



.....

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

.....

“DEGRADACIÓN DE RESIDUOS DE POLIURETANO
CON HONGOS TERMOFÍLICOS”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA:
ESTEFANY RAMÍREZ HUERTAS

ASESOR:
DR. HERMILO LEAL LARA

.....

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO, 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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la: **Tesis y Examen Profesional**

Degradación de residuos de poliuretano con hongos termofílicos.

Que presenta la pasante: **Estefany Ramírez Huertas**
Con número de cuenta: **305241083** para obtener el Título de la carrera: **Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica**

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 16 de Enero de 2017.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M.E. Fernando Flores Benítez	
VOCAL	Dr. Hermilo Leal Lara	
SECRETARIO	Q.F.B. Luis Alberto Parra Oaxaca	
1er. SUPLENTE	Q.F.B. Leticia Cubillo Carrillo	
2do. SUPLENTE	M. en C. Ma. Lucero Paniagua García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida y salud, a mi madre y mis hermanos por su apoyo, amor y fe incondicional.

Al Dr. Hermilo Leal por su paciencia y por brindarme un espacio en su laboratorio, por las enseñanzas académicas y de vida.

A la Dra. Hermina Loza, Rebeca Ramírez y Lilihana Domínguez por su tiempo y colaboración en este proyecto.

DEDICATORIAS

A mi madre Lidia por ser una mujer amorosa y ejemplar.

A mis hermanos Eduardo y Edgar que con su apoyo y confianza me han llevado a ser la persona que soy.

A mis sobrinos Abraham y Emiliano porque una de sus sonrisas calma toda aflicción.

A mi esposo Alejandro por la alegría que ha traído a mi vida.

Este trabajo fue financiado por el proyecto DGAPA-PAPIIT-UNAM IN217114.

INDÍCE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	
2.1. ANTECEDENTES	
2.1.1 La espuma de PU como contaminante ambiental	8
2.1.2 Biodegradación por hongos	10
2.1.3 La composta de champiñón como fuente de hongos termofílicos	13
2.2. JUSTIFICACIÓN	19
3. HIPÓTESIS	20
4. OBJETIVOS	
4.1 OBJETIVO GENERAL	20
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	20
5. MATERIALES Y MÉTODOS	
5.1 MEDIOS DE CULTIVO Y COLORANTES	
5.1.1 Medio papa-dextrosa (PDA)	21
5.1.2 Agar extracto de malta (EMA)	21
5.1.3 Agar Impranil® 0.5%	22
5.1.4 Colorantes y soluciones	
5.1.4.1 Azul de Lactofenol	23
5.1.4.2 Buffer de fosfatos pH 7.4	24
5.2 AISLAMIENTO DE HONGOS TERMOFÍLICOS DEGRADADORES DE PU	
5.2.1 Inoculación de compostas en medio agar Impranil® 0.5%	25
5.2.2 Purificación de cepas de hongos termofílicos degradadores de PU	26
5.2.3 Preservación de cepas de hongos termofílicos degradadores de PU en sílica gel con leche descremada ...	26
5.3 PRUEBAS DE DEGRADACIÓN DE PU POR CEPAS SELECCIONADAS DE HONGOS TERMOFÍLICOS	
5.3.1 Pruebas de degradación en medio sólido agar Impranil® 0.5%	28
5.3.2 Pruebas de degradación en medio líquido Impranil® 0.5%	
5.3.2.1 Curva estándar para cuantificación de Impranil® en medio líquido	29

5.3.2.2	Cuantificación de la degradación de Impranil® en medio líquido	30
5.3.3	Determinación de pérdida de peso de espumas de PU por hongos termofílico	32
5.4	IDENTIFICACIÓN DE HONGOS TERMOFÍLICOS	
5.4.1	Identificación de hongos termofílicos por morfología microscópica	36
5.4.2	Identificación de hongos termofílicos por técnicas de biología molecular	37
5.4.2.1	Extracción de ADN de hongos termofílicos por técnica de fenol-cloroformo	38
5.4.2.2	Electroforesis de ADN de hongos termofílicos	39
5.4.2.3	Amplificación de ADN de hongos termofílicos por técnica de PCR	41
5.4.2.4	Secuenciación y análisis bioinformático de ADN de hongos termofílicos	43
6.	RESULTADOS	
6.1	SELECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS TERMOFÍLICOS DEGRADADORES DE PU	44
6.2	DEGRADACIÓN IMPRANIL® POR CEPAS SELECCIONADAS DE HONGOS TERMOFÍLICOS	50
6.2.1	Degradación en medio sólido agar Impranil® 0.5%	50
6.2.2	Degradación en medio líquido Impranil® 0.5%	57
6.3	DEGRADACIÓN DE ESPUMA DE PU POR CEPAS DE HONGOS TERMOFÍLICOS	67
6.4	IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS TERMOFÍLICOS AISLADOS	
6.4.1	Identificación por morfología microscópica	76
6.4.2	Identificación por técnicas de biología molecular	78
7.	DISCUSIÓN	81
8.	CONCLUSIONES	87
9.	RECOMENDACIONES	87
10.	REFERENCIAS	88

1. RESUMEN

Los plásticos juegan un rol esencial en la actualidad debido a su bajo costo y durabilidad. Los poliuretanos son plásticos sintéticos con un amplio rango de aplicaciones en la industria médica, automovilística, de la construcción, entre otras, sin embargo, la acumulación de los residuos de este tipo de materiales se ha convertido en un problema ambiental de gran escala debido a su naturaleza xenobiotica. Los poliuretanos de tipo poliéster se han mostrado más susceptibles a la degradación por microorganismos en comparación con los de tipo poliéter. Se tiene documentado que los poliéster poliuretanos son susceptibles a la biodegradación, especialmente por hongos. En el presente trabajo se aislaron once cepas de hongos termofílicos con la capacidad de crecer y degradar el barniz líquido de poliéster poliuretano Impranil® y espuma de poliuretano sólida. Las cepas fueron obtenidas a partir de compostas para el cultivo del hongo comestible *Agaricus bisporus*, procedentes de tres diferentes etapas de elaboración: bunker, al llenado del túnel de pasteurización y a la siembra del champiñón. Se eligió la composta como medio de búsqueda de hongos termofílicos debido a que en el proceso se registran temperaturas en el rango de 50 a 70°C, lo que promueve el desarrollo de especies termofílicas. Para determinar la capacidad de las cepas aisladas de utilizar el poliuretano como única fuente de carbono se realizaron pruebas de degradación en medio agar Impranil 0.5% midiendo el aclaramiento del medio producido por los hongos debido a su actividad enzimática. Se obtuvieron anillos de degradación de hasta 3.8 mm después de 5 días de incubación a 45°C. Del mismo modo se sometieron las once cepas a pruebas en medio líquido Impranil 0.5% donde el efecto de aclaramiento fue cuantificado por absorbancia a 600 nm, obteniéndose porcentajes de degradación de hasta 72% tras 9 días de incubación a 45°C. Las cepas fueron inoculadas sobre espuma de poliuretano cuantificando la degradación a través de la pérdida de peso. Se obtuvieron porcentajes de pérdida peso de hasta 70.3% después de 28 días de incubación a 45°C. Se eligieron las cinco cepas con mayor capacidad de degradar el poliuretano para su identificación molecular a través del análisis por secuenciación, todas las cepas fueron identificadas como *Aspergillus fumigatus*. Los resultados de este estudio sugieren que la biorremediación por medio de hongos termofílicos puede ser la base del desarrollo de procesos biotecnológicos para la degradación de poliuretano residual.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 ANTECEDENTES

2.1.1 La espuma de PU como contaminante ambiental

El poliuretano (PU) es un polímero sintético muy versátil inventado por el Dr. Otto Bayer en 1937. Provee amplios beneficios debido a su resistencia, hidrofobicidad, aislante térmico, alto coeficiente de tensión, alto punto de fusión, flexibilidad o rigidez y su bajo costo. Son usados como adhesivos, barnices, rellenos, pinturas, materiales de construcción, fibras, etc. (17).

El poliuretano es formado por condensación en una reacción de polimerización entre un polisocianato y un polioliol, se caracteriza por poseer enlaces uretano en su estructura molecular (9) (17). (Figura 1)

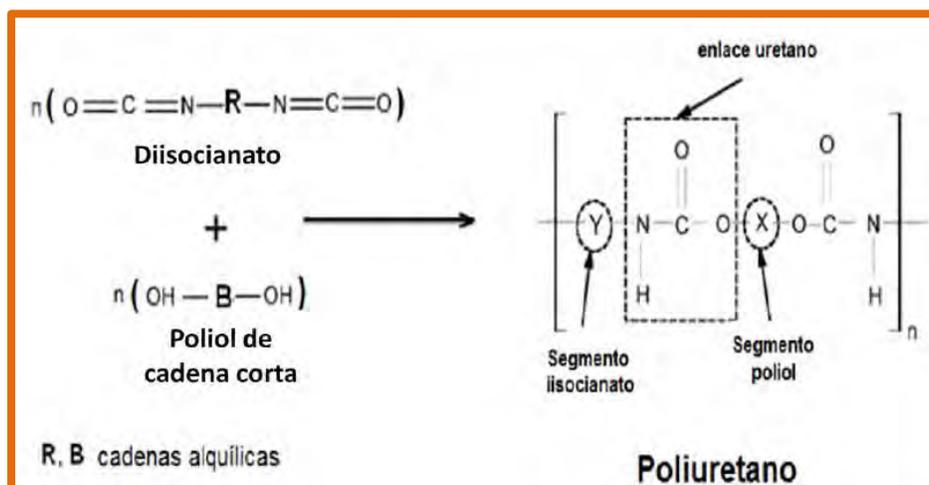


Figura 1. Síntesis de PU por reacción de polimerización (9)

En todos los tipos de PU el esqueleto polimérico contiene enlaces uretano, los diisocianatos son precursores de la formación del enlace uretano, ya que reaccionan con los grupos hidroxilo de los compuestos poliólicos mediante la transferencia del átomo de hidrogeno del polioliol al átomo de nitrógeno del diisocianato, este último compuesto reacciona con cualquier compuesto que contenga un hidrogeno (12). Se pueden obtener una gran variedad de PU al variar los tipos de diisocianatos y polioliol, así las propiedades finales de la espuma dependerán directamente de estos compuestos siendo desde lineares hasta aromáticos y flexibles o rígidos (12) (17).

Los polioles funcionan como donadores de H^+ , el poliol representado en la Figura 1 por X, puede ser tanto de tipo éster como éter, el polímero de poliuretano que contiene un poliol tipo éster es conocido como poliéster poliuretano, el poliuretano que contiene un poliol tipo éter es llamado poliéter poliuretano (Figura 2). El polisocianato puede ser alifático o aromático (9).

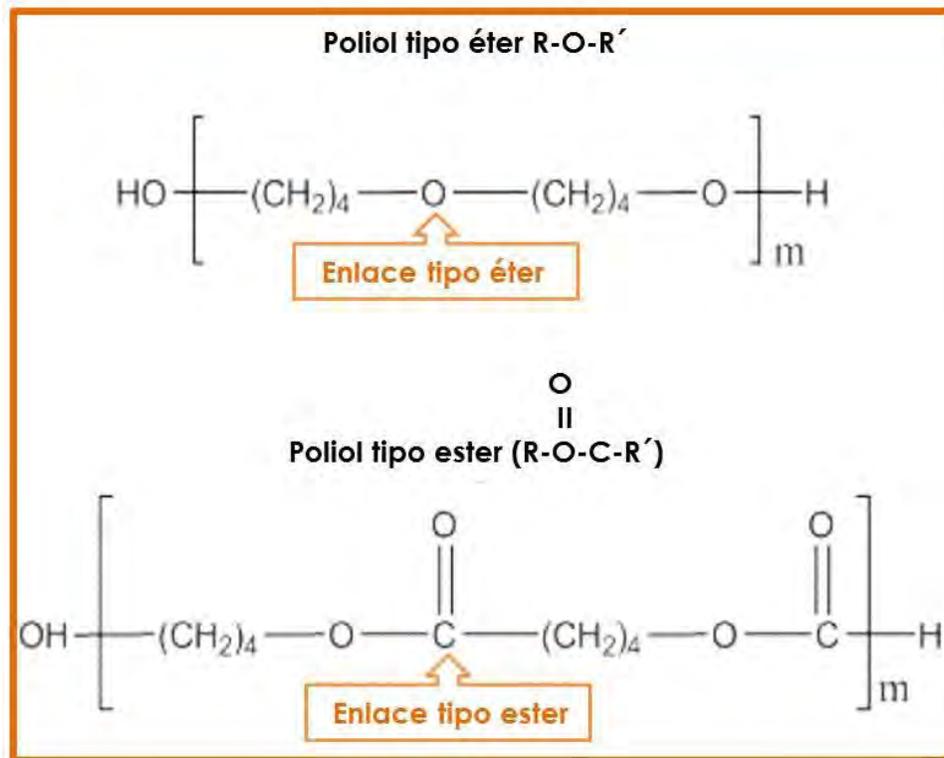


Figura 2. Polioles de tipo éter y de tipo éster (9)

Las espumas plásticas consisten en una fase gaseosa dispersa en una fase sólida, la forma de la espuma y sus propiedades se derivan de estas dos fases. Los componentes sólidos forman la matriz de la espuma mientras que la fase gaseosa forma los huecos en la fase sólida. El PU es una espuma termoestable formada mientras los reactivos están sólo parcialmente reaccionando y en su forma líquida, esto es seguido por un proceso de reacción total, solidificación y estabilización de la espuma la cual posee una buena resistencia a los solventes (12).

Las técnicas más utilizadas actualmente para la eliminación de PU residual son el reciclaje, la incineración y el relleno sanitario. En el caso del reciclaje mecánico este involucra un tratamiento físico que incluye la pulverización, prensado, moldeado por inyección y moldeado por compresión. En el caso

del procesamiento químico se recuperan monómeros como principal producto de la ruptura de enlaces uretano a través de la hidrólisis, aminólisis y glucólisis. Las espumas de PU contienen CFC (clorofluorocarbono) que puede ser emitido como un gas tóxico, haciendo más difícil su tratamiento (27).

Finalmente el tratamiento térmico incluye la pirolisis, hidrogenación y gasificación, este tipo de tratamiento es riesgoso ya que se pueden generar óxidos de nitrógeno, amoníaco, piridinas y otros residuos tóxicos derivados de compuestos nitrogenados (27).

2.1.2 Biodegradación por hongos

La degradación ambiental resulta del efecto total de varios factores ambientales como la humedad, el oxígeno, el aire, el viento, la lluvia, el polvo, la contaminación, insectos, animales y flora que pueden derivar en un efecto degradante (20).

La biodegradación se refiere a la degradación y asimilación enzimática por microorganismo vivos como bacterias, hongos y algas, que deriva en la generación de productos de degradación como CO_2 , H_2O , CH_4 y biomasa. La degradación enzimática ocurre bajo condiciones ambientales determinadas como pH, temperatura y presión (10).

Existen factores que están directamente relacionados con la biodegradación. Los materiales plásticos son de existencia relativamente reciente por lo que los microorganismos aún no han desarrollado las enzimas necesarias para utilizarlos como fuente de energía. De la misma forma, la poca familiarización que hay con estos materiales hace que exista una carencia de conformaciones proteicas geométricamente similares para el complejo enzima-sustrato. La mayoría de los materiales plásticos contiene estructuras ramificadas poco flexibles que impide a las enzimas interactuar con el material, esto está soportado por el hecho que los poliésteres alifáticos son relativamente más susceptibles a la degradación en comparación con los aromáticos, tal es el caso del PET. Un alto peso molecular, espumas de estructura celular cerrada, de gran tamaño, cristalinas (siendo preferentemente degradadas las estructuras amorfas que las cristalinas), diversos grupos químicos acompañantes en la cadena principal y la hidrofobicidad son factores que dificultan la biodegradación ya que están directamente relacionadas con la accesibilidad (9) (12).

Numerosas publicaciones han reportado la susceptibilidad del poliéster PU para ser degradado por bacterias y hongos, adjudicado esto, al número de grupos metileno en la cadena polimérica, mientras que el poliéter PU ha mostrado una mayor resistencia debido a las cadenas acompañantes cerca del grupo diol (Figura 3) (8).

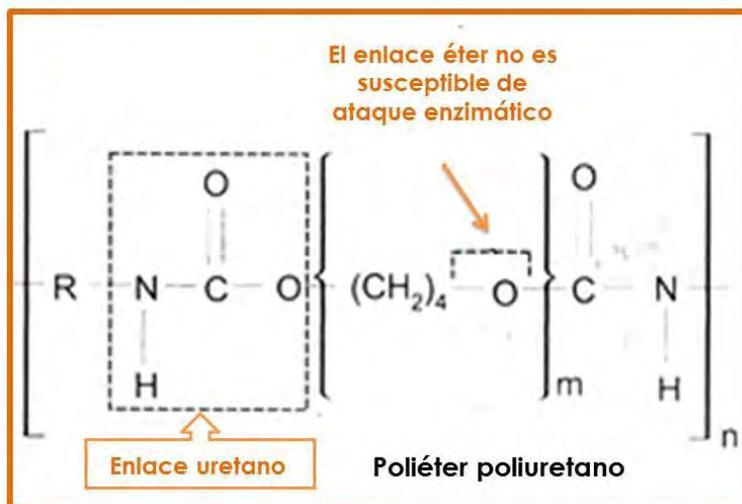


Figura 3. Estructura de poliéter poliuretano no susceptible de ataque enzimático (9)

Se presume que la degradación del poliéster PU es llevada a cabo por diversas enzimas tales como ureasas, lipasas, hidrolasas, proteasas y esterases asociadas tanto a bacterias como a hongos (12)(17) (18). El sitio de ataque enzimático se encuentra en el enlace éster (Figura 4) y se lleva a cabo por hidrólisis enzimática que genera productos de degradación pudiendo ser estos: ácido adípico, dietilenglicol y trimetilolpropano (21). Las esterases poseen la triada catalítica Ser-His-Glu en su sitio activo (9).

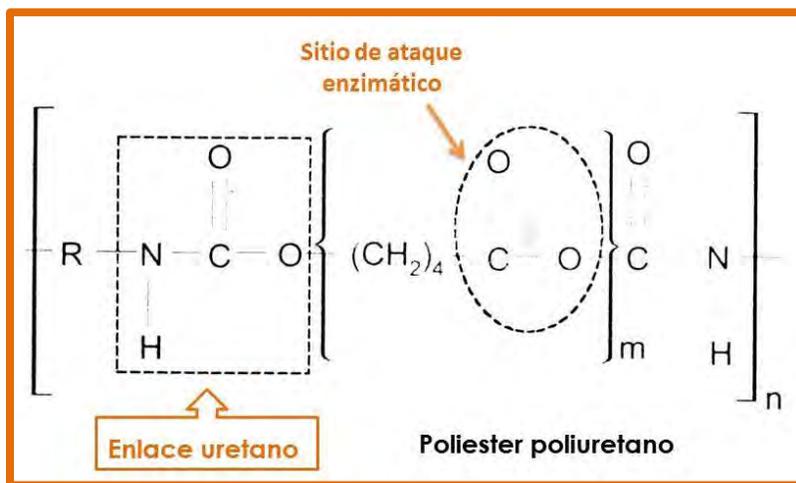


Figura 4. Estructura de poliéster poliuretano indicando el sitio de ataque enzimático (9)

Estudios lograron obtener dos proteínas implicadas en el ataque enzimático a espumas de PU, una de unión a la membrana y otra de tipo extracelular extraídas de *Comamonas acidovorans* y *Pseudomonas chlororaphis* respectivamente (9).

Debido a la naturaleza hidrofóbica del PU hay un contacto ineficiente entre el microorganismo y el material, lo que interfiere en la relación enzima- sustrato, para que la biodegradación suceda es necesario que haya un contacto correcto con el sustrato. La biodegradación de PU implica una actividad sinérgica entre dos proteínas y es llevada a cabo en una reacción de dos pasos, adsorción hidrofóbica seguida de la hidrólisis del enlace éster. La proteína endopoliuretanasas unida a membrana tiene tres dominios hidrofóbicos de unión a PU y permite que se tenga la interacción necesaria para la adsorción hidrofóbica en la superficie del polímero, además hidroliza en localizaciones azarosas del esqueleto de la molécula mientras que el dominio de sitio activo de la exopoliuretanasas es el que cataliza la hidrólisis del enlace éster en el segmento polioli, removiendo monómeros de cadena terminal, obteniéndose así cadenas cortas lo suficientemente pequeñas para permear a través de la pared celular y ser utilizado como fuente de energía, este proceso es llamado depolimerización y ocasiona una pérdida en el coeficiente de tensión de la espuma (12)(17)(19).

Se ha observado que los hongos y no las bacterias son predominantemente responsables de la degradación de PU (7), entre las especies de hongos en las que se ha observado esta capacidad se encuentra *Aspergillus niger*, *Trichoderma sp*, *Fusarium sp*, *Geomyces pannorum*, *Penicillium ochrochloron*, *Candida rugosa* y *Nectria gliocladioides* (4)(14)(20), siendo las propiedades físico-químicas del poliuretano las que determinan su susceptibilidad a ser biológicamente degradado (10)(17).

Estudios han demostrado la capacidad de *Aspergillus niger* para degradar PU sólido, el análisis de espectroscopia infrarroja mostró variación en las bandas que corresponden a los enlaces C=O, C-N y C-H presentes en el grupo uretano y el grupo éster, lo que implica la posible hidrólisis de estos grupos durante la degradación por *Aspergillus* (11) (20).

2.1.3. La composta de champiñón como fuente de hongos termofílicos

La diversidad de la población microbiana es muy amplia en la naturaleza lo que significa que hay un potencial de degradación de residuos existente en los sitios de contaminación (6) o bien en situaciones donde se favorezcan los procesos de degradación de materia orgánica, como es en el caso de la producción de compostas o compostaje. La palabra composta proviene del latín *componere* que significa juntar, el proceso de compostaje es una tecnología de bajo costo para la estabilización de los residuos orgánicos biodegradables y consiste en la descomposición biológica de residuos, ya que transforma la materia orgánica en CO₂, biomasa, energía térmica y materia orgánica estabilizada rica en sustancias húmicas como producto final. Es un proceso similar a la degradación en el suelo pero en el compostaje una cantidad considerable de calor se genera, lo que acelera el proceso considerablemente (23) (24).

El composteo es un proceso relativamente rápido, barato y ambientalmente amigable, que se ha convertido en las últimas décadas en una alternativa que reduce el volumen los materiales residuales entre el 40 y 50% generando un producto final (compost) que puede ser manipulado, almacenado, transportado y aplicado al suelo sin afectar el medio ambiente. La aplicación de compost a suelos agrícolas aumenta la producción de cultivos debido a su capacidad de retención hídrica y a que mejora la regulación de la disponibilidad de nutrientes, aunado a esto, los productos compostados son potenciales bioplaguicidas. (23)(24).

En términos generales en el proceso de composteo se distinguen las siguientes 3 etapas.

- Etapa inicial mesófila. Una vez que la materia orgánica fresca se amontona para favorecer el desarrollo microbiano, empiezan a multiplicarse los microorganismos con temperatura óptima de crecimiento entre los 15 y 35°C. Esta etapa tiene una duración de pocos días, y aquí se degradan los compuestos orgánicos de cadena corta.
- Etapa termófila. Una vez que el material alcanza una temperatura de 40°C, se presenta una mayor actividad biológica donde abundan los microorganismos termofílicos. Por arriba de los 60°C la mayoría de los hongos termofílicos desaparecen (pero no sus conidias) y aparecen bacterias esporulantes y actinomicetos. Estos

organismos son los responsables de descomponer ceras, proteínas y hemicelulosa. En esta etapa se eliminan posibles gérmenes patógenos, así como el poder germinativo de las semillas de maleza.

- Etapa de madurez. La actividad biológica es mucho menor y ocurre a temperatura mesofílica. Se producen en esta etapa reacciones secundarias de condensación y polimerización de las sustancias húmicas lo que da a la composta excelentes cualidades agronómicas.

El balance de nutrientes es un factor de gran importancia para un adecuado composteo. Una cantidad excesiva o insuficiente de carbono o nitrógeno en el material inicial puede afectar negativamente a la calidad del producto final, de ahí la importancia de la relación C/N. Inicialmente esta relación debe tener valores entre 25 y 40 para que el compostaje se realice de forma adecuada, una relación C/N menor a 15 es considerada como una característica del compost maduro (23).

La fase termofílica que se registra en la producción de compostas es debida a la actividad de microorganismos que prosperan a altas temperaturas. Los hongos termofílicos poseen una temperatura mínima de crecimiento de 20°C y una temperatura máxima alrededor de 50°C, teniendo como límite de 60 a 62°C. No resisten temperaturas tan extremas como las bacterias o arqueas cuyas especies son capaces de crecer cerca de los 100°C. Sus requerimientos nutricionales no son tan estrictos, se tiene reportado que cerca de la mitad de ellos requieren 0.1% de extracto de levadura para poder germinar sus conidias y crecer en medio sólido, se desarrollan satisfactoriamente en medio mínimo nutricional con fuente de aminoácidos, sales y carbohidratos con pH óptimo entre 5.5 y 7.0 (16).

Para la producción de champiñones, *Agaricus bisporus*, se preparan cantidades considerables de sustratos por medio de composteo. Esta composta se prepara generalmente usando paja de cereales, estiércol de pollo o caballo, granos y desechos agrícolas y yeso. El proceso se extiende por alrededor de 3 semanas produciéndose un sustrato selectivo para *A. bisporus* rico en lignina, hemicelulosa y celulosa. El proceso se realiza en 2 etapas, la Fase I y la Fase II o pasteurización (3) (13).

La fase I tradicionalmente se realizaba al aire libre con una duración de 2 a 3 semanas aproximadamente, dependiendo del proceso seguido. La paja es vigorosamente humedecida por 24 horas y mezclada con diversos tipos de materiales que aporten nutrientes. Entre otros materiales se usa salvado

y otros granos, residuos del malteado, estiércol de pollo o de caballo, sulfato de amonio y urea (Figura 5). La paja mojada se deja reposar por 1 o 2 días para que se inicie la fermentación, después de lo cual se acomoda en pilas de aproximadamente 2 m de ancho y de altura (Figura 6). Después de 2 a 3 días, el material en fermentación se mezcla agregándole nuevamente materiales con nutrientes y se vuelve a apilar. Este proceso es llamado volteado y se realiza cada 3er o 4to día agregando agua para mantener una humedad de 75% y para proporcionar aireación a la mezcla. Son necesarios 4 a 5 volteos y se agrega yeso en el tercer volteo para regular el pH y evitar la formación de aglomerados (13) (22).

Recientemente se ha desarrollado una alternativa tecnológica para realizar la fase I en una instalación cerrada, conocida como bunker (Figura 7). Esta instalación tiene un acceso frontal de aproximadamente 4 a 5 m de ancho con paredes laterales de 20 a 30m de largo y una pared al fondo de los 4 a 5 m de ancho. Todas las paredes son de 4 a 5 m de altura. El bunker tiene un piso perforado por el cual se alimentan grandes cantidades de aire a presión con el objeto de favorecer la fermentación termofílica propia de la fase I. En este caso, la paja húmeda en lugar de ser apilada al aire libre es colocada en el bunker llenándolo para alcanzar una altura de 5 m de material en fermentación. Favorecido por el gran volumen de material y el suministro de aire fresco, una vez llenado el bunker, la temperatura aumenta inmediatamente alcanzando rápidamente los 75 a 80 °C. Con el manejo adecuado de la aireación se logra mantener este régimen de temperaturas y después de 3 a 4 días, el material en fermentación es sacado del bunker, se le añade agua y materiales ricos en nutrientes, se mezcla para tener un material homogéneo y se vuelve a meter al bunker para otros 4 días de procesamiento en el régimen de 75 a 80 °C. Después de este segundo periodo, el material es nuevamente mezclado y se coloca en un piso al aire libre formando una pila de 2 m de ancho y de altura por 1 o 2 días para entonces ser llenado en un túnel de fermentación y someterlo a la fase II (13).

La fase II o pasteurización se lleva a cabo en una instalación totalmente cerrada conocida como túnel de pasteurización (Figura 8), provista con paredes con un buen aislamiento térmico para evitar tener puntos fríos en donde pudieran sobrevivir organismos nocivos para el champiñón, especialmente insectos, nematodos y cierto tipo de mohos. También está

prevista con un potente sistema de ventilación y un piso perforado por el cual se suministra una aireación adecuada para mantener una temperatura uniforme en toda la masa de material en el túnel de pasteurización. Después de haberse llenado el túnel de fermentación con la composta fase I, se ventila con aire reciclado por 6 – 8 horas para homogenizar la temperatura de la composta entre 48 – 50°C. Después, con ayuda de la inyección de vapor se eleva la temperatura a 58 – 60°C para la fase de pasteurización, manteniendo esta temperatura por 6 a 8 horas y así lograr una pasteurización efectiva. Posteriormente, inyectando aire fresco se desciende la temperatura gradualmente hasta alcanzar 52°C durante 4 a 5 días. En esta etapa la composta se libera de amoníaco con ayuda de microorganismos como *Scytalidium thermophilum*, para finalmente introducir aire fresco para bajar la temperatura a 25 – 28°C y proceder a la siembra o inoculación de la composta con el micelio de *A. bisporus*. En este momento la composta será de color marrón oscuro, de textura terrosa y con un agradable aroma (4) (14) (15).

La siembra se realiza mezclando inóculo (micelio de *A. bisporus* propagado en granos estériles de cereales como mijo y centeno mezclado con yeso). A la composta fase II se le añade una proporción del 0.5 – 0.75% de este inóculo. La composta inoculada se coloca en contenedores o estantes y se incuba a 24°C por 12 a 14 días. A la composta ya invadida con el micelio de *A. bisporus*, se le aplica una capa de cobertura, la cual se prepara generalmente con turba (peat moss). Esta cobertura es indispensable para la fructificación de *A. bisporus* y aunque no contiene nutrientes, permite una buena aeración y retención de agua. La temperatura se mantiene a 24°C por 7 – 10 días y cuando el micelio ha llegado a la superficie de la capa de cobertura, la temperatura se disminuye a 17 – 18°C manteniendo 85 – 90% de humedad y una inyección de aire fresco regular en la nave de cultivo. Los hongos empiezan a desarrollarse 4 o 5 días después de haber hecho estos cambios en el ambiente y 5 o 6 días después se cosecha el primer brote de champiñones. Los champiñones son cosechados cuando el diámetro del sombrero es igual al diámetro de la base. Esta operación se repite en 2 ocasiones más para completar 3 brotes de producción en intervalos de aproximadamente 10 días. En la actualidad los rendimientos en las plantas comerciales se encuentran en el rango de 30 a 36 Kg/m² (4) (14) (15).



Figura 5. Mojado de pajas y mezcla con estiércol de pollo



Figura 6. Apilado de Composta (Fase I al aire libre)



Figura 7. Bunker para fase I



Figura 8. Túneles de pasteurización (Fase II)



Figura 9. Composta Fase II a la siembra I



Figura 10. Composta invadida con micelio de *A. bisporus*

Los microorganismos responsables del proceso de compostaje utilizan como nutrientes esenciales carbono, nitrógeno, fósforo, potasio y elementos traza. Alcanzar un nivel óptimo de temperatura es esencial para un proceso efectivo, temperaturas menores a 20°C detienen el proceso, por arriba de los 82°C la actividad microbiana se vuelve insignificante. Sin embargo, los conidios pueden sobrevivir durante todo el proceso (24), así las temperaturas óptimas para la composta se encuentran en 52 – 65°C por lo menos durante 15 días para la inactivación de patógenos, entre 45 y 55°C para optimizar la biodegradación y entre 35 y 45°C para favorecer la diversidad microbiana (23).

La población fúngica en la composta de *A. bisporus* es basta, la sucesión fúngica puede ser explicada por la ecofisiología de la composta. Los pioneros son *Rhizomucor* y *Aspergillus fumigatus* con un pH óptimo de 7.0, la temperatura óptima de crecimiento de *A. fumigatus* es de 40°C. Cuando la temperatura aumenta a 45°C y comienza la amonificación aumentando el pH a 9 los pioneros desaparecen y hacen presencia *Talaromyces thermophilus* y *Thermomyces lanuginosus* los cuales no degradan celulosa, *Scytalidium thermophilum* por su parte lo hace fuertemente, a 50°C *Emericella rugosa* domina. Cuando la composta se enfría aparecen los mesófilos como *Humicola insolens* y algunos termófilos cuyos conidios se han mantenido viables (22) (24).

Se han aislado más de 20 especies de hongos termofílicos en la composta que coadyuvan en el descenso de los niveles de amoniaco, el cual contrarresta el crecimiento del micelio de *A. bisporus*. Adicionalmente, inmovilizan nutrientes de tal forma que aparentemente están únicamente disponibles para *A. bisporus*. Finalmente, poseen un efecto de promoción de crecimiento (a través de la liberación de auxinas, citosinas, vitaminas, aminoácidos, compuestos volátiles y giberelinas) así como la producción de antibióticos que protegen a *A. bisporus* contra efectos negativos de bacterias y hongos. Estos efectos se han estudiado con *Scytalidium thermophilum*, habiéndose establecido que la presencia de este microorganismo está directamente relacionada con un alto rendimiento en el champiñón (5) (24).

2.2. JUSTIFICACIÓN

Las espumas sintéticas nos han brindado muchos beneficios debido a sus propiedades, sin embargo también han causado un problema ambiental significativo por su naturaleza recalcitrante y xenobiótica es decir debido a que su estructura química es poco frecuente en la naturaleza estos compuesto presentan una resistencia a al biodegradación. Actualmente el poliuretano residual sobresaatura rápidamente los rellenos sanitarios donde se deposita, las técnicas de eliminación de este material son obsoletas, contaminantes y agotan recursos, tales como la incineración que genera emisiones tóxicas y requiere de un gran gasto de energía.

En Europa 57 millones de toneladas de plásticos fueron producidas en el 2012, de los cuales 4 millones de toneladas fueron PU y más de 1.5 millones de toneladas fueron enviados a tiraderos después de su uso. Para México la situación es igual de grave ya que en el 2012 fueron enviadas más de 4 millones de toneladas de PU a los tiraderos municipales. La biodegradación puede proveer una solución viable al problema, no obstante, aún no se tienen bien estudiados los procesos de degradación por parte de microorganismo especialmente por hongos.

El poliéster poliuretano ha mostrado una susceptibilidad a la degradación enzimática por parte de hongos y bacterias a diferencia del poliéter poliuretano que se ha mostrado resistente. Los hongos, degradadores por excelencia, son capaces de degradar este tipo de materiales, aunado a esto el acelerado metabolismo que poseen los hongos termofílicos puede coadyuvar para dar solución al problema. Aislar hongos termofílicos con la capacidad de degradar PU y comprender nuevas vías metabólicas, puede proveer las bases para el desarrollo de procesos biotecnológicos para un reciclaje eficiente de poliuretano residual además de obtener productos de degradación valiosos con la viabilidad para ser contenidos y atrapados o bien la creación de plásticos biodegradables desde su naturaleza.

3. HIPÓTESIS

Será posible aislar hongos termofílicos de compostas de champiñón con la capacidad de utilizar poliuretano como fuente de carbono para lograr una degradación extensiva de espuma de poliuretano.

4. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Encontrar una opción viable para la biodegradación de espuma de PU residual usando hongos termofílicos aislados de composta de champiñón, con la capacidad de utilizar PU como única fuente de carbono con el fin de aplicarlos como alternativa de biorremediación.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar cepas de hongos termofílicos con capacidad de utilizar PU como única fuente de carbono a partir de compostas de champiñón en diferentes etapas del proceso de composteo.
- Cuantificar la capacidad de degradación de PU de los hongos termofílicos aislados en medio sólido agar Impranil® y en medio líquido Impranil®.
- Cuantificar la capacidad de degradación de PU de los hongos termofílicos aislados en espumas de poliuretano sólidas.
- Identificar los géneros de los hongos termofílicos aislados por medio de su morfología macro y microscópica y con técnicas de biología molecular.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 MEDIOS DE CULTIVO Y COLORANTES

5.1.1 Medio papa-dextrosa agar (PDA)

Para preparar 1 L de medio PDA, se procede de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Lavar y rallar 250 g de papa de cascara blanca, colocar en un matraz y añadir 1 L de agua destilada.
2. Calentar en autoclave a 15 lb/in² durante 15 minutos.
3. Filtrar por 5 capas de gasa en un embudo Büchner conectado a un matraz kitasato en sistema al vacío.
4. Recuperar el filtrado y reponer el agua perdida con agua destilada hasta completar nuevamente 1 L.
5. Agregar 20 g de dextrosa y 20 g de agar bacteriológico, agitar hasta homogeneizar.
6. Esterilizar por autoclave (121°C, 15 lb/in², 15 min).
7. Dejar enfriar hasta alcanzar 45°C y servir en placas Petri estériles en zona aséptica.

Notas

- a) En caso de desearse preparar medio líquido papa-dextrosa prescindir de adicionar agar bacteriológico y continuar con el resto del procedimiento.
- b) Para preparara 1 L de medio líquido papa-dextrosa al 50% antes de esterilizar agregar a 500 mL de medio liquido papa-dextrosa preparado convencionalmente, 500 mL de agua destilada, agitar y continuar con el proceso de esterilización.

5.1.2 Agar extracto de malta (EMA)

Para preparar 1 L de medio EMA; se procede de acuerdo al siguiente esquema:

1. Pesar 15 g de extracto de malta.
2. Pesar 18 g de agar bacteriológico.
3. Disolver el extracto de malta y el agar bacteriológico en 300 mL de agua destilada.

4. Una vez disueltos añadir los 700 mL de agua restantes para completar 1 L, una vez añadida la segunda porción de agua no debe continuar agitándose.
5. Esterilizar por autoclave (121°C, 15 lb/in², 15 min).
6. Terminado el periodo de esterilización, dejar enfriar 5 minutos y servir en placas Petri estériles en zona aséptica.

5.1.3 Agar Impranil® 0.5%

Con la finalidad de aislar aquellos hongos termofílicos que tuvieran la facultad de utilizar el PU como única fuente de carbono a partir de compostas de champiñón, fue formulado un medio de cultivo selectivo que posee una fuente de nitrógeno ((NH₄)₂SO₄), azufre (MgSO₄, (NH₄)₂SO₄) fósforo (NaH₂PO₄, K₂HPO₄), sales inorgánicas y elementos traza además del barniz de PU Impranil® que funge como suministro de carbono.

El barniz Impranil® es una suspensión aniónica alifática de poliéster poliuretano de formulación patentada con una concentración de sólidos del 50% en medio acuoso, con una apariencia blanca, opaca y lechosa. Es usado en la formulación de revestimientos textiles como bolsos, zapatos, equipaje, entre otros y cuya propiedad de volverse transparente tras su degradación lo ha hecho partícipe en numerosas investigaciones de biodegradación de polímeros. Su descomposición térmica ocurre a los 60°C, posee un pH de 6.5 y una densidad de 1.1g/cm³ (27).

Para elaborar el medio Impranil® 0.5% fue utilizada la formulación propuesta por Russell *et al.* (2011), cuya composición se muestra en la Tabla 1, procediendo de acuerdo al siguiente esquema:

1. Preparar por separado las soluciones A y B que se muestran en la Tabla 1 y esterilizar por autoclave (121°C, 15 lb/in², 15 min).
2. Preparar la solución C disolviendo individualmente cada uno de los elementos en 20 mL de agua destilada y esterilizar por autoclave (121°C, 15 lb/in², 15 min), terminado el tiempo de esterilización dejar enfriar. Una vez fríos concentrar todos los elementos en un matraz estéril y adicionar 60 mL de agua destilada estéril para completar 200 mL.
3. Preparar 1 L de agar bacteriológico simple, este se prepara disolviendo 18 g de agar bacteriológico en 1 L de agua destilada, esterilizar por autoclave (121°C, 15 lb/in², 15 min), dejar enfriar en un

baño María hasta una temperatura de 45°C manteniendo a esa temperatura hasta su uso.

4. Debido a que el Impranil® es un material termolábil que conserva sus propiedades a una temperatura máxima de 60°C este no puede ser sometido al proceso de esterilización y tomando en cuenta que el contenido de sólidos en el barniz Impranil® es del 50%, para preparar una solución al 0.5% se debe agregar el 1% de barniz, así para preparar 1 L de medio se deben agregar 10 mL de Impranil®.
5. En un matraz estéril agregar 100 mL de la solución A, 10 mL de la solución B y 1 mL de la solución C (todas las soluciones deben estar frías, los volúmenes deben medirse con pipetas y probetas estériles), agregar 10 ml de Impranil aforado a 100 ml con agua destilada estéril, agregar 789 mL de agar bacteriológico estéril a 45°C, homogeneizar el medio con movimientos circulares suaves.
6. Comprobar que el pH del medio sea de 6 (si este no fuera el caso ajustar con una solución de HCl 20% o de NaOH 20% estériles según el caso).
7. Servir inmediatamente en condiciones asépticas en cajas Petri estériles con 20 mL de medio cada una con sistema de inyección continúa.

Nota. Para preparar medio líquido Impranil® sustituir el volumen de agar bacteriológico por agua destilada estéril.

5.1.4 Colorantes y soluciones

5.1.4.1 Azul de Lactofenol

Para preparar 100 mL de colorante se procede de acuerdo al siguiente esquema:

1. Disolver 20g de fenol en 20mL de agua en un matraz de 250 mL calentando a baño María.
2. Agregar 20g de ácido láctico y 40g de glicerina, mezclar.
3. Dejar enfriar.
4. Agregar 0,05g de azul de anilina.
5. Dejar reposar 24 horas.
6. Filtrar el colorante, conservar en un frasco gotero ámbar y etiquetar.

5.1.4.2 Buffer de fosfatos pH 7.4

Para preparar 1 L de buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.4 se procede de acuerdo al siguiente esquema:

1. Pesar 2.51 g de fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4).
2. Pesar 5.34 g de fosfato de potasio dibásico (K_2HPO_4).
3. Mezclar ambos compuestos en 300mL de agua destilada, una vez disueltos agregar 700mL de agua para completar 1 L.
4. Esterilizar por autoclave (121°C , 15 lb/in², 15 min) y dejar enfriar.

Tabla 1. Composición del medio de cultivo Impranil® 0.5% y formulación de soluciones para preparar 1 L de medio (Russell et al., 2011)

Solución	Composición del medio de cultivo Impranil		Peso molecular (g/mol)	Composición (g/L)	Volúmenes finales y cantidad de componente agregada		Volúmenes de solución agregados (mL) para preparar 1L de medio
	Componente	Concentración (en 1L)			Concentración (X) y volumen final de la solución (mL)	Cantidad agregada (g)	
A	NaH_2PO_4	19 mM	119.97	2.32	10 X (500)	11.63	100
	K_2HPO_4	33.5 mM	174.17	6.07	10 X (500)	30.38	
B	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7.6 mM	132.83	1.01	100 X (200)	20.39	10
	MgSO_4	250 μM	120.36	0.03	100 X (200)	0.607	
C	$\text{FeCl}_3 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$	147 μM	270.29	0.039	1000 X (200)	7.94	1
	$\text{ZnCl}_2 \bullet 4 \text{H}_2\text{O}$	14 μM	208.33	0.002	1000 X (200)	0.583	
	$\text{CoCl}_2 \bullet 6\text{H}_2\text{O}$	12 μM	237.92	0.002	1000 X (200)	0.571	
	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	12 μM	241.94	0.002	1000 X (200)	0.581	
	$\text{CaCl}_2 \bullet 2\text{H}_2\text{O}$	10 μM	147.01	0.001	1000 X (200)	0.294	
	CuCl_2	11 μM	154.44	0.001	1000 X (200)	0.339	
	MnCl_2	12 μM	125.84	0.001	1000 X (200)	0.302	

5.2 AISLAMIENTO DE HONGOS TERMOFÍLICOS DEGRADADORES DE PU

5.2.1 Inoculación de compostas en medio agar Impranil® 0.5%

Con el objetivo de encontrar aquellas especies de hongos que, además de ser termofílicos pudieran utilizar el PU como única fuente carbono se empleó un medio selectivo que contiene como fuente de carbono el barniz de poliéster poliuretano Impranil®. Este medio fue inoculado con compostas de *Agaricus bisporus* en tres fases de su maduración: a) bunker, b) llenado y c) siembra, procediendo de acuerdo al siguiente esquema:

1. Pesar 20 g de composta en condiciones asépticas y colocarla en un matraz que contenga 200 mL de buffer de fosfatos pH 7.4, homogeneizar 5 minutos con movimientos circulares vigorosos a fin de efectuar un lavado. Realizar la misma operación para cada una de las tres compostas.
2. Inocular 20 mL de esta solución buffer-composta en 200 mL de medio líquido Impranil® 0.5%, incubar por 2 semana a 45°C agitando diariamente 2 minutos con movimientos circulares suaves. Adicionar 10mL de buffer semanalmente para reponer el volumen evaporado.
3. Transcurridas las 2 semanas de incubación, inocular 500 µL de la solución en 2 placas de agar Impranil® 0.5%. Extender el inóculo con una varilla de vidrio estéril.
4. Realizar el procedimiento de inoculación para cada una de las tres compostas cuidando de no contaminar las soluciones una con otra, para lo cual se utilizarán puntas de micropipeta y varillas de vidrio diferentes.
5. Incubar las placas tapa abajo a 45°C, 5 días con cubierta húmeda para evitar deshidratación del medio (la cubierta húmeda consiste en envolver las cajas en una franela húmeda previamente esterilizada en autoclave (121°C, 15 lb/in², 15 min) y contener en bolsas plásticas de polipapel). Cambiar la cubierta de humedad cada 48 h.
6. Revisar el crecimiento en las placas transcurridos los 5 días de incubación.

5.2.2 Purificación de cepas de hongos termofílicos degradadores de PU

Con el fin de obtener colonias puras y separadas, los hongos crecidos en el medio fueron resembrados como se describe.

1. Resembrar por trasplante los hongos crecidos en medio agar Impranil® 0.5% en 2 placas del mismo medio a razón de una colonia por placa.
2. Descartar para resiembra aquellos hongos que no presenten un halo de aclaramiento alrededor de la colonia en el medio de cultivo.
3. Incubar las placas resembradas a 45°C, 5 días con cubierta humedad, cambiar la cubierta cada 48 h.
4. Terminado el tiempo de incubación comprobar por observación que los aislamientos correspondan a las características de la cepa original así como la presencia de un halo de aclaramiento en el medio de cultivo alrededor de la colonia.
5. Sellar cada caja con parafilm y contenerlas en una cubierta plástica de manera individual y sellada con calor, refrigerar las cepas a 4°C.

5.2.3 Preservación de cepas de hongos termofílicos degradadores de PU en sílica gel con leche descremada

Una vez aislados aquellos hongos capaces de utilizar el barniz de poliéster poliuretano Impranil® como única fuente de carbono fue necesario la conservación de cepas con el fin de evitar pérdidas, contaminaciones, envejecimiento y la realización de múltiples resiembras con lo cual se corre el riesgo de presentar la pérdida de la capacidad degradadora.

Se conservaron las cepas utilizando el método de desecación en sílica gel con leche descremada. La preservación por desecación es un método basado en la deshidratación que reduce drásticamente el metabolismo, es necesario agregar un agente protector como lo es la leche descremada o el glutamato sódico. Como soporte se utilizan perlas de sílica, es necesario conservar herméticamente para evitar el contacto con el aire ya que son higroscópicas.

Este procedimiento fue realizado en el Laboratorio 334 del departamento de alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM con el apoyo del Dr. Guillermo Aguilar Osorio.

1. A partir de cultivos puros resembrar cada cepa en medio PDA por estría masiva, incubar 45°C con cubierta humedad durante 4 días permitiendo que el hongo crezca hasta saturar la caja y conidie en cantidad significativa.
2. Llenar a 1/3 de su capacidad 5 frascos viales con tapa hermética por cada cepa, con gel de sílice en gránulos, esterilizar semiabiertos en autoclave (121°C, 15 lb/in², 15 min).
3. Secar la humedad contenida en los viales en estufa dejando semiabiertos los frascos a 80°C por 5 días.
4. Preparar solución salina fisiológica (NaCl 0.9%), solución SLH de lavado (NaCl, 0.9% y tween 80, 0.05% en agua destilada) y solución de leche descremada (leche en polvo Svelty- Nestle® descremada, 12% en agua destilada) esterilizar las soluciones en autoclave (121°C, 15 lb/in², 15 min).
5. Una vez que el hongo presente una buena cantidad de conidias, en condiciones asépticas adicionar 10 mL de solución SLH en la caja Petri con el hongo y raspar cuidadosamente con una varilla de vidrio estéril toda la superficie del crecimiento con la finalidad de desprender las conidias pero cuidando de no desprender micelio.
6. Con la ayuda de una micropipeta de 5mL y puntas estériles colectar la solución SLH de la caja y colocarla en un tubo Falcon estéril. Repetir el procedimiento para cada cepa.
7. Centrifugar los tubos 3500 rpm, 5 minutos (centrifuga SOL-BAT, BA-301) y decantar el sobrenadante.
8. Resuspender el pellet con 5 ml de solución lava hongos SLH y centrifugar 3500 rpm, 5 minutos y decantar el sobrenadante.
9. Repetir el ciclo de lavado por tercera vez pero con solución salina fisiológica estéril, con el fin de eliminar residuos de solución SLH.
10. En condiciones asépticas resuspender el pellet con 1000 µL de solución de leche descremada 12% y agitar con vórtex 30 segundos.
11. Adicionarlos a los viales con sílice previamente etiquetados (5 viales por cada cepa) 200 µL de la suspensión de conidias, tapar ligeramente y dejar secar semiabiertos, en área aséptica, a temperatura ambiente, 2-3 semanas.
12. Una vez secos, se debe observar desprendimiento de los gránulos de sílice entre si al ser agitados, cerrar completamente las tapas, etiquetar con nombre, cepa y fecha de realización. Conservar en un lugar seco, fresco, a temperatura ambiente y alejado de la luz.

13. Con el fin de comprobar la correcta conservación de las cepas y la ausencia de contaminación, inocular 1-3 gránulos de sílice en medio PDA, incubar 45°C, 3 días), corroborar que el crecimiento y morfología coincidan con la conocida.

5.3. PRUEBAS DE DEGRADACIÓN DE PU POR CEPAS SELECCIONADAS DE HONGOS TERMOFÍLICOS

5.3.1 Pruebas de degradación en medio sólido agar Impranil® 0.5%

Se ha observado que algunas especies de hongos tiene la capacidad de aclarar el medio de cultivo Impranil® debido a la degradación enzimática, por lo que es posible cuantificar esta capacidad.

La prueba de degradación en placa es un método cualitativo para la observación inicial de la capacidad de degradación y colonización de cada hongo aislado. Esta prueba permite medir el halo de crecimiento micelial y el anillo de aclaramiento que cada cepa forma en el medio agar Impranil® 0.5%. Se realiza con el fin de observar la facultad del hongo de crecer usando el polímero y degradarlo así como detectar la existencia de posibles diferencias entre cepas en base a dicha capacidad, en un lapso de tiempo establecido.

1. A partir de colonias de cepas puras de hongos termofílicos degradadores de PU crecidas en medio PDB por 5 días, resembrar por trasplante en medio agar Impranil® 0.5% una colonia de cada cepa. A modo de estandarizar el inóculo usar el reverso de una punta para micropipeta de 1000 µL previamente estéril para tomar del medio una circunferencia de 8 mm ϕ .
2. Depositar el inóculo en el centro de la caja previamente marcada de tal forma que al momento de realizar las mediciones sea posible ubicar el eje horizontal y el eje vertical, realizar 3 repeticiones por cepa.
3. Incubar 45°C, con cubierta de humedad por 5 días, tapa abajo. Medir con ayuda de un vernier el diámetro horizontal y vertical del crecimiento micelial y del halo de degradación que forma en el medio cada cepa, registrar los diámetros diariamente durante 5 días.

5.3.2 Pruebas de degradación en medio líquido Impranil® 0.5%

Debido a que la prueba en medio sólido muestra solamente datos cualitativos es necesario realizar una prueba cuyos datos nos refleje con cifras más exactas la capacidad que tiene cada cepa de hongo aislado para degradar el PU, para lo cual se diseñó una prueba que cuantifica la degradación del barniz Impranil® a través de mediciones espectrofotométricas. El grado de absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de PU presente en el medio y no degradado por el hongo.

5.3.2.1 Curva estándar para la cuantificación de Impranil® en medio líquido

Con el objetivo de relacionar las observancias registradas en la prueba de degradación en medio líquido y conocer la cantidad del barniz que fue degradado debido a la acción enzimática del hongo, se debe realizar una curva estándar con medio Impranil® a diferentes concentraciones y medir a una absorbancia de 600 nm al igual que las muestras, usando como blanco una solución que contenga todos los componentes del medio líquido Impranil® 0.5% en las cantidades que se especifican en la Tabla 1, excepto el barniz.

1. Preparar en un matraz de 125 mL, 15 mL de medio líquido Impranil® 0.5% de acuerdo a la Tabla 1.
2. Preparar en tubos Eppendorf alícuotas con un volumen final de 1 mL, con agua destilada y el medio líquido Impranil® preparado en el paso 1, en concentraciones ascendentes como lo muestra la Tabla 2.
3. Agitar en vórtex para homogeneizar
4. Tomar cada alícuota y medir la absorbancia con un espectrofotómetro a 600 nm, utilizando como blanco una solución que contenga todos los componentes del medio líquido Impranil® 0.5% excepto el barniz.
5. Construir la curva estándar que nos permita relacionar la absorbancia (eje de las ordenadas) con la concentración de Impranil® en g/L (eje de las abscisas).

Tabla 2. Cantidades y concentraciones finales de los sistemas para construir curva de calibración

Sistema	Volumen de agua destilada (μL)	Volumen de medio Impranil® líquido 0.5% (μL)	Concentración final (%)	Concentración final (g/L)
1	950	50	5	0.25
2	900	100	10	0.5
3	850	150	15	0.75
4	800	200	20	1
5	750	250	25	1.25
6	700	300	30	1.5
7	650	350	35	1.75
8	600	400	40	2
9	550	450	45	2.25
10	500	500	50	2.5

5.3.2.2 Cuantificación de la degradación de Impranil® en medio líquido

La prueba cuantitativa para evaluar la capacidad de los hongos de degradar el barniz de poliéster poliuretano se desarrolló haciendo crecer al hongo en el medio líquido y leer espectrofotométricamente al 5 y 9 día de incubación el grado de aclaramiento que se ha producido en el medio. De tal manera que el grado de turbidez será inversamente proporcional a la cantidad de PU degradada por el hongo.

1. Inocular cada cepa de hongos termofílicos aislados en un matraz de 125mL con 25mL de medio líquido PDB, incubar 7 días a 45°C, agitando diariamente en vórtex, 1 minuto.
2. Transcurrido el tiempo de incubación agitar los matraces en vórtex 2 minutos para tener una suspensión homogénea.
3. En condiciones asépticas tomar con una pipeta estéril 2 mL del medio y transferir a un tubo de ensayo estéril (15x100 mm), previamente pesado, tapar el tubo con parafilm, centrifugar 6000 rpm/10 minutos (centrifuga SOL-BAT BA-301) y decantar el sobrenadante.
4. Con el fin de lavar el medio PDB restante, resuspender el pellet con 1 mL de solución salina fisiológica estéril, agitar en vórtex por 30

segundos, centrifugar 6000 rpm durante 10 minutos y decantar el sobrenadante.

5. Pesar el tubo con el pellet para estandarizar el inóculo a 100 mg con el fin de obtener una biomasa equitativa, si el peso excede esta cantidad deberá retirarse pellet, si es inferior deberá agregarse más medio y centrifugar nuevamente hasta obtener la cantidad deseada. Estandarizar seis inóculos de biomasa de 100mg para cada una de las cepas.
6. Una vez ajustado el inóculo resuspender el pellet con 1 mL de medio líquido Impranil® 0.5% y colocarlo en un tubo de ensayo de 16x150 mm con 9 mL de medio líquido Impranil® 0.5% de tal manera que el volumen final de cada tubo sea de 10 mL. Agitar en vórtex 30 segundos para homogeneizar.
7. Inocular 6 tubos por cada cepa y 6 tubos sin inocular como control, incubar todos los tubos a 45°C con cubierta de humedad por dos periodos: 5 y 9 días, agitando en vórtex 1 minuto diariamente con el fin de homogeneizar el hongo en todo el medio y promover la degradación. Cambiar la cubierta de humedad cada 48 horas.
8. Cumplido el primer periodo de incubación de 5 días tomar 3 tubos por cepa y 3 tubos control (el resto de los tubos continua con el periodo de incubación).
9. Homogeneizar el contenido de los tubos en agitando vórtex durante 1 minuto, filtrar a gravedad con papel filtro Whatman No. 41 para retirar el micelio, realizar el mismo procedimiento con los tres tubos de cada cepa incluyendo los tres de control.
10. Tomar una alícuota del filtrado y medir la absorbancia a 600 nm, con un espectrofotómetro, utilizando como blanco la solución que contiene todos los componentes del medio excepto el Impranil®.
11. Cumplido el segundo tiempo de incubación de 9 días repetir el procedimiento desde el inciso 3 con el fin de realizar las lecturas para el resto de los tubos.
12. Relacionar las absorbancias registradas con la concentración de PU en el medio con ayuda de la curva estándar previamente construida.

5.3.3 Determinación de la pérdida de peso de las espumas de PU por hongos termofílicos

Con el objetivo de determinar si los hongos termofílicos son capaces de degradar PU sólido, fueron inoculados cubos de espuma de PU de estructura conocida (Tabla 3) (28) y previamente pesados, se incubaron por dos periodos, 14 y 28 días respectivamente en medio líquido PDA (50%). La pérdida de peso sufrida por las espumas tras el periodo de incubación así como los cambios en su morfología puede determinar el efecto que el hongo genera en ellas producto de la degradación enzimática o por la acción mecánica de la colonización.

1. Preparar en matraces de 125 mL, 50 mL de medio líquido PDB al 50% de su concentración original diluyendo con agua destilada, con el fin de reducir nutrientes y estimular el uso de la espuma como fuente de alimentación. Alistar 6 matraces por cada cepa, incluyendo 6 matraces para el control negativo y 6 para la cepa negativa que es aquella que se conoce no tiene la capacidad de degradar el PU. La cepa negativa corresponde a *Cladosporium sp.*, donada por el Laboratorio 105, departamento de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Química Conjunto E, UNAM a cargo de la Dra. Hermina Loza Tavera.
2. Cortar 78 cubos de espuma de poliuretano de (1X2X2) cm con cortes limpios y cuidando de no dejar rebabas que puedan desprenderse y alterar el resultado.
3. Lavar las espumas sumergiendo en un recipiente con agua destilada y exprimiendo los cubos dos veces.
4. Secar las espumas en un desecador al vacío a temperatura ambiente por 72 h para llevarlas a peso constante. Pesarlas para tener un registro de su peso antes de que sean inoculadas y colocar cada espuma en un matraz con 50 ml de medio PDB al 50% etiquetado con el peso de la espuma colocada (tener precaución de no perder el registro del peso de cada una).
5. Esterilizar los matraces con las espumas en autoclave (121°C, 15 lb/in², 15 min) y dejar enfriar.
6. A modo de estandarizar el inóculo para la siembra de las cepas en las espumas, se debe sembrar cada cepa de hongo aislado en un matraz de 125 mL con 25 mL de medio líquido PDB, incubar 5 días a 45°C, agitando diariamente en vórtex a velocidad máxima, 1 minuto.

7. Transcurrido el tiempo de incubación agitar los matraces en vórtex 2 minutos para tener una suspensión homogénea.
8. En condiciones asépticas tomar con una pipeta estéril 2 mL del medio y transferir a un tubo de ensayo estéril (15x100 mm), previamente pesado, tapar el tubo con parafilm, centrifugar 6000 rpm por 10 minutos (centrifuga SOL-BAT BA-301) y decantar el sobrenadante.
9. Con el fin de lavar el medio PDB restante, resuspender el pellet con 1 mL de solución salina fisiológica estéril, agitar en vórtex por 30 segundos, centrifugar 6000 rpm durante 10 minutos y decantar el sobrenadante.
10. Pesar el tubo con el pellet para estandarizar el inóculo a 100 mg, si el peso excede ésta cantidad deberá retirarse pellet, si es inferior deberá agregarse más medio y centrifugar nuevamente hasta obtener la cantidad deseada. Estandarizar seis inóculos de biomasa de 100 mg para cada una de las cepas.
11. Resuspender el pellet con 1 mL de medio líquido PDB 50%, agitar en vórtex 30 segundos y sembrar en los matraces con espuma preparados, con ayuda de una micropipeta, dejar caer el inóculo sobre la espuma. Inocular seis matraces por cada cepa; los matraces control negativo no serán inoculados pero deberán ser incubados y tratados como el resto de los matraces.
12. Incubar los matraces a 45°C durante 14 y 28 días, adicionar 10 mL de medio de cultivo líquido PDB 50% estéril cada 7 días para reponer la cantidad de medio perdido a causa de la evaporación.
13. Una vez transcurrido el primer tiempo de incubación de 14 días, tomar 3 matraces por cepa incluyendo las espumas de control negativo y las espumas de cepa negativa, el resto de los matraces continúa con el régimen de incubación.
14. Recuperar para cada matraz los cubos de espuma sin perder la procedencia de las espumas.
15. Retirar la mayor cantidad de hongo posible con ayuda de una microespátula cuidando de no dañar la espuma.
16. Colocar cada espuma de PU en un matraz Erlenmeyer de 125 mL, adicionar sobre la espuma 50 mL de hipoclorito de sodio (NaClO) comercial CLORALEX® diluido 30% v/v con agua destilada, (el cloro comercial contiene 5.25% de hipoclorito de sodio por lo que en realidad se tiene una concentración de 1.57%). Con el fin de lisar las

células y eliminar el micelio, los matraces con las espumas control negativo también serán sometidas a este tratamiento.

17. Presionar la espuma con ayuda de una espátula 2 o 3 veces con el fin de sumergirlo en la solución y promover que la solución penetre. Dejar las espumas en la solución 24 horas a temperatura ambiente en incubadora orbital 80 rpm.
18. Transcurrido el tiempo, decantar el hipoclorito de sodio, adicionar 20 mL de agua destilada sobre la espuma, agitar suavemente en forma circular 5 segundos, decantar el agua y repetir la operación 5 veces.
19. Terminado el quinto lavado, decantar y retirar el exceso de agua de la espuma mediante filtración al vacío (con embudo Buchner y papel filtro acoplado a un matraz Kitasato) manteniendo el filtrado al vacío por 1 minuto; transcurrido el tiempo voltear la espuma sobre su cara contraria y repetir el régimen 1 minuto.
20. Colocar la espuma sobre papel aluminio cuidando de no perder la procedencia de cada una, dejar secar en un desecador al vacío a temperatura ambiente durante 72 horas hasta peso constante. Pesar las espumas rápidamente para evitar que la rehidratación adquirida del medio ambiente influya en su peso.
21. Al cumplirse los 28 días de incubación repetir el procedimiento desde el inciso número 13 para el resto de las espumas.
22. Calcular el porcentaje de degradación del poliuretano por pérdida de peso de la espuma a los 14 y 28 días de incubación tomando en cuenta la pérdida de peso sufrida por el control. De igual forma comparar con los controles para observar si hay cambios de tamaño y forma.

Tabla 3. Características de la espuma de PU

Característica	Especificación
Aspecto	Espuma blanca 
Densidad	15.5 Kg/m ³
Retardante de flama	No contiene
Composición	CARADOL MD30-45: 45.0 ppm Óxido de etileno/ óxido de propileno poliéster- poliál adicionado con un copolímero de estireno- acrilonitrilo para aumentar la dureza
	CARADOL SC56-22: 55.0 ppm Óxido de etileno/ óxido de poliál de poliéter a base de propileno
	TDI: 52.7 ppm
	Agua: 4.05 ppm
	CH ₂ Cl ₂ : 7.7 ppm

5.4. IDENTIFICACIÓN DE HONGOS TERMOFÍLICOS

Una vez observadas las propiedades degradadoras de cada cepa aislada es necesario identificarlas, con el fin de analizar una posible relación de su comportamiento en cuanto a capacidad de degradación de PU con su género. La identificación consiste en una observación macro y microscópica para generar una idea preliminar del género al que corresponde cada cepa y con ello hacer una primo identificación. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio 334 del Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química Conjunto E, UNAM con el apoyo del Dr. Guillermo Aguilar Osorio.

Posteriormente se realiza una identificación con técnicas moleculares para asignar el género y la especie. Este procedimiento se realizó en el Laboratorio 105, del Departamento de Bioquímica y Farmacia, Facultad de Química Conjunto E, UNAM con el apoyo de la Dra. Hermina Loza Tavera y la Dra. Lilianha Domínguez Malfavón.

5.4.1 Identificación de hongos termofílicos por morfología microscópica

La identificación de hongos de tipo filamentoso está basada principalmente en la observación microscópica. La cual fue realizado para las 5 cepas con mayor capacidad de degradar PU: B7, B4, LI1, LI2 y S3, las estructuras en las cuales se basa la identificación es la parte micelial del cultivo, particularmente la morfología de las hifas, conidióforo, vesícula, fiálide y conidias.

Se realizó la identificación atreves de la técnica de Ridell (microcultivo) y con ayuda de un atlas de identificación micológica (Winn, 2008) para su clasificación de acuerdo al sistema de Saccardo.

1. Tener disponibles cultivos puros de las cepas a identificar en medio PDA con 5 días de incubación, así como una caja de medio PDA sin inocular.
2. Cortar cuadros de PDA sin inocular con ayuda de un bisturí estéril y caliente de 1 cm de lado y 5 mm de espesor.
3. Colocar el cuadro de PDA sobre un portaobjetos estéril que este soportado sobre una varilla de vidrio en forma de V dentro de una caja Petri de vidrio, todo este sistema debe estar estéril.
4. Tomar con una asa micológica una pequeña cantidad de micelio de la colonia e inocular por picadura cada uno de los lados laterales del cuadro de agar.

5. Con ayuda de unas pinzas de disección estériles, colocar sobre el cuadro de agar un cubreobjetos estéril y presionar suavemente para que se adhiera al medio.
6. Adicionar a la caja Petri que contiene el sistema, 5 mL de glicerol al 10% estéril, sellar la caja con parafilm y rotular. Incubar la caja a 25°C por 48 o 72 horas hasta observar crecimiento.
7. Una vez que el hongo se ha desarrollado retirar el glicerol con ayuda de una pipeta Pasteur y depositar en un frasco para su inactivación.
8. Adicionar 5 mL de formaldehído a la caja Petri para inactivar el hongo durante 15 minutos.
9. Con ayuda de unas pinzas de disección desprender con cuidado el cubreobjetos que está soportado en el cuadro de agar y colocarlo sobre un portaobjetos que contenga una gota de azul de lactofenol.
10. Desprender con cuidado el cuadro de agar soportado en el portaobjetos y colocar una gota de azul de lactofenol, colocar un cubreobjetos estéril sobre el colorante.
11. Sellar las preparaciones colocando alrededor del cubreobjetos barniz de uñas transparente y rotular.
12. Observar las preparaciones con los objetivos, seco débil y seco fuerte, realizar las identificaciones con ayuda de un atlas de micología en base a la morfología de las estructuras vegetativas.

5.4.2 Identificación de hongos termofílicos por técnicas de biología molecular

La identificación de microorganismos mediante métodos moleculares permite, a través de la determinación de la secuencia de ADN asignar género y especie de una manera específica, sensible y rápida. Como primer paso se realizó una selección de las cinco cepas de trabajo que mostraron mayor capacidad de degradar PU, estas fueron B7, B4, LI1, LI2 y S3. Se utilizó la técnica de extracción de ADN con fenol-cloroformo, se realizó una electroforesis con gel de agarosa al 0.5% para comprobar la integridad del ADN extraído y posteriormente se efectuó PCR para la amplificación del material genético el cual fue secuenciado en un laboratorio externo y finalmente se realizó el análisis bioinformático.

5.4.2.1 Extracción de ADN de hongos termofílicos por técnica de fenol-cloroformo

La extracción de ADN es una técnica fina que se basa en las características fisicoquímicas de la molécula y cuyo objetivo es obtener material genético puro (libre de enzimas y proteínas acompañantes) e íntegro (no fragmentado) que pueda ser utilizado para su amplificación por PCR y su posterior secuenciación.

El método de extracción usado se basa primeramente en obtener el ADN de los hongos, para lisar la pared celular y membrana nuclear se utilizó nitrógeno líquido y un buffer de lisis; para la eliminación de proteínas y lípidos se empleó la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico. Finalmente, la precipitación de material genético se logró con isopropanol.

1. Inocular cada cepa en un matraz de 125mL conteniendo 50mL de medio líquido PDA, incubar en incubadora orbital a 25°C, 50 rpm durante 5 días (Agitadora Sontec OS10). Una vez terminado el periodo de incubación se habrá formado una cantidad considerable de micelio en forma de microesferas, estas estructuras facilitan la lisis evitando la formación de una capa gruesa de micelio de difícil disgregación.
2. Filtrar el micelio en papel filtro Whatman 41, 90mm con ayuda de un embudo Buchner conectado a sistema al vacío.
3. Macerar el micelio con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana, hasta obtener un polvo fino y uniforme.
4. Transferir con ayuda de una microespátula aproximadamente 0.2g del micelio pulverizado a un microtubo, agregar 600 µL de buffer de extracción. El buffer de extracción contiene CTAB 2%, Tris-HCl 100mM a pH 8.0, NaCl 1.4 M y EDTA 200mM.
5. Agitar en vórtex vigorosamente 1 minuto e incubar inmediatamente a 65°C durante 30 min.
6. Terminado el tiempo de incubación enfriar la mezcla a temperatura ambiente.
7. Agregar 250 µL de acetato de potasio 5M y mezclar vigorosamente durante 1 minuto.
8. Centrifugar la muestra a 12,000 rpm, 4°C, 5 min, en una microcentrífuga (Eppendorf Centrifuge 5417C).

9. Transferir el sobrenadante a un nuevo tubo y adicionar un volumen igual al que se tiene en el tubo de la mezcla fenol: cloroformo: alcohol isoamílico 25:24:1 (v/v) y mezclar en vórtex 30 segundos.
10. Centrifugar a 12,000 rpm, 4°C, 5 min en microcentrífuga.
11. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo, y repetir desde el inciso 9.
12. Nuevamente colocar el sobrenadante en un tubo nuevo, adicionar 660 µL de isopropanol frío, incubar a -20°C, 1 hora.
13. Centrifugar a 12,000 rpm, 4°C, 5 minutos, decantar y adicionar 1 mL de etanol al 70%, volver a decantar y secar la pastilla dejando semi destapado el tubo a temperatura ambiente.
14. Resuspender el ADN en 50 µL de agua libre de nucleasas (agua grado inyectable).

5.4.2.2 Electroforesis de ADN de hongos termofílicos

Los nucleótidos de la molécula de ADN están integrados por el azúcar desoxirribosa, un grupo fosfato y una base nitrogenada pudiendo ser esta adenina, guanina, timina o citosina. La unión de los nucleótidos ocurre entre el grupo fosfato y el azúcar, mediante enlaces fosfodiéster, dando lugar al esqueleto de la molécula. Los grupos fosfato están cargados negativamente y son polares, lo que le confiere al ADN una carga neta negativa y lo hace altamente polar, características que son aprovechadas para su extracción y purificación.

La electroforesis en gel de agarosa es un método estándar para separar, identificar y purificar fragmentos de ADN. La técnica está basada en la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico generado por la aplicación de una carga a través de los electrodos. En caso del ADN en condiciones de pH neutro la carga negativa neta de la molécula hace que los fragmentos migren hacia el polo positivo (ánodo). La resolución y velocidad de separación son regulados a través de la concentración de agarosa y el voltaje aplicado. Así la agarosa funciona como un filtro en el que los fragmentos de menor tamaño migran más rápidamente hacia el ánodo; al aumentar la concentración de agarosa se dificulta el movimiento permitiendo obtener una mayor resolución en los fragmentos de menor longitud. El incremento del voltaje aumenta proporcionalmente la velocidad de migración de los fragmentos en el gel.

Para visualizar los ácidos nucleicos separados se usan tinciones con colorantes fluorescentes que actúan mediante la inserción entre los pares de bases.

Con el objetivo de corroborar la integridad del ADN extraído por la técnica de fenol-cloroformo de las cepas de trabajo seleccionadas, se realizó electroforesis en gel de agarosa al 0.5% comprobando que la calidad del material genético sea apto para secuenciación.

1. Preparar gel de agarosa 0.5% pesando 0.3 g de agarosa y disolver en 30 mL de buffer TAE 1X (para preparar 500mL de buffer TAE 1X se deben pesar 24.2 g de Tris, agregar 5.6 mL de ácido acético glacial, 10mL de EDTA 0.5M a pH 8 y aforar a 50mL con agua destilada), adicionar 0.5 μ g/mL de bromuro de etidio.
2. Disolver por ebullición la agarosa y dejar enfriar en un baño María a 45°C.
3. Estructurar el molde de acrílico para geles colocando en los extremos los topes y el peine para formar los pozos. Cuando la agarosa alcance la temperatura deseada vaciar el líquido sobre el molde y dejar polimerizar a temperatura ambiente durante 45 minutos.
4. Una vez sólido, colocar el gel en una cámara de electroforesis que contenga 300 mL de amortiguador TAE 1X cubriendo completamente el gel.
5. Mezclar en un tubo Ependorf 20 μ L del ADN obtenido más 5 μ L de buffer de carga (para preparar buffer de carga se deben agregar 25 mg de azul de bromofenol, 3 mL de glicerol, aforando a 10 mL con agua destilada), homogeneizar bien y con ayuda de una micropipeta depositar 10 μ L de las muestras en un carril diferente para cada una de ellas.
6. Aplicar el flujo eléctrico de 120 volts durante 10 minutos.
7. Sacar el gel de la cámara con ayuda de una pala plástica y colocar en el transiluminador (Chemidoc MP Imaging System), observar el ADN y capturar la imagen a través del sistema informático del transiluminador como evidencia.

5.4.2.3 Amplificación de ADN de hongos termofílicos por técnica de PCR

La reacción en cadena de polimerasa es una técnica de alta sensibilidad, reproducibilidad y eficiencia que nos permite obtener mediante una poderosa catálisis suficiente material de una secuencia específica de ADN a partir de cantidades pequeñas de muestra para su estudio.

La técnica de PCR se basa en el principio de complementariedad de bases del ADN y en la participación de la enzima Taq polimerasa que permite la extensión del fragmento mediante la adición de nucleótidos en secuencia complementaria al ADN molde por medio de un proceso cíclico. La PCR se desarrolla en tres pasos, el primero es la separación de las dos cadenas que forman la molécula de ADN para lo cual se requiere calentar a 98°C. Cada una de estas cadenas actuará como molde para fabricar su complementaria. A continuación, se disminuye la temperatura a 64°C para conseguir que cada primer se una a su región complementaria dentro de la cadena de ADN. Finalmente se añade la Taq Polimerasa y se aumenta la temperatura a 72°C para generar cadenas complementarias al ADN molde.

Fueron amplificadas cinco cepas de trabajo (B7, B4, LI1, LI2 y S3) por la técnica de PCR con el fin de obtener una cantidad suficiente de material genético para secuenciación.

1. En un tubo tipo Ependorf en baño de hielo colocar los reactivos y cantidades indicadas en la Tabla 4 (a excepción de la muestra de ADN), para llevar a un volumen total de 50 μ L, esto se realiza con material estéril y en condiciones asépticas. Considerar que este volumen es para una sola reacción, deberá prepararse solución madre suficiente para la cantidad de muestras a correr.
2. Una vez preparada la solución madre alicuotar 50 μ L en tubos Ependorf para cada una de las muestras, adicionar el volumen de ADN de cada cepa a identificar a cada uno de los tubos de acuerdo a la Tabla 4 y mezclar. Se utilizan los primers universales para hongos ITS1 e ITS4.
3. Preparar un tubo control al cual se le adiciona agua grado PCR en vez de muestra, mantener a 4°C las muestras hasta su uso.

Tabla 4. Reactivos y cantidades para PCR

Reactivo	Concentración en reacción	Volumen (μL)
Oligo F	10 μM	2
Oligo R	10 μM	2
dNTPs	10 μM	1
Buffer PCR	5X	10
Taq Polimerasa Phusion	1 u/ μL	0.5
MilliQ estéril	----	33.5
DNA molde	<250 ng	1

4. Programar el termociclador (Verit de 96 pozos de Applied Biosystems) con los intervalos de tiempo y temperatura mostrados en la Tabla 5.
5. Colocar los tubos en el termociclador e iniciar el programa de amplificación.

Tabla 5. Condiciones de reacción para PCR con Pushion

Paso	Temperatura	Tiempo	No. de Ciclos
Desnaturalización inicial	98°	3min	1x
Desnaturalización	98°	10secs	35x
Alineamiento	64.4°	30secs	
Elongación	72°	36min	
Elongación final	72°	36min	1x
Conservación	4°	∞	∞

6. Terminados los ciclos mantener a 4°C la muestra hasta su uso.
7. Realizar electroforesis al fragmento amplificado para verificar la presencia del producto esperado de acuerdo al numeral 5.4.2.2 usando el marcador de peso molecular Lambda DNA-*Hind* III de Sigma-Aldrich, No. Cat. D9780.

5.4.2.4 Secuenciación y análisis bioinformático de ADN de hongos termofílicos

1. Una vez obtenido el gel de electroforesis, cortar con un escalpelo de navaja estéril cuadros de gel de agarosa exclusivamente en la zona que corresponde al ADN.
2. Purificar el ADN a través del kit comercial de purificación GeneJet Gel Extraction, Thermo Fisher Scientific No. Cat. K0691 siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit se basa en la disolución del gel de agarosa y la promoción de la unión del ADN a la sílica de la cual está hecha la membrana de la columna. Seguido de un lavado con buffer eluyente para obtener el material genético en solución.
3. Realizar electroforesis al material obtenido para verificar la presencia del producto esperado de acuerdo al numeral 5.4.2.2 usando el marcador de peso molecular Lambda DNA-*Hind* III de Sigma-Aldrich, No. Cat. D9780.
4. La secuenciación fue realizada por la técnica de Sanger de manera externa a cargo de MacroGen Korea, la secuencia una vez recibida se somete a análisis BLAST en la interfaz de Gene Bank.

6. RESULTADOS

6.1 SELECCIÓN DE CEPAS DE HONGOS TERMOFÍLICOS DEGRADADORES DE PU

Con la finalidad de aislar aquellos hongos termofílicos que tuvieran la capacidad de utilizar el PU como única fuente de carbono a partir de compostas de champiñón, fue formulado un medio de cultivo selectivo que posee una fuente de nitrógeno, azufre fósforo, sales inorgánicas y elementos traza, además del barniz de poliéster PU Impranil®, que es una emulsión alifática aniónica que funge como suministro de carbono. Para elaborar el medio Impranil® 0.5% fue utilizada la formulación propuesta por Rusell *et al.* (2011) cuya composición se muestra en el apartado de materiales y métodos.

El cultivo del hongo *Agaricus bisporus* denominado genéricamente champiñón se desarrolla favorablemente sobre sustratos de composta, la cual está constituida por paja de cereales, estiércol de pollo y yeso. Esta mezcla es sometida a tres etapas de preparación. La primera de ellas se desarrolla al aire libre, donde la paja es hidratada y se le agrega estiércol de pollo y yeso, la fase II o de pasteurización, y finalmente la siembra o fase III donde la composta se reposa a temperatura ambiente.

Par obtener cepas de hongos termofílicos fueron empleadas compostas de champiñón en tres diferentes estadios de maduración y cuyo rango de temperaturas durante el proceso de compostaje se muestra a continuación:

- a) Salida de bunker, (45-85°C)
- b) Llenado de túneles fase II, (40-70°C)
- c) Siembra, después de pasteurización y al enfriamiento, (20°C)

Se inocularon soluciones de lavado de las tres compostas en placas de agar Impranil® 0.5%, se incubaron durante 5 días a 45°C. Concluido el tiempo de incubación fueron seleccionadas las colonias de hongos que pudieran degradar el PU, las cuales se evidenciaron por halos de aclaramiento alrededor de la colonia, esto se debe a que el barniz contenido en el medio de cultivo posee la capacidad de cambiar su aspecto blanco- lechoso a traslúcido al ser degradado por las enzimas extra-celulares secretadas por los hongos.

En la Tabla 6 se muestran el total de colonias crecidas en medio agar Impranil® 0.5% ordenadas de acuerdo a su composta de origen, así como las colonias seleccionadas en base a su fenotipo. Las cepas aisladas se denominaron con un sistema alfa-numérico de acuerdo a la primera letra de su composta de procedencia, seguida del número asignado al momento del conteo de colonias. De manera que, del bunker, se asilaron un total de 10 cepas nombradas de B1 hasta B10, se formaron dos grupos de fenotipos similares, B4, B5, B9 en un grupo, y B6, B8 en un segundo grupo, por lo que se conservó B4 del primer grupo y B6 del segundo; B5, B9 y B8 se descartaron. El resto de las colonias aisladas del bunker mostraron un fenotipo distinto entre sí, B1, B2, B3, B4, B6, B7, B10 por lo que se conservaron como cepas de trabajo. En el llenado se aislaron dos tipos de colonias con diferente fenotipo entre sí por lo que se conservaron ambas. En la siembra se formaron dos grupos de fenotipos similares entre sí, S1, S2 en un grupo y S3, S4, S5, S6 y S7 en un segundo grupo; se conservó para cepa de trabajo S1 del primer grupo y S3 del segundo, se descartaron S2, S4, S5, S6 y S7. Finalmente, se conservaron un total de once cepas con fenotipo aparentemente distinto entre sí: siete colonias del bunker (B1, B2, B4, B6, B7 Y B10); dos colonias del llenado (LI1 y LI2); dos colonias de la siembra (S1 y S3).

Una vez seleccionadas las cepas de trabajo se procedió a su descripción morfológica, estos datos se muestran en la Tabla 7. Cabe destacar que todas las cepas aisladas fueron de tipos filamentosas, mohosas, polvosas, planas y de color verde oliva; respecto a su conidiación LI1, LI2 y S1 lo hacen de manera muy abundante, en contraste con B1, B2, B3 y B10 que lo hace escasamente, por su parte S3, B4, B6 y B7 lo hacen de manera regular. Las conidias se presentaron blancas en un inicio para S3, B1, B3 y B6 tornándose verdes posteriormente, las conidias que desde un inicio fueron de color verde se presentaron en las cepas LI1, LI2, S1, B2, B4, B7 y B10.

Tabla 6. Selección de cepas de hongos termofílicos degradadores de PU

Composta (origen)	Colonias aisladas agrupadas por fenotipos	Cepas seleccionadas
Bunker	B1	B1, B2, B3, B4, B6, B7 y B10
	B2	
	B3	
	B4*, B5*, B9*	
	B6*, B8*	
	B7	
	B10	
Llenado ^Δ	LI1	LI1, LI2
	LI2	
Siembra	S1*, S2*	S1, S3
	S3*, S4*, S5*, S6*, S7*	

*Colonias con fenotipo similar

^ΔEn llenado se encontraron 5 Colonias de tipo bacteriano

Todas las colonias presentaron bordes regulares exceptuando LI1, S1 y B1. En el tipo de forma colonial fue donde más heterogeneidad se presentó siendo en puntos LI1 y B1; radiadas como hondas en el agua LI2, S3, B2, B3, B6, B7 y B10; en un tapete homogéneo y liso S1 y finalmente en manchas amorfas e irregulares B4. La característica más importante para este experimento fue la formación de halos de aclaramiento por los hongos en el medio ya que es indicativo de la capacidad de utilizar el barniz de PU como fuente de carbono. Presentaron amplios halos de aclaramiento LI2, S3, B1, B2, B4, B6, B7 y B10; halos regulares B3 y halos no visibles LI1 y S1.

Tabla 7. Fenotipos de hongos termofílicos degradadores de PU en medio agar Impranil® 0.5%

Cepas	Conidiación		Forma de colonia*		Degradación (halos)
	Abundancia	Color	Bordes	Tipo	
LI1	Abundante	Verdes	Irregulares	Puntos	No visibles
LI2	Abundante	Verdes	Regulares	Radiadas	Amplios
S1	Abundante	Verdes	Irregulares	En tapete	No visibles
S3	Regular	Blancas (i)	Regulares	Radiadas	Amplios
B1	Escasa	Blancas (i)	Irregulares	Puntos	Amplios
B2	Escasa	Verdes	Regulares	Radiadas	Amplios
B3	Escasa	Blancas(i)	Regulares	Radiadas	Regular
B4	Regular	Verdes	Regulares	Manchas	Amplios
B6	Regular	Blancas (i)	Regulares	Radiadas	Amplios
B7	Regular	Verdes	Regulares	Radiadas	Amplios
B10	Escasa	Verdes	Regulares	Radiadas	Amplio

* Todas las colonias aisladas son de tipo mohosas, polvosas, planas y de color verde oliva
 i Colonias con esporulación blanca en un inicio que después se torna verde

En la Figura 11 se muestra el fenotipo para cada una de las cepas (anverso y el reverso de la placa) crecidas en el medio de cultivo agar Impranil® y cuyas características están descritas en la Tabla 7.

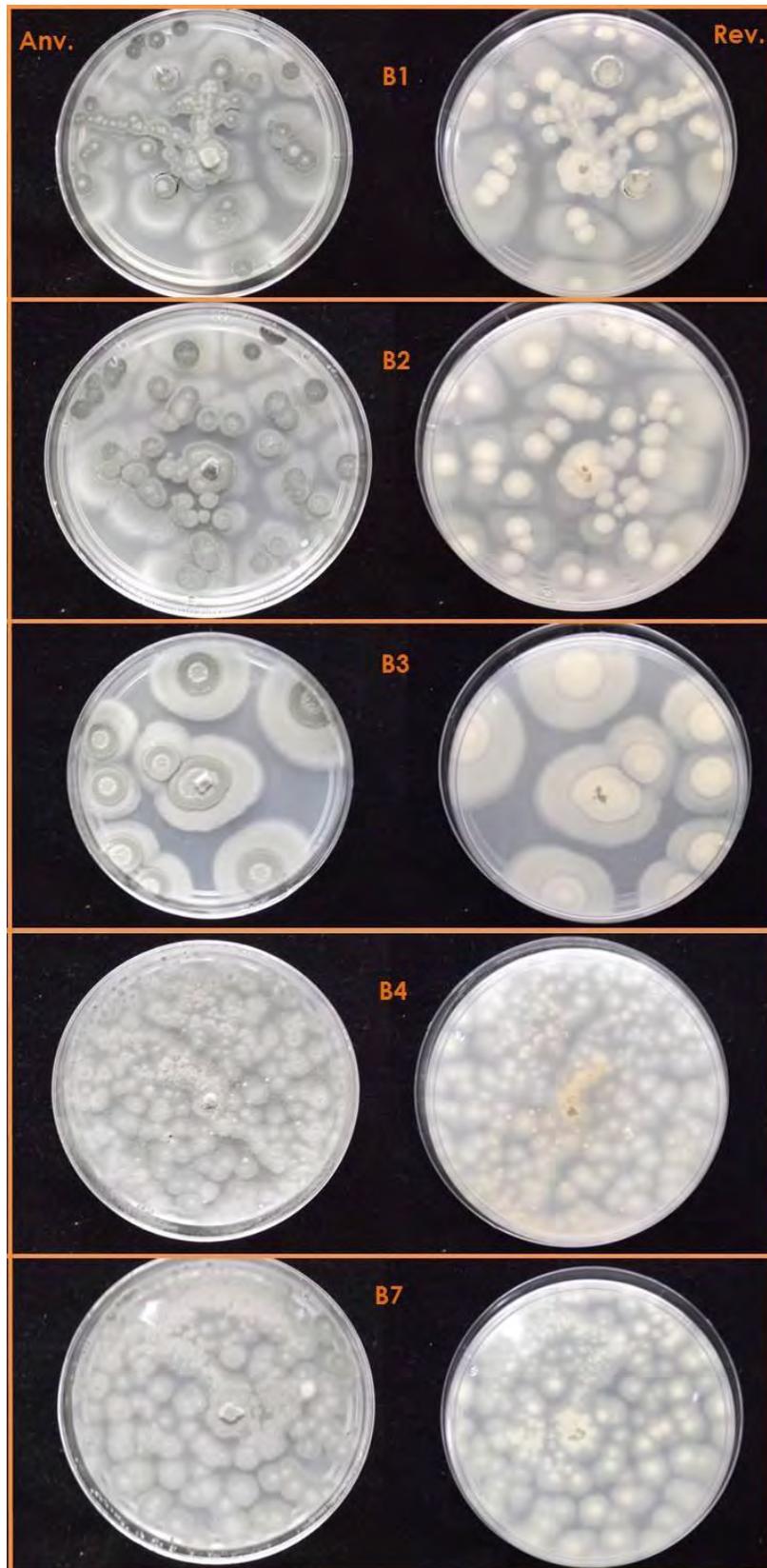


Figura 11. Fenotipos de hongos termofílicos degradadores de PU en medio agar Impranil® 0.5%

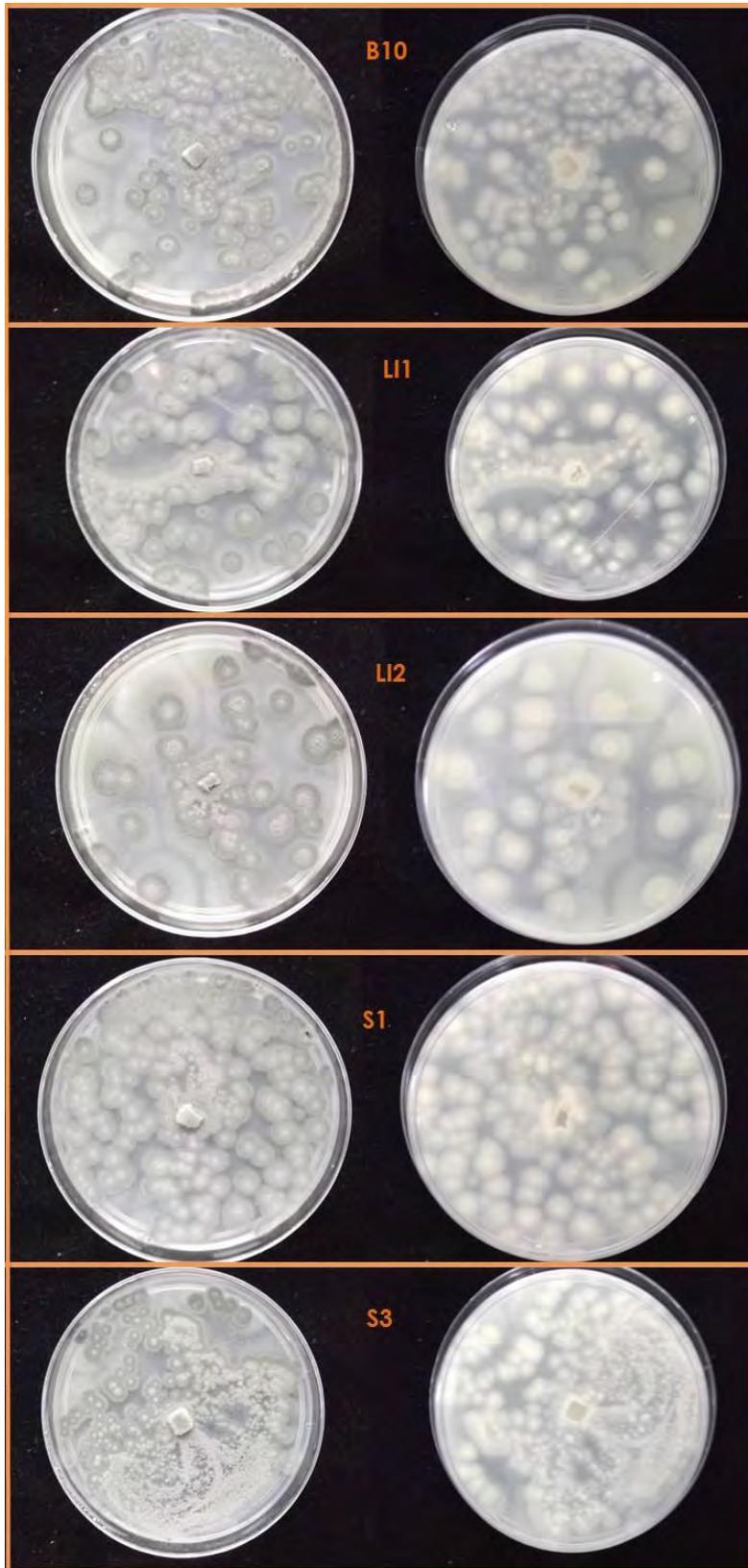


Figura 11 (continuación). Fenotipos de hongos termofílicos degradadores de PU en medio agar Impranil® 0.5%

Una vez seleccionadas las once cepas de trabajo, se observaron diferencias en su fenotipo, pero sobre todo en su capacidad para aclarar el medio, aquellas colonias que conidaban abundantemente saturan con mayor velocidad la placa de medio, sin embargo enfocamos la atención en aquellas que aclaraban más el medio. Se deseó conocer la capacidad de degradación de PU que poseía cada cepa, por lo que se realizaron pruebas de degradación en medio sólido y en medio líquido Impranil® 0.5%.

6.2 DEGRADACIÓN IMPRANIL® POR CEPAS SELECCIONADAS DE HONGOS TERMOFÍLICOS

El Impranil® es una suspensión de poliéster poliuretano con apariencia opaca, blanco-lechosa que se vuelve translúcida tras ser degradada, los organismos capaces de degradar este polímero generan una zona de aclaramiento alrededor de la colonia en el medio de cultivo. Deseando saber que cepa de hongo de trabajo poseía la mayor capacidad de degradar el PU se desarrollaron dos métodos para la cuantificación de la degradación del barniz. El primer método se realizó en medio sólido y está basado en la medición del diámetro de aclaramiento de los halos que se forman alrededor de la colonia cuando el barniz es degradado por el hongo. El segundo método es en medio líquido, y mide espectrofotométricamente el aclaramiento que el hongo genera en el medio.

6.2.1 Degradación en medio sólido agar Impranil® 0.5%

La prueba en placa es un método cualitativo para la observación inicial de la capacidad de degradación y colonización de cada cepa de hongo aislada. Esta prueba permite medir el halo de crecimiento micelial y el anillo de aclaramiento formado en el medio agar Impranil® 0.5% a los 5 días de incubación. Este ensayo se realiza con el fin de observar la aptitud de cada cepa para crecer usando el polímero y degradarlo, haciendo así una detección temprana de las diferencias entre cepas con base en dicha facultad, en un lapso de tiempo establecido, intentando detectar a los mejores degradadores.

Una vez sembrada cada cepa en medio Impranil® 0.5% con un inóculo estandarizado de 8mm ϕ , los diámetros de crecimiento micelial y de espesor del anillo de degradación fueron medidos diariamente durante 5 días consecutivos.

Tabla 8. Crecimiento micelial (mm) de hongos termofílicos degradadores de PU en medio agar Impranil® 0.5% al día 5 de incubación

CEPA	Diámetro de la colonia (mm)
B6	21.5 ± 1.91 d*
L11	21.1 ± 1.03 d*
S1	20.8 ± 1.50 d*
B1	20.5 ± 1.29 cd*
B3	20.4 ± 1.49 cd*
L12	18.8 ± 1.26 bc*
S3	18.3 ± 0.96 ab*
B7	18.0 ± 1.41 ab*
B2	17.8 ± 0.50 ab*
B4	17.0 ± 0.82 ab*
B10	16.8 ± 0.96 a*

*Letras diferentes en diámetro de colonia indican diferencia significativa entre cepas según la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

En la Tabla 8 y la Figura 12 se presentan los diámetros en milímetros para cada cepa en orden descendente y agrupados en cinco grupos (a, ab, bc, cd y d) de acuerdo a las diferencias significativas entre cepas según la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$). Como observamos en el grupo d con mayor velocidad de crecimiento esta B6, L11 y S1 este grupo se caracteriza por su buena velocidad de crecimiento y colonización se distingue por saturar la caja Petri rápidamente. En el grupo cd y también con alta velocidad de crecimiento esta B1 y B3, con mediana velocidad de crecimiento esta L12 en el grupo bc y finalmente los de baja velocidad para colonizar en el

grupo ab esta S3, B7, B2 y B4 y el de menor capacidad de colonización es B10 en el grupo a.

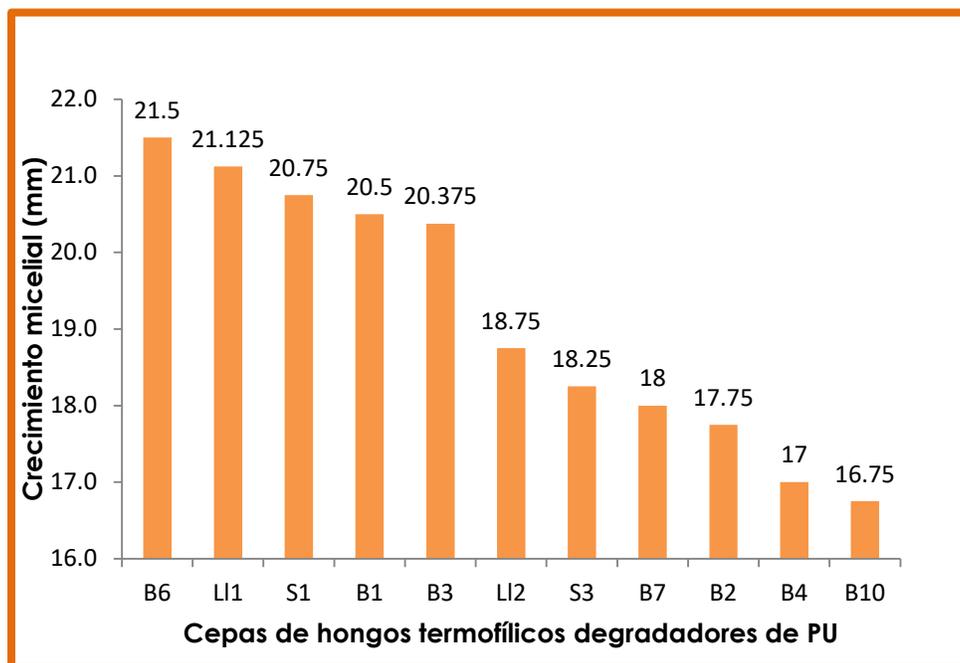


Figura 12. Crecimiento micelial (mm) de hongos termofílicos degradadores de PU en medio agar Impranil® 0.5% al día 5 de incubación

En la Tabla 9 y la Figura 13 se muestran las mediciones del espesor de anillo de degradación en milímetros para cada una de las cepas en orden descendente y agrupadas en cuatro grupos (a, ab, b y c) de acuerdo a las diferencias significativas entre cepas según la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$). Para obtener la medida del espesor del anillo de degradación se restó al diámetro medido hasta el borde del halo de aclaramiento la medida del diámetro medido hasta el borde del crecimiento colonial. La cepa que forma halos de degradación más anchos y está en el grupo c es B4 queriendo decir que de primera instancia y según esta prueba, la cepa B4 es la mejor degradadora; seguida de S3 en el grupo b; las cepas B2, LI2, B10, S1, B3, B1, B6 y B7 pertenecen al grupo ab y forman halos medianamente anchos, este grupo representa el 72% es decir que la mayoría de las cepas degrada con la misma intensidad, la cepa LI1 forma el grupo a y es la que forma el anillo de degradación más pequeño considerando esta la peor degradadora .

Tabla 9. Espesor del anillo de degradación de hongos termofílicos degradadores de PU en medio agar Impranil® 0.5% al día 5 de incubación

CEPA	Anillo de degradación (mm)
B4	3.8 ± 0.50 c*
S3	2.6 ± 0.75 b*
B2	2.3 ± 0.96 ab*
LI2	2.3 ± 0.96 ab*
B10	2.0 ± 0.82 ab*
S1	1.8 ± 0.50 ab*
B3	1.6 ± 0.48 ab*
B1	1.5 ± 0.71 ab*
B6	1.5 ± 1.00 ab*
B7	1.5 ± 0.58 ab*
LI1	1.3 ± 0.87 a*

*Letras diferentes en anillo de degradación indican diferencia significativa entre cepas según la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

De acuerdo a esta prueba se observa que las cepas B6, LI1 y S1 son las que más rápido crecen, por su parte B4 es la que mejor aclara el medio. Concluyendo que las cepas que más rápido colonizan no son las mejores degradadoras, se sugiere que estas cepas invierten su energía en colonizar ampliamente el medio que las contiene y, las que mejor degradan crecen más lentamente invirtiendo su energía en metabolizar el medio, invadiendo más lentamente.

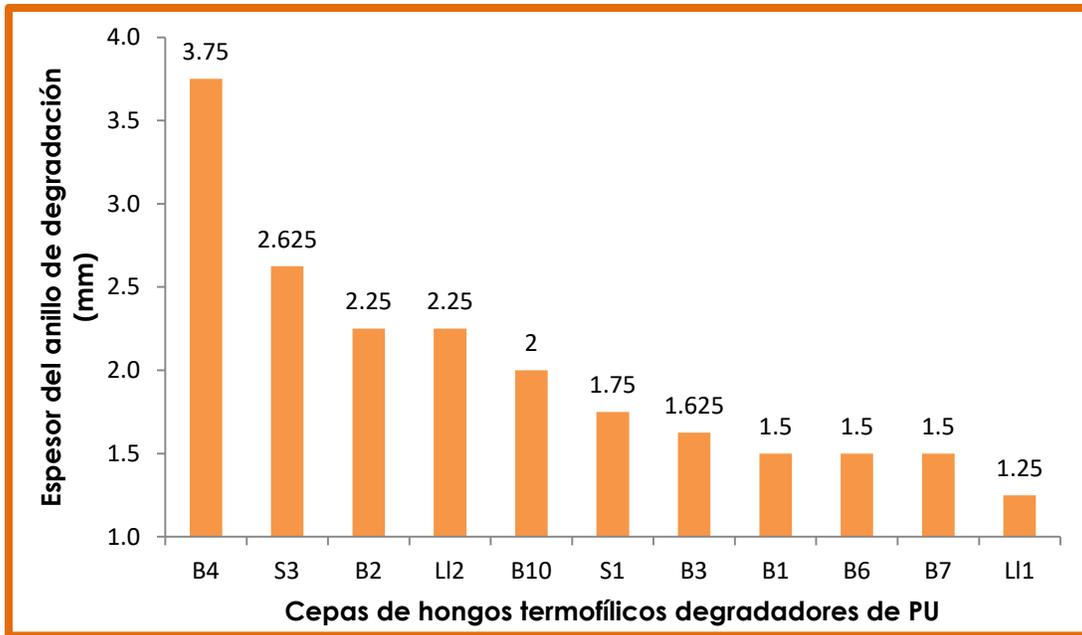


Figura 13. Espesor del anillo de degradación de hongos termofílicos degradadores de PU en medio agar Impranil® 0.5% al día 5 de incubación

En la Figura 14 se aprecia el espesor del anillo de degradación de las once cepas al reverso de la placa de medio agar Impranil®.

Sin embargo, aunque esta prueba nos muestra un comportamiento preliminar de la capacidad de degradación y de colonización de las cepas es decir, un primer plano de a qué velocidad crecen y su facultad para degradar el barniz. Es una prueba poco fina cuyos resultados son cualitativos; así con el fin de obtener resultados cuantitativos se desarrolla una prueba en medio líquido basada igualmente en el aclaramiento en el medio pero esta vez medido espectrofotométricamente.

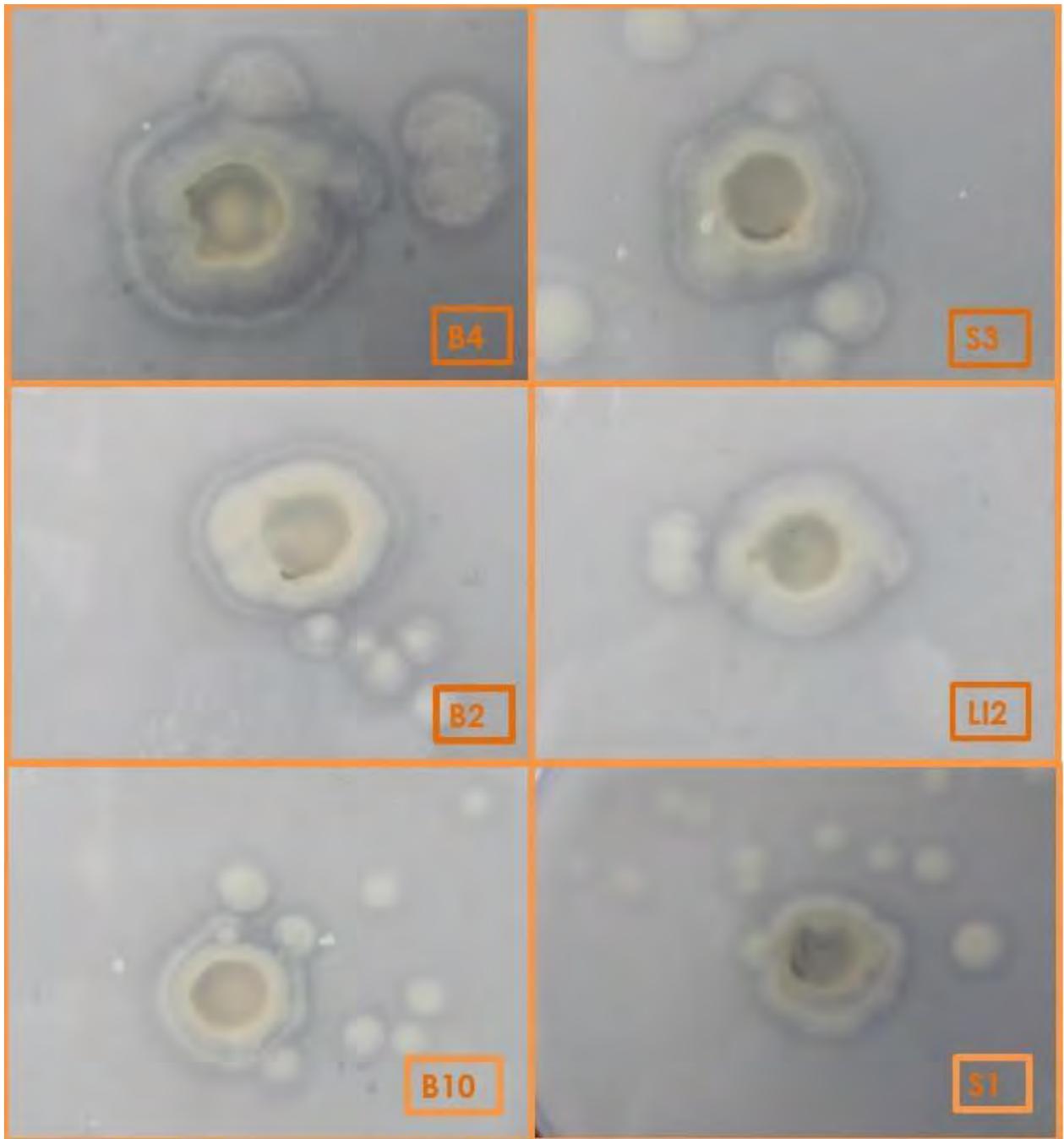


Figura 14. Anillo de aclaramiento formado por hongos termofílicos degradadores de PU en medio agar Impranil® 0.5%

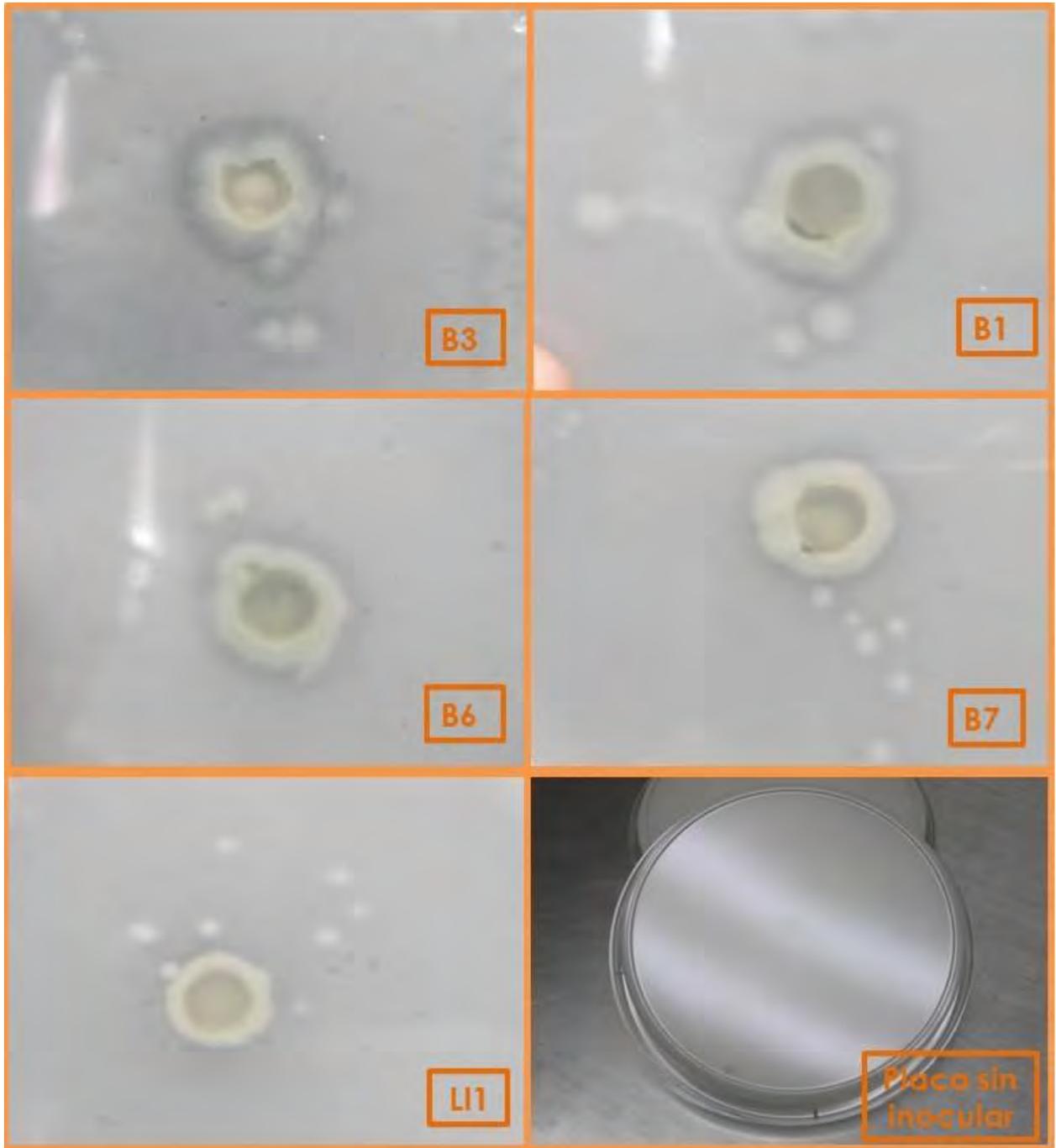


Figura 14 (continuación). Anillo de aclaramiento formado por hongos termofílicos degradadores de PU en medio agar Impranil® 0.5%

6.2.2 Degradación en medio líquido Impranil® 0.5%

Con el fin de aplicar un método cuantitativo a la búsqueda de las cepas con mayor capacidad de degradación de PU se desarrolló el método de degradación del barniz Impranil® 0.5% en medio líquido en base a mediciones espectrofotométricas. Dado que el Impranil® clarifica al ser degradado se aprovecha esta cualidad para cuantificarla en un medio acuoso, aplicando la ley de Lambert-Beer la cantidad de radiación electromagnética absorbida por el barniz se puede relacionar con la cantidad del analito que tenemos en la muestra permitiéndonos saber con la ayuda de un control negativo cuánto del barniz ha sido degradado. Fueron puestas a prueba las once cepas de hongos termofílicos aislados, cada una se inoculó por sextuplicado en tubos de ensaye con 10 mL de medio líquido Impranil® 0.5%. Se inocularon 6 tubos por cepa, incluyendo la cepa negativa, con un inóculo estandarizado de 100 mg del hongo así como 6 tubos sin inocular para control negativo (Materiales y Métodos 5.3.2). La cepa control negativo es una especie de *Cladosporium sp* donado por la Dra. Herminio Loza Tavera Facultad de Química, Conjunto de investigación E, UNAM. Se incubaron los tubos a 45°C por 5 y 9 días respectivamente, todos los tubos fueron agitados diariamente para promover la interacción entre el medio de cultivo y el micelio. Tras 5 días de incubación se procedió a realizar la lectura de tres de los 6 tubos totales por cada cepa en una primera ronda, así como tres tubos control negativo, para realizar la lectura el micelio fue filtrado con papel Wathman, al medio filtrado se le midió la absorbancia a 600nm utilizando el medio de cultivo sin el barniz como blanco. Los restantes tres tubos por cepa y tres tubos control negativo continuaron con su periodo de incubación. Transcurridos 9 días de incubación desde la inoculación se procedió a hacer una segunda ronda de lectura para los tubos restantes.

Con el objetivo de relacionar las absorbancias registradas en la prueba de degradación en medio líquido y con ello conocer la cantidad del barniz que fue degradado debido a la acción enzimática del hongo, se construyó una curva estándar con medio Impranil®, la curva relaciona la concentración en g de Impranil® por cada mL de medio con la absorbancia a 600nm. La calibración del espectrofotómetro se realizó con una preparación de medio líquido Impranil® que contenía todos sus componentes excepto el barniz Impranil® y se usó agua como blanco. En

la Tabla 10 se muestran los valores con los cuales se construyó la curva y en la Figura 15 se muestra la curva con un porcentaje de variación de 0.9923.

Tabla 10. Curva patrón para cuantificación de Impranil®

Concentración Impranil (g/L)	Absorbancia
0.25	0.1906
0.5	0.3366
0.75	0.5734
1.0	0.7240
1.25	0.9201
1.5	1.0641
1.75	1.2137
2.0	1.3353
2.25	1.5150
2.5	1.5877

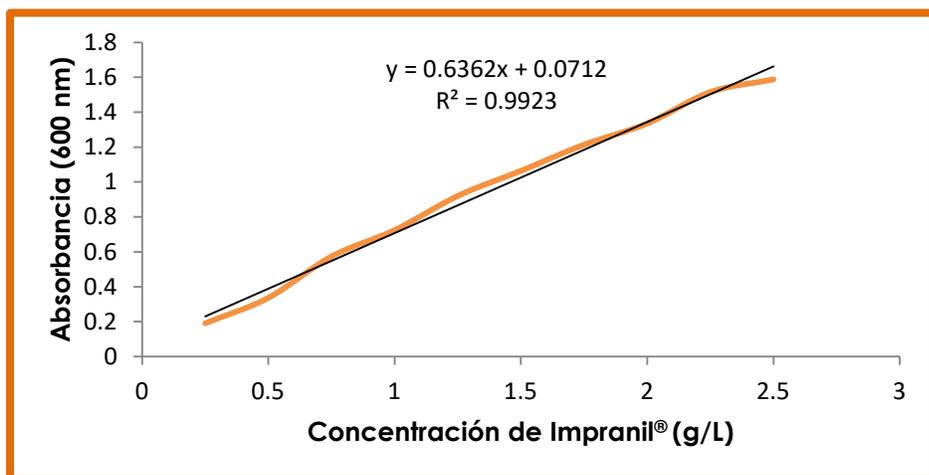


Figura 15. Curva patrón para cuantificación de Impranil®

Transcurridos los 5 días de incubación se realizó el primer periodo de lectura, los resultados se muestran en la Tabla 11 y la Figura 16, son expresados en porcentaje de degradación y fueron calculados restando la concentración en g/L de cada cepa a la concentración en g/L del control negativo.

Tabla 11. Degradación de Impranil® por hongos termofílicos degradadores de PU en medio líquido al día 5 de incubación

CEPA	Degradación de Impranil® (%)
	DÍA 5
B7	63.5 ± 0.43
B3	47.9 ± 6.04
B2	46.1 ± 5.39
B10	45.2 ± 2.48
LI2	44.7 ± 7.91
B4	43.7 ± 7.28
B6	43.2 ± 11.15
S1	42.6 ± 2.74
LI1	42.0 ± 7.12
S3	40.8 ± 9.68
B1	29.8 ± 0.43

Las once cepas se sometieron a esta prueba y se encuentran ordenadas en la tabla de manera descendente de acuerdo al porcentaje de Impranil® degradado. La cepa que muestra una mayor degradación es B7 con 63.5%, el resto de las cepas mostraron un menor porcentaje dentro de un intervalo de 47.9- 29.8% como puede notarse B7 está muy encima del resto de las cepas, concluyendo que en medio líquido es la mejor degradadora.

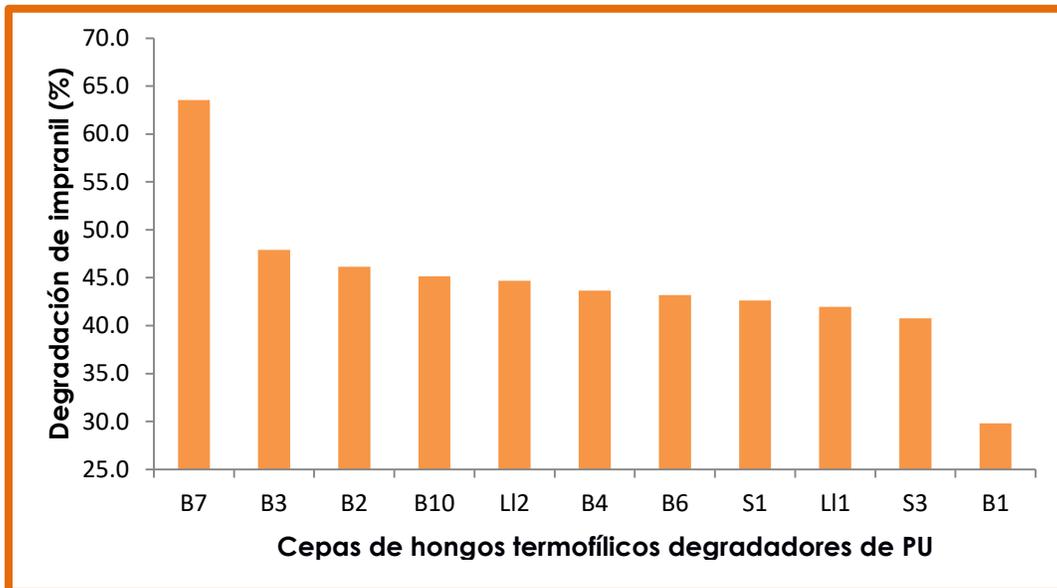


Figura 16. Degradación de Impranil® por hongos termofílicos degradadores de PU en medio líquido al día 5 de incubación

En la Figura 17 se muestran los tubos del medio de cultivo una vez filtrado el micelio y con los cuales se realizaron las lecturas de absorbancia al día 5 de incubación. Cada tubo inoculado con las cepas se expone junto al tubo control negativo.

Para el segundo periodo de lectura (al día 9 de incubación) se obtuvieron los datos mostrados en la Tabla 12 y la Figura 18, los cuales son expresados en porcentaje de degradación y fueron calculados de la misma manera que para el primer periodo de lectura. Las once cepas de trabajo se ordenan de acuerdo a su porcentaje de degradación del medio de manera descendente y agrupadas en seis grupos (a, ab, b, c, cd y d) de acuerdo a las diferencias significativas entre cepas según la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

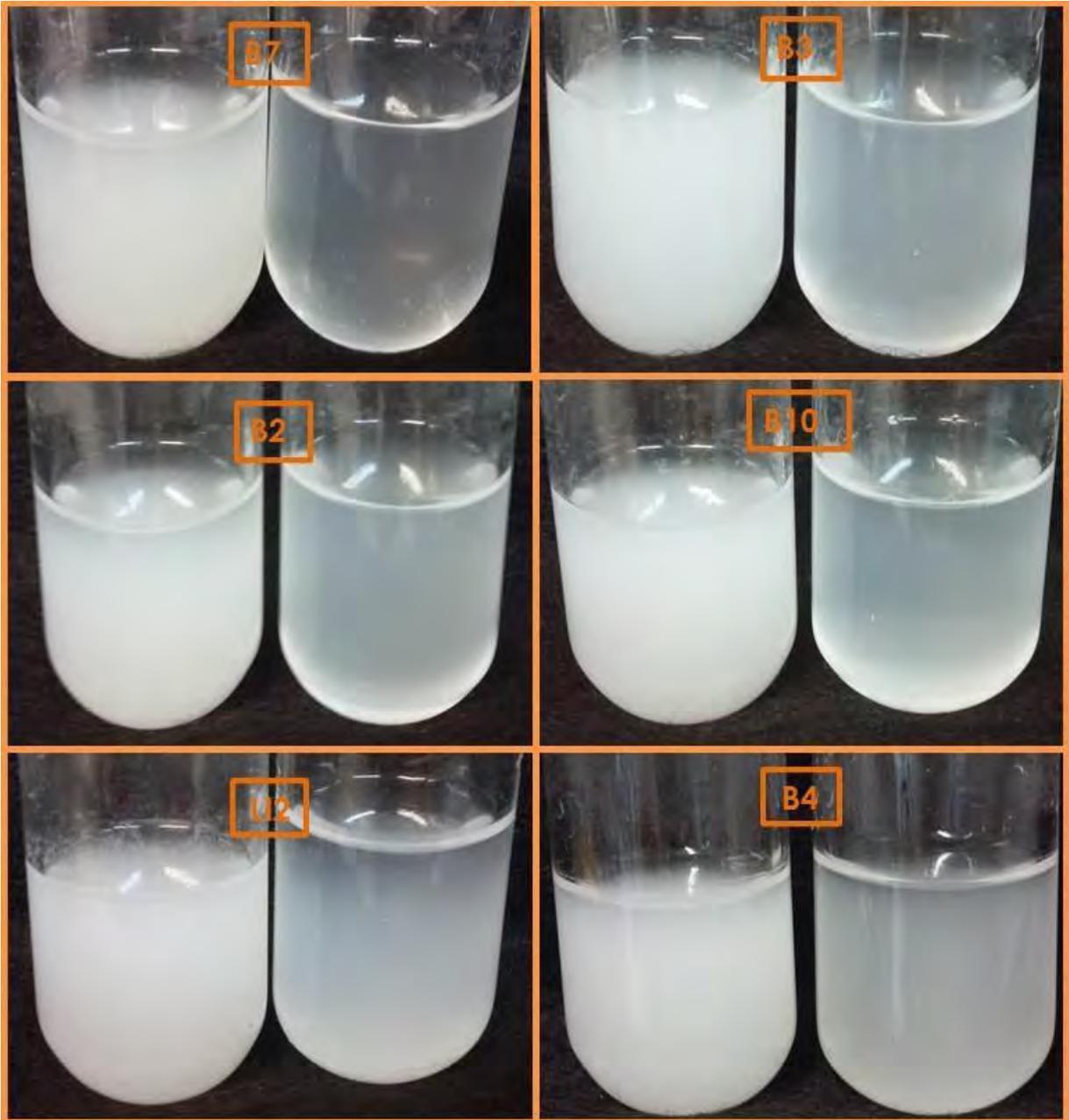


Figura 17. Aclaramiento en medio líquido Impranil® por hongos termofílicos degradadores de PU al día 5 de incubación

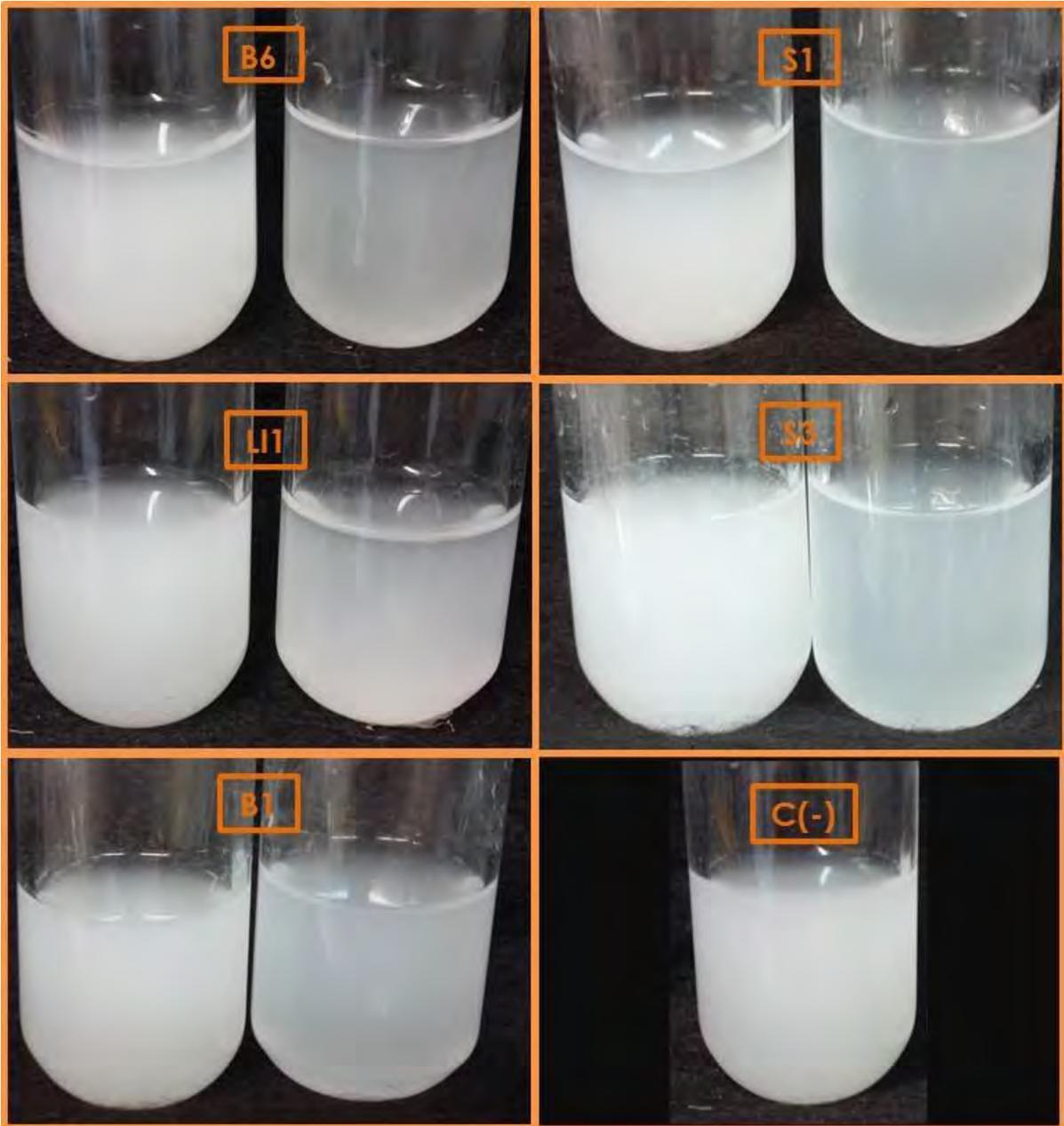


Figura 17 (continuación). Aclaramiento en medio líquido Impranil® por hongos termofílicos degradadores de PU al día 5 de incubación

Tabla 12. Degradación de Impranil® por hongos termofílicos degradadores de PU en medio líquido al día 9 de incubación

CEPA	Degradación de Impranil® (%)
	DÍA 9
L12	72.4 ± 1.81 d*
L11	71.6 ± 1.11 cd*
S3	71.6 ± 0.54 cd*
B3	68.3 ± 1.12 cd*
B10	67.6 ± 0.76 c*
B4	62.6 ± 2.32 b*
S1	61.4 ± 0.54 ab*
B2	61.2 ± 5.34 ab*
B7	59.0 ± 5.17 ab*
B1	58.1 ± 2.65 ab*
B6	57.0 ± 0.66 a*

*Letras diferentes en degradación de Impranil® al día 9 indican diferencia significativa entre cepas según la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

La cepa que muestra una mayor degradación es L12 en el grupo d con 71.6% siendo esta la mejor cepa que degrada el barniz en un periodo de 9 días, Le siguen las cepas del grupo cd, L11 y S3 con 71.6% y B3 con 68.3% son también consideradas como buenas degradadora. Las cepas que degradan moderadamente son B10 en el grupo c con 67.6% y B4 en el grupo b con 62.6%; por otra parte las que mostraron los porcentajes más bajas pertenecer al grupo ab y son S1, B2, B7 y B1 nótese que B7 fue la cepa mejor degradadora en el periodo de 5 días de incubación sin

embargo en el segundo periodo desciende su posición hasta la antepenúltima. Por último, B6 en el grupo a es la que menor cantidad de barniz degradó. De la prueba de degradación en medio líquido se concluye que las cepas son capaces de degradar el PU hasta en un 72%, se observan diferencias entre cepas respecto a dicha capacidad siendo las mejores degradadoras a los 5 días como las que poseen mayor velocidad de degradación y aquellas que mejor degradan a los 9 días como más constantes.

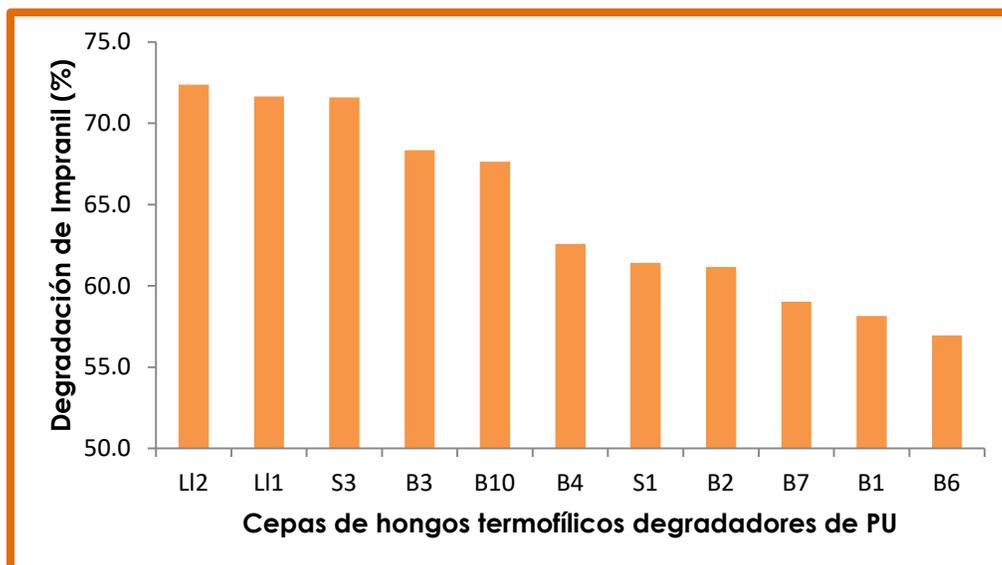


Figura 18. Degradación de Impranil® por hongos termofílicos degradadores de PU en medio líquido al día 9 de incubación

En la Figura 19 se muestran los tubos del medio de cultivo una vez filtrado el micelio y con los cuales se realizaron las lecturas de absorbancia al día 9 de incubación. Cada tubo inoculado con las cepas se expone junto al tubo control negativo.

Una vez que se conoció que las cepas de trabajo tienen en menor o mayor medida la capacidad de degradar el barniz de PU Impranil® se deseó saber si las cepas tenían la capacidad de degradar espumas de PU sólidas. Para lo cual se diseñó una prueba para medir la degradación que sufría la espuma de PU por cada una de las once cepas de trabajo.

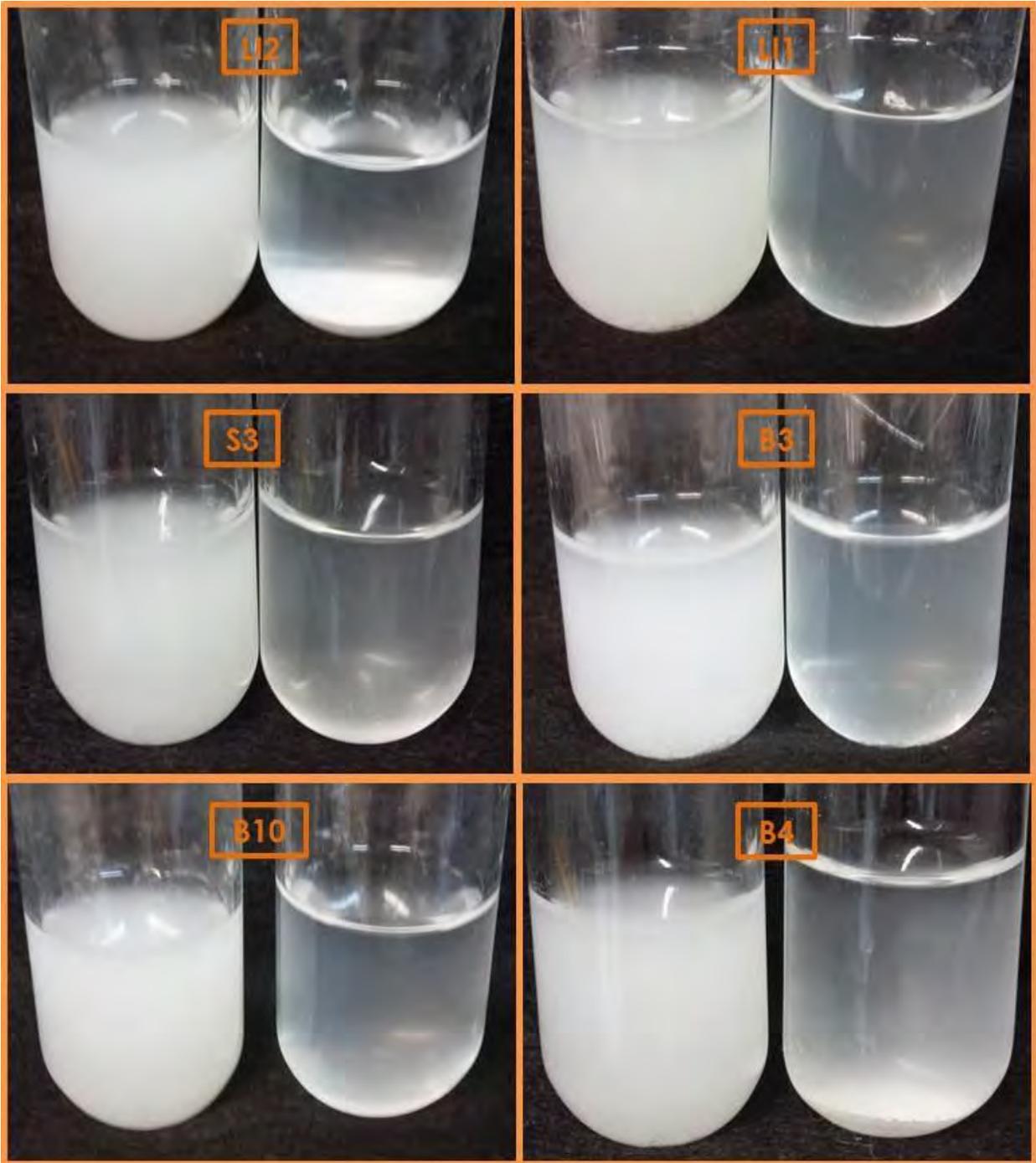


Figura 19. Aclaramiento en medio líquido Impranil® por hongos termofílicos degradadores de PU al día 9 de incubación

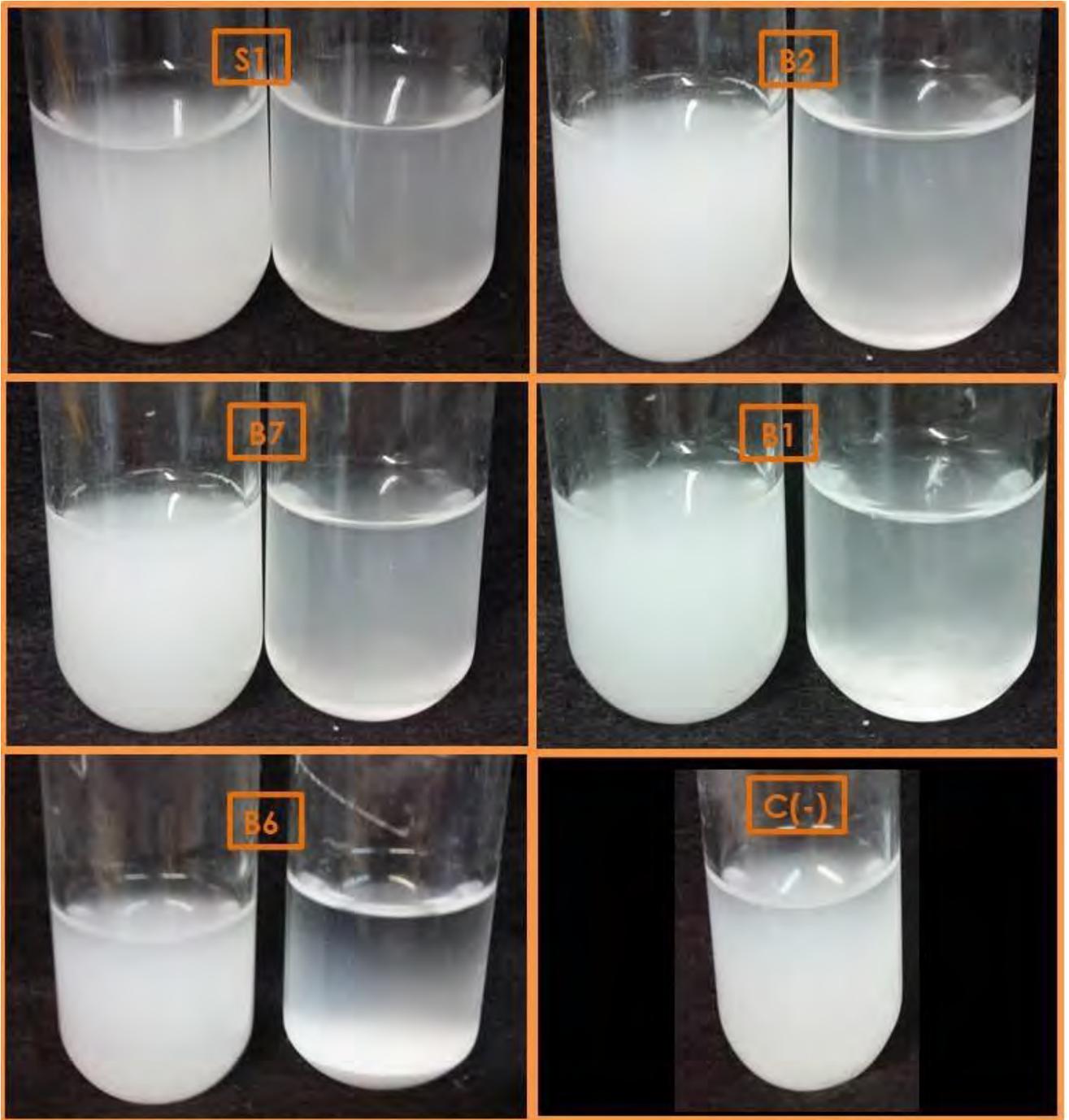


Figura 19 (continuación). Aclaramiento en medio líquido Impranil® por hongos termofílicos degradadores de PU al día 9 de incubación

6.3 DEGRADACIÓN DE ESPUMA DE PU POR CEPAS DE HONGOS TERMOFÍLICOS

Con el objetivo de determinar si las cepas de hongos termofílicos aisladas podrían ser capaces de degradar trozos de PU sólido, fueron inoculados cubos de espuma de PU de estructura conocida (Tabla 3), las espumas fueron cortadas en cubos de 2 cm de lado por 1cm de espesor, se pesó cada cubo y se sembraron con inóculos estandarizados de 100 mg de biomasa para las once cepas de hongos termofílicos, cada una se inoculó por sextuplicado incluyendo controles negativos. La cepa control negativo es una especie de *Cladosporium sp* donado por la Dra. Herminio Loza Tavera Facultad de Química, Conjunto de investigación E, UNAM. Las espumas inoculadas se colocaron en matraces con medio líquido PDB 50%, se incubaron por dos periodos de tiempo, 14 y 28 días. Se suministró 10mL de medio líquido PDA (50%) cada siete días para compensar la evaporación sufrida por la incubación y con el fin de estimular la germinación de las conidias y la producción de las enzimas necesarias para la degradación. El hongo creció sobre y dentro de los trozos de espuma. A los 14 días de incubación se sometieron tres espumas de cada cepa a un proceso de lavado con hipoclorito de sodio (Cloralex® diluida al 30%), secadas al vacío a temperatura ambiente y vueltas a pesar para determinar la pérdida de peso sufrida, así como los cambios en su morfología por la acción mecánica de la colonización. Las tres espumas por cepa restantes continuaron con su tiempo de incubación para su lectura a los 28 días.

Las pérdidas de peso registradas durante la primera lectura a los 14 días de incubación se concentran en la Tabla 13 y la Figura 20. Las once cepas de trabajo se ordenan de acuerdo a su porcentaje de degradación de manera descendente y agrupadas en once grupos (a, b, c, d, e, f, fg, gh, hi, e i) de acuerdo a las diferencias significativas entre cepas según la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$).

Los cálculos del porcentaje de degradación se obtuvieron restando el peso inicial de cada espuma con su peso pos-tratamiento (inoculación, incubación, lavado y secado) y calculando el porcentaje de peso perdido; al valor obtenido se le restó el porcentaje de pérdida de peso de las espumas control (sometidas al mismo tratamiento, pero sin inocular ningún microorganismo) obteniendo así el porcentaje real de degradación.

Tabla 13. Degradación de espuma de PU por hongos termofílicos degradadores de PU al día 14 de incubación

CEPA	Degradación de espuma de PU (%)
	DÍA 14
L12	43.5 ± 1.6 ^{i*}
S3	42.9 ± 1.5 ^{hⁱ}
B4	40.7 ± 0.8 ^{gh*}
L11	39.0 ± 2.0 ^{fg*}
B7	38.4 ± 2.0 ^{fg*}
B3	37.0 ± 1.5 ^{f*}
S1	34.3 ± 1.1 ^{e*}
B2	26.5 ± 1.7 ^{d*}
B10	25.1 ± 1.8 ^{d*}
B6	16.4 ± 1.4 ^{c*}
B1	12.5 ± 2.0 ^{b*}
Cepa (-)	6.5 ± 1.6 ^{a*}

*Letras diferentes en degradación de espumas de PU al día 14 indican diferencia significativa entre cepas según la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

En la Tabla 13 podemos observar que la cepa que más degrada la espuma a los 14 días de incubación es L12 y pertenece al grupo i con un 43.5% de degradación; seguido de las cepas S3 Y B4 en los grupos hi y gh respectivamente con 42.9 y 40.7% estas también se consideran como buenas degradadoras; las cepas de los grupos fg, L11 Y B7, f, B3 y e, S1 son consideradas medianamente degradadoras debido a que su porcentaje

de degradación se encuentra en el rango de 34.3 – 39%. Las peores degradadoras en esta prueba pertenecen al grupo d, B2 y B10 con 26.5 y 25.1% respectivamente, grupo c, B6 con 16.4% y la peor degradadora es la cepa B1 en el grupo b con 12.5%. Nótese que la cepa control negativo pertenece al último grupo “a” y presenta un 6.5% de degradación, lo cual se sospecha es debido al efecto mecánico de la colonización.

En la Figura 21 se observan las pérdidas de peso evidentes efectuadas en las espumas así como los cambios en su estructura sufridos tras la incubación por 14 días. Se muestran las espumas inoculadas por triplicado con cada cepa de hongo junto a la espuma utilizada como control negativo.

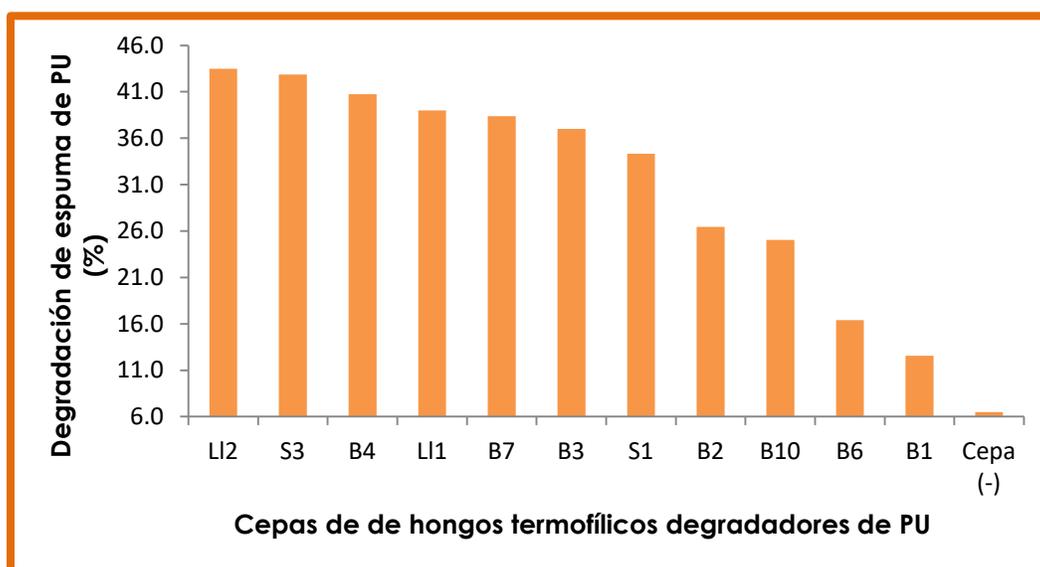


Figura 20. Degradación de espuma de PU por hongos termofílicos degradadores de PU al día 14 de incubación

Para el segundo periodo de lectura, a los 28 días de incubación, se obtuvieron las pérdidas de peso mostradas en la Tabla 14 y la Figura 22. Las once cepas de trabajo se ordenan de acuerdo a su porcentaje de degradación de manera descendente y agrupadas en once grupos (a, b,, c, d, e, f, fg, gh, hi, e i) de acuerdo a las diferencias significativas entre cepas según la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$). Los cálculos del porcentaje de degradación se obtuvieron restando el peso inicial de cada espuma con su peso pos-tratamiento (inoculación, incubación, lavado y secado) y calculando el porcentaje; al valor obtenido se le restó el porcentaje de pérdida de peso de las espumas control obteniendo así el porcentaje real.

Espuma inicial (X3)

Espumas tras 14 días de incubación

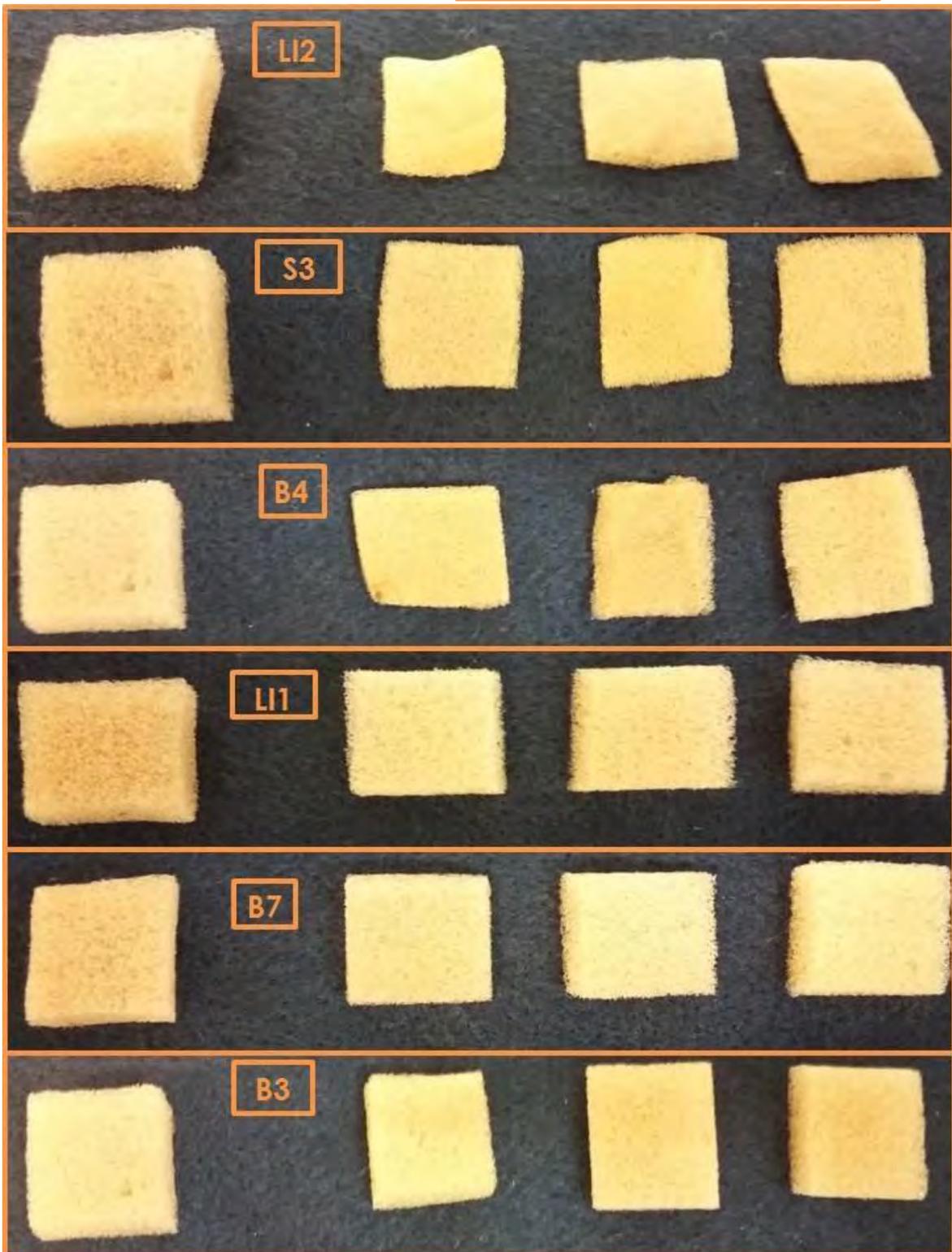


Figura 21. Espumas de PU degradadas por hongos termofílicos tras 14 días de incubación.

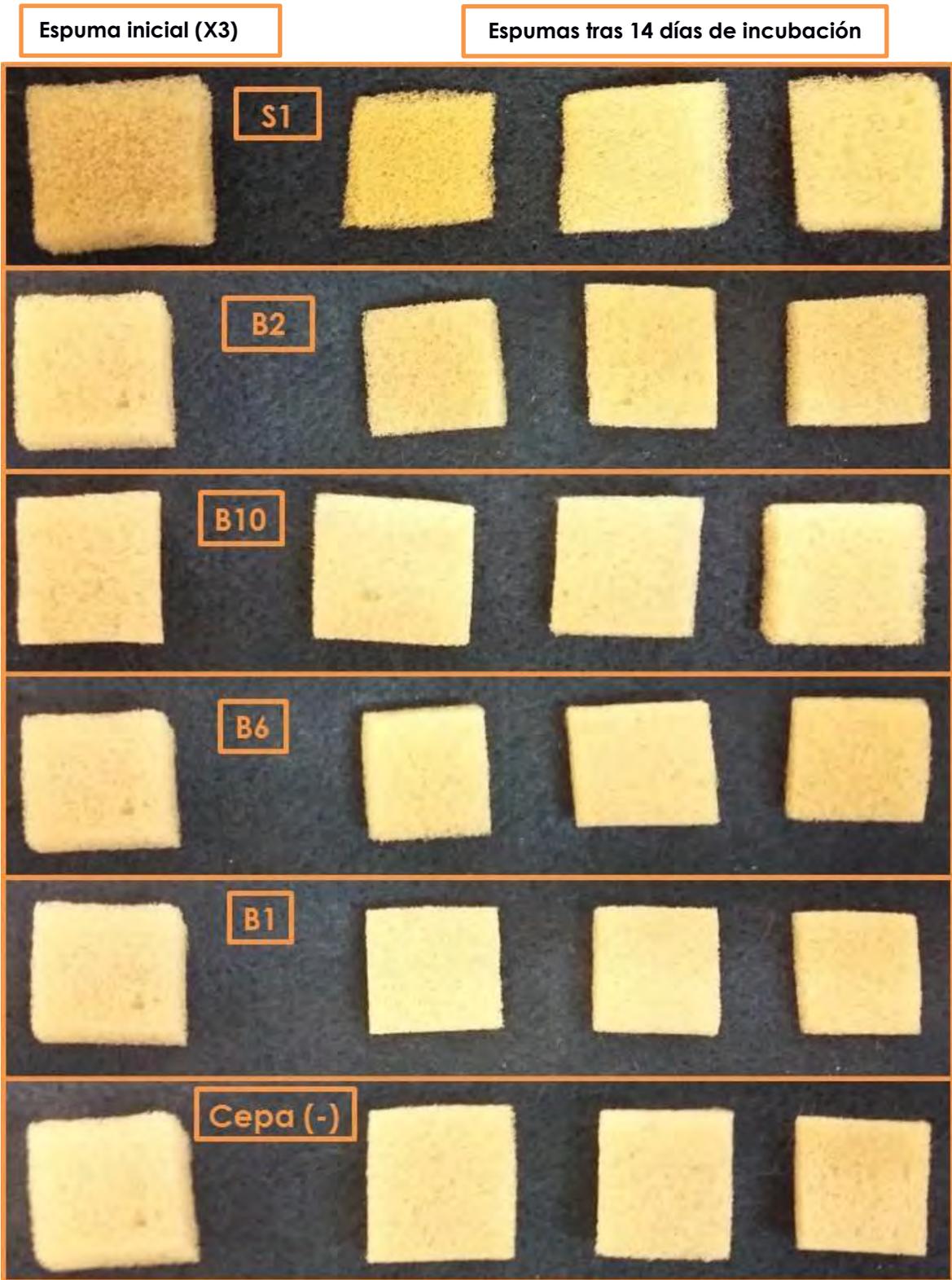


Figura 21 (continuación). Espumas de PU degradadas por hongos termofílicos tras 14 días de incubación.

La cepa mejor degradadora de espuma a los 28 días de incubación es S3 y pertenece al grupo h con un 70.3% de degradación; seguido de la cepa B4 en el grupo g con un 64.2% de degradación y las cepas LI1, B3, LI2 y B7 en el grupo f cuyo porcentaje de degradación se encuentra en el rango de 59.3 – 57.0% y son consideradas también como buenas degradadoras. La cepa B10 del grupo e con 48.5%, S1 del grupo d con 44.8% y B2 del grupo c con 34.2% son consideradas como medianamente degradadoras; finalmente las cepas B1 y B6 pertenecientes al grupo b con 29.1 y 26.4% de degradación respectivamente se consideran las peores degradadoras. La cepa control negativo pertenece al último grupo "a" y presenta un 8.2% de degradación.

En general las espumas tuvieron una mayor degradación a los 28 días de incubación alcanzando hasta un 70%. La espuma tiene una densidad de 15.5 Kg/m³ y es porosa, característica que permite la introducción del micelio a su interior promoviendo así la colonización y utilización.

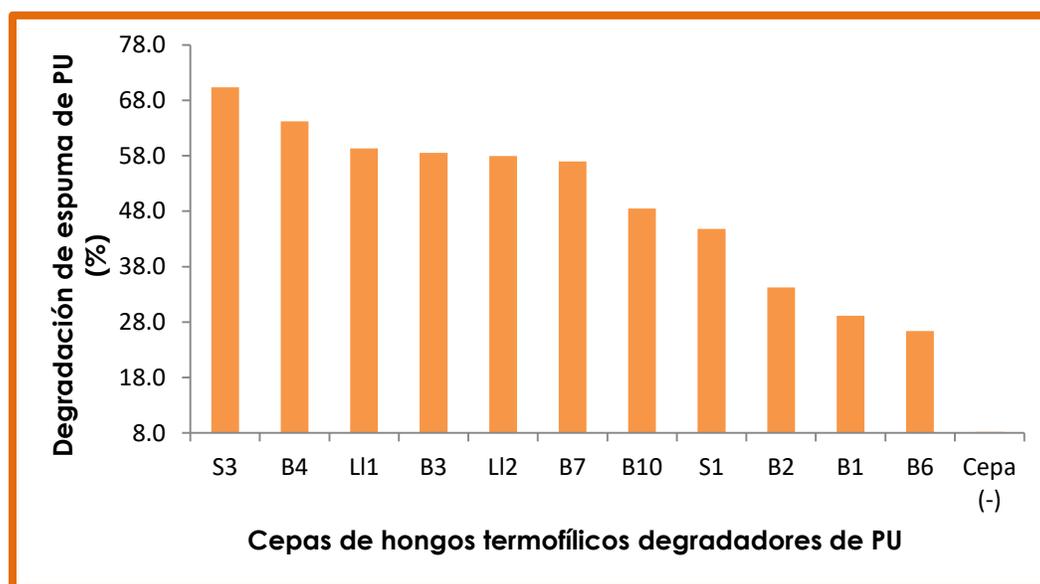


Figura 22. Degradación de espuma de PU por hongos termofílicos degradadores de PU al día 28 de incubación

Tabla 14. Degradación de espuma de PU por hongos termofílicos degradadores de PU al día 28 de incubación

CEPA	Degradación de espuma de PU (%)
	DÍA 28
S3	70.3 ± 1.6 h*
B4	64.2 ± 0.4 g*
L11	59.3 ± 0.7 f*
B3	58.5 ± 1.7 f*
L12	58.0 ± 5.6 f*
B7	57.0 ± 1.6 f*
B10	48.5 ± 1.2 e*
S1	44.8 ± 1.2 d*
B2	34.2 ± 1.5 c*
B1	29.1 ± 1.4 b*
B6	26.4 ± 1.3 b*
Cepa (-)	8.2 ± 1.8 a*

*Letras diferentes en degradación de espumas de PU al día 28 indican diferencia significativa entre cepas según la prueba de Duncan ($\alpha=0.05$)

En la Figura 23 se observan las pérdidas de peso evidentes efectuadas en las espumas así como los cambios en su estructura sufridos tras la incubación por 28 días. Se muestran las espumas inoculadas por triplicado con cada cepa de hongo junto a la espuma utilizada como control negativo.

Espuma inicial (X3)

Espumas tras 28 días de incubación

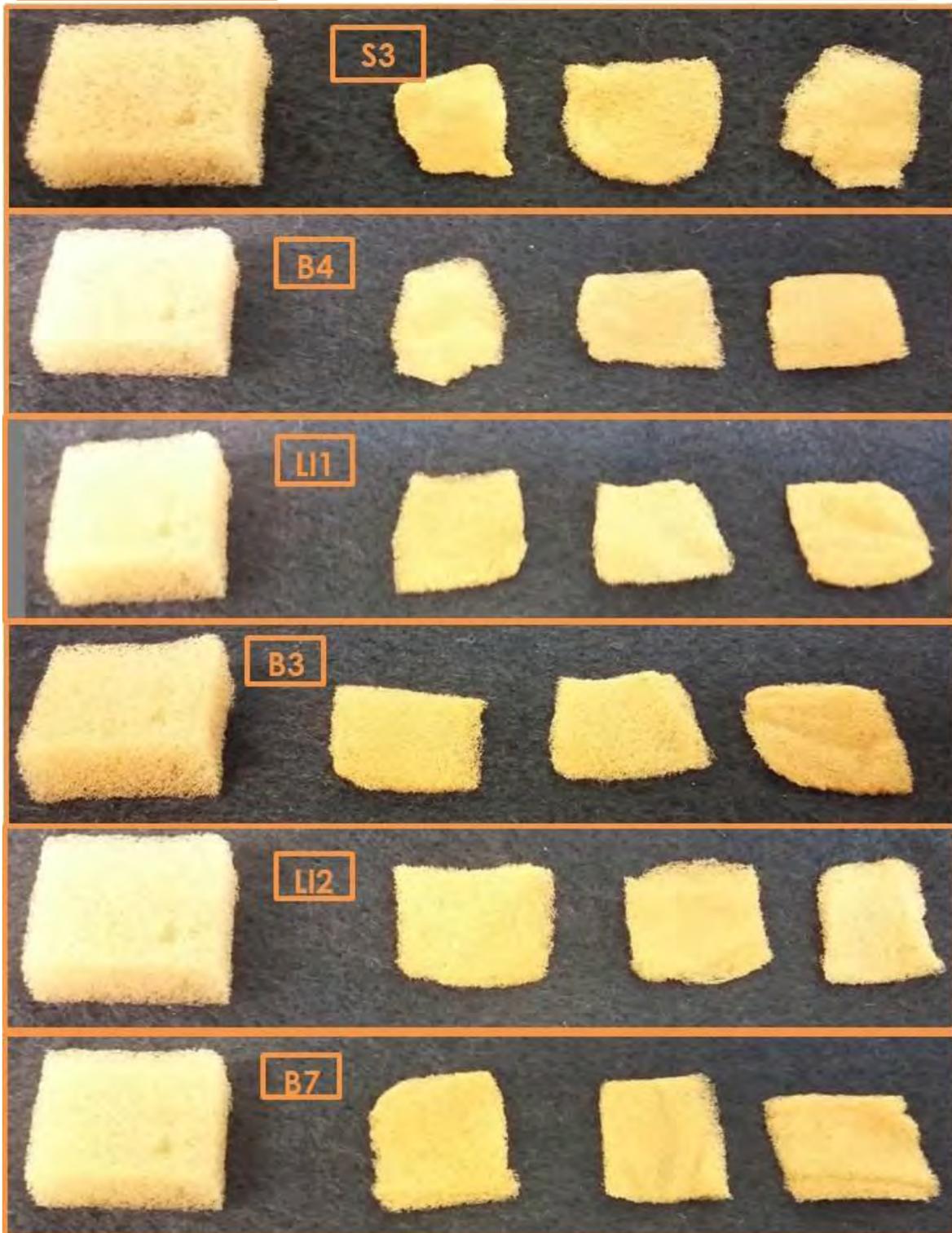


Figura 23 (continuación). Espumas de PU degradadas por hongos termófilos tras 28 días de incubación.

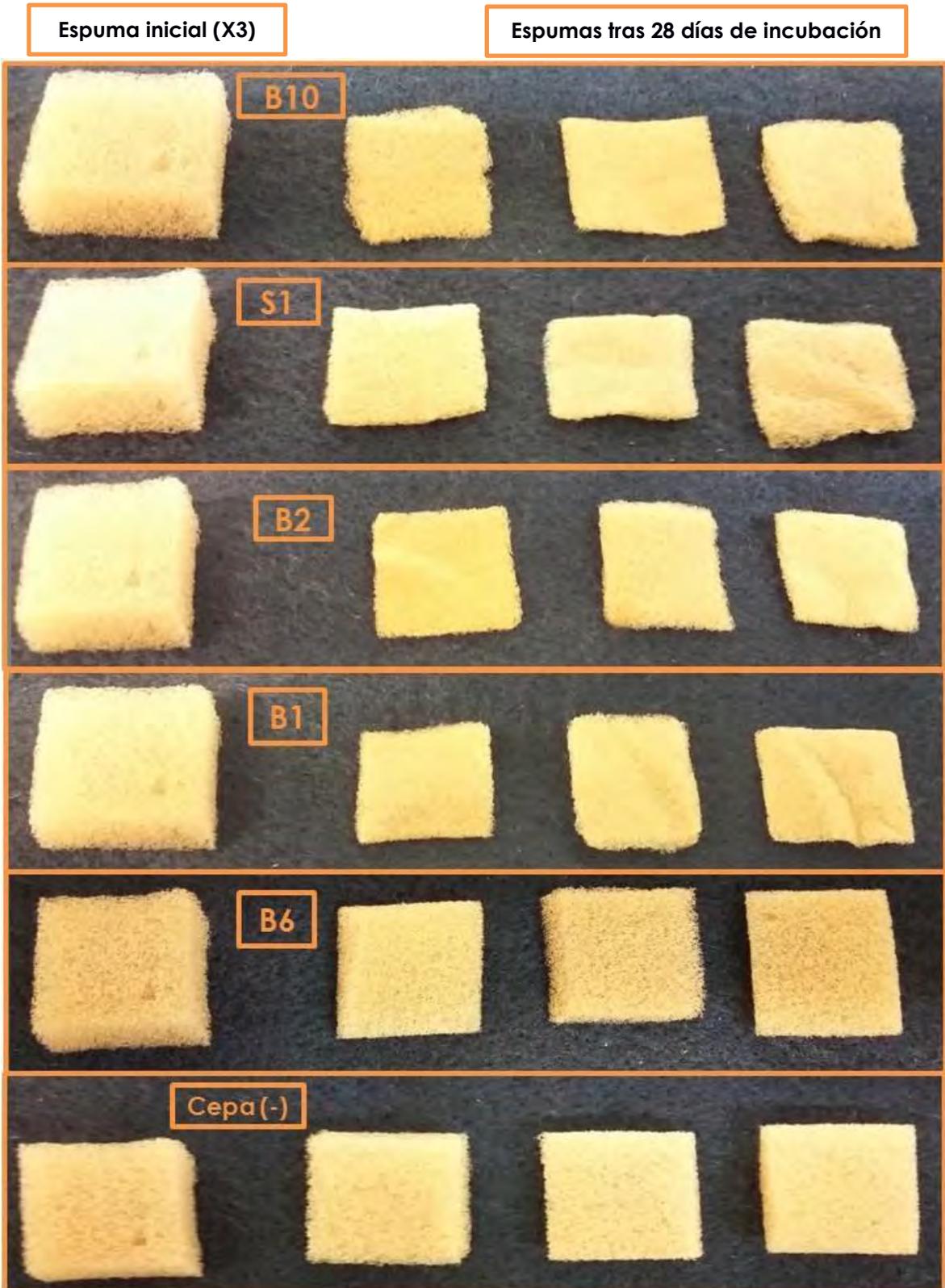


Figura 23. Espumas de PU degradadas por hongos termofílicos tras 28 días de incubación.

6.4 IDENTIFICACIÓN DE LOS HONGOS TERMOFÍLICOS AISLADOS

6.4.1 Identificación por morfología microscópica

La identificación de hongos de tipo filamentoso está basada principalmente en la observación microscópica. Para lo cual se resembró cada cepa en medio PDA y se incubó por 3 días a 45°C. Se efectuó un microcultivo y se observaron al microscopio las estructuras como el conidióforo, hifas y fiálides. Las once cepas fueron identificadas presuntivamente como *Aspergillus fumigatus*.

En la figura 24 se muestran las observaciones al microscopio de los microcultivo de las once cepas aisladas. Todas poseen una sola fila de fiálides que cubren sólo la parte superior de la vesícula la cual tiene forma alargada y columnar, es uniseriada. Sus conidias son esféricas y relativamente grandes (300-500µm).

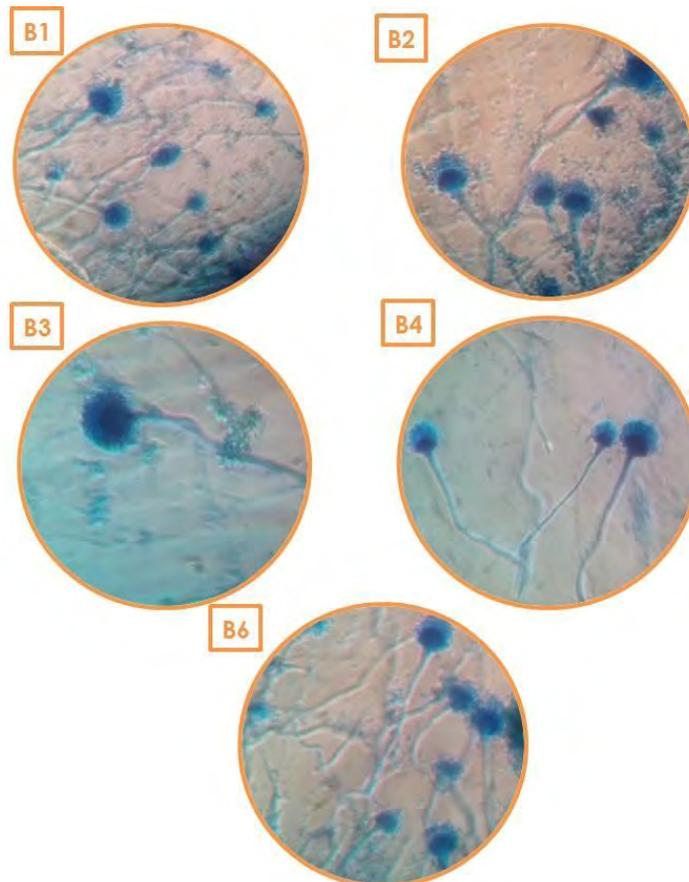


Figura 24. Observación microscópica de hongos termofílicos degradadores de PU identificados presuntivamente como *Aspergillus fumigatus*, microcultivo teñido con azul de lactofenol, aumento 40X. Se observan cabezas de fructificación con una sola hilera de fiálides sobre la mitad superior de una vesícula bulbosa. Las conidias son esféricas y lisas.

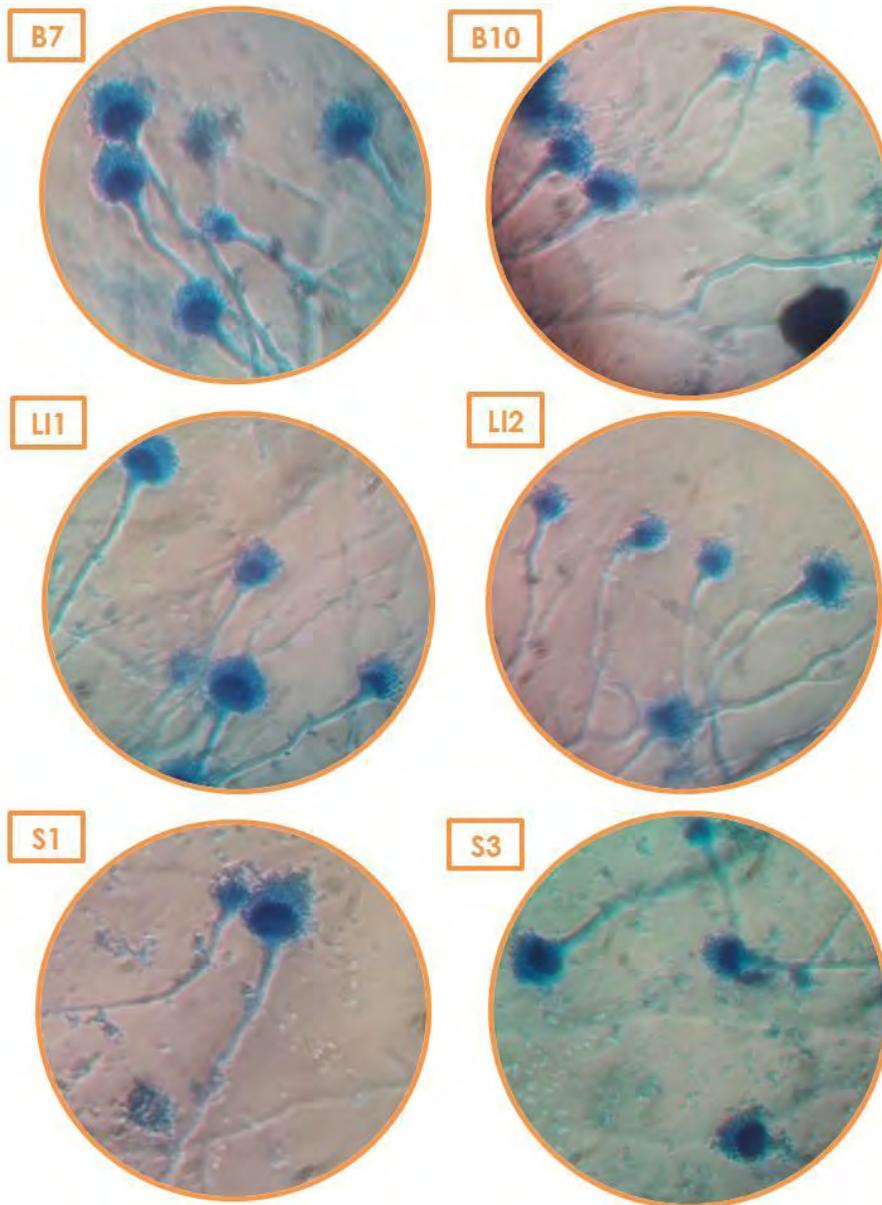


Figura 24 (continuación). Observación microscópica de hongos termofílicos degradadores de PU identificados presuntamente como *Aspergillus fumigatus*, microcultivo teñido con azul de lactofenol, aumento 40X. Se observan cabezas de fructificación con una sola hilera de fiálides sobre la mitad superior de una vesícula bulbosa. Las conidias son esféricas y lisas.

6.4.2 Identificación por técnicas de biología molecular

Para la asignación de especies, a las cinco cepas de hongos termofílicos seleccionados en base a su mayor capacidad de degradación mostrada (B7, B4, LI1, LI2 y S3), y con la finalidad de realizar una identificación confirmatoria se aplica la técnica de amplificación por reacción en cadena de polimerasa para su posterior secuenciación.

El ADN fue extraído por la técnica de fenol-cloroformo y sometida a una separación por electroforesis en gel de agarosa al 0.5% (Materiales y Métodos 5.2.4), la imagen del gel después de la extracción, es mostrada en la Figura 24, donde se compruebo la integridad del material genético.



Figura 24. Gel de electroforesis en agarosa 0.5% tras la extracción de ADN de las cepas de hongos termofílicos degradadores de PU: B7, B4, LI1, LI2 y S3

EL ADN extraído fue sometido a 35 ciclos en el termociclador, con los primers ITS1 e ITS4. Terminados los ciclos se realizó una corrida electroforética en gel de agarosa 0.5% para corroborar la existencia del material genético deseado usando el marcador de peso molecular Lambda DNA-*Hind* III, se obtuvo una secuencia de 1200 pb, el gel se muestra en la Figura 25.



Figura 25. Gel de electroforesis en agarosa 0.5% tras la amplificación por PCR de ADN de las cepas de hongos termofílicos degradadores de PU: B7, B4, LI1, LI2 y S3



Figura 26. Gel de electroforesis en agarosa 0.5% tras la extracción de ADN con GeneJet Gel Extracción de las cepas de hongos termofílicos degradadores de PU: B7, B4, LI1, LI2 y S3

El ADN inmerso en el gel de agarosa se extrajo cortando cubos del material y se purificó con el kit comercial de purificación GeneJet Gel Extraction, se realizó electroforesis en gel de agarosa 0.5% para comprobar la presencia del material extraído usando el marcador de peso molecular Lambda DNA-Hind III (Figura 26). Una vez purificado el material genético y contenido en solución fue secuenciado de manera externa por la técnica de Sanger en MacroGen Korea con los primers ITS1 e ITS4.

Las secuencias se depuraron haciendo alineamientos y revisando el electroferograma enviado por MacroGen. La identificación se hizo alineando las secuencias obtenidas en la base de datos del GenBank, a través del análisis por BLAST.

En la Tabla 15 se muestra para cada cepa, el nombre de la cepa, clave asignada por MacroGen, porcentaje de concordancia de la secuencia otorgada por Gene Bank, número de acceso a Gene Bank y el género especie asignada por Gene Bank.

Tabla 15. Identificación de las cepas de hongos termofílicos degradadores de PU por secuenciación

Cepa	Nombre clave de la cepa para MacroGen	Concordancia (%)	Número de acceso Gene Bank	Longitud analizada (PB)	Resultado
B4	LDM05-ITS1/LDM05-D2	100%	FJ867935.1	1054	<i>Aspergillus fumigatus</i>
LI1	LDM02-ITS1/LDM02-D2	100%	FJ867935.1	1080	<i>Aspergillus fumigatus</i>
LI2	LDM04-ITS1/LDM04-D2	100%	FJ867935.1	984	<i>Aspergillus fumigatus</i>
S3	LDM03-ITS1/LDM03-D2	100%	FJ867935.1	1064	<i>Aspergillus fumigatus</i>
S7	LDM01-ITS1/LDM01-D2	100%	FJ867935.1	1055	<i>Aspergillus fumigatus</i>

7. DISCUSIÓN

El primer objetivo de este estudio fue aislar de compostas de champiñón (*Agaricus bisporus*) cepas de hongos termofílicos con capacidad de utilizar PU como única fuente de carbono para lo cual se sembraron soluciones de lavados de composta de champiñón en tres diferentes estadios, bunker, llenado y siembra en medio agar Impranil® 0.5%.

Si bien se ha estudiado la biodegradación fúngica de PU, los estudios realizados se han circunscrito a hongos mesofílicos. El objetivo de averiguar el potencial de degradación por hongos termofílicos es la alta tasa de crecimiento y la rapidez en su metabolismo y síntesis proteica. Al respecto Maheshwari *et al.* (16) señala que la velocidad de degradación y resíntesis proteica es dos veces mayor que en especies mesofólicas.

Cosgrove *et al.* (6) al estudiar hongos de tipo ambiental menciona que el PU contiene muchos enlaces moleculares que son análogos a aquellos encontrados en macromoléculas biológicas y los genes de los hongos codifican un amplio rango de enzimas de secreción como hidrolasas por lo que se incrementa la probabilidad de encontrar degradadores de PU de forma fortuita. Para la búsqueda de hongos termofílicos fue elegida la composta para el cultivo de *A. bisporus* ya que en el proceso de preparación del sustrato para champiñón por composteo, se presenta una sucesión de microorganismos de diversos tipos en grandes cantidades. Straatsma *et al.* (22) al estudiar la microecología fúngica presente en la composta de *A. bisporus* señala que en la solución drenada de composta dominan hongos de rápida esporulación como *Aspergillus fumigatus*, *Rhizomucor* y *Absidia corymbifera*. *Aspergillus fumigatus* es una especie que aparece al inicio del proceso de composteo y que desaparece en el pico de la pasteurización, su función es la de degradar celulosa y no la de promover el crecimiento de *A. bisporus* como lo hacen otros hongos termofílicos presentes en la composta pasteurizada, como es el caso de *Scytalidium thermophilum*.

Se enriquecieron los microorganismos presentes en la composta de distintas etapas del proceso de producción de sustrato para champiñón incubando las muestras en medio líquido con Impranil®. De ahí se sembraron alícuotas en medio agar Impranil® con el fin de realizar una preselección de hongos con capacidad de utilizar el barniz. Aquellos hongos con capacidad de crecer y clarificar el medio fueron

seleccionados. Se asilaron once cepas de hongos termofílicos, ocho cepas procedentes del bunker, dos de llenado de túnel de pasteurización y dos a la siembra (Tabla 6). Todas ellas mostraron características fenotípicas similares, en color verde olivo, polvosas y con un alto grado de esporulación (Tabla 7).

El barniz de poliéster poliuretano Impranil® es una solución aniónica que posee la capacidad de cambiar su apariencia blanco lechosa a translúcida una vez que es degradado. Esta característica ha sido utilizada como criterio de cuantificación de la degradación de poliéster poliuretanos y diversos estudios sustentan su empleo (4)(6)(7)(20). Se cuenta con evidencia que los enlaces de poliuretanos tipo poliéter son significativamente menos aptos para usarse como fuente de nutrientes en comparación con aquellos PU de enlaces tipo poliéster (8).

Para conocer la capacidad que posee cada cepa aislada de clarificar el medio agar Impranil® estas fueron sembradas en dicho medio con un inóculo estandarizado de 8 mm ϕ midiendo los halos de aclaramiento y el diámetro de colonización. Tras 5 días de incubación a 45°C se obtuvo un máximo de anillo de degradación de 3.8 mm para la cepa B4 y un mínimo de 1.3 para L11 (Figura 13). Es de hacer notar que la cepa que crece más rápidamente, B6, no es necesariamente la que más degrada, que resultó ser la cepa B4. Esto probablemente es debido a que su gasto de energía es dirigido a actividades distintas al consumo del barniz como fuente de carbono. El ensayo de aclaramiento fue realizado por Russell (20) en tubo de manera vertical con agar Impranil® 0.5% con especies mesofílicas de hongos endofíticos, reporta una profundidad máxima de aclaramiento de 30 mm para *Lasiodiplodia*. En el presente estudio, se adecuó el método para medir la degradación del barniz de una forma más cuantitativa midiendo anillos de aclaramiento en un medio en caja de agar.

Respecto a la capacidad invasiva en medio agar Impranil® 0.5% se obtuvo un diámetro máximo de 21.5mm y un mínima de 16.8 mm (Figura 12). Loredó *et al.* (14) señalan un diámetro colonial de 75 mm de diámetro en 4 días para *Trichoderma* en medio de PU 0.3% enriquecido con 0.2% de glucosa para disminuir el estrés y permitir la adaptación al medio. Aunque se ha estudiado que para degradar PU sólido se requieren enzimas con dominios de unión hidrófobos, estos no son necesarios para la degradación de Impranil®, por lo tanto aquellos hongos con la capacidad de usar barniz de PU como sustrato pueden ser incapaces de hacerlo con PU sólido,

además la composición química del PU influye fuertemente su degradabilidad y disponibilidad como sustrato, y el Impranil® y las espumas de PU no tienen fórmulas idénticas. Sin embargo se ha observado que aquellos hongos que clarifican el medio con barniz de PU Impranil®, generalmente son capaces de usar la espuma de PU como sustrato. Se conoce que el barniz de Impranil® puede ser usado para bioestimular la degradación de espuma de PU de tal manera que pueda ser inicialmente colonizada por especies que serán más tarde desplazadas por otras, así la sucesión de comunidades fúngicas ha sido demostrada que ocurre en la biodegradación de plásticos (6).

Con el fin de contar con una prueba cuantitativa de la capacidad de degradar el barniz de poliéster fueron inoculadas las once cepas seleccionadas en tubos con medio líquido Impranil® 0.5%. Se midió espectrofotométricamente la turbidez presente en el medio (al día 5 y 9 de incubación a 45°C), esta es inversamente proporcional a la cantidad de barniz degradado por el hongo. Al día 5 de incubación, B7 produjo un 63.5% de degradación seguida por un rango de 40% de degradación para todas las cepas restantes a excepción de B1 con 29.8% (Figura 16). Para el día 9 de incubación la cepa LI2 registró un 72.4% de degradación como máximo y B6 con 57.0% como mínimo (Figura 18). Es de hacerse notar el comportamiento de LI2, ya que se tiene para esta cepa un buen crecimiento micelial de 18.8 mm, con un anillo de aclaración de 2.3 mm, una degradación de medio líquido de 44.7% y 72.4% para 5 y 9 días respectivamente, perfilándose como una cepa con alta capacidad de utilizar PU. Russell *et al.* (20) realizó un ensayo de aclaración en medio líquido donde obtuvo que el orden relativo de las cepas respecto a su poder de aclaramiento fue diferente de aquel observado en el ensayo en sólido. Con *Lasiodiplodia*, un hongo endofítico se obtuvo el mayor porcentaje de aclaración (80%) tras dos semanas de incubación usando como control positivo *Aspergillus niger* que obtuvo un 60% de aclaramiento. En otros estudios se ha utilizado el PU líquido como una solución de preadaptación de los microorganismos al PU, Hincapié *et al.* (11) menciona que fueron identificadas actividades estereasa del hongo *Chaetomium globosum* y *Aspergillus terreus*, estos microorganismos no crecen sin ayuda de PU líquido, estas enzimas deben ser inducidas mediante la adición de dicho barniz al medio donde están contenidas las espumas a degradar. Álvarez *et al.* (1) por su parte identificó actividad

estereasa, proteasa y ureasa, en *Penicillium sp.*, *Cladosporium sp.* y *Aspergillus sp.*

Las altas cifras en porcentaje de degradación nos sugiere el valioso potencial de degradación del barniz de PU por los hongos.

El siguiente objetivo fue conocer la capacidad de las cepas para degradar espuma de PU sólida, para lo que se inocularon espumas de PU, incubadas por 14 y 28 días a 45°C. Se calculó la pérdida de peso, en relación a su peso inicial, que sufrieron las espumas a causa de la degradación ejercida por el crecimiento y excreción de enzimas extracelulares por parte de los hongos. La presencia de piezas de espuma provee al hongo una matriz de soporte que le facilita la colonización y el desarrollo micelial, al mismo tiempo que los poros son espacios propicios para la colonización (11).

La espuma utilizada para el ensayo mencionado es de estructura patentada, se conoce que es una combinación del gas óxido de etileno que sirve para brindarle la característica de celdas y un poliéster polioliol a base de propileno (Tabla 3). Se ha reportado en la bibliografía que el ataque enzimático de los hongos a las espumas está determinado por las características fisicoquímicas de las mismas tales como el peso molecular o la longitud de los segmentos en la estructura no ramificados. Se obtuvieron pérdidas de peso del 43.5% para LI2 a los 14 días de incubación como pérdida máxima, muy cercana esta S3 con un 42.9% y 12.5% para B1 como pérdida mínima (Figura 20) mientras que la cepa control negativo produjo un 6.5%. Para el día 28 de incubación con la cepa S3 se obtuvo un 70.3% de degradación, con la cepa B4 un 64.2% y como degradación mínima se obtuvo 26.4% con la cepa B6, la cepa control negativo presentó un 8.2% de degradación (Figura 22). Físicamente las espumas se observaron con estructura debilitada, de textura pegajosa y de poros más amplios (Figura 21 y Figura 23).

Varios autores han utilizado el ensayo de pérdida de peso para determinar la biodegradación de PU por parte de microorganismos. Ghazali *et al.* (10) reportó pérdidas de peso de 40.2% para *Aspergillus niger* en espumas incubadas por 4 semanas en un medio mínimo de nutrientes (enriquecido con extracto de malta 1% y peptona 1%) en comparación con las incubadas en medio mínimo de sales con 25.3% de pérdida, sugiriendo que los hongos requieren una pequeña cantidad de nutrientes para la germinación de las conidias. Hincapié *et al.* (11) señala que *Aspergillus*

niger no se adaptó totalmente a las espumas de PU como única fuente de carbono y nitrógeno tras 30 días de incubación en un reactor con aireación a 25°C, de tal modo que fue necesario adicionar PU líquido (Czapeak) en proporción 1:3 como una forma de estimulación para que el hongo se desarrollara en el medio. Por otra parte Marthur y Prasad (17) reportan una pérdida de peso del 60.6% de espumas de poliéster PU inoculadas con *Aspergillus flavus* después de 30 días de incubación. Zafar *et al.* (26) incubaron por 12 semanas espumas de PU residual a 25, 45 y 50 °C en composta de residuos alimenticios donde se observó un daño fisiológico considerable, las especies involucradas en este deterioro fueron *Fusarium solani* a 25°C y *Aspergillus fumigatus*, *Thermomyces lanuginosus* y *Candida ethanolica* a 45 y 50°C, esta última relacionada a una enzima lipasa.

El ataque enzimático a las espumas ocurre sólo si la cadena de carbono posee una suficiente extensión libre de sustituyentes en la periferia de los enlaces uretano. Darby y Kaplan (8) sugieren que tres grupos metileno adyacentes son requeridos para que el ataque enzimático ocurra, el ataque es débil si sólo dos grupos están presentes, así mismo la proximidad de los grupos uretano entre sí puede interferir con la accesibilidad de las enzimas a los grupos susceptibles en la molécula.

Los microorganismos son capaces de biodegradar un rango complejo de polímeros bajo ciertas condiciones dependiendo de la composición de la molécula, peso molecular y la presencia de microorganismos específicos en la superficie del material. Algunos polímeros casi pueden utilizarse completamente como fuente de carbono y energía, mientras que otros solo se degradan parcialmente (10). Es importante anotar que la biodegradación de un sustrato de polímero raramente alcanza el 100% de mineralización, y la razón es que una pequeña porción del polímero es incorporada dentro de la biomasa microbiana, humus y otros productos naturales (11).

Para la identificación de géneros en las cepas aisladas se realizó inicialmente la descripción morfológica de cada cepa por observación microscópica con la ayuda de la técnica de microcultivo (Figura 24), siendo todas ellas presuntivamente *Aspergillus fumigatus*. Cinco cepas fueron elegidas de acuerdo a su capacidad de degradación de PU para ser sometidas a análisis para identificación por biología molecular. El ADN se extrajo de acuerdo a la técnica de fenol – cloroformo, amplificada por

PCR la región de espaciador ribosomal (rADN) con ayuda de los primers universales para hongos ITS1 e ITS4. Las secuencias amplificadas fueron visualizadas en gel de agarosa 0.5% con una longitud de 1200 pb (Figura 25). Los productos de PCR fueron purificados por GeneJet Gel Extraction y secuenciados por Macrogen Korea. El análisis de las secuenciaciones fue realizado en el software de GeneBank, BLAST. Las cinco cepas fueron finalmente confirmadas como *Aspergillus fumigatus*.

A. fumigatus es un hongo que aparece en las etapas iniciales del proceso de composteo para la preparación de los sustratos de champiñón. Tiene una temperatura optima de crecimiento entre los 40 y 45°C y desaparece una vez iniciada la pasteurización sin embargo sus conidias prevalecen hasta la siembra donde una vez que la composta se enfría vuelve a tener presencia (22) (24). La composta es un medio rico en hongos termofílicos donde abundan especies como *Pseudallescheria boydii* y *Aspergillus fumigatus* (2).

8. CONCLUSIONES

Se aislaron once cepas de hongos termofílicos procedentes de tres diferentes estadios de maduración de composta de *Agaricus bisporus*, se obtuvieron porcentajes de degradación de PU líquido de hasta 72.4 % a los 14 días de incubación y una degradación de espumas de PU del 70.3% a los 28 días de incubación cuantificada a través de la pérdida de peso.

Se identificaron con técnicas de biología de molecular cinco cepas de hongos termofílicos con capacidad de degradar el PU como *Aspergillus fumigatus*.

Los hongos termofílicos son una fuente prometedora para desarrollar modernos mecanismos biotecnológicos de biodegradación de PU residual.

9. RECOMENDACIONES

En futuras investigaciones es recomendable la identificación de las actividades enzimáticas involucradas para *Aspergillus fumigatus*. Una vez identificadas las enzimas involucradas y su mecanismo de actuación es importante asimismo evaluar el potencial para la degradación de espumas de poliuretano por estas cepas de hongos termofílicos aplicándolas en sistema de composteo a escala comercial.

10. REFERENCIAS

1. Álvarez, B. J., Domínguez, M. L., Vargas S. M., González, H. R., Aguilar, O. G., Loza, T. H. (2016). Biodegradative Activities of Selected Environmental Fungi on a Polyester Polyurethane Varnish and Polyether Polyurethane Foams. *Appl Environ Microbiol*, 82 (17), 5225-35
2. Anastasia, A., Varese, G. C. y Filipello M. V. (2005). Isolation and identification of fungal communities in compost and vermicompost. *Mycologia*, 97(1), 33 - 44.
3. Atlantic Province Agriculture. Small scale mushroom production *Agaricus bisporus*. [Versión electrónica]. *Advisory Committee on Vegetable Crops*.
4. Barrat, S.R., Ennos, A. R., Greenhalg, M., Robson, G. D. y 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. *Journal of Applied Microbiology*, 95, 78 - 85.
5. Bilay, V., Ivashchenko, S. (2011). Influence of thermophilic fungi *Humicola insolens* on the growth of *Agaricus brasiliensis* (A. blazei). *7th International Conference on Mushroom Biology and Mushroom Products*, 412 – 418.
6. Cosgrove, L., McGeechan, P. L., Handley, P. S. y Robson, G. D. (2010). Effect of biostimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 76 (3), 810 - 819.
7. Cosgrove, L., McGeechan, P. L., Robson, G. D. y Handley, P. S. (2007). Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(18), 5817 - 5824.
8. Darby, R. T. y Kaplan, A. M. (1968). Fungal Susceptibility of polyurethanes. *Applied Microbiology*, 16(6), 900 - 905.
9. Gautam, R., Bassi, A. S. y Yanful, E. K. (2006). A review of biodegradation of synthetic plastic and foams. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 141, 85 - 108.
10. Ghazali, R., Mei, L. C., Kassim, S. N. Z., Yousof, M. y Ahmad, S. (2005). Preliminary study on microbial degradation of flexible polyurethane foams- physico- mechanical and weight changes during fungal deterioration. *Journal of Oil Palm Research*, 17, 103 – 109.
11. Hincapié, Ll. G. A y Ramírez, M. E. C. (2009). Evaluación de la biodegradación aerobia de poliuretano residual generado en la industria de fabricación de refrigeradores. *Revista Investigaciones Aplicadas*, 5, 15 – 25.

12. Howard, G. T. (2002). Biodegradation of polyurethane: a review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 49: 245 - 252.
13. Iiyama, K., Stone, B. A. y Macauley, B. J. (1994). Compositional changes in compost during composting and growth of *Agaricus bisporus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(5), 1538 – 1546.
14. Loredó, A. T., García, G., Velasco, A. T., Rodríguez, R. H. y Aguilar, C. N. (2011). Polyurethane foam as substrate for fungal strains. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 2, 52 - 58.
15. Maheshwari, S. (2013). A guide for white button mushroom (*Agaricus bisporus*) production. *Open Access Scientific Reports*, 2(3).
16. Maheshwari R., Bharadwaj, G., K. y Mahalingeswara, K. B. (2000). Thermophilic fungi: Their physiology and enzymes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64(3), 461 - 488.
17. Marthur, G., Prasad, R. (2012). Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus* (ITCC 6051) isolated from soil. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 167: 1595 - 1602.
18. Martsumiya, Y., Marata, N., Tanabe, E., Kubota, K. y Kubo, M. (2009). Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria* sp. *Applied Microbiology*, 108, 1946 - 1953.
19. Premraj, R. y Mukesh, D. (2005). Biodegradation of polymers. *Indian Journal of Biotechnology*, 4, 186 – 193.
20. Russell, J. R. et al. (2011). Biodegradation of polyurethane by endophytic fungi. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6076 – 6084.
21. Sangale, K. M., Shahnwaz M y Ade, A.B. (2012). A review on biodegradation of polythene: the microbial approach. *Bioremediation and Biodegradation*, 3(10), 6 – 9.
22. Straatsma G., Samson R.A., Olijnsma T.W., Op den Camp H.J.M., Gerrits J.P.G., Van Griensven L.J.L.D. (1994). Ecology of thermophilic fungi in mushroom compost, with emphasis on *Scytalidium thermophilum* and growth stimulation of *Agaricus bisporus* mycelium. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(2), 454 – 458.
23. Tortarolo, M. F., Pereda M., Palma, M. y Arrido, M. N. (2008). Influencia de la inoculación de microorganismos sobre la temperatura en el proceso de compostaje. *CI Suelo*, 26(1), 41 – 50.
24. Wiegant, W. M. (1992). Growth Characteristic of the thermophilic fungus *Scytalidium thermophilum* in relation to production on mushroom compost. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(4), 1301 – 1307.

25. Winn, W., Allen, S., Janda, W., Koneman, E., Procop, G., Schreckenber, P. y Woods, G. (2008). *Koneman diagnóstico microbiológico: texto y atlas a color*. Argentina: Médica Panamericana
26. Zafar, U., Houlden, A. y 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.
27. Zavenhoven, R. (2004). Treatment and disposal of polyurethane wastes: options for recovery and recycling. *Energy Engineering and Environmental Protection Publications*. 24 – 36.
28. http://www.csc-jaekle.com/fileadmin/MeBI/110/MeBI_110228_EN.pdf
Consultado: Agosto 2016.