



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Optimización del cultivo de hongos filamentosos para biodegradar espumas de poliéter poliuretano y determinación de actividades enzimáticas relacionadas

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. Ricardo Alfonso González Hernández

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Herminia Loza Tavera

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. José Guillermo Aguilar Osorio

Facultad de Química, UNAM

Dr. Jesús Aguirre Linares

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Ciudad de México, Noviembre, 2016.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue desarrollado con los siguientes apoyos UNAM-DGAPA-PAPIIT IN222811 y UNAM-DGAPA-PAPIIT IN217114 y PAIP-FQ-UNAM 5000-9117, otorgados a Herminia Loza-Tavera.

Se agradece al Proyecto CONACYT 252001 por el Apoyo para Equipamiento otorgado al Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca proporcionada para la realización de mis estudios en la Maestría en Ciencias Bioquímicas, en el periodo comprendido de agosto del 2013 a julio del 2015.

Al Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas de la UNAM, por brindarme la oportunidad de formar parte del mismo y crecer como científico y persona.

A la Doctora Herminia Loza Tavera por todo el apoyo académico y personal brindado a lo largo de la realización de este proyecto, ya que sin sus oportunos consejos no habría logrado desarrollar las actitudes y aptitudes necesarias para mi crecimiento académico.

Al Doctor José Guillermo Aguilar Osorio y Doctor Jesús Aguirre Linares, miembros de mi comité tutorial, por todas las observaciones, consejos y correcciones realizadas a lo largo del desarrollo de este proyecto.

A los Doctores Marcela Ayala Aceves, Jorge Luis Folch Mallol, Agustín López-Munguía Canales, Mauricio Alberto Trujillo Roldán y Miquel Gimeno Seco, miembros de mi comité sinodal, por todo el tiempo y esfuerzo invertido en la revisión de este trabajo.

Al Doctor Martín Vargas Suárez por toda la paciencia y disposición para capacitarme en el manejo de los diferentes equipos y técnicas.

A los profesores y técnicos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química (Conjunto E), por todo el asesoramiento y apoyo recibido para el manejo de equipos y técnicas de análisis.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, en especial a los técnicos Iván Puente Lee y la Q. Georgina Duarte Lisci, por el apoyo brindado en los análisis de microscopía electrónica de barrido y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, respectivamente.

A la Q.F.B. Damaris Cabrero Palomino y a la I.Q. Karla Eriseth Reyes Morales, del laboratorio de análisis térmico, del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM) de la UNAM, por su colaboración en los análisis termogravimétricos.

Al Ing. Gabriel García Batarse, CEO de Espumas Industriales Monterrey SA de CV por proporcionar las espumas de poliuretano y la información sobre su composición química.

A todos mis compañeros del laboratorio 105 que, más que compañeros, demostraron ser una familia para mí a lo largo de este tiempo, siendo una parte fundamental para seguir esforzándome y hacer más llevaderos los obstáculos presentados en el día a día de trabajo experimental.

A mi papá que siempre fue mi modelo a seguir y que pese a que ya no está físicamente, estoy seguro que seguirá siempre con nosotros cuidándonos y guiándonos, desde dónde esté. Nunca terminaré de agradecerte todo lo que me enseñaste.

A mi mamá y mi hermana Brenda, quienes con su fortaleza y determinación, son mi motivación para seguir día con día. Y sé que siempre estarán apoyándome.

A Cristal por todos estos años juntos, por estar conmigo siempre apoyándome en las buenas y las malas, no dejándome decaer en los momentos difíciles.

A todos mis tíos, primos y amigos, así como también a mi madrina Nico, que si bien no les dedico una línea específica a cada uno de ustedes, sepan que los aprecio mucho y les agradezco el que estén conmigo formando parte de los buenos momentos de la vida.

ABREVIATURAS

λ	Longitud de onda
°C	grados Celsius
GC-MS	cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
cm^{-1}	centímetro inverso
Da	dalton
kDa	kilodalton
DTT	ditiotreitól
EtOH	etanol
FTIR	espectroscopia de infrarrojo con transformada de Fourier
g	gramos
mg	miligramos
μg	microgramos
g	gravedades
h	horas
min	minutos
MM	medio mínimo
m/v	masa/volumen
m/z	masa/carga
NBT	nitroazul de tetrazolio
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PB	caldo de papa
PDA	papa dextrosa agar
PDB	caldo papa dextrosa
PIB	caldo de papa Impranil [®]
PPLB	caldo de papa Poly Lack [®]
PBSE	caldo de papa sin espuma de poliuretano
PU	poliuretano

PE-PU	poliéter poliuretano
PS-PU	poliéster poliuretano
rpm	revoluciones por minuto
s	segundos
SDS	dodecil sulfato de sodio
SEM	microscopía electrónica de barrido
SN	sobrenadante
TDI	diisocianato de tolueno
TGA	análisis termogravimétrico
UV	ultravioleta

ÍNDICE DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	ii
ABREVIATURAS.....	iv
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS.....	viii
1. Resumen.....	x
1. Abstract.....	xi
2. Introducción.....	1
3. Antecedentes.....	2
3.1. Poliuretano.....	2
3.2. Tratamiento de residuos de PU.....	3
3.3. Biodegradación de PU.....	4
3.4. Hongos en la biodegradación de PU.....	5
3.5. Antecedentes del proyecto.....	8
4. Hipótesis.....	10
5. Objetivos.....	10
5.1. Objetivos generales.....	10
5.2. Objetivos particulares.....	10
6. Estrategia experimental.....	11
7. Materiales y métodos.....	12
7.1. Medios de cultivo y disoluciones.....	12
7.2. Catálogo de características morfológicas del crecimiento de los hongos.....	12
7.3. Identificación de las cepas de hongos.....	12
7.4. Conservación de las cepas de hongos filamentosos capaces de crecer en PU..	12
7.5. Estandarización del método para cuantificar la degradación de las espumas de PE-PU.....	15
7.6. Efecto del uso de diferentes inóculos sobre la degradación de espumas de PE-PU.....	16
7.6.1. Inóculo con conidias.....	17
7.6.2. Inóculo con biomasa (micelio y conidias).....	17
7.6.3. Inóculo con sólo micelio.....	18
7.6.4. Inóculo con conidias germinadas.....	19
7.7. Pruebas de bioestimulación para mejorar la degradación de las espumas de PE-PU.....	19
7.7.1. Efecto de cultivar con o sin agitación sobre la degradación del PU	20
7.8. Análisis de la degradación de las espumas de PE-PU por hongos.....	21

7.8.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM).....	21
7.8.2. Cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS).....	21
7.8.3. Termogravimetría.....	23
7.8.4. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR).....	24
7.9. Identificación de las cepas de hongos.....	24
7.9.1. Ensayos de difusión radial.....	25
7.9.2. Zimografías.....	26
8. Resultados y discusión.....	30
8.1. Catálogo de características morfológicas del crecimiento de los hongos	30
8.2. Identificación de las cepas estudiadas.....	30
8.3. Determinación del mejor sistema de conservación de las cepas.....	32
8.4. Selección de cepas y determinación del método más efectivo para eliminar el micelio de las espumas de PE-PU y poder cuantificar su degradación.....	33
8.5. Efecto del tipo de inóculo sobre la degradación de las espumas de PE-PU.....	36
8.6. Efecto de la bioestimulación sobre la biodegradación de espumas de PE-PU ...	43
8.7. Efecto de las condiciones agitación/estático sobre la degradación de las espumas de PE-PU.....	50
8.8. Análisis de la actividad degradativa de los hongos sobre las espumas de PE-PU.....	54
8.8.1. Análisis del daño estructural de las espumas cultivadas con los cuatro hongos más degradadores	54
8.8.2. Análisis del daño estructural de las espumas cultivadas con los cuatro hongos más degradadores	56
8.8.3. Análisis del daño estructural y químico de las espumas generado por A3.I.1 cultivada con distintos bioestimulantes.....	65
8.9. Identificación de algunas actividades enzimáticas	72
9. Conclusiones.....	78
10. Perspectivas.....	80
Anexo 1. Preparación de medios y reactivos.....	81
Anexo 2. Características morfológicas del crecimiento de hongos.....	88
Anexo 3. Identificación de las cepas de hongos	101
Anexo 4. Metodología para eliminar micelio de las espumas	106
Anexo 5. Espectros de masas de los compuestos identificados mediante GC-MS	107
11. Referencias.....	117

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figuras

Figura 1	Reacción general para la síntesis de poliuretanos.....	2
Figura 2	Algunos precursores de la síntesis de poliuretano.....	3
Figura 3	Degradación de espumas de PE-PU con hongos filamentosos.....	9
Figura 4	Seguimiento temporal del crecimiento de la cepa A3.I.1 en la espuma de PE-PU.....	35
Figura 5	Ensayos preliminares de degradación de espumas de PE-PU.....	35
Figura 6	Evaluación del efecto de la concentración y tiempo de exposición al NaClO sobre las espumas de PE-PU.....	36
Figura 7	Evaluación del tiempo mínimo para eliminar el micelio de las espumas.....	37
Figura 8	Efecto del tipo de inóculo en la degradación de espumas de PE-PU por hongos filamentosos.....	39
Figura 9	Observación microscópica de conidias germinadas y no germinadas de la cepa A3.I.1.....	40
Figura 10	Degradación de espumas de PE-PU inoculando con conidias germinadas de diferentes hongos filamentosos.....	43
Figura 11	Efecto de los bioestimulantes al 0.5% sobre la biodegradación de espumas de PE-PU.....	48
Figura 12	Efecto de los bioestimulantes al 0.25% sobre la biodegradación de espumas de PE-PU.....	51
Figura 13	Degradación con diferentes regímenes de cultivo agitación-estático.....	53
Figura 14	Análisis del daño estructural de las espumas de PE-PU.....	55
Figura 15	Cromatogramas de los compuestos detectados en las espumas disueltas con etanol.....	60
Figura 16	Cromatogramas de los compuestos detectados en los sobrenadantes del cultivo de A3.I.1 con la espuma.....	63
Figura 17	Análisis del daño estructural de las espumas de PE-PU generadas por el hongo A3.I.1 cultivado en condiciones de bioestimulación.....	67
Figura 18	Termogramas de las espumas de PE-PU tratadas con A3.I.1 cultivado en diferentes condiciones de bioestimulación.....	68
Figura 19	Espectros de FTIR de las espumas de PE-PU cultivadas con A3.I.1 en las diferentes condiciones de bioestimulación.....	71
Figura 20	Ensayos de difusión radial con proteínas extracelulares de distintos cultivos de A3.I.1 con espumas de PE-PU.....	74
Figura 21	Zimografías de los sobrenadantes de cultivo de A3.I.1.....	75
Figura 22	Posibles mecanismos de hidrólisis propuestos para la ruptura del grupo uretano por las diferentes enzimas hidrolíticas.....	77

Tablas

Tabla 1	Hongos con capacidad de degradar PU y las posibles actividades enzimáticas involucradas.....	6
Tabla 2	Régimen de cultivos en agitación-estático.....	20
Tabla 3	Identificación de las cepas de hongos seleccionadas por su capacidad de crecer en MM con Poly Lack®.....	31
Tabla 4	Efecto del método de conservación en el vigor de las cepas de hongos.....	33
Tabla 5	Resultado de las pruebas de viabilidad y tiempo de germinación en medio mínimo dextrosa.....	41
Tabla 6	Resultado de las pruebas de viabilidad y tiempo de germinación en medio mínimo dextrosa suplementando con extracto de levadura.....	42
Tabla 7	Compuestos detectados por GC-MS en las espumas disueltas con etanol.....	61
Tabla 8	Compuestos* detectados mediante GC-MS en los sobrenadantes del cultivo.....	62
Tabla 9	Grupos funcionales presentes en los PUs y longitudes de onda de los espectros de infrarrojo relacionadas.....	64
Tabla 10	Relación de la degradación de las espumas de PE-PU y las actividades enzimáticas determinadas por difusión radial.....	76
Tabla 11	Condiciones de reacción para la PCR con los primers ITS1 y D2.....	102

1. Resumen

Los poliuretanos (PU) son polímeros sintéticos muy resistentes a la degradación y con una amplia gama de propiedades, por lo cual son altamente demandados en diversos ámbitos productivos. Estas propiedades se deben a la gran variedad de precursores empleados en su síntesis. Lamentablemente la sobreproducción de estos materiales, aunada a la dificultad para reciclar y eliminar sus residuos, ha generado su acumulación exacerbada en el medio ambiente. En el presente trabajo se evaluó la capacidad degradativa sobre espumas de poliéter poliuretano (PE-PU) de 13 cepas de hongos filamentosos, aislados previamente en nuestro laboratorio, con el propósito de determinar algunas condiciones de cultivo y bioestimulación que incrementaran esta capacidad. Se determinó que inoculando con conidias, en vez de con micelio, se obtenían los mejores niveles de degradación en las cepas A3.I.1, A2.PP.5, T1.PL.1 y BP3.I.9. Posteriormente con las tres cepas más degradadoras, T1.PL.1 (*Cladosporium pseudocladosporioides*), A3.I.1 y A2.PP.5 (*Cladosporium tenuissimum*), se evaluó el efecto bioestimulante de dos concentraciones (0.5% y 0.25%) de dextrosa y dos barnices de PU, Impranil[®] y Poly Lack[®]. También se evaluó el efecto de la agitación de los cultivos sobre la actividad de los hongos para degradar el PU. La cepa A3.I.1 fue capaz de degradar más del 65% de la espuma al cultivarla en medio caldo de papa (PB) adicionado con 0.25% de Poly Lack[®] en un régimen de 14 días en agitación/7 días estático. Por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS), fue posible identificar diisocianato de tolueno (TDI) y un compuesto relacionado con el adipato de bis(2-etilhexilo) en las espumas cultivadas con A3.I.1 en PDB 50%. Por otra parte en las espumas provenientes de los cultivos de A3.I.1 con bioestimulantes, se observó, por microscopía electrónica de barrido, termogravimetría y espectroscopia de FTIR, que los mayores daños estructurales y químicos se presentaban al emplear a la cepa A3.I.1 cultivada con 0.25% de Poly Lack[®] como bioestimulante. Por último, se buscaron las posibles actividades enzimáticas relacionadas con la biodegradación de las espumas de PE-PU en la cepa A3.I.1 empleando la mejor condición para la degradación, mediante ensayos de difusión radial y zimografías. Actividades esterasa y ureasa fueron detectadas en estos cultivos, pero no se observaron en los cultivos sin PU, lo cual sugiere que estas actividades enzimáticas podrían estar involucradas en la degradación de las espumas de PE-PU.

1. Abstract

Polyurethanes (PU) are synthetic polymers highly resistant to degradation, and highly demanded because their wide range of properties. This versatility is due to the diverse variety of precursors used in their synthesis. Unfortunately, overproduction of these materials, and the difficulty to recycle or eliminate their waste, has generated their exacerbated accumulation in the environment. In this work, 13 strains of filamentous fungi, previously isolated in our laboratory, were studied in order to increase their degradative efficiency over polyether polyurethane foams (PE-PU). It was determined that inoculating with conidia, instead of mycelia, the best levels of degradation in strains A3.I.1, A2.PP.5, T1.PL.1 and BP3.I.9 were obtained. The bio-stimulating effect of two concentrations (0.5% and 0.25%) of dextrose and two PU varnishes, Impranil[®], a PS-PU and Poly Lack[®], a PE-PU, were evaluated in the three most degradative strains, A3.I.1 and A2.PP.5 (*Cladosporium tenuissimum*), and T1.PL.1 (*Cladosporium pseudocladosporioides*). The effect of agitation during fungi cultivation, on PU degradation, was also evaluated. Strain A3.I.1 was able to degrade more than 65% of the foam by cultivating it in potato broth (PB) added with 0.25% Poly Lack[®] in a 14 day agitation/7 day static regime. By gas chromatography-mass spectrometry, toluene diisocyanate (TDI) and a compound related to bis(2-ethylhexyl) adipate were identified in foams inoculated with A3.I.1 in 50% PDB medium. Also, in the foams incubated with A3.I.1 in media with biostimulants, it was observed by scanning electron microscopy, thermogravimetry and FTIR spectroscopy, that the greatest structural and chemical damages were generated when Poly Lack[®] at 0.25% was used as biostimulant. Finally, putative enzymatic activities involved in the biodegradation of PE-PU foams by the strain A3.I.1 were looked by using radial diffusion and zymography, at the best degradation condition. Esterase and urease activities were detected in cultures with PE-PU foams, which were not detected in cultures without PU. These results suggest that these enzymatic activities could be involved in the degradation of the PE-PU foams.

2. Introducción

Los poliuretanos (PUs) son una familia de polímeros sintéticos que por su gran versatilidad son ampliamente utilizados en diversos ámbitos de la vida moderna, como en la fabricación de automóviles, textiles, materiales de construcción, barnices, adhesivos, entre muchos otros (Howard, 2002). Debido a las ventajas que ofrecen los PUs de resistencia a la degradación y flexibilidad variable, existe una alta demanda de estos materiales sintéticos, representando más del 30% de la producción total de plásticos a nivel mundial (más de 10 Mt/año). Entre el 20 y 25% de PU total corresponde a la producción de espumas, generando un problema ecológico de gran impacto (Cregut *et al.*, 2013, Plastics Europe, 2015). En México, se estima que la producción de PUs asciende a cerca de 257,700 ton anuales, pero en el periodo del 2006 al 2011 ha habido un incremento en producción (Conde-Ortiz, 2012), por lo cual la cantidad de residuos generados de este material es inmensa.

La principal problemática derivada de la alta producción de este tipo de polímeros se debe a que sus residuos son difíciles de reciclar ya que pueden reutilizarse muy pocas veces. Además que los métodos para eliminarlos son poco eficientes, costosos o muy contaminantes. Todo esto ha propiciado la acumulación de los residuos de los PUs en el medio ambiente generando un grave problema, ya que propician el desarrollo de ambientes nocivos que pueden afectar a la mayoría de los seres vivos. Por esta razón ha surgido la necesidad de desarrollar nuevas estrategias como la biodegradación apoyada con microorganismos para la eliminación segura de estos residuos, generando el menor impacto posible al medio ambiente.

Desde finales de la década de los sesentas se sabe que los microorganismos, como hongos filamentosos y bacterias, son capaces de degradar a los PUs y los aditivos que estos poseen, principalmente moléculas que poseen una alta proporción de segmentos hidrolizables como ésteres o carbamatos, lo cual ha sido evidenciado en diversos estudios (Darby y Kaplan, 1968; Nakajima-Kambe *et al.*, 1995; Solís-González, 2008; Ocegüera-Cervantes *et al.*, 2007). Por lo anterior, es necesario desarrollar procesos biotecnológicos que utilicen a microorganismos capaces de biodegradar a los PUs, generando sistemas altamente eficientes, con los cuales se puedan eliminar adecuadamente los residuos de estos polímeros sintéticos.

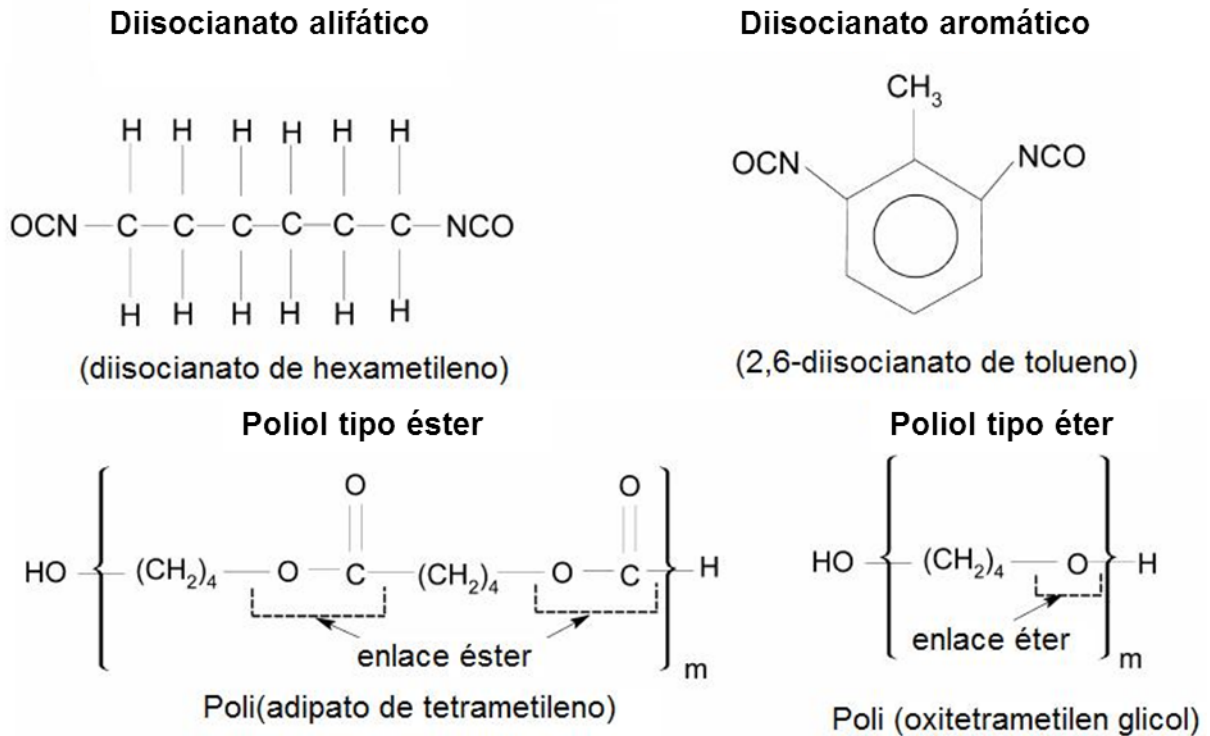


Figura 2. Algunos precursores de la síntesis de poliuretano (adaptado de Gautam *et al.*, 2007).

3.2. Tratamiento de residuos de PU

Los métodos empleados para el tratamiento de residuos de PU pueden ser físicos, los cuales consisten en desintegrar mecánicamente los residuos sólidos (molienda) para posteriormente mezclarlos con aditivos para reciclar el PU. Sin embargo, cada vez que el PU se recicla va perdiendo sus propiedades, por lo cual el reciclado está limitado a un número pequeño de veces. Por esta razón se emplean los métodos químicos, para intentar degradar el polímero, incluyendo hidrólisis, pirólisis, hidrogenación e incineración, siendo la incineración el más efectivo, aunque en el proceso se generan diversas especies tóxicas como radicales libres y compuestos aromáticos (Boutin *et al.*, 2004; Baur *et al.*, 1994).

Como se puede observar el principal problema que existe con estos polímeros, generalmente de alto peso molecular, radica en que son difíciles de degradar y los tratamientos para eliminarlos tienen repercusiones ecológicas y económicas muy diversas (Cregut *et al.*, 2013). Por esta razón los residuos de PU se han acumulado de manera exacerbada en el medio ambiente como desperdicios, generando un grave

problema ecológico. Por lo anterior es necesario desarrollar e implementar sistemas que permitan incrementar la eficacia de la degradación de estos polímeros y disminuyan el costo para llevarla a cabo. Entre estas posibilidades destaca la biodegradación con microorganismos, los cuales poseen diversos sistemas enzimáticos que pueden representar una alternativa viable para el tratamiento de los PUs.

3.3. Biodegradación de PU

Los microorganismos son los principales agentes responsables de la degradación de compuestos en el medio ambiente (Cosgrove *et al.*, 2007). Desde hace décadas se han realizado investigaciones enfocadas a encontrar organismos capaces de degradar diferentes tipos de xenobióticos. Por su amplio potencial biodegradativo, los microorganismos han sido empleados para la biorremediación de áreas contaminadas, para eliminar compuestos nocivos e impedir así su acumulación en el ambiente (Anastasi *et al.*, 2012; Cosgrove *et al.*, 2007, 2010; Cregut *et al.*, 2013). Para poder llevar a cabo estos procesos se requiere identificar y aislar microorganismos con la capacidad de degradar a los diferentes xenobióticos, identificar las condiciones en las cuales estos organismos actúan a su mayor capacidad degradativa, y en algunos casos determinar si es necesario suministrarles fuentes de nutrientes y energía, que favorezcan su rápido crecimiento y la inducción de algunas actividades enzimáticas (bioestimulación) que consecuentemente generen una mayor degradación de los contaminantes (Corton y Viale, 2006).

Debido a que los PUs son compuestos recalcitrantes, como muchos otros plásticos, se consideraba que no eran biodegradables. Sin embargo, en diversos estudios se ha demostrado que existen microorganismos capaces de utilizarlo como fuente de nutrientes. En 1968, se publicó el primer trabajo donde reportaron la existencia de hongos filamentosos capaces de atacar PUs observando que los PS-PU eran más susceptibles al ataque de los hongos que los PE-PU (Darby y Kaplan, 1968). A partir de entonces, se han identificado diversas cepas bacterianas capaces de utilizar al PU como fuente de carbono, entre las que se encuentran, *Corynebacterium sp.* (Kay *et al.*, 1993), *Comamonas acidovorans* TB-35 (Nakajima-Kambe *et al.*, 1995), *Pseudomonas fluorescens* (Howard y Blake, 1998), *P. chlororaphis* (Howard *et al.*, 1999), *Bacillus subtilis* (Rowe y Howard, 2002; Shah *et al.*, 2013), *Acinetobacter gernerii* (Howard *et al.*,

2012), *Pseudomonas putida* (Peng *et al.*, 2014) y *Alicyclophilus sp.*, BQ1, BQ5 y BQ8, aisladas en nuestro laboratorio (Solís-González, 2008; Ocegüera-Cervantes *et al.*, 2007).

3.4. Hongos en la biodegradación de PU

La mayoría de los hongos son saprófitos, es decir pueden utilizar materia orgánica (compleja) en descomposición como fuente de nutrientes, tales como biomasa animal (como estiércoles), o vegetal (celulosa, hemicelulosa: xilanos, glucomanos, lignina, entre otros). Son muy activos metabólicamente, poseen una amplia variedad de enzimas, por lo cual son capaces de proliferar en ambientes adversos, donde los nutrientes escasean y hay poca humedad. Esta capacidad metabólica les ha permitido emplear polímeros naturales recalcitrantes como la celulosa y la lignina, como fuente de nutrientes. Los polímeros naturales son transformados de moléculas de alto peso molecular a moléculas con pesos moleculares pequeños. Las hidrolasas y oxidasas son los dos principales tipos de enzimas involucradas en la degradación de polímeros naturales (Morgenstern *et al.*, 2014). En diversos estudios de biodegradación de PUs, empleando diferentes hongos, se ha propuesto que actividades enzimáticas de tipo hidrolasa tales como esterases, proteasas y ureasas, además de oxidasas como lacasas, podrían estar involucradas en su degradación (Crabbe *et al.*, 1999; Ibrahim *et al.*, 2009; Loredó-Treviño *et al.*, 2011; Mathur y Prasad, 2012; Matsumiya *et al.*, 2010; Pathirana y Seal, 1983; Russell *et al.*, 2011) (Tabla 1).

Como puede observarse en la Tabla 1, la mayor cantidad de reportes sobre actividades enzimáticas que pudieran atacar al PU corresponde a esterases y proteasas. Crabbe y colaboradores (1994) reportaron una cepa de *Curvularia senegalensis* capaz de degradar PE-PU. Este hongo, en presencia de PU, produjo una enzima extracelular de 28 kDa con propiedades de esterasa. Ibrahim *et al.* (2009) reportó una proteasa de *Alternaria solani* con la capacidad para degradar PS-PU. En un estudio de la capacidad degradativa de algunos hongos endofíticos sobre una suspensión de un barniz de PU (Impranil DLN[®]), se lograron valores de aclaramiento superiores al 60%. Además, se observó que, al cultivar una cepa de *Pestalotiopsis microspora* en un medio mínimo con PU, se inducía una proteasa extracelular tipo serina hidrolasa que no se presentaba al cultivarla en un medio rico (Russell *et al.*, 2011). Asimismo, se ha reportado la detección

de una actividad esterasa en una cepa de *Aspergillus flavus* cultivada en medio mínimo líquido con PU (Mathur y Prasad, 2012).

Tabla 1. Hongos con capacidad de degradar PU y las posibles actividades enzimáticas involucradas.

Hongo	Tipo de PU	Actividades enzimáticas	Referencia
<i>Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Chaetomium globosum, Penicillium funiculosum, Pullularia pullulans, Trichoderma sp.</i>	PS-PU y PE-PU	No reportadas	Darby y Kaplan, 1968
<i>Aspergillus niger, Cladosporium herbarum</i>	PE-PU	No reportada	Filip, 1979
<i>Aspergillus fumigatus, Gliocladium roseum, Penicillium citrium</i>	No reportado	Esterasa, proteasa	Pathirana y Seal, 1984
<i>Chaetomium globosum, Aspergillus terreus</i>	PS-PU	Esterasa y proteasa	Boubendir, 1993
<i>Curvularia senegalensis, Fusarium solani, Aureobasidium pullulans, Cladosporium sp.</i>	PS-PU	Esterasa	Crabbe <i>et al.</i> , 1994
<i>Exophiala jeanselmei</i>	PS-PU	No reportadas	Owen <i>et al.</i> , 1996
<i>Nectria gliocladioides, Penicillium ochrocloron, Geomyces pannorum</i>	PS-PU	No reportado	Barratt <i>et al.</i> , 2003
<i>Geomyces pannorum, Penicillium inflatum, Alternaria sp., Neonectria ramulariae, Penicillium viridicatum</i>	PS-PU	No reportadas	Cosgrove <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus niger</i>	PE-PU	No reportadas	Hincapié-Llanos <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria solani</i>	No reportado	Proteasa, ureasa y esterasa	Ibrahim <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida antarctica</i>	PS-PU	Lipasa	Shibasaki <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria sp. PURDK2</i>	PE-PU	Ureasa	Matsumiya <i>et al.</i> , 2009
<i>Nectria haematococca, Penicillium viridicatum, Penicillium ochrocloron, Mucormycotina sp.</i>	PS-PU	No reportadas	Cosgrove <i>et al.</i> , 2010
<i>Pestalotiopsis microspora, Alternaria sp., Plectosphaerella sp., Bionectria sp., Nectria sp., Phaeosphaeria sp.</i>	PS-PU	Proteasa	Russell <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus sp., Trichoderma sp., Paecilomyces sp., Penicillium sp., Alternaria sp., Fusarium sp.</i>	No reportado	Proteasa, ureasa, esterasa y lacasa	Loredo-Treviño <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus flavus</i>	PS-PU	Esterasa	Mathur y Prasad, 2012
<i>Volutella ciliata, Fusarium solani, Aspergillus fumigatus, Fusarium oxysporum, Trichosporon moniliforme, Penicillium mandriti, Bionectria ochroleuca, Penicillium roseopurpureum, Alternaria sp., Geomyces pannorum, Thermomyces lanuginosus</i>	PS-PU	No reportadas	Zafar <i>et al.</i> , 2013
<i>Candida rugosa, Arthrographis kalrae, Aspergillus fumigatus, Malbranchea cinnamomea, Emericella nidulans, Thermomyces lanuginosus</i>	PS-PU	No reportadas	Zafar <i>et al.</i> , 2014

Por otro lado, evidencias de la posible actividad de ureasa sobre el PU provienen de estudios en *Alternaria* sp. cepa PURDK2 cultivada en presencia de espumas de PU, la cual logró degradar en 10 semanas 27.5% de las espumas de PE-PU (de 0.6 cm³) (Matsumiya *et al.*, 2009). En un estudio similar, donde también se cultivaron hongos con espumas de PE-PU, se detectó la actividad de lacasas, la cual los autores sugieren podría ser otra actividad que ataque a los PUs, en especial a los de tipo PE-PU (Loredo-Treviño *et al.*, 2011).

En la última década se han realizado investigaciones dirigidas a desarrollar métodos para el tratamiento de residuos de PU, uno de los principales grupos que ha abordado este problema es el del Dr. Geoff D. Robson de la Universidad de Manchester, UK, quienes han implementado el uso de compostas para degradar PU. Con la finalidad de conocer cómo ocurre la degradación de los PU en las compostas, se han realizado estudios empleando diferentes tipos de suelos, contenido de humedad y nutrientes en el proceso de compostaje. En estos estudios se han empleado muestras de suelos con diferentes grados de humedad, en los cuales se han logrado reducir la fuerza tensil de laminillas de Impraniil[®] hasta en un 60%. Además de identificar que los hongos filamentosos son los principales microorganismos involucrados en la degradación de los PUs y que las especies predominantes dependen de la humedad, nutrientes y pH del suelo evaluado (Barrat *et al.*, 2003; Cosgrove *et al.*, 2007). En un análisis temporal de la presencia de cepas fúngicas durante el curso del proceso de compostaje y su implicación en la degradación de laminillas de PU, observaron que, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y temperatura de la composta, las cepas fúngicas predominantes variaban (Zafar *et al.*, 2013, 2014).

Actualmente se busca mejorar los procesos de biodegradación de xenobióticos con microorganismos, para tener procesos más eficientes, para lo cual la bioestimulación ha surgido como una opción muy viable. La bioestimulación es una técnica que consiste en la modificación del ambiente para estimular a los microorganismos encargados de la biodegradación de un xenobiótico. Se ha observado en diversos estudios que esto se puede lograr mediante la adición en el cultivo de nutrientes limitantes, donadores o aceptores de electrones y moléculas que, si bien no se conoce el mecanismo

específico, inducen actividades enzimáticas específicas, en una concentración suficiente para no inhibir la biodegradación (Kannisery *et al.*, 2011; Adams *et al.*, 2014). La bioestimulación ha resultado una estrategia muy útil para la degradación de xenobióticos como hidrocarburos (Margesin y Schinner, 2001), compuestos organohalogenados (Baker *et al.*, 2001) y metales pesados (Cardenas *et al.*, 2008). Sin embargo, en cuanto al uso de la bioestimulación para la degradación de PU, sólo existe un reporte en donde, adicionando extracto de levadura y el barniz de PS-PU Impranil® a cultivos en suspensiones acuosas inoculados con muestras de suelo, se logra la disminución de la fuerza tensil de laminillas de Impranil en cerca del 50%, después de 12 semanas de cultivo (Cosgrove *et al.*, 2010).

Toda la información recopilada sugiere que es posible diseñar bioprocesos a gran escala para el tratamiento de los PU, además que la bioestimulación es una alternativa potencial para incrementar la capacidad de degradación de PUs con hongos, lo cual abre nuevas alternativas de estudio del desarrollo de bioprocesos usando hongos o consorcios microbianos para degradar residuos de PU.

3.5. Antecedentes del proyecto

En nuestro laboratorio se aislaron, a partir de tres ambientes distintos (tierra, aire y muestras del basurero Bordo Poniente), cepas de hongos capaces de crecer en medios mínimos que contienen dos distintos barnices de PU como única fuente de carbono. Los barnices empleados fueron Impranil® DLN, un barniz de PS-PU y Poly Lack® un barniz de PE-PU, ambos base agua. Se obtuvieron 31 cepas capaces de crecer en Impranil y 22 cepas que crecieron en Poly Lack, todas las cepas que crecieron en Poly Lack crecieron también en Impranil. Se cuantificó la degradación del Impranil por acción de los hongos filamentosos, empleando una técnica espectrofotométrica y espectroscopía de infrarrojo (FTIR). Como resultado del estudio se seleccionaron ocho cepas de hongos filamentosos capaces de degradar más del 70% del barniz. Por otra parte, se evaluó la capacidad degradativa de estos ocho hongos sobre dos tipos de espumas de PE-PU, fabricadas a base de diisocianato de tolueno (Mondur 80®) y dos polímeros poliólicos a base de óxido de etileno y propiléter. Además, una de las espumas contenía un compuesto halogenofosfatado [Tris (1,3-dicloroisopropil) fosfato] (TDPP) empleado como retardante de flama (espuma A). Se observó que, cuatro cepas

de los hongos evaluados degradaron más del 40% de las espumas de PE-PU que no tenían retardante de flama (espuma B), en 21 días de incubación en medio líquido papa dextrosa (PDB) al 50%, mientras que la espuma que tenía el retardante de flama fue degradada en menor proporción, un 25% como máximo (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016) (Figura 3).

Además, empleando medios diferenciales, se determinó si los hongos seleccionados presentaban actividades de tipo esterasa, proteasa y ureasa, las cuales se han reportado como enzimas involucradas en la degradación de los PUs. Seis de las ocho cepas evaluadas presentaron las tres actividades, mientras que la cepa BP3.IC.2 presentó sólo las actividades proteasa y ureasa y la cepa A2.PL.1 sólo mostró las actividades esterasa y proteasa (Álvarez-Barragán, 2013).

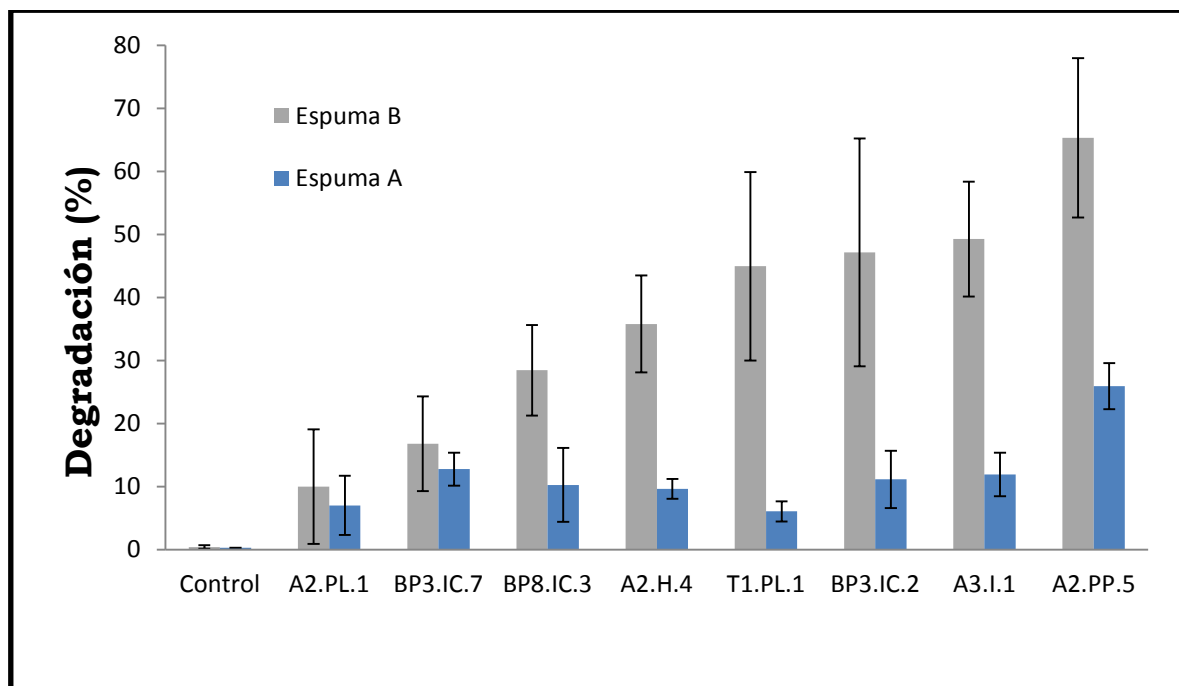


Figura 3. Degradación de espumas de PE-PU con hongos filamentosos. Espuma A: con retardante de flama. Espuma B: sin retardante de flama. Adaptado de Álvarez-Barragán, 2013.

Debido al gran problema que representa la acumulación de desechos de PU sería de gran importancia desarrollar bioprocesos para biodegradar estos polímeros. Para ello es necesario realizar estudios que permitan definir las mejores condiciones para la degradación de PU, tomando en consideración los aspectos fisiológicos de las cepas de hongos, previamente seleccionadas, con el propósito de mejorar la capacidad que tienen de degradar espumas de PE-PU.

4. Hipótesis

Es posible incrementar la eficiencia de los hongos filamentosos para degradar espumas de poliéter poliuretano manipulando algunos parámetros en su cultivo.

5. Objetivos

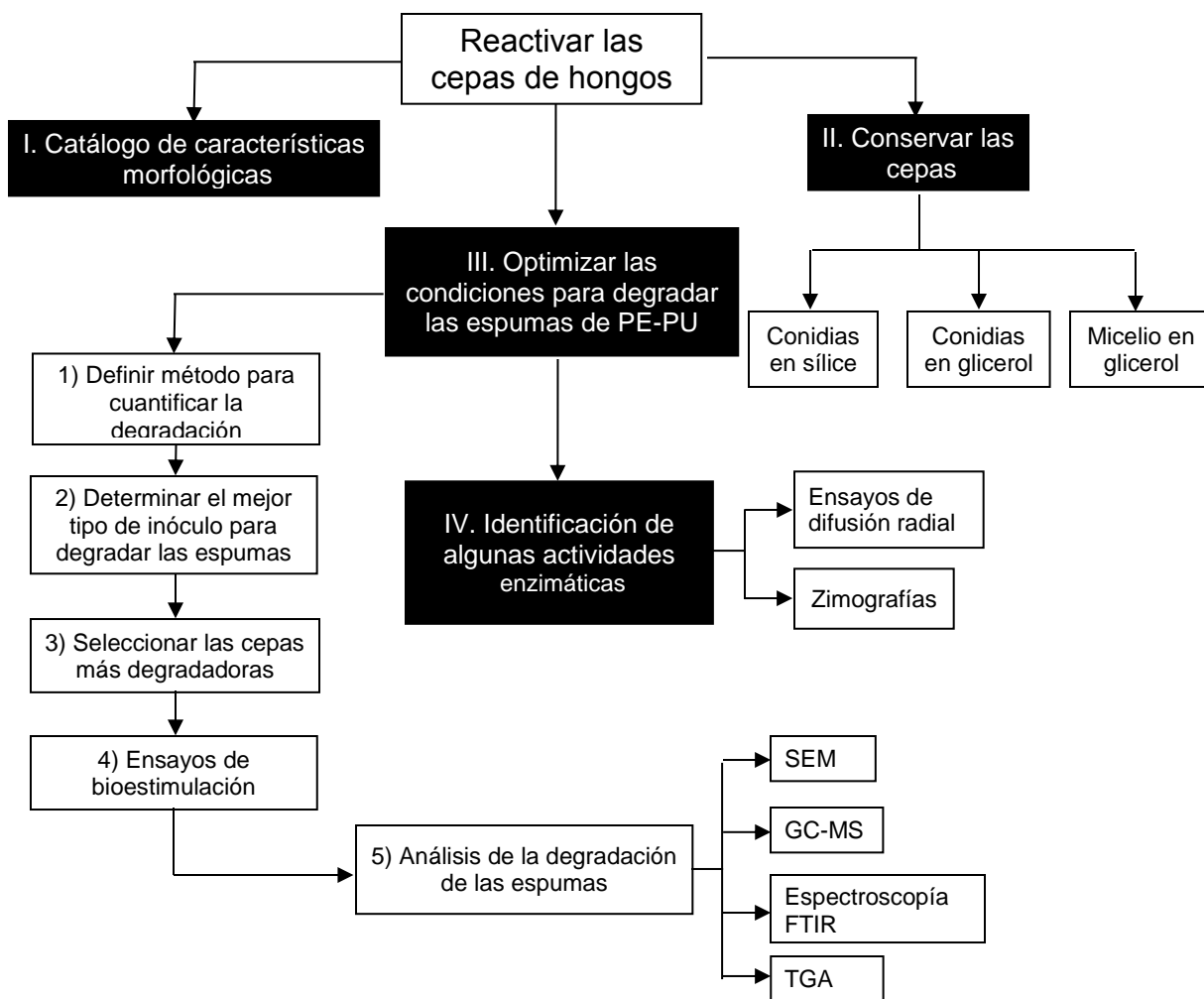
5.1 Objetivos generales

- Optimizar algunas condiciones de cultivo de hongos filamentosos seleccionados por su capacidad de crecer en un barniz de PE-PU (Polylack®), para degradar espumas de poliéter poliuretano (PE-PU).
- Identificar algunas de las actividades enzimáticas involucradas en la degradación de espumas de PE-PU por los hongos filamentosos seleccionados.

5.2 Objetivos particulares

- I. Realizar un catálogo de las características morfológicas de cada hongo filamentosos capaz de crecer en PU.
- II. Determinar las condiciones para la conservación de las cepas de hongos filamentosos capaces de crecer en PU.
- III. Optimizar algunas condiciones de cultivo, para lograr una mayor degradación de espumas de PE-PU.
 - 1) Definir el tratamiento para eliminar el micelio después de su crecimiento en las espumas de PE-PU para cuantificar la pérdida de peso.
 - 2) Determinar el tipo de inóculo (conidias o micelio) que permita una mejor colonización y que conduzca a una mayor degradación de las espumas.
 - 3) Seleccionar los hongos más eficientes para degradar las espumas de PE-PU.
 - 4) Utilizar barnices de PU como bioestimuladores para favorecer la degradación de las espumas por los hongos filamentosos.
 - 5) Analizar la degradación de las espumas, por diversas técnicas analíticas.
- IV. Identificar algunas de las actividades enzimáticas que pudieran estar involucradas en la degradación de las espumas de PE-PU.

6. Estrategia experimental



7. Materiales y métodos

7.1. Medios de cultivo y disoluciones

La preparación de todos los medios de cultivo y disoluciones, empleados para cada uno de los experimentos realizados en este trabajo se describen en el anexo 1.

7.2. Catálogo de características morfológicas del crecimiento de los hongos

Reactivar los hongos filamentosos capaces de crecer en Poly Lack (13 cepas) a partir de conidias que estaban conservadas en piedras de sílice, inoculándolas en una caja Petri con medio PDA. Dejar crecer los hongos durante dos semanas y tomar fotografías por el anverso y reverso de las cajas, para realizar el registro de las características de crecimiento.

El catálogo incluye la descripción de las siguientes características (Anexo 2):

- Crecimiento en medio mineral sólido con Impranil®
- Formación de halo de degradación en Impranil®
- Crecimiento en medio mineral sólido con Poly Lack®
- Aspecto de la colonia
- Tipo de crecimiento
- Pigmentación de la colonia
- Reverso de la colonia
- Tiempo de crecimiento para llenar la caja
- Tiempo de conidiación después de sembrado

7.3. Identificación de las cepas de hongos

Algunas de las cepas seleccionadas por su mayor capacidad de degradar espumas de PE-PU fueron identificadas y reportadas en Alvarez Barragán *et al.*, 2016. Otras cepas fueron identificadas por la Dra. Lilianha Domínguez Malfavón, siguiendo los protocolos descritos en el anexo 3.

7.4. Conservación de las cepas de hongos filamentosos capaces de crecer en PU

Debido a la importancia que tienen estas cepas de hongos filamentosos por su capacidad de degradar el PU, es necesario conservarlas en condiciones en las cuales se mantengan viables para ser reactivadas y que no sufran variaciones genéticas que

afecten la capacidad de degradar el PU. Para ello se probarán tres métodos de almacenamiento.

- **Almacenamiento a temperatura ambiente de conidias adsorbidas en sílice**

1. A partir de cultivos puros del hongo que se desea preservar, tomar una asada del hongo e inocularlo en medio PDA por estría masiva. Incubar a 30 °C en oscuridad.
2. Permitir que el hongo crezca hasta llenar la caja y conidie abundantemente.
3. En condiciones asépticas (campana de flujo laminar), verter 10 mL de solución salina isotónica (SSI) estéril en la caja de Petri con el hongo y raspar cuidadosamente, con un asa Digrafsky, toda la superficie para desprender las conidias.
4. Con una micropipeta de 1 mL coleccionar la suspensión de conidias y colocarla en tubos Falcon estériles.
5. Centrifugar los tubos a 3500 rpm en centrífuga clínica por 5 min y decantar el sobrenadante.
6. Lavar el pellet resuspendiéndolo con 5 mL de SSI estéril y volver a centrifugar 5 min a 3500 rpm y a decantar el sobrenadante. Repetir 2 veces más.
7. En condiciones asépticas resuspender el pellet en 200 µL de una suspensión estéril de leche descremada al 12% (Svelty[®] de Nestle[®]) en agua desionizada.
8. Tomar 100 µL de la suspensión de conidias y adicionarlos a los viales (en baño de hielo) con piedras amorfas de sílice (1 g) (CAS 112926-00-8) (previamente esterilizado en estufa a 180 °C, durante 48 h) y homogeneizar agitando en vórtex.
9. Taparlos ligeramente, etiquetarlos y dejarlos en un lugar fresco durante varios días, hasta que se evapore el exceso de humedad.
10. Inocular 1-3 piedras de sílice en medio PDA para evaluar viabilidad.
11. Las conidias conservadas se mantienen almacenados a TA en un lugar fresco y oscuro.

- **Almacenamiento de micelio con conidias en glicerol a -70 °C.**

1. A partir de cultivos puros del hongo que se desea preservar, tomar una asada e inocularlo en un matraz con 25 mL de medio PDB. Incubar a 30 °C en oscuridad sin agitación.

2. Permitir que el hongo crezca hasta llenar la superficie del medio de cultivo y conidie abundantemente.
 3. En condiciones asépticas macerar la biomasa generada, sin decantar el medio de cultivo, contra la pared del matraz utilizando una varilla de vidrio estéril.
 4. Colectar aproximadamente 100 mg de biomasa (peso húmedo) en tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles, utilizando una micropipeta de 1.0 mL con la punta recortada. Agregar 1 mL de glicerol al 30% en buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 estéril en cada uno.
 5. Congelar los gliceroles que contienen micelio con conidias de cada hongo utilizando nitrógeno líquido y almacenar en ultracongelador de -70 °C.
- **Almacenamiento de conidias en glicerol a -70 °C.**
 1. A partir de cultivos puros del hongo que se desea preservar, tomar una asada del hongo e inocularlo en medio PDA por estría masiva.
 2. Permitir que el hongo crezca hasta llenar la caja y conidie abundantemente.
 3. Adicionar 4 mL de una solución de glicerol al 30% en buffer de fosfatos 50 mM pH 6.5 (estéril) sobre la caja de Petri con el hongo y raspar con asa Digrafsky.
 4. Colectar la suspensión de conidias en tres tubos Eppendorf de 1.5 mL estériles, agregando 1 mL del glicerol con conidias en cada uno.
 5. Congelar el glicerol con conidias de cada hongo utilizando nitrógeno líquido y almacenar en ultracongelador a -70 °C.

Con la finalidad de asegurar que las cepas de hongos fueron conservadas adecuadamente, se realiza una evaluación de la viabilidad de las conidias, después de haber sido almacenadas durante 1, 3, 6, 9 y 12 meses. Para esta evaluación, las cepas de hongos se reactivan, inoculándolas en medio PDA y observando el tiempo que tardan en aparecer colonias (vigor). Se considera como un tiempo de crecimiento rápido (R) cuando el hongo desarrolló suficiente micelio para poder ser sembrado en menos de 1 semana, un tiempo de crecimiento medio (M), cuando demoró entre 1 semana a 2 semanas, y un tiempo de crecimiento lento (L), cuando el tiempo de desarrollo fue mayor a 2 semanas.

7.5. Estandarización del método para cuantificar la degradación de las espumas de PE-PU

Para todos los experimentos se utilizan espumas elaboradas con TDI (Mondur 80[®]) y polioles de óxido de etileno y propiléter (Caradol MD30-45[®] y Caradol SC56-22[®]) como precursores. Las espumas son recortadas con las siguientes dimensiones: 2.5 cm \pm 0.2 cm (largo) x 1.5 cm \pm 0.2 cm (ancho) x 0.7 \pm 0.2 cm (grosso) y un peso aproximado de 55 \pm 3 mg. La degradación de las espumas de PU por ataque de los hongos es cuantificada por la pérdida de peso de la espuma expuesta al crecimiento miceliar. Por lo tanto, es necesario retirar el micelio del hongo que ha crecido sobre la espuma, con un agente que destruya el micelio causando el menor daño posible a la espuma. Previamente se determinó que un tratamiento con hipoclorito de sodio (NaClO) degrada el micelio (Álvarez-Barragán, 2013). Sin embargo, fue necesario estandarizar las condiciones (concentración y tiempo de exposición) para volver el proceso más eficiente y se pudieran tener mediciones precisas de pérdida de peso de la espuma, por acción de los hongos. Para ello se evaluaron dos diluciones de una disolución comercial de hipoclorito de sodio (NaClO) equivalentes a 0.88% y 1.76% m/v, además se probaron tres tiempos de tratamiento (12, 18 y 24 hrs). El procedimiento para eliminar el micelio de la espuma de PE-PU después del cultivo se detalla a continuación:

1. Lavar los cubos de espuma con agua destilada para eliminar restos de polvo, sumergiéndolos y exprimiéndolos en un vaso de precipitados, tres veces, empleando 20 mL de agua destilada por cada cubo de espuma.
2. Colocar las espumas en una estufa con vacío a 40 °C durante 24 h para lograr peso constante (esto se realiza antes de cada ensayo).
3. Colocar cada espuma, previamente pesadas y esterilizadas en autoclave (en tubos de ensaye con tapa) a 120 °C, 15 psi de presión durante 20 min, en cajas Petri estériles y adicionar 25 mL de PDB (50%) estéril.
4. Inocular 100 mg de micelio (peso húmedo) de la cepa A3.I.1, obtenido por cultivo en medio PDB (50%) en matraces de 125 mL e incubar durante 21 días a 30 °C. Adicionalmente se incluye un control sin inocular para monitorear posibles contaminaciones.

5. Colocar cada espuma en un matraz de 125 mL y adicionar 50 mL de la disolución de NaClO por evaluar (0.88 ó 1.76% m/v).
6. Presionar la espuma con una espátula para sumergirla en la solución de hipoclorito de sodio dos a tres veces al principio y repetir esta operación a las 3 h. Incubar durante 12, 18 ó 24 h a temperatura ambiente (TA), sin agitación y en oscuridad.
7. Posteriormente, retirar el hipoclorito de sodio por decantación manteniendo la espuma dentro del matraz.
8. Enjuagar con 20 mL de agua destilada agregándola sobre la espuma, y agitar suavemente en forma circular por 5 s, para retirar el exceso de hipoclorito. Decantar.
9. Lavar cinco veces con 20 mL de agua destilada, agitando a 125 rpm a TA (30 °C) durante 2 min cada vez.
10. Decantar el agua y filtrar por vacío la espuma durante 1 min. Para ello montar un sistema con un embudo Büchner, acoplado a un matraz Kitasato, en el cual se coloca un papel filtro y la espuma encima, con la cara de mayor superficie expuesta.
11. Finalmente, colocar la espuma sobre un papel aluminio pre-pesado y rotulado. Dejar secar en una estufa al vacío a TA hasta peso constante.

Se realizaron 3 ensayos independientes con cuatro repeticiones cada uno, para determinar el porcentaje de degradación de trozos de espuma sin inocular y así estimar el efecto del hipoclorito sobre la espuma. El procedimiento definitivo para la eliminación del micelio de las espumas se detalla en el anexo 4.

7.6. Efecto del uso de diferentes inóculos sobre la degradación de espumas de PE-PU

Los hongos filamentosos han desarrollado estructuras para su reproducción asexual (conidias o micelio) que le permiten tener una mayor y mejor diseminación y colonización en diversos ambientes. Por esta razón es necesario determinar qué tipo de inóculo, de las cepas de hongos filamentosos en estudio, es más efectivo para el establecimiento sobre la espuma y su degradación. Los tipos de inóculo a probar son: biomasa (micelio con conidias), micelio y conidias. El tipo de inóculo más adecuado para el sistema se elegirá tomando en cuenta la mayor capacidad degradativa de los hongos filamentosos sobre las espumas de PE-PU.

Metodología general para evaluar la degradación de espumas de PE-PU por hongos filamentosos:

1. Reactivar las cepas de hongos filamentosos capaces de crecer en Poly Lack[®] inoculándolos en medio PDA por estría masiva.
2. Preparar los inóculos.
3. Colocar una espuma pre-pesada en una caja Petri estéril y adicionar 25 mL de PDB diluido al 50% con agua desionizada estéril.
4. Colocar los inóculos sobre la espuma e incubar durante 21 días a 30 °C recambiando el medio de cultivo cada 7 días (PDB al 50%).
5. Retirar el micelio de los hongos filamentosos de las espumas empleando el método con hipoclorito de sodio (Anexo 4).
6. Cuantificar el peso de las espumas.

7.6.1. Inóculo con conidias

1. Cultivar el hongo, previamente inoculado por estría masiva en medio sólido (PDA), hasta conidiación abundante.
2. Añadir solución salina isotónica (SSI) a la caja con el hongo y raspar suavemente con un asa Digrafsky para cosechar las conidias.
3. Recuperar la suspensión de conidias en un tubo Falcon de 15 mL y centrifugar a 1600 x *g*.
4. Decantar el sobrenadante, añadir 10 mL de SSI al pellet y centrifugar a 1600 x *g*, repetir el procedimiento 4 veces más.
5. Resuspender el pellet en 10 mL de SSI y realizar diluciones, de 1/5 o incluso hasta 1/50, dependiendo de la cantidad de conidias obtenida.
6. Contar en el microscopio con la cámara de Neubauer a 40X el número de conidias por mL de suspensión.
7. Calcular el volumen necesario de suspensión donde se tengan 1 millón de conidias.
8. Colocar el inóculo en un tubo Eppendorf (1.5 mL) y llevar a 200 µL de volumen final.
9. Inocular sobre la espuma.

7.6.2. Inóculo con biomasa (micelio y conidias)

1. Tomar una asada de micelio del hongo reactivado e inocular en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, con 25 mL de PDB (50%) estéril.
2. Incubar hasta que el hongo cubra la superficie del medio (7-10 días).
3. Para cosechar, disgregar la biomasa en condiciones asépticas macerando contra la pared del matraz utilizando una varilla de vidrio estéril. Colectar fragmentos de biomasa en un tubo Eppendorf de 2.0 mL estéril y prepesado, utilizando una micropipeta de 1.0 mL con la punta recortada.
4. Centrifugar a 19,900 x g y decantar el sobrenadante.
5. Ajustar el inóculo a aproximadamente 0.1 g.
6. Resuspender el inóculo en 1 mL de PDB (50%) e inocular sobre la espuma.

7.6.3. Inóculo con sólo micelio

Debido a que algunas especies de hongos filamentosos se diseminan mejor a partir de su micelio se decidió probar como inóculo, exclusivamente micelio, para intentar mejorar la degradación de las espumas de PE-PU. Para obtener pellets sólo de micelio vegetativo, se siguió una metodología recomendada por el Dr. Guillermo Aguilar Osorio, consistente en cultivar cada hongo, inoculado a partir de conidias, en medio líquido con agitación (200 rpm). El procedimiento se describe a continuación:

1. A partir de suspensiones de conidias tomar una alícuota de 500 μ L e inocular en un matraz Erlenmeyer de 125 mL que contenga 25 mL de PDB (50%) estéril.
2. Incubar en agitación (200 rpm) a 30 °C hasta que se formen pellets del hongo (3-5 días).
3. Colectar los pellets y disgregarlos empleando un homogeneizador tipo Potter en condiciones asépticas. A partir del micelio disgregado colectar fragmentos en un tubo Eppendorf de 2.0 mL estéril y prepesado, utilizando una micropipeta de 1.0 mL con la punta recortada.
4. Centrifugar a 19,900 x g y decantar el sobrenadante.
5. Ajustar el inóculo a aproximadamente 0.1 g.
6. Resuspender el inóculo en 1 mL de PDB (50%) e inocular sobre la espuma.

Para todos los ensayos, el control negativo es la espuma sin inocular. Este control sirve para estimar el daño químico que sufre la espuma por causa del tratamiento para eliminar el micelio.

7.6.4 Inóculos con conidias germinadas

Debido a que los hongos presentaron conidias con diferente viabilidad y velocidad de germinación, quisimos determinar si estas variables influían en la degradación de las espumas de PE-PU. Por esta razón, y previamente a la evaluación de la degradación, se determinó el porcentaje de conidias viables y la velocidad de germinación de éstas, para cada cepa, en medio mínimo dextrosa (MM-Dex) y MM-Dex adicionado con extracto de levadura (como bioestimulante de crecimiento). El tiempo y porcentaje de germinación se determinó mediante observación bajo el microscopio empleando la cámara de Neubauer. Con estos resultados obtenidos se planteó un nuevo tipo de inóculo, denominado conidias germinadas, en donde se inocularon el mismo número de conidias viables para todas las cepas en fases de germinación equivalentes.

7.7 Pruebas de bioestimulación para mejorar la degradación de las espumas de PU

Este ensayo se fundamenta en que, agregando algún compuesto que estimule el crecimiento del hongo se podría favorecer el proceso de degradación del PU. Más aún, si el mecanismo por el cual degradan a las espumas emplea los mismos sistemas enzimáticos que para la degradación del PU líquido, entonces se esperaría que la adición de los PUs líquidos favorezca la degradación de las espumas. Para estas pruebas se siguió el procedimiento que arrojó los mejores resultados, definido en la sección 7.5, utilizando las cepas seleccionadas. En este ensayo se utilizaron como bioestimulantes dextrosa y los barnices de PU Impranil[®] DLN y Poly Lack[®]. Como medio de cultivo base se utilizó caldo de papa (potato broth, PB) diluido al 50% adicionado con la sustancia de la cual se quiere saber su capacidad bioestimulante (dextrosa, Impranil o Poly Lack) las concentraciones de estas sustancias fueron: 0.5% y 0.25% (Anexo 1). Como degradación de referencia se evaluó la degradación de las espumas cultivando los hongos en el medio PB al 50%, sin adicionar una fuente de carbono, sólo con la que se encuentra en la papa. Para todos los casos el volumen del medio de cultivo fue de 25 mL, el cual se repuso cada 7 días adicionando PB al 50%

para mantener el volumen de cultivo. El control negativo en este ensayo (control de daño mecánico por la incubación) fue la espuma incubada en el medio de cultivo sin inocular, al cual se le simuló inoculación con solución salina isotónica estéril.

7.7.1 Efecto de cultivar con o sin agitación sobre la degradación del PU

Debido a que este proyecto tiene como finalidad sentar las bases para una aplicación biotecnológica, se decidió determinar si se podrían obtener niveles de degradación similares en cultivos sin agitación y agitados (200 rpm). El sistema agitado supone niveles de oxigenación del medio de cultivo que favorecen el crecimiento de los hongos filamentosos. Sin embargo, un bioproceso en el que se requiera mantener un cultivo en agitación tiene mayor gasto energético y por ende mayor costo por lo que este análisis resulta importante. Para evaluar esta condición se realizarán cultivos estáticos y con agitación de las condiciones previamente descritas en el ensayo de bioestimulación (0.5% de concentración de bioestimulante, con 25 mL de medio de cultivo y reponiendo el volumen cada 7 días). Una vez definida la mejor condición para realizar la biodegradación de espumas (agitación o estática), se procederá a emplear una concentración menor de bioestimulante (0.25%), para definir si es factible disminuir la concentración del sustrato para obtener iguales o mejores resultados de degradación, además de disminuir costos. Adicionalmente se probaron combinaciones de tiempo de cultivo con agitación y estático con el objetivo de determinar si es posible incrementar la eficiencia de degradación de espumas, reduciendo además, el gasto energético que implica la agitación. Para este ensayo se empleó la mejor concentración de bioestimulante, utilizando 25 mL de medio de cultivo y reponiendo el volumen cada 7 días, las combinaciones de tiempo en agitación-estático se describen en la Tabla 2.

Tabla 2. Régimen de cultivos en agitación-estático

AGITACIÓN (días)	ESTÁTICO (días)
0	21
7	14
14	7
21	0

La condición en donde se obtenga la mayor degradación a partir de todos los ensayos antes mencionados, se considerará la condición óptima de cultivo en este proyecto.

- **Análisis estadístico**

Para determinar las diferencias significativas entre los resultados de degradación de las espumas de PE-PU, por acción de los hongos, para todos los casos se empleó la prueba de Tukey (comparaciones múltiples), con una significancia de $p < 0.05$.

7.8. Análisis de la degradación de las espumas PE-PU por hongos

7.8.1. Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Con la finalidad de determinar el daño que generan los hongos filamentosos en la microestructura de las espumas de PE-PU, en las diferentes condiciones de cultivo analizadas, se realizaron análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM). Las muestras para este análisis fueron obtenidas de la siguiente manera:

1. Obtener las espumas del cultivo de 21 días con los hongos del medio correspondiente: caldo de papa (PB), caldo de papa dextrosa (PDB), caldo de papa Impranil (PIB), caldo de papa Poly Lack (PPLB).
2. Los controles negativos consistieron en espumas incubadas durante 21 días en cada uno de los medios de cultivo respectivos (PB, PDB, PIB, PPLB) sin inocular con los hongos.
3. Eliminar el micelio, desarrollado en la espuma, siguiendo la metodología detallada en el anexo 4.
4. Secar las espumas en estufa de vacío a 30 °C, durante 48 h.
5. Las muestras fueron analizadas en un microscopio electrónico JEOL JSM-5900-LV, recubriendo las espumas con oro y en condiciones de bajo vacío, en la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. Se tomaron microfotografías a 50X, 250X, 500X y en algunos casos 1000X (4 campos aleatorios para cada caso).

7.8.2. Cromatografía de gases y espectrometría de masas (GC-MS)

Para intentar identificar algunos compuestos resultantes de la degradación de las espumas se hicieron análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de

masas (GC-MS). En ambos casos las muestras a analizar se obtendrán de los cultivos de hongos con las espumas incubados durante 21 días en medio PDB (50%) a 30 °C estático, eliminando el excedente de micelio y recambiando el medio de cultivo cada 7 días. El cromatógrafo empleado fue un Agilent, modelo 6890N, con una columna DB-5MS (5% Fenil-metilsilicón), de 20 m de largo, y un diámetro interno de 0.18 mm. El programa de corrida fue el siguiente: Temperatura inicial 100 °C (3 min) con un incremento de temperatura de 20 °C/min hasta 300 °C (15 min) utilizando helio como gas acarreador (Split 1:50) con un flujo de 1 mL/min. El espectrómetro de masas utilizado fue un LECO, modelo Pegasus 4D, con analizador de tiempo de vuelo (MS/TOF) detectando iones de masa molecular en el intervalo de 45 a 500 umas tomando 20 espectros/s. Estos análisis fueron llevados a cabo sólo en muestras de espumas que fueron incubadas en medio con PDB (inoculadas y no inoculadas con hongos). La metodología para obtener las muestras es la siguiente:

1. Obtener las espumas del cultivo de 21 días con los hongos en medio PDB, dos cultivos por hongo. El sobrenadante del medio de cultivo es concentrado por ultrafiltración para retener moléculas mayores a 10 kDa empleando un Centricon[®] 10.
2. Mecánicamente, retirar la mayor cantidad de micelio de las espumas y enjuagarlas con agua desionizada para retirar residuos del medio de cultivo. Colocar una de las espumas, con todo y micelio, en tubo de ensayo y adicionar 5 mL de EtOH (96%).
3. Con otra espuma realizar el tratamiento con hipoclorito de sodio para eliminar completamente el micelio, descrito en el anexo 4, dejando secar a temperatura ambiente 12 h y posteriormente colocar la espuma en un tubo de ensayo y adicionar 5 mL de EtOH, dejando actuar durante 30 min.
4. Filtrar los dos extractos etanólicos (obtenidos en 2 y 3) utilizando un papel filtro Whatman No. 41, para separar la fracción soluble.
5. Llevar a sequedad la fracción etanólica soluble, evaporando el solvente a temperatura ambiente durante varios días para concentrar la muestra.
6. Acidificar los filtrados hasta pH=1 y realizar extracción por par de disolventes utilizando diclorometano. Realizar 3 extracciones con 1/5 del volumen del

sobrenadante, para extraer los compuestos menos polares. Dejar que las extracciones lleguen a sequedad a temperatura ambiente.

7. Una vez secas todas las muestras (de las espumas y de los sobrenadantes del medio de cultivo) se envían para el análisis de GC-MS a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM.

Los controles en este ensayo son dos espumas de PE-PU incubadas durante 21 días con PDB (50%) a 30 °C, una a la que se le hace el tratamiento con NaClO y otra a la que no, estos controles permiten conocer las moléculas que se liberan de la espuma en cada caso, con los cuales además se pueden diferenciar las moléculas que se generan de la espuma, por el tratamiento con NaClO. Otro control es el cultivo de los hongos en medio PDB (50%) sin espuma durante 21 días, este control se emplea con la finalidad de identificar las moléculas generadas por el metabolismo de cada hongo al utilizar los nutrientes del medio de cultivo. El último control son los extractos etanólicos obtenidos del micelio de cada hongo tratado y sin tratar con NaClO, esto para conocer los compuestos procedentes del hongo que puedan ser detectados en las muestras. Estos controles tienen como finalidad conocer las moléculas comunes entre los controles y las muestras obtenidas del tratamiento con hongos, para discernir qué compuestos son derivados de la degradación de las espumas de PE-PU por acción de los hongos y cuales son liberados de las espumas como resultado de la incubación o del tratamiento con NaClO. Por otra parte se incluyó un control químico de la hidrólisis de las espumas mediante digestión ácida. Este control tiene la finalidad de determinar si el proceso de hidrólisis química libera algunos compuestos que puedan correlacionarse con los detectados en los residuos de la espuma y los sobrenadantes de los cultivos con hongos. De este control se analizó la fase acuosa de la digestión (sobrenadante) y el residuo de la espuma será tratado con NaClO y posteriormente disuelto en EtOH.

7.8.3. Termogravimetría

Por otra parte se realizó análisis termogravimétrico (TGA) empleando un equipo de la marca TA Instruments modelo Q5000 IR, con porta muestra de platino, empleando un programa de calentamiento de 30 a 700 °C con una razón de incremento de 10 °C/min). La estrategia experimental para obtener las muestras es la siguiente:

1. Incubar espumas por 21 días, con el hongo más degradador, en las diferentes condiciones de bioestimulación.
2. Eliminar el micelio crecido sobre cada espuma empleando la metodología descrita en el anexo 4.
3. Secar las espumas en estufa de vacío a 30 °C.
4. Las muestras se enviaron para el análisis al Laboratorio de análisis térmico del Instituto de Investigaciones en Materiales (IIM), UNAM.

En este caso cada condición de bioestimulación (PB, PDB, PIB y PPLB) tuvo como control negativo la espuma incubada durante 21 días sin inocular.

7.8.4. Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR)

El análisis de espectroscopía de infrarrojo con Transformada de Fourier (FTIR) se realizó con un espectrofotómetro de FTIR / FIR Spectrum 400 de Perkin-Elmer, a las espumas inoculadas con la cepa que presentó los mejores resultados de degradación en los ensayos de bioestimulación. Las muestras se obtuvieron de la misma forma que para el TGA y fueron enviadas para el análisis de espectroscopía FTIR a la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM. De igual manera el control negativo para cada condición consiste en la espuma incubada durante 21 días sin inocular, en cada uno de los medios de cultivo (PB, PDB, PIB y PPLB).

7.9. Identificación de las actividades enzimáticas

Para la identificación de las posibles actividades enzimáticas involucradas en el ataque a las espumas de PE-PU, presentes en los concentrados proteicos de los sobrenadantes de cultivo de las pruebas de bioestimulación, se realizaron ensayos de difusión radial y zimografías empleando diferentes sustratos para determinar actividades relacionadas con la degradación de PU. La metodología general para los ensayos se describe a continuación:

1. Cultivar los hongos en las condiciones definidas en III poner el número correspondiente durante 21 días a 30 °C.

2. Recuperar únicamente el sobrenadante del medio de cultivo (SMC) filtrando a través de una membrana Millipore® de 0.45 µm de poro para eliminar micelio y conidias.
3. Realizar ultrafiltración para concentrar el SMC empleando Centricon con una membrana de 10 kDa de corte (Centricon 10, Millipore®).
4. Añadir 5 mL de buffer de fosfatos 50 mM para intercambiar el solvente donde se encuentran las proteínas. Repetir el procedimiento 3 veces.
5. Colectar el concentrado proteico en tubos Eppendorf (1.5 mL) y añadir buffer de fosfatos 50 mM para tener un volumen final de 1 mL.
6. Cuantificar la cantidad de proteína en los concentrados proteicos mediante el método de Bradford.
7. Evaluar cada uno de los concentrados proteicos por ensayos de difusión radial en cajas con diferentes sustratos (leche descremada, Tween 20, urea y Poly Lack) para identificar las actividades relacionadas con la degradación de PU.
8. Los concentrados proteicos que presenten actividad de degradar el poliuretano (“poliuretanasa”) (determinado por el ensayo de difusión radial usando Poly Lack como sustrato) se analizarán mediante zimografía con el propósito de conocer el tamaño de la proteína con esa actividad.

7.9.1. Ensayos de difusión radial

Estas pruebas consisten en generar, en placa de Petri, un medio sólido específico para detectar una actividad enzimática de interés, en las proteínas extracelulares (PEC) recuperadas de los sobrenadantes provenientes de los cultivos del hongo en medio caldo de papa 50% sin espuma (PBS), caldo de papa 50% con espuma (PB) y caldo de papa 50% con 0.25% de Poly Lack y la espuma (PPLB). Para ello se hacen orificios, de 2 mm de diámetro x 5 mm de profundidad, en el agar para añadir las muestras de proteína obtenidas de los SMC y se incuban por un período determinado. A continuación se detallan las actividades enzimáticas que serán detectadas con esta estrategia, la información detallada de la preparación de los medios y disoluciones se describen en el Anexo 1.

- **“Poliuretanasa” (sobre PE-PU):** Medio mínimo mineral, con 0.3% de Poly Lack (MM-Poly Lack). Se revela con tinción de azul de Coomassie (Anexo 1). Una

prueba positiva presenta zonas de aclaramiento, ya que el azul de Coomassie se une a las moléculas del PU.

- **Proteasa:** Medio mínimo mineral sólido, adicionado con leche descremada al 2%. La prueba se basa en que la caseína en el medio de cultivo genera un color blanquecino y opaco, que al ser hidrolizada genera aclaramiento del medio, por lo tanto en una prueba positiva se observan halos de aclaramiento alrededor del pozo donde se encuentra el SMC.
- **Esterasa:** Para este ensayo se utiliza Tween 20 y carbonato de calcio (CaCO_3) en un medio mínimo mineral sólido. El Tween 20 es un compuesto que contiene en su estructura un enlace éster, el cual tras ser hidrolizado por la enzima libera al medio un alcohol y un ácido carboxílico. El ácido carboxílico reacciona con el CaCO_3 formando un precipitado blanco en el medio, el cual es indicador de que la prueba es positiva.
- **Ureasa:** Esta prueba se realizará con el medio de urea de Christensen, el cual contiene urea y rojo de fenol como indicador. La prueba se basa en que la urea, al ser hidrolizada, libera amoníaco al medio, provocando un aumento de pH, lo cual es evidenciado por el indicador rojo de fenol el cual vira de anaranjado-amarillo a rosa-violeta. Si hay un vire en el indicador la prueba es positiva.

7.9.2. Zimografías

Con el objetivo de identificar las proteínas responsables de las actividades enzimáticas esterasa y ureasa, PEC que presentaron actividad hidrolítica sobre el PU (“poliuretanasas”), las proteínas presentes en los SMC fueron resueltas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) al 10%, siguiendo la metodología general que se describe a continuación:

1. Realizar geles de poliacrilamida al 10% (ver ANEXO 1)
2. Cuantificar la concentración de proteína en cada una de las muestras, empleando el método de Bradford.
3. Cargar el primer pozo del gel con 4 μL de marcador de peso molecular Precisión Plus Protein Standards, Dual Color BIO-RAD).

4. Cargar 15 µg de proteína de cada una de las muestras en diferentes pozos, así como del respectivo control positivo (para esterasa: lipasa de *Pseudomonas fluorescens*; ureasa: ureasa de *Canavalia ensiformis*) adicionando 5 µl de buffer de carga. Se hace una réplica de cada gel (gel gemelo) para realizar la tinción con Coomassie y tener el perfil de proteínas en la muestra.
5. Colocar los geles en el equipo de electroforesis y resolver las proteínas empleando una un campo eléctrico con una diferencia de potencial de 90 mV.
6. Una vez finalizada la electroforesis, se colocan los geles en un recipiente y se realizan 2 lavados de 10 minutos (cada uno) en agitación con buffer de fosfatos 50 mM.
7. Se procede a renaturalizar *in situ* las proteínas, colocando los geles en un recipiente y se añaden 25 mL de una disolución de Tritón X-100 al 2.5%, poniendo en agitación durante 25 minutos. Transcurrido el tiempo, el líquido se descarta y se añaden 25 mL más de la disolución de Tritón X-100, hasta completar tres lavados.
8. Se continúa el procedimiento específico para la determinación de la actividad esterasa o ureasa.

A continuación se describe el procedimiento seguido para cada una de las actividades específicas buscadas:

- **Revelado para actividad esterasa:**

1. Preparar una solución 1.6 mM de 4-metilumbeliferil butirato a partir de un stock del mismo 50 mM (BioChemica, No. Cat. 19362) utilizando dimetil sulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, No. Cat. 200-664-3) como disolvente.
2. Una vez terminados los lavados renaturalizantes, se adiciona el sustrato 4-metilumbeliferil butirato sobre el gel, y se incuba a temperatura ambiente en agitación de durante 10 minutos.
3. Transcurrido el tiempo se observa bajo la luz UV, para poner de manifiesto la formación de 4-metilumbeliferona.

Este ensayo se basa en que el sustrato 4-metilumbeliferil butirato en presencia de una esterasa se hidroliza para dar lugar a la formación de ácido butírico y 4-metilumbeliferona, esta última se puede observar bajo la luz UV por fluorescencia (Díaz

et al., 1999). En este ensayo se usa como control positivo la lipasa de *Pseudomonas fluorescens*.

- **Revelado para actividad ureasa:**

1. Una vez terminado el tratamiento renaturalizante, se realizan tres lavados consecutivos, con 10 mL de buffer de acetatos 5 μ M [pH 6.0], de 15 minutos cada uno. Esto con la finalidad de activar a las ureasas.
2. Por otra parte se prepara una disolución reveladora, que contiene urea 0.1 mM, nitro azul de tetrazolio (NBT) al 0.08% m/v y ditiotreitól (DTT) 0.05 mM (ANEXO 1), es importante prepararla al momento, ya que el NBT en disolución acuosa puede oxidarse lentamente.
3. Terminados los lavados con el buffer de acetatos, eliminar el líquido e inmediatamente verter sobre el gel la disolución reveladora.
4. Incubar en oscuridad a 30 °C, sin agitación, durante 12 h.

Este ensayo se basa en que en presencia de ureasas, la urea se descompone en dióxido de carbono y amoníaco/amonio, este último incrementa el pH favoreciendo que el NBT se reduzca para formar formazán, el cual se identifica por formar un precipitado azul oscuro en las bandas donde hay proteínas con actividad ureasa (Witte y Medina-Escobar, 2001).

8. Resultados y discusión

8.1. Catálogo de características morfológicas del crecimiento de los hongos

Se eligieron 13 cepas de hongos filamentosos capaces de crecer en Poly Lack[®], un barniz de PE-PU, aisladas en nuestro laboratorio (Álvarez-Barragán, 2013), con el propósito de evaluar su capacidad de degradar espumas de PE-PU, bajo distintas condiciones de cultivo. El crecimiento de estos hongos fue registrado fotográficamente y sus características morfológicas fueron descritas en el catálogo. Adicionalmente, en el catálogo se incluye el tiempo de germinación de las conidias, en un medio definido (medio mínimo dextrosa), para tener una descripción más amplia de los hongos filamentosos en estudio (anexo 2).

8.2. Identificación de las cepas estudiadas

Ocho de las cepas elegidas (T1.PL.1, A2.PP.5, BP8.I.3, A3.I.1, BP3.I.2 y A2.H.4) fueron previamente identificadas por morfología y análisis molecular (Alvarez-Barragán *et al.*, 2016). La identificación de las otras cepas no reportadas previamente, fue llevada a cabo por la Dra. Lilianha Domínguez Malfavón, posdoctorante de nuestro laboratorio, por amplificación por PCR de la secuencia de DNA comprendida entre la región ITS1 y D2 (Anexo 3) y posterior secuenciación realizada por la empresa MACROGEN. La identificación se realizó comparando las secuencias obtenidas en la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) (Tabla 3).

En distintos trabajos se han reportado cepas de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Bionectria*, *Cladosporium*, *Chaetomium*, *Curvularia*, *Exhophiala*, *Fusarium*, *Geomyces*, *Mucormycota*, *Nectria*, *Neonectria*, *Penicillium*, *Pestalotiopsis*, *Phaeosphaeria*, *Plectosphaerella*, *Thermomyces* y *Trichoderma* capaces de degradar PU, principalmente de tipo PS (Ver Tabla 1), el cual es más susceptible a la degradación que el de tipo PE. Pocas especies de hongos han sido reportadas con capacidad de degradar PE-PU. Entre ellas *Chaetomium globosum* (Darby y Kaplan, 1968), *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum* (Filip, 1979), *Alternaria* sp. PURDK2 (Matsumiya *et al.*, 2009), son las únicas especies de las que se tiene conocimiento, hasta ahora, que son capaces de degradar PE-PU.

Tabla 3. Identificación de las cepas de hongos seleccionadas por su capacidad de crecer en MM con Poly Lack®.

Cepa	Especie identificada	Identidad (%)	No. acceso de la secuencia referencia GenBank (rDNA, ACT, TEF)	No. acceso de la secuencia depositada GenBank (rDNA, ACT, TEF)
A2.H.4*	<i>Cladosporium montecillanum</i>	100	AY251074.2	KU605787
		100	KT600604.1	KU605795
		96	KT600504.1	KU605781
A2.PL.1* #	<i>Aspergillus fumigatus</i>	100	FJ867935.1	KU605788
		100	KJ596320.1	KU605789
A2.PP.5*	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	100	HM148694.1	KU605796
		99	HM148424.1	KU605782
		100	AY251074.2	KU605790
A3.I.1*	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	100	HM148694.1	KU605797
		99	HM148457.1	KU605783
		99	AY251074.2	KU605791
BP3.I.2*	<i>Cladosporium asperulatum</i>	100	KT600576.1	KU605798
		96	LN834453.1	KU605784
		100	FJ613114.1	KU605792
BP3.I.7* #	<i>Penicillium chrysogenum</i>	100	FJ613114.1	KU605792
BP8.I.3*	<i>Cladosporium asperulatum</i>	100	AY251074.2	KU605793
		100	KT600576.1	KU605799
		97	LN834453.1	KU605785
T1.PL.1*	<i>Cladosporium pseudocladosporioides</i>	100	KJ596320.1	KU605794
		100	HM148674.1	KU605800
		100	HM148424.1	KU605786
BP3.I.9#	<i>Cladosporium</i> sp.	99*	---	---
BP4.I.1#	<i>Dichotomomyces cejpai</i>	100*	EF669956.1	KX011610
BP6.I.9#	<i>Dichotomomyces cejpai</i>	100*	EF669956.1	KX011611
BP7.I.7#	<i>Dichotomomyces cejpai</i>	100*	EF669956.1	KX011612
T1.H.7 ^a	<i>Fusarium</i> sp.	---	---	---

* Cepas identificadas por Álvarez-Barragán *et al.*, 2016.

Cepas identificadas únicamente por la secuencia de la región ITS1-D2 (rDNA).

^a Cepa identificada únicamente por morfología microscópica.

En nuestro laboratorio reportamos recientemente las cepas *A. fumigatus* A2.PL.1, *C. asperulatum* BP3.I.2 y BP8.I.3, *C. montecillanum* (A2.H.4), *C. pseudocladosporioides* (T1.PL.1), *C. tenuissimum* (A2.PP.5 y A3.I.1) y *P. chrysogenum* (BP3.I.7), como capaces de degradar espumas de PE-PU (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016). En este trabajo estamos reportando, por primera vez, una cepa de *Fusarium* sp. (T1.H.7) y tres cepas de *Dichotomomyces cejpaii* (BP4.I.1, BP6.I.9 y BP7.I.7) que presentan esta capacidad. Esta diversidad permite proponer que existen diversas posibilidades para desarrollar procesos que usen hongos para tratar residuos de PE-PU.

8.3. Determinación del mejor sistema de conservación las cepas de interés

Con el objetivo de evaluar el efecto del método de conservación de las conidias sobre el tiempo que tarda el hongo en generar colonias visibles después de ser reactivado (vigor), se realizaron análisis a 1, 3, 6, 9 y 12 meses, con conidias que habían sido conservadas con los métodos propuestos: a) Almacenamiento a temperatura ambiente de conidias adsorbidas en sílice, b) Almacenamiento de micelio con conidias en glicerol a -70 °C y c) Almacenamiento de conidias en glicerol a -70 °C. El criterio para evaluar el vigor de las cepas de hongos fue el tiempo que transcurrió desde que se inoculó el hongo en medio PDA (reactivación), hasta la aparición de colonias (tiempo de crecimiento) (Tabla 4).

Los resultados obtenidos en este ensayo muestran que el método de conservación si tiene un efecto sobre el vigor de las cepas de hongos. En la mayoría de los casos se observa que el vigor que presentan las cepas, en los distintos métodos de conservación, se mantiene similar a los 6 meses que al primer mes de evaluación. El almacenamiento de micelio con conidias a -70 °C tuvo un menor impacto sobre el vigor de las cepas de hongos filamentosos ya que todos formaron colonias a tiempos menores de dos semanas, lo cual sugiere que este método es el mejor para conservar las cepas. Asimismo, se recomienda que se renueven los gliceroles cada 6 meses, ya que a partir de este tiempo, comienza a presentarse disminución significativa en el vigor de algunas cepas.

Tabla 4. Efecto del método de conservación en el vigor de las cepas de hongos.

Hongo	Conidias en sílice a temperatura ambiente (meses)					Micelio en glicerol a -70 °C (meses)					Conidias en glicerol -70 °C (meses)				
	1	3	6	9	12	1	3	6	9	12	1	3	6	9	12
A2.H.4	R	M	M	M	M	M	L	L	L	L	L	L	L	L	L
A2.PL.1	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
A2.PP.5	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	M	M	M	M	M
A3.I.1	R	R	R	R	M	R	R	R	R	R	M	M	M	M	M
BP3.I.2	M	M	M	M	L	M	M	M	M	M	L	L	L	L	L
BP3.I.7	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
BP3.I.9	L	L	L	L	L	M	M	M	M	M	L	L	L	L	L
BP4.I.1	L	L	L	L	L	R	R	M	L	L	M	M	M	M	M
BP6.I.9	L	L	L	L	L	R	R	R	R	R	M	M	M	L	L
BP7.I.7	L	L	L	L	L	R	R	R	R	M	L	L	L	L	L
BP8.I.3	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	R	R	M	M	M
T1.H.7	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
T1.PL.1	R	R	M	M	M	R	R	R	R	R	R	R	M	M	M

R: tiempo de crecimiento rápido, menos de una semana; M: tiempo de crecimiento medio, más de una semana y menos de dos semanas; L: tiempo de crecimiento lento, más de dos semanas.

8.4. Selección de cepas y determinación del método más efectivo para eliminar el micelio de las espumas de PE-PU y poder cuantificar su degradación

A partir de las 13 cepas indicadas anteriormente se realizó una primera selección de las cepas con mayor actividad degradativa de espumas de PE-PU, para lo cual se cuantificó la degradación utilizando el método empleado por Álvarez Barragán (2013). Este método consistió en inocular 80 mg de biomasa de hongo (micelio y conidias indistintamente) sobre la espuma, en una caja de Petri con 25 mL de medio PDB 50%, incubando de manera estática a 25-30 °C, por 21 días. Cada 7 días de cultivo se cambiaba completamente el medio y el excedente de micelio era eliminado, cortándolo

con bisturí y pinzas de disección estériles y dejando solamente aquél que creció sobre la espuma (Figura 4). Una vez transcurridos 21 días del cultivo se procedía a eliminar el micelio para evaluar la pérdida de peso de la espuma, empleando para ello 50 mL de NaClO al 1.76% m/v (Cloralex[®] diluído al 30%) durante 18 h. Los resultados mostraron que las cepas BP6.I.9, BP3.I.9, BP7.I.7 y BP4.I.1 produjeron degradaciones arriba del 50% y hasta casi un 60%, mientras que las cepas T1.H.7, A3.I.1, A2.PP.5 y T1.PL.1 presentaron degradación de entre 30 y 50% y todas las otras cepas mostraron degradación menor del 30% (Figura 5). Las ocho cepas que disminuyeron más del 30% del peso de las espumas fueron seleccionadas para continuar con el trabajo con el propósito de definir algunas condiciones en las que pudiera inducirse mayor degradación de la espuma.

En la figura 5 también observamos que, la degradación de las espumas control tratadas con hipoclorito, en algunos casos fue mayor que la degradación generada por algunas cepas de hongos con baja degradación (A2.PL.1, BP3.I.7, BP8.I.3, BP3.I.2), lo que nos hizo pensar que quizá la concentración de hipoclorito empleada para eliminar el micelio era muy alta degradando la espuma que no se encontraba cubierta por el micelio del hongo. Este resultado nos condujo a analizar el método por el cual estábamos eliminando el micelio de las espumas. Para ello se evaluó el efecto de dos concentraciones y tres tiempos de exposición al NaClO en espumas no inoculadas y no incubadas.

Se encontró un efecto importante de degradación de la espuma a la concentración de 1.76% m/v de NaClO, mientras que a 0.88% m/v la espuma sólo sufrió una pérdida de peso de $2.4\% \pm 0.046\%$ a 24 h de tratamiento (Figura 6). Para conocer el tiempo mínimo requerido para eliminar el micelio de la espuma de PE-PU, se procedió a cultivar la cepa A3.I.1 con la espuma, durante 21 días a 30 °C, realizando recambios al medio de cultivo (PDB 50%) cada 7 días. Una vez transcurrido el tiempo de cultivo, las espumas se trataron con NaClO 0.88% m/v, realizando observaciones a las 12, 18 y 24 horas. Se definió que el tiempo mínimo necesario para eliminar completamente el micelio de la espuma fue de 24 h (Figura 7).

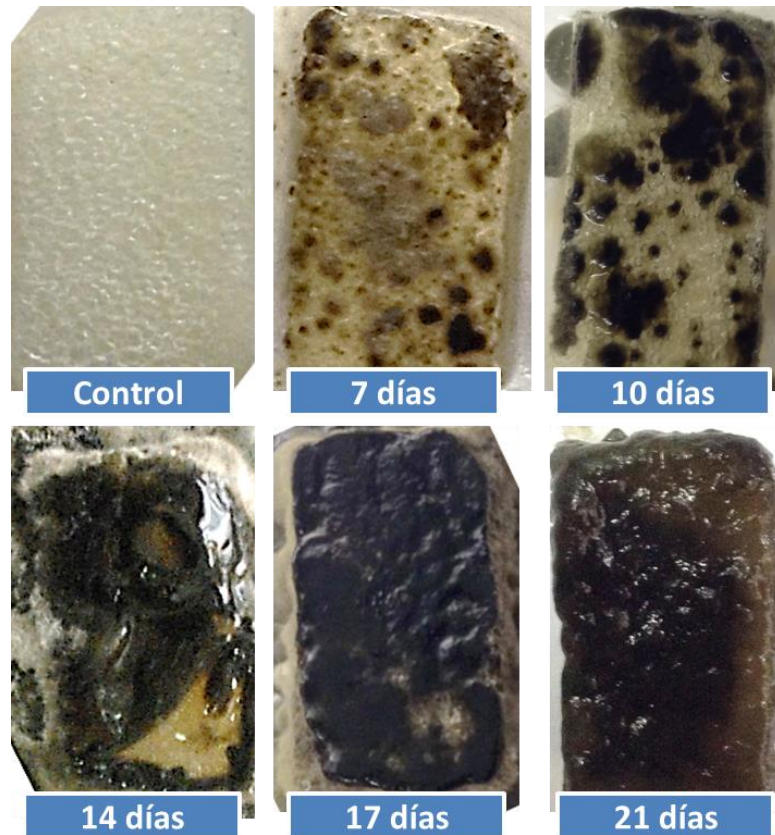


Figura 4. Seguimiento temporal del crecimiento de la cepa A3.I.1 en la espuma de PE-PU. Medio PDB (50%), 21 días de cultivo a 30 °C. Reemplazo del medio de cultivo cada 7 días, recortando el micelio excedente de la espuma cada vez, cultivo estático.

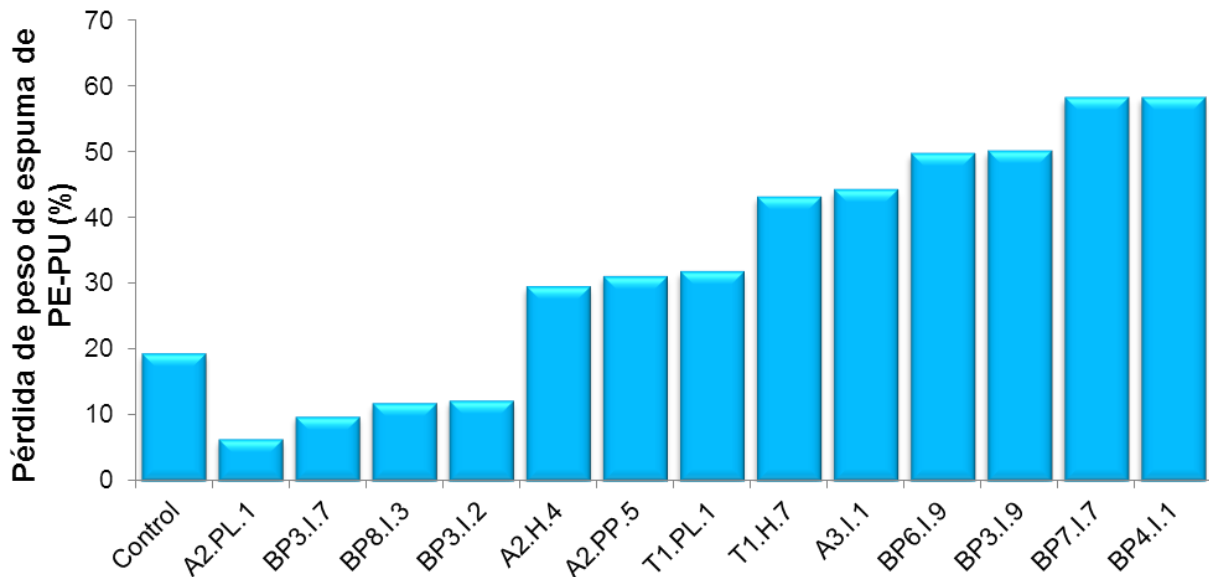


Figura 5. Ensayos preliminares de degradación de espumas de PE-PU, con las 13 cepas de hongos capaces de crecer en Poly Lack®. Inoculadas con 80 mg de biomasa (micelio con conidias). Medio PDB (50%), 21 días a 30 °C, con reemplazo de medio de cultivo cada 7 días, recortando el micelio de afuera de la espuma cada vez, cultivo estático. Tratadas con NaClO al 1.76% para eliminar el micelio. n=1

Habiendo determinado las condiciones óptimas para eliminar el micelio sin que se afectara la espuma, se decidió probar este tratamiento en espumas control que fueron incubadas durante 21 días en PDB 50% a 30 °C, condiciones que se emplearon para la evaluación del efecto biodegradativo de los hongos sobre la espuma, observando, en ocho repeticiones, que las espumas presentaron pérdidas de peso promedio de 6.25% \pm 0.74% (datos no mostrados). El procedimiento definitivo para eliminar el micelio con NaClO se describe en el anexo 4.

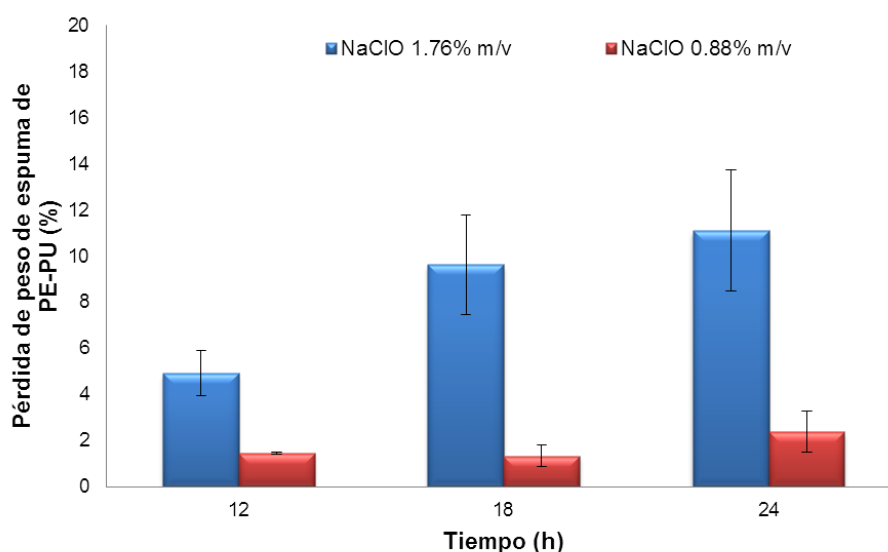


Figura 6. Evaluación del efecto de la concentración y tiempo de exposición al NaClO sobre las espumas de PE-PU. Las espumas sin cultivar se trataron con 50 mL de NaClO probando las concentraciones de 1.76 (azul) y 0.88% m/v (rojo), a 12, 18 y 24 h de incubación.

8.5. Efecto del tipo de inóculo sobre la degradación de las espumas de PE-PU

Empleando el sistema para degradación de espumas de PE-PU descrito en el punto 7.6 en materiales y métodos (cultivo estático en cajas de Petri, recambiando el medio de cultivo PBD 50% y recortando el micelio cada 7 días, durante 21 días a 30 °C) y utilizando el método estandarizado para eliminar el micelio de las espumas para cuantificar la pérdida de peso determinado en la sección 8.4 y descrito en el anexo 4, se procedió a analizar qué tipo de inóculo: micelio con conidias, conidias o micelio sin conidias, producía mejores niveles de degradación por los hongos. Todos los resultados fueron normalizados restándoles el valor de degradación presentado por el correspondiente control negativo (en todos los casos, menor al 7%).

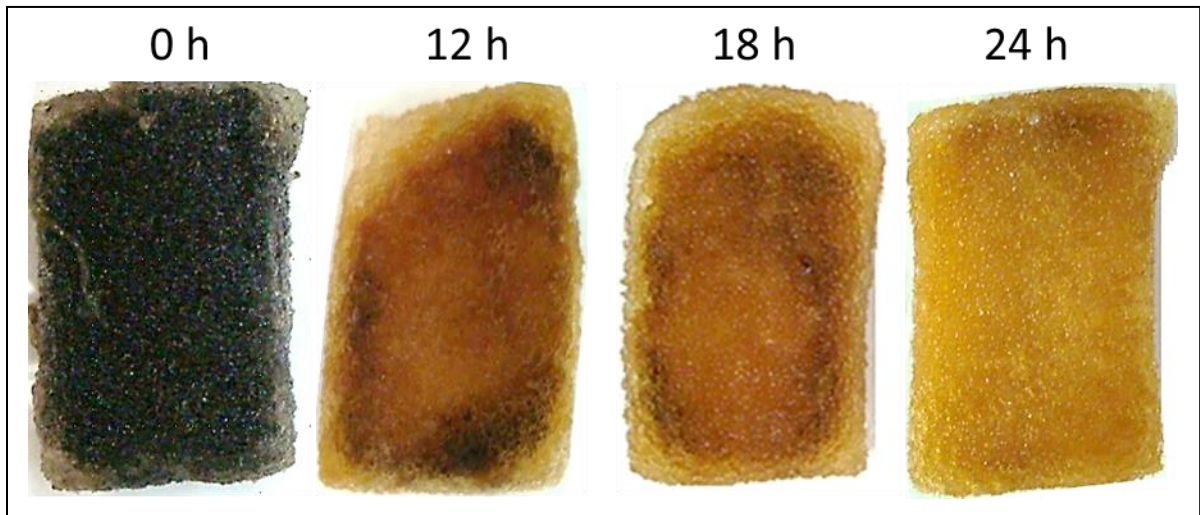


Figura 7. Determinación del tiempo mínimo necesario para eliminar el micelio de las espumas para cuantificar la pérdida de peso por acción del hongo. Se colocó la espuma con el hongo en 50 mL de una disolución de NaClO (0.88% m/v), dejando actuar a temperatura ambiente sin agitación. Cepa A3.I.1.

Cuando las cepas A3.I.1, T1.PL.1, A2.PP.5 y BP3.I.9 fueron inoculadas con conidias, mostraron una degradación mayor al 45%, mientras que al inocular con micelio y conidias la degradación fue menor al 40%; la cepa T1.H.7 presentó valores de degradación del 30% cuando fue inoculada con conidias y cercano a 35% cuando se inoculaba con micelio y conidias. En el caso de las cepas BP4.I.1, BP6.I.9 y BP7.I.7 la degradación fue por debajo del 15% cuando fueron inoculadas con conidias y cercana al 20% cuando inoculada con micelio y conidias. Al inocular con solo micelio se observó que las cepas A3.I.1, T1.PL.1 y A2.PP.5 degradaron menos del 30%, las cepas T1.H.7, BP4.I.1, BP6.I.9 y BP7.I.7 presentaron una degradación menor al 5% mientras que, para la cepa BP3.I.9 no fue posible generar los pellets de micelio para inocular con este tejido, debido a que esta cepa no presentó un crecimiento apreciable en medio líquido y agitación, por lo cual no se pudo analizar esta condición. Comparando estos resultados se observa que las cepas A3.I.1, T1.PL.1, A2.PP.5 y BP3.I.9 fueron las más degradadoras cuando se emplean conidias como inóculo, lográndose niveles arriba del 50% y hasta 70%, presentando una diferencia estadística significativa contra las otras cepas y tipos de inóculo. Las cepas T1.H.7, BP4.I.1, BP6.I.9 y BP7.I.7 mostraron mayor degradación cuando fueron inoculadas con micelio con conidias, que con solo conidias. En la mayoría de las cepas, cuando se inocula con sólo micelio la degradación de las

espumas significativamente menor (15%), sugiriendo que al inocular con conidias los hongos tienen más capacidad de atacar las espumas, logrando con ello más degradación (Figura 8).

Los resultados observados podrían deberse a una mejor adaptación del desarrollo de las conidias al ambiente en el que se encuentran debido a que poseen sistemas enzimáticos que les permiten responder de manera adecuada a las condiciones presentes en el entorno. Se ha observado que las conidias poseen enzimas involucradas en la resistencia a sustancias tóxicas (como oxido-reductasas), respuesta a choques térmicos (Skamnioti *et al.*, 2007; Sugui *et al.*, 2008; Barros *et al.*, 2010; Qiu *et al.*, 2012) y diversos tipos de hidrolasas, que emplean para poder utilizar fuentes potenciales de nutrientes, lo que les brinda una mayor capacidad de adaptación al medio en comparación con el micelio (Ao *et al.*, 2016). Por otra parte, el micelio es una estructura diferenciada, que puede ser más susceptible a los efectos causados por la temperatura y concentración de nutrientes (Giorni *et al.*, 2009; De Oliveira-Costa *et al.*, 2012),

Por lo que quizá requieran llevar a cabo una reestructuración metabólica para poder utilizar los posibles nutrientes presentes en la espuma de PE-PU (Rogers *et al.*, 1974; New *et al.*, 2014). Otro factor que pudo influir en el resultado es que para producir los inóculos con micelio, cada hongo fue cultivado por casi dos semanas y en consecuencia es posible que el hongo ya no estuviera tan activo metabólicamente o incluso una porción no fuera viable. Sin embargo, para determinar que el fenómeno observado se debe a una mejor adaptación del micelio que surge de las conidias que del micelio ya diferenciado empleado como inóculo al medio de cultivo con la espuma, podrían realizarse estudios proteómicos para determinar el tipo de enzimas que se están produciendo en las conidias al germinar y en el micelio ya maduro de los hongos en respuesta a las espumas de PE-PU.

La degradación de los PU por acción de microorganismos se ha reportado empleando diferentes métodos, principalmente de tipo cualitativo tales como espectroscopía de FTIR, análisis de degradación térmica y microscopía electrónica de barrido, los cuales permiten tener una idea de cómo se alteró física y químicamente el material.

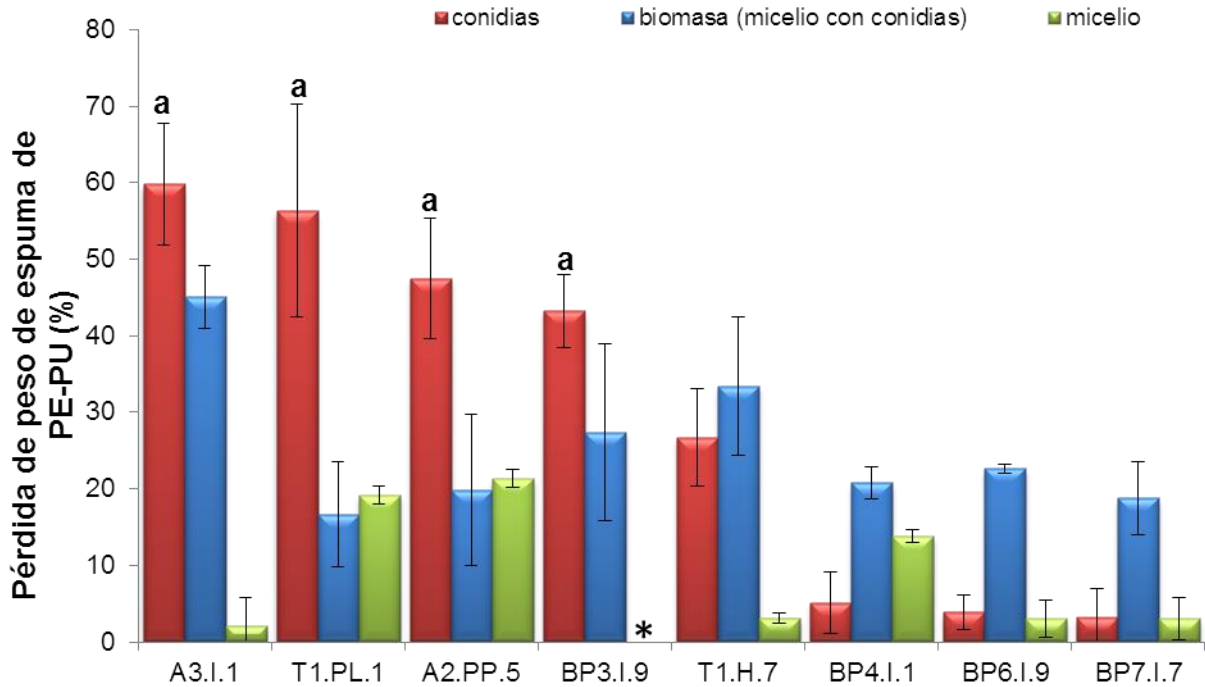


Figura 8. Efecto del tipo de inóculo en la degradación de espumas de PE-PU por hongos filamentosos. Medio PDB (50%), 21 días a 30 °C, cada 7 días se eliminó el excedente de micelio y se reemplazó el medio de cultivo. Cultivo estático. n=3. * no fue posible obtener micelio. (a) diferencia significativa con respecto a los otros tipos de inóculo ($p < 0.05$).

Para tener una idea cuantitativa del daño que se genera a estos polímeros sintéticos por microorganismos se ha recurrido a la cuantificación de la disminución de la fuerza tensil y la pérdida de peso. Se han reportado degradaciones de espumas de PS-PU, medidas en pérdida de peso, de más del 60% en cultivo líquido agitado de *Aspergillus flavus* incubado por 30 días (Mathur *et al.*, 2012) y de 42% en sistema de composteo después de 24 meses (Krasowska *et al.*, 2011). Sin embargo, existen muy pocos estudios donde se reporten valores de degradación de PE-PU sólido, el cual es mucho más recalcitrante que el PS-PU. *Alternaria* sp. PURDK2 logró degradar espumas de PE-PU cerca del 28% después de 10 semanas (Matsumiya *et al.*, 2009), mientras que por composteo después de 24 meses no se logra degradar ni el 2% (Krasowska *et al.*, 2011). Por esta razón los resultados observados en nuestro estudio son muy relevantes debido a que superan los valores de degradación reportados en la literatura y se logran en menor tiempo (21 días).

Debido a las diferencias observadas en la degradación inoculando con conidias entre las diferentes cepas decidimos descartar que las diferencias observadas se debieran a

que las conidias de las diferentes cepas tuvieran tiempos de germinación y viabilidad distintos. Por esta razón se decidió realizar pruebas de germinación y viabilidad, para probar si empleando como inóculo número de conidias viables se podría mejorar la colonización de las espumas de PE-PU por los hongos, y así, aumentar la degradación de las mismas. Este inóculo se definió como conidias germinadas. Se observó que las conidias de las cepas A3.I.1 (Figura 9), T1.PL.1 y A2.PP.5 presentaron germinación rápida (12 h) y el porcentaje de conidias viables en las suspensiones fue cercano al 100%, mientras que BP3.I.9 y T1.H.7 presentaron un porcentaje de conidias viables de 85.1 y 95.0%, respectivamente, además de que ambas germinaban entre 24 h - 48 h. El porcentaje de conidias viables de la cepa BP7.I.7 fue de alrededor del 90%, mientras que los de BP4.I.1 y BP6.I.9 fueron 53.6% y 72.3% respectivamente, además de que estas tres cepas germinaron en tiempos mayores a 60 h (Tabla 5).

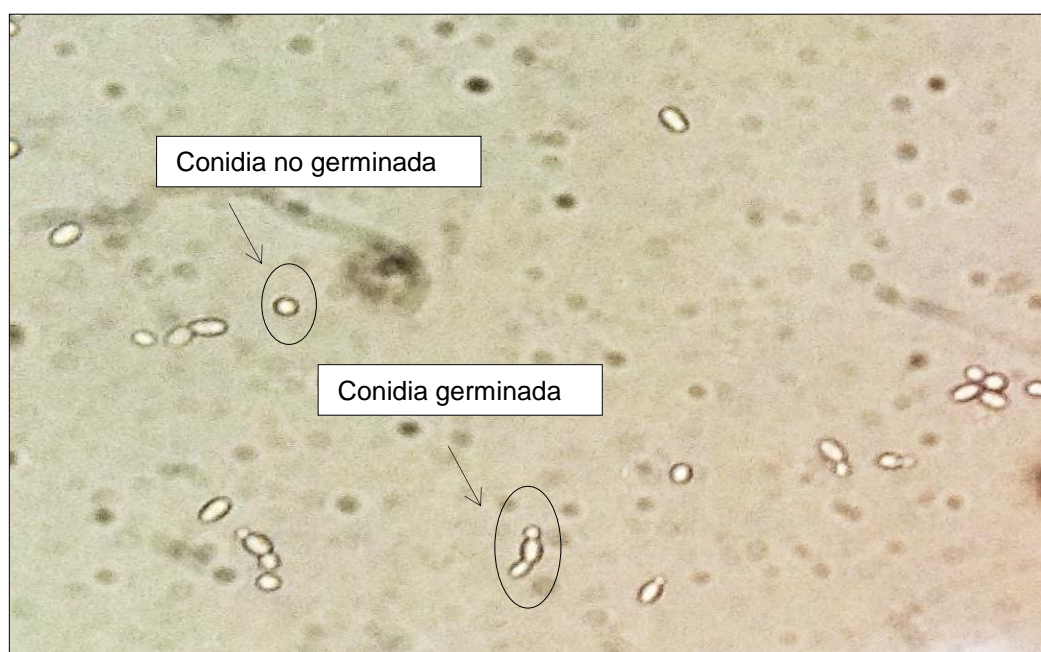


Figura 9. Observación microscópica de conidias germinadas y no germinadas de la cepa A3.I.1 (400X). Cultivo de 12 h en medio mínimo dextrosa (0.5% m/v) a 30 °C.

Se probó agregar extracto de levadura al medio de germinación para tratar de incrementar la velocidad de germinación de las conidias. Aunque fue posible reducir el tiempo de germinación de las conidias para todas las cepas, no se logró emparejar los tiempos de germinación entre ellas (Tabla 6). El porcentaje de conidias viables no aumentó por efecto del extracto de levadura.

Tabla 5. Resultado de las pruebas de viabilidad y tiempo de germinación en medio mínimo dextrosa (0.5% m/v)

Conidias viables (%)*							
Hongo	12 h	24 h	48 h	60 h	72 h	78 h	96 h
A3.I.1	100.0±0.0	100.0±0.0	100.0±0.0	M [#]	M	M	M
T1.PL.1	99.9±0.1	100.0±0.0	100.0±0.0	M	M	M	M
A2.PP.5	98.0±0.7	99.0±0.8	98.0±1.2	M	M	M	M
BP3.I.9	75.3±3.1	80.6±2.7	85.1±1.3	M	M	M	M
T1.H.7	52.4±1.2	95.0±0.6	M	M	M	M	M
BP7.I.7	0.0±0.0	73.9±1.9	90.9±2.0	89.3±1.2	M	M	M
BP6.I.9	5.5±1.4	22.1±0.8	63.2±1.0	69.3±0.7	72.3±0.9	M	M
BP4.I.1	13.5±1.2	15.8±0.9	41.7±1.5	46.8±0.8	53.6±0.5	M	M

* Valores promedio de tres réplicas

[#] M indica crecimiento micelial abundante que no permitió distinguir entre conidias germinadas y no germinadas.

Estos resultados muestran que las cepas BP7.I.7, BP4.I.1 y BP6.I.9 son de lento crecimiento a partir de conidias, además de que tienen un porcentaje considerable de conidias no viables (10% - 50%). Con base en los porcentajes máximos de conidias germinadas de cada cepa en medio mínimo dextrosa suplementado con extracto de levadura (Tabla 6) se estableció un protocolo de pre-germinación para producir el inóculo con conidias germinadas. Para ello se calculó el volumen necesario de la suspensión de conidias de cada cepa para transferir 1×10^6 conidias viables a un tubo Eppendorf de 1.5 mL, ajustando el volumen a 200 μ L con solución salina isotónica, posteriormente se adicionaron 500 μ L del medio de cultivo suplementado con 0.1% de extracto de levadura y se incubaron durante el tiempo necesario para que todas germinaran. Las cepas T1.H.7, BP3.I.9, A2.PP.5, T1.PL.1 y A3.I.1 se pre-germinaron durante 24 h, mientras que BP7.I.7 se incubó durante 36 h y las cepas BP6.I.9 y BP4.I.1 fueron cultivadas 54 h. Una vez que transcurrieron los tiempos de germinación para cada cepa, se procedió a inocular las espumas de PE-PU con las conidias germinadas.

Tabla 6. Resultado de las pruebas de viabilidad y tiempo de germinación en medio mínimo dextrosa (0.5% m/v), suplementado con 0.1% de extracto de levadura.

Conidias viables (%)*							
Hongo	12 h	24 h	36 h	48 h	54 h	60 h	96 h
A3.I.1	98.7±0.5	98.3±1.1	M [#]	M	M	M	M
T1.PL.1	98.2±0.3	100.0±0.0	M	M	M	M	M
A2.PP.5	97.4±0.7	100.0±0.0	M	M	M	M	M
BP3.I.9	84.7±3.2	87.3±1.1	M	M	M	M	M
T1.H.7	62.8±1.5	M	M	M	M	M	M
BP7.I.7	25.6±2.9	73.6±1.3	88.7±0.9	M	M	M	M
BP6.I.9	20.3±2.2	33.5±1.0	43.6±2.3	68.2±0.7	74.4±1.3	M	M
BP4.I.1	6.3±2.6	8.9±1.6	20.2±.8	30.7±1.3	56.1±0.7	M	M

* Valores promedio de tres réplicas

[#] M indica crecimiento micelial abundante que no permitió distinguir entre conidias germinadas y no germinadas.

Los resultados presentados en las pruebas de degradación de las espumas inoculando con conidias germinadas, fueron normalizados restándoles el valor el control negativo. Se observó un comportamiento parecido a cuando se inoculó con conidias sin germinar: las cepas BP4.I.1, BP6.I.9 y BP7.I.7 degradaron entre 20 y 30%, lo cual es superior al obtenido al inocular con sólo conidias sin considerar la germinación de las mismas (5% de degradación). Este resultado nos muestra que la capacidad biodegradativa de espumas de las cepas BP4.I.1, BP6.I.9 y BP7.I.7 fue subestimada cuando se inoculó sólo con conidias sin considerar la germinación de éstas ya que un porcentaje de conidias empleadas como inóculo en el primer experimento no eran viables. Por otra parte se observó que al inocular con conidias germinadas o sin germinar se obtienen resultados semejantes de degradación con las cepas A3.I.1, T1.PL.1, A2.PP.5, BP3.I.9 y T1.H.7 (Figura 10). Por lo anterior, se seleccionaron a las cepas A3.I.1, A2.PP.5 y T1.PL.1, las cuales presentaron niveles de degradación de las espumas de PE-PU, de más del 50%, al ser inoculadas a partir de conidias. Aunque la cepa BP3.I.9 también presentó altos niveles de degradación de las espumas, se decidió descartarla debido a su crecimiento limitado y a la baja producción de conidias.

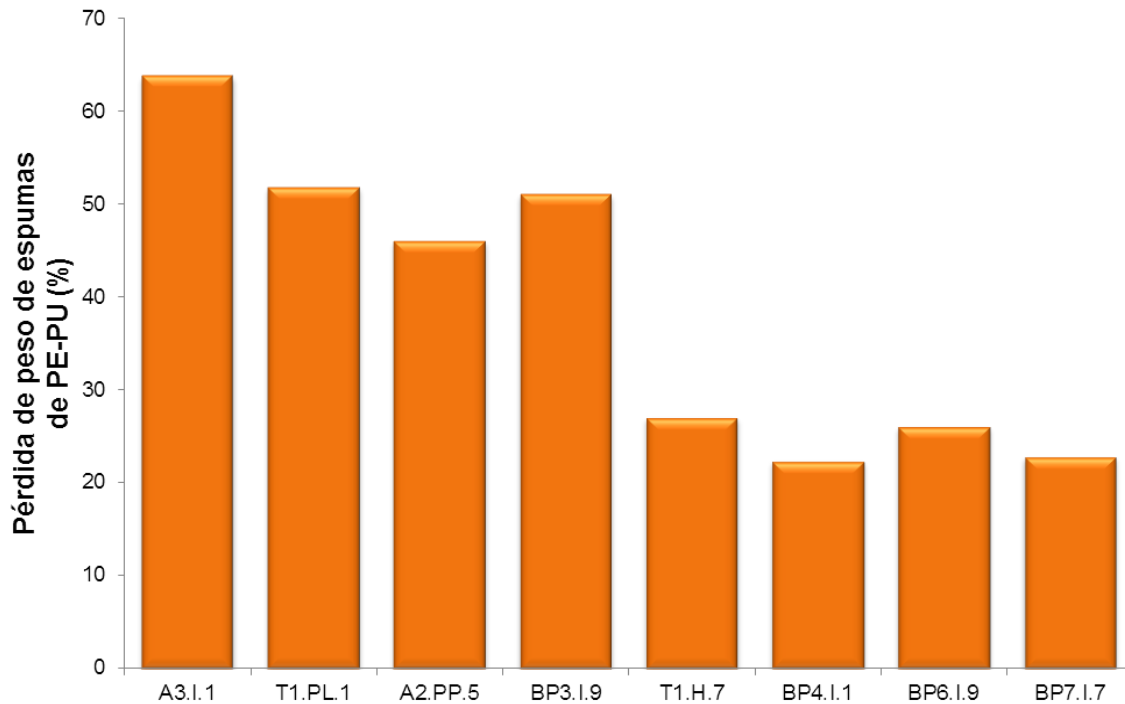


Figura 10. Degradación de espumas de PE-PU inoculando con conidias germinadas de diferentes hongos filamentosos. 1×10^6 conidias germinadas. Medio PDB (50%), 21 días a 30 °C, cada 7 días se eliminó el excedente de micelio y se reemplazó el medio de cultivo. Cultivo estático. n=1

De manera interesante, las cuatro cepas más degradadoras, pertenecen al género *Cladosporium*, del cual ya ha sido reportada una cepa de *Cladosporium herbarum* como capaz de utilizar PE-PU como única fuente de carbono en un medio de cultivo definido tras 70 días de incubación (Filip, 1979) Sin embargo, las especies *C. pseudocladosporioides* (T1.PL.1) y *C. tenuissimum* (A2PP.5 y A3.I.1) se han reportado recientemente como capaces de degradar PE-PU (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016).

8.6. Efecto bioestimulante de algunas sustancias en la biodegradación de espumas de PE-PU

Con el objetivo de determinar las condiciones para aumentar la biodegradación de PU, se definieron los criterios a considerar para determinar qué condiciones de bioestimulación eran las que generaban los mejores resultados. La bioestimulación consiste en la adición de moléculas exógenas al medio de cultivo, para observar un incremento en la degradación, en este caso, de espumas de PE-PU (Cosgrove *et al.*, 2010; Adams *et al.*, 2015). Algo que es importante resaltar, es que una sustancia puede ser bioestimulante a una concentración, pero también puede ser inhibitoria en concentraciones mayores (Kannisery *et al.*, 2011). Debido a que aún no se conocen

con precisión los mecanismos biológicos que determinan que un compuesto pueda tener efecto bioestimulante en la degradación de un xenobiótico, en este trabajo proponemos que la bioestimulación puede estar determinada por dos causas principales: el incremento en la producción de biomasa o el aumento en las actividades enzimáticas involucradas con la degradación, sin un aumento en la biomasa. En el caso de nuestro objetivo particular, el principal criterio para determinar las mejores condiciones de bioestimulación de entre una serie de pruebas realizadas en este trabajo, es la pérdida de peso de las espumas y el segundo, la actividad degradativa específica del micelio (calculada como el cociente entre la cantidad de espuma degradada y la biomasa producida), el cual es la primera vez que se emplea como criterio de selección para obtener las mejores cepas para degradar PU. Se consideraron ambos criterios pues se quieren definir condiciones en las que los hongos degraden mucho y sean más eficientes generando el mínimo de biomasa posible. Para ello, se hizo la cuantificación de la degradación de las espumas de PE-PU y la producción de biomasa con las cepas de hongos seleccionadas, después de 21 días de cultivo en medio de papa (PB) (control) comparándolo con cultivos en este mismo medio adicionado con 0.5% de bioestimulante: dextrosa (PDB), Impranil® (PIB) o Poly Lack® (PPLB). En estos ensayos se cambió el sistema de cultivo, de cajas Petri en cultivo estático, a matraces de 125 mL en cultivo con agitación, con el objeto de mantener lo más homogéneo posible el medio de cultivo, ya que los barnices de PU se precipitan, además de propiciar una mayor oxigenación del cultivo lo que consideramos redundará en un mejor crecimiento de los hongos. Además en este sistema no se realizaron recambios del medio de cultivo ni eliminación del excedente de micelio cada 7 días, como se hacía en los experimentos en caja de Petri en cultivo estático. En este experimento también se probó si cultivos estáticos producían los mismos resultados que los cultivos agitados (200 rpm), ya que algunos autores sugieren que el tratamiento de diversos xenobióticos, como los PU y otros que contienen grupos funcionales semejantes, con hongos se ve favorecido por procesos oxidativos por lo cual se requiere de una buena oxigenación del medio (Hincapié-Llanos *et al.*, 2009; Kannisery *et al.*, 2011; Da Silva Coelho-Moreira *et al.*, 2013).

En el análisis de los resultados se describen solamente los más relevantes para el objetivo del estudio. La cepa A3.I.1 fue bioestimulada para la degradación de PU (15%) en el medio PPLB al 0.5%, comparado con el medio de referencia (PB), tanto en agitación como estático (Figura 11a y 11b). La cepa A2.PP.5 presentó bioestimulación con Impranil® (20%) en los cultivos en agitación (Figura 11a), mientras que en los cultivos estáticos fue bioestimulada con Poly Lack® (20%) (Figura 11b). Por último la cepa T1.PL.1 fue altamente bioestimulada con dextrosa, degradando cerca del 45% de las espumas, y en menor cantidad con Poly Lack® (13%) en los cultivos con agitación (Figura 11a), mientras que en el cultivo estático únicamente presentó poca bioestimulación con dextrosa (13%) (Figura 11b). En las tres cepas la producción de biomasa fue mayor en los cultivos con agitación (Figura 11c y d), ya que los hongos son organismos aerobios, por lo que la oxigenación fomenta un mayor crecimiento. Los cálculos de la actividad degradativa específica (cantidad de espuma degradada/biomasa generada) muestran que en los medios de cultivo en los que se observa la mayor degradación, hay también la mayor actividad específica (Figura 11e y f). Sin embargo, de manera interesante en los cultivos estáticos de las cepas A3.I.1 y A2.PP.5 la actividad específica alcanzada en la bioestimulación con Poly Lack es mucho mayor a la obtenida en los cultivos con agitación para todas las condiciones de bioestimulación. Estos resultados sugieren la posibilidad de combinar las condiciones de agitación y estática para obtener mayores niveles de biodegradación.

Al comparar los resultados de este experimento en condiciones de cultivo estático y empleando dextrosa como bioestimulante, con los obtenidos en los experimentos presentados en la figura 8 se observan discrepancias notables. En los resultados mostrados en la figura 8, las cepas A3.I.1, A2.PP.5 y T1.PL.1 generaron entre 50 a 70% de degradación, mientras que en este experimento se obtuvieron resultados de degradación de entre 7 y 15%. Esta gran discrepancia en la biodegradación de las espumas podría ser el resultado de las diferencias en las condiciones de cultivo, ya que en el primer experimento se empleó medio PDB diluido al 50% (conteniendo 1% de dextrosa), que se recambiaba cada 7 días, a la vez que el micelio que sobresalía a la espuma de PU era eliminado, mientras que en el experimento de la figura 11 se empleó medio PB con 0.5% de dextrosa, sin recambio de medio ni eliminación del micelio

excesivo en todos los 21 días. La mayor concentración de dextrosa en el medio de cultivo y el recambio por medio fresco cada semana, en el primer experimento podría haber favorecido un mejor desarrollo del micelio, ya sea por un mayor suplemento en la fuente de carbono, así como por la eliminación de posibles sustancias tóxicas, derivadas de la degradación de la espuma de PE-PU por el hongo, que pudieran acumularse en el medio durante el cultivo.

Otro factor que pudo haber influido en la gran diferencia entre los resultados, es la eliminación del exceso de micelio. Esta acción estaría permitiendo que el micelio viejo, que podría ser ya no viable, fuera retirado de la espuma, manteniendo constante el desarrollo de tejido joven, mientras que en el experimento de la figura 11 no se retiró el excedente de micelio. Resultados interesantes dependientes de la cepa pudieron ser observados. Por ejemplo, la degradación de espumas de PE-PU por T1.PL.1 (40%) cultivado en agitación en medio bioestimulado con dextrosa (Figura 11) fue cercana a la observada en los experimentos de la figura 8 (55%) que eran en régimen estático pero que contenían más dextrosa, se recambiaba el medio y se eliminaba el micelio cada 7 días; lo que sugiere que la oxigenación del cultivo, favorece la degradación de las espumas. Por otro lado, las cepas A3.I.1 y A2.PP.5, a diferencia de la T1.PL.1, fueron mayormente bioestimuladas por barnices de PU, lo cual sugiere que las diferentes cepas tienen diferentes mecanismos o procesos regulatorios involucrados en la degradación del PU.

Para determinar si existe un efecto dependiente de la concentración de bioestimulante, que pudiera favorecer la degradación de las espumas debido a que los hongos prefieran consumir el sustrato que está en disolución en vez del PU sólido, o que incluso pudiera haber un efecto tóxico por la concentración de los bioestimulantes, se decidió probar el efecto de una concentración menor de bioestimulantes (0.25%), cultivando 21 días a 30 °C y en agitación. Los resultados muestran que la cepa A3.I.1 presentó la mayor degradación (55%) y actividad degradativa específica (0.23 mg de espuma degradada/mg de biomasa) en el medio PPLB, seguida de las obtenidas en PIB (40% de degradación y 0.18 mg de espuma degradada/mg de biomasa). La cepa T1.PL.1 mostró bioestimulación en PDB y PPLB presentando degradaciones de entre el 12 y 16% y actividades específicas de alrededor de 0.13 mg de espuma degradada/mg

de biomasa. Para el caso de la cepa A2.PP.5 hubo bioestimulación en todos los medios probados, alcanzando valores de degradación entre 15 y 18%, aunque sólo en el cultivo con PPLB hubo una mejora en la actividad degradativa específica (0.13 mg de espuma degradada/mg de biomasa) que en las otras condiciones (Figura 12b,d,f).

Los resultados muestran que la cepa A3.I.1 presentó la mayor degradación (55%) y actividad degradativa específica (0.23 mg de espuma degradada/mg de biomasa) en el medio PPLB, seguida de las obtenidas en PIB (40% de degradación y 0.18 mg de espuma degradada/mg de biomasa). La cepa T1.PL.1 mostró bioestimulación en PDB y PPLB presentando degradaciones de entre el 12 y 16% y actividades específicas de alrededor de 0.13 mg de espuma degradada/mg de biomasa. Para el caso de la cepa A2.PP.5 hubo bioestimulación en todos los medios probados, alcanzando valores de degradación entre 15 y 18%, aunque sólo en el cultivo con PPLB hubo una mejora en la actividad degradativa específica (0.13 mg de espuma degradada/mg de biomasa) que en las otras condiciones (Figura 12a,c,e)

Comparando estos resultados con los obtenidos en los ensayos con 0.5% de bioestimulante y cultivados en agitación (Figura 11), se observa que se logró una mejora muy significativa en la capacidad de A3.I.1 para degradar las espumas de PE-PU, incrementando en más de tres veces con Poly Lack[®] y más de 10 veces con Impranil, el cual con esta menor concentración el Impranil, actuó claramente como bioestimulante, aunque no tan efectivo como el Poly Lack. Asimismo, a 0.25% de Poly Lack se observó el doble de la actividad degradativa específica que empleando 0.5%. Estas observaciones muestran que el Poly Lack a la concentración de 0.5% en el medio de cultivo, presenta un efecto estimulador menor en la actividad degradativa de A3.I.1, en comparación con una concentración de 0.25%.

Por otra parte, la biodegradación alcanzada con A3.I.1 utilizando Poly Lack[®] (0.25%) como bioestimulante y sin recambio del medio de cultivo ($57 \pm 13\%$) (Figura 12) es muy similar a la obtenida con el sistema de recambio de medio y recorte de micelio ($59 \pm 8\%$) (Figura 8), lo cual es de gran utilidad ya que empleando esta nueva condición se logró disminuir significativamente tanto el gasto de nutrientes, como la manipulación del cultivo.

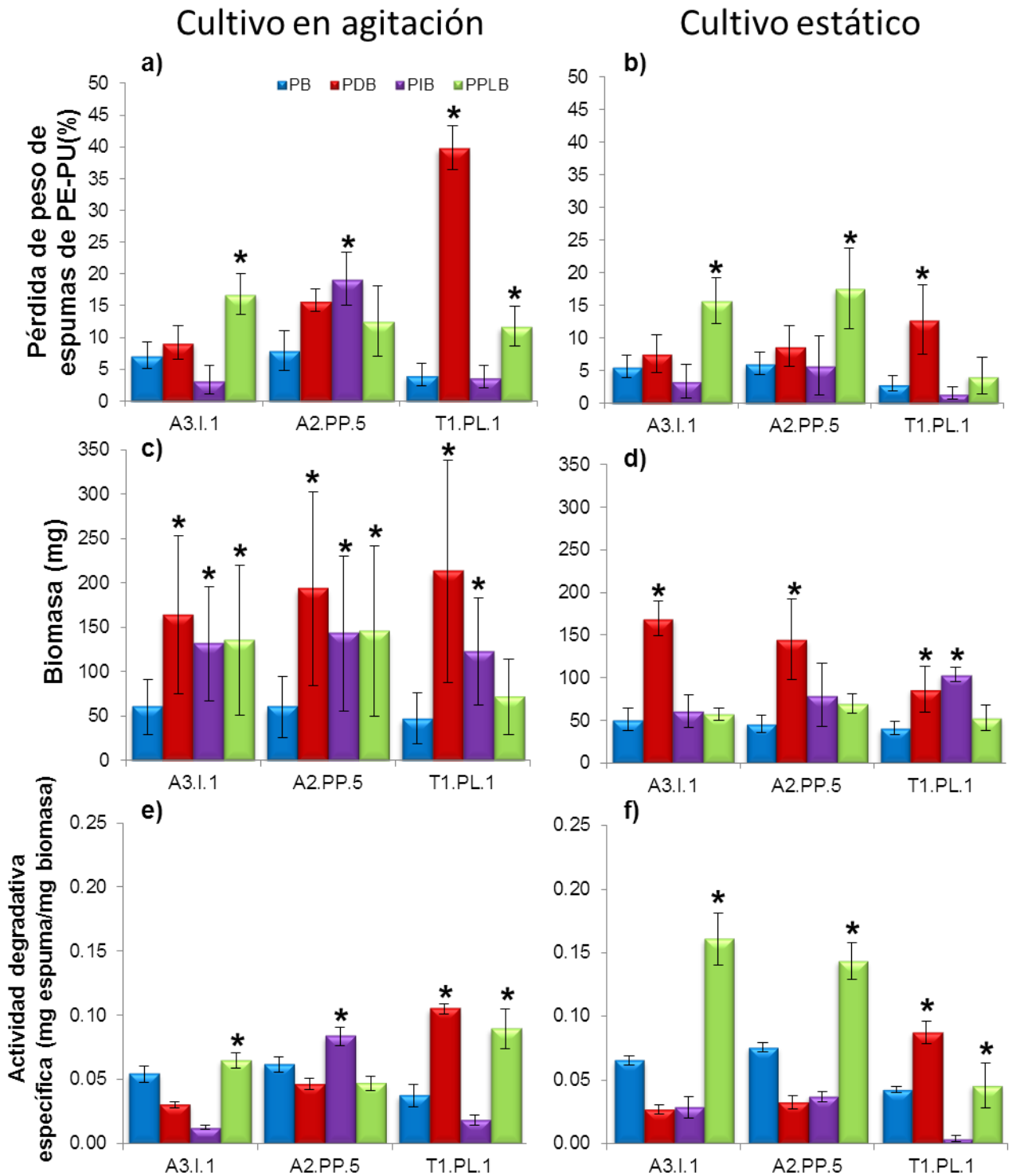


Figura 11. Efecto de los bioestimulantes al 0.5% sobre la biodegradación de espumas de PE-PU. Degradación de las espumas (a,b), producción de biomasa (c,d) y actividad degradativa específica (e,f) en cultivos de tres cepas de hongos (A3.I.1, A2.PP.5 y T1.PL.1), en caldo de papa (PB) y bioestimulados con dextrosa (PDB), Imranil (PIB) y PolyLack (PPLB) durante 21 días a 30 °C en agitación (izquierda) y estáticos (derecha). A los valores de degradación se les restó la degradación de los controles sin inocular. n=3. *diferencia significativa con cultivos en PB (p<0.05).

En el caso de la cepa T1.PL.1 se observó que la mayor degradación fue alcanzada usando 0.5% de dextrosa en el medio de cultivo ($39\pm 3\%$) (Figura 11a), y disminuyó considerablemente (menos del 15%) al reducir la concentración al 0.25% de dextrosa (Figura 12a), lo cual concuerda con lo observado en el resultado del experimento de la figura 8, para esta cepa, en donde alcanzó valores de degradación de $57\pm 13\%$. Con estos resultados, se concluye que esta cepa requiere concentraciones mayores de dextrosa para tener mejores resultados en la degradación de las espumas de PE-PU. Por último la cepa A2.PP.5, presentó resultados muy semejantes de degradación en los ensayos con 0.5% (Figura 11) y 0.25% (Figura 12) de bioestimulante, por lo cual el disminuir la concentración no mejora la degradación de las espumas, sin embargo es necesario evaluar si una concentración mayor de sustratos podría presentar un efecto bioestimulante, al igual que con T1.PL.1.

Debido a que poder realizar las evaluaciones de estos experimentos en menor tiempo podría resultar muy ventajoso para los avances del proyecto, se decidió evaluar la degradación de las espumas a los 14 días de cultivo empleando las mismas cepas y las mismas condiciones de bioestimulación (0.25% y agitación). La cepa A3.I.1 presentó bioestimulación en PDB y PIB degradando cerca del 20% de las espumas, sin embargo la degradación obtenida fue considerablemente menor a lo observado a los 21 días, en donde con PIB se alcanzaban degradaciones superiores al 40%. En el medio PPLB a los 14 días no se observa bioestimulación, mientras que a los 21 días esta sustancia es el mejor bioestimulante. Para las otras dos cepas ocurre algo semejante, en donde no se alcanza la misma degradación que a los 21 días, y no es posible observar el efecto bioestimulante, lo cual sugiere que no es conveniente reducir los tiempos de cultivo para la evaluación de la degradación de las espumas de PE-PU por los hongos filamentosos. Como ya se mencionó, sólo existe un estudio sobre el uso de bioestimulantes para la degradación de PU con microorganismos, donde se utilizaron laminillas de PS-PU y se bioestimuló con extracto de levadura e Impranil en un sistema de composta con microorganismos no conocidos. Con ello solo se logró reducir la fuerza tensil de las laminillas en casi el 50% después de 10 semanas de cultivo (Cosgrove *et al.*, 2010). En nuestro trabajo sin embargo, se lograron alcanzar degradaciones sobre espumas de PE-PU de $57\% \pm 13\%$ en tan sólo 21 días. Por lo

tanto es de suma importancia continuar con más estudios dirigidos a mejorar la degradación de PU con microorganismos utilizando bioestimulantes para definir las concentraciones más apropiadas. Por esta razón se decidió continuar optimizando las condiciones utilizando la cepa A3.I.1 y utilizando 0.25% de Poly Lack en el medio de cultivo como bioestimulante.

8.7. Efecto de las condiciones agitación/estático sobre la degradación de las espumas de PE-PU

Con la idea de explorar si utilizando combinaciones de cultivos en regímenes de agitación y estático sería posible incrementar la biodegradación de las espumas de PE-PU, por los hongos, se realizaron diversos experimentos empleando la cepa A3.I.1, con la mejor condición de bioestimulación: 0.25% de Poly Lack[®] en donde se había registrado degradación de espumas de PE-PU mayores al 55%. Para este experimento se plantearon cuatro combinaciones de cultivos agitación-estático (0 días de agitación - 21 estático; 7 días de agitación -14 días estático; 14 días en agitación – 7 estático y 21 días de agitación). En todas las condiciones probadas, excepto a 7 días agitación – 14 días estático, se observó un claro efecto bioestimulante del Poly Lack[®], siendo más notoria esta diferencia a 14 días agitación – 7 días estático en donde se observaron degradaciones cercanas al 70% (Figura 13a), las más altas obtenidas dentro de todas las condiciones probadas. Comparando con los resultados del experimento donde se cultivó a 14 días, estos datos cobran sentido ya que transcurridos los 14 días en agitación se produce la mayor cantidad de biomasa (150 mg) (Figuras 12c y d), y después de este tiempo comienza a ocurrir una mayor degradación de las espumas.

En cuanto a la actividad específica de degradación, se logró un valor mayor con este nuevo sistema (0.38 ± 0.12 mg de espuma/mg biomasa) al obtenido en el cultivo de 21 días con agitación (Figura 13c). El cultivo de 21 días estático presentó la mayor actividad específica pero la menor degradación y producción de biomasa (Figura 13), semejante a lo observado en las mismas condiciones en la figura 11), lo cual es un ejemplo de que considerar sólo la actividad degradativa específica para determinar que una condición es la mejor, no es suficiente, ya que el objetivo prioritario es degradar la

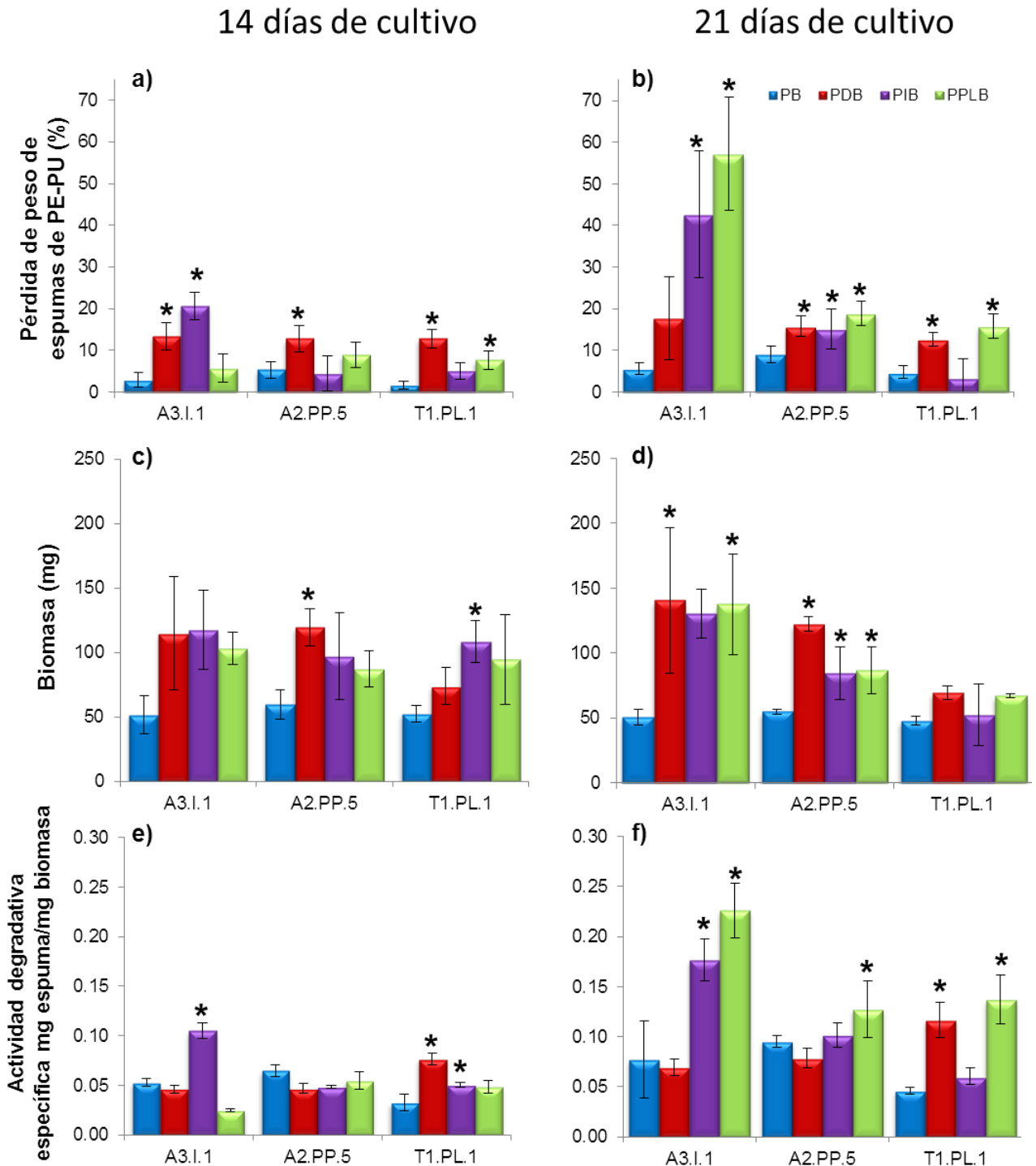


Figura 12. Efecto de los bioestimulantes al 0.25% en la biodegradación de espumas de PE-PU. Degradación de las espumas (a,b), producción de biomasa (c,d) y actividad degradativa específica (e,f) cultivos en caldo de papa (PB) y bioestimulados con dextrosa (PDB), Impranil (PIB) y Poly Lack (PPLB) a 30 °C en agitación (200 rpm). Cultivos a 14 (Izq.) y 21 días (der.). A los valores de degradación se les restó la degradación de los controles sin inocular. n=3. *diferencia significativa con cultivos en PB (p<0.05).

mayor cantidad posible de estos polímeros sintéticos. En la condición de 21 días de agitación se observó una degradación cercana al 45% en el medio PPLB (Figura 13a), lo cual fue un valor menor al observado anteriormente, cerca del 60% (Figura 12a). Al comparar la actividad específica se observó que era de 0.25 ± 0.07 mg de espuma degradada/mg de biomasa, semejante al observado previamente, sin embargo, la producción de biomasa fue menor a la obtenida anteriormente (Figura 13).

Esto significa que el micelio del hongo presentó la misma actividad degradativa específica, pero produjo una menor biomasa en este experimento, lo cual pudo haber sido el resultado de algún factor ambiental (probablemente cambios de temperatura determinados por la temporada en la que se llevó a cabo el experimento) que influyó sobre su velocidad de crecimiento, lo cual se vio reflejado en la disminución en la degradación (Figura 12c).

Con estos resultados se logró reducir el tiempo de cultivo en agitación a 14 días, más 7 días estático, y obtener los mismos resultados de degradación que al cultivarlos 21 días con agitación. Esto tendría una ventaja económica pensando en el establecimiento de un proceso a mayor escala, ya que ahora sabemos que únicamente debemos mantener el cultivo en agitación el tiempo suficiente para que alcance una biomasa crítica y a partir de ahí se puede retirar la agitación, generando una disminución en los costos del cultivo.

En conclusión la mejor cepa para degradar las espumas de PE-PU es A3.I.1, la cual se logró bioestimular adicionando 0.25% de Poly Lack, logrando la mayor eficiencia y actividad específica para la degradación de las espumas de PE-PU, al combinar cultivos agitados (14 días) con un periodo de incubación estática (7 días). Con este sistema se consiguió alcanzar valores de degradación mayores a los obtenidos con el método inicial (67% vs 60), en el cual se cambiaba por completo el medio de cultivo cada 7 días y se eliminaba el excedente de micelio del hongo, disminuyendo sustancialmente la manipulación y requerimiento de nutrientes. Además, a partir de estas observaciones es posible sugerir realizar un análisis para determinar el tiempo de cultivo más efectivo para lograr alcanzar altos niveles de biodegradación de las espumas, con estas cepas de hongos, así como probar otras condiciones de aireación y concentración de

bioestimulantes para incrementar la degradación de las espumas de PE-PU por acción de estos hongos filamentosos.

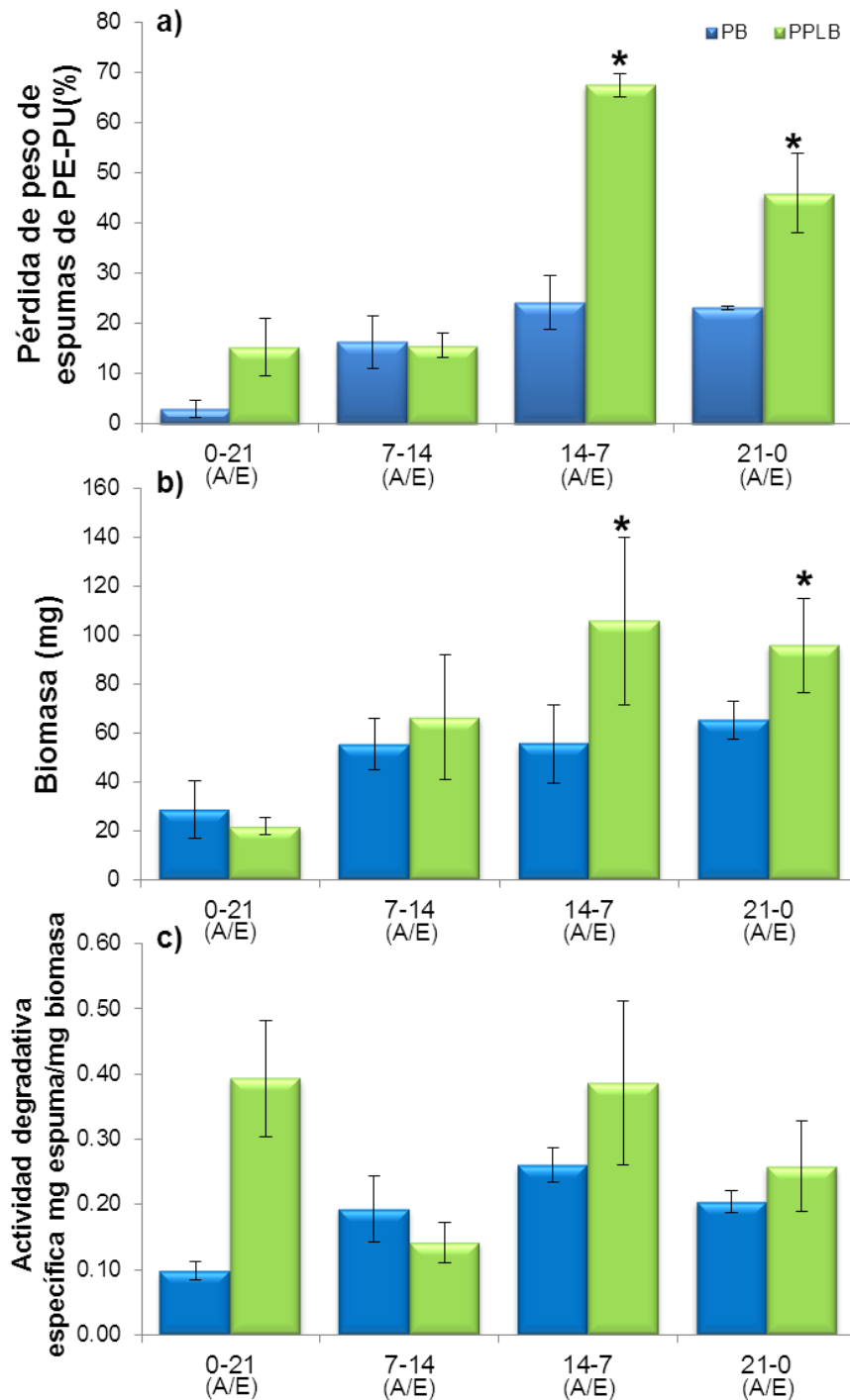


Figura 13. Efecto de diferentes regímenes de cultivo agitación-estático sobre la degradación de espumas de PE-PU por acción del hongo A3.I.1 en medio PPLB con 0.25% de bioestimulante. a) degradación de las espumas. **b)** producción de biomasa. **c)** actividad degradativa específica. **A/E:** días de cultivo en agitación/ estático. 30 °C, 200 rpm. n=3. * Diferencia significativa p<0.05.

8.8. Análisis de la actividad degradativa de los hongos sobre las espumas de PE-PU

El efecto de la actividad biodegradativa de los hongos sobre las espumas de PE-PU fue evaluado por diversas técnicas analíticas con el objeto de demostrar el efecto tanto físico como químico.

8.8.1. Análisis del daño estructural de las espumas cultivadas con los cuatro hongos más degradadores

En este estudio se analizó la degradación de las espumas provenientes de los cultivos inoculados con conidias de los hongos A3.I.1, A2.PP.5, T1.PL.1 y BP3.I.9 cultivados en medio PDB (50%), sin agitación y con recambio de medio y recorte de micelio cada 7 días. Las muestras fueron analizadas por SEM, revisando diferentes campos al azar. Se muestran imágenes representativas de los daños estructurales en las microfibras de la espuma por los hongos. El control negativo consistió en la espuma sin inocular, incubada en las mismas condiciones de cultivo. La cepa A3.I.1 generó la mayor cantidad de daños sobre las espumas, tales como rupturas, porosidades y adelgazamientos en las fibras que colapsaron la microestructura de la espumas. En las espumas tratadas con A2.PP.5 y T1.PL.1 se observaron poros y rupturas en las microfibras, aunque en menor medida que con A3.I.1. De manera interesante, en la espuma cultivada con la cepa BP3.I.9 no se ven poros en las microfibras, sino que se observan rupturas y adelgazamientos muy marcados. Estas diferencias en la acción de los hongos sobre las espumas de PE-PU, demuestra que tienen distintas formas de invasión y ataque a la estructura, sustentada en la distinta fisiología y bioquímica de cada uno de ellos (Figura 14). Como parte de este trabajo, recientemente hemos reportado microfotografías electrónicas del crecimiento de las cepas A3.I.1, A2.PP.5 y T1.PL.1 invadiendo las espumas de PE-PU y los daños generados en éstas al retirar el micelio de las espumas tras 21 días de cultivo en medio PDB al 50% (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016).

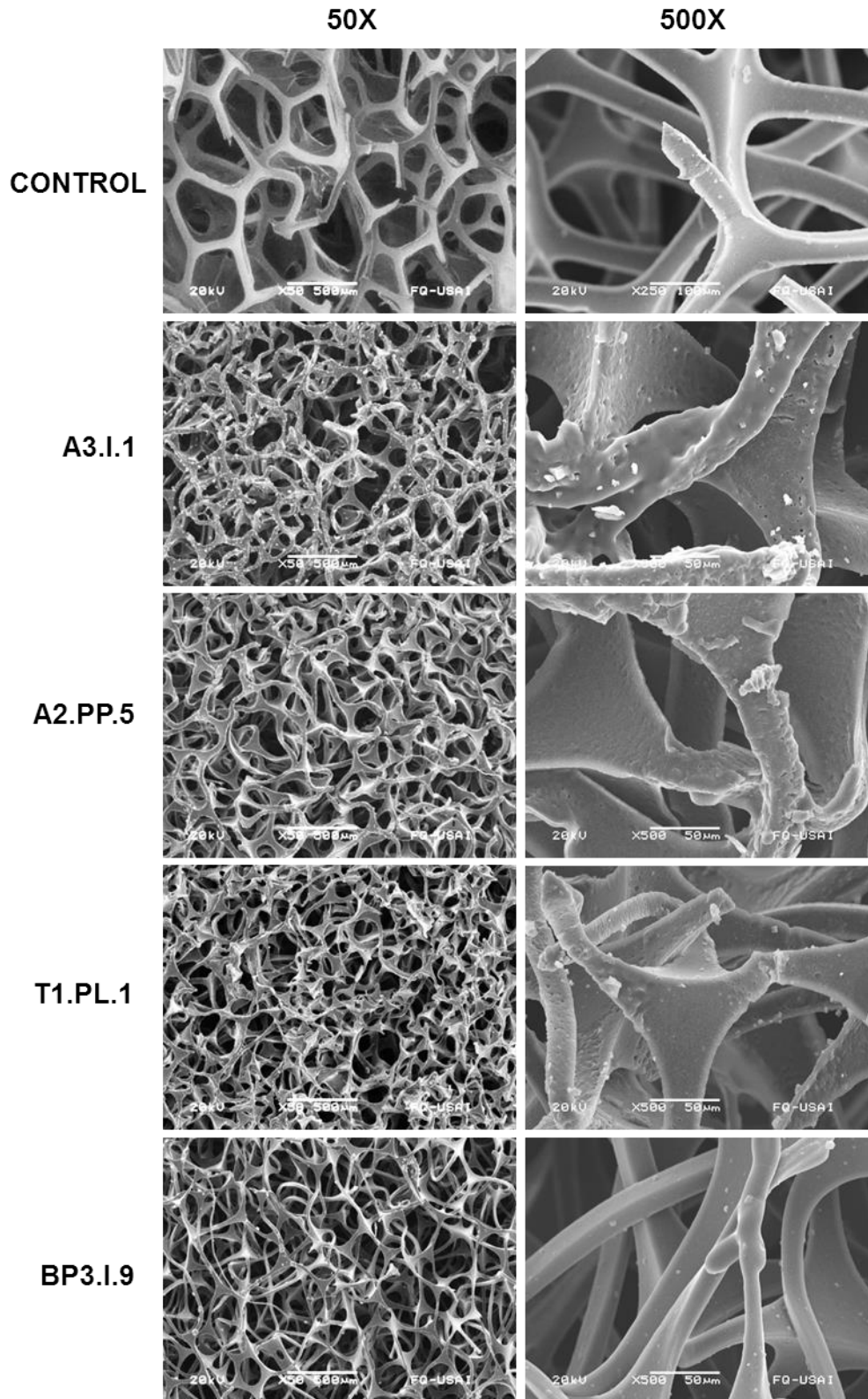


Figura 14. Análisis del daño estructural de las espumas de PE-PU. Cultivo en PDB (50%), 21 días a 30 °C en caja de Petri (estático), con recambio de medio y recorte del micelio cada 7 días. Las espumas fueron tratadas con NaClO (0.88% m/v) para eliminar el micelio.

Este tipo de daños estructurales también han sido reportados por otros autores usando hongos como *Alternaria* sp. (Matsumiya *et al.*, 2009), *Apergillus niger* (Hincapié-Llanos *et al.*, 2009) y consorcios fúngicos constituidos por *Nectria gliocladioides*, *Penicillium ochrochloron* y *Geomyces pannorum* (Barrat *et al.*, 2003). Sin embargo, estos daños son generados en cultivos de más de 6 semanas, mientras que las cepas de *Cladosporium* evaluadas en este trabajo, logran esos daños en sólo 3 semanas, lo cual significa una mayor eficiencia para degradar las espumas de PE-PU bajo las condiciones probadas.

8.8.2. Análisis de los compuestos derivados de la degradación de las espumas de PE-PU por A3.I.1 por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS)

Debido a que la cepa A3.I.1 mostró los mayores efectos de degradación sobre las espumas de PE-PU en la SEM (Figura 14), se decidió tratar de identificar los posibles compuestos resultantes de la degradación de las espumas mediante GC-MS, bajo las condiciones de cultivo del experimento de la figura 8. En este ensayo uno de los controles consistió en espumas incubadas por 21 días, en régimen estático, medio PDB (50%) sin inocular, recambiado cada 7 días y después tratadas con NaClO al 0.88% m/v, para comparar con los compuestos detectados al analizar las espumas incubadas con A3.I.1 bajo las mismas condiciones de cultivo y el mismo tratamiento para eliminar el micelio. Un control más fue la espuma sin inocular, incubada en las condiciones indicadas, pero sin tratarla con NaClO, esto permite discernir sobre los compuestos que aparecen por la acción del NaClO, que es oxidante. Previamente fue necesario identificar un disolvente adecuado para preparar las muestras para el análisis por GC-MS, para lo cual se emplearon diferentes disolventes (diclorometano, cloroformo, acetonitrilo, metanol y etanol), para determinar con cuál de éstos se lograban disolver las espumas (datos no mostrados). En este ensayo se descubrió, que únicamente las espumas que habían sido cultivadas con el hongo y tratadas con NaClO se disolvían casi por completo en etanol, lo cual es resultado del efecto del hongo sobre la estructura de las espumas, posiblemente generando compuestos más polares y pequeños. Por esta razón se decidió utilizar etanol como disolvente. Para todos los

compuestos detectados (Figura 15) (Tabla 7) se presentan los espectros de masas en el anexo 5.

En las espumas sin inocular incubadas por 21 días, tanto las tratadas como las no tratadas con NaClO, fue posible detectar compuestos orgánicos de cadenas largas con diversos grupos funcionales, como ácidos carboxílicos, alcoholes y ésteres, señalados en la Tabla 7 con rosa, amarillo y azul respectivamente. En el análisis de la espuma que no fue tratada con NaClO se observan 20 compuestos, posiblemente moléculas que no polimerizaron durante la síntesis del PU, y por lo tanto no forman parte de la estructura del polímero y sólo están adsorbidas en él, o que se liberaron como resultado de degradación física generada por la incubación. En las espumas tratadas con NaClO se observó la aparición de otros 10 compuestos que no se detectaron en la espuma sin tratar. De manera interesante, la detección de la 6-cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina parece implicar la ciclación de algunos compuestos, liberados de la espuma de PU tras la incubación, por acción del NaClO. También se observó que algunos compuestos en la espuma sin tratar desaparecen en la espuma tratada. Esto puede deberse a que algunos de estos compuestos reaccionaron con el hipoclorito, como en el caso del hexadecanol y el ácido undecanoico (detectados en la espuma sin tratar), los cuales desaparecieron en la espuma tratada, pero aparecieron dos compuestos relacionados con el hexadecanol y uno relacionado con el 1-cloroundecano. Es probable que esto mismo les ocurriera a otros de los compuestos que desaparecieron, sin embargo no fue posible identificar la correlación con los compuestos que se formaron.

Al comparar los compuestos detectados en la espuma cultivada con la cepa A3.I.1 y el control sin inocular tratado con hipoclorito de sodio (Tabla 7) se observa que hay algunos compuestos que aparecen (**negritas**) y otros que desaparecen (subrayados). Los compuestos que aparecen únicamente en la espuma tratada con el hongo muy probablemente estén relacionados con la actividad biodegradativa del hongo sobre la espuma. En esta categoría, los más abundantes (más del 65%) en la espuma tratada con el hongo, pero que fueron muy escasos en la espuma sin inocular, fueron los organoclorofosfatados empleados como retardantes de flama en las espumas. El incremento en la concentración de estos compuestos puede deberse a que al cultivar la espuma con el hongo, éste favoreció la liberación de dichos compuestos, pero sin una

degradación de los mismos. Cabe mencionar que estos compuestos retardantes de flama, son tóxicos para algunos eucariontes como protozoarios (Li *et al.*, 2015), sin embargo ya se ha demostrado que *C. tenuissimum* es capaz de soportar la toxicidad de estas sustancias (Álvarez-Barragán *et al.*, 2016), lo cual brinda una ventaja más para utilizar a este hongo para la degradación de PU sólidos, particularmente espumas de PU.

Le siguieron en abundancia tres compuestos no identificados (cni1-cni3), de los cuales cni 1 y 2 están relacionados químicamente, los cuales parecerían ser el resultado de alguna actividad degradativa ya que no se detectaron en los controles. También se observó la aparición de tres compuestos relacionados con la 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H-benzimidazol-2-ona, sin embargo no fue posible hacer una correlación directa con la degradación de algún compuesto en específico.

Por otro lado, en la espuma tratada con el hongo, hubo un incremento en la concentración relativa del compuesto relacionado con la 6-cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina, el cual fue detectado en incubación de la espuma sin inocular y tratada con NaClO, muy probablemente porque el hongo incrementó la liberación, de la espuma de PE-PU, de las moléculas que al reaccionar con el hipoclorito generan al compuesto relacionado con la 6-cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina. Asimismo, aparecieron tres compuestos relacionados con el ácido m-clorocinámico (rosa), los cuales pudieron haber sido generados por la biotransformación de las moléculas precursoras para la síntesis del compuesto relacionado con la 6-cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina, ya que al comparar los espectros de masas se observó similitud en los patrones de ionización entre ellos.

De manera importante fue posible identificar en la espuma tratada con el hongo, al diisocianato de tolueno (TDI) (rojo en la Tabla 8), el cual es uno de los precursores en la síntesis del PU y forma parte del grupo uretano. Por la naturaleza de los enlaces uretano (-NHCOO-), formados entre los poliisocianatos y los polioles, el encontrar TDI libre después del tratamiento con el hongo, sugiere la acción de al menos una actividad enzimática hidrolítica de tipo amidasa o esterasa, aunque la reacción específica aún no es clara. También fue posible observar en la espuma cultivada con el hongo, la desaparición de muchos compuestos que se encontraron en el control sin inocular

tratado con NaClO. Entre los compuestos que desaparecieron, se encuentran el compuesto ni 6, el más abundante en este tratamiento (41.6%) y los compuestos ni 7 y 8. Casi todos los ésteres (azul) (12%) desaparecieron, así como todos los ácidos carboxílicos (rosa) (13%) y alcoholes (amarillo) (8.7%) que se habían detectado en el control, lo cual se puede deber a que el hongo los utilizó como fuente de carbono. Debido a que, como ya se comentó anteriormente, lo más probable es que estos compuestos no formen parte del polímero, la degradación de estas sustancias por el hongo no es una evidencia del ataque al PU, pero indica que algunos de los componentes estructurales del polímero podrían ser utilizados por A3.I.1 como fuente de carbono. Resulta interesante señalar que la cepa A3.I.1 fue capaz de degradar al compuesto mono(2-etilhexil) éster del ácido benceno-1,2-dicarboxílico, un derivado del ácido ftálico, el cual aunque no forma parte del poliuretano, se emplea como plastificante en la síntesis de muchos polímeros sintéticos.

Si bien el análisis de las espumas para detectar los compuestos derivados de la degradación dan una perspectiva más aproximada a la realidad en el microambiente que se genera al momento de que el hongo se desarrolla y degrada el PU, el conocer el tipo de compuestos que se dispersan en el sobrenadante de cultivo permite identificar como se liberan moléculas más pequeñas en el medio, después de los 21 días de incubación con el hongo. Por esta razón se decidió analizar también el sobrenadante en un intento de detectar la presencia de compuestos resultantes de la biodegradación (Tabla 8). Para ello se hicieron extracciones con diclorometano (CH_2Cl_2), del sobrenadante del cultivo y se analizó por GC-MS. En el experimento donde se analizó el sobrenadante de cultivo de A3.I.1 sin la espuma no se detectó ningún compuesto, asegurando con esto que las moléculas detectadas en el sobrenadante en los cultivos con las espumas corresponderán a productos de la degradación de éstas (Figura 16b). Al incubar la espuma en el medio PDB (50%) sin hongo (control incubación), para identificar los posibles compuestos liberados al sobrenadante por la incubación, fue posible detectar únicamente los retardantes de flama (verde) (Figura 16a). Los compuestos detectados en el sobrenadante del cultivo de A3.I.1 en PDB (50%) con la espuma fueron principalmente ésteres que fueron liberados de las espumas de PE-PU por acción del hongo.

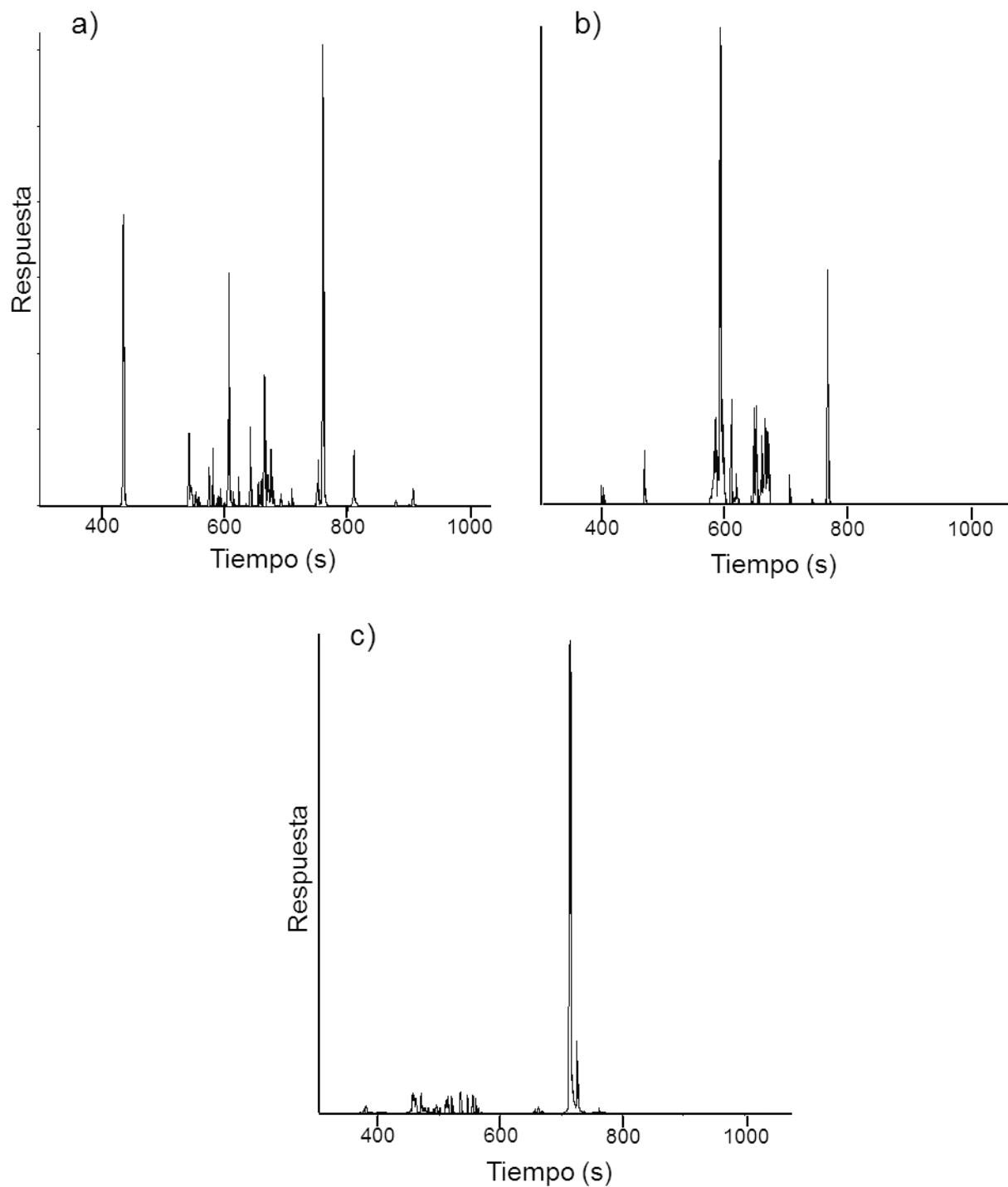


Figura 15. Cromatogramas de los compuestos detectados en las espumas disueltas con etanol. Cultivos de 21 días en medio PDB (50%) a 30 °C, sin agitación. Después de la incubación, las espumas fueron tratadas con etanol 96° durante 30 min con agitación. El extracto etanólico fue analizado por CG-EM. **a)** Espuma sin inocular ni tratar con NaClO, **b)** Espuma sin inocular tratada con NaClO, **c)** Espuma inoculada con A3.I.1 tratada con NaClO.

Tabla 7. Compuestos detectados por GC-MS en las espumas disueltas con etanol.

R.T. (s)	Compuesto	Espuma sin inocular % área		Espuma inoculada con A3.I.1 % área
		Sin tratar con NaClO	Tratada con NaClO	Tratada con NaClO
380.6	2,4-diisocianato-1-metilbenceno (TDI)	-	-	0.40
399.7	relacionado con 2,3-dihidro-6-amino-indol-2-ona	-	2.38	0.50
434.6	hexanoato de heptilo	16.42	-	-
456.8	ni 1	-	-	4.74
459.1	ni 2	-	-	4.76
462.2	relacionado con ácido m-clorocinámico (1)	-	-	0.64
470.8	relacionado con 6-cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina	-	1.70	3.96
495.9	relacionado con ácido m-clorocinámico (2)	-	-	1.19
501.9	relacionado con ácido m-clorocinámico (3)	-	-	1.50
510.9	Relacionado con 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H- benzimidazol-2-ona (1)	-	-	1.07
513.2	ni 3	-	-	3.28
514.5	relacionado con dicloroxilenol (1)	-	-	3.28
534.9	Relacionado con 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H- benzimidazol-2-ona (2)	-	-	2.16
536.4	relacionado con dicloroxilenol (2)	-	-	2.16
541.4	relacionado con ácido hexadecanoico	3.95	-	-
546.5	Relacionado con 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H- benzimidazol-2-ona (3)	-	-	1.01
560.0	2-propanol-1-clorofosfato	0.69	-	1.16
573.7	relacionado con ácido undecanoico	2.54	-	-
574.3	ni 4	2.54	<u>5.07</u>	-
578.7	ni 5	-	<u>2.59</u>	-
579.9	1-hexadecanol	2.71	-	-

580.6	relacionado con 1-hexadecanol (1)	-	<u>3.78</u>	-
581.0	relacionado con 1-cloroundecano	-	<u>3.78</u>	-
588.4	ni 6	-	<u>41.64</u>	-
592.6	relacionado con tridecanoato de metilo	0.93	-	-
593.1	relacionado con octadecanoato de metilo	-	<u>2.76</u>	-
606.9	ácido hexadecanoico	17.22	<u>5.08</u>	-
613.2	pentadecanoato de etilo	1.48	<u>2.15</u>	-
621.9	palmitato de isopropilo	1.52	-	-
641.8	(E) 9-hexadecen-1-ol	3.85	<u>3.87</u>	-
645.5	ni 7	-	<u>3.31</u>	-
652.0	octadecanoato de metilo	0.43	<u>0.56</u>	-
653.7	relacionado con metilenciclooctano	1.53	2.57	1.22
659.4	relacionado con ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrienoico	-	<u>5.05</u>	-
663.9	ácido octadecanoico	7.34	<u>2.81</u>	-
665.5	ni 8	-	<u>2.65</u>	-
674.5	relacionado con acetato de heptadecacilo	2.67	-	-
698.6	relacionado con el 1 hexadecanol (2)	-	<u>1.07</u>	-
714.4	1-propanol-2,3-diclorofosfato	1.28	-	60.06
725.8	relacionado con 1-propanol-2,3-diclorofosfato	-	-	5.87
751.0	relacionado con dicitlohexil adipato	2.99	-	-
761.9	mono(2-etilhexil) éster del ácido 1,2-bencendicarboxílico	21.67	6.5	0.43
809.1	mono(2-etilhexil) éster del ácido 1,3-bencendicarboxílico	4.76	-	-
903.2	relacionado con diisocil éster del ácido adípico	1.37	-	-
---	Otros no identificados	1.83	0.7	0.6

Amarillo: alcoholes, **café:** hidrocarburos, **anaranjado:** heterociclos, **azul:** ésteres, **rojo:** isocianatos, **rosa:** ácidos carboxílicos, **verde:** organoclorofosfatos (retardantes de flama). ni: compuesto no identificado. Espectros de masas en el anexo 5.

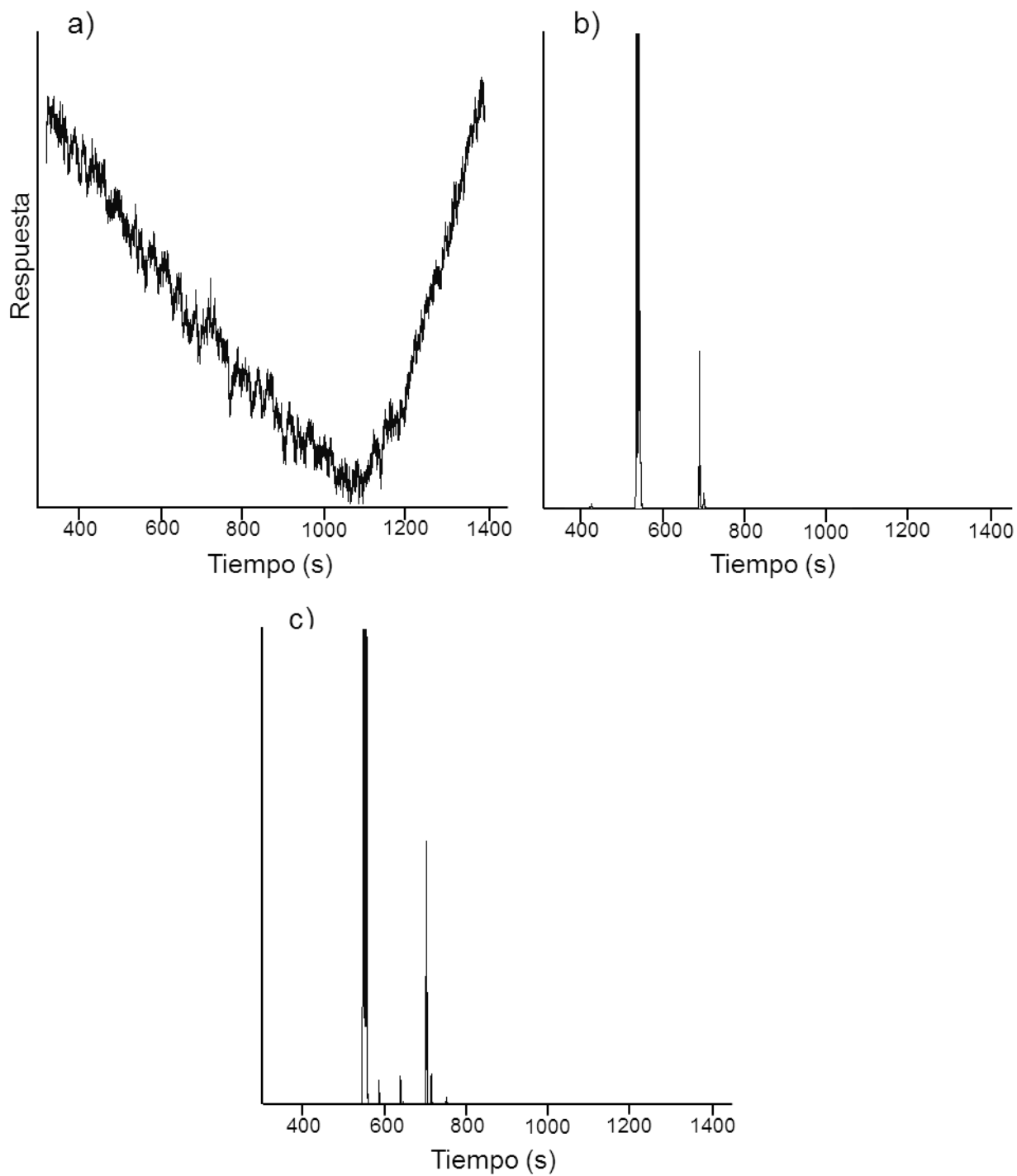


Figura 16. Cromatogramas de los compuestos detectados en los sobrenadantes del cultivo de A3.I.1 con la espuma. a) Sobrenadante del cultivo de A3.I.1 sin espuma (no se detectaron compuestos), **b)** Sobrenadante del medio de cultivo con espuma y sin inocular **c)** Sobrenadante de cultivo de A3.I.1 con espuma. Medio de cultivo PDB 50%, 21 días de cultivo a 30 °C.

Tabla 8. Compuestos detectados mediante GC-MS en los sobrenadantes del cultivo.

R.T. (S)	Compuestos detectados en el sobrenadante	% AREA CONTROLES	% AREA A3.I.1
		Espuma sin hongo	Con espuma
550.6	2-propanol-1-clorofosfato	-	36.74
551.3	relacionado con 2-propanol-1-clorofosfato	-	38.00
558.7	tris(3-cloropropil) fosfato	-	9.09
588.9	relacionado con tridecanoato de metilo	-	2.07
640.9	metil éster del ácido 11-octadecenoico	-	0.75
647.7	octadecanoato de metilo	-	0.74
704.5	1-propanol-2,3-diclorofosfato	90.77	6.12
716.7	relacionado con 1-propanol-2,3-diclorofosfato	9.23	2.27
717.4	relacionado con adipato de bis(2-etilhexilo)	-	2.27
753.5	mono(2-etilhexil) éster del ácido benceno-1,2-dicarboxílico	-	1.94

Azul: ésteres, **Verde:** organoclorofosfatos (retardantes de flama). Espectros de masas en el anexo 5

Existen pocos estudios en donde se ha analizado por GC-MS la degradación de PU mediada por hongos. En un trabajo donde se estudió la degradación del etilfenilcarbamato (EPC), que es un compuesto con enlaces uretano, observó que *Alternaria* sp. PURDK2 era capaz de degradarla y generar anilina y etanol, lo cual es evidencia de un mecanismo de hidrólisis de este compuesto (Matsumiya *et al.*, 2009). Sin embargo, dado que este compuesto no es un polímero, podría ser que el hongo no tuviera el mismo efecto sobre un polímero, ya que los monómeros son más susceptibles a la degradación por los hongos que los polímeros (Darby y Kaplan, 1968). Por lo tanto el presente trabajo es de los primeros estudios dirigidos a identificar compuestos derivados de la degradación de PU sólidos con hongos filamentosos. Los compuestos detectados en este trabajo, que pueden ser resultado de la degradación incluyen al TDI, los compuestos relacionados con el ácido m-clorocinámico, la 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H-benzimidazol-2-ona, el dicloroxilenol y tres compuestos no identificados. Para el caso del ácido m-clorocinámico, se sabe que los compuestos derivados del ácido

cinámico tienen un importante potencial antimicrobiano, especialmente contra algunas cepas de hongos filamentosos como *Aspergillus niger*, *Botrytis cinerea* y *Pleurotus ostreatus* (Zhang *et al.*, 2015; Korošec *et al.*, 2013), por lo cual podría pensarse, en un futuro, obtener compuestos de valor agregado a partir de la degradación de los PU. Asimismo la desaparición de los ésteres y la mayoría de los ácidos carboxílicos (detectados en los controles negativos) es una evidencia de que realmente está ocurriendo una degradación de los compuestos presentes en las espumas de PE-PU por los hongos filamentosos. Sin embargo, aún queda mucho por comprender de los procesos bioquímicos por los cuales se lleva a cabo la biotransformación de las espumas de PE-PU a moléculas asimilables por los hongos filamentosos, por esa razón es necesario realizar análisis temporales de espectroscopía de FTIR, TGA y GC-MS en conjunto, que permitan observar cómo se dan los pasos para la transformación química de las espumas.

8.8.3. Análisis del daño estructural y químico de las espumas generado por A3.I.1 cultivada con distintos bioestimulantes

En los estudios del daño que sufren las espumas debido a la biodegradación con la cepa A3.I.1 empleando 0.25% de bioestimulante, durante 21 días con agitación, se observó, en el medio de cultivo base (PB 50%) sin bioestimulante, que hubo colapso de la microestructura de las espumas, observándose fundida y con ligera formación de poros, lo cual no se observa en la espuma sin inocular. Cuando la espuma fue incubada en el medio adicionado con dextrosa, se observó un mayor daño en la microestructura de la espuma que cuando esta cepa se cultivó en PB, presentando mucho mayor número de poros y la estructura más fundida, así como ligeras rupturas de las fibras. En el medio PB con Impranil[®] la formación de poros no fue tan abundante como en PDB, aunque la estructura de la espuma estaba más fundida e inclusive más delgada. Por último en el cultivo con 0.25% de Poly Lack[®] se observó que la microestructura de la espuma estaba prácticamente destruida, y pese a que no se aprecian poros o rupturas, las microfibras de la espuma fueron adelgazadas en más del 80% comparadas con el control negativo, lo cual concuerda con la mayor degradación de las espumas registrada como pérdida de peso en los ensayos de bioestimulación en el medio PPLB (Figura 17).

- **Análisis termogravimétrico (TGA)**

El análisis termogravimétrico es una técnica que permite observar como una muestra sufre cambios en su masa al ser expuesta a incrementos de temperatura, lo cual está relacionado con los grupos funcionales que posee la muestra. La termogravimetría es generalmente empleada para caracterizar los PUs y conocer sus propiedades de resistencia (Loh *et al.*, 2008; Jiao *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013). Esta técnica también ha sido aplicada a estudios de biodegradación de PUs, ya que cuando los microorganismos atacan los principales grupos funcionales de estos polímeros se observan cambios en los termogramas, siendo posible determinar cuáles grupos funcionales fueron atacados en el polímero (Cangemi *et al.*, 2006; Mathur *et al.*, 2012).

En los controles negativos (sin inocular) provenientes de los cuatro medios de cultivo (PB, PDB, PIB y PPLB) se observaron las mismas tres fases de degradación, la primera (80-210 °C) corresponde a la pérdida de agua y algunos compuestos volátiles como algunos aditivos usados en la síntesis de PU). La segunda fase de degradación (210-275 °C) corresponde a la descomposición del grupo uretano, el tercer intervalo (275-325 °C) está relacionado con el grupo éster, y el último (325-450 °C) se debe a la presencia de los grupos éter (Cangemi *et al.*, 2006; Mathur *et al.*, 2012) (Figura 18). En las espumas de PE-PU tratadas con el hongo A3.I.1 se observó que únicamente en la espuma proveniente del medio PPLB se presentó una desaparición casi completa de los intervalos de degradación térmica de (210-275 °C) y (275-325 °C) correspondientes a los grupos uretano y éster, respectivamente, mientras que la fase correspondiente a la degradación de los grupos éter permaneció intacta (Figura 18). En cuanto a las espumas provenientes de los cultivos en PB, PDB y PIB, no se observan cambios en los termogramas, comparados con su respectivo control negativo. Estos resultados concuerdan con lo obtenido en los ensayos de bioestimulación, en donde se observó que la mayor degradación en las espumas por la cepa A3.I.1 ocurrió en el medio con Poly Lack®.

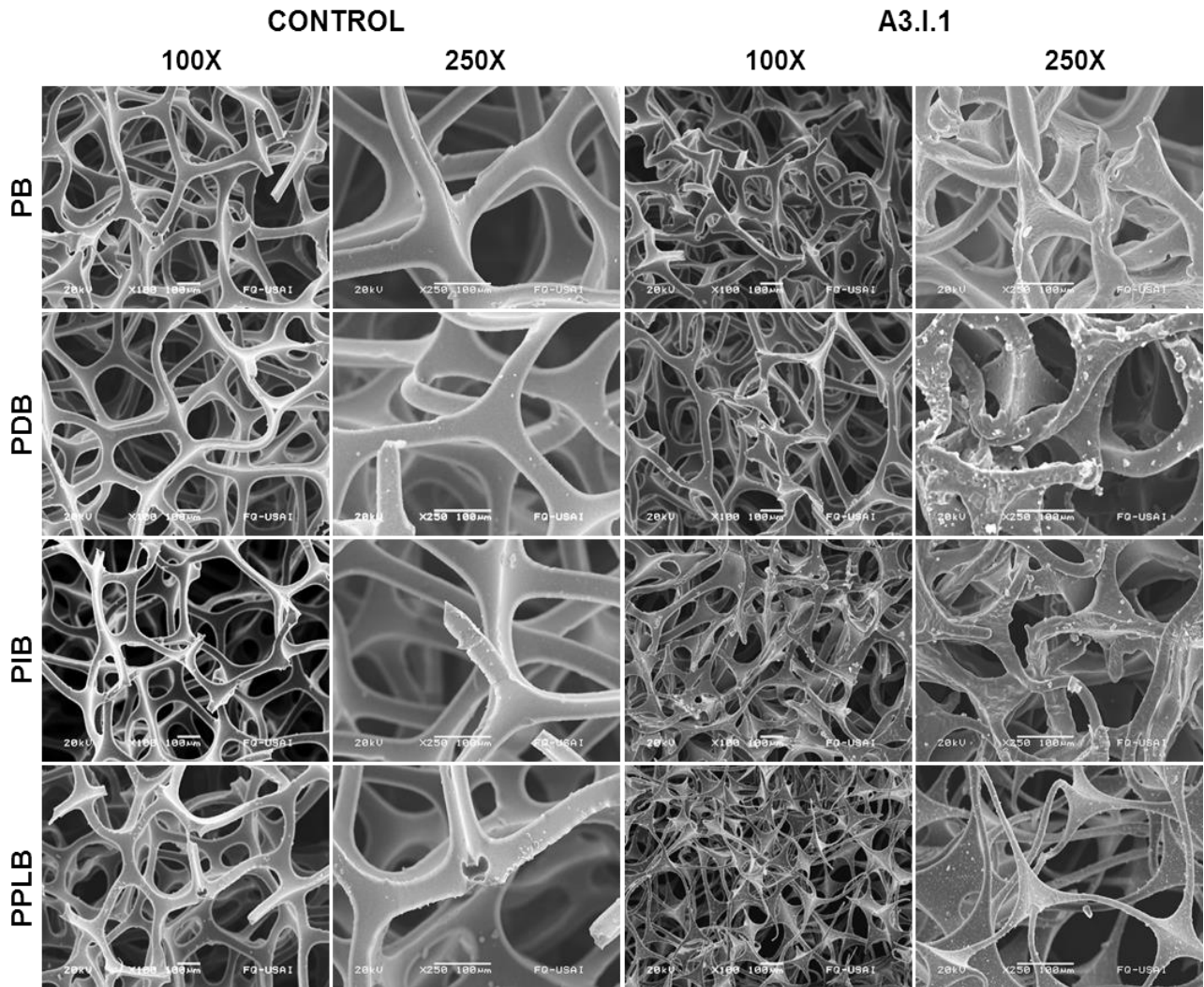


Figura 17. Análisis del daño estructural de las espumas de PE-PU generadas por el hongo A3.I.1 cultivado en condiciones de bioestimulación. PB: caldo de papa, PDB: caldo de papa dextrosa, PIB: caldo de papa Impranil®, PPLB: caldo de papa Poly Lack®. 21 días de cultivo a 30 °C. Agitación (200 rpm). 0.25% de bioestimulante. Las espumas se trataron con NaClO para eliminar el micelio. En todos los caso el control negativo es la espuma sin inocular.

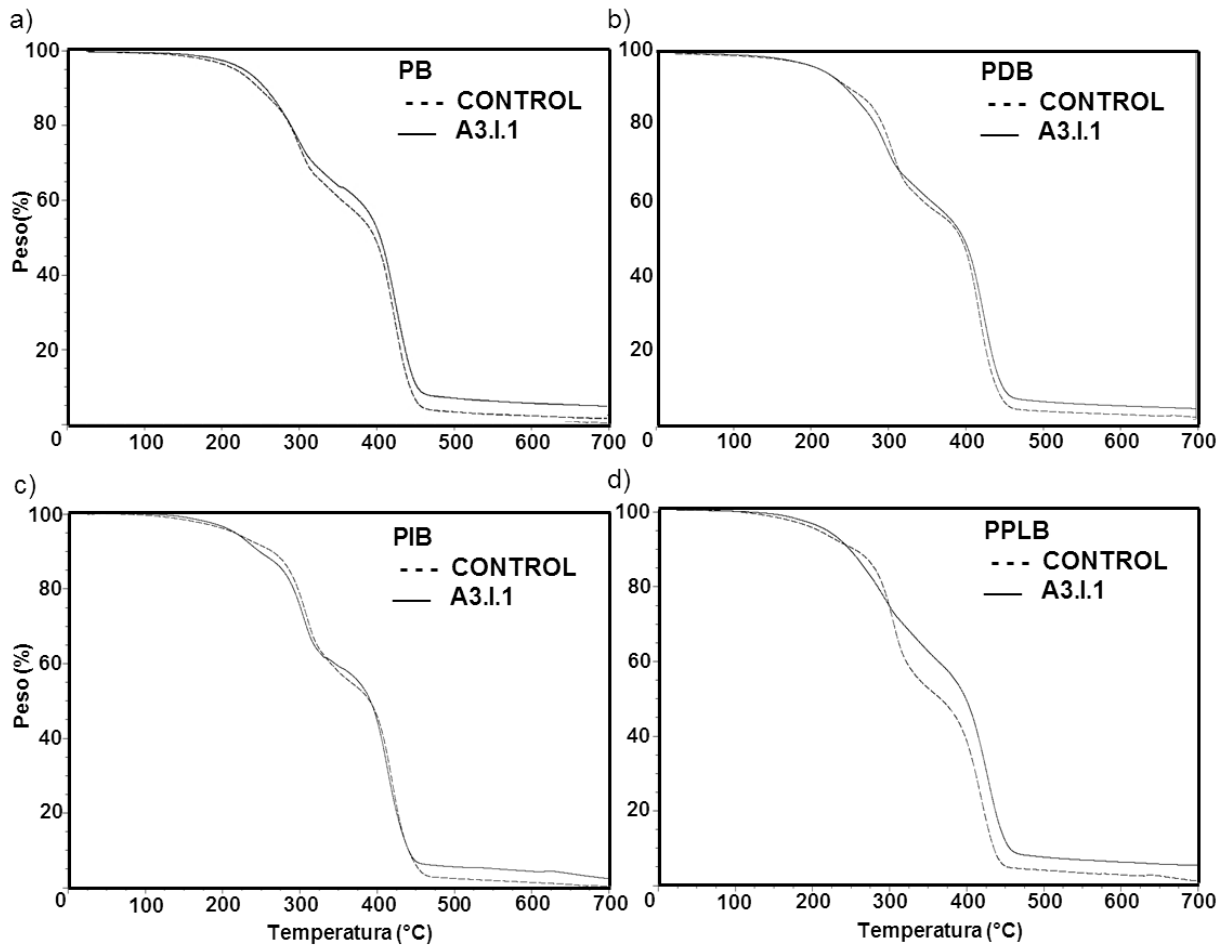


Figura 18. Termogramas de las espumas de PE-PU tratadas con A3.I.1 cultivado en diferentes condiciones de bioestimulación. PB: caldo de papa (referencia), PDB: caldo de papa dextrosa, PIB: caldo de papa Impranil[®], PPLB: caldo de papa Poly Lack[®]. 0.25% de bioestimulante, cultivo agitado (200 rpm) durante 21 días a 30 °C.

- **Análisis por espectroscopía de FTIR**

Para identificar los grupos funcionales de las espumas de PE-PU que fueron modificados por el ataque de la cepa A3.I.1 en las diversas condiciones de bioestimulación, incubadas durante 21 días a 30 °C en agitación (200 rpm), se empleó la técnica de espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR). En la Tabla 7 se muestran los grupos funcionales reportados como los más representativos en los poliuretanos.

Tabla 9. Grupos funcionales presentes en PUs y longitudes de onda en los espectros de infrarojo relacionadas (McCarthy *et al.*, 1997; Radice and Bradley, 2007).

Grupo funcional	Longitud de onda (cm ⁻¹)
Amina (-N-H)	3300-3200
Metilenos (-CH ₂ -)	3000-2900
Metilos (-CH ₃)	2850-2800
Carbonilo (-C=O)	1740-1690
Urea (-N-CO-N-)	1665-1635
Uretano (flexión N-H)	1530-1515
Uretano (estiramiento C-N)	1260-1220
Éter (-C-O-C-)	1110-1090

En la espuma tratada con A3.I.1 cultivado en PB hubo disminución en las señales características de metilenos (2930 cm⁻¹), ésteres (1715 cm⁻¹) y uretano (1536 y 1220 cm⁻¹), lo cual indica que hubo disminución en la longitud de las cadenas alifáticas y ataque a los grupos funcionales éster y uretano. Además se observó un incremento en la señal de los grupos amina (3280 cm⁻¹), lo cual sugiere que se están generando compuestos conteniendo estos grupos. Por otra parte las señales de los grupos urea (1640 cm⁻¹) que forman parte de los segmentos duros del PU y 1087 cm⁻¹ (éter) se mantuvieron iguales en el control y la muestra tratada con el hongo (Figura 17), lo que implica que estos grupos funcionales no fueron atacados por el hongo. En las espumas procedentes de los cultivos en medios PDB y PIB se observó un patrón de cambios semejante, disminución en las señales correspondientes a los grupos uretano (1536 y 1220 cm⁻¹) y urea (1640 cm⁻¹), aunque la señal de los carbonilos del grupo éster (1715 cm⁻¹) no presentó cambios, lo que implica que hubo ataque a los grupos uretano y urea, pero no a los grupos éster. Otra interpretación del hecho que no disminuyó la señal del carbonilo es que, en estas condiciones de cultivo, el mecanismo de degradación de la espuma sea por adición de grupos OH, para luego llevar a cabo la oxidación y posteriormente generar compuestos carbonílicos, un mecanismo común de

biotransformación de sustancias empleado por microorganismos (Chao *et al.*, 2015) y en el caso de hongos, se realiza mediante el citocromo P450 (Da Silva Coelho-Moreira *et al.*, 2013). Por otro lado, hubo incremento en las señales de aminas (3280 cm^{-1}), metilos y metilenos (2870 y 2930 cm^{-1}). El incremento de la señal de aminas se puede deber a la hidrólisis de los grupos urea, los cuales disminuyeron, mientras que el incremento de metilos y metilenos puede estar relacionado con la formación de compuestos intermediarios en la degradación del PU por el hongo. Por último, la espuma incubada con A3.I.1 en medio PPLB, fue la que presentó el mayor efecto de biotransformación de las espumas de PE-PU, mostrando una reducción mucho mayor en casi todas las señales, en comparación con las condiciones anteriores. La señal de los grupos amino (3280 cm^{-1}) se redujo a casi la mitad que en el control negativo, las señales de metilos y metilenos (2930 y 2870 cm^{-1}) se redujeron en una tercera parte, mientras que las señales de carbonilos (1715 cm^{-1}), urea (1640 cm^{-1}) y uretano (1536 y 1220 cm^{-1}) disminuyeron a la mitad con respecto al control negativo. En cuanto a la señal del éter (1087 cm^{-1}) se aprecia una ligera disminución, menor del 5%, por lo cual no podemos considerar que haya realmente un ataque a este grupo funcional (Figura19).

Realizando un análisis integral de los resultados obtenidos por TGA y por espectroscopía de FTIR en las espumas tratadas con A3.I.1 se observó que la espuma incubada en el medio PPLB mostró disminución en la señal de los grupos éster (1715 cm^{-1}), urea (1640 cm^{-1}) y uretano (1536 y 1220 cm^{-1}), mientras que en el TGA se evidenció la disminución de ésteres y enlaces uretano. La importancia de este resultado reside en que los grupos urea forman parte de los segmentos duros de los PU, los más resistentes a la degradación, y pese a que mediante el TGA no fue posible identificar la temperatura de descomposición de estos enlaces, en la espectroscopía es evidente su disminución. El hecho de que estas señales hayan disminuido sugiere que en las condiciones de bioestimulación la cepa de *Cladosporium tenuissimum* A3.I.1 produjo proteínas con actividades enzimáticas capaces de atacar a este grupo funcional. Esto indica que esta cepa es capaz de atacar tanto los segmentos blandos (que contienen grupos éster, región elastomérica) como los segmentos duros de los PU (grupos isocianato y urea).

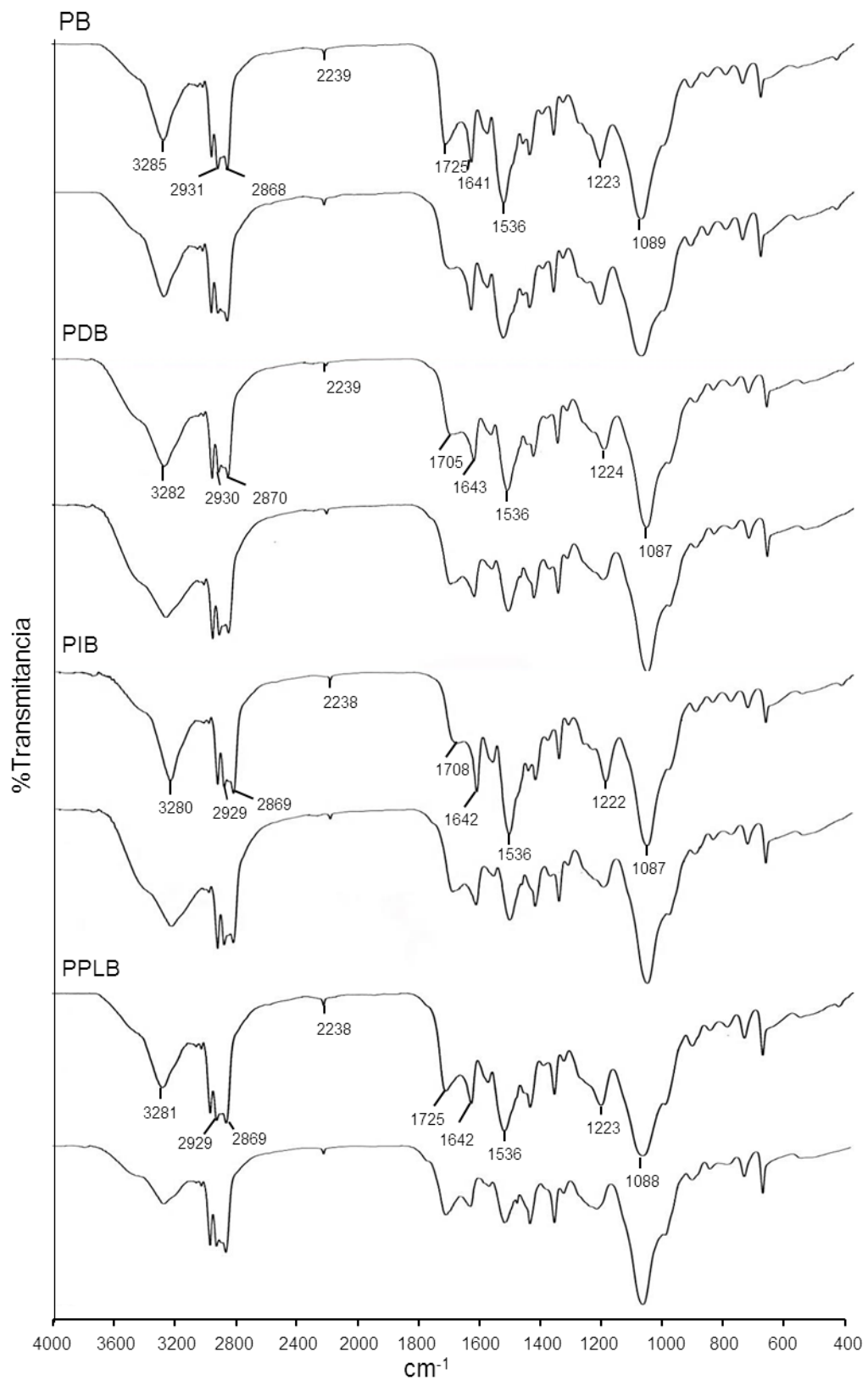


Figura 19. Espectros de FTIR de las espumas de PE-PU cultivadas con A3.I.1 en las diferentes condiciones de bioestimulación. Para cada condición se presentan dos espectros, el superior corresponde al control negativo y el inferior corresponde al de la espuma cultivada con A3.I.1. PB: medio de papa, PDB: medio de papa con dextrosa, PIB: medio de papa Impranil®, PPLB: medio de papa Poly Lack®. 21 días de cultivo en agitación (200 rpm) a 30 °C. 0.25% de bioestimulante. Espectros representativos de tres repeticiones de cada uno.

8.9. Identificación de algunas actividades enzimáticas

Con el propósito de identificar algunas posibles actividades enzimáticas “poliuretanolíticas” involucradas en la degradación de las espumas de PE-PU, las proteínas extracelulares (PEC) de los cultivos de la cepa A3.1.1 bioestimulados se concentraron y se emplearon para realizar ensayos de difusión radial eligiendo como sustrato el barniz Poly Lack[®]. Se eligió este sustrato debido a que, al igual que las espumas, es un PU de tipo poliéter y además puede teñirse con azul de Coomassie. Para ello, en una placa de Petri conteniendo agar con Poly Lack[®] se hicieron pozos en los cuales se depositaron 50 µg de PEC de cada cultivo (PB, PDB, PIB y PPLB todos al 0.25%). Después de muchos intentos para estandarizar el procedimiento para este ensayo se definió que la mejor condición para realizar la determinación era incubando durante 72 horas a 30°C, tiñendo con azul de Coomassie durante 2 h y destiñendo 2 h. Un resultado positivo se observa como zonas más claras alrededor de los pozos conteniendo las PEC. En los medios PIB y PPLB se presentó la mayor actividad, coincidiendo con el mayor efecto bioestimulador previamente observado, mientras que las PEC provenientes del cultivo con PDB presentaron una actividad ligera. Por último en la muestra proveniente del cultivo con PB no se observó actividad poliuretanolítica (Figura 20a). Posteriormente se hicieron ensayos de difusión radial para buscar actividades enzimáticas de tipo proteasa, esterasa y ureasa, las cuales han sido reportadas como las posibles responsables de la actividad poliuretanolítica (Howard 2002; Ibrahim *et al.*, 2008; Matsumiya *et al.*, 2009; Shibasaki *et al.*, 2009).

Se utilizaron PEC del cultivo de A3.1.1 en medio PB sin espuma (PBSE) como referencia de las actividades enzimáticas “constitutivas”. En el ensayo de proteasa se observó que en todas las muestras hay una ligera actividad, la cual es muy similar entre ellas, esto sugiere que no hay una actividad proteasa inducida por el PU (Figura 20b). En el ensayo para esterasa las PEC de PB y de PBSE presentaron una actividad enzimática similar, pero el concentrado proveniente del cultivo en PPLB mostró una mayor actividad (Figura 20c). Por último en el ensayo para actividad ureasa se observó que las PEC del cultivo en PPLB fueron las más activas, seguidas por las del cultivo en PB, mientras que el cultivo en PBSE no presentó actividad ureasa (Figura 20d).

Estos resultados indican que en la cepa A3.I.1 se indujeron actividades de tipo esterasa y ureasa, por la presencia del Poly Lack como bioestimulante.

A partir de los resultados obtenidos en los ensayos de difusión radial, se decidió realizar zimografías para intentar determinar el tamaño de algunas de las proteínas responsables de las actividades poliuretanolíticas detectadas. En una etapa inicial se intentó montar un ensayo *in situ* de la actividad poliuretanolítica usando Poly Lack[®] como sustrato, el cual como ya se mencionó anteriormente tiene una naturaleza química similar a las espumas de PE-PU. Para ello las muestras fueron resueltas en geles de poliacrilamida tanto en condiciones desnaturalizantes, como nativas, a los que se les acopló un gel de agarosa, que contenía Poly Lack[®], sobreponiéndolos en forma de “sándwich”, como se realizó con Impranil[®] en otro estudio previo (Ruiz *et al.* 1998). Desafortunadamente, no se pudieron identificar proteínas que actuaran sobre el Poly Lack[®] (datos no mostrados). También se realizaron zimografías para las actividades esterasa y ureasa que dieron señal positiva en los ensayos de difusión radial. En el zimograma para actividad esterasa se observó un barrido de actividad hasta 75 kDa y una banda de aproximadamente 45 kDa, las cuales son esterases constitutivas de A3.I.1 ya que se presentaron en el medio PBSE (sin espuma). En el medio PB con espuma se sigue observando un barrido hasta 75 kDa, pero desaparece la banda de 45 kDa. Por último en la muestra del cultivo en PPLB se observó que el barrido de actividad esterasa entre 250 y 50 kDa fue muy intenso y aparecieron cuatro bandas de aproximadamente 30, 25, 22 y 20 kDa no presentes en las otras condiciones (Figura 21a). En la zimografía para actividad ureasa, se observó que en el medio sin espuma (PBSE) no hubo bandas que presentaran actividad, mientras que en las muestras de los cultivos PB y PPLB se presentaron tres bandas de proteínas con actividad ureasa (cerca de 250, 150 y 100 kDa); adicionalmente en el medio PPLB se presentaron cuatro bandas con actividad, en 50 y 37 kDa y otras dos de menos de 25 kDa (Figura 21b).

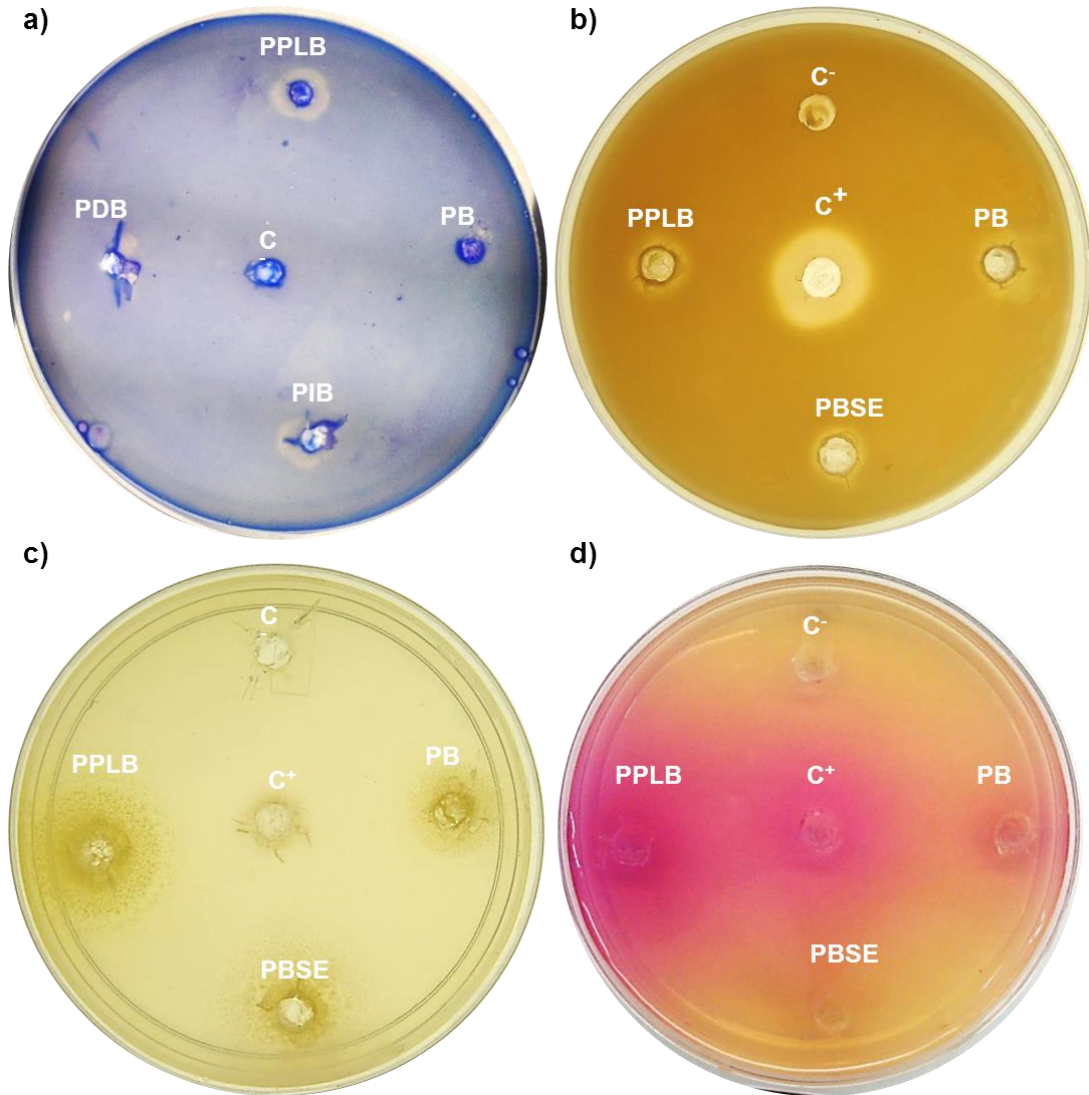


Figura 20. Ensayos de difusión radial con proteínas extracelulares de distintos cultivos de A3.I.1 con espumas de PE-PU. a) Medio mínimo con Poly Lack® (ensayo de “poliuretanas”). b) Medio agar leche descremada (proteasa). c) Medio Tween 20 (esterasa). d) Medio urea de Christensen (ureasa). PB: caldo de papa sin bioestimulante; PDB: caldo de papa-dextrosa; PIB: caldo de papa-Impranil, PPLB: caldo de papa-Poly Lack; PBSE: caldo de papa sin espuma ni bioestimulante.. Se cargaron 50 µg de proteína por pozo. El control negativo fue el sobrenadante del medio PPLB hervido (para inactivar las enzimas), el tiempo de incubación para las pruebas fue de 72 h para Poly Lack® y 18 h para las demás, todas a 30 °C

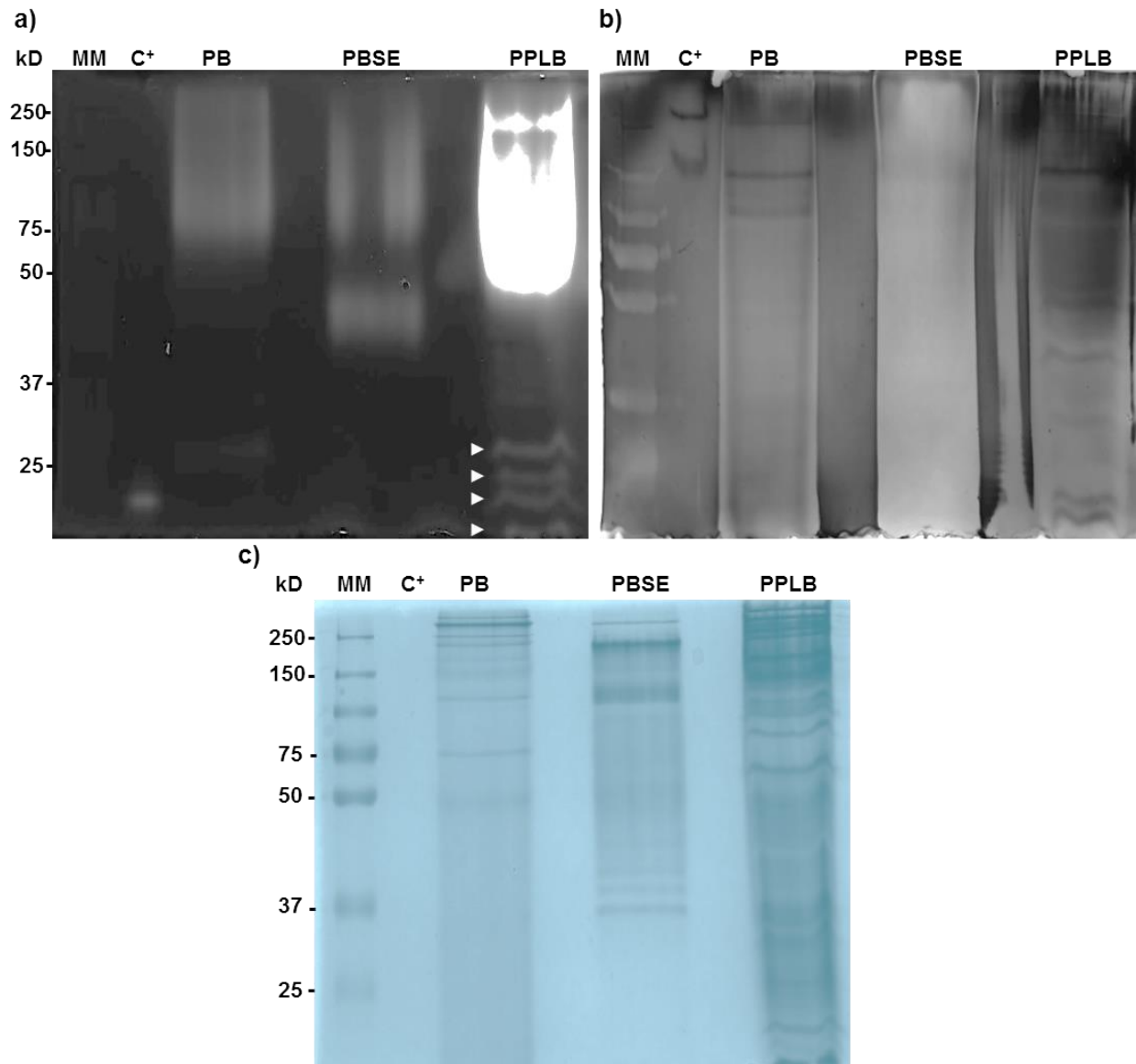


Figura 21. Zimografías de los sobrenadantes de cultivo de A3.I.1. a) zimograma para esterasa, C⁺: lipasa de *Pseudomonas fluorescens*. **b)** zimograma para ureasa, C⁺: ureasa de *Canavalia ensiformis*. **c)** Perfil protéico teñido con Coomassie (gel gemelo). PB: Caldo de papa sin bioestimulante, PPLB: Poly Lack, PBSE: Caldo de papa sin espuma ni bioestimulante. Se cargaron 30 µg de proteína por carril (cuantificada por el método de Bradford).

En los diversos reportes sobre degradación de PU por microorganismos se ha mencionado que las posibles actividades enzimáticas involucradas en la degradación, de estos polímeros sintéticos, son esterasas, proteasas y ureasas. Sin embargo, pese a que en algunos estudios se ha sugerido que la actividad ureasa está involucrada en la degradación de los PU (Matsumiya et al., 2009; Loredó-Treviño et al., 2011), las

ureasas son enzimas muy específicas, por lo cual muy pocas pueden reconocer sustratos diferentes a la urea (Dixon *et al.*, 1980). La ureasa de *Canavalia ensiformis* (Jack bean) puede reconocer, aparte de la urea, solamente algunos sustratos que contienen un grupo amida ($R^1\text{-CO-NHR}^2$), o urea ($R^1\text{NH-CO-NHR}^2$), que son muy semejantes a la urea en tamaño, como tiourea, acetamida y N-metilurea, pero moléculas más grandes ya no son reconocidas por esta enzima (Dixon *et al.*, 1980; Lopreore y Byers, 1998). Por esta razón es poco probable que sea una ureasa la que esté implicada en la degradación de PU, ya que en los segmentos duros de estos polímeros hay grupos urea unidos a cadenas largas de carbonos. Lo más factible es que el ataque al PU lo lleven a cabo amidasas, las cuales pueden llevar a cabo la hidrólisis de grupos amida y urea, pero además reconocen sustratos de mayor tamaño. En el caso de las plantas, un ejemplo de esto es la N-carbamoilputrescina hidrolasa de *Medicago truncatula*, la cual media la ruptura de la N-carbamoilputrescina, que posee un grupo urea unido a 4 carbonos, a putrescina, CO_2 y NH_3 (Sekula B. 2016). Por lo anterior, proponemos que, más que la ureasa, una actividad de tipo amidasa podría ser la responsable del ataque a los grupos uretano. Pero con los resultados obtenidos hasta el momento no es posible definir si realmente este tipo de hidrolasas son las responsables del ataque al PU.

Tabla 10. Relación de la degradación de las espumas de PE-PU y las actividades enzimáticas determinadas por difusión radial

Medio de cultivo	Régimen (14-7) días (A/E)	Poliuretanasas* (difusión radial)	Proteasa	Esterasa	Ureasa	Degradación de PE-PU
PBSE	Sí	ND	+	+	+	NA
PB	Sí	-	+	++	+	35.7% ± 5.26%
PPLB	Sí	+	+	+++	++++	67.4% ± 3.7%

Los resultados obtenidos a lo largo de este proyecto sugieren que en presencia de PU las actividades esterasa y amidasa son inducidas. Asimismo es muy probable que sean estas actividades, las encargadas de la biodegradación del polímero, ya que como se observó en los resultados del análisis por espectroscopia de FTIR, termogravimetría y

CG-EM, hay aparición de grupos amina que pueden ser generados por la hidrólisis del grupo uretano, ya sea por una ureasa o amidasa. Además la disminución en los carbonilos de grupos éster, pueden relacionarse con la actividad esterasa. Con base en lo discutido anteriormente en relación a las posibles actividades enzimáticas que atacan a los poliuretanos se presentan los posibles mecanismos de ataque a los principales grupos funcionales presentes en este polímero (Figura 22).

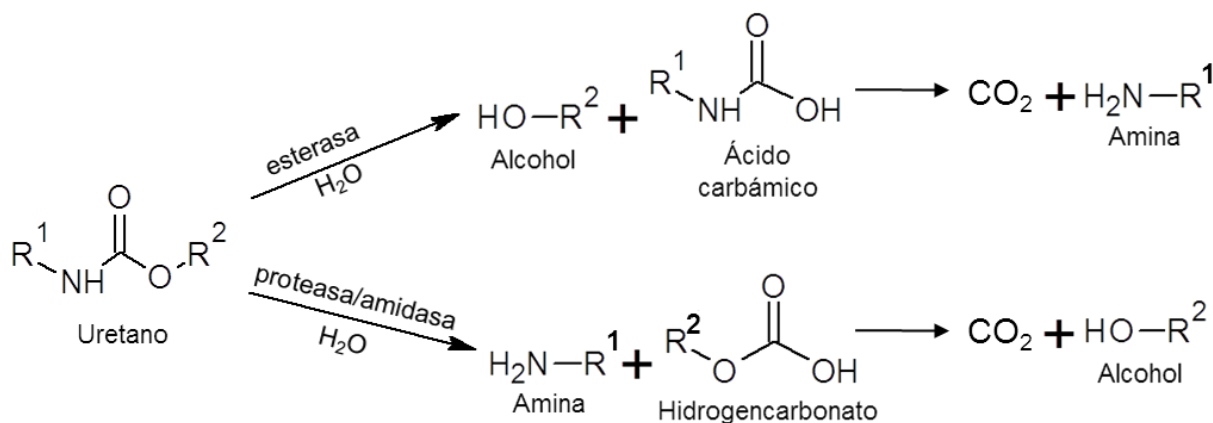


Figura 22. Posibles mecanismos de hidrólisis propuestos para la ruptura del grupo uretano por las diferentes enzimas hidrolíticas: esterasa, proteasa y amidasa.

Pese a que los resultados sugieren que las actividades hidrolíticas de enzimas tipo esterasa y amidasa son las responsables de la degradación de los PU, es necesario realizar estudios más específicos para identificar con precisión las enzimas que en la cepa A3.I.1 se están induciendo en presencia de PU. Para ello será necesario purificar las proteínas con actividades de interés presentes en los sobrenadantes de cultivo, caracterizarlas empleando inhibidores e identificarlas por espectrometría de masas para poder definir si se trata de esterases y amidasas o son algunas otras proteínas que presenten una actividad promiscua y puedan reconocer grupos carbamato en la estructura de los PU. Con las evidencias presentadas en este trabajo queda claro que la biodegradación de PU no se lleva a cabo exclusivamente por un solo tipo de enzimas, sino que requiere de varias de ellas para degradar los grupos específicos presentes en la estructura del polímero y para el caso de la cepa A3.I.1 al menos las actividades esterasa y amidasa pueden estar actuando como “poliuretanasas”.

9. CONCLUSIONES

- En este estudio se determinó que, de las 13 cepas evaluadas de hongos capaces de crecer en Poly Lack[®], las mejores cepas biodegradadoras de espumas de PE-PU pertenecen al género *Cladosporium*, A3.I.1 y A2.PP.5 (*Cladosporium tenuissimum*), T1.PL.1 (*Cladosporium pseudocladosporioides*) y BP3.I.9 (*Cladosporium sp.*) al inocularlos a partir de conidias se obtuvieron los mejores resultados de degradación (más del 45%) con respecto a inocular con micelio, lo cual muestra que el tipo de inóculo tiene una gran influencia en la capacidad biodegradativa de los hongos sobre las espumas de PE-PU.
- Es posible bioestimular la biodegradación de espumas de PE-PU por estas cepas suplementando el medio de cultivo con dextrosa o barnices de PU. La cepa A3.I.1 se bioestimuló con Impranil[®] y Poly Lack[®], A2.PP.5 con dextrosa, Impranil[®] y Poly Lack[®], mientras que T1.PL.1 sólo fue bioestimulado con dextrosa y Poly Lack[®].
- Hay un efecto importante de la concentración del bioestimulante sobre la biodegradación que generan los hongos filamentosos en las espumas de PE-PU. Los mejores resultados de degradación se obtuvieron con 0.25% de bioestimulante para A3.I.1 y A2.PP.5, aunque por otro lado T1.PL.1 mostró la mayor degradación de las espumas al usar 0.5% de dextrosa.
- Los mejores resultados de degradación de las espumas de PE-PU (67% ± 4% de la masa inicial de la espuma degradada) se obtuvieron con la cepa A3.I.1 en medio PB (50%) suplementado con 0.25% de Poly Lack[®], 14 días en agitación y 7 en cultivo estático). Siendo ésta la cepa y condiciones propuestas como la base para desarrollar un proceso biotecnológico para el tratamiento de residuos sólidos de PU.
- Mediante los análisis físicos y químicos de las espumas de PE-PU, fue posible evidenciar los diversos cambios que generaron los hongos al biodegradarlas. La microscopía electrónica de barrido mostró que las espumas sufrieron adelgazamiento, derretimiento y colapso de la microestructura de las espumas. Por otra parte el análisis termogravimétrico y la espectroscopía de infrarrojo evidenciaron los cambios en los principales grupos funcionales característicos de los PU, pese a que no hubo cambios significativos en los grupos éter, si hubo cambios en los grupos amina presentes en los segmentos duros de la estructura de la espuma de PE-PU.

- Mediante el análisis de cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas se pudieron identificar en las espumas y sobrenadantes del cultivo con A3.I.1 compuestos como TDI, adipatos y alcoholes, que sugieren un mecanismo de hidrólisis para destruir los grupos funcionales de las espumas de PE-PU Asimismo, la desaparición, en las espumas tratadas con hongos, de muchos de los compuestos detectados en los respectivos controles negativos, evidencia que el hongo está consumiéndolos como fuente de nutrientes.
- Se identificó que en los sobrenadantes del cultivo de A3.I.1 con 0.25% de Poly Lack[®] como bioestimulante hay actividades enzimáticas capaces de actuar sobre el barniz Poly Lack[®] observándose un incremento importante en las actividades enzimáticas de esterasa y ureasa.
- En las zimografías fue posible identificar que en la cepa A3.I.1 cultivada con 0.25% de Poly Lack[®] como bioestimulante se producen esterasas muy activas de alto peso molecular entre 250 y 50 kDa y otras tres cercanas a 25 kDa. Mientras que para la actividad ureasa se identificaron proteínas de 50, 37 y dos menores a 25 kDa únicamente donde se usó el bioestimulante.

10. PERSPECTIVAS

- Evaluar otros tipos y concentraciones de bioestimulantes que induzcan tanto incrementos en la degradación como un mayor ataque a los grupos funcionales más recalcitrantes, específicamente los enlaces éter.
- Desarrollar un proceso en el cual se pueda combinar el cultivo de los hongos filamentosos (que atacan de manera rápida y eficiente la mayoría de grupos hidrolizables en el poliuretano), con bacterias o consorcios microbianos que puedan atacar los grupos funcionales más recalcitrantes como el éter. Con esta combinación se esperaría lograr una degradación más completa de los PU llegando incluso a la mineralización (CO₂).
- Optimizar las condiciones de aireación y oxigenación de cultivo para obtener mejores resultados de degradación. Realizando pruebas con diferentes velocidades de agitación en matraz y cuantificando la transferencia de oxígeno en cada caso, e identificar la condición donde se tiene la mayor actividad degradativa para A3.I.1.
- Identificar y purificar las principales enzimas con actividad esterasa y ureasa que se expresan diferencialmente en los cultivos con 0.25% de Poly Lack y la espuma, las cuales deben ser las principales involucradas en la degradación del PU. Esto con el propósito de generar microorganismos recombinantes que puedan sobre-expresar estas enzimas o para producirlas a gran escala para aplicarlas en el tratamiento de residuos sólidos de PU.

Anexo 1. Preparación de medios y reactivos

• Medio papa dextrosa agar (PDA)

Para 1 L

Papa de cáscara blanca	250 g
Dextrosa	20 g
Agar	20 g

1. Lavar y rallar los 250 g de papa.
2. Hervir la papa en un litro de agua destilada por 20 minutos
3. Filtrar usando 5 capas de gasa
4. Reponer el volumen hasta 1 L y distribuir en alícuotas de 250 mL.
5. Agregar 5 g de agar y 5 g de dextrosa por cada 250 mL.
6. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi durante 15 minutos.

• Medio papa dextrosa broth (PDB)

Para 1 L

Papa de cáscara blanca	250 g
Dextrosa	20 g

1. Lavar y rallar los 250 g de papa.
2. Hervir la papa en un litro de agua destilada por 20 minutos
3. Filtrar usando 5 capas de gasa.
4. Centrifugar el filtrado a 10 000 rpm 10 minutos y descartar el pellet.
5. Reponer el volumen hasta 1 L y distribuir en alícuotas de 250 mL.
6. Agregar 5 g de dextrosa por cada 250 mL.
7. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi durante 15 minutos.

• Medio base papa broth (PB)

Para 1 L

Papa de cáscara blanca	250 g
------------------------	-------

1. Lavar y rallar los 250 g de papa.
2. Hervir la papa en un litro de agua destilada por 20 minutos
3. Filtrar usando 5 capas de gasa.
4. Centrifugar el filtrado a 10 000 rpm 10 minutos y descartar el pellet.
5. Reponer el volumen hasta 1 L y distribuir en alícuotas de 250 mL.
6. Esterilizar en autoclave a 121 °C, 15 psi durante 15 minutos.

• **Medio mínimo mineral (MM)**

(Basado en el medio empleado por Russel et al., 2011)

Disolución A (10 X) para 1 L

NaH₂PO₄ 26.18 g

K₂HPO₄ 61.80 g

Disolución B (100 X) para 1 L

(NH₄)₂SO₄ 103.30 g

MgSO₄ 3.01 g

Disolución C (1000 X) para 1 L

FeCl₃•6H₂O 39.70 g

ZnCl₂•4H₂O 2.92 g

CoCl₂•6H₂O 3.86 g

Na₂MoO₄•2H₂O 2.47 g

CaCl₂•2H₂O 1.47 g

CuCl₂ 1.48 g

MnCl₂ 1.51 g

Ácido (10 X) para 1L

HCl (36% m/v) 18 mL

1. Preparar las disoluciones A y B, esterilizar en autoclave 121°C/15 min.
2. Preparar la disolución C (elementos traza) disolviendo cada uno de los elementos en 50 mL de agua destilada y esterilizar por autoclave a 121°C/ 15 min, una vez estériles juntar todos los elementos traza y aforar a 1 L con agua destilada estéril.
3. Para realizar el medio, agregar la cantidad correspondiente de disoluciones A, B y C. Agregar el agua desionizada (estéril) y agregar la fuente de carbono correspondiente.
4. Agregar el HCl y ajustar el pH a 6.

Nota: Para hacer medio sólido el orden cambia se debe agregar hasta el final la disolución C y aforar con una solución de agua agar en vez de agua.

• **Agua Agar**

Agar 20.3 g/L

Agua 1 L

Para prepararlo se realiza la mezcla de agua con agar y se esteriliza en autoclave a 121°C/15 min.

• **Medio mínimo con Impranil® DLN al 0.5% de sólidos (MM-Impranil)**

Realizar la mezcla de las soluciones A y B del MM y antes de agregar la solución C se le adiciona la cantidad requerida de Impranil® DLN. Tomar en cuenta que en la ficha técnica del barniz de poliuretano base agua (Impranil® DLN), se indica que el contenido de sólido es 50% por lo que para obtener una disolución con una concentración al 0.5% hay que agregar el 1% de barniz referente al volumen total que se desea preparar. En caso de requerir medio sólido se sustituye el agua por agua-agar.

• **Medio mínimo con Poly Lack® al 0.3% de sólidos (MM-PUpl)**

El barniz de comercial Polylack® tiene una concentración de 30% en sólidos por lo que es necesario hacer una dilución de 1:100 para obtener una concentración final de 0.3%. Se debe preparar una disolución de Polylack® 10X colocando 1 mL de barniz por cada 10 mL de agua para que quede al 3% (disolución de Poly Lack® al 10X) y esterilizar por autoclave a 121°C/15 min. Preparar el MM y agregar la disolución de Polylack® estéril. En caso de requerir medio sólido se sustituye el agua por agua-agar.

• **Medios líquidos para bioestimulación**

El método de preparación de los medios para evaluar la bioestimulación es semejante a la preparación de los medios mínimos para los barnices de poliuretano (**Impranil® DLN, Poly Lack®**), sustituyendo los componentes del medio mineral (disolución A, B y C) por el medio base caldo de papa (PB) diluido al 50%, se ajusta la concentración del barniz de poliuretano con base en el porcentaje de sólidos que se desee tener (0.3%, 0.5%). En el caso de la Dextrosa, la cantidad se ajusta al porcentaje masa/volumen deseado.

• **Medio urea de Christensen**

Para 1 Litro

Urea	20 g
Agar	15 g
NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	2 g
Peptona	1 g
Glucosa	1 g
Rojo fenol	12 mg

Adicionar todos los componentes, excepto el agar, a 100 mL de agua desionizada.

1. Agitar hasta disolver y esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.45 μm (disolución A).
2. Adicionar el agar a 900 mL de agua desionizada y calentar a ebullición, agitando hasta disolver.
3. Esterilizar en autoclave a 121°C/15 min.
4. Enfriar y adicionar la disolución A en forma aséptica.
5. Mezclar y distribuir en cajas.

• **Medio Tween 20[®]**

(Lelliot y Stead, 1987)

Para 1 Litro

Peptona	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.1 g
Agar	16 g
Tween 20 [®]	10 mL
Agua destilada	1 L

1. Disolver en 800 mL de agua destilada la peptona, el cloruro de calcio y el cloruro de sodio.
2. Ajustar el pH a 7.4.
3. Agregar el Tween 20[®].
4. Aforar a 1 L.
5. Agregar el agar.
6. Esterilizar por autoclave a 121°C por 15 minutos.
7. Vaciar en cajas Petri cuando la mezcla esté tibia y se vea translúcida la solución.

• **Medio mínimo con leche descremada**

Para 1 Litro

Leche descremada	12g
Agar	16 g

1. Disolver la leche descremada en 100 mL de agua desionizada para obtener una disolución al 10 X.
2. Esterilizar por autoclave a 121°C/ 15 min.
3. Se realiza la mezcla de MM líquido (estéril) para 1 L (100 mL de disolución A, 10 mL de disolución B y 1 mL de disolución C).

4. Agregar 100 mL de la disolución 10X de leche descremada.
5. Pesar el agar, agregarlo en 100 mL de agua destilada y esterilizar por autoclave 121 °C/15 min.
6. Una vez que la disolución con agar esté tibia, agregarlo a la mezcla de disoluciones con leche descremada.
7. Ajustar el volumen a 1 L con agua destilada (tibia) estéril.
8. Verter en cajas Petri y dejar enfriar en zona aséptica.

• **Preparación de geles SDS-PAGE 10%**

Gel separador 10% (2 geles)

Agua desionizada	4.0	mL
Buffer separador	2.5	mL
Acrilamida al 30%	3.3	mL
Persulfato de amonio al 20%	50	μL
TEMED	5	μL

1. Armar al equipo de Bio-Rad para preparación de geles, utilizar los cristales de 1 mm de espesor, asegurarse que se encuentren completamente limpios y desengrasados.
2. Mezclar, el agua, el buffer separador y la acrilamida (30%).
3. Agregar persulfato y el TEMED, agitar un poco y verter entre los vidrios.
4. Poner inmediatamente un poco de etanol encima, para facilitar la polimerización y alinear el gel.
5. Dejar polimerizar (5 minutos) y posteriormente quitar completamente el etanol antes de vaciar el gel apilador.

Gel apilador (2 geles)

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

1. Preparar de la misma forma que el gel separador.
2. Colocar encima del gel separador y colocar inmediatamente el peine para formar los carriles.
3. Dejar polimerizar (5 minutos) para poder retirar el peine.

Buffer separador para 100 mL

Tris-base	18.17 g
SDS al 20%	2 mL

1. Pesar el Tris, disolverlo en 80 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 8.8 con HCl 12 N
2. Agregar el SDS y aforar a 100 mL. Almacenar a temperatura ambiente.

Buffer apilador para 100 mL

Tris-base	6.06 g
SDS al 20%	2 mL

1. Pesar el Tris disolverlo en 80 mL de agua desionizada y ajustar el pH a 6.8 con HCl 12N.
2. Agregar el SDS y aforar con agua desionizada. Almacenar a temperatura ambiente.

• Buffer de corrida 10X

Para 1 Litro

Tris-base	30 g
glicina	144 g
SDS	10 g

1. Disolver en 600 mL de agua desionizada la glicina, calentar un poco y agitar.
2. Agregar el Tris y esperar a que casi por completo esté solubilizado.
3. Verificar el pH, debe estar entre 8.3 y 8.8.
4. Agregar el SDS, disolverlo y ajustar el volumen a 1000 mL en una probeta. Almacenar a temperatura ambiente.
5. Antes de usarlo para correr el gel, hacer una dilución 1:10 para tener el volumen necesario para la cámara de electroforesis (800 mL)

• Disolución de Tritón-X100 2.5%

Para 1 Litro

Tritón-X100	25 mL
Agua	975 mL

1. Disolver la disolución de Tritón-X100 en 500 mL de agua desionizada.
2. Mantener en agitación constante (se recomienda mezclar con temperatura moderada (35°C) hasta mezclar completamente los componentes.
3. Ajustar el volumen a 1 L con el agua restante

• **Colorante de Coomassie (100 mL)**

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

Coomasie brillante blue R250	0.05 g
Metanol QP	50 mL
Agua	40 mL
Ácido acético glacial	10 mL

1. Pesar y medir los reactivos, disolverlos en un vaso de precipitados de vidrio (no usar plástico) con agitación a temperatura ambiente.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

• **Mezcla desteñidora**

Para 250 mL: 20% Metanol: 7.5% ácido acético

Ácido acético glacial	18.75 mL
Metanol grado técnico	50 mL

1. Medir los reactivos y ajustar a 250 mL con agua desionizada.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

Anexo 2. Características morfológicas del crecimiento de hongos

A2.H.4 (*Cladosporium montecillanum*)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Rugoso, seco
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Irregular, elevada y orilla ondulada
Pigmentación de la colonia (PDA)	Verde olivo, orilla blanca < 2 semanas. Después de 2 semanas genera pigmento verde oscuro
Reverso (PDA)	Pigmento verde no difusible
Tiempo de conidiación después de sembrado	5 días
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	10 días
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	No determinado

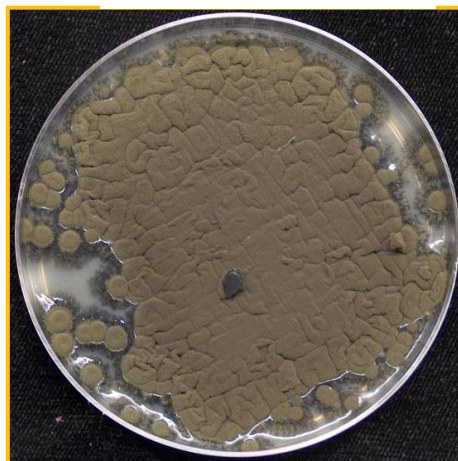
Anverso



Reverso

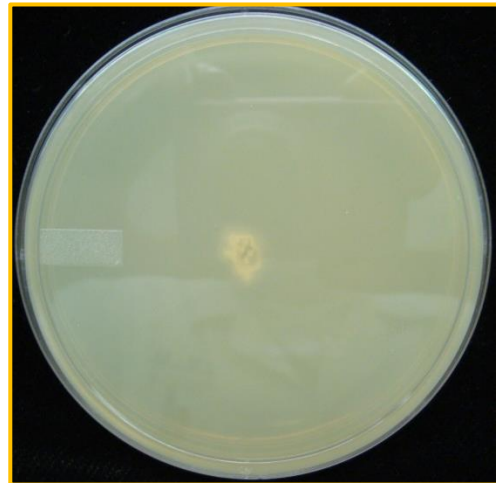


Más de 2 semanas



A2.PL.1 (*Aspergillus fumigatus*)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Seco, polvoso y aterciopelado
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Radial, plano y con la orilla filamentosa
Pigmentación de la colonia (PDA)	Verde claro (aqua), orilla blanca
Reverso	Sin pigmento
Tiempo de conidiación después de sembrado	1 día
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	3 días
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	No determinado

Anverso**Reverso**

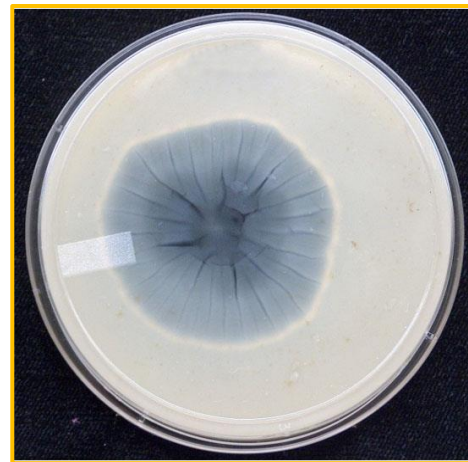
A2.PP.5 (*Cladosporium tenuissimum*)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Esponjoso, seco, esporas semejan nieve
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Radial, elevada con la orilla ondulada
Pigmentación de la colonia (PDA)	Verde, con la orilla blanca
Reverso	Pigmento verde no difusible
Tiempo de conidiación después de sembrado	5 días
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	1 semana
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	12 h (cerca del 100% de conidias germinadas)

Anverso



Reverso



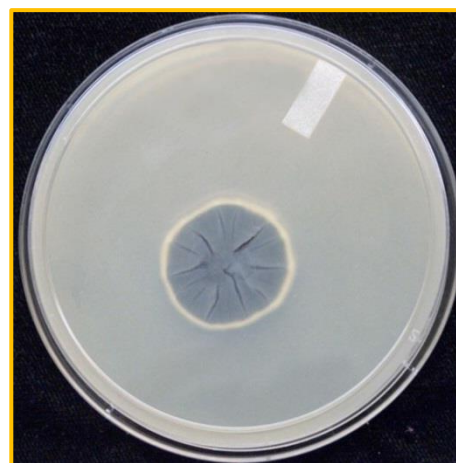
A3.1.1 (*Cladosporium tenuissimum*)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Forma halo en Impranil	Sí
Crecimiento en Polylack	No
Aspecto (PDA)	Esponjoso, seco
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Radial
Pigmentación de la colonia (PDA)	Verde olivo
Reverso	Pigmento verde claro no difusible
Tiempo de conidiación después de sembrado	5 días
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	1 semana
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	12 h (cerca del 100% de conidias germinadas)

Anverso

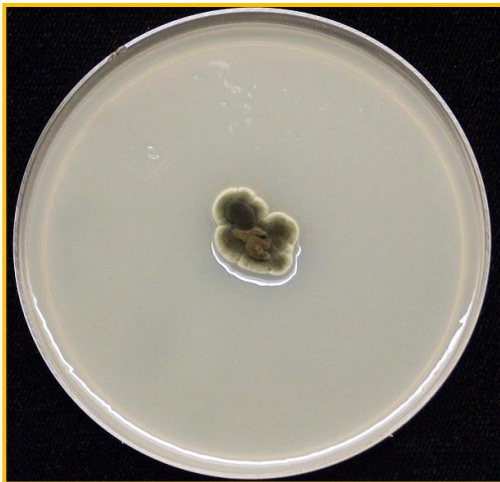
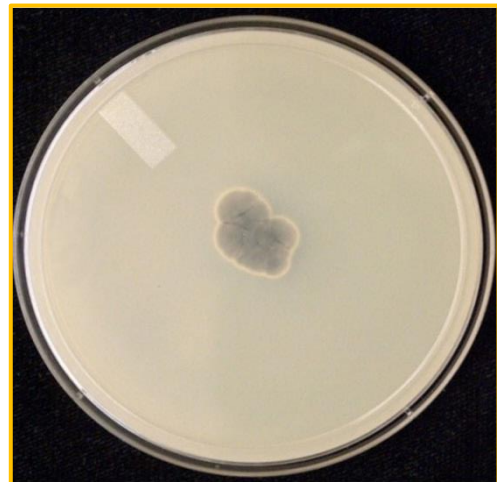


Reverso



BP3.I.2 (*Cladosporium asperulatum*)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Forma halo en Impranil	Sí
Crecimiento en Polylack	No
Aspecto (PDA)	Seco y esponjoso (apariencia de coliflor)
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Forma irregular, elevada-convexa con orilla lobulada
Pigmentación de la colonia (PDA)	Verde con orilla blanca
Reverso	Pigmento verde no difusible
Tiempo de conidiación después de sembrado	1 semana
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	1 semana
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	No determinado

Anverso**Reverso**

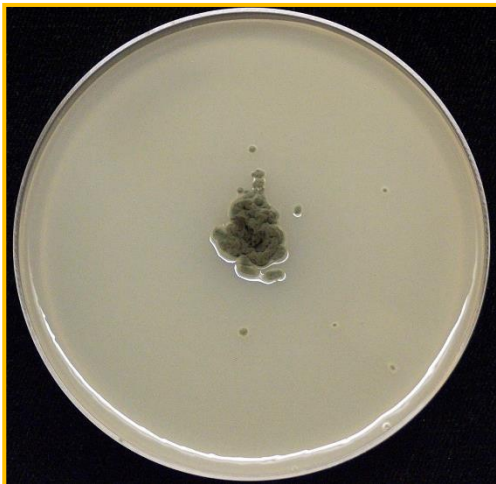
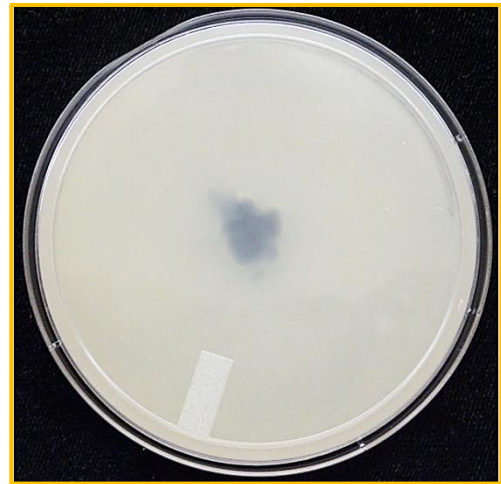
BP3.I.7 (*Penicillium chrysogenum*)

Crecimiento en Impranil	Sí
Forma halo en Impranil	Sí
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Aterciopelado y esponjoso
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Radial, elevada-convexa y con orilla ondulada
Pigmentación de la colonia (PDA)	Verde claro con orilla blanca, después de 5 días produce un líquido amarillo
Reverso	El micelio vegetativo es profundo (rompe el agar)
Tiempo de conidiación después de sembrado	1 día
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	3 días
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	No determinado

Anverso**Reverso****5 días de cultivo**

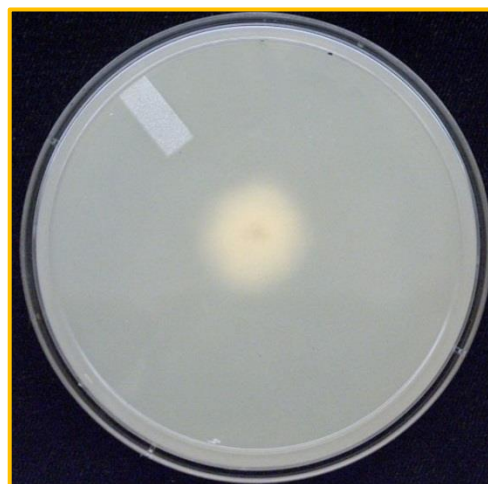
BP3.I.9 (*Cladosporium* sp.)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Forma halo en Impranil	Sí
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Rugoso y seco
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Irregular limitado, elevado con orilla lobulada
Pigmentación de la colonia (PDA)	Verde oscuro en el centro, verde olivo en lo más externo
Reverso	Pigmento verde oscuro no difusible
Tiempo de conidiación después de sembrado	1 semana (produce pocas conidias)
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	No llena la caja (crecimiento limitado)
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	48 h (más del 85% de conidias germinadas)

Anverso**Reverso**

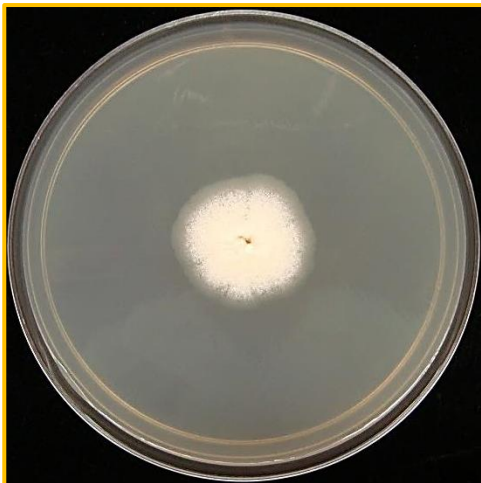
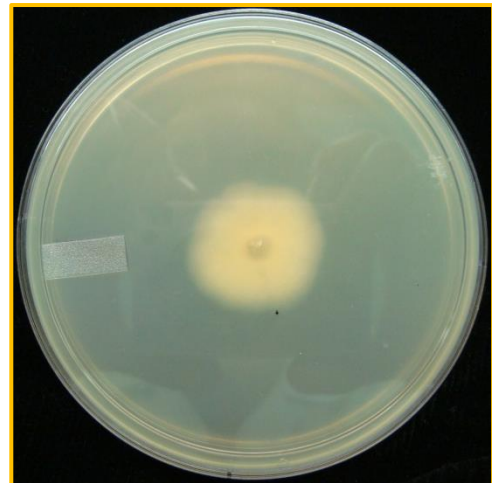
BP4.I.1 (*Dichotomomyces cejpii*)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Forma halo en Impranil	Sí
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Seco, algodonoso
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Radial, plano y con orilla filamentosa
Pigmentación de la colonia (PDA)	Blanca
Reverso	Sin pigmento
Tiempo de conidiación después de sembrado	1 semana
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	10 días
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	72 h (cerca del 55% de conidias germinadas)

Anverso**Reverso**

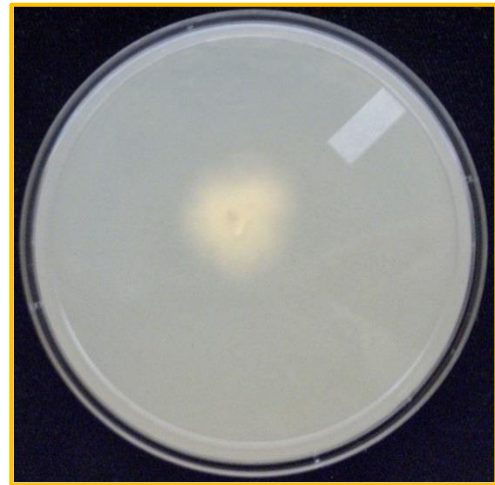
BP6.I.9 (*Dichotomomyces cejpii*)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Seco, polvoso
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Radial, plano con orilla lobulada y filamentosa
Pigmentación de la colonia	Blanco en los primeros días. Después de una semana se ve color beige
Reverso	Sin pigmento
Tiempo de conidiación después de sembrado	5 días
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	10 días
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	72 h (más del 70% de conidias germinadas)

Anverso**Reverso**

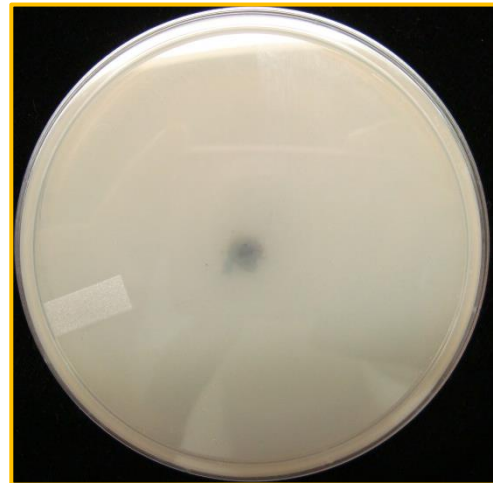
BP7.I.7 (*Dichotomomyces cejpii*)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Seco, algodonoso, esponjoso
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Irregular, colonias puntiformes que generan crecimiento radial y filamentoso
Pigmentación de la colonia (PDA)	Blanco
Reverso	Sin pigmento
Tiempo de conidiación después de sembrado	5 días
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	10 días
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	60 h (cerca del 90% de conidias germinadas)

Anverso**Reverso**

BP8.I.3 (*Cladosporium asperulatum*)

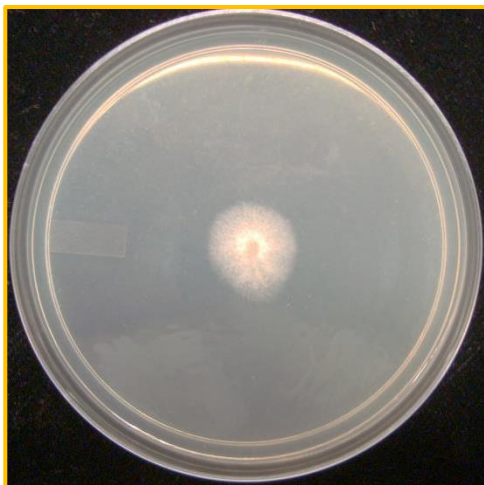
Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Esponjoso y seco
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Irregular, elevado-convexo, con orilla lobulada
Pigmentación de la colonia (PDA)	Verde claro, orilla blanca. Las esporas son verde limón
Reverso	Pigmento verde claro no difusible
Tiempo de conidiación después de sembrado	5 días
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	7 días
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	No determinado

Anverso**Reverso**

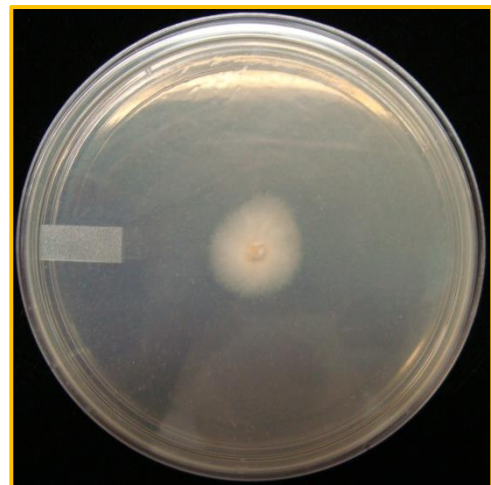
T1.H.7 (*Fusarium* sp.)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Seco, aterciopelado con el centro granular
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Radial, plana con la orilla filamentosa
Pigmentación de la colonia (PDA)	Presenta pigmentos violetas, anaranjados, rosas (después de 1 semana)
Reverso	Pigmentos violetas, rosas y anaranjados (después de 1 semana)
Tiempo de conidiación después de sembrado	2 días
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	4 días
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	24 h (más del 95% de conidias germinadas)

Anverso



Reverso



1 semana



T1.PL.1 (*Cladosporium pseudocladosporioides*)

Crecimiento en Impranil	Sí (forma halo)
Crecimiento en Polylack	Sí
Aspecto (PDA)	Rugoso, seco, terroso
Tipo de crecimiento de la colonia (PDA)	Fusiforme, elevado-irregular con orilla ondulada
Pigmentación de la colonia (PDA)	Verde olivo
Reverso	Pigmento verde oscuro no difusible
Tiempo de conidiación después de sembrado	5 días
Tiempo de crecimiento para llenar la caja	7 días
Tiempo de germinación en MM-Dextrosa (0.5%)	12 h (cerca del 100% de conidias germinadas)

Anverso



Reverso



ANEXO 3. Identificación de las cepas de hongos

a) Extracción de DNA genómico

1. Inocular los hongos en matraces con 50 mL de PDB y dejarlos crecer por una semana a 30 °C. Para A2.PL.1 y BP3.I.7 se obtuvo gran cantidad de conidias y muy poco micelio en la condición de cultivo anterior, por lo que se cultivaron en agitación a 200 rpm (LablineMod. 3527 Orbital IncubatorShaker, 3/4" de radio de agitación para propiciar la formación de esferas de micelio sin conidias. Esta condición fue seleccionada, debido a que es difícil obtener DNA a partir de las conidias.
2. Cosechar el tejido por filtración del micelio en papel Whatman No. 41 estéril. Transferir 0.2 g del tejido filtrado a un mortero de porcelana estéril pre-enfriado. Macerar con nitrógeno líquido para pulverizar la biomasa.
3. Transferir el micelio pulverizado a un tubo Eppendorf agregar 600 µL de buffer de extracción (2% CTAB, 1.4 M NaCl, EDTA 200 mM, 100 mM Tris HCl [pH8.0]). Agitar en vórtex por un min e incubar a 65 °C por 30 min. Dejar que la mezcla alcance la temperatura ambiente.
4. Agregar 250 µL de acetato de potasio (5 M) mezclar vigorosamente por un min en vórtex.
5. Centrifugar a 10,000 x g a 4°C por 5 min. Colocar el sobrenadante en un tubo nuevo.
6. Agregar un volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1 v/v) y mezclar vigorosamente en vórtex.
7. Centrifugar a 10,000 x g a 4°C por 5 min y transferir el sobrenadante en un tubo nuevo estéril.
8. Agregar un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1 v/v) y mezclar en vórtex.
9. Centrifugar a 10,000 x g a 4°C por 5 min y colocar el sobrenadante en un tubo nuevo estéril.
10. Agregar 600 µL de isopropanol frío e incubar 2 h a -20°C.
11. Centrifugar a 10,000 x g a 4°C por 5 min y colocar el sobrenadante en un tubo nuevo estéril.
12. Lavar la pastilla con 1 mL de etanol al 70% y dejar secar la pastilla.
13. Resuspender el DNA en 100 µL de agua.

b) Amplificación de la región entre los primers ITS1 y D2 para la identificación de género y especie.

Posteriormente se procedió a la amplificación, mediante PCR de la región ITS1 (internal transcribed spacer) y D2, que abarca parte de la secuencia del gen que codifica el RNA

ribosomal 28S), empleando los primers correspondientes y las condiciones mostradas en la Tabla 10.

Tabla 11. Condiciones de reacción para la PCR con los primers ITS1 y D2

Temperatura	Tiempo	Ciclos
98 °C	3 min	1 X
98 °C	10 seg	
64.4 °C	30 seg	40 X
72 °C	36 seg	
72 °C	7 min	1 X
4 °C	∞	∞

Los fragmentos amplificados fueron enviados a secuenciar (empleando los primers ITS1 y D2) a la empresa MACROGEN (Seoul, Korea). Una vez obtenidos los resultados se analizaron mediante BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) con la base de datos del GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>) para identificar la especie de las cepas de interés. Debido a que la identificación de las cepas A2.H.4, A2.PL.1, A2.PP.5, A3.I.1, BP3.I.2, BP3.I.7, BP.8.I.3 y T1.PL.1 ya fue reportada por Álvarez-Barragán *et al.* (2016), en el presente trabajo se incluyen únicamente las secuencias de las cepas BP3.I.9, BP4.I.1, BP6.I.9 y BP7.I.7, no reportadas previamente. Se presentan los 10 primeros hits.

Cepa: BP3.I.9. *Cladosporium* sp.

Región amplificada: ITS1 / D2

Longitud de la secuencia: 1046 b

```
GACCCGGTCTACCACCGGGATGTTTCATAACCCTTTGTTGTCCGACTCTGTTGCCTCCGGGGCGACCCTGCCTTC
GGGCGGGGGCTCCGGGTGGACTTCAAACCTTTCGTAACCTTTCGAGTCTGAGTAACTTAATTAATAAATTA
AACTTTTAACAACGGATCTCTTGTTCTGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAAGTAATGTGAATTGC
AGAATTCAGTGAATCATCGAATCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTTTCGAG
CGTCATTTCACTCAAGCCTCGCTTGGTATTGGCAACGCGGTCCGCCGCGTGCCTCAAATCGACCGGCTGG
GTCTTCTGTCCCCTAAGCGTTGTGAAACTATTCGCTAAAGGGTGTTCGGGAGGCTACGCCGTAAAACAACCCCA
TTTCTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAAC
CAACAGGGATTGCTCTAGTAACGGCGAGTGAAGCAGCAATAGCTCAAATTTGAAATCTGGCGTCTTCGACGTCGG
AGTTGTAATTTGTAGAGGATGCTTCTGAGTAACCACCGACCTAAGTTCCTTGAACAGGACGTCATAGAGGGTGA
GAATCCCCTATGCGGTTCGAAAGGTGCTCTATACGTAGCTCCTTCGACGAGTTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCT
CTAAATGGGAGGTAAATTTCTTCTAAAGCTAAATATTGGCCAGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAA
GATGAAAAGCACTTTGGAAAGAGAGTTAAAAGCACGTGAAATTTGTTAAAAGGGAAGGGATTGCAACCAGACTTG
CTCGCGGTGTTCCGCCGGTCTTCTGACCGGTCTACTCGCCGCGTTGCAGGCCAGCATCGTCTGGTGCCGCTGG
ATAAGACTTGAGGAATGTAGCTCCCTCGGGAGTGTTATAGCCTCTTGTGATGCAGCGAGCGCCGGGCGAGGTCC
GCG
```

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Cladosporium asperulatum strain BP312 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal R	1927	1927	100%	0.0	99%	KU605791.1
<input type="checkbox"/>	Cladosporium uredinicola strain CPC 5390 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribe	1927	1927	100%	0.0	99%	AY251071.2
<input type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate F47-02 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso	1923	1923	99%	0.0	99%	KX664413.1
<input type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate F47-01 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso	1923	1923	99%	0.0	99%	KX664412.1
<input type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate F37-05 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso	1923	1923	99%	0.0	99%	KX664391.1
<input type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate F37-03 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso	1923	1923	99%	0.0	99%	KX664389.1
<input type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate F35-04 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso	1923	1923	99%	0.0	99%	KX664382.1
<input type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate F34-03 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso	1923	1923	99%	0.0	99%	KX664378.1
<input type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate F08-03 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso	1923	1923	99%	0.0	99%	KX664339.1
<input type="checkbox"/>	Cladosporium cladosporioides isolate F07-02 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S riboso	1923	1923	99%	0.0	99%	KX664334.1

Cepa: BP4.I.1.

Región amplificada: ITS1 / D2

Longitud de la secuencia: 1082 b

CCCTCCACCCGTGTCTACCGTACCTTGTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTGACGGCCGCCGGGGAGGCCTCC
 GCGCCCCGGGCCCGCGCCCGCCGAAGACGCCACGTGAACCTCTGCCCTGAAGGATTGCAGTCTGAGTCGATT
 ATCATAATCAGTTAAAACCTTTCAACAACGGATCTCTTGGTTCGGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAA
 CTAATGTGAATTGCAGAAATCAGTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGC
 ATGCCTGTCCGAGCGTCATTGCTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCGCCGTCGCCGCTCCCCGGGG
 ACGGGCCCGAAAGGCAGCGGGCCGACCCGCTCCGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTGCAG
 GCCCGGCCGGCGCCGGCCGACCACCAACCCACTTCTTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGA
 ACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAG
 AGCTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCGGGTCCGCGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGATGCGGCCCCCG
 TCTAAGTGCCCTGGAAGGGCCGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGGACGGGGTGTCCGCGTCCGTGTGA
 AGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTG
 GCCGGAGACCGATAGCGCACAAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACG
 TGAAATTTGAAAGGGAAGCGTTTGCACCAGACTCGCCCGGGGTTCCAGCCGGCACTCGTGCCGGTGTAC
 TTCCCCGCGGGCGGGCCAGCGTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCTCGGAATGTGTACCCCCCGGGT
 GTCTTATAGCCGAGGGTGAATGCGGCCTGCCCGACCGAGGAACGCGCTCC

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Dichotomomyces ceipii isolate BP411 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	2001	2001	100%	0.0	100%	KX011610.1
<input type="checkbox"/>	Dichotomomyces ceipii isolate NRRL 26980 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib	2001	2001	100%	0.0	100%	EF669956.1
<input type="checkbox"/>	Dichotomomyces ceipii isolate BP619 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1958	1958	97%	0.0	100%	KX011611.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya sp. NRRL 1283 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8	1790	1790	99%	0.0	97%	EF669929.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya pseudofischeri isolate NRRL 180 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcri	1783	1783	99%	0.0	96%	EF669935.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya fischeri isolate NRRL 181 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp	1766	1766	99%	0.0	96%	EF669936.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya spinosa isolate NRRL 185 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp	1766	1766	99%	0.0	96%	EF669940.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus lentulus isolate NRRL 35553 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s	1760	1760	99%	0.0	96%	EF669970.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus lentulus isolate NRRL 35551 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s	1760	1760	99%	0.0	96%	EF669968.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya spinosa isolate NRRL 3435 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s	1760	1760	99%	0.0	96%	EF669965.1

Cepa: BP6.I.9
Región amplificada: ITS1 / D2
Longitud de la secuencia: 1046 b

CCTTGTTGCTTCGGCGGGCCCGCCGCTGACGGCCGCGGGGAGGCCTCCGCGCCCCGGGCCGCGCCCCG
 CCGAAGACGCCACGTGAACTCTGCCCTGAAGGATTGCAGTCTGAGTCGATTATCATAATCAGTTAAAACCTTCA
 ACAACGGATCTCTTGGTTCCGGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATAACTAATGTGAATTGCAGAATTCA
 GTGAATCATCGAGTCTTTGAACGCACATTGCGCCCCCTGGTATTCCGGGGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTG
 CTGCCCTCAAGCACGGCTTGTGTGTTGGGCCGCGTCCCCGCTCCCCGGGACGGGCCGAAAGGCAGCGG
 CGGCACCGCGTCCGTCCTCGAGCGTATGGGGCTTCGTCACCCGCTCTGCAGGCCCGGCCGCGCCGGCCGA
 CCACCAACCCACTTCTTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAGGGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGG
 AGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCC
 CCCCCGGGTCCGCGTTGTAATTTGCAGAGGATGCTTCGGATGCGGCCCCCGTCTAAGTCCCTGGAAGGGGC
 CGTCATAGAGGGTGAGAATCCCGTCTGGGACGGGTGTCCGCGTCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGT
 TGTTTGGGAATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGCCGGAGACCGATAGCGCAC
 AAGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTTGAAAGGGAAGC
 GTTTGCGACCAGACTCGCCCGCGGGGTTAGCCGGCACTCGTGCCGTTGACTTCCCCGCGGGCGGGCCAGC
 GTCGGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCTCGGAATGTGTACCCCCCGGGTGTCTTATAGCCGAGGGTGCAA
 TGCGGCCTGCCCGGACCGAGGAACGCGCTCC

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected: 0

	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Dichotomomyces ceipii isolate BP6I9 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1958	1958	100%	0.0	100%	KX011611.1
<input type="checkbox"/>	Dichotomomyces ceipii isolate BP411 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1958	1958	100%	0.0	100%	KX011610.1
<input type="checkbox"/>	Dichotomomyces ceipii isolate NRRL_26980 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib	1958	1958	100%	0.0	100%	EF669956.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya sp. NRRL 1283 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8	1760	1760	99%	0.0	97%	EF669929.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya pseudofischeri isolate NRRL 180 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcri	1753	1753	99%	0.0	97%	EF669935.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya fischeri isolate NRRL 181 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp	1731	1731	99%	0.0	96%	EF669936.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya spinosa isolate NRRL 185 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp	1731	1731	99%	0.0	96%	EF669940.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya pseudofischeri NRRL 180 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp	1727	1727	99%	0.0	96%	AF459729.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus duricaulis isolate NRRL 4021 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed	1725	1725	99%	0.0	96%	EF669971.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus lentulus isolate NRRL 35553 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed s	1725	1725	99%	0.0	96%	EF669970.1

Cepa: BP7.I.7
Región amplificada: ITS1 / D2
Longitud de la secuencia: 625 b

TGCAGGCCCGCGCGCCGCGCCGACCACCAACCCACTTCTTAAGGTTGACCTCGGATCAGGTAG
 GGATACCCGCTGAACTTAAGCATATCAATAAGCGGAGGAAAAGAAACCAACAGGGATTGCCCCAGTA
 ACGGCGAGTGAAGCGGCAAGAGCTCAAATTTGAAAGCTGGCCCCCGGGGTCCGCGTTGTAATTT
 GCAGAGGATGCTTCGGATGCGGCCCCCGTCTAAGTGCCCTGGAAGGGGCCGTCATAGAGGGTGAG
 AATCCCGTCTGGGACGGGGTGTCCGCGTCCGTGTGAAGCTCCTTCGACGAGTCGAGTTGTTTGGGA
 ATGCAGCTCTAAATGGGTGGTAAATTTTCATCTAAAGCTAAATACTGGCCGGAGACCGATAGCGCACA
 AGTAGAGTGATCGAAAGATGAAAAGCACTTTGAAAAGAGAGTTAAACAGCACGTGAAATTTGTTGAAA
 GGGAAGCGTTTTCGACCACTCGCCCGCGGGGTTAGCCGGCACTCGTGCCGGTGTACTTCCCC
 GCGGGCGGGCCAGCGTCCGTTTGGGCGGCCGGTCAAAGGCCCTCGGAATGTGTACCCCCCGGG
 GTGTCTTATAGCCGAGGGTGCAATGCGGCCTGC

Sequences producing significant alignments:

Select: [All](#) [None](#) Selected:0

Alignments Download GenBank Graphics Distance tree of results							
	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/>	Dichotomomyces ceipii isolate BP717 internal transcribed spacer 2 and 28S ribosomal RNA gene, partial s	1155	1155	100%	0.0	100%	KX011612.1
<input type="checkbox"/>	Dichotomomyces ceipii isolate BP619 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1155	1155	100%	0.0	100%	KX011611.1
<input type="checkbox"/>	Dichotomomyces ceipii isolate BP411 internal transcribed spacer 1, partial sequence: 5.8S ribosomal RNA	1155	1155	100%	0.0	100%	KX011610.1
<input type="checkbox"/>	Dichotomomyces ceipii isolate NRRL 26980 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcrib	1155	1155	100%	0.0	100%	EF669956.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya pseudofischeri isolate NRRL 180 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcri	1068	1068	100%	0.0	97%	EF669935.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya sp. NRRL 1283 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed spacer 1, 5.8	1068	1068	100%	0.0	97%	EF669929.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya pseudofischeri NRRL 180 18S ribosomal RNA gene, partial sequence: internal transcribed sp	1051	1051	100%	0.0	97%	AF459729.1
<input type="checkbox"/>	Aspergillus nishimurae ITS1 (partial), 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene (partial), strain CBS 1172	1046	1046	100%	0.0	97%	HE974451.2
<input type="checkbox"/>	Neosartorya assulata genomic DNA containing ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rRNA gene, strain IBT	1046	1046	100%	0.0	97%	HF545007.1
<input type="checkbox"/>	Neosartorya nishimurae genomic DNA containing 18S rRNA gene, ITS1, 5.8S rRNA gene, ITS2 and 28S rR	1046	1046	100%	0.0	97%	HE974449.1

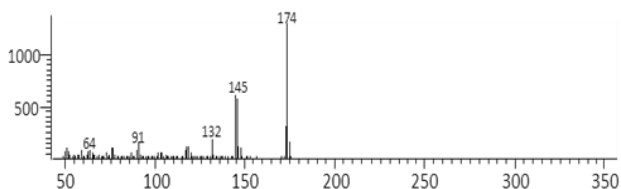
Anexo 4. Metodología para eliminar micelio de las espumas

1. Recuperar las espumas cultivadas con el hongo filamentoso después de los 21 días de la evaluación.
2. Colocar cada espuma en un matraz de 125 mL y adicionar 50 mL de la disolución de NaClO (0.88% m/v).
3. Presionar la espuma con una espátula para sumergirla en la solución de hipoclorito de sodio dos a tres veces al principio y repetir esta operación a las 3 h. Incubar durante 24 h a temperatura ambiente (TA), sin agitación y en oscuridad.
4. Posteriormente, retirar el hipoclorito de sodio por decantación manteniendo la espuma dentro del matraz.
5. Enjuagar con 20 mL de agua destilada agregándola sobre la espuma, y agitar suavemente en forma circular por 5 s, para retirar el exceso de hipoclorito. Decantar.
6. Lavar cinco veces con 20 mL de agua destilada, agitando a 125 rpm a TA (30 °C) durante 2 min cada vez.
7. Decantar el agua y filtrar por vacío la espuma durante 1 min. Empleando un sistema con un embudo Büchner, acoplado a un matraz Kitasato, en el cual se coloca un papel filtro y la espuma encima, con la cara de mayor superficie expuesta.
8. Finalmente, colocar la espuma sobre un papel aluminio pre-pesado y rotulado. Dejar secar en una estufa al vacío a TA hasta peso constante.

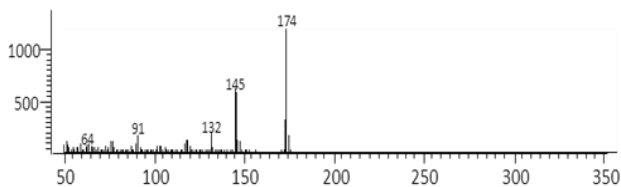
Anexo 5. Espectros de masa de los compuestos identificados mediante GC-MS

Espectros de masas de los compuestos detectados en la tabla 7

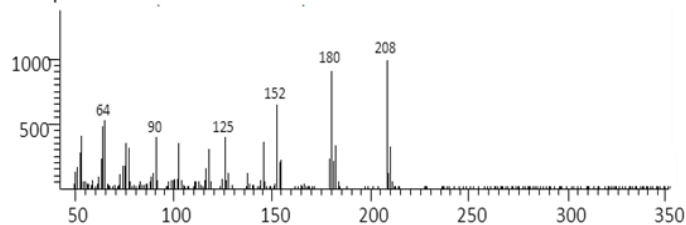
2,4-Diisocianato-1-metilbenceno



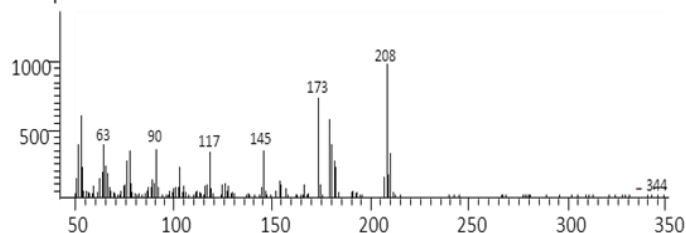
Library hit: 2,4-Diisocianato-1-metilbenceno. Similitud: 869



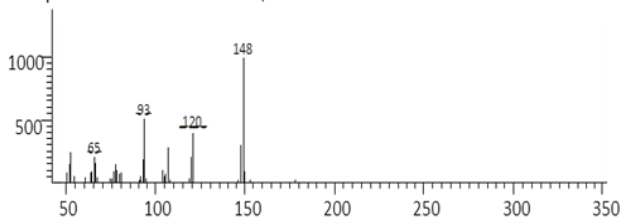
Compuesto no identificado 1



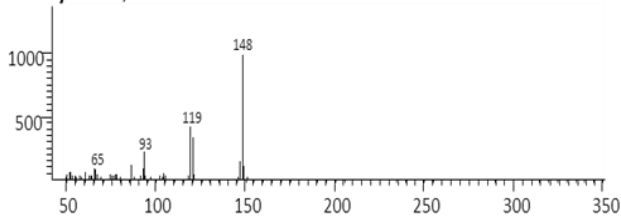
Compuesto no identificado 2



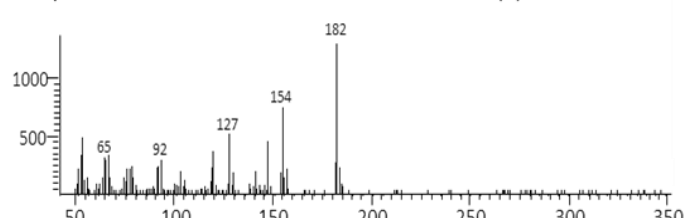
Compuesto relacionado con 2,3-dihidro-6-amino-indol-2-ona



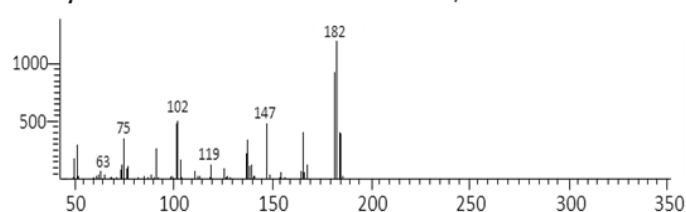
Library hit: 2,3-dihidro-6-amino-indol-2-ona



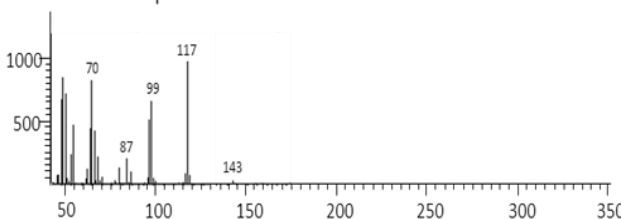
Compuesto relacionado con ácido m-clorocinámico (1)



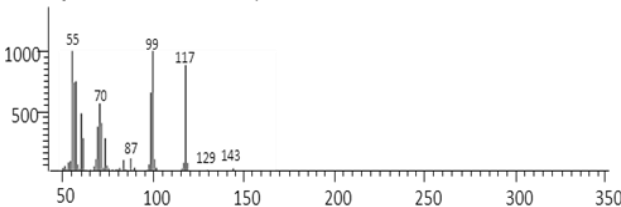
Library hit: Ácido m-clorocinámico. Similitud: N/A



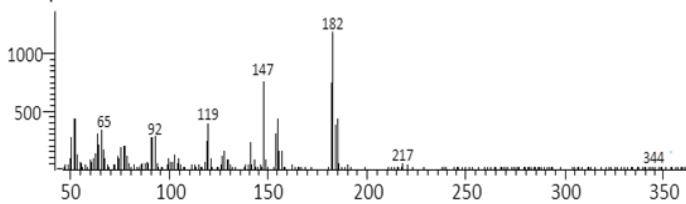
Hexanoato de heptilo



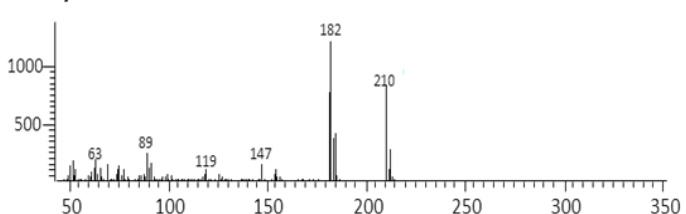
Library hit: Hexanoato de heptilo. Similitud: 866



Compuesto relacionado con 6-cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina



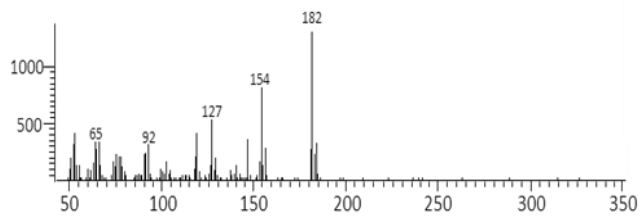
Library hit: 6-cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina. Similitud: 654



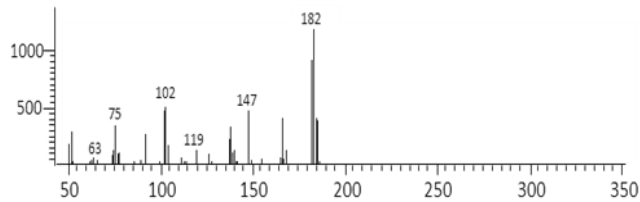
m/z

m/z

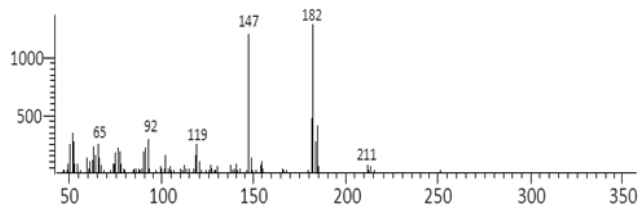
Compuesto relacionado con ácido m-clorocinámico (2)



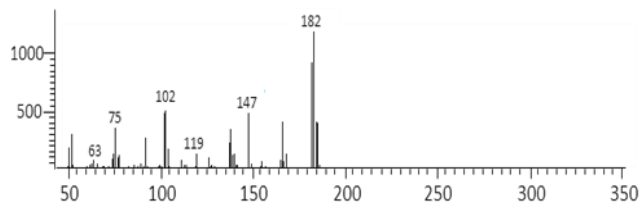
Library hit: Ácido m-clorocinámico. Similitud: N/A



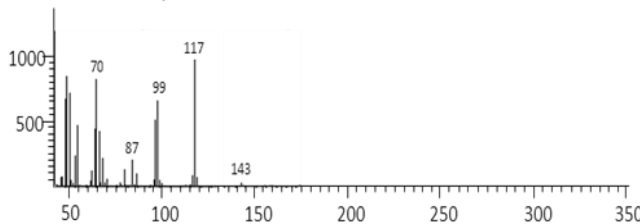
Compuesto relacionado con ácido m-clorocinámico (3)



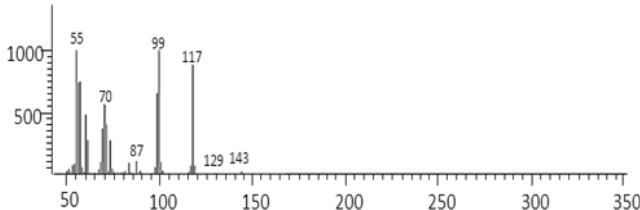
Library hit: Ácido m-clorocinámico. Similitud: 663



Hexanoato de heptilo

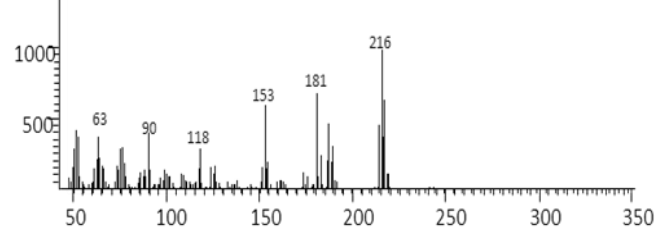


Library hit: Hexanoato de heptilo. Similitud: 866

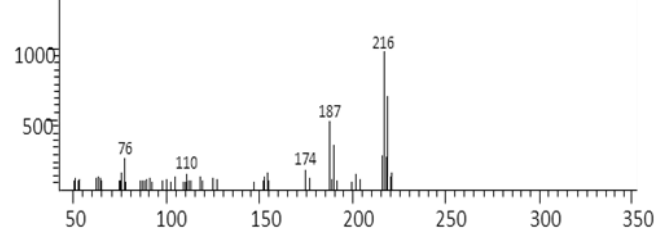


m/z

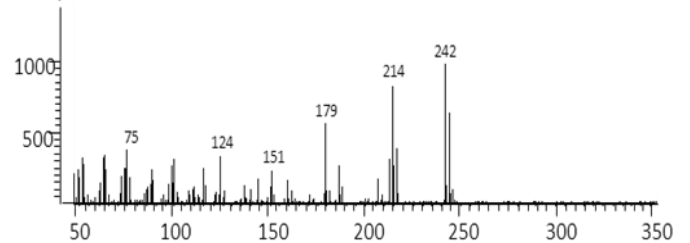
Compuesto relacionado con 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H-benzimidazol-2-ona (1)



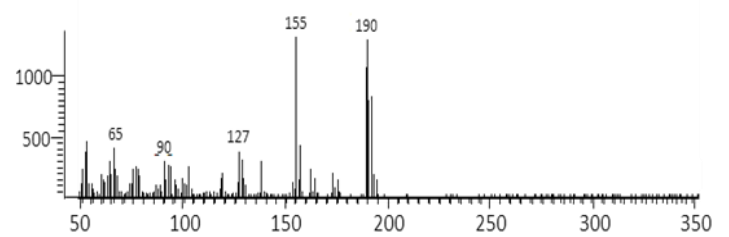
Library hit: 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H-benzimidazol-2-ona. Similitud: 690



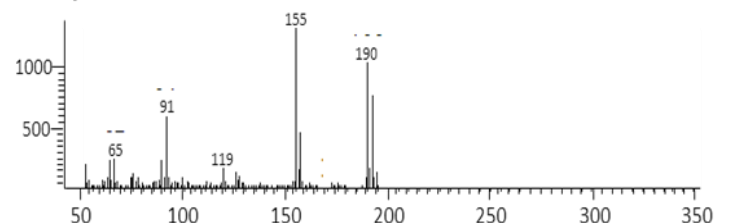
Compuesto no identificado 3



Compuesto relacionado con dicloroxilenol (1)

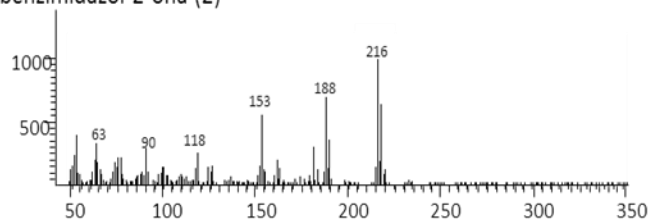


Library hit: Dicloroxilenol. Similitud: 682

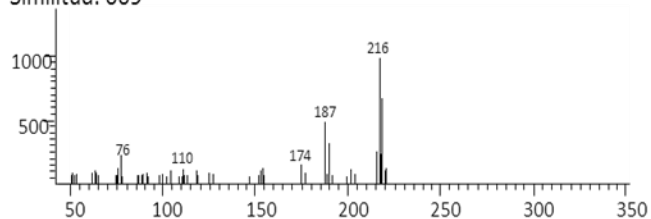


m/z

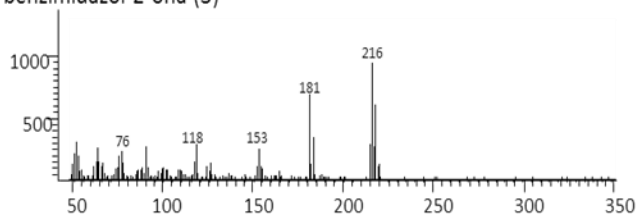
Compuesto relacionado con 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H-benzimidazol-2-ona (2)



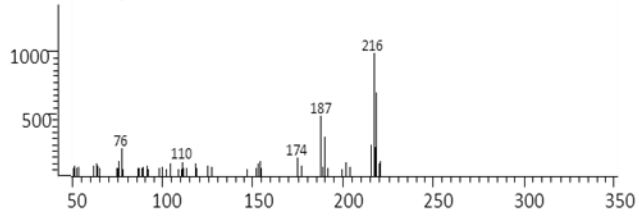
Library hit: 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H-benzimidazol-2-ona. Similitud: 669



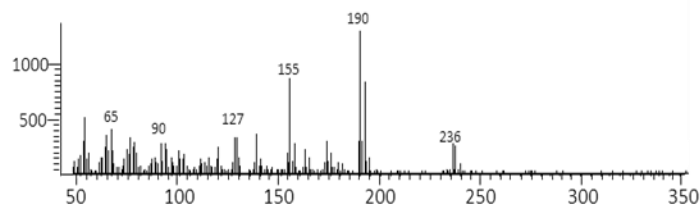
Compuesto relacionado con 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H-benzimidazol-2-ona (3)



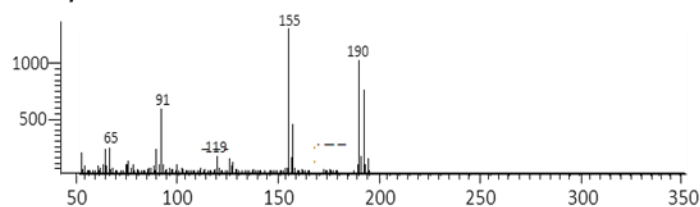
Library hit: 6,7-dicloro-1,3-dihidro-1-metil-2H-benzimidazol-2-ona. Similitud: N/A



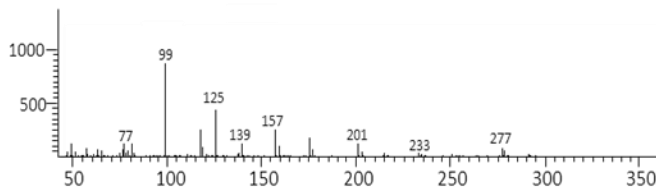
Compuesto relacionado con dicloroxileno (2)



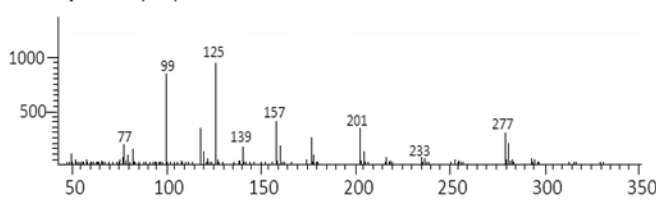
Library hit: Dicloroxileno. Similitud: 664



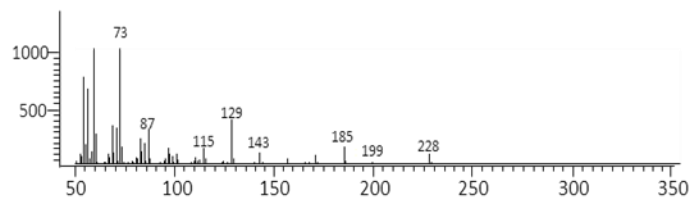
2-propanol-1-clorofosfato



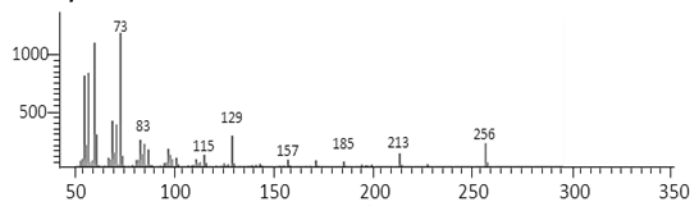
Library hit: 2-propanol-1-clorofosfato. Similitud: 854



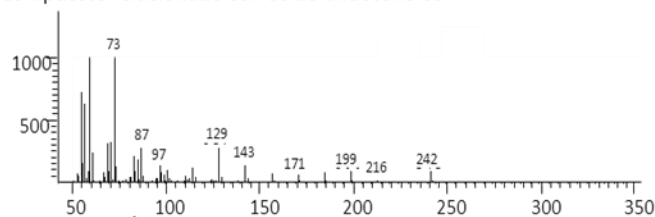
Compuesto relacionado con ácido hexadecanoico



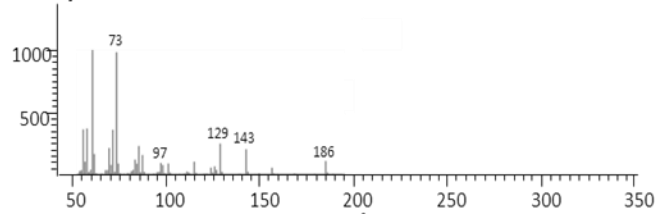
Library hit: Ácido hexadecanoico. Similitud: 733



Compuesto relacionado con ácido undecanoico



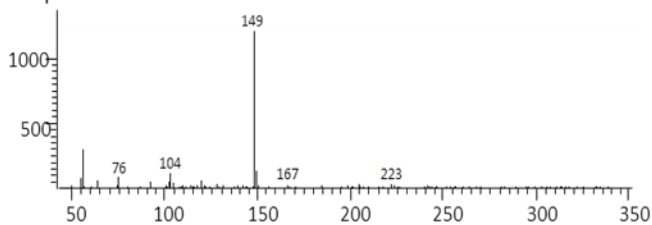
Library hit: Ácido undecanoico. Similitud: 801



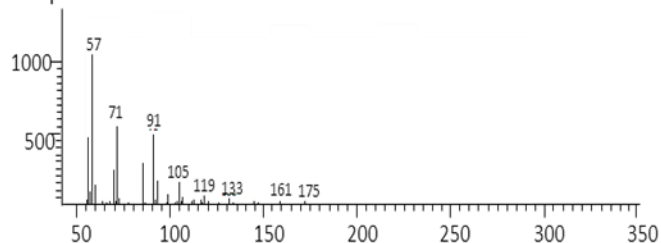
m/z

m/z

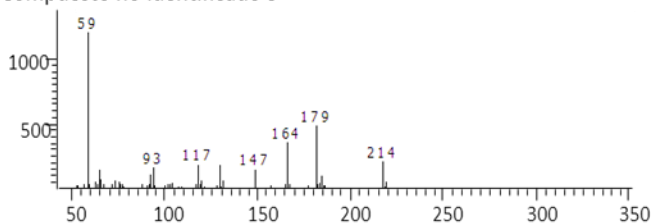
Compuesto no identificado 4



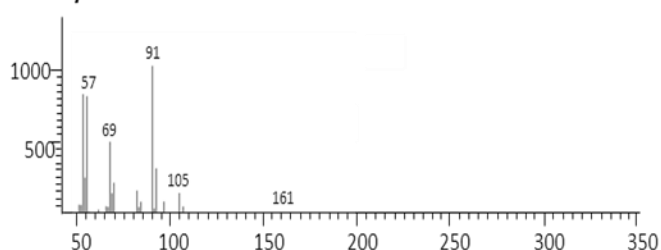
Compuesto relacionado con el 1-cloroundecano



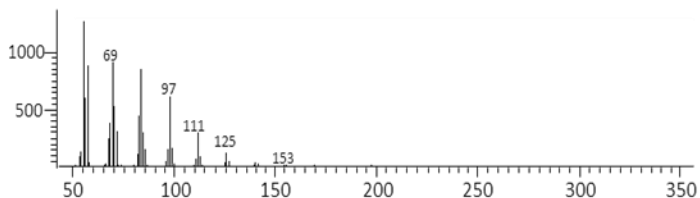
Compuesto no identificado 5



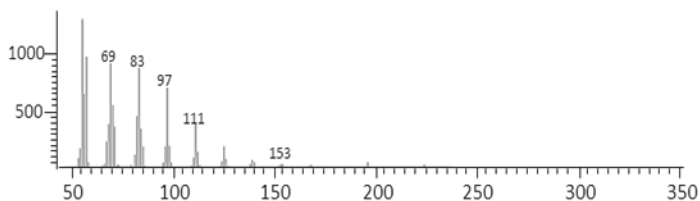
Library hit: 1-cloroundecano. Similitud: 780



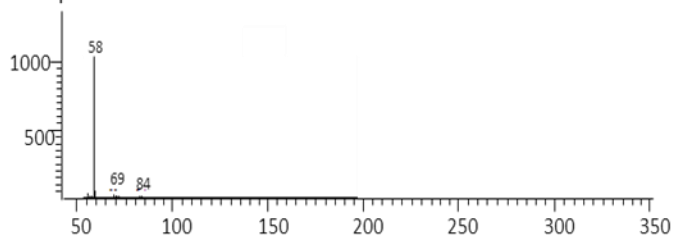
1-Hexadecanol



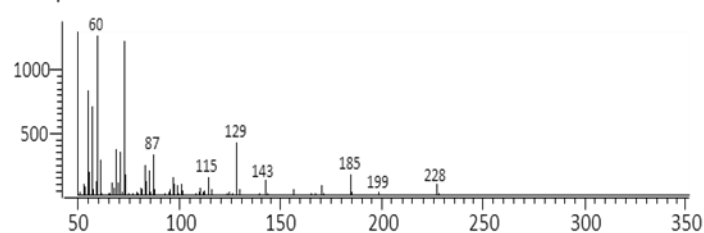
Library hit: 1-Hexadecanol Similitud: 854



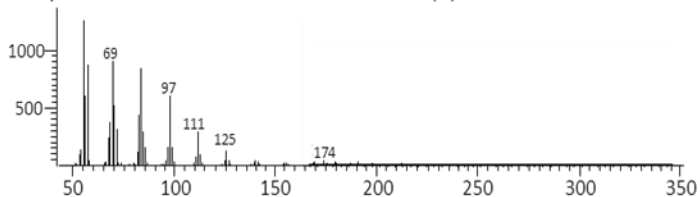
Compuesto no identificado 6



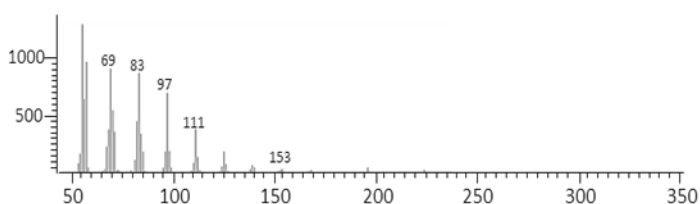
Compuesto relacionado con Tridecanoato de metilo



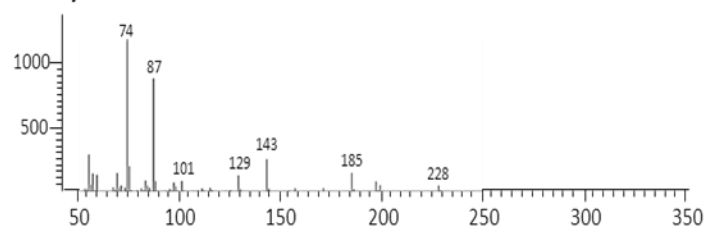
Compuesto relacionado con 1-Hexadecanol (1)



Library hit: 1-Hexadecanol Similitud: N/A



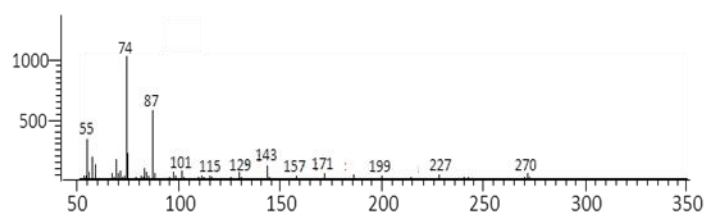
Library hit: Tridecanoato de metilo Similitud: 792



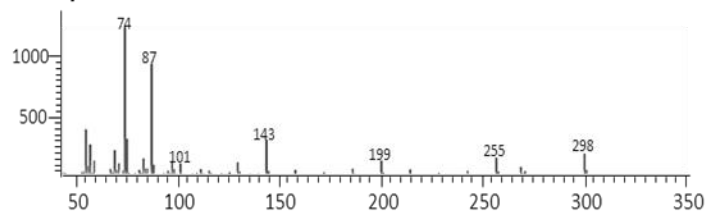
m/z

m/z

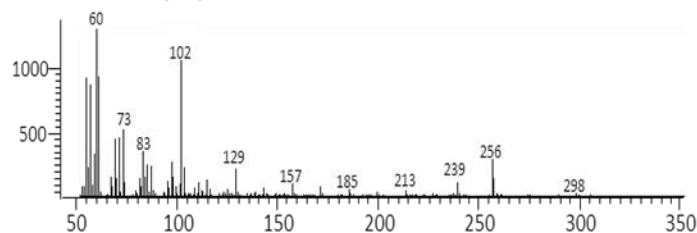
Compuesto relacionado con octadecanoato de metilo



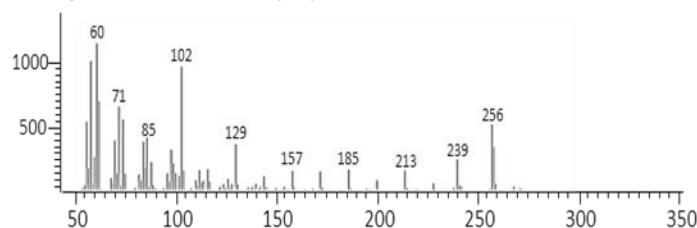
Library hit: Octadecanoato de metilo. Similitud: 733



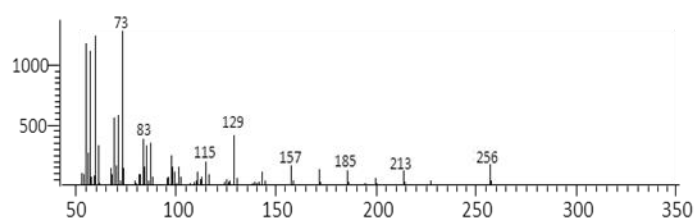
Palmitato de isopropilo



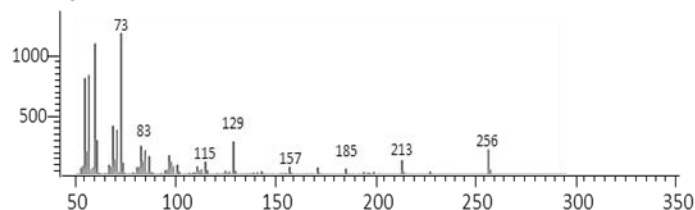
Library hit: Palmitato de isopropilo Similitud: 862



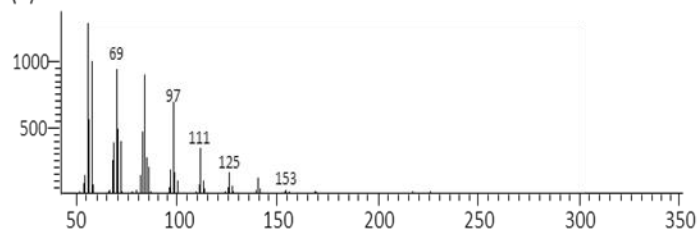
Ácido hexadecanoico



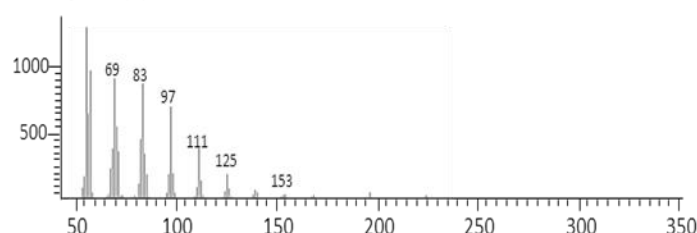
Library hit: Ácido hexadecanoico Similitud: 901



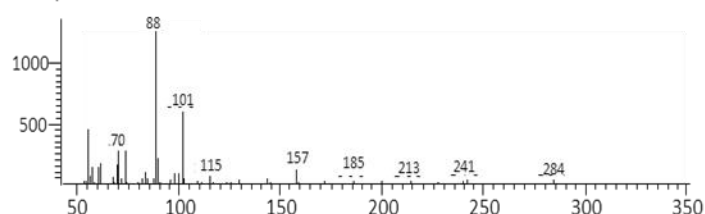
(E) 9- Hexadecen-1-ol



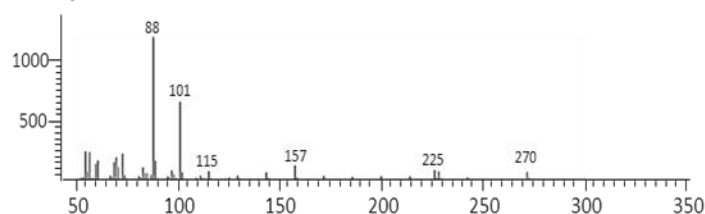
Library hit: (E) 9- Hexadecen-1-ol. Similitud: 878



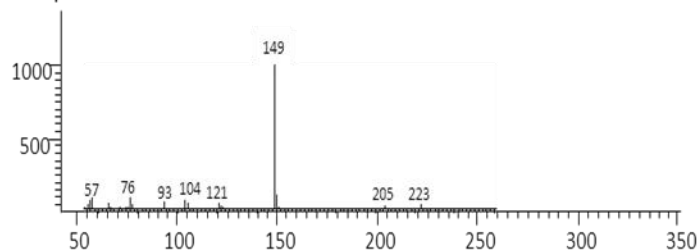
Compuesto relacionado con Pentadecanoato de etilo



Library hit: Pentadecanoato de etilo. Similitud: 734



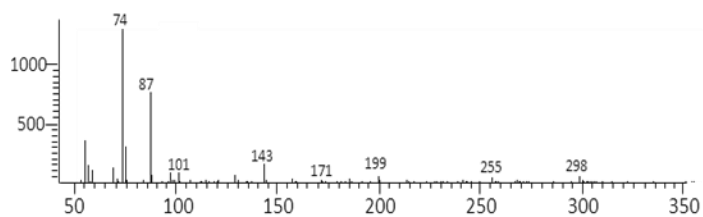
Compuesto no identificado 7



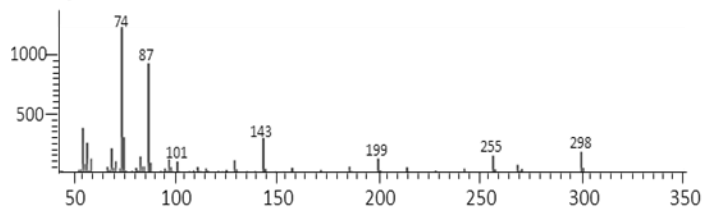
m/z

m/z

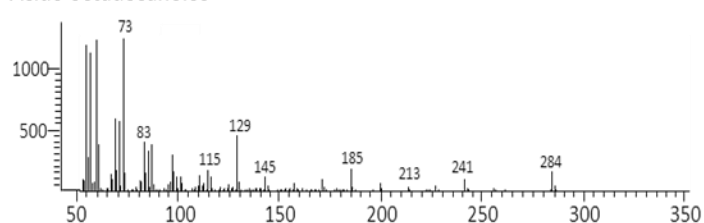
Octadecanoato de metilo



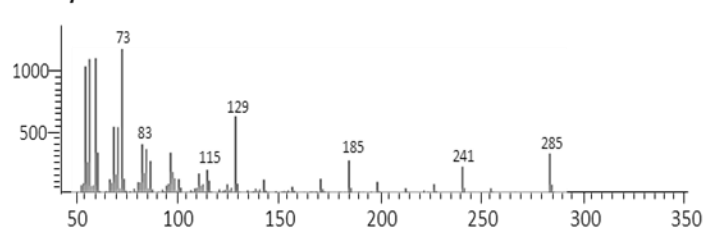
Library hit: Octadecanoato de metilo. Similitud: 866



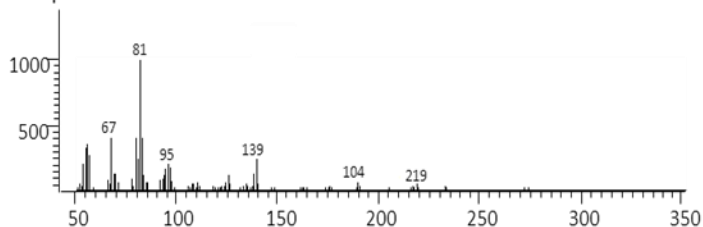
Ácido octadecanoico



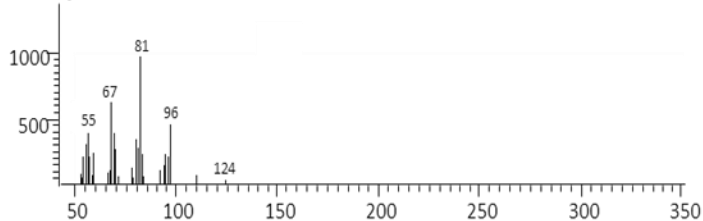
Library hit: Ácido octadecanoico. Similitud: 890



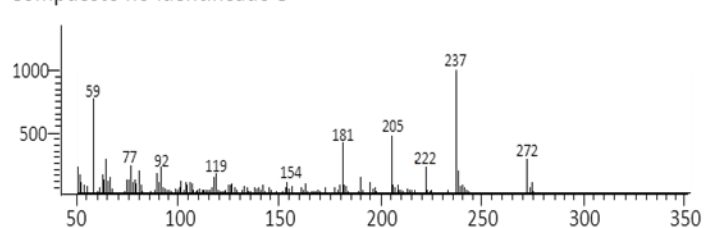
Compuesto relacionado con metilciclooctano



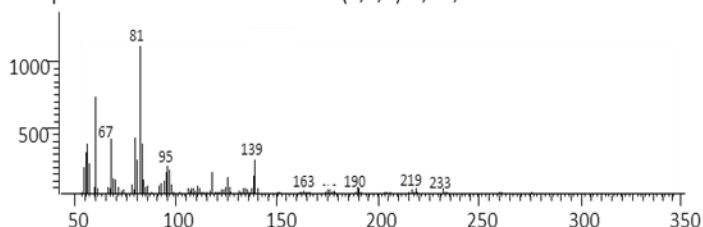
Library hit: Meilenciclooctano. Similitud: 772



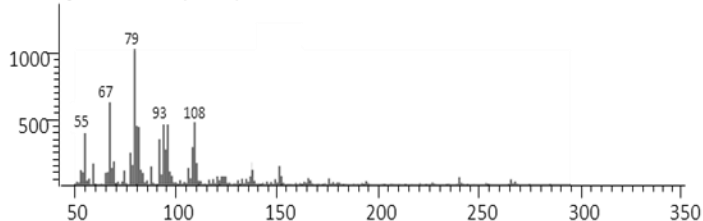
Compuesto no identificado 8



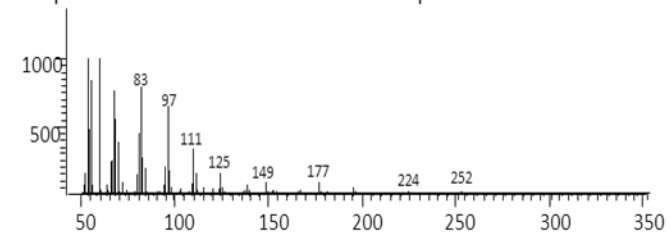
Compuesto relacionado con ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrilenoico



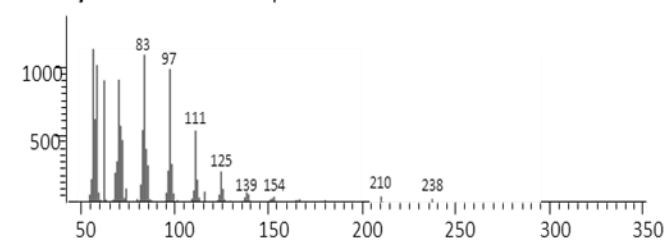
Library hit: Ácido (Z,Z,Z)-9,12,15-octadecatrilenoico. Similitud: 703



Compuesto relacionado con acetato de heptadecilo



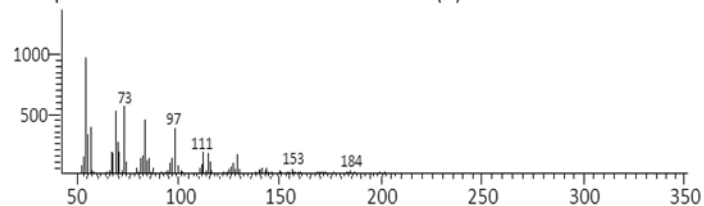
Library hit: Acetato de heptadecilo. Similitud: 715



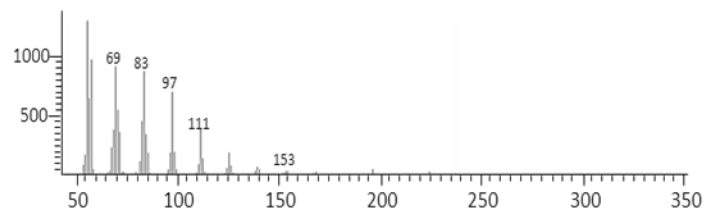
m/z

m/z

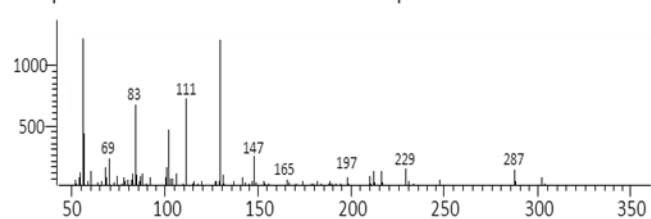
Compuesto relacionado con 1-Hexadecanol (2)



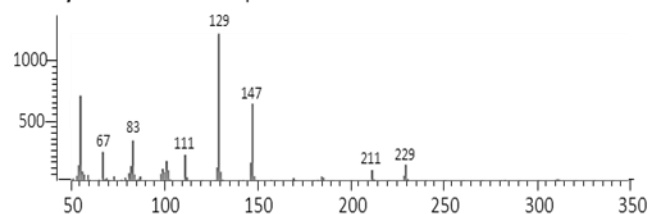
Library hit: 1-Hexadecanol Similitud: N/A



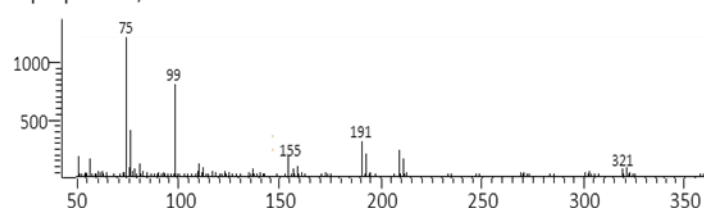
Compuesto relacionado con Diciclohexiladipato



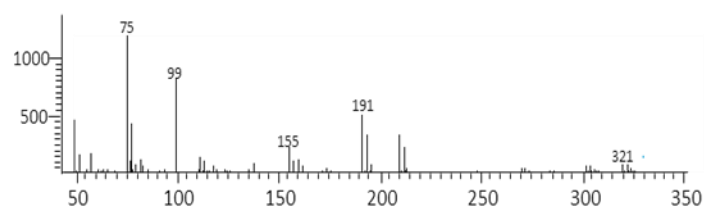
Library hit: Diciclohexiladipato. Similitud: 714



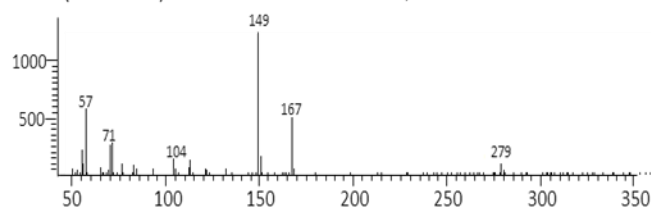
1-propanol-2,3-diclorofosfato



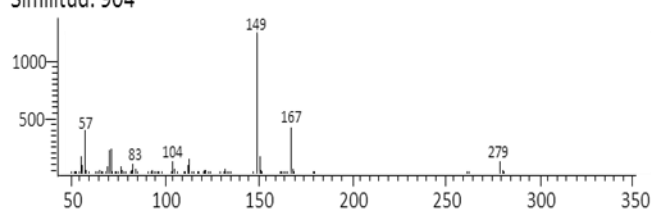
Library hit: 1-propanol-2,3-diclorofosfato. Similitud: 953



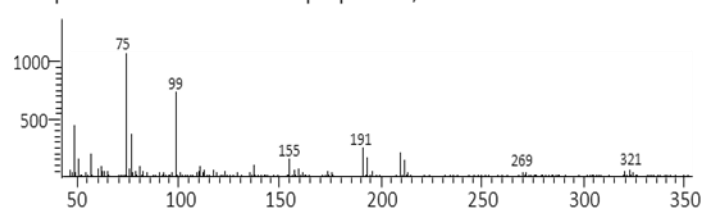
mono(2-etilhexil) éster del ácido benceno-1,2-dicarboxílico



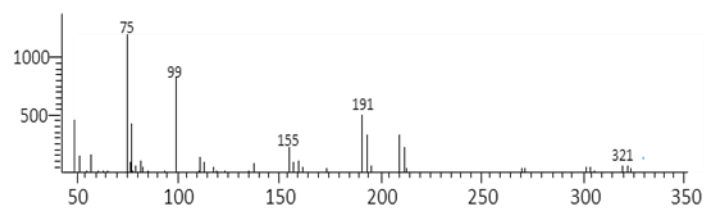
Library hit: mono(2-etilhexil) éster del ácido bencen-1,2-dicarboxílico. Similitud: 904



Compuesto relacionado con 1-propanol-2,3-diclorofosfato

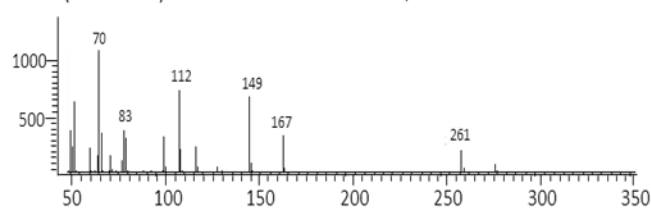


Library hit: 1-propanol-2,3-diclorofosfato. Similitud: 884

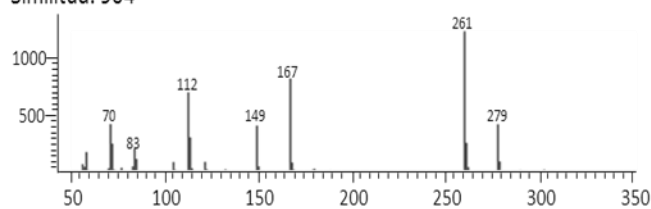


m/z

mono(2-etilhexil) éster del ácido benceno-1,3-dicarboxílico

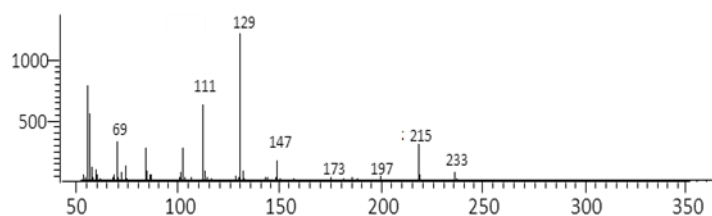


Library hit: mono(2-etilhexil) éster del ácido bencen-1,3-dicarboxílico. Similitud: 904

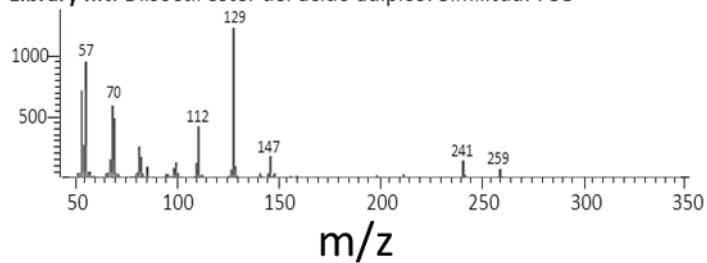


m/z

Compuesto relacionado con Diisooctil éster del ácido adípico



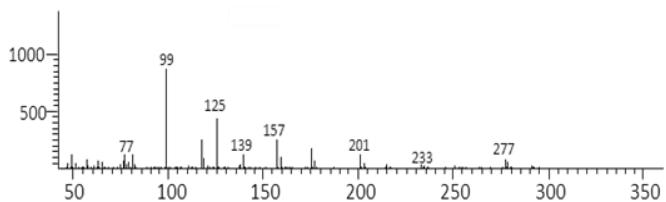
Library hit: Diisooctil éster del ácido adípico. Similitud: 738



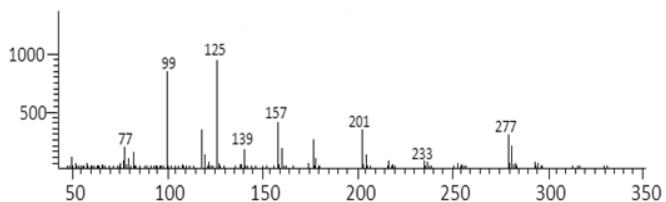
*El término N/A utilizado en la similitud de los espectros de ionización de masas para algunos compuestos, quiere decir que se identificó la relación al comparar los espectros individualmente y no con la información proporcionada por el equipo analizador de masas.

Espectros de masas de los compuestos detectados en la tabla 8

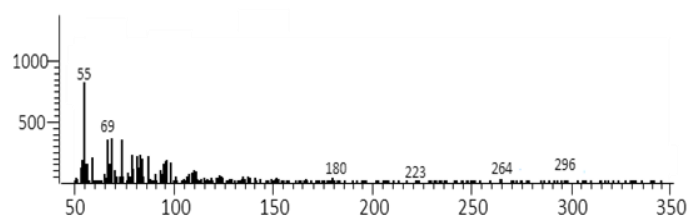
2-propanol-1-clorofosfato



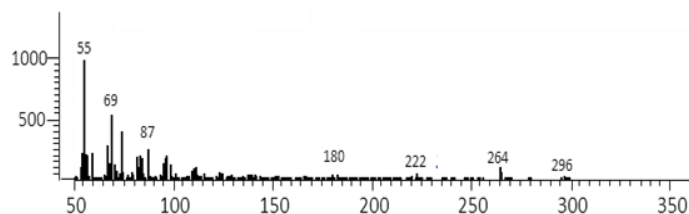
Library hit: 2-propanol-1-clorofosfato. Similitud: 954



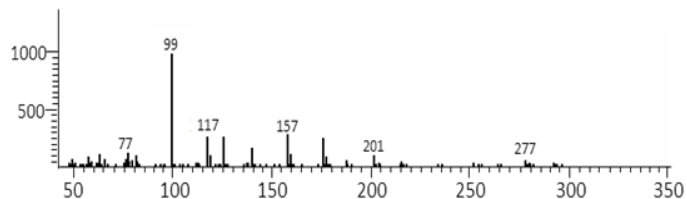
Metil éster del ácido 11-Octadecenoico



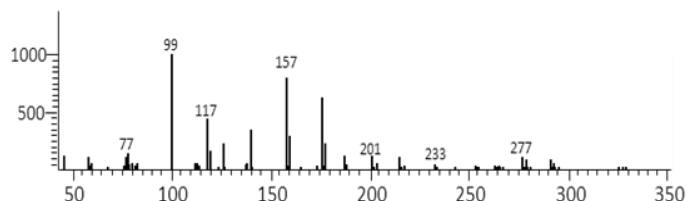
Library hit: Metil éster del ácido 11-Octadecenoico. Similitud: 939



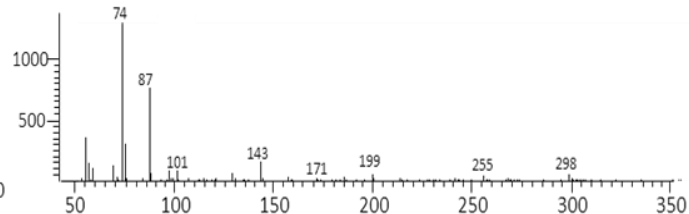
Tris(3-cloropropil) fosfato



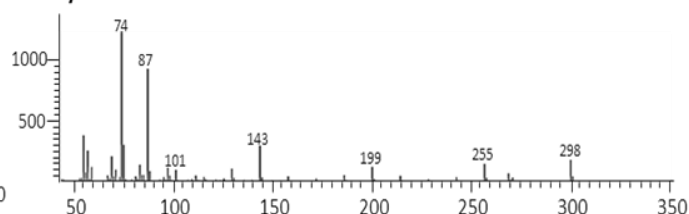
Library hit: Tris(3-cloropropil) fosfato. Similitud: 826



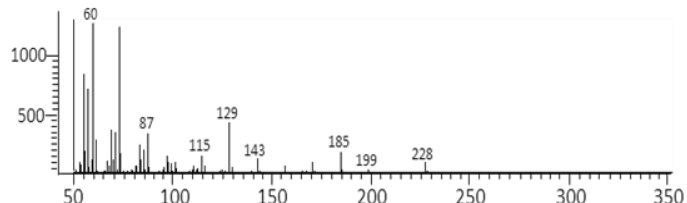
Octadecanoato de metilo



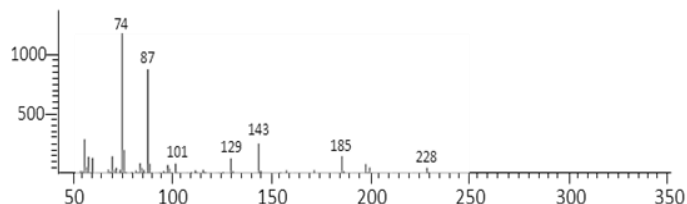
Library hit: Octadecanoato de metilo. Similitud: 946



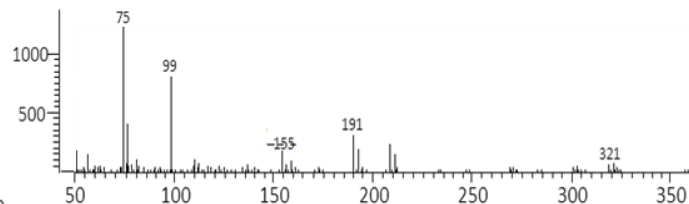
Compuesto relacionado con Tridecanoato de metilo



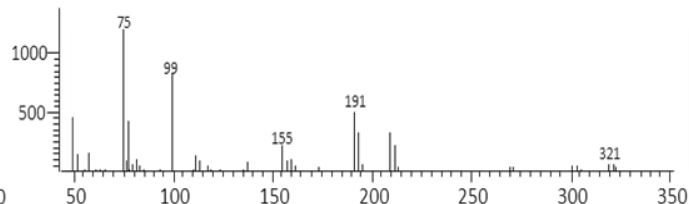
Library hit: Tridecanoato de metilo Similitud: 792



1-propanol-2,3-diclorofosfato



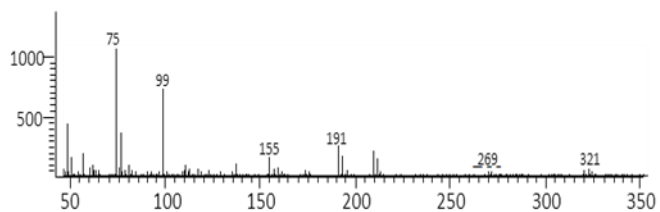
Library hit: 1-propanol-2,3-diclorofosfato. Similitud: 951



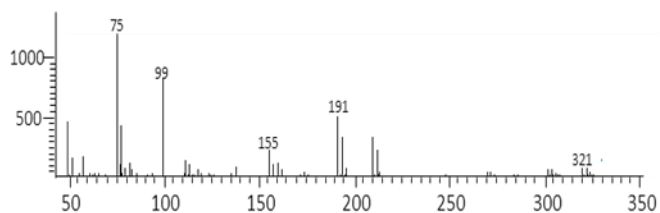
m/z

m/z

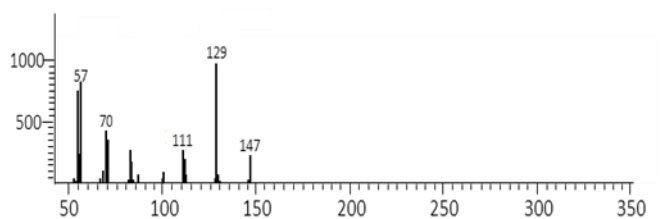
Compuesto relacionado con 1-propanol-2,3-diclorofosfato



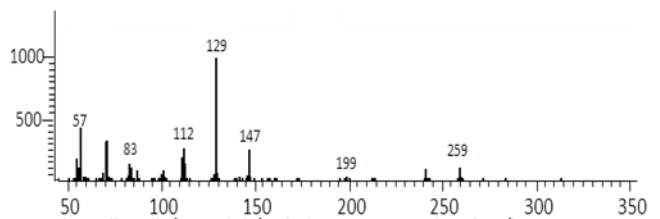
Library hit: 1-propanol-2,3-diclorofosfato. Similitud: 884



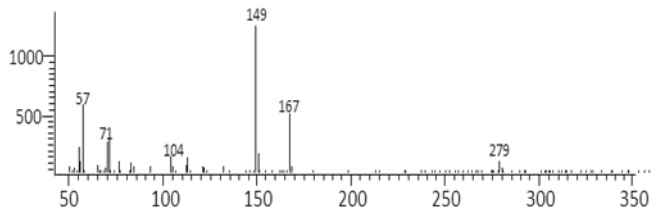
Compuesto relacionado con Adipato de bis(2-etilhexilo)



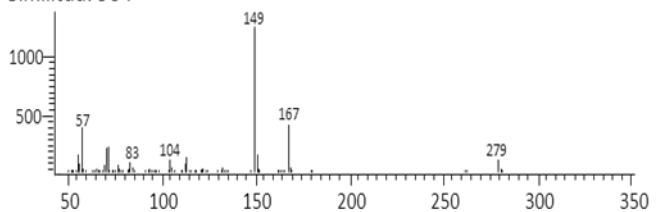
Library hit: Adipato de bis(2-etilhexilo). Similitud: 897



mono(2-etilhexil) éster del ácido benceno-1,2-dicarboxílico



Library hit: mono(2-etilhexil) éster del ácido bencen-1,2-dicarboxílico. Similitud: 904



m/z

10. Referencias

- Adams GO, Fufeyin PT, Okoro SE, Ehinome I. 2015. Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: a review. *Int J Environl Bioremed & Biodegrad.* 3: 28-39.
- Álvarez-Barragán J. 2013. Aislamiento e identificación de hongos capaces de degradar poliuretano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Álvarez-Barragán J, Domínguez-Malfavón L, Vargas-Suárez M, González-Hernández R, Aguilar-Osorio G, Loza-Tavera H. 2016. Biodegradative Activities of Selected Environmental Fungi on a Polyester Polyurethane Varnish and Polyether Polyurethane Foams. *Appl Environ Microbio.* 82: 5225-5235.
- Amaral JS, Sepúlveda M, Cateto CA, Fernandes IP, Rodrigues AE, Belgacem MN, Barreiro MF. 2012. Fungal degradation of lignin-based rigid polyurethane foams. *Pol Degrad Stab.* 97:2069-2076.
- Amore A, Giacobbe S, Faraco V. 2013. Regulation of cellulose and hemicellulose gene expression in fungi. *Curr Genom.* 14:230-249
- Anastasi A1, Spina F, Romagnolo A, Tigini V, Prigione V, Varese GC. 2012. Integrated fungal biomass and activated sludge treatment for textile wastewaters bioremediation. *Bioresour Technol.* 123:106-111.
- Anitha TS, Palanivelu P. 2013. Purification an characterization of an extracellular keratinolytic protease from a new isolate of *Aspergillus parasiticus*. *Prot Expr Purif.* 88:214-220.
- Ao J, Aldabbous M, Notaro MJ, Lojacono M, Free SJ. 2016. A proteomic and genetic analysis of the *Neurospora crassa* conidia cell wall proteins identifies two glycosyl hydrolases involved in cell wall remodeling. *Fungal Genet Biol.* 94:47-53.
- Baker P, Futamata H, Harayama S, Watanabe K. 2001. Bacterial populations occurring in a trichloroethylene-contaminated aquifer during methane injection. *Environ Microbiol.* 3:187-193.
- Barratt SR, Ennos AR, Greenhalgh M, Robson GD, Handley PS. 2003. Fungi are the predominant micro-organisms responsible for degradation of soil-buried polyester

- polyurethane over a range of soil water holding capacities. *J App Microbiol.* 95:78-85.
- Barros BH, da Silva SH, dos Reis Marques Edos R, Rosa JC, Yatsuda AP, Roberts DW, Braga GU. 2010. A proteomic approach to identifying proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Metarhizium acridum*. *Fungal Biol.* 114:572-579.
- Baur X, Marek W, Ammon J Czuppon AB, Marczynski P, Raulf-Heimsoth M, Roemmelt H, Fruhmann G (1994) Respiratory and others hazards of isocyanates. *Int Arch Occup Environ Health.* 66:141-152
- Bollag JM, Leonowicza A. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl Environ Microbiol.* 48:849-854.
- Boubendir A. 1993. Purification and biochemical evaluation of polyurethane degrading enzymes of fungal origin. *Diss Abstr Int.* 53:4632.
- Bourbonnais R, Paice MG. 1990. Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation. *FEBS.* 267:99-102.
- Boutin M, Lesage J, Ostiguy C, Pauluhn J, Bertrand MJ (2004) Identification of the isocyanates generated during the thermal degradation of a polyurethane car paint. *J Anal Appl Pyrolysis.* 71:791-802.
- Cangemi JM, Claro-Nieto S, Chierice GO. 2006. Study of the degradation of a polymer derived from castor oil by scanning electron microscopy, thermogravimetry and infrared spectroscopy. *Ciênc e Tecnol.* 16:129-135.
- Chao HJ, Chen YF, Fang T, Xu Y, Huang WE, Zhou NY. 2015. HipH Catalyzes the Hydroxylation of 4-Hydroxyisophthalate to Protocatechuate in 2,4-Xylenol Catabolism by *Pseudomonas putida* NCIMB 9866. *Appl Environ Microbiol.* 82:724-731.
- Conde-Ortiz MP (2012) Presente y futuro de la industria del plástico en México. <http://www.ptq.pemex.gob.mx/productosyservicios/eventosdescargas/Documents/Fo ro%20PEMEX%20Petroqu%C3%ADmica/2012/03%20Mercado%20plásticos%202012.pdf>

- Crabbe JR, Campbell JR, Thompson L, Walz SL, Schultz WW. 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *Int Biodeterior Biodegrad.* 33:103-113.
- Cregut M, Bedas M, Durand MJ, Thouand G. 2013. New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotechnol Adv.* 31:1634-1647.
- Corton E, Viale A. 2006. Solucionando grandes problemas ambientales con la ayuda de pequeños amigos: las técnicas de biorremediación. *Ecosistemas.* 2006/3 147-156 <http://www.revistaecosistemas.net>. Consultado 4/05/2016.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Robson GD, Handley PS. 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *App Environ Microbiol.* 73:5817-5824.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Handley PS, Robson GD. 2010. Effect of biostimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. *App Environ Microbiol.* 76:810-819.
- Da Silva Coelho-Moreira, Bracht A, Da Silva de Souza AC, Ferreira-Oliveira R, Babeto de Sá-Nakanishi A, Marques de Souza CG, Marina-Peralta R. 2013. Degradation of Diuron by *Phanerochaete chrysosporium*: Role of Ligninolytic Enzymes and Cytochrome P450. *Biomed Res Int.* 2013: 251354.
- Darby RT, Kaplan AM. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *App Environ Microbiol.* 16:900-905.
- De Oliveira-Costa B, Nahas E. 2012. Growth and enzymatic responses of phytopathogenic fungi to glucose in culture media and soil. *Braz. J. Microbiol.* 43:332-340.
- Díaz P, Prim N, Pastor F. 1999. Direct fluorescent-based lipase activity assay. *Biotech.* 27:696-698.
- Dixon NE, Riddles PW, Gazzola C, Blakeley RL, Zerner B. 1980. Jack bean urease (EC 3.5.1.5). V. On the mechanism of action of urease on urea, formamide, acetamide, N-methylurea, and related compounds. *Can J Biochem.* 58:1335-1334.

- Filip Z. 1979. Polyurethane as the sole nutrient source for *Aspergillus niger* and *Cladosporium herbarum*. *Europ J Appl Microbiol Biotechnol.* 15:20-24
- Gautam R, Bassi AS, Yanful EK. 2007. A Review of biodegradation of synthetic plastic and foams. *Appl Biochem Biotechnol.* 141:85-108.
- Giorni P, Magan N, Battilani P. 2009. Environmental factors modify carbon nutritional patterns and niche overlap between *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* strains from maize. *J. Food. Microbiol.* 130:213-218.
- Hincapié-Llanos GA, Ramírez-Cardona ME. 2009. Evaluación de la biodegradación aerobia de poliuretano residual generado en la industria de fabricación de refrigeradores. *Rev Invest Apl.* 5:15-25.
- Howard GT, Blake RC. 1998. Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. *Int Biodeterior Biodeg.* 42:213-220.
- Howard GT, Ruiz C, Hilliard NP. 1999. Growth of *Pseudomonas chlororaphison* a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-esterase enzyme. *Int Biodeterior Biodeg.* 43:7-12
- Howard GT. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeterior Biodegrad.* 40:245-252.
- Howard GT, Norton WN, Burks T. 2012. Growth of *Acinetobacter gernerii* P7 on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase enzyme. *Biodegradation.* 23:561-573.
- Ibrahim IN, Maraqa A, Hameed KM, Saadoun IM, Maswadeh HM. 2011. Assessment of potential plastic-degrading fungi in Jordanian habitats. *Turk J Biol.* 35:551-557.
- Jiao L, Xiao H, Wang Q, Sun J. 2013. Thermal degradation characteristics of rigid polyurethane foam and the volatile products analysis with TG-FTIR-MS. 98:2687-2696.
- Kannisery RG, Sims GK. 2011. Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. *App Environ Soil Sci.* doi.10.1155/2011/843450

- Kay MJ, McAbe RW, Morton LGH. 1993. Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *Int Biodet Biodeg.* 31:209-225.
- Korošec B, Sova M, Turk S, Kraševc N, Novak M, Lah L, Podobnik B, Berne S, Zupanec N, Bunc M, Gobec S, Komel R. 2013. Antifungal activity of cinnamic acid derivatives involves inhibition of benzoate 4-hydroxylase (CYP53). *J App Microbiol.* 116: 955-966.
- Krasowska K, Janik H, Gradys A, Rutkowska A. 2011. Degradation of polyurethanes in Compost under natural conditions. *J Appl Polym Sci.* 125: 4252-4260.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS.*169:247-250.
- Li J, Giesy JP, Yu L, Li G, Liu C. 2015. Effects of Tris(1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) in *Tetrahymena thermophila*: targeting the ribosome. *Sci Rep* 5:10562. <http://dx.doi.org/10.1038/srep10562>.
- Loh XJ, Colin-Sng KB, Li J. Synthesis and water-swelling of thermo-responsive poly(ester urethane)s containing poly(ϵ -caprolactone) and poly(propylene glycol). *Biomaterials.* 29:3185-3194.
- Lopreore C, Byers LD. 1998. The urease-catalyzed hydrolysis of thiourea and thioacetamide. *Arch Biochem Biophys.* 349:299-303.
- Loredo-Treviño A, García G, Velasco-Téllez A, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. 2011. Polyurethane foam as substrate for fungal strains. *Adv Biosc Technol.* 2:52-58.
- Margesin R, Schinner F. 2001. Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an alpine glacier skiing area. *Appl Environ Microbiol.* 67:3127-33
- Mathur G, Prasad R. 2012. Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 167:1595-1602.
- Matsumiya Y, Murata N, Tanabe E, Kubota K, Kubo M. 2009. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and

- analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. J App Microbiol. 108: 1946-1953.
- McCarthy SJ, Meis GF, Mitchell N, Gunatillake PA, Heath G, Brandwood A, Schinheim K (1997) *In-vivo* degradation of polyurethanes: transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethanes sectioned by cryomicrotomy. Biomaterials.18:1387-1409.
- Montgomery HJ, Monreal CM, Young JC, Seifert KA. 2000. Determination of soil fungal biomass from soil ergosterol analyses. Soil Biol Biochem. 1207-1217.
- Nakajima-Kambe T, Onuma F, Kimpara N, Nakahara T. 1995. Isolation and characterization of a bacterium which utilizes polyester polyurethane as a sole carbon and nitrogen source. FEMS. 129:39-42.***
- New AM, Cerulus B, Govers SK, Perez-Samper G, Zhu B, Boogman S, Xavier JB, Verstrepen KJ. 2014. Different Levels of Catabolite Repression Optimize Growth in Stable and Variable Environments. PLoS Biol. doi:10.1371/journal.pbio.1001764
- Oceguera-Cervantes A. 2005. Aislamiento de bacterias capaces de crecer en un medio con poliuretano (Hydroform) como única fuente de carbono y caracterización de las actividades enzimáticas relacionadas con su degradación. Tesis de licenciatura. Facultad de Química, UNAM.
- Oceguera-Cervantes A, Carrillo-García A, López N, Bolaños NS, Cruz-Gómez MJ, Wachter C, Loza-Tavera H. 2007. Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp. strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. Appl Environ Microbiol. 73:6214-6223.
- Owen S, Otani T, Masaoka S, Ohe T. 1996. The biodegradation of low-molecular-weight urethane compounds by a strain of *Exophiala jeanselmei*. Biosci Biotechnol Biochem. 60:244-248.
- Pathirana RA, Seal KJ. 1983. Gliocadium roseum (Bainier), a potential biodeteriogen of polyester polyurethane elastomers. Biodeter. 5:679-689.

- PlasticsEurope, 2015. -The Facts 2015- an analysis of European plastics production, demand and waste data. Ave E. van Nieuwenhuysse 4/3, Bruxelles, Belgium: Association of plastics manufacturers.
- Peng YH, Shih YH, Lai YC, Liu YZ, Liu YT, Lin NC. 2014. Degradation of polyurethane by bacterium isolated from soil and assessment of polyurethanolytic activity of a *Pseudomonas putida* strain. *Environ Sci Pollut Res Int.* 21(16):9529-9537.
- Qiu J, Su Y, Gelbič I, Qiu Y, Xie X, Guan X. 2012. Proteomic analysis of proteins differentially expressed in conidia and mycelium of the entomopathogenic fungus *Aschersonia placenta*. *Can. J. Microbiol.* 58: 1327–1334.
- Rowe L, Howard GT. 2002. Growth of *Bacillus subtilis* on polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-lipase enzyme. *Int Biodeterior Biodeg.* 50:33-40.
- Ruiz C, Main T, Hilliard N, Howard GT. 1998. Purification and characterization of two polyurethane enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. *Biodeter Biodegrad.* 43:43-47.
- Russell JR, Huang J, Anand P, Kucera J, Sandoval AG, Dantzler KW, Hickman D, Jee J, Kimovec FM, Koppstein D, Marks DH, Mittermiller PA, Nuñez SJ, Santiago M, Townes MA, Vishnevetsky M, Williams NE, Nuñez-Vargas PA, Boulanger LA, Bascom-Slack C, Strobel SA. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ Microbiol.* 77:6076-6084.
- Rüttimann-Johnson C, Cullen D, Lamar RT. 1994. Manganese peroxidases of the white rot fungus *Phanerochaete sordida*. *Appl Environ Microbiol.* 60: 599-605.
- Sekula B, Ruszkowski M, Malinska M, Dauter Z. Structural Investigations of N-carbamoylputrescine Amidohydrolase from *Medicago truncatula*: Insights into the Ultimate Step of Putrescine Biosynthesis in Plants. *Front Plant Sci.* 7:350. doi: 10.3389/fpls.2016.00350.
- Shah Z, Krumholz L, Aktas DF, Hasan F, Khattak M, Shah AA. 2013. Degradation of polyester polyurethane by a newly isolated soil bacterium, *Bacillus subtilis* strain MZA-75. *Biodegradation.* 24(6):865-877.

- Shapir N, Sadowsky MJ, Wackett LP. 2005. Purification and characterization of allophanate hydrolase (AtzF) from *Pseudomonas* sp. strain ADP. *J Bacteriol.* 187(11):3731-3738.
- Shibasaki S, Kawabata A, Tanino T, Kondo A, Ueda M, Tanaka M. 2009. Evaluation of the biodegradability of polyurethane and its derivatives by using lipase-displaying arming yeast. *Biocontrol Sci.* 14(4): 171-175.
- Silva EM, Martins SF, Milagres AMF. 2008. Extraction of manganese peroxidase produced by *Lentinula edodes*. *Biores Technol.* 99:2471-2475.
- Skamnioti P, Henderson C, Zhang Z, Robinson Z, Gurr SJ. 2007. A novel role for catalase B in the maintenance of fungal cell-wall integrity during host invasion in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant Microbe Interact.* 20 (5): 568-580.
- Solís-González CJ (2008) Caracterización del crecimiento de *Alicyclophilus* sp. BQ5 en poliuretano. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Solís-González CJ. 2011. Identificación y clonación de algunos de los genes de *Alicyclophilus* sp. Relacionados con su capacidad para utilizar poliuretano como única fuente de carbono. Tesis de maestría. Facultad de Química, UNAM.
- Sugui JA, Kim HS, Zarembek KA, Chang YC, Galin JI, Nierman WC, Know-Chong KJ. 2008. Genes Differentially Expressed in Conidia and Hyphae of *Aspergillus fumigatus* upon Exposure to Human Neutrophils. *PLoS ONE* 3(7): e2655. doi:10.1371/journal.pone.0002655.
- Tien M, Kirk TK. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Method Enzymol.* 161:238–248.
- Torres-Rodríguez JM, Alvarado-Ramírez E, Gutiérrez-Gallegos R. 2008. Diferencias en la actividad de la enzima ureasa entre *Cryptococcus neoformans* y *Cryptococcus gatti*. *Rev Iberoam Micol.* 25:27-31.
- Walter HE. Proteinases: methods with hemoglobin, casein and azocoll as substrates. *Meth of Enzym Anal.* V: 270-277.
- Wang S, Chen H, Zhang L. 2013. Thermal decomposition kinetics of rigid polyurethane foam and ignition risk a hot particle. *J Appl polym sci.* DOI: 10.1002/app.39359.

- Zafar U, Houlden A, Robson GD. 2013. Fungal communities associated with the biodegradation of polyester polyurethane buried under compost at different temperatures. *App Environ Microbiol.* 79:7313-7324.
- Zafar U, Nzeram P, Langarica-Fuentes A, Houlden A, Heyworth A, Saiani A, Robson GD. 2014. Biodegradation of polyester polyurethane during commercial composting and analysis of associated fungal communities. *Biores Technol.* 158:374-377.
- Zhang Z, Qin G, Li B, Tian S. 2015. Effect of cinnamic acid for controlling gray mold on table grape and its possible mechanisms of action. *Curr Microbiol.* 71(3): 396-402.