que las temperaturas ensayadas corresponden a la fase de desactivación. La mayor respuesta de producción de amonio se obtiene alrededor de los 30°C, por lo que en un tercer enriquecimiento se ensayaron temperaturas alrededor de los 30°C descartando las temperaturas mayores a 40°C.

Tercer enriquecimiento en medio 2, para el cultivo 3₂.LO₂

Tabla 40. Valores de máxima producción de amonio y temperaturas 3₂.LO₂

T °C	1/T (K)	V máx (M NH ₄ ⁺ /min)	V máx (mg NH ₄ ⁺ /mg prot min)	Ln Vmáx
22	3.39E-03	1.60E-05	1.65E-04	-11.04
28	3.32E-03	3.46E-05	3.11E-04	-10.27
30	3.30E-03	4.43E-05	4.17E-04	-10.02
35	3.25E-03	3.60E-05	3.18E-04	-10.23

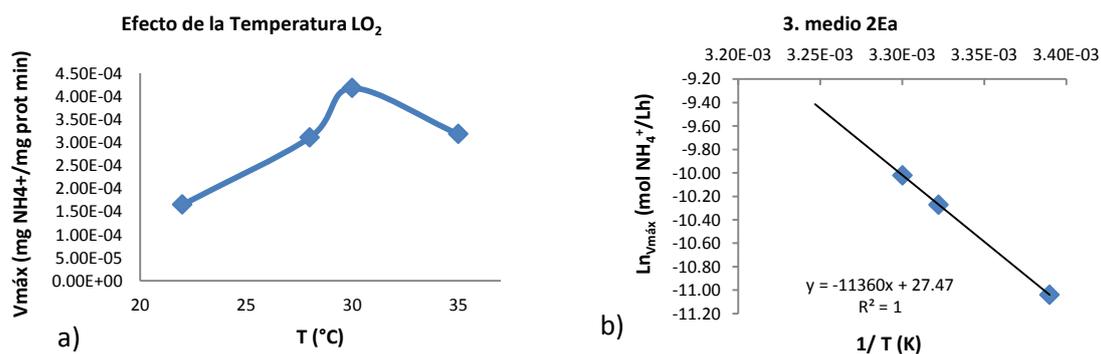


Figura 40. a) Velocidad de producción de amonio 3₂.LO₂

b) Linearización método de Arrhenius 3₂.LO₂

Cultivo: LO₂.

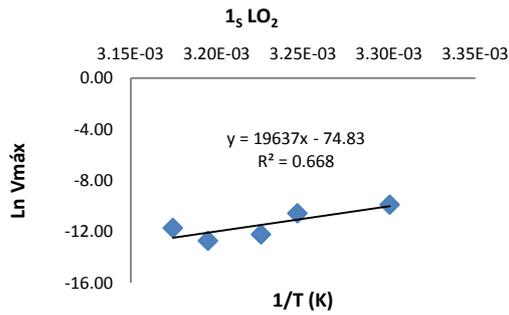
Medio de cultivo: Stuart

Número de enriquecimientos: 3

Primer enriquecimiento 1_s.LO₂

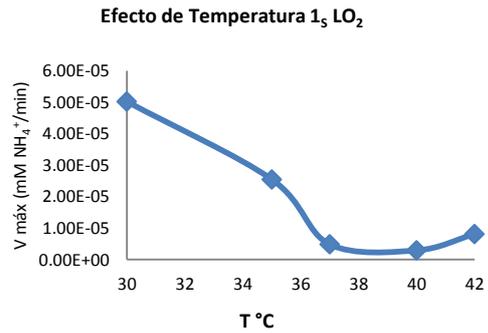
Tabla 41 .Valores de máxima producción de amonio y temperaturas 1_s.LO₂

T °C	1/T (K)	V máx (mM NH ₄ ⁺ /min)	Ln Vmáx
30	3.30E-03	5.02E-05	-9.90
35	3.25E-03	2.55E-05	-10.58
37	3.23E-03	4.87E-06	-12.23
40	3.19E-03	2.95E-06	-12.73
42	3.17E-03	8.13E-06	-11.72



a)

Figura 41. a) Velocidad de producción de amonio 1_s.LO₂



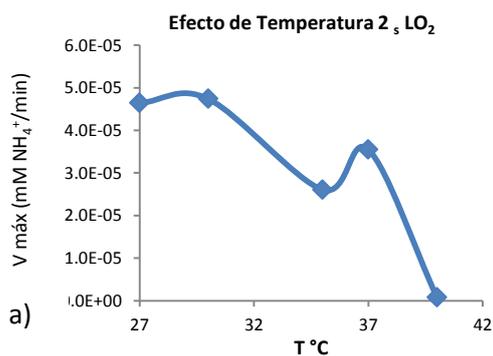
b)

b) Linearización método de Arrhenius 1_s.LO₂

Segundo enriquecimiento 2_s.LO₂.

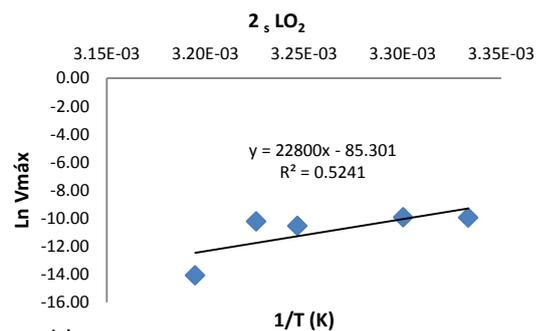
Tabla 42. Valores de máxima producción de amonio y temperaturas 2_s.LO₂

T °C	1/T (K)	V máx (mM NH ₄ ⁺ /min)	Ln Vmáx
27	3.33E-03	4.64E-05	-9.98
30	3.30E-03	4.74E-05	-9.96
35	3.25E-03	2.60E-05	-10.56
37	3.23E-03	3.55E-05	-10.25
40	3.19E-03	7.54E-07	-14.10



a)

Figura 42. a) Velocidad de producción de amonio 2_s.LO₂



b)

b) Linearización método de Arrhenius 2_s.LO₂

Tercer enriquecimiento

Tabla 43. Valores de máxima producción de amonio y temperaturas $3_S.LO_2$

T °C	1/T (K)	V máx (mM NH ₄ ⁺ /min)	V máx (mg NH ₄ ⁺ /mg prot min)	Ln Vmáx
22	3.39E-03	2.58E-05	4.45E-04	-10.56
28	3.32E-03	4.08E-05	6.34E-03	-10.11
30	3.30E-03	3.18E-05	8.59E-04	-10.36
35	3.25E-03	5.02E-05	7.56E-04	-9.90

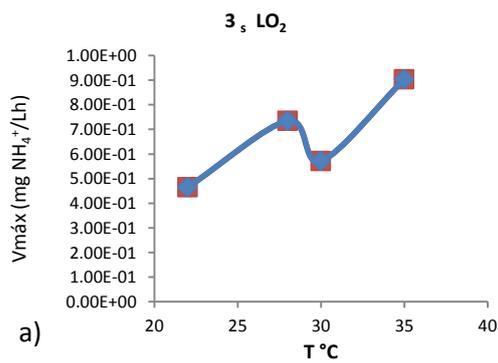
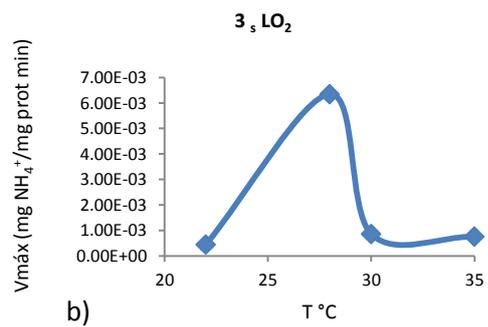
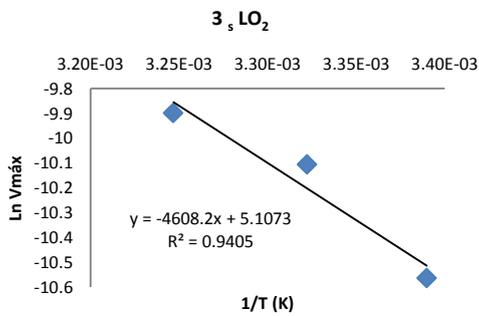


Figura 43. a) Velocidad de producción de amonio $3_S.LO_2$



b) Velocidad específica de producción de amonio $3_S.LO_2$



c) Linearización método de Arrhenius $3_S.LO_2$

ANEXO 3

EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO SOBRE LA HIDRÓLISIS DE UREA.

Para los cultivos LO_2 y EGO_2 y se realizaron dos enriquecimientos por cultivo en medio Stuart y se calcularon μ_{max} y K_s mediante la obtención de la pendiente. Con la velocidad promedio se procedió a la estimación de K_s y μ_{max} mediante la linearización de los datos graficando sus recíprocos.

Cultivo: EGO_2 .

Medio de cultivo: Stuart

Número de enriquecimientos: 2

Temperatura de incubación: $40^\circ C$

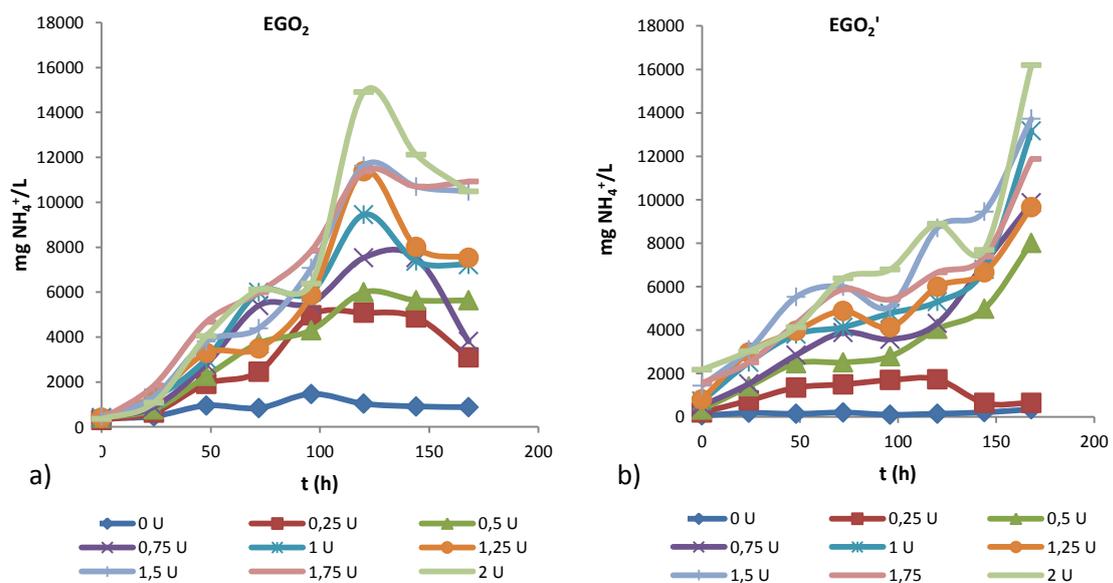


Figura 44. Perfiles de producción de amonio del cultivo EGO_2 , a diferentes concentraciones de sustrato; a) primer enriquecimiento y b) segundo enriquecimiento.

Tabla 44. Concentraciones de urea, velocidad de producción de amonio e inversos del cultivo EGO₂, primero y segundo enriquecimientos.

% U	U (g /L)	V (mg NH ₄ ⁺ /Lh)	R ²	S(U) (mM)	V (mg NH ₄ ⁺ /mg proteína h)	V mM NH ₄ ⁺ /h	1/S	1/V h /mM NH ₄ ⁺
Primer enriquecimiento								
0	0	12.052	0.967	0.000	0.022	0.000	0.000	2 401.517
0.25	2.5	44.513	0.936	0.042	0.632	0.002	24.024	404.374
0.5	5	47.214	0.980	0.083	0.484	0.003	12.012	381.246
0.75	7.5	60.710	0.983	0.125	0.14	0.003	8.008	296.493
1	10	73.171	0.964	0.167	0.463	0.004	6.006	246.001
1.25	12.5	84.262	0.910	0.208	0.294	0.005	4.805	213.618
1.5	15	89.710	0.955	0.250	0.246	0.005	4.004	200.646
1.75	17.5	89.399	0.984	0.291	0.406	0.005	3.432	201.344
2	20	127.788	0.968	0.333	0.290	0.007	3.003	140.858
Segundo enriquecimiento								
0	0	1.022	0.483	0.000	0.006	0.000	0.000	17 607.698
0.25	2.5	12.613	0.879	0.042	0.046	0.001	24.024	1427.125
0.5	5	29.072	0.950	0.083	0.073	0.002	12.012	619.147
0.75	7.5	31.116	0.897	0.125	0.107	0.002	8.008	578.481
1	10	35.661	0.916	0.167	0.194	0.002	6.006	504.760
1.25	12.5	40.997	0.917	0.208	0.191	0.002	4.805	439.053
1.5	15	55.045	0.972	0.250	0.209	0.003	4.004	327.006
1.75	17.5	40.552	0.938	0.291	0.186	0.002	3.432	443.871
2	20	58.375	0.982	0.333	0.130	0.003	3.003	308.349

Cultivo: LO₂.
Medio de cultivo: Stuart
Número de enriquecimientos: 2
Temperatura de incubación: 29°C

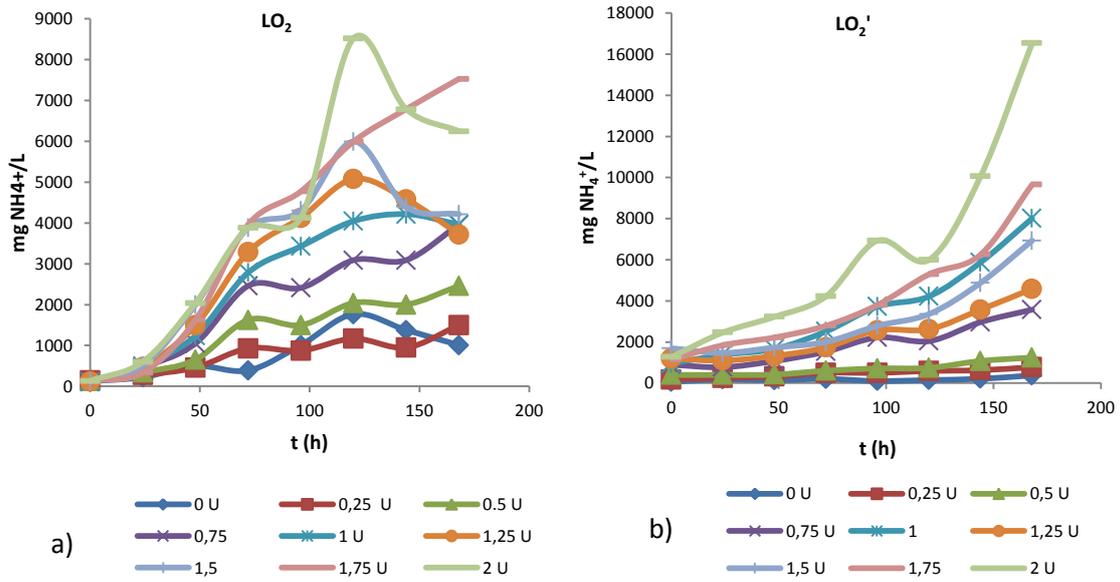


Figura 45. Perfiles de producción de amonio del cultivo LO₂, a diferentes concentraciones de sustrato; a) primer enriquecimiento y b) segundo enriquecimiento.

Tabla 45. Concentraciones de urea, velocidad de producción de amonio e inversos del cultivo LO₂, primero y segundo enriquecimientos.

% U	U (g /L)	V (mg NH ₄ ⁺ /Lh)	R ²	S(U) (mM)	V (mg NH ₄ ⁺ /mg proteína h)	V mM NH ₄ ⁺ /h	1/S	1/V h /mM NH ₄ ⁺
Primer enriquecimiento								
0	0	14.373	0.963	0.000	0.137	0.001	0.000	1252.350
0.25	2.5	8.701	0.988	0.042	0.025	0.000	24.024	2068.647
0.5	5	16.441	0.981	0.083	0.063	0.001	12.012	1094.837
0.75	7.5	25.514	0.989	0.125	0.292	0.001	8.008	705.507
1	10	33.974	0.983	0.167	0.227	0.002	6.006	529.824
1.25	12.5	43.168	0.977	0.208	0.222	0.002	4.805	416.978
1.5	15	51.276	0.981	0.250	0.168	0.003	4.004	351.042
1.75	17.5	51.728	0.966	0.291	0.622	0.003	3.432	347.974
2	20	73.499	0.963	0.333	0.399	0.004	3.003	244.902
Segundo enriquecimiento								
0	0	0.593	0.845	0.000	0.004	0.0000	0.000	30376.519
0.25	2.5	3.599	0.956	0.042	0.014	0.0002	24.024	5001.232
0.5	5	3.256	0.873	0.083	0.030	0.0002	12.012	5527.976
0.75	7.5	15.356	0.894	0.125	0.043	0.0009	8.008	1172.148
1	10	28.833	0.957	0.167	0.072	0.0016	6.006	624.288
1.25	12.5	17.854	0.937	0.208	0.043	0.0010	4.805	1008.150
1.5	15	20.154	0.952	0.250	0.066	0.0011	4.004	893.112
1.75	17.5	32.377	0.943	0.291	0.371	0.0018	3.432	555.945
2	20	38.761	0.997	0.333	0.276	0.0022	3.003	464.381

Método de linealización para la obtención de K_s y μ_{máx}.

$$\frac{1}{V} = \frac{K_s}{\mu_{máx}} \frac{1}{S} + \frac{1}{\mu_{máx}}$$

Ecuación 18

ANEXO 4
CURVAS DE CALIBRACIÓN

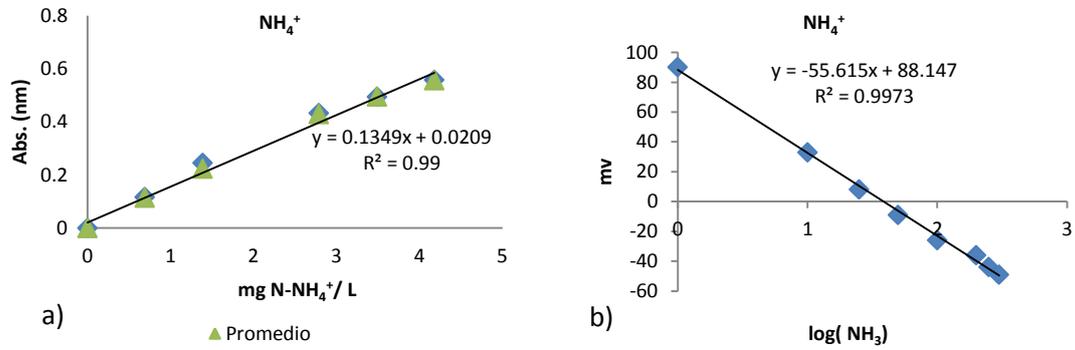


Figura 46. Determinación de amonio a) Método de Nessler b) Electrodo selectivo de amonio

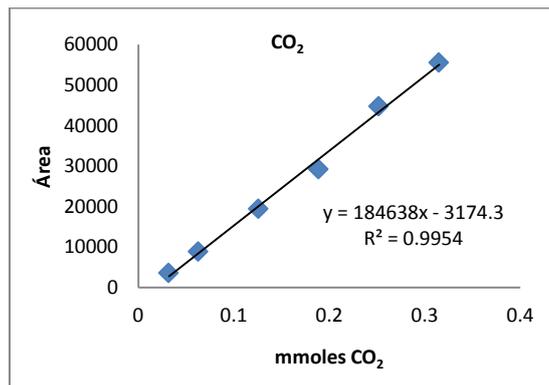


Figura 47. Curva de calibración de CO₂. cromatografía de gases.

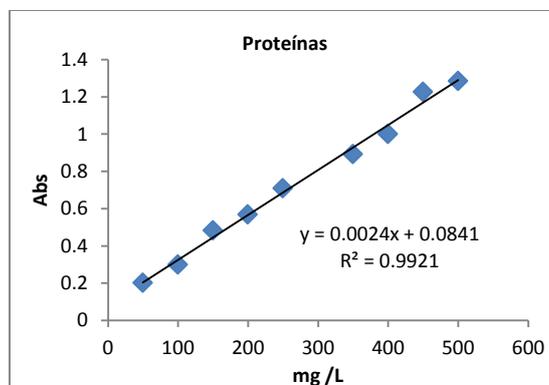


Figura 48. Curva de calibración de proteínas método de Lowry.

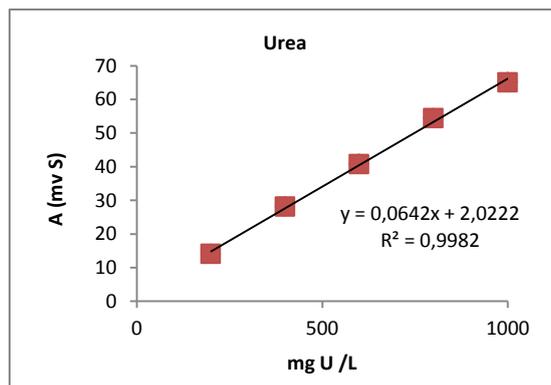


Figura 49. Curva de calibración de Urea por HPLC.