



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

ANÁLISIS DE LA DEGRADACIÓN
DE ESPUMAS DE POLIÉTER-POLIURETANO
(PE-PU) POR HONGOS FILAMENTOSOS

TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA DE ALIMENTOS

PRESENTA
ANA LILIA QUINTANA LUNA



MÉXICO, CD.MX.

AÑO 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE: AGUILAR OSORIO JOSÉ GUILLERMO DE JESÚS

VOCAL: CAMACHO DE LA ROSA NORMA ANGÉLICA

SECRETARIO: DOMÍNGUEZ VALDÉZ VERÓNICA

1er. SUPLENTE: MONTIEL PACHECO CARMINA

2° SUPLENTE: JIMÉNEZ REYES GENARO

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA

Grupo de Fisiología de Hongos Filamentosos del Departamento de Alimentos y Biotecnología. Conjunto E, Laboratorio 312. Facultad de Química. UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dr. Guillermo Aguilar Osorio _____

SUSTENTANTE:

Ana Lilia Quintana Luna _____

La presente investigación fue realizada con recursos del Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) de la UNAM. Proyecto: *“Identificación y caracterización de bacterias y hongos capaces de degradar poliuretano y su solvente n-metil pirrolidona e identificación de algunos genes y proteínas involucrados con estas capacidades.”*

Clave IN217114.

AGRADECIMIENTOS

A mis papás, Higinio Quintana y Galdina Luna, por su apoyo incondicional a lo largo de mi estancia en la Universidad, por la confianza en mí depositada y por brindarme fortaleza en los momentos difíciles.

A mis hermanos, Edgar, Ange, Chayo, Alex y Quique por hacerme saber que cuento con ustedes, porque la vida en casa es más amena con su presencia y por brindarme hermosos momentos de relajación cuando platicamos.

A mi esposo, Mayolo Pérez, por su apoyo incondicional para la culminación de mis estudios, por impulsar mi desarrollo profesional y personal cada día y por la comprensión y paciencia que me otorgó en la elaboración de este trabajo, te amo mamor.

De manera especial y expedita a mi asesor el Dr. Guillermo Aguilar Osorio por la confianza en mí depositada, por todos los consejos y apoyo brindados y por las palabras de aliento y sabiduría que compartió conmigo.

A mi tía Lucy por abrirme las puertas de su casa durante toda mi estancia en la Universidad, por sus consejos y por siempre alentarme a seguir adelante, a mi sobrino David y mis primos Connie y Rafita por hacerme sentir parte de su familia.

A mis compañeros de laboratorio Clara, Cristian, Sergio, Angy, Karliux, Michelle y Karlita por hacer más ameno el trabajo en el laboratorio y haberme compartido siempre su amistad, compañía y conocimientos.

Dedico este trabajo a mis hijos Diego y Gael porque fortalecen cada día de mi vida y me recuerdan lo bello que es vivirla.

CONTENIDO

ABREVIATURAS	vii
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS	viii
1. RESUMEN	1
2. INTRODUCCIÓN	2
3. ANTECEDENTES	3
3.1 Poliuretano (PU)	3
3.2 Espumas de poliuretano	5
3.3 Poliuretano en el ambiente	7
3.4 Tratamientos de los residuos de poliuretano	8
3.5 Degradación de PU con microorganismos	9
3.6 Mecanismos de degradación del poliuretano	10
3.7 Enzimas involucradas en la degradación del poliuretano	12
3.8 Bioestimulación	14
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	17
5. HIPÓTESIS	17
6. JUSTIFICACIÓN	18
7. OBJETIVOS	18
7.1 Objetivo general	18
7.2 Objetivos particulares	18
8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	19
9. MATERIALES Y MÉTODOS	20
9.1 Microorganismos	20
9.1.1 Inóculo de las fermentaciones	20
9.2 Formulación y preparación de medios base para el crecimiento de cepas	21
9.3 Cuantificación de la pérdida de masa de las espumas de PE-PU	22
9.3.1 Característica físicas y químicas de la espuma empleada	22
9.3.2 Lavado de las espumas	22
9.3.3 Tratamiento de las espumas en etanol	23

9.4 Determinación de actividades enzimáticas	23
9.4.1 Filtrado del líquido de fermentación	23
9.4.2 Extracción de proteínas a partir de la biomasa crecida sobre las espumas	24
9.4.3 Determinación de actividad de xilanasas	24
9.4.4 Determinación de actividad de amilasas	25
9.4.5 Determinación de actividad de feruloilsterasas	25
9.4.6 Determinación de actividad de proteasas	26
9.4.7 Determinación de actividad de esterasas	26
9.5 Determinación de azúcares reductores	27
10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
10.1 Reactivación de cepas de hongos degradadores de poliuretano	28
10.2 Primera etapa. Formulación de un medio base para el crecimiento de las cepas en estudio	29
10.2.1 Medios con 10% salvado de trigo y 1.0% glucosa	29
10.2.2 Prueba de degradación con el filtrado libre de células	33
10.2.3 Prueba de degradación con 2% de salvado de trigo	34
10.2.4 Prueba de degradación en medios líquidos	35
10.2.5 Prueba de degradación a diferentes tiempos de fermentación	38
10.2.6 Prueba de lavado del control con etanol	39
10.2.7 Prueba de degradación con 0.3% glucosa	40
10.2.8 Determinación de actividades enzimáticas primera etapa	43
10.3 Segunda etapa. Formulación de un medio con bioestimulantes para favorecer el crecimiento de los hongos y la degradación de ePE-PU	45
10.3.1 Prueba de bioestimulación con uretano y urea	46
10.3.2 Prueba con diferentes porcentajes de uretano	54
10.3.3 Determinación de actividades enzimáticas segunda etapa	56
11. CONCLUSIONES	59
12. PERSPECTIVAS	60
13. ANEXOS	61
14. REFERENCIAS	65

ABREVIATURAS

CFC	Clorofluorocarbono
CFCs	Clorofluorocarbonos
ePE-PU	Espumas de Poliéter-Poliuretano
FTIR	Espectroscopía de Infrarrojo por Transformada de Fourier
MC	Medio completo
mo	Microorganismo
PDAc	Agar Papa Dextrosa comercial
PDAp	Agar Papa Dextrosa preparado en el laboratorio
PE-PU	Poliéter-poliuretano
PS-PU	Poliéster-poliuretano
PU	Poliuretano
PUs	Poliuretanos
rpm	Revoluciones por minuto
SST80	Solución salina-Tween 80
Tween 80	Polisorbato
EF	Etilferulato

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

	Pág.	
Figura 1	Síntesis del poliuretano	3
Figura 2	Clasificación del poliuretano dependiendo del polirol utilizado en su síntesis	3
Figura 3	Algunas aplicaciones del poliuretano	5
Figura 4	Formación de una espuma de poliuretano	6
Figura 5	Tipos de celda en las espumas de poliuretano	6
Figura 6a	Posible vía de degradación del etilcarbamato y difenilmetano-4,4'-dibutilurea	12
Figura 6b	Posibles mecanismos de hidrólisis propuestos para la ruptura del grupo uretano por las diferentes enzimas hidrolíticas: esterasa, proteasa y amidasa	13
Figura 7	Estrategia experimental	19
Figura 8	Vista de los medios base preparados en matraces Erlenmeyer	21
Figura 9	Proceso de lavado de las espumas después de la fermentación	23
Figura 10	Porcentajes de degradación de ePE-PU con las cepas 1 a 7 al final de la fermentación semisólida (8 días a 31°C) con 10.0% salvado de trigo	31
Figura 11	Porcentajes de degradación de ePE-PU con las cepas 4, 6 y 7 al final de la fermentación semisólida (8 días a 31°C) con 2.0% salvado de trigo y 1.0% glucosa en reposo (medio s2g1r)	34
Figura 12	Porcentajes de degradación de ePE-PU con las cepas 1 a 8 al final de la fermentación líquida	37
Figura 13	Porcentaje de degradación de ePE-PU sometidas a fermentación 8 días a 31°C con 2.0% salvado de trigo y 0.3% glucosa a 100 rpm (a) y en reposo (r)	40
Figura 14	Imágenes de los ensayos realizados para determinar actividades enzimáticas primera etapa.	44
Figura 15	Crecimiento de la cepa A3.I.1 en cajas petri con diferentes medios sólidos	46
Figura 16	Azúcares reductores en el líquido de fermentación con A3.I.1 en medios con urea y uretano.	52
Figura 17	pH en el líquido de fermentación con A3.I.1 en medios con urea y uretano	53
Figura 18	Imágenes de los ensayos realizados para determinar actividades enzimáticas segunda etapa	57

	Pág.	
Tabla 1	Ejemplos de materias primas para la síntesis de poliuretano	4
Tabla 2	Hongos con la capacidad de degradar PU y las posibles actividades involucradas	13 20
Tabla 3	Cepas de hongos seleccionadas por su capacidad de crecer en PU como única fuente de carbono y la identificación de especie.	22
Tabla 4	Características de la espuma de PE-PU utilizada en los ensayos	28
Tabla 5	Crecimiento observado en las cepas de estudio durante 6 días incubándose a 31°C en PDAc y MC por estría y extensión masiva de cepas crecidas en PDAp	30
Tabla 6	Registro fotográfico del crecimiento de cepas de hongos degradadores de espumas de PU a los 8 días de fermentación a 31°C en los medios cs10 y ds10 con 10.0% salvado de trigo	32
Tabla 7	pH y actividades amilasa, xilanasas y feruloilsterasa del líquido al final de la fermentación semisólida (8 días a 31°C) con 10.0% salvado de trigo	33
Tabla 8	pH final del líquido de fermentación y porcentaje de degradación de ePE-PU con filtrados enzimáticos libres de células obtenidos de la fermentación con el medio cs10	35
Tabla 9	pH del líquido al final de la fermentación semisólida (8 días a 31°C) en el medio s2g1r	36
Tabla 10	Registro fotográfico del crecimiento de cepas de hongos degradadores de espumas de PE-PU a los 8 días de fermentación a 31°C en Polylack® al 0.3% en reposo (PLr), Impranil® al 1.0% en reposo (Imr) e Impranil® al 1.0% en agitación (Ima)	36
Tabla 11	pH del líquido y porcentajes de degradación de ePE-PU al final de la fermentación sólida (8, 16 y 24 días a 31°C) con 2.0% salvado de trigo y 0.3% glucosa (medio s2g0.3a)	38
Tabla 12	Porcentaje de degradación de ePE-PU control sin inocular e inoculadas con la cepa 4 lavandolas con etanol al 70%, NaClO al 1.61% o agua destilada	39
Tabla 13	pH final del líquido de fermentación y porcentaje de degradación de ePE-PU sometidas a fermentación (8 días a 31°C) en el medio s2g0.3r	41
Tabla 14	Actividades amilasa, xilanasas, feruloilsterasa, esterasa y proteasa del líquido de la fermentación líquida en el medio Ima y la semisólida en el medio s2g0.3r	43
Tabla 15	Porcentaje de degradación de ePE-PU a los 21 días de	

	fermentación a 31°C con A3.I.1 y en un control sin inocular en medios con uretano y urea	48
Tabla 16	Registro fotográfico del crecimiento de la cepa A3.I.1 1 a los 21 días de fermentación a 31°C en medios con uretano y urea así como el el tratamiento posterior a las ePE-PU	50
Tabla 17	Porcentaje de degradación de ePE-PU a los 21 días de fermentación a 31°C con A3.I.1 en el medio PUSG con diferentes porcentajes de uretano	54
Tabla 18	Registro fotográfico del crecimiento de la cepa A3.I.1 y el aspecto de las ePE-PU a los 21 días de fermentación a 31°C en el medio PUSG con diferentes porcentajes de uretano	55
Tabla 19	Actividades amilasa, xilanasas, feruloilesterasa, esterasa y proteasa en el líquido de los medios con uretano a los 7, 14 y 21 días de fermentación con A3.I.1	56
Tabla 20	Actividades amilasa, xilanasas, feruloilesterasa, esterasa y proteasa en el líquido de fermentación (LF) y en el extracto proteico de la biomasa (EXT) a los 7, 14 y 21 días de fermentación en el medio PUSG con diferentes porcentajes de uretano	58

1. RESUMEN

En el presente trabajo se utilizaron ocho cepas de hongos filamentosos de cuatro especies distintas (*Cladosporium cladosporioides*, *Dichotomomyces cejpii*, *Cladosporium uredinicola* y *Fusarium* sp.) aisladas a partir de muestras de tierra, aire y/o espumas en descomposición provenientes del Basurero de Bordo Poniente de la Ciudad de México y seleccionadas por su capacidad para crecer utilizando un barniz de poliuretano soluble en agua como única fuente de carbono. El proyecto tiene como objetivo evaluar la capacidad de estas cepas para crecer en espumas de poliéter-poliuretano e identificar las enzimas producidas durante su degradación.

La primera etapa del proyecto se centró en formular un medio base para el crecimiento de las cepas y degradación de las espumas, para ello se probó un medio mineral adicionado con salvado de trigo ó lacas de poliuretano soluble (Impranil® y Polylack®) y glucosa como fuentes alternas de carbono. Se vió que agregando 2.0% de salvado de trigo y 0.3% de glucosa al medio mineral se obtenía mayor pérdida de masa en las espumas que con 10.0% de salvado y 1.0% de glucosa.

Para la segunda etapa del proyecto se utilizó un medio con 2.0% de salvado de trigo y 0.3% de glucosa y se probó cómo influía la adición de uretano y urea en el porcentaje de degradación de las espumas. Los resultados obtenidos demuestran hasta un 87.2% de pérdida de masa en espumas inoculadas con *Cladosporium cladosporioides* después de 21 días de fermentación semisólida a 31°C y 100 rpm comparado con un 16.8% de pérdida de masa en espumas no inoculadas y sometidas al mismo tratamiento. La estructura de las espumas tratadas y los controles se modifica substancialmente, se observa un colapso de la gometría estructural en las espumas inoculadas que nos e observa en el control.

Se realizaron ensayos enzimáticos para detectar cinco enzimas hidrolasas (xilanasas, amilasas, feruloilesterasas, proteasas y estererasas) en el sobrenadante de la fermentación, se obtuvo actividad de xilanasas, amilasas y feruloilesterasas a los 7, 14 y 21 días de fermentación mientras que estererasas y proteasas sólo se detectaron a los 7 días de fermentación.

2. INTRODUCCIÓN

En México se estima que la producción de poliuretanos asciende a cerca de 257,700 toneladas anuales (Conde-Ortíz, 2012). El uso más extendido de los poliuretanos se hace en forma de espumas rígidas y flexibles (D'Addario, 2012). De acuerdo a la compañía Bayer en 2012 se consumieron 15.3 millones de toneladas de PU en todo el mundo, el mercado global de espumas flexibles de PU en este mismo año fue de 5.7 millones de toneladas y 4.4 millones de toneladas para espumas rígidas. Los poliuretanos lograron sustituir a los antiguos polímeros por diversas razones, como el aumento de resistencia a la tracción y punto de fusión, su resistencia a la degradación por agua, aceites y disolventes, así como su versatilidad de aplicaciones que los hizo excelentes para la sustitución de los termoplásticos (Mathur y Prasad, 2012). Por esta durabilidad y resistencia se logró elevar su producción y por consecuencia su acumulación en el ambiente, generando así un problema de contaminación actual (Alavi-Nikje y col., 2011).

Los residuos de poliuretano se pueden reutilizar muy pocas veces y su eliminación por métodos químicos o térmicos en ocasiones puede ser poco eficiente, costosa y/o contaminante. Es por ello que se requiere trabajar en la búsqueda de alternativas viables que contribuyan a la reducción de dichos residuos. Una posible vía de minimización de los residuos de PU, ya sea antes o después de su disposición en relleno sanitario, consistiría en recurrir a la biodegradación con microorganismos ya que los productos formados durante este proceso son generalmente inocuos y la relación costo/efectividad puede ser menor comparada con otros tratamientos (Howard. 2002; Gu, 2003). En diferentes estudios se ha evidenciado que hongos y bacterias son capaces de degradar poliuretanos y sus componentes, principalmente segmentos hidrolizables como ésteres y carbamato (Darby y Kaplan, 1968; Nakajima-Kambe y col., 1995; Ocegüera-Cervantes y col., 2007; Sólis-González, 2008). La mejora de la biodegradabilidad de los materiales de PU y el entendimiento de los mecanismos que éstos emplean en la biodegradación constituye una posible estrategia para superar el problema de su acumulación en el ambiente, ya que se podrían desarrollar procesos en los que se degraden estos residuos biológicamente (Ustinov y col., 2004; Sarkar y col., 2011).

3. ANTECEDENTES

3.1 Poliuretano (PU)

Los poliuretanos están presentes en muchos aspectos de la vida moderna. Representan una clase de polímeros sintéticos que han encontrado un amplio uso en los campos médico, automotriz e industrial. Fueron investigados y producidos por el Dr. Otto Bayer en 1937 (Howard, 2002). La

palabra poliuretano es un término general usado para un polímero derivado de la condensación de poliisocianatos y polioles dando como resultado un enlace uretano (Fig. 1). El poliuretano puede adoptar varias formas dependiendo de la estructura química de los poliisocianatos y polioles empleados en su síntesis. En general al poliuretano se le clasifica en dos tipos:

poliéster o poliéter dependiendo del tipo de poliol empleado en su síntesis (Howard, 2011) (Fig. 2).

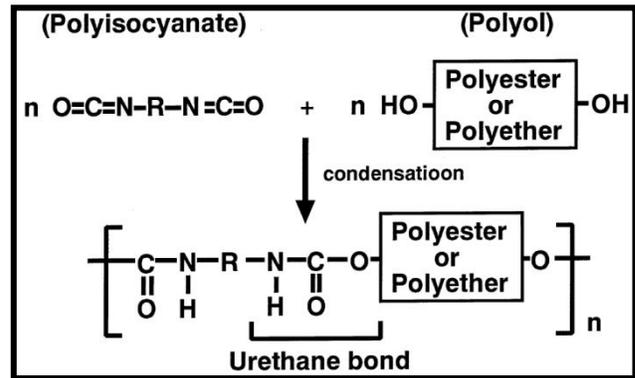


Figura 1. Síntesis del poliuretano (tomado de Nakajima-Kambe y col., 1999).

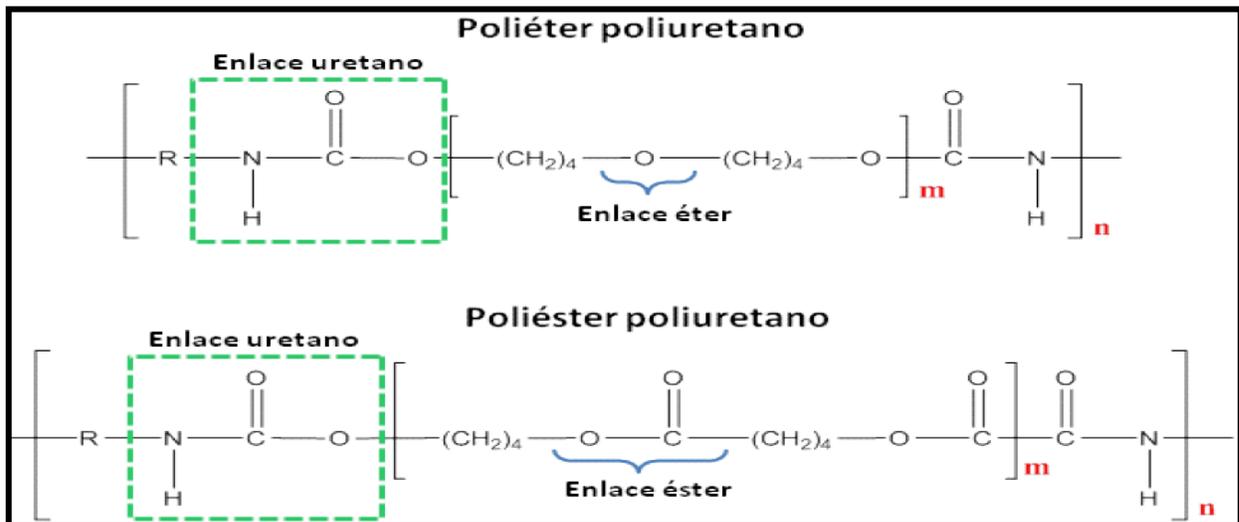


Figura 2. Clasificación del poliuretano dependiendo del poliol utilizado en su síntesis (tomado de Álvarez-Barragan, 2013).

De todos los polímeros disponibles actualmente en el mercado, los poliuretanos son el grupo más versátil, el amplio rango de compuestos precursores que pueden ser usados en su síntesis ha permitido obtener una diversidad casi inimaginable de productos tales como espumas, elastómeros, recubrimientos, selladores, fibras, películas, entre otros, cuyas propiedades y usos son específicos (Forrest, 1999) (Tabla 1) (Fig. 3). El uso más extendido de los poliuretanos se hace en forma de espumas rígidas y flexibles. Las flexibles se emplean para fabricar colchones, cojines, asientos de automóviles, etc. Las espumas rígidas de poliuretano se emplean en la fabricación de flotadores, embarcaciones, sillas, mesas, frigoríficos, entre otros. El amplio uso de las espumas de poliuretano se debe a su buena capacidad de aislamiento térmico unida a su bajísima densidad aparente y bajo costo (D´Addario, 2012).

Tabla 1. Ejemplos de materias primas para la síntesis de poliuretano (elaboración propia a partir de Nakajima-Kambe y col., 1999 y Singh, 2001).

Poliisocianatos	2,4-Diisocianato de tolueno (2,4-TDI) 2,4-TDI/2,6-TDI (mezcla 80/20) 1,3-Diisocianato de xilileno Diisocianato de hexametileno 1,5-Diisocianato de naftaleno
Poliolés Tipo poliéster	Poli(butileno adipato) Poli(etileno butileno adipato) Poli(etileno adipato) Poli(propileno adipato) Poli(etileno propileno adipato)
Tipo poliéter	Poli(oxitetrametileno) glicol Poli(oxipropileno) glicol Poli(oxipropileno)-Poli(oxietileno) glicol
Agentes de reticulación o extensores de la cadena	1,4- Butanediol Etilenglicol 1,3-Butanediol 1,2,6-Hexanotriol Glicerol 2,2-Dimetil-1,3-propanodiol
Agentes de soplado	Triclorofluorometano (CFC-11) Dióxido de carbono, Diclorometano, Agua



Figura 3. *Algunas aplicaciones del poliuretano.*

3.2 Espumas de poliuretano.

La espuma de poliuretano es un material plástico formado por una agregación de burbujas, conocido también como hule espuma, poliuretano flexible, poliuretano espumado ó esponja. La fabricación de espuma fue descubierta por Hochlen y Droste quienes observaron que al reaccionar un grupo isocianato con compuestos que contengan hidrógenos activos, por ejemplo, el agua, se obtenían aductos que contenían burbujas gaseosas debido al desprendimiento de CO_2 . La formación de la espuma depende de dos reacciones básicas: la reacción entre el isocianato con el poliol (gelación) para formar un enlace uretano y la reacción de isocianato con agua (soplado) para formar los enlaces de urea con el desprendimiento de CO_2 , que permite la formación de la espuma (Fig. 4). Las espumas de PU poseen celdas abiertas y/o cerradas dependiendo de la manera en que se distribuye el gas de soplado a través de la matriz del polímero (Fig. 5). En la celda cerrada los poros de gas son aproximadamente esféricos y completamente separados unos de otros por la matriz y en la celda abierta los poros se interconectan en cierto grado, permitiendo el paso de fluidos a través de la celda (Winding y Hiatt, 1961).

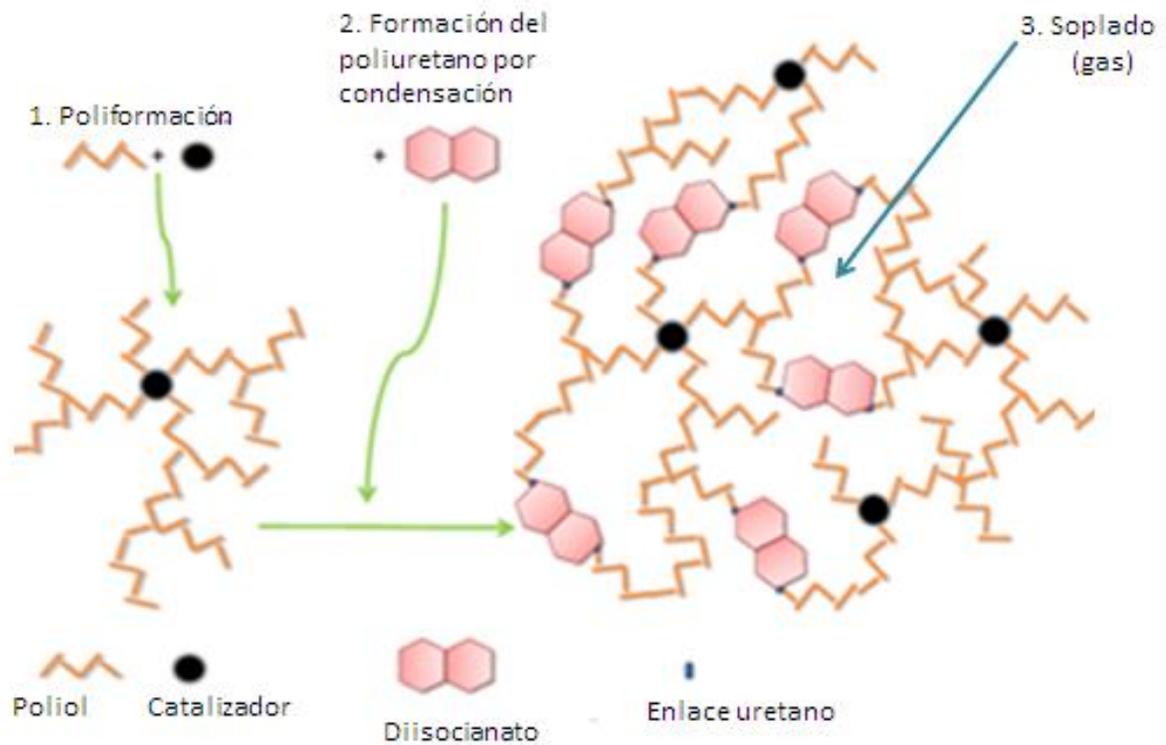


Figura 4. *Formación de una espuma de poliuretano (modificación a partir de Cregut, 2013).*

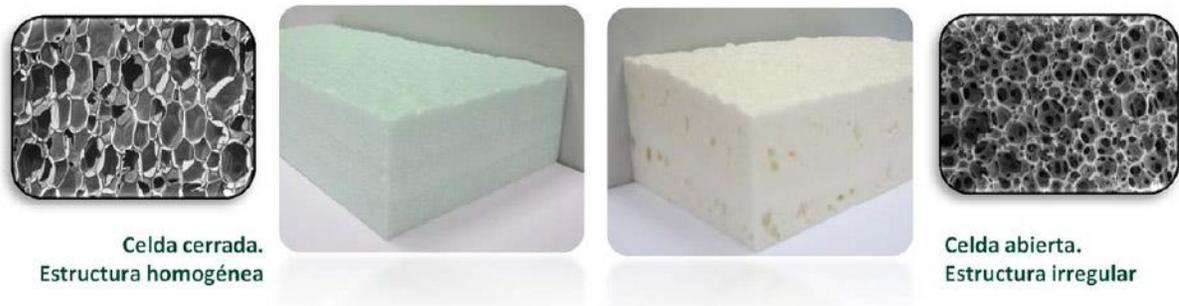


Figura 5. *Tipos de celda en las espumas de poliuretano*

(<http://aislaconpoliuretano.com/poliuretano-proyectado-diferencias-entre-celda-abierta-y-celda-cerrada.htm>)

Hasta finales de la década de los cincuenta la espuma de poliuretano se elaboraba con el dióxido de carbono liberado de la reacción del isocianato con agua. El uso del poliuretano espuma creció aceleradamente con el descubrimiento, a finales de esta misma década, de los clorofluorocarbonos (CFCs) como agentes de soplado, así comenzó a emplearse el triclorofluorocarbono (CFC-11) para la elaboración de

espumas flexibles y diclorofluorocarbono para espumas rígidas, el cloruro de metileno (CH_2Cl_2) fue introducido como agente de soplado a mitad de los setenta como respuesta a la hipótesis de la acción de los CFCs en la capa de ozono (Singh, 2001).

Las espumas de poliuretano pueden ser producidas con diversos niveles de firmeza y resiliencia. Ofrecen características que ningún otro material proporciona tales como comodidad, durabilidad, bajo peso y bajo costo (Winding y Hiatt, 1961). Las propiedades de las espumas pueden variar de acuerdo con las exigencias del mercado, pero básicamente existen espumas flexibles y rígidas estas son diferentes entre sí principalmente en su densidad y dureza. La densidad de las espumas convencionales está en el intervalo de 15 kg/m^3 a 130 kg/m^3 , la dureza es de 1.3 kPa a 13 kPa. Las espumas flexibles son el mayor mercado de poliuretanos. Estos materiales tienen alta resistencia al impacto y se utilizan para hacer muebles de amortiguación (D'Addario, 2012).

3.3 Poliuretano en el ambiente

Los PUs lograron sustituir a los antiguos polímeros por diversas razones, como el aumento de resistencia a la tracción y punto de fusión, su resistencia a la degradación por agua, aceites y disolventes, así como su versatilidad de aplicaciones que los hizo excelentes para la sustitución de los termoplásticos (Mathur y Prasad, 2012). Por esta durabilidad y resistencia se logró elevar su producción y por consecuencia su acumulación en el ambiente, generando así un problema de contaminación actual (Alavi-Nikje y col., 2011).

En Estados Unidos de Norteamérica se generan alrededor de 1.3 millones de toneladas de residuos de PU cada año (Alavi-Nikje y col., 2011). De acuerdo a la compañía Bayer Science for a better Life en su reporte "*Modern Foam Production in Harmony with Global Trends*", el consumo mundial de PU ha crecido alrededor de 5% por año a partir de los años setenta, según esta compañía en 2012 se consumieron 15.3 millones de toneladas de PU en todo el mundo, el mercado global de espumas flexibles de PU en

este mismo año fue de 5.7 millones de toneladas y 4.4 millones de toneladas para espumas rígidas.

En 2011 la compañía BASF una de las empresas de la industria química más importantes del mundo, obtuvo un total de ventas de 73.5 billones de euros de los cuales el 8% correspondió a PU, es decir, 5.88 billones de euros, según esta empresa la demanda de PU en 2011 fue de 14.2 millones de toneladas y se espera que para 2020 sea de 22.2 millones de toneladas. Por su parte Bridgestone Automotive Products de México, establecida en 2013 en Celaya, Guanajuato prevé una capacidad de producción de espumas de PU para 360,000 automóviles al año. En México se estima que la producción de poliuretanos asciende a cerca de 257,700 toneladas anuales (Conde-Ortíz, 2012). Los principales motores para que la producción de PU sea cada vez mayor pueden ser: ingresos disponibles más altos, necesidad de aumentar la eficiencia energética y mayores expectativas de confort.

3.4 Tratamiento de los residuos de poliuretano

Por lo que se menciona previamente los residuos de PU no sólo significan un problema de contaminación actual, sino que, de acuerdo a las estadísticas se espera que su producción vaya en aumento, así que es y será necesario desarrollar estrategias para el tratamiento de estos residuos a fin de reducir dicho problema ambiental.

Existen varios factores a considerar al elegir un método adecuado para el tratamiento de residuos de PU, el cual dependerá de las características propias del polímero. Las espumas de PU contienen CFC (clorofluorocarbono), que puede ser emitido como gas tóxico, haciendo riesgoso el tratamiento de sus desechos. En el procesamiento térmico se corre el riesgo de generar óxidos de nitrógeno, amoníaco, piridinas y otros residuos tóxicos derivados de compuestos nitrogenados, existe muy poca información sobre el comportamiento de los PUs en los vertederos por lo que es necesario desarrollar un mercado para el reciclaje de PU o bien un mecanismo menos riesgoso para tratar los residuos (Zevenhoven, 2003).

Una posible vía de minimización de los residuos de PU, ya sea antes o después de su disposición en relleno sanitario, consistiría en recurrir a la biorremediación (o biorrecuperación) este término se emplea para describir una gran variedad de sistemas de ingeniería que utilizan microorganismos para degradar compuestos químicos orgánicos, es un proceso amplio y global, donde se realiza la transformación del contaminante mediante procesos metabólicos (Gu, 2003). La biorremediación posee ventajas sobre otras técnicas alternativas para eliminar compuestos contaminantes como lo son los tratamientos físicoquímicos, ya que los productos formados durante este proceso son generalmente inocuos, la relación costo/efectividad es menor comparada con otras tecnologías y puede ser realizada *in situ* ó *ex situ* según convenga (Rodríguez, 2005).

Brown y colaboradores (1999), predijeron la vida media de la espuma de PE-PU en el medio ambiente en alrededor de 400 años. La mejora de la biodegradabilidad de los materiales de PU y el entendimiento de los mecanismos que éstos emplean en la biodegradación constituye una posible estrategia para superar el problema de su acumulación en el ambiente, ya que se podrían desarrollar procesos en los que se degraden estos residuos biológicamente (Ustinov y col., 2004; Sarkar y col., 2011).

3.5 Degradación de PU por microorganismos

Aunque de manera general los plásticos, grupo al que pertenece el PU, no son biodegradables, se han publicado trabajos en los que se reporta que el PU puede ser susceptible al ataque microbiano (Howard, 2011).

Entre los microorganismos que han sido utilizados se encuentran bacterias como *Corynebacterium sp.* que fue inoculada en un medio con PS-PU suplementado con sales minerales y extracto de levadura logrando reducción en la resistencia a la tracción y en el porcentaje de alargamiento, se consideró que el material de ensayo no estaba siendo utilizado con fines nutricionales y se degradó como resultado del cometabolismo (Kay y col., 1993), además se han utilizado cepas de *Comamonas acidovorans TB-35* (Nakajima-Kambe y col., 1995), *Pseudomonas fluorescens* (Howard y Blake, 1998),

Pseudomonas chlororaphis (Howard y col., 1999) y *Alicyclophillus* sp. (Ocegüera-Cervantes y col., 2007).

Se sabe que los poliéster-poliuretano (PS-PU) son más sensibles a la biodegradación por hongos que los poliéter-poliuretano (PE-PU) (Darby y Kaplan, 1968). En 2003 se reportó que los hongos son los microorganismos predominantes en la degradación de poliéster-poliuretano *in situ* (Barrat y col., 2003).

Los hongos del suelo comprenden la mayoría de los organismos examinados para la actividad de degradación del poliuretano. Se han aislado hongos de los géneros *Alternaria*, *Aspergillus*, *Phoma*, *Penicillium*, *Plectosphaerella*, *Geomyces*, *Nectria* y *Neonectria* con acceso a fuentes de nutrientes mixtos de muestras de poliuretano enterradas (Crabbe, 1994; Crosgrave, 2007). Recientemente se realizó un análisis temporal de la aparición de cepas fúngicas durante el curso del proceso de compostaje y su implicación en la degradación de laminillas de PU, observando que, dependiendo de la disponibilidad de nutrientes y temperatura de la composta, las cepas fúngicas que predominan varían (Zafar y col., 2013, 2014). Estos resultados sugieren que el compostaje es una alternativa potencial para el tratamiento de residuos de PU, lo cual abre nuevas alternativas de estudio acerca del desarrollo de bioprocesos usando hongos o consorcios microbianos para degradar residuos de PU.

3.6 Mecanismos de degradación del poliuretano

En los materiales poliméricos, el ataque microbiano se puede dar de tres diferentes formas: daño biofísico por efecto del crecimiento celular; un efecto bioquímico en el cual el microorganismo (mo) produce sustancias que afectan la constitución del PU y la acción enzimática directa sobre la estructura molecular (Cangemi y col., 2008).

Para dilucidar los mecanismos que emplean los microorganismos en la degradación del poliuretano se han implementado varias técnicas en las que destaca la espectroscopía de infrarrojo por transformada de Fourier (FTIR) por ejemplo; con esta técnica en 1979 Filip observó que la banda de absorción del isocianato en un espectro de absorción

infrarroja presente en espumas de poliéster-poliuretano desaparecía después de 70 días de incubación con *Aspergillus niger* y *Cladosporium herbarum*. En este mismo trabajo se mostró que en los lixiviados de la fermentación aparecían bandas en la región de 250 nm indicando enlaces (-N-C=O) los cuales podrían atribuirse a la hidrólisis del isocianato en agua. Sin embargo, no fue evidencia definitiva para distinguir si es el isocianato o los productos de su hidrólisis los responsables del crecimiento fúngico.

Se ha propuesto que los fenoles producidos por diferentes hongos microscópicos, pueden ser liberados en el medio durante el crecimiento fúngico. Y debido a que los poliuretanos pueden ser disueltos en fenol diluido también se puede asumir que las sustancias fenólicas producidas por los hongos microscópicos pueden estar involucrados en la biodegradación de poliuretanos, hipótesis que tampoco ha sido probada (Filip, 1979).

En 2009 Matsumiya y colaboradores propusieron que el mecanismo de degradación de PE-PU por una cepa de *Alternaria alternata* (PURDK2) parece ser una combinación de ruptura física y la biodegradación. En la primera etapa, el microorganismo creció en el poliéster- poliuretano, y la estructura de rejilla de la espuma era físicamente perturbada por hifas de la cepa. Posteriormente, *A. alternata* PURDK2 secretaba una enzima(s) degradante(s) de enlaces uretano y urea para contribuir a la degradación de la espuma, cuando los enlaces uretano se hidrolizaban por la(s) enzima(s) se generan poliaminas y polioles (Fig. 6a).

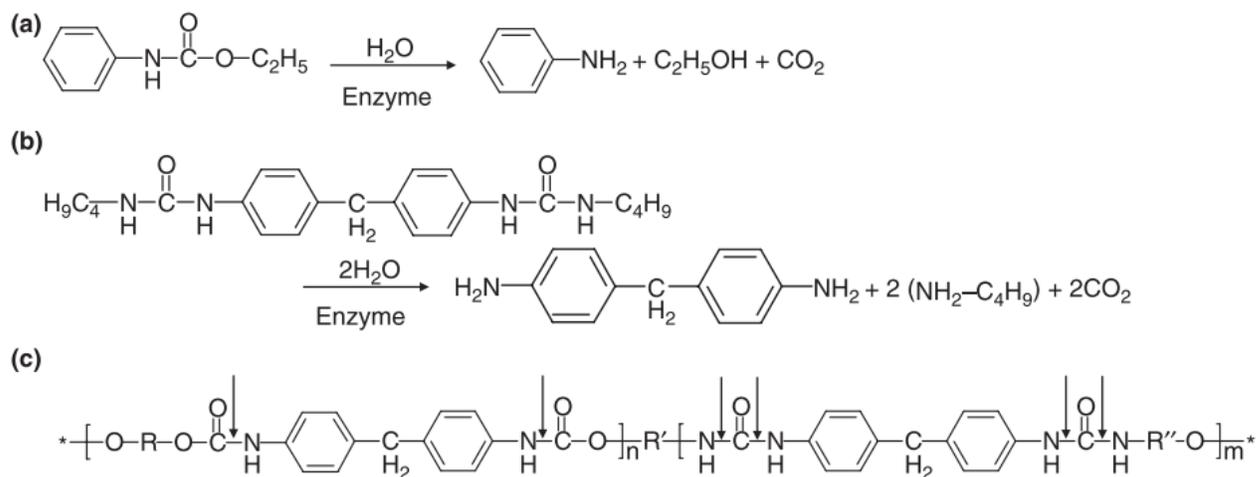


Figura 6a. Posible vía de degradación de etilfenilcarbamato (a) y difenilmetano-4,4'-dibutilurea (b) por la cepa PURDK2 y posibles sitios de degradación en el éter poliuretano (c). La letra “R” en la estructura química indica la cadena del polirol. *Indica el inicio de la repetición de la estructura química (Tomado de Matsumiya y col., 2009).

3.7 Enzimas involucradas en la degradación de poliuretano

El principal mecanismo de degradación de polímeros se da por oxidación o hidrólisis producida por enzimas, resultando en la ruptura de enlaces para generar productos de menor peso molecular que son más accesibles para la asimilación por los microorganismos (Barrat y col., 2003). Dos tipos de enzimas están involucradas en la biodegradación del PU; enzimas extracelulares e intracelulares, durante la degradación, las enzimas extracelulares rompen al polímero generando moléculas más pequeñas que son capaces de permear hacia el interior de la célula y pueden ser usadas como fuente de carbono y energía por acción de las enzimas intracelulares (Shah y col., 2008).

Tabla 2. Hongos con capacidad de degradar PU y las posibles actividades enzimáticas involucradas.

Hongo	Tipo de PU	Actividades enzimáticas	Referencia
<i>Alternaria solani</i>	No reportado	Proteasa, ureasa y esterasa	Ibrahim y col., 2009
<i>Candida antarctica</i>	PS-PU	Lipasa	Shibasaki y col., 2009
<i>Alternaria sp.</i>	PE-PU	Ureasa	Matsumiya y col., 2009
<i>Pestalotiopsis microspora, Alternaria sp., Plectosphaerella sp.</i> , entre otros.	PS-PU	Proteasa	Russell y col., 2011
<i>Aspergillus sp., Trichoderma sp., Paecilomyces sp., Penicillium sp., Alternaria sp., Fusarium sp.</i>	No reportado	Proteasa, ureasa, esterasa y lacasa	Loredo-Treviño y col., 2011
<i>Aspergillus flavus</i>	PS-PU	Esterasa	Mathur y Prasad, 2012

Como puede observarse en la tabla 2, la mayor cantidad de información sobre actividades enzimáticas que pudieran atacar al PU corresponde a esterasas y proteasas. En relación con las posibles actividades enzimáticas hidrolíticas que atacan a los poliuretanos González-Hernández (2016) presentó un posible mecanismo de ataque al grupo uretano (Fig. 6b).

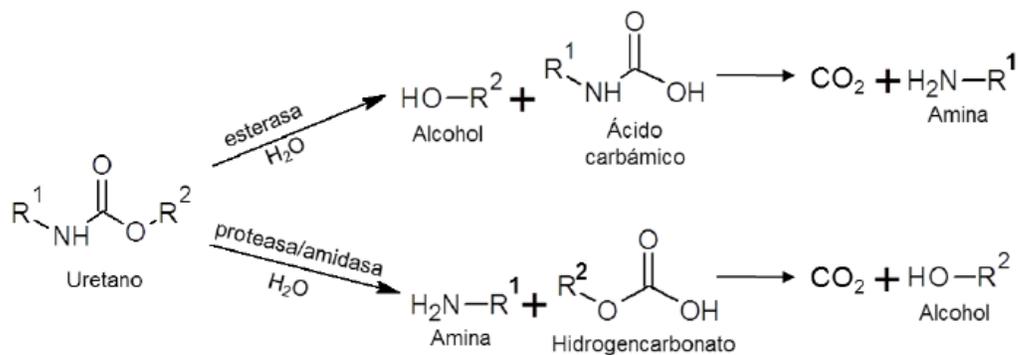


Figura 6b. Posibles mecanismos de hidrólisis propuestos para la ruptura del grupo uretano por las diferentes enzimas hidrolíticas: esterasa, proteasa y amidasa (tomado de González-Hernández, 2016).

Crabbe y colaboradores (2004) 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 y col. (2009) reportaron una proteasa de *Alternaria solani* con la capacidad para degradar PS-PU. En un estudio de la

capacidad degradativa de algunos hongos endofíticos sobre un barniz de PU (Impranil DLN®), 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 y col., 2011). Mathur y Prasad (2012) reportan la detección de una actividad esterasa en una cepa de *Aspergillus flavus* cultivada en medio mínimo líquido con PU.

Entre las enzimas que han sido capaces de producir degradación de poliuretano destacan las esterases. Estas enzimas constituyen un amplio grupo de enzimas que, básicamente catalizan la hidrólisis de enlaces éster, dichas enzimas juegan un papel muy importante en la degradación de materiales naturales y contaminantes industriales como desechos de cereales, plásticos y productos químicos tóxicos también son de gran utilidad en la síntesis de perfumes, antioxidantes y productos ópticamente activos en forma pura (Panda y Gowrishankar, 2005).

3.8 Bioestimulación

Los principales factores que influyen en el proceso de biodegradación son la disponibilidad de oxígeno y de nutrientes. En consecuencia, muchas técnicas se centran en medidas que podrían tomarse para manipular los niveles de oxígeno y nutrientes con el fin de crear condiciones óptimas que permitan potenciar el proceso de biodegradación. Estas técnicas suelen recibir el calificativo de bioestimulación y se considera como la provisión activa de cantidades suficientes de oxígeno y nutrientes para mantener los microorganismos de tal modo que éstos puedan continuar proliferando y desarrollando el proceso de biodegradación (OMI, 2005). En los últimos años se ha utilizado la bioestimulación, donde la actividad natural de los microorganismos es estimulada por la adición de nutrientes y oxígeno u otro aceptor de electrones al sistema para mejorar su efectividad y acelerar la biodegradación (Gómez y col., 2009).

Los hongos filamentosos son microorganismos eucariontes y heterótrofos, por lo que obtienen sus nutrientes de la materia orgánica en descomposición (saprofitos) o se

alimentan de otros organismos vivos como las plantas (Walker y White, 2011). Dentro de sus requerimientos nutricionales está la glucosa como principal fuente de carbono, también son capaces de usar fructosa, manosa y galactosa; así como sustratos complejos como el almidón y la celulosa. Utilizan nitrato y amonio como fuente de nitrógeno, algunos otros utilizan urea, aminoácidos, polipéptidos y proteínas. También necesitan sulfatos o metionina como fuente de azufre (Kendrick, 2000).

La materia orgánica que sirve como sustrato para el crecimiento de especies de hongos se compone de moléculas complejas que necesitan ser degradadas para servir como fuentes de carbono. Una mezcla enzimática es secretada por los hongos con este objetivo y la acción de este complejo enzimático desempeña un papel muy importante en el proceso fitopatogénico y en la descomposición de materia vegetal. Materiales lignocelulósicos como el gajardo de caña de azúcar, el rastrojo de maíz, granos de cereales, salvado de avena y salvado de trigo se han usado como sustratos para el crecimiento de microorganismos por medio de su incorporación a medios de cultivo (Betini y col., 2009).

El uso integral y racional de los desechos agroindustriales como sustratos en la producción de enzimas de interés industrial se convierte en una alternativa extremadamente atractiva debido a la presencia en estos compuestos de grandes cantidades de celulosa, hemicelulosa, pectina y lignina, los cuales sirven como inductores para la síntesis de enzimas hidrolíticas (Cannel y Moo-Young, 1980; Raimbault, 1998).

El salvado es uno de los principales subproductos que se obtiene a partir de la molienda de trigo. Los principales constituyentes del salvado de trigo son polisacáridos no amiláceos; 46%, almidón de 10-20%, proteínas de 15-22% y lignina de 4 a 8%. Los arabinosilanos son los polisacáridos no amiláceos más abundantes (Zhang, 2011). Nigam (2009), menciona que contiene 32.9% de celulosa, 24.0% hemicelulosa y 8.9% lignina. Su producción llega a ser de 154-185 x 10⁶ toneladas a nivel mundial (Sánchez 2009). La cantidad anual en México de esquilmos provenientes del trigo, es de

alrededor de 4.5 millones de toneladas (Mussatto y col., 2012). Por su contenido de nutrientes y una estructura física fácil de colonizar el salvado de trigo es ampliamente utilizado como sustrato en diferentes fermentaciones (López y col., 2004).

En cuanto al uso de la bioestimulación para la degradación de poliuretano, sólo existe un reporte en donde, adicionando extracto de levadura y el barniz de PS-PU Impranil® a cultivos en suspensiones acuosas 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 y col., 2010).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las cepas de hongos utilizadas en este estudio tienen la capacidad para crecer utilizando poliuretano soluble en agua como única fuente de carbono (Álvarez-Barragán, 2013). Debido a que las espumas de PE-PU son difíciles de utilizar como única fuente de carbono por microorganismos, se requiere la formulación de un medio que favorezca su crecimiento, la producción de enzimas y finalmente la degradación de estos materiales.

En este sentido, se pueden adicionar fuentes de carbono alternativas o complementarias que faciliten el crecimiento del hongo y la colonización de la espuma con su consecuente degradación. Entre estas fuentes de carbono alternas se pueden usar azúcares, desechos agroindustriales y otros materiales que promuevan el crecimiento.

5. HIPÓTESIS

Se espera que la suplementación con fuentes de carbono más fáciles de asimilar que el poliuretano como: salvado de trigo, glucosa, uretano y urea acelere el crecimiento de los hongos, promueva la síntesis de enzimas y facilite la degradación de las espumas de poliuretano (ePE-PU).

6. JUSTIFICACIÓN

Las espumas de poliuretano pueden ser producidas con diversos niveles de firmeza y resiliencia. Ofreciendo características que ningún otro material proporciona, tales como: comodidad, durabilidad, bajo peso y bajo costo (Winding y Hiatt, 1961). Debido a lo anterior desde su origen la producción de este material se ha elevado gradualmente. Como estas espumas son difíciles de degradar en el medio ambiente se han acumulado en él generando un problema de contaminación considerable.

De acuerdo a la compañía Bayer Science for a better Life en 2012 se consumieron 15.3 millones de toneladas de PU en todo el mundo, el mercado global de espumas flexibles de PU en este mismo año fue de 5.7 millones de toneladas y 4.4 millones de toneladas para espumas rígidas. En México se estima que la producción de poliuretanos asciende a cerca de 257,700 toneladas anuales (Conde-Ortíz, 2012). Es por ello que se requiere trabajar en la búsqueda de alternativas viables que contribuyan a la reducción de dichos residuos.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo general

Evaluar la capacidad de hongos filamentosos para crecer en espumas de poliéter-poliuretano e identificar las enzimas producidas durante su degradación.

7.2 Objetivos particulares

- ★ Evaluar el efecto de la adición de salvado de trigo, glucosa, urea y uretano a un medio mineral sobre el crecimiento y degradación de espumas de PE-PU.
- ★ Identificar algunas actividades enzimáticas durante el proceso de degradación de espumas de PE-PU por hongos filamentosos.

8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

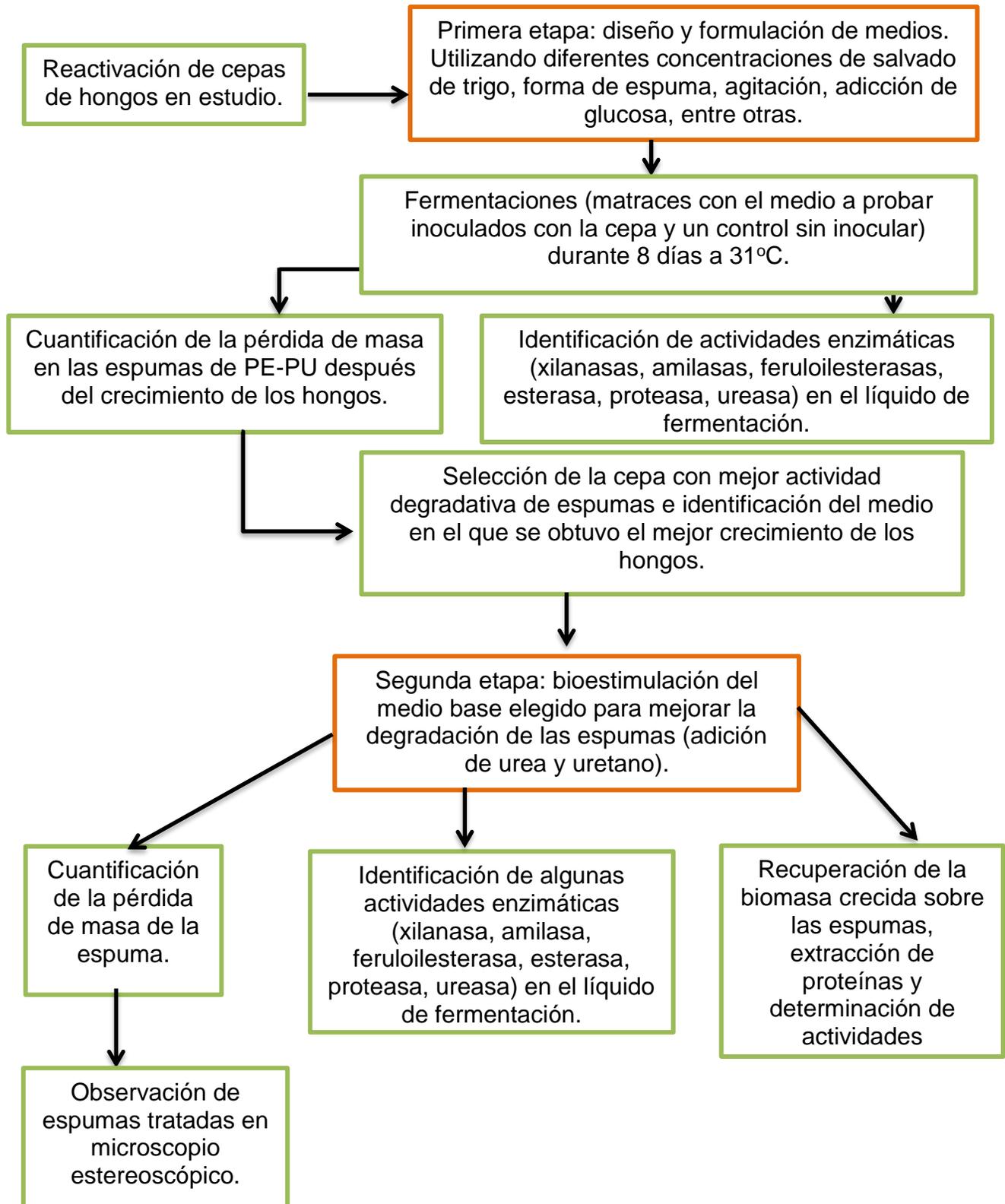


Figura 7. Estrategia experimental

9. MATERIALES Y MÉTODOS

9.1 Microorganismos

Para el desarrollo del proyecto se utilizaron 8 cepas de hongos filamentosos identificadas de acuerdo a la nomenclatura de la tabla 3.

Las cepas se reactivaron inoculándolas en Agar Papa Dextrosa comercial (PDAc) y en un medio completo (MC), la siembra se hizo en cajas petri por estría con asa micológica y por extensión masiva con un asa Drigalsky a partir de cepas crecidas en PDA preparado en el laboratorio (PDAp) (Anexo 1). Las cajas inoculadas se incubaron a 31°C por 8 días luego de los cuales fueron mantenidas en refrigeración a 4°C para utilizarse como inóculo en las fermentaciones y para resiembras posteriores. Para mantener las cepas viables se resembraba cada cepa por extensión masiva en PDAc cada 15 días.

Tabla 3. *Cepas de hongos seleccionadas por su capacidad de crecer en PU soluble como única fuente de carbono (Álvarez-Barragán, 2013) y la identificación de especie (González-Hernández, 2016).*

CLAVE	Especie*	Fuente de obtención	Medio de selección
A2.PP.5	<i>Cladosporium cladosporioides</i>	T1=Tierra**	H=Hydroform®
BP6.IC.9	<i>Dichotomomyces cejpilii</i>	A1=Aire de laboratorio	PL=Polylack®
BP4.IC.1	<i>Dichotomomyces cejpilii</i>	A2=Aire**	I=Impranil®
T1.H.7	<i>Fusarium</i> sp.	A3=Ambiente de cuarto frío.	IC=Impranil® con cloranfenicol
BP7.IC.7	<i>Dichotomomyces cejpilii</i>	BP=Basurero Bordo Poniente México	PP=Poliéster poliol.
A3.I.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		
T1.PL.1	<i>Cladosporium cladosporioides</i>		
BP3.IC.9	<i>Cladosporium uredinicola</i>		

**Tierra y aire del edificio E de la Facultad de Química, UNAM.

9.1.1 Inóculo de las fermentaciones

Suspensión de esporas. La suspensión fue preparada a partir de cajas de Petri inoculadas con las cepas de estudio e incubadas durante 8 días. A cada caja se le agregaron 10 mL de solución salina de NaCl al 0.9% (p/v) con Tween 80 al 0.005% v/v estéril (SST80), las esporas se liberaron mecánicamente mediante un raspado superficial de las colonias con asa Drigalsky, se recuperó este líquido en un tubo y se centrifugó 5 minutos a 4500 rpm, el sobrenadante se desechó y las esporas se

resuspendieron en otros 10 mL de SST80. Todo el procedimiento se realizó en condiciones asépticas en una campana de bioseguridad las veces necesarias hasta obtener sobrenadante sin color.

Conteo de esporas. El conteo de esporas en la suspensión se realizó con una cámara de Neubauer. Se realizó una dilución de la suspensión de esporas 1:50 en H₂O destilada y se agitó en vórtex a máxima velocidad. De la dilución anterior se tomaron 100 µL y se colocaron sobre la cámara, se procedió al conteo de esporas en el microscopio a 40x en 16 cuadros que conforman uno de los 4 cuadrantes de la cámara, la concentración de esporas se calculó como:

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = (\#\text{esporas}_{\text{contadas}})(4_{\text{cuadrantes}})(2500_{\text{factor de cámara}})(X_{\text{dilución}})$$

9.2 Formulación y preparación de medios base para el crecimiento de cepas

Para analizar el crecimiento de las cepas en estudio y la degradación de ePE-PU en fermentación fue necesario probar a lo largo del proyecto diferentes composiciones en medios semisólidos y líquidos, así como condiciones en la fermentación e incluso en la forma de lavar las espumas. Con cada medio se probó un control sin inocular y la cepa inculada en el medio (ver condiciones de los diferentes medios en el anexo1) todos los medios se ajustaron a pH inicial 6.0.



Figura 8. Vista de los medios base preparados en matrazes Erlenmeyer de 250 mL (imagen de la izquierda) y matraces con medio e inculados en la cámara de incubación (imagen de la derecha).

9.3 Cuantificación de la pérdida de masa de las espumas de PE-PU

9.3.1 Características físicas y químicas de la espuma empleada

Se utilizó una espuma de PE-PU de estructura conocida (Tabla 4) que se recortó con tijeras de las medidas y forma según se especifica en cada medio (Anexo 1).

Tabla 4. Características de la espuma de PE-PU utilizada en los ensayos (Datos del proveedor).

Características físicas		Características químicas
Aspecto	Espuma blanca 	TDI= Mondur TD 80: diisocianato de tolueno, tiene una mezcla de 2,4 y 2,6-isómeros en la proporción de 80% y 20%, respectivamente.
Densidad	15.5 kg/m ³	Poliol: CARADOL MD30-45=óxido de etileno/óxido de propilenopoliéter-poliol adicionado con un copolímero de estireno-acrilonitrilo para aumentar la dureza.
Retardante de flama	No contiene	CARADOL SC56-22: es un óxido de etileno/óxido de poliol de poliéter a base de propileno.
Composición	CARADOL MD30-45: 45.0 pph CARADOL SC56-22: 55.0 pph TDI: 52.7 pph Agua: 4.05 C ₂ Cl ₂ : 7.7 pph	

9.3.2 Lavado de las espumas

Para el lavado de la espuma se hizo una adecuación al método utilizado por Álvarez-Barragán (2013). Una vez concluido el tiempo de las diferentes fermentaciones, las espumas se retiraron del medio y se recuperó el caldo libre de células de la fermentación. De la espuma, se eliminaron el sustrato residual y el crecimiento superficial impregnados a ellas con una espátula, luego se realizaron 2 lavados con 50 mL de H₂O destilada cada uno, exprimiendo 10 veces cada espuma manualmente. Se colocaron las espumas en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de solución de NaClO comercial Cloralex® diluido al 30% en H₂O destilada (el Cloralex® contiene entre 5.25% y 5.50% de NaClO por lo que en promedio se usó una solución de 1.61% de NaClO) y se dejaron reposar por 16 ó 24 horas a 25°C (ver tabla I en anexos) para lisar las células y poder eliminar el micelio de los hongos que crece dentro de la espuma. Al finalizar el tiempo de reposo se retiraron las espumas de la solución y se lavaron nuevamente 2 veces con 50 mL de H₂O destilada cada una, exprimiéndolas con los dedos (10 veces cada espuma) para eliminar las células lisadas lo mayor posible. Se eliminó el resto de solución colocando las espumas sobre un matraz Kitasato

conectado al vacío. Luego se colocaron las espumas sobre papel absorbente y se dejaron secar durante 3 días a 37°C, al término de los cuales se registró nuevamente su masa. El mismo procedimiento se realizó para el control sin inocular. La pérdida de masa se calculó como: $\% \text{ masa perdida} = (\text{masa inicial} - \text{masa final} / \text{masa inicial}) \times 100$.

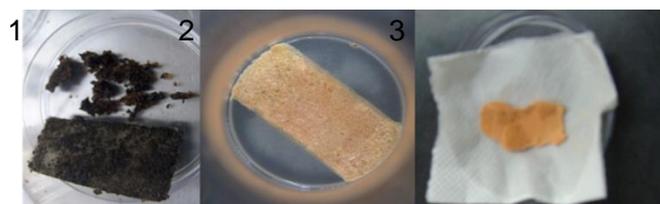


Figura 9. *Proceso de lavado de las espumas después de la fermentación, 1. Retirado de biomasa, 2. Reposo en solución de NaClO y 3. Secado a 37°C.*

9.3.3 Tratamiento de espumas de PE-PU en etanol

Mathur y Prasad (2012) utilizaron etanol al 70% para remover las células de películas de poliuretano. Como tratamiento adicional al lavado de las espumas se utilizó etanol al 96%. Se recortaron trozos de masa conocida de ePE-PU lavadas y secas de acuerdo al punto 9.3.2 y se colocaron en tubos de ensaye de 16X150, se agregaron 10 mL de etanol al 96% y se dejaron reposar 24 horas a 25°C, al término de las cuales se recuperó el etanol y la espuma sin disolver por filtración al vacío en papel Whatman® grado 1 empleando un sistema Milipore, se evaporó el etanol de la espuma hasta obtener masa constante y se cuantificó la masa sin disolver, se realizó el mismo procedimiento con los controles. El porcentaje de espuma disuelta se calculó como: $\% \text{ disuelto} = (\text{masa inicial} - \text{masa final} / \text{masa inicial}) \times 100$.

9.4 Determinación de actividades enzimáticas

9.4.1 Filtrado del líquido de fermentación

El líquido sobrenadante de la fermentación se recuperó en tubos Eppendorf y se midió el pH. Posteriormente se sometió a centrifugación 5 minutos a 4500 rpm, se decantó y este líquido libre de medio se filtró en un sistema Milipore para eliminar los restos de células, a este filtrado se determinó azúcares reductores y las diferentes actividades enzimáticas.

9.4.2 Extracción de proteínas a partir de la biomasa crecida sobre las espumas

Se empleó el método propuesto por Wageningen (1999) para extracción de proteínas. Se recuperó la biomasa crecida en las espumas y se colocó en un tubo Eppendorf de 50 mL agregando agua destilada. Se centrifugó a 4500 rpm durante 5 minutos y se decantó el agua. Se resuspendió la muestra con una solución de NaCl al 0.9%. Se tomaron 20 mL de la solución de biomasa con NaCl al 0.9% y se filtraron en papel filtro Watman No.1 secando al vacío. El micelio seco se congeló en nitrógeno líquido y posteriormente se transfirió a la cápsula del Dismembrator y se pulverizó a 2000 rpm durante 50 segundos. Del polvo recuperado en la pulverización se tomaron 0.5 g y se transfirieron a un tubo Eppendorf de 2 mL al que se agregó 1 mL de buffer de extracción de proteínas. Con cuidado se mezcló la suspensión por inversión del tubo. La suspensión se centrifugó 5 minutos a 4500 rpm y el sobrenadante se colectó en otro tubo Eppendorf, a dicho extracto se determinaron las actividades enzimáticas y se conservó en congelación.

9.4.3 Determinación de actividad de xilanasas

La actividad xilanólítica se determinó por la cuantificación de grupos reductores liberados por la actividad enzimática. En tubos de 16x150 mm se agregaron 0.5 mL de buffer de acetatos 100 mM pH 5 más 0.4 mL de solución de xilano de abedul al 1% (p/v) en el mismo buffer, la reacción enzimática se inició agregando 0.1 ml del filtrado enzimático libre de células y se incubó durante 20 min a 50°C. La reacción se detuvo adicionando 1 mL de DNS y se determinaron los azúcares reductores producidos por la degradación de xilano. El blanco se preparó de la misma forma que la muestra, pero el filtrado libre de células se agregó después de adicionar el DNS. La actividad fue calculada utilizando una curva patrón de xilosa leída a 575 nm. Una unidad de actividad U/mL fue definida como los mg de xilosa formados por mL de filtrado enzimático a las condiciones de ensayo.

6.4.4 Determinación de actividad de amilasas.

En tubos de 13 x 100 mm se agregó 1 mL de solución de almidón soluble de papa al 1% (p/v) en buffer de acetatos 100 mM pH 5, la reacción enzimática se inició agregando 0.1 ml de filtrado enzimático libre de células y se incubó durante 1 hora a 40°C. La reacción se detuvo adicionando 0.1 mL de HCl 1M; se agitó en vórtex para tomar 0.1 mL de medio que se colocaron en tubos de 13 x 100 mm. El blanco se preparó de la misma forma que la muestra, pero el filtrado libre de células se agregó después de adicionar el HCl 1M. Posteriormente a estos tubos se agregaron 2.4 mL de una solución I₂/KI al 0.3/3% (p/v) diluido al 4% en H₂O, se agitó en vórtex y se determinó la absorbancia de las muestras a una longitud de onda de 620 nm. La actividad se expresó en unidades U/mL definidas como los mg de almidón degradados por mL de filtrado enzimático a las condiciones de ensayo. La concentración del almidón degradado se calcula restando el almidón presente en el blanco menos el de la muestra tratada utilizando una curva estándar de almidón leída a 620 nm.

9.4.5 Determinación de actividad de feruloilesterasas

En general las feruloilesterasas son enzimas responsables de catalizar la ruptura de enlaces éster entre polisacáridos de la pared celular de los vegetales (hemicelulosa y pectina) y el ácido ferúlico. El ácido ferúlico se encuentra enlazado covalentemente a polisacáridos incluyendo glucoarabinosilanos y pectinas, su función en las plantas es otorgar rigidez en la estructura y resistencia a la degradación por mos (Ou y col., 2011). La actividad de feruloilesterasas se determinó por la medición de halos de degradación producidos por la actividad enzimática en un gel preparado en placas de vidrio de 16x18cm, conteniendo 30 mL de buffer de acetatos 100 mM pH 5.0, etilferulato (EF) al 0.1% (p/v) y agar bacteriológico al 1.0%. Se formaron pozos de 7 mm de diámetro en los que se colocaron 20 µl de filtrado enzimático libre de células; se incubó 24h a 25°C, observando la degradación del etilferulato como halos transparentes; se midieron los halos formados, y se calcularon los mg de EF degradados. Una unidad de actividad fue definida como los miligramos de EF degradados por mL de filtrado enzimático a las condiciones de ensayo.

9.4.6 Determinación de actividad de proteasas

Para determinar la actividad de proteasas se calculó la cantidad de caseína degradada por mL de filtrado enzimático libre de células. Sobre placas de vidrio de 16X18 cm se preparó un gel con 40 mL de caseína/agar al 0.1% / 1.0% (caseína/agar bacteriológico) en buffer de fosfatos 100 mM pH 7.5 precalentado, se formaron pozos de 7 mm de diámetro en los que se colocaron 20 µl de filtrado enzimático libre de células. Como control positivo se empleó una proteasa alcalina comercial; se incubó 24 horas a 25°C al término de los cuales se tiñó el gel con 50 mL de azul de Coomassie R-250 durante 30 minutos. Posteriormente para retirar el colorante que no se unió a la caseína se lavaron las placas con 100 mL de una solución de ácido acético-metanol (7.5%/20%) (v/v) agitándolas durante 24 horas en un oscilador a velocidad mínima. La presencia de actividad proteasa se observó como un halo transparente alrededor de los pozos después de desteñir, se calculó la cantidad de caseína degradada definiendo las unidades enzimáticas U/mL como los g de caseína degradados por mL de filtrado enzimático a las condiciones de ensayo.

9.4.7 Determinación de actividad de esterases

En 99 mL de buffer de fosfatos pH 8 se disolvieron 1 mL de Tween 80 ó 20 (se probaron ambos), 0.1 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ y 1.0 g de agar. En placas de vidrio de 16x18 cm se vertieron 40 mL de la solución anterior precalentada para formar un gel de 1mm de espesor. El Tween 80 es una molécula anfipática que contiene ésteres de ácidos grasos, la hidrólisis de este compuesto por acción de esterases genera como producto un alcohol y un grupo ácido, al asociarse dos moléculas de ácido y un catión Ca^{2+} se produce un complejo color blanco brillante que precipita. Para determinar la actividad esterasa; sobre el gel se formaron pozos de 7 mm de diámetro en los que se colocaron 20 µl de filtrado enzimático libre de células; se incubó 24h a 25°C y se observó la presencia de un halo blanquecino alrededor de los pozos que indica acción de esterases, se consideró una actividad positiva (+) o negativa (-) si el halo no se presentaba.

9.5 Determinación de azúcares reductores

Los azúcares reductores se determinaron por el método de DNS (ácido 2,4-dinitrosalicílico). En tubos de ensayo de 16x150 mm se adicionaron 0.1 mL del filtrado enzimático libre de células diluyendo, 0.9 mL de agua destilada y 1.0 mL de DNS. Los tubos con la mezcla se colocaron a baño María a ebullición durante 5 minutos. Posteriormente el tubo se enfrió adicionando 5 mL de agua destilada a temperatura ambiente, se determina la absorbancia a una longitud de onda de 575 nm. La concentración de los azúcares se calculó utilizando una curva estándar de glucosa leída a la misma longitud de onda.

10. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

10.1 Reactivación de cepas de hongos degradadores de poliuretano

Para la etapa inicial de este trabajo se utilizaron las ocho cepas de hongos descritas en la tabla 3 de materiales y métodos reactivándolas en PDAc y MC.

Tabla 5. Crecimiento observado en las cepas de estudio durante 6 días incubándose a 31°C en PDAc y MC por estría y extensión masiva a partir de cepas crecidas en PDAp.

Cepa	Crecimiento* en PDAc								Crecimiento en MC
	Día 1		Día 2		Día 3		Día 6		Día 6 por estría
	Estría	Masivo	Estría	Masivo	Estría	Masivo	Estría	Masivo	
1	-	+	+	+	+	++	++	+++	+++
2	-	-	-	+	-	+	+	++	++++
3	-	+	-	+	-	++	+	+++	++
4	+	+	+	+	++	++	++	+++	+++
5	+	+	+	+	++	++	+++	++	++++
6	-	-	+	+	+	++	++	+++	+++
7	-	-	-	+	+	+	+++	+	+++
8	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* -: Ningún crecimiento, +: Crecimiento mínimo observable, ++: Crecimiento observable, +++: Crecimiento abundante y ++++: Crecimiento muy abundante.

De acuerdo a la tabla 5, tanto en PDAc como en MC hay crecimiento de 7 cepas a los 6 días de incubación a 31°C excepto para la cepa 8. Se observó mejor crecimiento cuando se sembró por extensión masiva que por estría y también es mejor el crecimiento en MC que en PDA. Sin embargo, el MC es un medio enriquecido que fácilmente puede contaminarse por lo que se eligió el PDAc sembrando por extensión masiva para las resiembras y la obtención de esporas a lo largo del proyecto.

En la cepa 8 se observó crecimiento mínimo hasta los 14 días de inoculada con la suspensión de esporas. Aparentemente, las esporas no pueden crecer adecuadamente en los medios utilizados. Entonces se decidió probar la inoculación con un trozo de medio con crecimiento colocado directamente sobre el medio. Para ello se utilizó medio de PDAc, con este método se obtuvo un crecimiento abundante a los 8 días después de la inoculación.

10.2 Primera etapa. Formulación de un medio base para el crecimiento de las cepas en estudio

Con el fin de contar con un medio y condiciones en los que las cepas en estudio crecieran y excretaran enzimas favoreciendo la degradación de las ePE-PU se formularon varios medios (anexo 1) en los que se modificó entre otras variables, la composición del medio, la forma de la espuma y/o las condiciones de agitación,

10.2.1 Medios con 10% salvado de trigo y 1.0% glucosa

Para verificar la forma y tamaño de las espumas de PU que era conveniente emplear en la cuantificación de la degradación se diseñaron inicialmente 2 medios (cs10 y ds10), cuya composición, condiciones de fermentación y lavado de espumas fue la misma excepto por la forma y tamaño de la espuma (c=espuma en cubos y d=espuma en disco). Los resultados de este experimento se muestran en las tablas 6 y 7 así como en la figura 11, el control son espumas con el mismo tratamiento que las cepas pero sin inocular.

Tabla 6. Registro fotográfico del crecimiento de cepas de hongos degradadores de espumas de PU a los 8 días de fermentación a 31°C en los medios cs10 y ds10 con 10% salvado de trigo.

CEPA	Crecimiento observado	
	Medio cs10	Medio ds10
Control		
1		
2		
3		
4		
5		
6		
7		

En la tabla 6, para el medio cs10 se observa crecimiento en todas las cepas excepto en las 6 y 7, que coinciden con las cepas con menor número de esporas inoculadas por lo que en experimentos posteriores se probó inocular más esporas, en este medio las cepas 1, 2 y 5 mostraron porcentajes de degradación menores que el control (18.04%) aún cuando se observó crecimiento de la cepa sobre el medio, por lo que posiblemente no se logró eliminar completamente las células vegetativas que crecen dentro de la espuma y por ello la masa final no refleja degradación, para evitar esto en experimentos posteriores se probó aumentar las horas de reposo en solución de NaClO de 16h a 24h en el lavado.

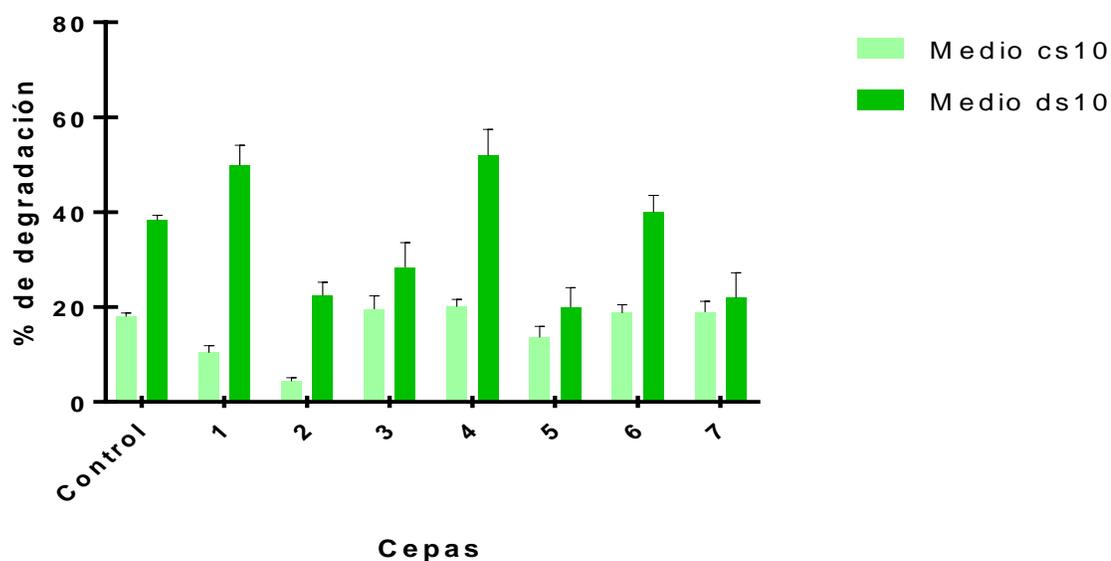


Figura 10. Porcentajes de degradación de ePE-PU con las cepas 1 a 7 al final de la fermentación semisólida (8 días a 31°C) con 10% salvado de trigo.

En el medio ds10 se observa crecimiento para todas las cepas probadas y se logran mayores porcentajes de degradación que en el medio cs10, sin embargo, también es mayor el % de degradación del control (38.35%), por esto solo 3 cepas (1, 4 y 6) logran un % de degradación mayor al control en este medio. El tamaño de espuma usada en el medio ds10 presentó buenos resultados de degradación pero no es factible emplearlo debido a que es muy delgada lo que dificulta el tratamiento posterior a la fermentación,

obteniendo falsos positivos, por esto en experimentos subsecuentes sólo se emplearon espumas en forma de cubos de 2X2X2 cm.

Tabla 7. *Determinación de pH y actividades amilasa, xilanasa y feruloilesterasa del líquido al final de la fermentación semisólida (8 días a 31°C) con 10% salvado de trigo.*

CEPA	# esporas inoculadas	pH al final de la fermentación		Actividad amilasa (U/mL)		Actividad xilanasa (U/mL)		Actividad feruloilesterasa (U/mL)	
		Medio cs10	Medio ds10	Medio cs10	Medio ds10	Medio cs10	Medio ds10	Medio cs10	Medio ds10
		Control	0	5.74	5.75	0	0	0	0
1	26X10 ⁶	6.70	5.76	57.8	12.8	35.9	18.8	0	0
2	43X10 ⁶	7.48	8.12	56.2	57.2	127.8	19.8	0	37
3	28X10 ⁶	8.29	8.10	2.4	2.8	26.5	30.8	1045	0
4	124X10 ⁶	8.45	7.49	0	15.2	39.9	18.3	0	0
5	21X10 ⁶	7.44	7.94	49.9	72.1	115.5	50.9	0	0
6	1X10 ⁶	5.72	8.68	1.4	32.3	0.96	73.6	1150	0
7	1X10 ⁶	5.43	8.52	0.5	0	16.7	28.8	0	0

En cuanto a las actividades enzimáticas en el medio cs10 las cepas 1, 2 y 5 presentan actividad amilolítica arriba o cercana a 50 U/mL estas cepas coinciden con las 3 que presentaron porcentajes de degradación de la espuma de PU menores que el control (18.04%). En el medio ds10 las cepas 2 y 5 vuelven a presentar los valores más altos de actividad, e igual estas cepas no lograron un % de degradación mayor al control, por lo que posiblemente la enzima amilasa no esté involucrada en la degradación del PU, y más bien se haya expresado por la composición del salvado de trigo. En la actividad xilanolítica nuevamente las cepas 2 y 5 presentan los valores más altos de actividad en el medio cs10, esta actividad se presentó en todas las cepas y en ambos medios pero no se puede ver claramente alguna relación con el % de degradación del PU. La actividad feruloilesterasa sólo se presentó en 2 cepas (3 y 6) del medio cs10, ambas presentaron también mayor porcentaje de degradación mayor que el control, sin embargo en las cepas 4 y 7 que también presentan degradación mayor a 18.04% no se observa actividad por lo que, para esta enzima en este ensayo tampoco es clara la relación con la degradación del PU.

10.2.2 Prueba de degradación con el filtrado enzimático libre de células

En 2006 Zavala y sus colaboradores probaron la biodegradabilidad de espumas de poliuretano sintetizadas a partir de un polioliol de aceite de soya utilizando enzimas puras (papaína, ureasa y esterasa). A diferencia del PS-PU con PE-PU no se encontraron reportes donde se pruebe la acción de enzimas directamente sobre espumas es por ello que en el medio e (anexo 1) se probó la acción del filtrado libre de células obtenido de la fermentación en el medio cs10 sobre una ePE-PU, los resultados de este experimento se resumen en la tabla 8.

Tabla 8. *pH final del líquido de fermentación y % de degradación de ePE-PU tratadas durante 15 días a 37°C con filtrados enzimáticos libres de células (medio e) obtenidos de la fermentación con el medio cs10.*

Filtrado de cepa/mezclado en	% degradación	pH final
Control/H ₂ O	-0.09	6.36
Control/buffer pH 5	0.08	5.13
1/H ₂ O	-0.18	5.75
1/Buffer pH 5	-0.35	5.31
2/H ₂ O	-0.17	8.1
2/Buffer pH 5	-0.17	5.45
3/H ₂ O	-0.41	7.52
3/Buffer pH 5	0.50	5.96
4/H ₂ O	-0.21	8.77
4/Buffer pH 5	-0.30	7.46
5/H ₂ O	0.00	5.37
5/Buffer pH 5	-0.26	5.41

En la tabla 8 se ve que el filtrado enzimático libre de células obtenido de fermentaciones semisólidas con 10% salvado de trigo no tiene ninguna acción sobre las espumas de PE-PU en un rango de pH de 5.13 hasta 8.77, a diferencia de lo observado en la fermentación semisólida con las mismas cepas. Debido posiblemente a una concentración de enzima muy baja en los filtrados.

10.2.3 Prueba de degradación con 2% de salvado de trigo

En las fermentaciones anteriores con 10% de salvado de trigo se vió que los microorganismos tenían una fuente de nutrientes casi inagotable y a consecuencia no se veían en la necesidad de degradar ninguna otra cosa, para corroborar esto y favorecer el uso de las espumas se probó un medio con 2% de salvado de trigo en lugar de 10% empleado en los medios cs10 y ds10, la Fig.12 muestra los resultados obtenidos.

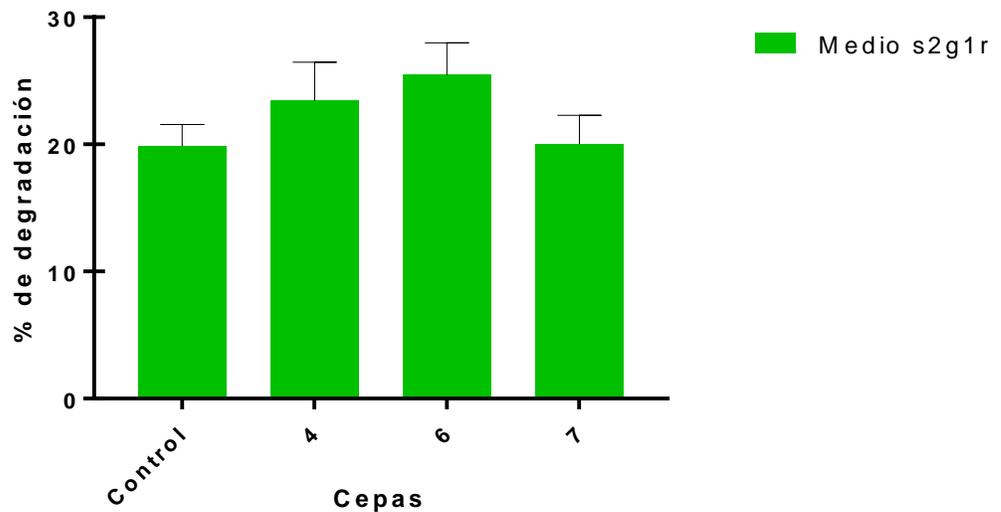


Figura 11. Porcentajes de degradación de ePE-PU con las cepas 4, 6 y 7 al final de la fermentación semisólida (8 días a 31°C) con 2% de salvado de trigo y 1% glucosa.

Comparando con lo obtenido en el medio cs10 (figura 10) las 3 cepas probadas mostraron un mayor % de degradación de las espumas utilizando sólo 2% de salvado de trigo, para la cepa 4 incluso es mayor este porcentaje con menos esporas inoculadas que en el medio cs10, por lo que no fue necesario probar la inoculación de más esporas. En pruebas siguientes se empleó 2% de salvado inoculando un mL con 1×10^6 esporas de hongo al medio. En esta prueba los 30 mL de MM con glucosa al 1% se colocaron al inicio de la fermentación y no se agregó ninguna otra cantidad en los 8 días de fermentación por lo que en pruebas siguientes ya tampoco se agregó MM mientras transcurrían los días de la fermentación como se hizo en el medio cs10 y ds10.

Tabla 9. *Medición de pH del líquido al final de la fermentación semisólida (8 días a 31°C) con 2% de salvado de trigo en reposo.*

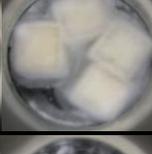
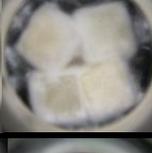
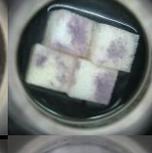
CEPA	# esporas inocularas	pH final
Control	0	5.82
4	1X10 ⁶	8.81
6	1X10 ⁶	8.93
7	1X10 ⁶	8.93

La única vía metabólica de utilización del nitrógeno a partir de nitrato es por reducción a nitrito y luego a amoníaco mediante la acción de la enzima nitrato reductasa. La mayoría de los hongos pueden utilizar amonio como única fuente de nitrógeno, el que penetra en las células por transporte activo (Lurá y col., 1997). En diversos estudios se ha demostrado la presencia de aminos por degradación del enlace uretano en el poliuretano (Matsumiya, 2009; González-Hernández, 2016). Debido a que el metabolismo de carbohidratos en presencia de oxígeno supone la formación de CO₂ y por tanto acidificación del medio por la formación de ácido carbónico, y el amoníaco debe ser usado como fuente de nitrógeno se puede inferir que la alcalinidad del medio debe a la presencia de grupos aminados que en solución acuosa son básicos.

10.2.4 Prueba de degradación en medios líquidos

Hasta ahora hemos visto que el salvado de trigo en medio mineral con glucosa favorece el crecimiento de las cepas en estudio. Sin embargo, la degradación de espumas no muestra resultados convincentes por ello se decidió evaluar el efecto de otros componentes en el medio, que fungieran como bioestimulantes. Se probaron 3 medios líquidos con lacas de PU soluble; Polylack® al 0.3% en reposo (PLr), Impranil® al 1% en reposo (Imr) e Impranil® al 1% en agitación (Ima) los resultados de la degradación se presentan a continuación.

Tabla 10. Registro fotográfico del crecimiento de cepas de hongos degradadores de espumas de PE-PU a los 8 días de fermentación a 31°C en Polylack® al 0.3% en reposo (PLr), Impranil® al 1% en reposo (Imr) e Impranil® al 1% en agitación (Ima).

CEPA	Crecimiento observado		
	Medio PLr	Medio Imr	Medio Ima
Control			
1			
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8	No probada	No probada	

En el medio PLr se observó crecimiento para todas las cepas, en este medio se obtuvo un % de degradación menor en el control (19.16%) que para el medio Imr (23.62%), sin embargo, solo las cepas 6 y 7 presentan mayor % de degradación que su control. En el medio Ima se logró crecimiento en las cepas 2, 3, 5 y 6, las cepas 1 y 7 solamente aclararon el medio y la cepa 4 no tuvo cambios, pero para este medio ninguna cepa obtuvo porcentaje de degradación mayor que el control, posiblemente las cepas crecieron utilizando el PU soluble (Impranil®) pero el tiempo de fermentación fue poco para que éstas comenzaran a degradar las espumas.

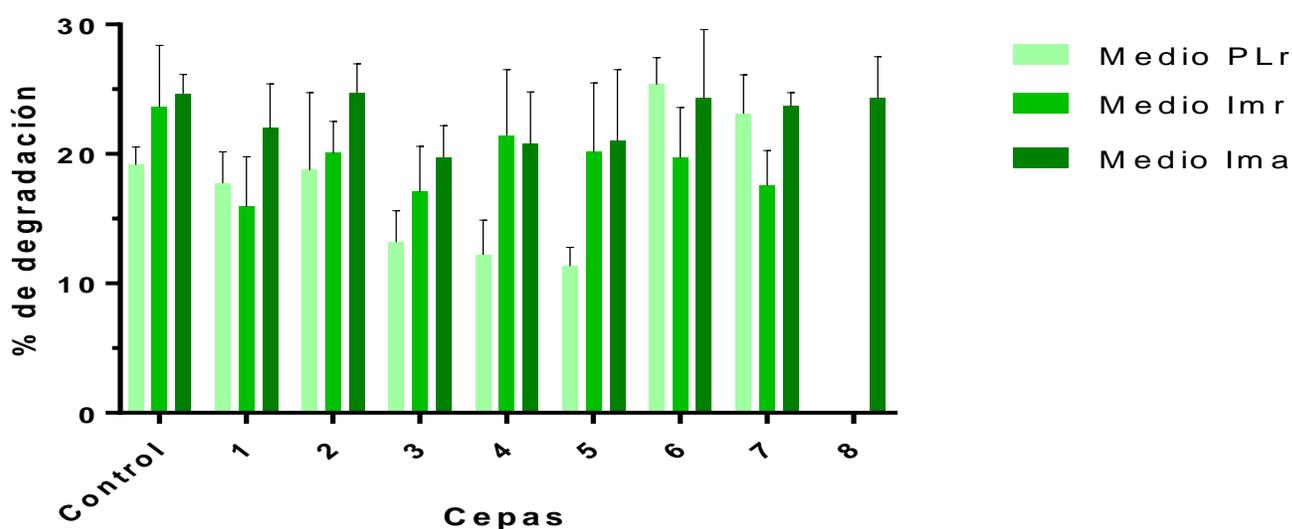


Figura 12. Porcentajes de degradación de ePE-PU con las cepas 1 a 8 al final de la fermentación líquida (8 días a 31°C) en Polylack® al 0.3% en reposo (PLr), Impranil® al 1% en reposo (Imr) e Impranil® al 1% en agitación (Ima).

Se puede ver que las cepas si utilizan el PU soluble pero los resultados de degradación de las espumas sugiere que, nuevamente los nutrientes presentes en el medio dejan al microorganismo sin la necesidad de degradar las espumas. En estos medios se observó crecimiento de las 8 cepas y aclaramiento del medio corroborando lo reportado por (Alvarez-Barragan, 2013) sobre la utilización de PU soluble de las cepas como fuente de carbono, como se ve en la tabla 10 cada cepa creció de diferente color y forma sobre la espuma. En el medio Ima las cepas 1, 2, 3, 5, 6 y 7 presentaron mayores porcentajes de degradación comparado con el medio Imr que tenía más glucosa, sin embargo, como también muestra la figura 12 en el medio Ima ninguna cepa supera el %

de degradación del control (24.66%) por lo que posiblemente esta mejora en la degradación en las cepas mencionadas no se deba a la acción microbiana sino más bien a la mecánica. Aún con ello el crecimiento observado es mayor cuando se agita el medio que en reposo debido posiblemente a la disponibilidad de oxígeno en el medio por lo que la agitación deberá considerarse en medios futuros.

10.2.5 Prueba de degradación a diferentes tiempos de fermentación

En ensayos anteriores se vió que quizá el tiempo de fermentación de 8 días no era suficiente para que los hongos agotaran los nutrientes fáciles de degradar y recurrieran a las ePE-PU para seguir creciendo. Por esto último se recurrió a evaluar la degradación de las espumas a diferentes tiempos de fermentación para ello se eligieron 3 de las cepas que obtuvieron mayor porcentaje de degradación con respecto al control en el medio cs10 y se probaron en un medio con 2.0% salvado de trigo, 0.3% glucosa y agitación a 100 rpm, los resultados de este ensayo se muestran en la tabla 11.

Tabla 11. *pH del líquido y porcentajes de degradación de ePE-PU al final de la fermentación sólida (8, 16 y 24 días a 31°C) con 2% salvado de trigo y 0.3% glucosa.*

CEPA	% de degradación			pH final		
	8 días	16 días	24 días	8 días	16 días	24 días
Control	16.82±3.01	14.07±4.49	20.14±3.13	5.82	5.67	5.98
3	21.23±1.88	17.87±4.91	18.79±1.39	8.87	9.21	9.2
4	16.50±5.91	20.37±5.98	17.75±2.69	8.92	9.17	9.13
7	21.65±6.00	11.09±3.31	14.34±1.60	8.76	9.05	8.98

El pH del medio aumentó a mayor tiempo de fermentación lo que sugiere, como había mencionado, a la presencia de grupos aminados en el medio (Matsumiya y col, 2009; González-Hernández, 2016). Sin embargo, los resultados de degradación muestran que nuestro método para la determinación de pérdida de masa es muy variable, por ello se inició el perfeccionamiento de este proceso, con la finalidad de tener un método que nos permitiera tener resultados más confiables y sobre todo reproducibles.

10.2.6 Prueba de lavado del control con etanol y agua

A partir del medio donde se redujo a 2.0% el salvado de trigo se optó por lavar las espumas durante 24h en solución de NaClO en lugar de 16h debido a que en los medios cs10 y ds10 se vió que no se lograban eliminar completamente las células con 16 horas en NaClO, con este tiempo las espumas con crecimiento se limpian visiblemente mejor. Por ello se eligen 24h porque se logra una mayor eliminación de células en espumas con crecimiento. Nos hemos percatado que en todos los medios en reposo, se observan porcentajes de degradación altos en las espumas control (alrededor del 20.0%) esto se debe a que a la hora del lavado en solución de NaClO la espuma se debilita, y, en el control que no tiene crecimiento este debilitamiento es mayor, por ello y con el fin de buscar una alternativa de lavado de las espumas se probó lavar el control y las espumas con crecimiento de 3 formas distintas; etanol al 70%, solución de NaClO al 1.61% que se ha empleado en todas las determinaciones y agua destilada. Los resultados de este experimento se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. *Porcentaje de degradación de ePE-PU control sin inocular (lavadas en etanol al 70%, NaClO 1.61% y H2O destilada) e inoculadas con la cepa 4 lavadas con etanol al 70% y NaClO 1.61%.*

Cepa/lavado	Pérdida de masa (%)
Control/agua	0.13±0.13
Control/etanol	0.82±0.37
Control/NaClO	11.33±0.93
4/ NaClO	13.79±2.83
4/etanol	0.87±0.20

Como vemos en la tabla 12 el control lavado con NaClO tiene un porcentaje de degradación considerablemente mayor a los lavados con etanol y agua, contrario a lo que mencionan Mathur y Prasad (2012) sobre la eliminación de biomasa con un lavado en etanol al 70% en este ensayo se vió que en 24h el etanol no elimina las células que crecen dentro de las espumas y por consiguiente el porcentaje de degradación en la espuma no se refleja (0.87% contra 13.79% lavando con NaClO). Se siguió empleando la solución de NaClO para lavar los controles y espumas inoculadas, esto sin descartar la búsqueda de alguna otra forma de eliminar este crecimiento sin que se dañe la

espuma demasiado y así poder tener un método confiable para la determinación de la pérdida de masa de las espumas.

10.2.7 Prueba de degradación con 0.3% glucosa

Hasta este momento los medios semisólidos solo se habían probado en reposo por lo que se implementó una fermentación en agitación al igual que la probada en medio líquido disminuyendo la cantidad de glucosa en el MM de 1.0% a 0.3% con un número de esporas inoculado igual para todos los casos, los resultados de la degradación de las ePE-PU con esta condición se muestran en la figura 13.

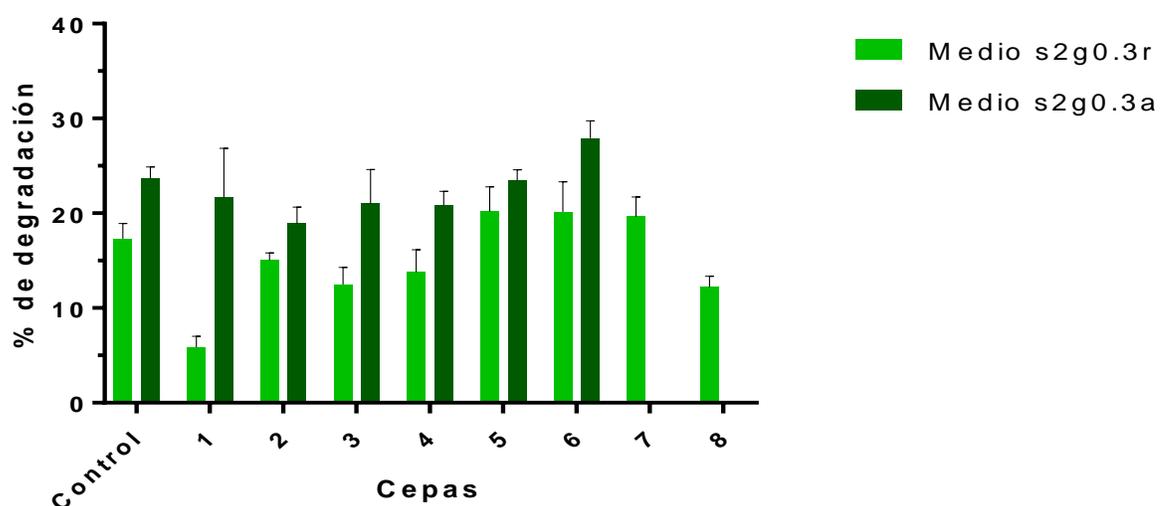
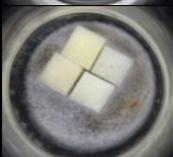


Figura 13. Porcentaje de degradación de ePE-PU sometidas a fermentación 8 días a 31°C con diferentes cepas de hongos en medios con 2% de salvado de trigo y 0.3% de glucosa a 100 rpm(a) y en reposo(r).

En esta prueba con agitación solo la cepa 6 presentó mayor porcentaje de degradación que el control (23.67), aún con ello los porcentajes de degradación son cercanos a 20% con las otras cepas y en su mayoría mayores en comparación con el medio cs10 que contenía 1% glucosa.

Para descartar degradación por tratamiento mecánico en las espumas se realizó una última prueba con este medio en reposo, en él se midió la degradación de ePE-PU con las 8 cepas en estudio, los resultados visuales de esta prueba se muestran en la tabla 13 y los numéricos se mostraron en la figura 13

Tabla 13. Medición de pH final en el líquido de fermentación y porcentaje de degradación de ePE-PU sometidas a fermentación (8 días a 31°C) con 2% salvado de trigo y 0.3% glucosa sin agitación.

CEPA	# esporas inoculadas	pH final	Imagen del crecimiento observado
Control	0	5.94	
1	1X10 ⁶	6.61	
2	1X10 ⁶	8.81	
3	1X10 ⁶	7.58	
4	1X10 ⁶	8.92	
5	1X10 ⁶	7.74	
6	1X10 ⁶	9.11	
7	1X10 ⁶	5.94	
8	1X10 ⁶	7.43	

Esta vez solo 3 cepas (5, 6 y 7) mostraron un porcentaje de degradación mayor al control (17.33%), se puede observar en las imágenes que el medio semisólido con salvado de trigo es factible para el crecimiento de las 8 cepas en estudio ya que en este medio todas las cepas incluyendo la 1 que mostró un porcentaje de degradación de 5.86% mostraron crecimiento o bien algún cambio en la apariencia del medio, el color observado en este crecimiento se asemeja al visto sobre las espumas en fermentación líquida del medio Ima (tabla 10) y al visto sobre medio PDAP de las cepas reactivadas, por lo que este aspecto puede ser empleado como una forma de vigilar que la cepa está creciendo sin contaminación, cabe decir que, en este último medio el inóculo se hizo sobre el medio a diferencia, por ejemplo, del medio c que se hizo sobre las espumas esto también influye sobre el aspecto del crecimiento del hongo, como se observa en las imágenes de la tabla 13 las espumas no presentan ninguna coloración y el crecimiento del hongo se ve sobre el medio. Al realizar el lavado se observó que solo la parte en contacto con el medio tenía un cambio de apariencia por lo que en la segunda etapa del proyecto para evaluar la bioestimulación y la degradación de las espumas se eligió este medio, pero con agitación ya que así permitimos que el hongo crezca dentro de las espumas y no solo en la superficie en contacto con el medio.

10.2.8 Determinación de actividades enzimáticas primera etapa

Para iniciar la búsqueda de las enzimas responsables de la degradación de las espumas de PE-PU, se determinó la actividad enzimática del filtrado libre de células obtenido en la fermentación líquida (medio lma) y semisólida con 2% salvado de trigo y 0.3% glucosa en reposo (medio s2g0.3r) en los cuales se habían probado las 8 cepas de estudio, la tabla 14 muestra los resultados de estas determinaciones.

Tabla 14. *Actividades amilasa, xilanasa, feruloilesterasa, esterasa y proteasa del líquido al final de la fermentación líquida en el medio con Impranil (lma) y semisólida en un medio con 2.0% de salvado de trigo y 0.3% de glucosa (sga) ambos agitados a 100rpm.*

CEPA	Actividad amilasa (U/mL)		Actividad xilanasa (U/mL)		Actividad feruloilesterasa (U/mL)		Actividad esterasa		Actividad proteasa (U/mL)	
	lma	sga	lma	sga	lma	sga	lma	sga	lma	sga
	Control	0.00	0.00	0.00	0.00	0	0	-	-	0
1	0.00	19.35	0.88	3.49	0	409	-	+	0	0
2	0.00	50.21	0.85	2.41	0	0	-	-	2.55	27.65
3	0.00	7.92	0.80	2.00	0	0	-	+	2.55	27.65
4	0.73	0.00	0.76	2.14	0	585	-	+	0	19.75
5	4.73	0.00	0.73	0.90	0	16.35	-	+	10.45	18.55
6	0.00	12.84	1.07	2.39	0	494.5	-	+	0	19.09
7	0.00	31.66	0.73	1.44	0	21.8	-	+	0	0
8	0.00	0.00	0.80	8.80	0	261.5	-	+	0	17.55

Con los resultados de la tabla 14 no es posible establecer aún la relación de las actividades enzimáticas con el % de degradación, pero se ve que en la mayoría de cepas que presentan mayor % de degradación en las ePE-PU que su control las actividades enzimáticas, si se presentaron, son más altas comparadas con las de menor % de degradación, aunque esto no siempre se cumple para todas las actividades.

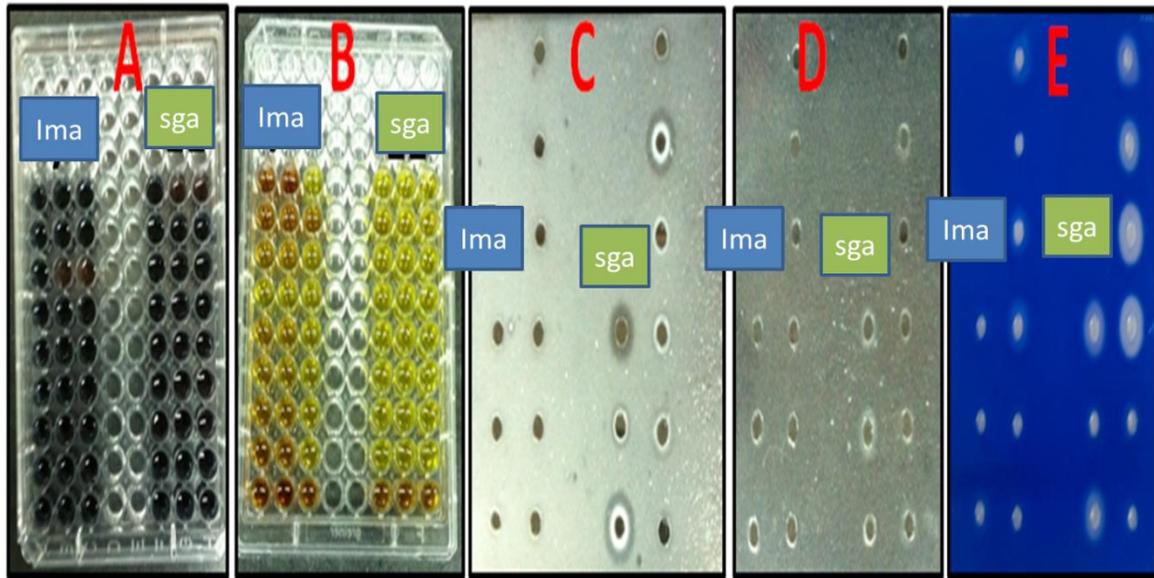


Figura 14. Imágenes de los ensayos realizados para determinar actividades enzimáticas amilasa (A), xilanasa (B), feruloilesterasa (C), esterasa (D) y proteasa (E) en las imágenes se probó un medio líquido con impranil, glucosa al 1.0% agitado a 100 rpm (Ima) y un medio semisólido con 2.0% de salvado de trigo, 0.3% glucosa a 100 rpm (sal).

En la figura 14 se puede observar que sólo en el medio con 2.0% salvado de trigo se presentaron las cinco actividades determinadas en alguna de las cepas evaluadas. Si recordamos, en el medio Ima, el cual contiene Impranil® (PS-PU soluble en agua) sin salvado de trigo, todas las cepas crecieron (tabla 10), sin embargo, las enzimas feruloilesterasa y esterasa no se encontraron. Los principales constituyentes del salvado de trigo son polisacáridos no amiláceos; 46%, almidón de 10-20%, proteínas de 15-22% y lignina de 4 a 8%. Los arabinoxilanos son los polisacáridos no amiláceos más abundantes (Zhang, 2011). La variedad de componentes del salvado de trigo podría inducir una variedad equivalente de enzimas útiles a la hora de degradar el poliuretano, por lo que para la segunda etapa del proyecto el medio con salvado de trigo fue la base para probar nuevos componentes que favorezcan la degradación de las ePE-PU.

10.3 Segunda etapa. formulación de un medio con bioestimulantes para favorecer el crecimiento de los hongos y la degradación de ePE-PU

El objetivo de la primera parte de esta investigación fue encontrar un medio y las condiciones de fermentación líquida o sumergida que favorecieran el crecimiento de las cepas de hongos y la degradación de ePE-PU. La estrategia que se exploró fue que el crecimiento de los hongos se iniciara a partir de substratos mas fáciles de asimilar que el poliuretano (salvado de trigo y glucosa) dosificados en cantidades limitantes para que, cuando se agotaran estas fuentes, la biomasa producida pudiera iniciar la degradación de las ePE-PU, que será en ese momento su único substrato disponible. En estas condiciones además de contar ya con una cantidad importante de biomasa también se cuenta con enzimas que pueden participar en la degradación del PU. Para la segunda etapa se eligió a la cepa A3.I.1 (*Cladosporium cladosporioides*) para inocular los diferentes medios de prueba debido a que en los experimentos anteriores fue una de las cepas que mostró casi siempre los mayores porcentajes de degradación con respecto a las otras 7 en estudio. En la primera etapa del estudio vimos que utilizando salvado de trigo, MM y glucosa era factible para el crecimiento de las 8 cepas de hongos. En los medios líquidos probados también se observa crecimiento, sin embargo, con el medio semisólido se logra un porcentaje de degradación en las ePE-PU mayor en tan solo 8 días de incubación, así como de más enzimas que pudieran favorecer la degradación de las espumas, por ello para esta segunda etapa se decidió emplear el medio semisólido como base para el crecimiento. Retomando las consideraciones que surgieron a lo largo de la primera etapa. Para iniciar las pruebas con otros bioestimulantes se formuló el medio que a continuación se describe:

- 1) Un medio semisólido base para el crecimiento de los hongos con 50 mL de MM al que se agrega glucosa al 0.3% y salvado de trigo al 2.0%.
- 2) Una ePE-PU recortada en trozos de 3X6X1 cms con la cual se tiene una mayor superficie de contacto que con los cubos de 2X2X2 cms y por otro lado puede manipularse mejor a la hora del lavado.

- 3) Agitación a 100 rpm durante la fermentación, una velocidad baja con la que se logra cubrir la espuma con el medio e impregnarla de nutrientes, facilitando el crecimiento de los hongos dentro de la misma.
- 4) El tiempo de fermentación de 21 días a 31°C, con este tiempo se pretende además de obtener más biomasa favorecer aún más la degradación de las ePE-PU.

10.3.1 Prueba de bioestimulación con uretano y urea

Como bioestimulantes se pensó en uretano debido a que siendo el monómero del poliuretano su utilización por el microorganismo induciría la producción de enzimas poliuretanasas que favorecerían la degradación de las ePE-PU, además se probó la urea debido a que su estructura podría inducir la producción de ureasas, enzimas que han sido reportadas como posiblemente involucradas en la degradación de PE-PU (Matsumiya y col., 2009). Para probar si el hongo crecía en medios con estos bioestimulantes se inocularon 20 μ L de suspensión de esporas de la cepa A3.I.1 en cajas petri con medios sólidos y se observó la apariencia de la cepa en los diferentes medios. Los resultados se muestran en la figura 15.

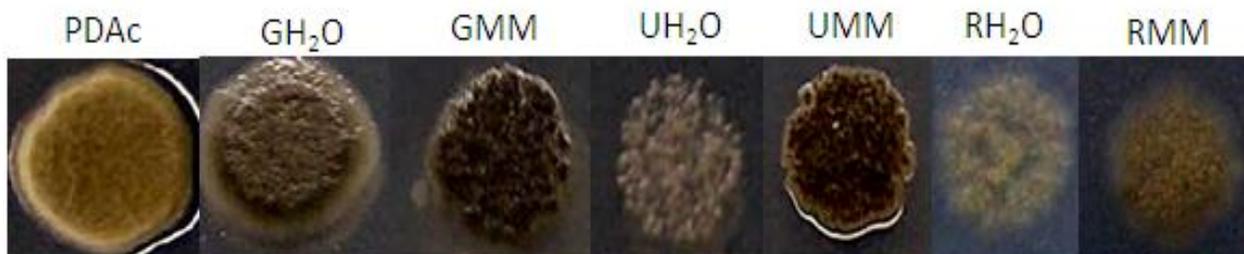


Figura 15. Crecimiento de la cepa A3.I.1 en medio Agar Papa Dextrosa comercial (PDAc), Agar con glucosa al 1% en agua (GH₂O), Agar con glucosa al 1% en medio mineral (GMM), Agar con uretano al 0.6% en agua (UH₂O), Agar con uretano al 0.6% en medio mineral (UMM), Agar con urea al 0.3% en agua (RH₂O) y Agar con urea al 0.3% en medio mineral (RMM). Se inocularon 20 μ L de suspensión de esporas y se incubaron durante 8 días a 31°C.

Como lo muestra la Figura 15 la cepa A3.I.1 es capaz de crecer en medios con uretano y urea como únicas fuentes de carbono (medios UH₂O y RH₂O).

Debido a los resultados anteriores en los que se prueba que este hongo es capaz de crecer utilizando el uretano y la urea como únicas fuentes de carbono se prosiguió a evaluar la acción de estos elementos sobre el crecimiento del mismo hongo en medios con espuma de PE-PU. Para esta prueba se utilizó un total de 8 medios con diferentes combinaciones de dichos componentes todos con un control sin inocular, el tiempo de fermentación fué de 21 días a 31°C, durante la fermentación cada 7 días se tomó una muestra de fermentación reponiendo la cantidad de líquido tomado con MM sin glucosa para mantener el mismo volumen hasta el final de la fermentación. Los resultados de la degradación en esta prueba se muestran en las tablas 15 y 16, las figuras 16 y 17 muestran resultados de azúcares reductores y pH durante la fermentación. Cabe decir que en experimentos anteriores se vió que en las espumas, la parte en contacto con los hongos se convertía en una especie de resina que posiblemente encapsulaba agua ya que las muestras con degradaciones visibles pesaban más que el control sin inocular. Cabe decir que de manera fortuita durante las pruebas de etanol para lavar los controles se encontró que éste disolvía la resina que se formaba en espumas degradadas este hecho fue de vital importancia porque podemos implementarlo en la cuantificación de pérdida de masa como se muestra en la tabla 15.

Tabla 15. Porcentaje de degradación de ePE-PU a los 21 días de fermentación a 31°C con *Cladosporium cladosporioides* y en un control sin inocular en medios con uretano y urea. En los medios **P**=ePE-PU recortada en trozos de 3X6X1 cms; **U**=Uretano al 0.6%; **S**=Salvado de trigo al 2.0%, **R**=Urea al 0.3% y **G**=Glucosa al 0.3% en 50 mL de MM).

Medio	Espumas después del lavado con NaClO Pérdida de masa (%)	% Disuelto en etanol al 96%	Considerando todo el proceso % Degradación
PUSG (C)	16.8±3.0	5.0±0.45	21.0±1.6
PUSG	25.8±1.6	77.5±0.67	83.3±3.3
PUG (C)	15.7±2.3	2.3±0.56	17.6±0.9
PUG	33.0±6.6	4.6±0.76	36.1±5.0
PRSG (C)	27.8±1.8	4.8±0.65	31.3±0.9
PRSG	43.4±3.0	2.3±0.36	44.7±4.9
PRG (C)	16.9±2.9	4.2±0.87	20.4±0.6
PRG	34.5±2.2	0.9±0.38	35.1±4.0
PSG (C)	15.8±1.8	3.0±0.43	18.3±1.6
PSG	15.5±2.4	45.1±0.65	53.6±3.7

Los resultados de la tabla 15 muestran que el método de determinación de pérdida de masa empleando solamente el lavado con NaClO arroja resultados subestimados de la degradación de las espumas, por ejemplo, las ePE-PU inoculadas de los medios PUSG y PSG muestran degradación mínima (25.8% y 15.5% respectivamente) frente a su control. Pero, como podemos corroborar en la tabla 16, estas muestras están considerablemente dañadas después de la fermentación con A3.1.1 y el lavado con NaClO, resultado que sí se refleja numéricamente después de tratar estas espumas en etanol al 96% donde se disuelven un 77.5% y 45.1% respectivamente. Con el tratamiento en etanol los resultados visuales de degradación en las ePE-PU son comparables con los numéricos, ya que con este tratamiento tanto las espumas que visiblemente no están degradadas y los controles se disuelven menos del 5.0%.

González-Hernández (2016) publicó que en espumas inoculadas con *Cladosporium tenuissimum* y tratadas con NaClO se puede detectar la presencia de 6-cloro-7-hidroxi-4-metilcumarina misma que no se presenta en espumas sin inocular. La presencia de este compuesto parece implicar la ciclación por acción de NaClO de algunos compuestos liberados de la espuma de PU tras la incubación. La resina que se forma

después del lavado de las espumas con NaClO puede deberse a la presencia de cumarinas hecho que debe corroborarse con la detección de los compuestos antes y después de la disolución en etanol.

Las cumarinas son compuestos incoloros que cristalizan en agujas o en prismas cortos, son poco solubles en agua fría, pero se disuelven fácilmente en agua a ebullición y cristalizan por el enfriamiento; son muy solubles en alcohol y en el éter y no ejercen reacción alcalina ni ácida (Joule, 2000). Suponiendo que sean cumarinas las responsables de la formación de la resina después del tratamiento con cloro, y debido que pueden disolverse en etanol dicha disolución fue incluida para cuantificar la degradación real de las espumas ya que dicho tratamiento estaría eliminando estos compuestos y puede cuantificarse la degradación real de las espumas.

Por otro lado podemos ver que considerando todo el tratamiento con etanol los controles presentan un porcentaje de degradación comparable en los medios con uretano y glucosa (alrededor de 20%). No es así en los medios con urea donde el control y la muestra inoculada presentan porcentajes de degradación similares por lo que este componente tiene un efecto desconocido sobre las espumas o sobre el crecimiento del hongo que no permite obtener resultados favorables en la degradación de las ePE-PU.

Tabla 16. Registro fotográfico del crecimiento de la cepa A3.I.1 a los 21 días de fermentación a 31°C en medios con uretano y urea así como el tratamiento posterior a las ePE-PU con etanol al 96%. En los medios P=ePE-PU recortada en trozos de 3X6X1 cms; U=Uretano al 0.6%; S=Salvado de trigo al 2.0%, R=Urea al 0.3% y G=Glucosa al 0.3% en 50 mL de MM.

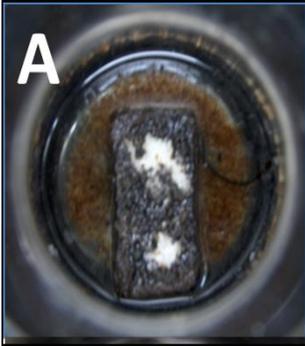
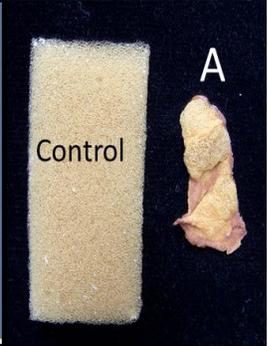
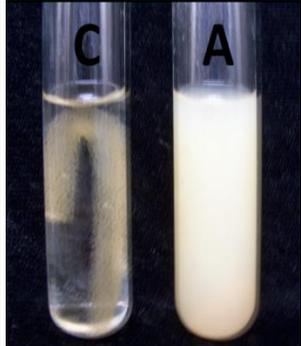
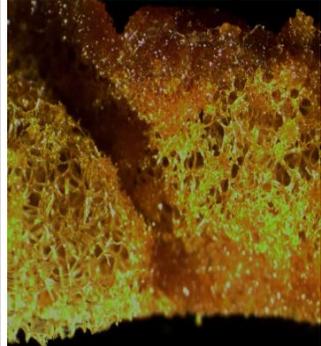
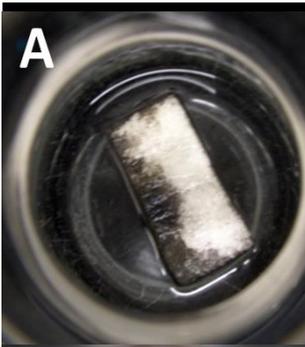
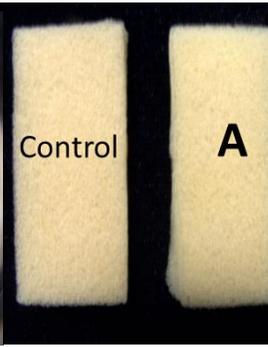
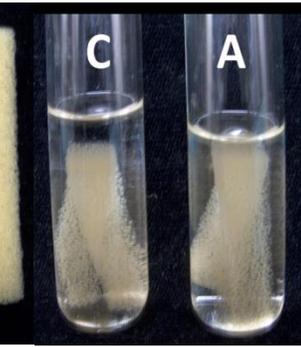
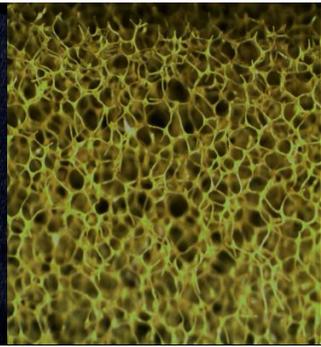
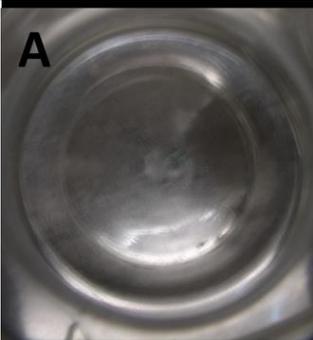
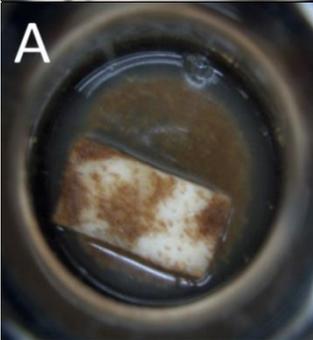
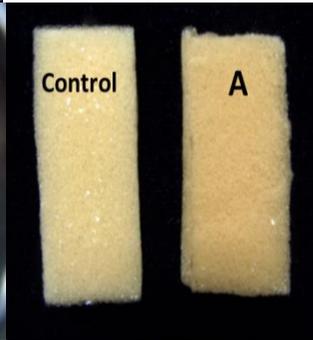
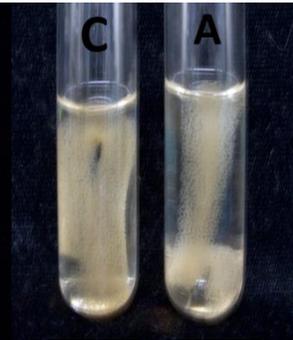
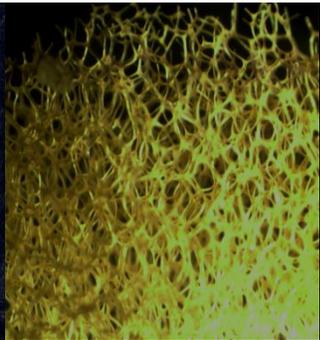
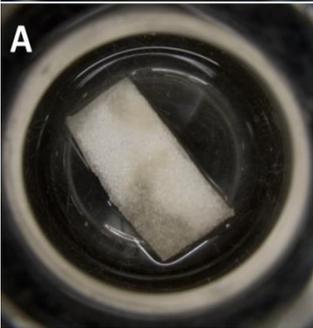
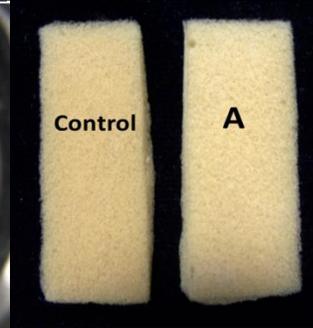
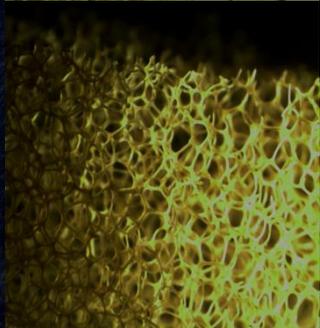
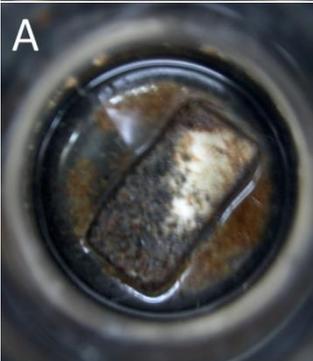
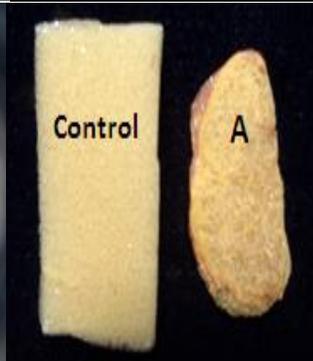
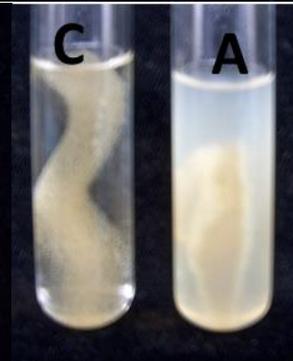
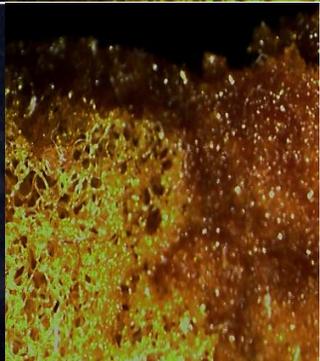
Medio	Crecimiento a los 21 días de fermentación	Espumas después del lavado con NaClO (A=Inoculada)	Espumas en etanol al 96% (C=Control)	Espuma A vista en microscopio estereoscópico
PUSG				
PUG				
USG				
UG				

Tabla 16 continuación. Registro fotográfico del crecimiento de la cepa A3.I.1 a los 21 días de fermentación a 31°C en medios con uretano y urea así como el tratamiento posterior a las ePE-PU. En los medios P=ePE-PU recortada en trozos de 3X6X1 cms; U=Uretano al 0.6%; S=Salvado de trigo al 2.0%, R=Urea al 0.3% y G=Glucosa al 0.3% en 50 mL de MM).

Medio	Crecimiento a los 21 días de fermentación	Espumas después del lavado (A=Inoculada)	Espumas en etanol al 96% (C=Control)	Espuma A vista en microscopio estereoscópico
U				
PRSG				
PRG				
PSG				

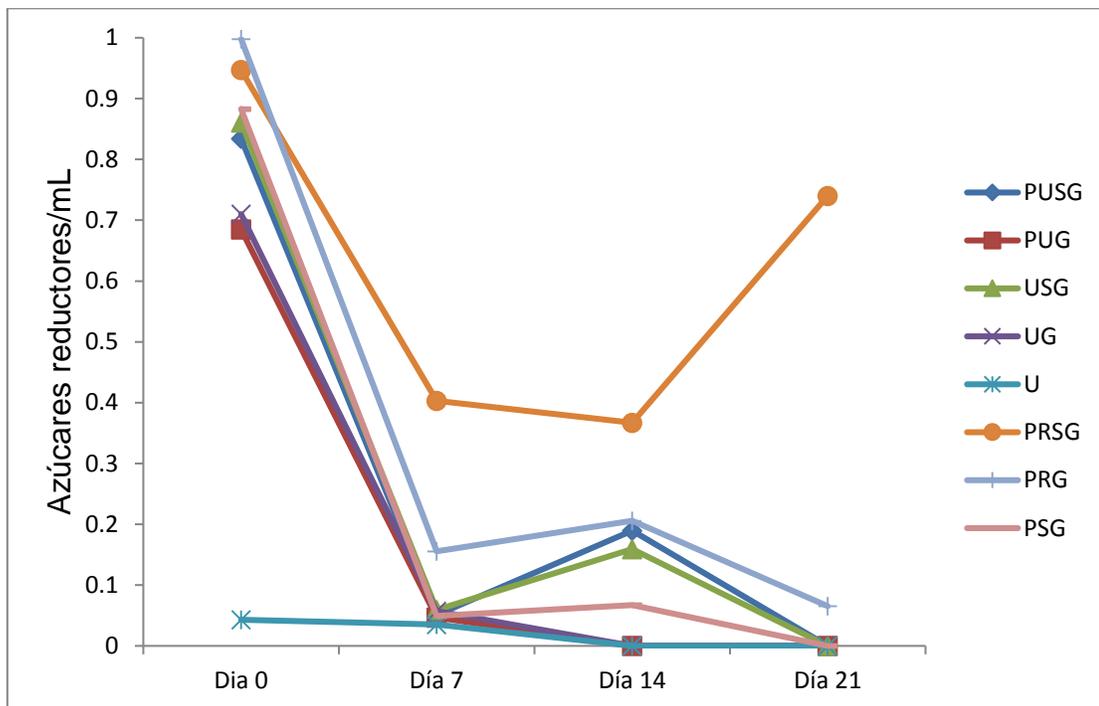


Figura 16. Azúcares reductores en el líquido de fermentación con A3.I.1 en medios con *P*=ePE-PU recortada en trozos de 3X6X1 cms; *U*=Uretano al 0.6%; *S*=Salvado de trigo al 2.0%, *R*=Urea al 0.3% y *G*=Glucosa al 0.3% en 50 mL de MM.

Los polisacáridos se hidrolizan, entonces mostrarán las características reductoras de sus monómeros constituyentes (Véjar, 2005). La figura 16 muestra como los azúcares reductores presentes en el medio al día 7 prácticamente desaparecen con una tendencia a disminuir hasta el final de la fermentación (día 21). En el caso del medio con salvado y urea se observó aumento de azúcares reductores, posiblemente en estas condiciones el hongo ya no estaba creciendo, de modo que los azúcares producidos por la degradación de los polisacáridos presentes en el salvado se acumularon en el medio.

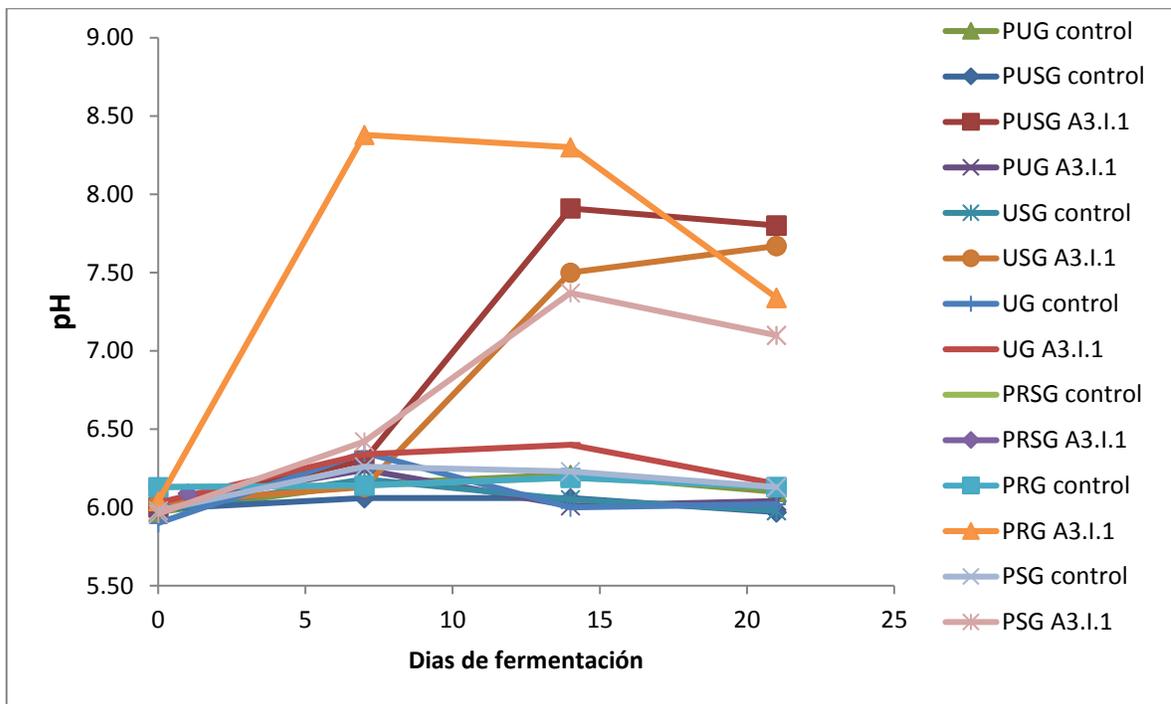


Figura 17. Medición de pH en el líquido de fermentación con A3.I.1 en medios con P=ePE-PU recortada en trozos de 3X6X1 cms; U=Uretano al 0.6%; S=Salvado de trigo al 2.0%, R=Urea al 0.3% y G=Glucosa al 0.3% en 50 mL de MM.

De acuerdo al comportamiento del pH podemos suponer que la alcalinización del medio se debe a que los hongos activaron una vía de utilización del nitrógeno para seguir creciendo. La única vía metabólica de utilización del nitrógeno a partir de nitrato (presente en el MM) es por reducción a nitrito y luego a amoníaco mediante la acción de la enzima nitrato reductasa. La mayoría de los hongos pueden utilizar amonio como única fuente de nitrógeno, el que penetra en las células por transporte activo, para participar en la conversión de aminoácidos (Lurá y col., 1997). Si los hongos dejan de crecer el amoníaco liberado se concentra en el medio de cultivo, por lo que el pH del medio tiende a incrementarse produciendo la alcalinización del medio. Por otro lado, también podría deberse a la presencia de aminas, derivadas de la degradación del enlace uretano en el poliuretano hecho que ha sido demostrado (Matsumiya, 2009; González-Hernández, 2016).

10.3.2 Prueba con diferentes porcentajes de uretano

En la prueba con ureano y urea con el medio PUSG se logró mayor degradación de la ePE-PU, comparado contra el medio PSG por lo que podríamos decir que el uretano favorece la degradación de las espumas. Debido a esto se eligió el medio PUSG para evaluar el efecto que tendrían distintos porcentajes de uretano sobre la degradación de las espumas los resultados de este experimento se muestran en las tablas 17 y 18.

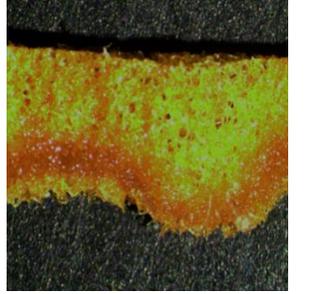
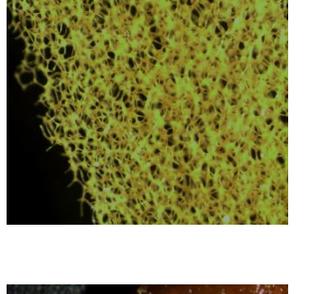
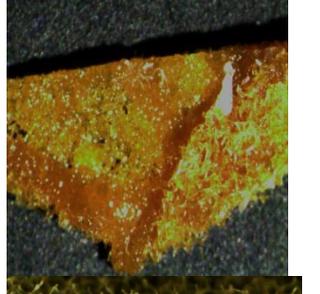
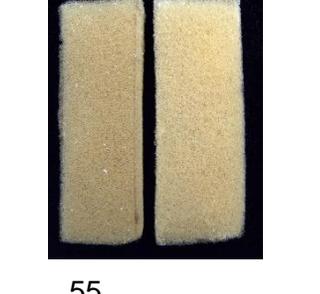
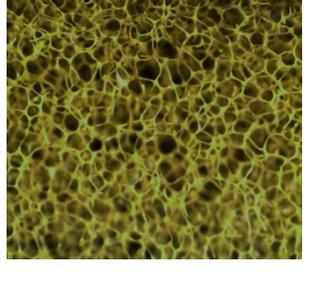
Tabla 17. Porcentaje de degradación de ePE-PU a los 21 días de fermentación a 31°C con A3.I.1 y en un control sin inocular en el medio PUSG (P=ePE-PU recortada en trozos de 3X6X1 cms; U=Uretano al x %; S=Salvado de trigo al 2.0%, y G=Glucosa al 0.3% en 50 mL de MM).

% Uretano	Cepa	Espumas lavadas con NaClO Pérdida de masa (%)	% Disuelto en etanol	Considerando todo el proceso % Degradación
0%	Control	18.1±3.5	1.9±0.56	19.6±1.5
0%	A3.I.1	9.0±1.7	63.1±0.76	66.4±2.8
0.3%	Control	14.4±0.6	2.3±0.67	16.3±1.7
0.3%	A3.I.1	21.0±1.7	9.0±0.34	38.1±4.9
0.3% *	Control	13.5±3.4	3.8±0.25	16.8±0.7
0.3% *	A3.I.1	15.7±2.1	84.8±0.59	87.2±2.7
0.60%	Control	20.0±1.7	3.7±0.45	23.0±1.6
0.60%	A3.I.1	10.8±4.0	66.9±0.63	76.5±2.4
1.00%	Control	22.8±3.7	2.8±0.32	25.0±1.8
1.00%	A3.I.1	18.1±2.3	4.3±0.47	21.6±3.5

*Indica restitución de glucosa al medio para volver a tener 0.3% cada 7 días en los otros medios solo se agregó al inicio y se recuperó MM sin glucosa.

Se ha observado en diversos estudios que la bioestimulación se puede lograr mediante la adición en el cultivo de nutrientes limitantes, donadores o aceptores de electrones y moléculas en una concentración suficiente para no inhibir la degradación (Kannisery y Sims, 2011; Adams y col. 2014) en cuanto al porcentaje de uretano vemos que posiblemente al 1.0% se inhiba la degradación de la espuma, vemos que adicionando glucosa solo al inicio el porcentaje de uretano óptimo para favorecer la degradación de la espuma sería 0.6%, pero también es obvio que con 0.3% uretano y agregando glucosa cada 7 días la degradación es más favorecida que si no se agrega por lo que podemos concluir que la adición de azúcares simples favorece más la degradación debido a que estos son asimilados por los hongos rápidamente.

Tabla 18. Registro fotográfico del crecimiento de *Cladosporium cladosporioides* a los 21 días de fermentación a 31°C en el medio PUSG (P=ePE-PU recortada en trozos de 3X6X1 cms; U=Uretano al x%; S=Salvado de trigo al 2.0%, y G=Glucosa al 0.3% en 50 mL de MM).

<p>% Uretano</p>	<p>Crecimiento a los 21 días de fermentación</p>	<p>Espumas después del lavado con NaClO (Derecha=Inoculada)</p>	<p>Espuma Inoculada vista en microscopio estereoscópico 1.0 de magnificación</p>
<p>0.0%</p>			
<p>0.3%</p>			
<p>0.3%*</p>			
<p>0.6%</p>			
<p>1.0%</p>			

Con los resultados de este último experimento comprobamos cómo entre mayor y mejor sea el crecimiento del hongo mayor es el daño que provoca este en la espuma. En las imágenes de espumas dañadas y controles observadas al microscopio estereoscópico de las tablas 16 y 18 podemos concluir que el daño provocado por el hongo se da en la estructura de la espuma convirtiéndola en una especie de resina que se disuelve en etanol. Este hecho es considerable ya que de esta manera se demuestra la degradación de ePE-PU por pérdida de masa.

10.3.3 Determinación de actividades enzimática segunda etapa

Se determinaron actividades enzimáticas en el líquido de fermentación de los diferentes medios probados en la segunda etapa del proyecto. Para los medios con uretano se obtuvieron los siguientes resultados.

Tabla 19. *Actividades amilasa, xilanasa, feruloilesterasa, esterasa y proteasa en el líquido los medios con uretano a los 7, 14 y 21 días de fermentación con A3.I.1.*

Medio	Actividad amilasa (U/mL)	Actividad xilanasa (U/mL)	Actividad feruloilesterasa (U/mL)	Actividad esterasa	Actividad proteasa (U/mL)
PUSG t7	15.67	8.34	578.8	+	16.87
PUSG t14	17.98	7.76	17.86	-	0.00
PUSG t21	23.34	8.45	0.00	-	0.00
PUG t7	0.00	0.00	2.83	-	0.00
PUG t14	0.00	0.00	0.89	-	0.00
PUG t21	0.00	0.00	0.00	-	0.00
PRSG t7	2.45	0.05	17.89	-	6.87
PRSG t14	1.78	0.00	18.94	-	7.65
PRSG t21	2.01	0.00	28.65	-	3.87
PRG t7	0.00	0.00	0.00	-	0.00
PRG t14	0.00	0.00	0.00	-	0.00
PRG t21	0.00	0.00	0.00	-	0.00
PSG t7	13.67	1.78	387.9	+	6.43
PSG t14	16.75	2.34	0.00	-	0.00
PSG t21	19.43	1.89	0.00	-	0.00

En los medios **P**=ePE-PU recortada en trozos de 3X6X1 cms; **U**=Uretano al 0.6%; **S**=Salvado de trigo al 2.0%, **R**=Urea al 0.3% y **G**=Glucosa al 0.3% en 50 mL de MM.

t7: 7 días de fermentación, t14: 14 días de fermentación y t21: 21 días de fermentación.

En la tabla 19 observamos que para los medios PUSG y PSG las 5 actividades enzimáticas estudiadas están presentes a los 7 días de iniciada la fermentación, en estos mismos medios las actividades de amilasas y xilanasas están presentes durante

toda la fermentación hecho que no ocurre con la actividad de feruloiesterasas, esterasas y proteasas cuya actividad se presentó solo a los 7 días de fermentación y desaparece en los siguientes días. El comportamiento anterior nos sugiere que las enzimas amilasa y xilanasa posiblemente no están involucradas en la degradación del poliuretano y que el hongo las emplea solo para obtener energía a partir del salvado de trigo pues además estas actividades no se presentaron en medios sin salvado. El hecho de que las otras tres actividades probadas no se presenten al final de la fermentación nos hizo pensar que posiblemente dichas enzimas habían quedado atrapadas entre la biomasa crecida sobre la espuma y que posiblemente de esta manera participan en la degradación de esta última, para confirmar esta sospecha se decidió extraer las proteínas de la biomasa y evaluar su actividad enzimática, este ensayo se realizó solo con muestras de la prueba 10.3.2 los resultados se presentan en la tabla 20 y la figura 18.

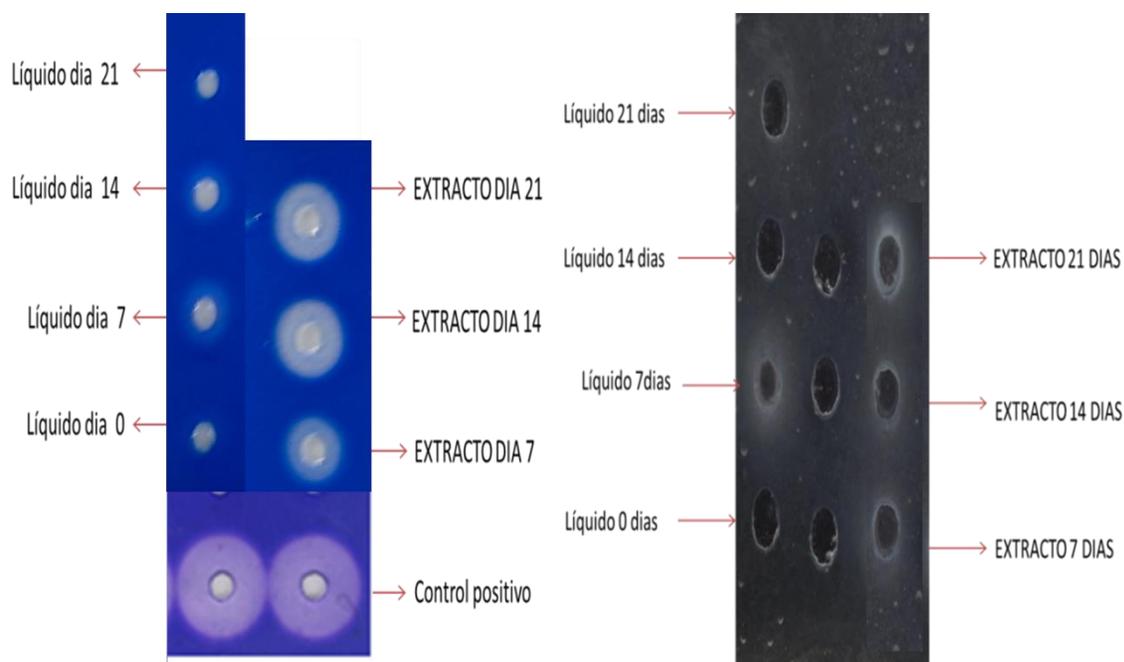


Figura 18. Imágenes de ensayos enzimáticos de proteasa (azul) y esterasa (gris) en ambos se probó el líquido de la fermentación en el medio 0.3%* uretano y extractos de proteína de la biomasa recolectada sobre la espuma en un ensayo con este mismo medio a los 7, 14 y 21 días de fermentación.

Tabla 20. Actividades amilasa, xilanasa, feruloilesterasa, esterasa y proteasa en el líquido de fermentación (LF) y en el extracto proteico de la biomasa (EXT) a los 7, 14 y 21 días de fermentación en el medio PUSG con diferentes porcentajes de uretano. (P=ePE-PU recortada en trozos de 3X6X1 cms; U=Uretano al x %; S=Salvado de trigo al 2.0%, y G=Glucosa al 0.3% en 50 mL de MM).

% Uretano	Actividad amilasa (U/mL)		Actividad xilanasa (U/mL)		Actividad feruloilesterasa (U/mL)		Actividad esterasa		Actividad proteasa (U/mL)	
	LF	EXT	LF	EXT	LF	EXT	LF	EXT	LF	EXT
0% t7	12.1	2.3	1.6	0.0	287.6	98.2	+	+	7.1	6.3
0% t14	14.5	3.5	3.8	0.0	0.0	75.9	-	+	7.4	18.4
0% t21	18.4	4.1	2.8	0.0	0.0	78.4	-	+	0.0	18.9
0.3% t7	12.5	0.8	4.5	0.0	185.2	0.0	+	+	0.0	0.6
0.3%t14	15.6	1.2	6.4	0.0	236.9	0.0	+	+	0.0	1.5
0.3% t21	16.7	2.3	5.7	0.0	201.8	0.0	+	+	0.0	2.8
0.3%* t7	14.2	0.0	3.7	0.0	489.0	20.8	+	+	6.5	7.3
0.3%* t14	12.1	3.9	4.8	0.0	237.4	56.8	-	+	6.9	18.4
0.3%* t21	12.3	2.6	4.3	0.0	167.4	45.3	-	+	0.0	18.9
0.6% t7	16.3	0.7	6.7	0.0	502.1	68.4	+	+	6.6	5.1
0.6%t14	17.9	1.8	7.4	0.0	28.5	78.6	-	+	7.3	15.6
0.6% t21	18.6	0.4	7.8	0.0	0.0	86.3	-	+	0.0	15.7
1.0% t7	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0
1.0% t14	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0
1.0% t21	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	-	-	0.0	0.0

*Indica adición al medio de 0.3% glucosa en el total de líquido cada 7 días posterior al muestreo en los otros medios solo se agregó glucosa al inicio y se recuperó MM sin glucosa en cada muestreo.

La tabla 20 muestra que la enzima xilanasa no está presente en el extracto proteico por lo que esta enzima posiblemente el hongo sólo la utilice para degradar el polisacárido del salvado de trigo y no participe en la degradación de la espuma.

El líquido de fermentación tiene una actividad de proteasas baja a los 7 y 14 días de iniciada la fermentación y a los 21 días esta actividad desaparece por completo, por lo que se pensó que las enzimas estaban siendo adsorbidas o retenidas entre la biomasa y la estructura de la espuma (Taylor, 1991). Las enzimas proteasa y esterasa parecen producirse pero no se liberaron al medio sino que quedaron inmovilizadas en la biomasa crecida sobre las espumas ya que en el extracto proteico se presenta una mayor actividad de proteasas a los 14 y 21 días de fermentación.

11. CONCLUSIONES

- La proliferación del hongo dentro y sobre la espuma es mayor al emplear agitación durante la fermentación que en reposo.
- Se logra una mayor degradación de las espumas al usar estimulantes en cantidades limitantes y dosificadas que en exceso.
- El salvado de trigo, uretano y glucosa en conjunto pueden emplearse como estimuladores del crecimiento para *Cladosporium cladosporioides* sobre espumas de PE-PU.
- *Cladosporium cladosporioides* es capaz de crecer en ePE-PU y degradarlas hasta un 87.2%.
- El uso de salvado de trigo en los medios con espumas de PE-PU favorece la producción de más enzimas que usando Impranil® (éster poliuretano soluble en agua).
- Se identificaron proteasas y esterases en la biomasa que podrían participar en la degradación de las espumas.

12. PERSPECTIVAS

- Realizar análisis por espectroscopía de infrarrojo para evidenciar los cambios estructurales en las espumas tratadas y los controles.
- Identificar por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas los compuestos presentes en el medio antes y después de la fermentación, en el líquido del lavado con NaClO y en el etanol después de disolver las espumas tratadas y los controles, para sugerir un mecanismo de degradación.
- Identificar otras enzimas en el filtrado enzimático mediante zimogramas.
- Probar condiciones de agitación/reposo durante la fermentación para ver la posibilidad de reducir el tiempo de agitación sin afectar la degradación de las espumas con el fin de hacer más sustentable dicho proceso.
- Diseñar un prototipo de bioproceso con condiciones controladas en el medio PUSG.

13. ANEXOS

ANEXO 1. Preparación de medios y reactivos

A lo largo del proyecto se probaron varios medios cuyas características se enlistan en la tabla I, todos los medios fueron preparados en matraces Erlenmeyer de 500 mL y esterilizados en autoclave a 121°C por 20 minutos.

Tabla I. Medios de fermentación probados para el crecimiento de las cepas y degradación de espumas de PE-PU en la primera etapa del proyecto: formulación de un medio base para el crecimiento.

Condiciones probadas	Medio cs10	Medio ds10	Medio e	Medio s2g1r
Estado físico	Semisólido en reposo	Semisólido en reposo	Líquido en reposo	Semisólido en reposo
Composición	*5g de salvado de trigo *50 mL de medio mínimo (MM) con glucosa al 1%	Igual al medio cs10	*0.5 mL de azida de sodio *3.5 mL de buffer de acetatos 100 Mm pH 5 ó de H ₂ O destilada *1 mL de filtrado enzimático libre de células	*1g de salvado de trigo *50 mL de MM con glucosa al 1%
Recuperación de MM	SI: 10 mL de MM sin glucosa al 3er. día y otros 10 mL al 6to día.	Igual al medio cs10	NO	NO
Tamaño y forma de espumas de PU	4 ePE-PU en forma de cubos de aprox. 2X2X2 cm.	1 ePE-PU cortada en discos de 8cm diámetro x 2 mm de espesor	1 ePE-PU en forma de cubos de aprox. 2X2X2 cm.	4 ePE-PU en forma de cubos de aprox. 2X2X2 cm.
Incubación	8 días a 31°C	8 días a 31°C	15 días a 37°C	8 días a 31°C
Lavado de las espumas de PU	16 horas en NaClO al 1.61%	16 horas en NaClO al 1.61%	2 lavados con 50mL de H ₂ O destilada c/uno	24 horas en NaClO al 1.61%
Secado de espumas	72 horas a 25°C	72 horas a 25°C	72 horas a 37°C	72 horas a 37°C
# Esporas inoculadas	Diferente p/cada cepa	Diferente p/cada cepa	NINGUNA	1X10 ⁶

Tabla I Continuación. Medios de fermentación probados para el crecimiento de las cepas y degradación de espumas de PE-PU en la primera etapa del proyecto: formulación de un medio base para el crecimiento.

Condiciones probadas	Medio PLr	Medio lmr	Medio lma	Medio tiempos de fermentación	Medio s2g0.3a	Medio s2g0.3r
Estado físico	Líquido en reposo	Líquido en reposo	Líquido con agitación	Semisólido en reposo	Semisólido agitando a 100 rpm	Semisólido en reposo
Composición	50 mL de MM con 1% glucosa y 0.3% Polylack®	50 mL de MM con 1% glucosa y 1% Impranil®	50 mL de MM con 0.3% glucosa y 1% Impranil®	*1g de salvado de trigo *50 mL de MM con glucosa al 0.3%	*1g de salvado de trigo *50 mL de MM con glucosa al 0.3%	*1g de salvado de trigo *50 mL de MM con glucosa al 0.3%
Recuperación de MM	Igual al medio cs10	Igual al medio cs10	Igual al medio cs10	Igual al medio cs10	Igual al medio cs10	Igual al medio cs10
Tamaño y forma de espumas de PU	Igual al medio cs10	Igual al medio cs10	Igual al medio cs10	Igual al medio cs10	Igual al medio cs10	Igual al medio cs10
Incubación	8 días a 31°C	8 días a 31°C	8 días a 31°C	8,16 y 24 días a 31°C	8 días a 31°C	8 días a 31°C
Lavado de las espumas de PU	24 horas en NaClO al 1.61%	24 horas en NaClO al 1.61%	24 horas en NaClO al 1.61%	24 horas en NaClO al 1.61%	24 horas en NaClO al 1.61%	24 horas en NaClO al 1.61%
Secado de espumas	72 horas a 25°C	72 horas a 25°C	72 horas a 25°C	72 horas a 37°C	72 horas a 37°C	72 horas a 37°C
# Esporas inoculadas	Diferente p/cada cepa	Diferente p/cada cepa	1X10 ⁶	1X10 ⁶	1X10 ⁶	1X10 ⁶

Medio mínimo mineral (MM) para crecimiento microbiano (Pontecorvo, 1953)

- NaNO₃ 0.6%
- KH₂PO₄ 0.15%
- KCl 0.05%
- MgSO₄·7H₂O 0.05%

Se pesaron los componentes y se disolvieron en agua destilada ajustando el pH a 6.0 antes de agregar a los matracez.

Medio completo (MC) para recuperación de cepas.

- Medio mínimo mineral (MM)
- Dextrosa Anhidra Baker® 1.0%
- Peptona de carne 0.2%
- Agar bacteriológico 1.5%

Se ajustó el pH a 6.0 con HCl y/o NaOH y se esterilizó en autoclave a 121°C por 15 minutos. La cajas petri se prepararon e inocularon asépticamente en una campana de flujo laminar.

Medio PDAc para conservación de cepas.

Se utilizó un medio comercial de la marca BDBioxon® cuya fórmula aproximada para 1L de agua purificada es:

- Infusión de papa (Sólidos) 4.0 g
- Dextrosa 20.0 g
- Agar 15.0 g

pH final 5.6±0.2

Se disolvió el medio en agua destilada y se esterilizó a 121°C durante 15 minutos. Cuando se enfrió se vertió en cajas petri en condiciones asépticas (camara de flujo laminar). Se realizó la prueba de esterilidad dejándolas en incubación a 37°C por 72 horas, si las cajas pasaban la prueba de esterilidad se conservaban en refrigeración y/o eran usadas para resembrar las cepas.

Medio PDAP preparado en el laboratorio

Para 1L

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 1L 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 durante 15 minutos.

Buffer de extracción de proteínas

- Buffer de fosfatos 50 mM pH 7.0
- MgCl₂ 5 mM
- Mercapetanol 5 mM
- EDTA 0.5 mM

Disolver los compuestos sólidos en el buffer y ajustar el pH a 7.0

14. REFERENCIAS.

1. Adams G.O., Fufeyin P.T., Okoro S.E. and Ehinome I. (2015). Bioremediation, Biostimulation and Bioaugmentation: a review. *Int J Environl Bioremed & Biodegrad.* 3: 28-39.
2. Alavi-Nikje M.M., Bagheri-Garmarudi A., Idris B.A. (2011). Polyurethane wast reduction and recycling: from bench to pilot scales. *Designed Monomers and Polymers*, 14:395-421.
3. Álvarez-Barragán, J. (2013). Aislamiento e identificación de hongos capaces de degradar poliuretano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
4. Barratt S.R., Ennos A.R., Greenhalgh M., Robson G.D., Handley P.S. (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.
5. BASF The Chemical Company S.A. de C.V. (2012). BASF's Polyurethenes Division, driving efficiency, confort and sustainability [En línea] (Actualizado al 5 de septiembre de 2012). Disponible en:
http://www.basf.com/group/corporate/en_GB/function/conversions:/publish/content/investorrelations/calendar/images/120905/BASF_Investor_Day_Automotive_Polyurethanes.pdf [Último acceso el 19 de noviembre de 2014].
6. Bayer Science for a better Life S.A. (2012). Modern Foam Production in Harmony with Global Trends. [En línea] (Actualizado al 22 de noviembre de 2013). Disponible en:
[http://www.press.bayer.com/baynews/baynews.nsf/id/E7D0AF768483C868C1257C2B002E3BCD/\\$File/2013-1516e.pdf?open&mod=22.11.2013_10:53:27](http://www.press.bayer.com/baynews/baynews.nsf/id/E7D0AF768483C868C1257C2B002E3BCD/$File/2013-1516e.pdf?open&mod=22.11.2013_10:53:27) [Último acceso el 19 de noviembre de 2014].
7. Betini H.A., Michelin M., Peixoto S.C., Terenzi H.F. and Polizeli M. (2009). Xilanases from *Aspergillus niger*, *Aspergillus niveus* and *Aspergillus ochraceus* produced under solid-state fermentation and their application in cellulose pulp bleaching. *Bioprocess Biosyst*, 32:819-824.
8. Boubendir, A. (1993). Purification and biochemical evaluation of polyurethane degrading enzymes of fungal origin. *Discusing Abstract International*, 53, 4632.

9. Bridgestone Automotive Products de México S.A. de C.V. 2013. Bridgestone to Build a Plant in Mexico for the Manufacture of Polyurethane Foam for Automotive Seats. [En línea] (Actualizado al 28 de octubre de 2013). Disponible en: <http://www.bridgestone.com/corporate/news/2013102801.html>. [Último acceso el 19 de noviembre de 2014].
10. Brown W.E., Bartlet C., Aul D.J., Blogh M.S., D'Andrea M. and Hauck J.T. (1999). Monitoring potential degradation of polyurethanes in a landfill simulator. *Polyurethanes*, 99:369-72.
11. Cangemi J.M., Dos Santos A., Nieto S.C., Chierice G.O. (2008). Biodegradation of polyurethane derived from castor oil. *Polímeros; Ciencia e Tecnología*. 18:201-206.
12. Cannel E. & Moo-Young M. 1980. Solid-state fermentation system. *Process Biochemistry*, 15, 2-7.
13. Chibata I. and Tosa T. (1980). Immobilized microbial cells and their applications. *Trends Biochem. Sci.* 5:88-90.
14. Conde-Ortíz M.P. (2012). Presente y Futuro de la industria del plástico en México. Disponible en: <http://www.ptq.pemex.gob.mx/productosyservicios/eventosdescargas/Documents/Foro%20PEMEX%20Petroqu%C3%ADmica/2012/03%20Mercado%20pl%C3%A1sticos%202012.pdf>. [Último acceso el 25 de Agosto de 2016]
15. Cosgrove L., McGeechan P.L., Handley P.S., Robson G.D. (2010). Effect of biostimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. *App Environ Microbiol.* 76:810-819.
16. Cosgrove L., McGeechan P.L., Robson G.D., Handley P.S. (2007). Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *App Environ Microbiol.* 73:5817-5824.
17. Crabbe J. R., Campbell J. R., Thompson L., Walz S. L. And Schultz W. W. (1994). Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *Int. Biodeterior. Biodegrad.* **33**:103–113.
18. Cregut M., Bedas M., Durand M.J., and Thouand G. (2013). New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotechnol Adv.* 31(8):1634-1647.

19. D'Addario M. (2012). Técnicas de mecanizado industrial. Editorial Fulgor. Comunidad Europea. Págs. 130-132.
20. Darby R.T. and Kaplan A.M. (1968). Fungal Susceptibility of Polyurethanes. Appl. Microbiol, 16:900-905.
21. Filip Z. (1979). Polyurethane as the sole nutrient source for *Aspergillus niger* and *Cladosporium herbarum*. Europ J Appl Microbiol Biotechnol. 15:20-24
22. Forrest M.J. (1999). Chemical Characterisation of Polyurethanes. Rapra Technology Limited, 9(12):3-13.
23. Gómez W., Gaviria y Cardona S. (2009). Evaluación de la bioestimulación frente a la atenuación natural y la bioaumentación en un suelo contaminado con una mezcla de gasolina – diesel. Dyna, Año 76, Nro. 160, pp. 83-93. Medellín. ISSN 0012-7353.
24. González-Hernández R. A. (2016). Optimización del cultivo de hongos filamentosos para biodegradar espumas de poliéter poliuretano y determinación de actividades enzimáticas relacionadas. Tesis Maestría. Facultad de Química. UNAM.
25. Gu J. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. International Biodeterioration & Biodegradation, 52(11): 69–91.
26. Hincapié G.A. y Ramírez M.E. (2009). Evaluación de la biodegradación aerobia de poliuretano residual generado en la industria de fabricación de refrigeradores. Rev Invest Apl. 5:15-25.
27. Howard G.T. (2002). Biodegradation of poliurethane: a review. International Biodeterioration & Biodegradation, 49(4):245–252.
28. Howard G.T. (2011). Microbial biodegradation of Polyurethane. Recent Developments in Polymer Recycling, 1:215-238.
29. Howard G.T. and Blake R.C. (1998). Growth of *Pseudomonas fluorescens* on a polyester-polyurethane and the purification and characterization of a polyurethanase-protease enzyme. Int Biodetrrior Biodeg. 42:213-220.
30. Ibrahim I.N., Maraqa A., Hameed K.M., Saadoun I.M. and Maswadesh H.M. (2011). Assessment of potential plastic-degrading fungi in Jordanian habitats. Turk J Biol. 35:551-557.

31. Joule J.A. and Mills K. (2000) *Heterocyclic Chemistry*, cuarta edición. Blackwell Science. Oxford, UK.
32. Kannisery R.G. and Sims G.K. (2011) Biostimulation for the enhanced degradation of herbicides in soil. *App Environ Soil Sci*. Doi. 10.1155/2011/843450
33. Kay M.J., McAbe R.W. and Morton L.G.H. (1993). Chemical and physical changes occurring in polyester polyurethane during biodegradation. *Int Biodet Biodeg*.31:209-225.
34. Kendrick B. (2000).. *The fifth kingdom*. Third edition. Focus publishing. Massachussets, E.U.A., 373.
35. López A., García M. y Quintero R. (2004) *Biología Alimentaria*. Ediciones Limusa Noriega. México. Pág.585.
36. Loredó A., García G., Velasco A., Rodríguez R., Aguilar C.N. (2011). Polyurethane foam as substrate for fungal strains. *Adv. Biosci Technol*. 2: 52-58.
37. Lurá M. C., González A. M., Basílico J. C., Sarsotti P. V., Gómez R. G. y Freyre L. B. (1997). *Introducción al estudio de la micología*. Centro de publicaciones. Universidad Nacional del Litoral. Santa Fé, Argentina.
38. Mathur G. and Prasad R. (2012). Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC6051) isolated from soil. *Appl Biochem Biotechnol*, 167:1595-1602.
39. Matsumiya Y., Murata N., Tanabe E., Kubota K. and 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.
40. Mussatto S.I., Ballesteros L.F., Martins S., & Teixeira J.A. (2012) Use of Agro-Industrial Wastes in Solid-State Fermentation Processes. *Industrial Waste*, 6: 121-140.
41. Nakajima-Kambe T., Shigeno-Akutsu Y., Nomura N., Onuma F., Nakahara T. (1999). Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, 51:134-140.
42. Nigam P.S. (2009) Production of bioactive secondary metabolites, In: *Biotechnology for Agro-Industrial Residues Utilization*, Nigam P.S. & Pandey A. (Eds.) pp. 129-155, Springer, Netherlands.

43. Ocegüera A., Carrillo A., López N., Bolaños N.S., Cruz M.J., Wachter C., Loza H. (2007). Characterization of the polyurethanolytic activity of two *Alicyclophillus* sp. strains able to degrade polyurethane and N-methylpyrrolidone. *Appl Environ Microbiol.* 73:6214-6223.
44. Organización Marítima Internacional (OMI). (2005). Manual sobre la contaminación ocasionada por hidrocarburos. Segunda edición. Parte IV. La lucha contra derrames de hidrocarburos. Capítulo 10. Biorehabilitación. OMI. Londres. Págs. 165-171.
45. Ou S., Zhang J., Wang Y., and Zhang N. (2011). Production of Feruloyl esterase from *Aspergillus niger* by solid-state fermentation on different carbon sources. *Enzyme Research.* Volume 2011, 4 pages.
46. Panda T. and Gowrishanker B.S. (2005). Production and application of esterases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 67:160-169.
47. Pontecorvo, G. (1953). The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advanced Genetic.* 5: 141-238.
48. Raimbault, M. (1998). General And Microbiological Aspects Of Solid Substrates Fermentation. *Elect. Jour, of Biotech,* 1(3), 1-17.
49. Ren X. (2003). Biodegradable plastics: a solution or a challenge?. *J. Clean Prod.* 11:27-40.
50. Reslow, M. Adlercreutz, P. and Mattiasson, B. (1988). On the importance of the support material for bioorganic synthesis. Influence of water partition between solvent, enzyme and solid support in water-proof reaction media. *Eur. J. Biochem.* 172: 573-578.
51. Rodríguez F. (2005). *Biotecnología ambiental.* Editorial TEBAR, S.L. Madrid, España 366-368.
52. Russel J.R., Huang J., Anand P., Kucera K., Sandoval A.G. and Dantzler K.W. (2011). Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ Microbiology,* 77:6076-84.
53. Sánchez C. (2009). Lignocellulosic residues: Biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology Advances* 185-194.

54. Sarkar S., Basak P., and Adhikari B. (2011). Biodegradation of polyethylene glycol-based polyether urethanes. *Polym Plast Technol Eng* 50:80-88.
55. Shah A.A., Hasan F., Hameed A. AND Ahmed S. (2008). Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotech Advances*. 26:246-265.
56. Shibasaki S., Kawabata A., Tanino T., Kondo A., Ueda M. And Tanaka M. (2009). Evaluation of the biodegradation of polyurethane and its derivatives by using lipase-displaying arming yeast. *Biocontrol Sci*.
57. Singh S.N. (2001). Blowing Agents for Polyurethane Foams. Rapra Technology Limited, 12(10):3-27.
58. Solís-González C.J. (2008). Caracterización del crecimiento de *Alicyclophillus* sp. BQ5. En poliuretano. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
59. Taylor, R.F. (1991). Protein Immobilization: fundamentals and applications, Marcel Dekker, New York.
60. Ustinov M.Y., Artemento S.E., Ovchinnikova G.P., Vikhoreva G.A., and Guzenko A.N. (2004). Composition and properties of biodegradable polyurethanes. *Fibre Chem*, 36(3), 189-92.
61. Véjar E. I. (2005). Prácticas de Bioquímica descriptiva. Editorial UniSon. Universidad de Sonora. México. Págs. 130-134.
62. Wageningen. (1999). Molecular Genetic of Industrial Microorganisms. Protocols. Agricultural University.
63. Walker G.M. y White N.A. (2011). Introduction to fungal physiology. *Fungi, Biology and applications*, United States, Wiley, 2° edición.
64. Winding, D. G. and Hiatt C. C. (1961). Polymeric material. Mc Graw-Hill, New York, N.Y., 271-275.
65. Zafar U., Houlden A. and Robson G.D. (2013). Fungal Communities Associated with the Biodegradation of Polyester Polyurethane Buried under Compost at Different Temperatures. *Applied and Environmental Microbiology* 79(23):7313–7324
66. Zafar U., Nzeram P., Langarica A., Houlden A., Heyworth A., Saiani A. and Robson G.D. (2014). Biodegradation of polyester polyurethane during commercial composting

and analysis of associated fungal communities. *Bioresource Technology* 158:374–377.

67. Zevenhoven R. (2004). Treatment and disposal of polyurethane wastes: options for recovery and recycling. *Energy Engineering and Environmental Protection Publication*. Helsinki University of Technology Department of Mechanical Engineering, 1:6-36.
68. Zhang Y., Pitkänen L., Douglade J., Tenknen M., Remond C. & Joly C. (2011). Wheat bran arabinoxylans: Chemical structure and film properties of three isolates fractions. *Carbohydrate Polymers*, 86(2): 852-859.