



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

**Aislamiento e identificación de
hongos capaces de degradar
poliuretano**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A

Joyce Álvarez Barragán



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: **Profesor:** **Abel Gutiérrez Ramos**
VOCAL: **Profesor:** **Misael González Ibarra**
SECRETARIO: **Profesor:** **Herminia de Jesús Loza Tavera**
1er. SUPLENTE: **Profesor:** **Alejandro Camacho Cruz**
2do SUPLENTE: **Profesor:** **Beatriz Ruíz Villafán**

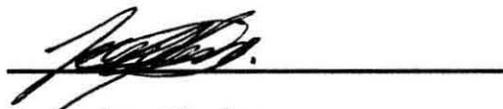
SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio 105. Conjunto E. Departamento de Bioquímica, Facultad de Química. UNAM.



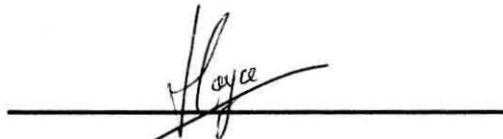
Asesor del tema:

Dra. Herminia de Jesús Loza Tavera



Supervisor técnico

Dr. Martín Pedro Vargas Suárez



Sustentante:

Joyce Álvarez Barragán

Agradecimientos Técnicos

A la Dra. Herminia Loza por abrirme las puertas de su laboratorio y brindarme la oportunidad de realizar el proyecto de mis sueños. Por su paciencia en los momentos críticos y por no rendirse conmigo por muy difícil que la situación fuera.

Al apoyo brindado por CONACYT (No. 22881) al proyecto “Caracterización de las enzimas y los genes responsables de la actividad biodegradativa de *Alicycliphilus sp.* sobre poliuretano” y al apoyo brindado por DEGAPA PAPIIT (No. IN222811) al proyecto “Identificación y caracterización de las proteínas y los genes de *Alicycliphilus sp.* BQ1 involucradas en la utilización del poliuretano como fuente de carbono”.

Al Programa de Apoyo a la Investigación y Posgrado PAIP de la Facultad de Química, UNAM.

Al Subprograma 127 “Formación Básica en Investigación” por el apoyo económico otorgado.

Al Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM por haberme permitido realizar este trabajo en sus instalaciones.

Al Dr. Guillermo Aguilar Osorio del Departamento de Alimentos, UNAM por su apoyo en el manejo y trabajo con los hongos y por proporcionar la cepa de *Apergillus niger* 334.

A la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química, UNAM y principalmente a la Q. Maricela Gutiérrez Franco por su colaboración en el trabajo con la técnica de FTIR.

Al Dr. Néstor Noé López Castillo por su ayuda en la interpretación de los resultados obtenidos por espectroscopía infrarroja.

Al Profesor Misael González Ibarra por la revisión de este trabajo y por su ayuda en la identificación de las cepas fúngicas.

Dedicatorias y Agradecimientos

A mi mamá Virginia, a la que quiero mucho, por darme todo lo necesario para cumplir mi sueño de concretar mi carrera. Quiero agradecerle su apoyo, paciencia, cariño, confianza y principalmente fuerza en los momentos difíciles; sin ella nunca hubiera podido llegar hasta donde he llegado, tiene toda mi admiración y representa a la clase de mujer fuerte e inteligente que algún día quiero llegar a ser.

A mi papá José Luis, por apoyarme con mis estudios, por escucharme y sacarme de algunos problemas y por facilitarme los medios para lograr este trabajo.

A mi hermana Jocelyne por ayudarme con este trabajo y con muchos otros a lo largo de mi carrera, por ser mi confidente, por ser una divertida molestia, por su paciencia, por sus consejos y por el apoyo económico aún cuando no tuviera cambio.

A mi hermano Allen por estar ahí, alimentar a mi perra Tequila y ser mi cómplice en el consumo de comida chatarra.

A mi familia: mis tías, tíos, primos y primas; por todos los momentos compartidos sobre todo en la última etapa, gracias por su apoyo y estar ahí cuando más los necesité.

A mis compañeros y amigos del laboratorio 105 por la paciencia, el apoyo, las risas, el tiempo, los juegos y todo cuanto aportaron. A Martín por su amistad, apoyo, consejos, paciencia y alegría, a Luz por su amistad (y por indicarme que el Tween80[®] estaba al lado del Tween20[®]), a Julieta por sus consejos y amistad, a Beto porque a pesar de su maldad innata me brindó su amistad, a Ricardo por su ayuda en este trabajo y por todos los buenos momentos desde la carrera hasta la tesis, a Fabiola por las risas, a Jackie y Alba por hacer la estancia en el laboratorio más amena y finalmente a Mariana, Karen, Vianney y Daniel por su compañía y amistad.

A mis amigas y compañeras de locuras Blanca y Selene, les agradezco darme ánimos en mis peores momentos, ser mis confidentes, seguirme en mis locuras (aunque nos perdiéramos constantemente) y compartir risas y alegrías en los mejores momentos. Sin ustedes la estancia en la Facultad de Química no hubiera sido la misma.

A mi amigo Jordan, el cuál a pesar de lo mucho que hemos cambiado con el paso de los años, hemos sabido conservar la amistad que hicimos desde la Olimpiada de Química. Muchas gracias por tu apoyo y tu cariño.

A mi amiga Norma por su confianza y paciencia en los peores momentos y por su alegría y compañía en los mejores.

A mis amigos de “la bandita” de primer semestre: Adrian, Oswaldo, Beto, Pablo, Ivan, Juanito, Joel, Panda, Julio y Eliel, gracias por su amistad, los días de fron tenis, las parrilladas y todos esos recuerdos.

A mi “esposo” y amigo Luis Fernando por ser esa mala influencia que me ha llevado a querer seguir el buen camino.

A mis amigos de la Facultad: Thalía, Ostin, Octavio, Marco Antonio, Gabriel, Rodrigo, Gerardo, Rubén, Omar Fortis y Amaury por hacerme pasar tan buenos momentos.

A mis mejores amigas del Colegio Guadalupe: Mariana (niña imán), Gaby, Ariana y Jimena; a las cuales aprecio y las considero como mis hermanas.

A todas las chicas del “goro”, les agradezco las risas, las aventuras, las cenas navideñas y todo el tiempo compartido.

*“Y la vida se acuesta a mi lado
y con ella me empiezo a reír
y ahora sueño que voy caminando
por todas las cosas
que faltan por vivir y sentir”*

Anónimo

Abreviaturas

abs	Absorbancia
DO	Densidad óptica
FTIR	Espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier
MM	Medio mínimo
MM-PUh	Medio mínimo con poliuretano Hydroform®
MM-PUi	Medio mínimo con poliuretano Impranil® DLN
MM-PUpl	Medio mínimo con poliuretano Polylack®
MM-PP	Medio mínimo con poliéster poliol Rymsapol® 200/107 L-83
nm	nanómetros
No.	número
PDA	Papa dextrosa agar
PDB	Papa dextrosa broth
PE-PU	Poliéter poliuretano
PS-PU	Poliéster poliuretano
PU	Poliuretano
rpm	Revoluciones por minuto
TA	Temperatura ambiente
Tween80	Polisorbato 80, polioxietilen sorbitano monooleato, monoleato de polietilen sorbitan

ÍNDICE

Abreviaturas	vii
Índice	viii
Índice de tablas y figuras	xi
1. Resumen	1
2. Introducción	3
2.1. Poliuretano (PU)	3
2.2. Aumento en la producción y contaminación de PU	6
2.3. Tratamiento de residuos de PU	7
2.3.1. Dificultades presentes en el tratamiento de residuos de PU	7
2.4. Biodegradación de PU	8
2.5. Biodegradación de PU por hongos	9
3. Objetivos	13
3.1. Objetivos particulares	13
4. Estrategia experimental	14
5. Materiales y métodos	15
5.1. Formulación de medio mineral (MM) para trabajar con PU como única fuente de carbono	15
5.2. Aislamiento de cepas fúngicas capaces de crecer en PU	16
5.2.1. Muestras del Basurero Bordo Poniente	18
5.2.2. Muestras ambientales	18
5.2.3. Muestras de hongos creciendo en MMPUs	18

5.2.4. Otras fuentes	19
5.2.5. Cepa control	19
5.3. Sistema de nomenclatura	19
5.4. Prueba de degradación en MM-PUi sólido	20
5.5. Conservación de las cepas	21
5.5.1. Conservación de levaduras	21
5.5.2. Preservación de hongos filamentosos por desecación	21
5.6. Prueba de degradación en MM-PUi líquido	23
5.7. Determinación de cambios en la estructura de MM-PUi por FTIR al ser degradado	24
5.8. Identificación de las actividades enzimáticas extracelulares	25
5.8.1. Actividad esterasa	25
5.8.2. Actividad proteasa	25
5.8.3. Actividad ureasa	26
5.9. Prueba de degradación en espuma de PU	26
5.10. Identificación de las cepas	28
5.10.1. Identificación macroscópica	28
5.10.2. Identificación microscópica	28
6. Resultados y discusión	30
6.1. Aislamiento de cepas de hongos capaces de crecer en medio mínimo de sales, con PU como única fuente de carbono	30
6.2. Prueba de degradación y crecimiento en medios sólidos	32
6.3. Prueba de degradación en medio MM-PUi líquido	36
6.4. Determinación por FTIR de los cambios en la estructura del MM-PUi al ser degradado	41
6.5. Identificación de las actividades enzimáticas extracelulares	52

6.5.1. Actividad esterasa	53
6.5.2. Actividad proteasa	54
6.5.3. Actividad ureasa	55
6.6. Prueba de degradación de espuma de PU	56
6.7. Identificación de las cepas	62
7. Conclusiones	68
8. Perspectivas	69
9. Anexo	70
10. Bibliografía	77

Índice de tablas y figuras

- Tabla 1** Algunos polioles y diisocianatos utilizados en la síntesis del poliuretano
- Tabla 2** Hongos con capacidad de degradar PU, el tipo de PU en el que se estudió la degradación y las posibles actividades enzimáticas involucradas.
- Tabla 3** Composición del medio mineral utilizado para el crecimiento de los hongos con PU_i al 0.5%, PU_{pl} al 0.3% y PP al 0.3%
- Tabla 4** Características de las espumas de PU
- Tabla 5** Características químicas de los componentes en las espumas
- Tabla 6** Escrutinio para la selección de cepas de hongos que degradan PU empleando diferentes tipos de PU y un PP como fuente de carbono.
- Tabla 7** Actividades enzimáticas relacionadas con los cambios en las bandas entre los espectros de FTIR inoculados y el espectro del MM-PU_i (control).
- Tabla 8** Resultado de las pruebas con medios diferenciales de cada uno de los hongos inoculados.
- Tabla 9** Identificación de los ocho mejores hongos degradadores de Impranil[®] DLN.
-
- Figura 1** Reacción de formación del PU
- Figura 2** Ejemplos de polioles utilizados en la síntesis de PU.
- Figura 3** Clasificación del poliuretano dependiendo del poliol utilizado en su síntesis.
- Figura 4** Consumo mundial de PU del año 1998 al 2005
- Figura 5** Efecto de las posibles enzimas que atacan el PU sobre el enlace uretano

- Figura 6** Muestras de espumas de PU en descomposición colectadas en el Basurero Bordo Poniente, Cd. Nezahualcoyotl, Edo. de México.
- Figura 7** Abreviaturas de las claves utilizadas para identificar los hongos aislados.
- Figura 8** Selección para el aislamiento de hongos capaces de degradar PU
- Figura 9** Crecimiento de los hongos seleccionados en los diferentes medios con PU como única fuente de carbono.
- Figura 10** Cambios en el MM-PUi líquido al ser inoculado con diferentes hongos
- Figura 11** Curva patrón con diferentes concentraciones de Impranil® DLN.
- Figura 12** Cuantificación de la degradación de Impranil® DLN por aclaramiento del medio de cultivo.
- Figura 13** Cuantificación de la degradación de Impranil® DLN por aclaramiento del medio de cultivo de los 15 hongos con mayor porcentaje de degradación.
- Figura 14** Espectro de FTIR del MM-PUi sin inocular (control) e identificación de bandas presentes en el análisis
- Figura 15** Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con A2.H.4 y sin inocular (control).
- Figura 16** Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con A2.PL.1 y sin inocular (control).
- Figura 17** Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con A2.PP.5 y sin inocular (control).
- Figura 18** Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con A3.I.1 y sin inocular (control).
- Figura 19** Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con BP3.IC.2 y sin inocular (control).
- Figura 20** Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con BP3.IC.7 y sin inocular (control).
- Figura 21** Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con BP8.IC.3 y sin inocular (control).

- Figura 22** Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con T1.PL.1 y sin inocular (control).
- Figura 23** Prueba para la detección de esterasas extracelulares en medio Tween80®.
- Figura 24** Prueba para la detección de proteasas extracelulares en MM con caseína.
- Figura 25** Prueba para la detección de ureasas extracelulares en medio Urea de Christensen.
- Figura 26** Progresión del crecimiento del hongo BP8.IC.3 en un trozo de espuma blanca de PU.
- Figura 27** Degradación de espumas de PU inoculadas con los hongos con mayor capacidad de degradar Impranil® DLN.
- Figura 28** Degradación de espumas de PU inoculadas con los hongos con mayor capacidad de degradar Impranil® DLN. Continuación.
- Figura 29** Porcentaje de degradación por pérdida de peso de dos tipos de espuma de PU al ser incubadas con los hongos que presentaron una degradación superior al 70% en MM-PUi.
- Figura 30** Identificación de las cepas con mayor capacidad para degradar PU de acuerdo a su morfología macroscópica y microscópica.
- Figura 31** Identificación de las cepas con mayor capacidad para degradar PU de acuerdo a su morfología macroscópica y microscópica. Continuación.

1. Resumen

El poliuretano (PU) es un polímero generado por la condensación de un disocianato y un poliol resultando en un compuesto con enlaces uretano. Es versátil y se utiliza para la fabricación de muchos productos por su durabilidad y resistencia, debido a esto ha aumentado su producción lo que ha llevado a generar un problema de contaminación. Existen algunas técnicas para tratar residuos de PU: reciclaje, tratamiento químico, incineración y relleno sanitario. Sin embargo, estas técnicas conllevan consecuencias indeseadas, es por eso que actualmente se explora la biodegradación como una alternativa más amigable con el ambiente. La biodegradación es un proceso que permite destruir o transformar contaminantes a compuestos menos peligrosos usando bacterias, hongos, plantas o enzimas derivadas de ellos. La degradación de PU por varios tipos de microorganismos (mo), bacterias y hongos, ha sido demostrada. En el caso de los hongos, la diversidad de micromicetos y la cantidad de metabolitos que secretan les permiten sobrevivir en medios limitados haciéndolos buenos candidatos para la biodegradación de PU.

En este trabajo se aislaron e identificaron cepas de hongos capaces de utilizar (PU) como única fuente de carbono, se determinó su efecto sobre el PU y se identificaron la presencia de actividades enzimáticas extracelulares relacionadas con esa capacidad.

Se realizó un triple escrutinio en diferentes medios sólidos, utilizando tres diferentes fuentes de carbono. Dos tipos PU: un poliéster poliuretano (PS-PU) marca Impranil® DLN y un poliéter poliuretano (PE-PU) marca Polylack®; y un poliol poliéster (Rymsapol® 200/107 L-83). Se empleó como criterio selectivo, en las cepas con crecimiento en Impranil® DLN, la capacidad para formar un halo de degradación (debido a que el Impranil® DLN clarifica al ser degradado (Howard *et al.*, 2002). A partir de este escrutinio se seleccionaron 31 cepas.

Se realizaron pruebas para cuantificar la degradación de Impranil® DLN por turbidimetría. Se observó que ocho de los hongos aislados produjeron degradación mayor al 70%.

Para determinar las posibles actividades enzimáticas extracelulares (ureasa, proteasa y esterasa) involucrada en esta degradación se realizaron pruebas de crecimiento en medios diferenciales. Todos los hongos resultaron positivos para la prueba de proteasas, en la prueba de esterasas sólo uno dio negativo y en la de ureasas también se obtuvo uno negativo.

Con el propósito de identificar los cambios estructurales en el Impranil® DLN llevados a cabo por la actividad de los hongos seleccionados, se realizó un análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR) del MM-PUi inoculado con los hongos comparándolo con un control sin inocular. Se observó disminución en los picos del espectro asociados a los grupos carbonilo, amida y éter. Estos grupos están presentes en la estructura del PU por lo que la disminución de estas bandas implica ruptura de los enlaces y por lo tanto, degradación del Impranil® DLN.

Para determinar si las ocho cepas tenían la capacidad de degradar espumas de PE-PU, los hongos se inocularon en medio PDB diluido al 50% que contenía trozos de espumas pre-pesadas y se incubaron durante 21 días. Al transcurrir este tiempo, las espumas fueron lavadas con Cloralex® al 30%, secadas y vueltas a pesar. Los resultados mostraron pérdida de peso y cambio de tamaño en las espumas, con porcentajes de degradación en algunos casos mayores al 50%.

Finalmente se realizó la identificación de los géneros realizando observaciones macroscópicas y microscópicas con base en la clasificación de Saccardo. Se identificaron cepas de los géneros *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.* y *Cladosporium sp.*

2. Introducción

2.1 Poliuretano (PU)

El PU es un polímero sintético que fue desarrollado en 1937 por el Dr. Otto Bayer. El polímero es generado por la condensación de un diisocianato y un polioli; en esta condensación, ocurren varias reacciones químicas que dan lugar a la formación del enlace uretano (carbamato) (Figura 1).

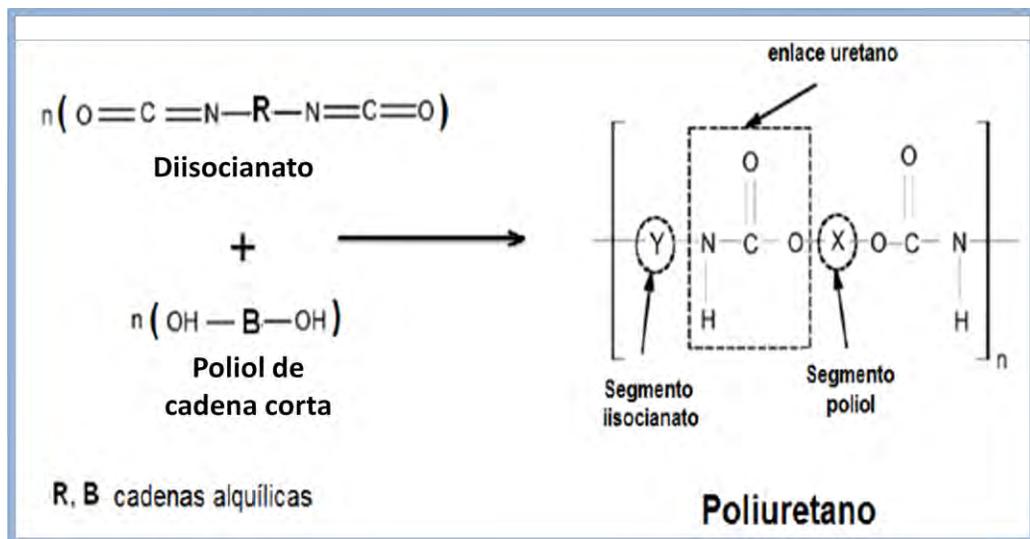


Figura 1. Reacción de formación del PU (Modificado de Gautam *et al.*, 2007).

Los PU contienen diisocianatos en su estructura, los cuales son cruciales en la elaboración de los polímeros y son precursores para la formación del enlace uretano, ya que reaccionan con los grupos hidroxilo de los compuestos poliólicos. Debido a la amplia variedad de diisocianatos y polioli, existen diversas combinaciones de los mismos, lo que da como resultado diferentes tipos de PU (Rahman y Brazel, 2004). En la Tabla 1 se muestran ejemplos de algunos diisocianatos y polioli frecuentemente utilizados.

Tabla 1. Algunos polioles y diisocianatos utilizados en la síntesis del poliuretano.

Polioles	Diisocianatos
Poli (butileno adipato)	4,4-Diisocianato de difenilmetano
Poli (etileno butileno adipato)	2,4-Diisocianato de difenilmetano
Poli (etileno adipato)	2,2-Diisocianato de difenilmetano
Policaprolactona	2,4-Diisocianato de tolueno
Poli (propileno adipato)	2,6-Diisocianato de tolueno
Poli (oxitetrametileno) glicol	1,3-Diisocianato de xileno
Poli (oxipropileno) glicol	1,5-Diisocianato de naftaleno

Los polioles contienen grupos hidroxilo, que sirven como donadores de H⁺ para los átomos de nitrógeno de los radicales isocianato. Dependiendo de su naturaleza, estos polioles pueden ser de tipo poliéter o de tipo poliéster (Figura 2).

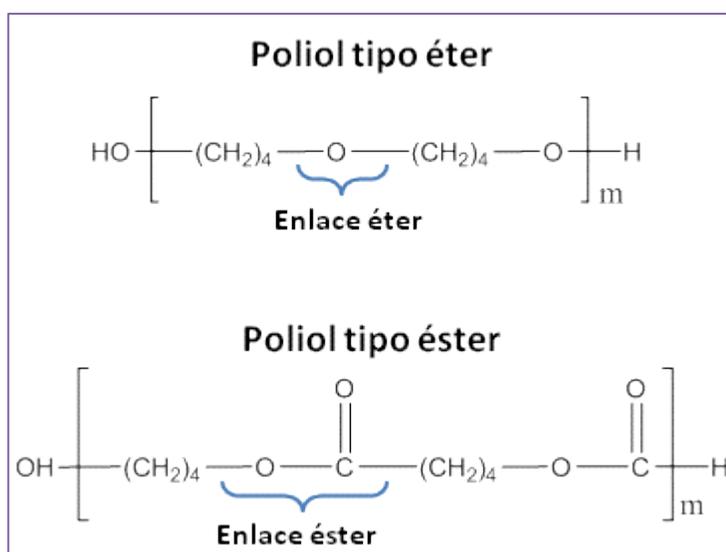


Figura 2. Ejemplos de polioles utilizados en la síntesis de PU.

De acuerdo al polirol utilizado para su formación, los PUs se pueden dividir en dos grupos: poliéster poliuretano (PE-PU) y poliéter poliuretano (PS-PU) (Urbanski *et al.*, 1997) (Figura 3). Los PUs son compuestos con estructuras heterogéneas y su composición estructural varía de acuerdo a su uso. En la industria, aquellos que tienen grupos poliéter son los más empleados para aislamiento térmico (Akutsu-Shigeno *et al.*, 2006). En cambio, los PU a base de poliéster son utilizados principalmente para partes de automóviles (Howard, 2012).

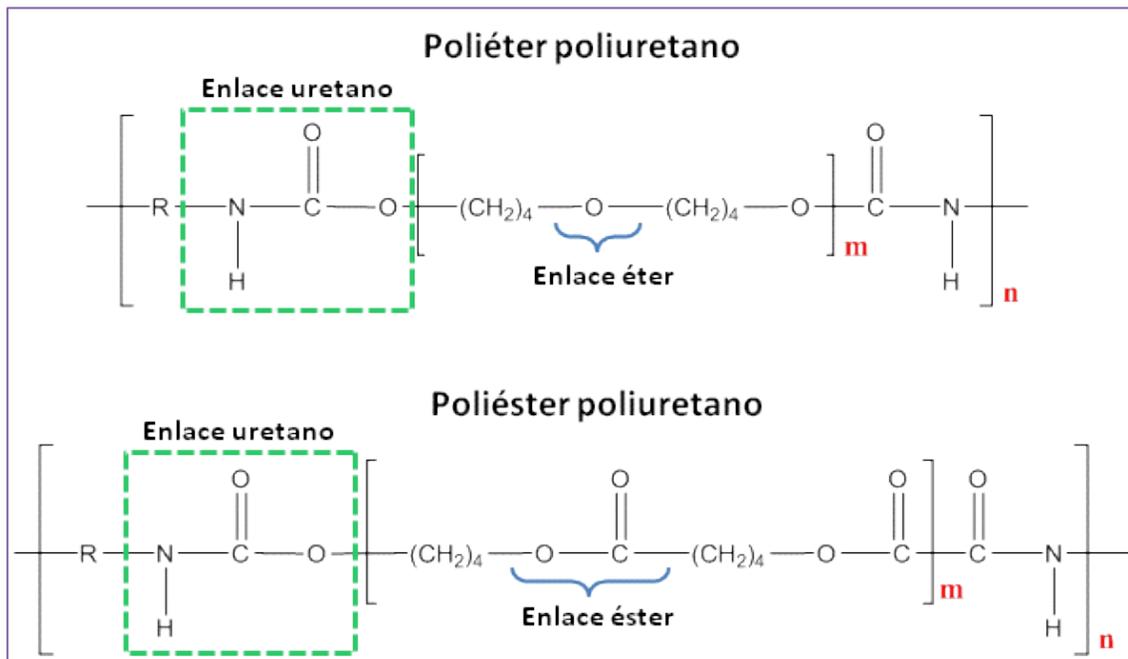


Figura 3. Clasificación del poliuretano dependiendo del polirol utilizado en su síntesis.

Las variaciones en el número de carbonos entre los enlaces uretano, así como la naturaleza de los sustituyentes, brindan características propias a cada polímero: desde lineal y rígido hasta ramificado y flexible. Los flexibles son ampliamente usados en espumas resilientes, elastómeros durables, adhesivos y selladores de alto rendimiento, pinturas, fibras, sellos, empaques, juntas, condones, alfombras, partes automotrices, entre otros. Por su parte, los rígidos, cuya densidad es más elevada, son utilizados principalmente para el aislamiento térmico (Tecnapol, 2008).

El PU es un polímero versátil que se utiliza para la fabricación de muchos productos por su durabilidad y resistencia. Debido a esto, ha aumentado su producción, lo que ha llevado a generar un grave problema de contaminación.

2.2 Aumento en la producción y contaminación de PU

El consumo mundial de plásticos ha aumentado de 1.5 millones de toneladas por año en 1950 a 265 millones de toneladas por año en 2011 (Cregunt *et al.*, 2011). Entre los plásticos sintéticos, el PU ocupa el sexto lugar entre los más usados alrededor del mundo y su producción abarca entre 6 y 7% de los plásticos totales (Cangemi *et al.*, 2008; Cuadron, 2003). En la Figura 4 se observa el aumento en el consumo mundial de PU de 1998 a 2004.

Este aumento en la producción también ha generado un aumento en la contaminación por residuos de PU. Solamente en Estados Unidos de Norteamérica, se generan alrededor de 1.3 millones de toneladas de residuos de PU cada año (Alavi-Nikje *et al.*, 2011). Como consecuencia de esto, los costos en los procesos para tratar residuos plásticos han aumentado rápidamente y la legislación que los regula cada vez hace más difícil su tratamiento y eliminación (Zevenhoven, 2003). Es por eso que el manejo de los residuos de PU, al final de su vida útil, provenientes de diversas fuentes están recibiendo mayor atención en todo el mundo.

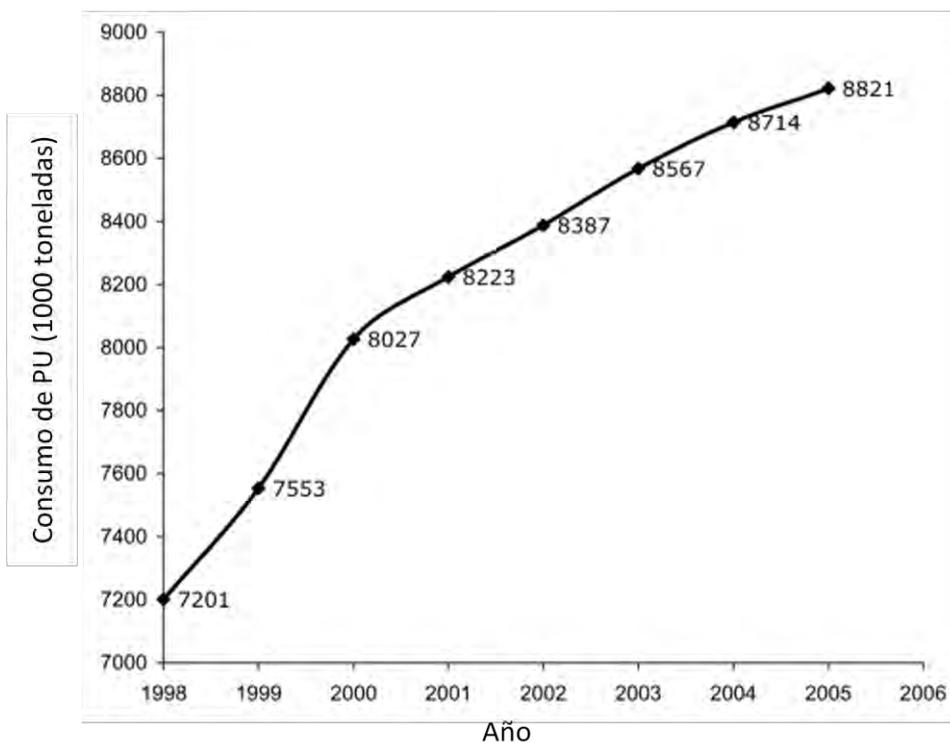


Figura 4. Consumo mundial de PU del año 1998 al 2005 (Alavi-Nikje *et al.*, 2011).

2.3 Tratamiento de residuos de PU

Las técnicas más utilizadas para tratar residuos sólidos poliméricos son el reciclaje, el compostaje, la incineración y el relleno sanitario (Gregorí *et al.*, 2007). En el caso del PU, las técnicas existentes de reciclaje y destrucción son: 1) reciclaje mecánico, que involucra un tratamiento físico y consiste esencialmente en los procesos de pulverización, prensado, moldeo por inyección y moldeo por compresión; 2) procesamiento químico, que es la recuperación de monómeros como principal producto de la ruptura de enlaces de uretano, en éste se encuentra la hidrólisis, aminólisis y la glicólisis; y 3) procesamiento térmico, que consiste en utilizar el flujo de residuos como fuente de energía combustible o para obtener monómeros utilizables en la industria, incluye a la pirólisis, hidrogenación y gasificación (Alavi-Nikje *et al.*, 2013).

2.3.1 Dificultades presentes en el tratamiento de residuos de PU

Existen varios factores a considerar para elegir un método adecuado para el tratamiento de residuos de PU, el cual dependerá de las características propias del polímero. Las espumas de PU contienen CFC (clorofluorocarbono), que puede ser emitido como gas tóxico, haciendo más difícil su tratamiento. En el procesamiento térmico, incluyendo la combustión de PU, se corre el riesgo de que se generen óxidos de nitrógeno, amoniaco, piridinas y otros residuos tóxicos derivados de compuestos nitrogenados, debido a los altos contenidos de nitrógeno en el material. Hay muy poca información sobre el comportamiento del PU en los vertederos por lo que se debe identificar y desarrollar un potencial mercado para recuperar y reciclar PU. También es necesario tomar en cuenta la legislación de cada país, si es que existe una, para el tratamiento de residuos (Zevenhoven, 2003).

Por lo anterior se considera a la biodegradación como una alternativa viable para el procesamiento de residuos de PU que facilite su tratamiento y tenga un menor número de repercusiones para el medio ambiente.

2.4 Biodegradación de PU

La biodegradación se refiere a cualquier proceso de recuperación medioambiental que permita destruir o transformar contaminantes a compuestos menos peligrosos usando bacterias, hongos, plantas o enzimas derivadas de ellos (Ren, 2003). Su objetivo principal es transformar contaminantes en metabolitos que puedan ser incluidos en las vías metabólicas de los microorganismos (mo) y éstos los mineralicen y generen productos como H₂O, CH₄ y CO₂ (Seo *et al.*, 2009).

Los plásticos son compuestos relativamente nuevos en la naturaleza, por lo que algunos de ellos todavía son resistentes al ataque de mo, ya que éstos no han evolucionado lo suficiente para generar nuevas estructuras enzimáticas capaces de degradarlos (Shah *et al.*, 2008). Sin embargo, la degradación de PU por mo como bacterias y hongos ha sido demostrada (Crabbe, 1994). Algunos de estos mo han sido aislados de desechos de PU colectados en basureros, de tierra o de otros ambientes en donde el PU ha estado expuesto a mos ambientales.

En los materiales poliméricos, el ataque microbiano se puede dar de tres diferentes formas: daño biofísico por efecto del crecimiento celular; un efecto bioquímico en el cual el mo produce sustancias que afectan la constitución del PU, y la acción enzimática directa, en donde las enzimas del mo atacan la estructura del PU y producen rupturas en el polímero (Cangemi *et al.*, 2008).

El principal mecanismo de degradación de polímeros se da por oxidación o hidrólisis producida por enzimas, resultando en la ruptura de enlaces para generar productos de menor peso molecular que son más accesibles para la asimilación por los mo (Barrat *et al.*, 2003). Se ha reportado que el enlace uretano es susceptible al ataque microbiano, el mecanismo por el cual se lleva a cabo se debe a la ruptura del enlace éster por hidrólisis enzimática. (Nakajima-Kambe *et al.*, 1999).

Dos tipos de actividades enzimáticas están involucradas en la biodegradación del PU: enzimas extracelulares e intracelulares. Durante la degradación, las enzimas extracelulares rompen al polímero generando moléculas más pequeñas con cadenas más cortas que son capaces de permear hacia el interior de la célula y pueden ser usadas como fuente de carbono y energía por acción de las enzimas intracelulares (Shah *et al.*, 2008).

Con base en la estructura del PU, se ha postulado que es probable que en el ataque a este polímero estén involucradas las siguientes actividades enzimáticas: actividad proteasa, que ataca los enlaces amida y uretano; actividad esterasa o lipasa, que ataca los enlaces éster, y actividad ureasa, que ataca los enlaces urea

(Ruiz *et al.*, 1999; Matsumiya *et al.*, 2010). En la Figura 5 se observa como es que estas enzimas rompen los enlaces uretano del PU.

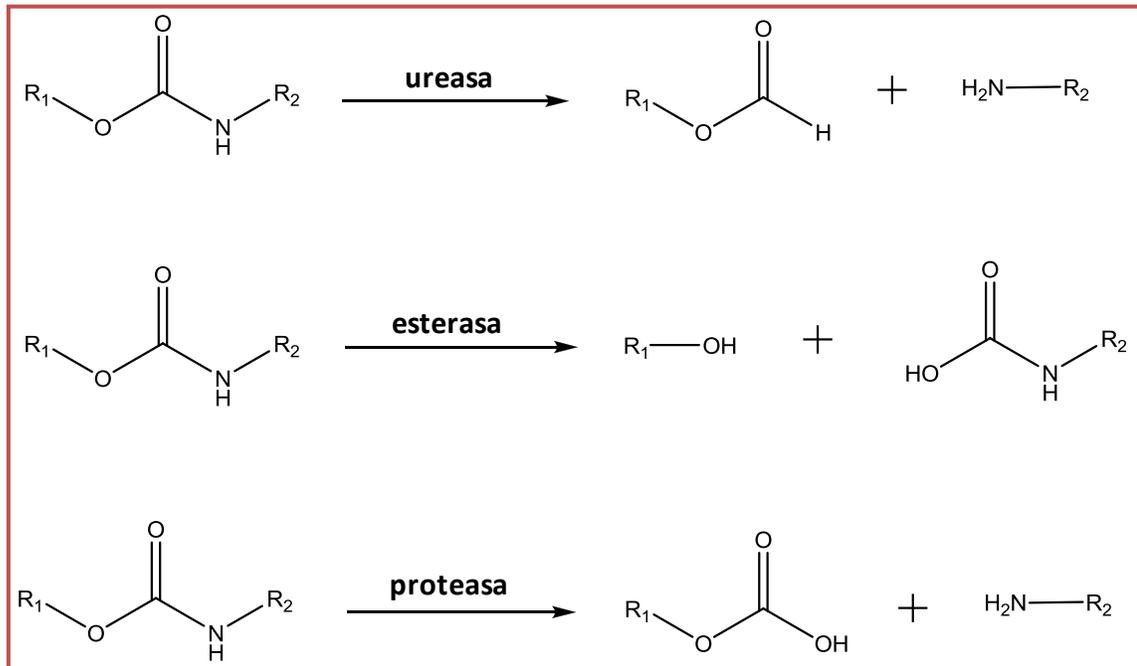


Figura 5. Efecto de las posibles enzimas que atacan el PU sobre el enlace uretano.
(Modificado de Loredó-Treviño *et al.*, 2012).

Existen varios reportes en la literatura que indican que el PU es susceptible a la degradación por hongos (Darby y Kaplan, 1968; Kaplan *et al.*, 1968; Ossefort y Testroet, 1966). Dicha degradación está relacionada a las actividades enzimáticas anteriormente descritas.

2.5 Biodegradación de PU por hongos

La diversidad de micromicetos y la cantidad de metabolitos que secretan los hongos les permiten sobrevivir en medios limitados (Loredó-Treviño, 2011), haciéndolos buenos candidatos para la biodegradación de PU. En la Tabla 2 se muestran varias especies de hongos reportados que tienen la capacidad de utilizar PU como fuente de carbono, así como el tipo del PU en el que fueron probadas y las posibles actividades enzimáticas involucradas en su degradación.

Tabla 2. Hongos con capacidad de degradar PU, el tipo de PU en el que se estudió la degradación y las posibles actividades enzimáticas involucradas.

Hongo	Tipo de PU	Actividades enzimáticas	Referencia
<i>Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Trichoderma sp.</i>	PS-PU y PE-PU	No reportadas	Darby y Kaplan, 1968
<i>Aspergillus niger, Cladosporium herbarum</i>	PE-PU	Esterasa	Filip, 1979
<i>Aspergillus fumigatus, Gliocladium roseum, Penicillium citrium</i>	No reportado	Esterasa, proteasa y ureasa	Pathirana y Seal, 1984
<i>Chaetomium globosum, Aspergillus terreus</i>	PS-PU	Esterasa y proteasa	Boubendir, 1993
<i>Exophiala jeanselmei</i>	PE-PU	No reportadas	Owen <i>et al.</i> , 1996
<i>Curvularia senegalensis, Fusarium solani, Aureobasidium pullulans, Cladosporium sp.</i>	PS-PU	Esterasa	Crabbe <i>et al.</i> , 2004
<i>Nectria gliocladioides, Penicillium ochrochloron, Geomyces pannorum</i>	PS-PU	No reportado	Barratt <i>et al.</i> , 2003
<i>Geomyces pannorum, Penicillium inflatum, Alternaria sp., Neonectria ramulariae, Penicillium viridicatum</i>	PS-PU	No reportadas	Cosgrove <i>et al.</i> , 2007
<i>Aspergillus niger</i>	PE-PU	No reportadas	Hincapié-Llanos <i>et al.</i> , 2009
<i>Curvularia senegalensis</i>	PS-PU	Esterasa	Crabbe <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria solani</i>	No reportado	Proteasa	Ibrahim <i>et al.</i> , 2009
<i>Candida antarctica</i>	PS-PU	Lipasa	Shibasaki <i>et al.</i> , 2009
<i>Alternaria sp.</i>	PE-PU	Ureasa	Matsumiya <i>et al.</i> , 2010
<i>Nectria haematococca, Penicillium viridicatum, Penicillium ochrochloron, Mucormycotina sp.</i>	PS-PU	No reportadas	Cosgrove <i>et al.</i> , 2010
<i>Pestalotiopsis microspora, Alternaria sp., Plectosphaerella sp., Bionectria sp., Nectria sp., Phaeosphaeria sp.</i>	PS-PU	Proteasa	Russel <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus sp., Trichoderma sp., Paecilomyces sp., Penicillium sp., Alternaria sp., Fusarium sp.</i>	No reportado	Proteasa, ureasa, esterasa y lacasa	Loredo-Treviño <i>et al.</i> , 2011
<i>Aspergillus flavus</i>	PS-PU	Esterasa	Mathur y Prasad, 2012

Como puede observarse en la Tabla 2, la mayoría de los estudios sobre degradación de PU han sido realizados utilizando como sustrato el PS-PU. Esto se puede deber a sus características químicas ya que el PS-PU contiene enlaces éster en su estructura que son más susceptibles al ataque de los hongos, a diferencia de los enlaces éter presentes en el PE-PU (Darby y Kaplan, 1968). También se observa que las actividades enzimáticas reportadas con mayor incidencia son la esterasa, proteasa y en algunos casos ureasa, aunque también existen reportes de otras enzimas como la lacasa.

Ibrahim *et al.* (2009) reportó una proteasa de *Alternaria solani* con la capacidad para degradar PS-PU. Cuando esta cepa fue probada en medios diferenciales, mostró actividad proteasa, esterasa y ureasa; mientras que en un medio en presencia de PU, sólo fue posible detectar actividad proteasa. Este resultado indica que las esterases y las ureasas no son inducidas en medio con PU a diferencia de las proteasas.

Crabbe *et al.*, reportó en el 2004 un hongo con la capacidad de degradar PE-PU aislado del suelo e identificado como *Curvularia senegalensis*. Este hongo secretó una enzima extracelular con propiedades de esterasa cuya actividad fue determinada mediante la hidrólisis de diacetato de fluoreceína. La enzima fue parcialmente purificada mediante fraccionamiento con sulfato de amonio determinándose su tamaño de 28 kDa.

Russell y colaboradores aislaron en el 2011 un hongo endofítico identificado como *Pestalotiopsis microspora* con la capacidad de degradar PS-PU. El hongo se cultivó en medio con PU y en medio rico como control, a los 10 días se filtró y el sobrenadante libre de células, de ambos medios, se probó sobre PU. A diferencia del sobrenadante del medio rico, el sobrenadante del medio con PU tuvo la capacidad de degradar el PU lo que sugiere que las enzimas son excretadas, difusibles e inducidas cuando se expone al hongo a un sustrato con el polímero. Para identificar la actividad poliuretanolítica se realizó una prueba con inhibidores de actividad enzimática, en donde no se observó actividad para degradar el PU en presencia de fluoruro de metilfenilsulfonil (PMSF), el cual es inhibidor para serina-hidrolasas, clasificadas como proteasas.

La capacidad para romper enlaces uretano también ha sido reportada en una cepa de *Aspergillus niger* en fermentación sólida. La cepa fue cultivada en medio con PU al cuál se le adicionó glucosa y peptona a diferentes concentraciones decrecientes, para adaptar al mo al plástico. La degradación se demostró haciendo uso de espectroscopía infrarroja con transformada de Fourier (FTIR), con la cual se analizó un control y una muestra de PU tratada con el hongo. Cambios en las

bandas de 1530 cm^{-1} y 1227 cm^{-1} , que corresponden a los enlaces C-N y N-H, sugieren rompimiento de enlaces amida presentes en el polímero por acción de las enzimas fúngicas, posiblemente proteasas o ureasas (Hincapié-Lanos *et al.*).

En el 2010, Matsumiya y colaboradores, reportaron una cepa de *Alternaria sp.* la cual fue probada sobre cubos (de 1 cm^3) de espumas de PE-PU en medio LB-glucosa diluido al 50% para determinar si existía degradación. A las 10 semanas de incubación, se observaron cambios en la estructura física del PU en comparación con el control sin inocular y se obtuvo un porcentaje de degradación de acuerdo a la pérdida de peso de 27.5%.

Aunque, como se ha mencionado, existen diversos reportes sobre el avance en la investigación de hongos que degradan PU, es necesario realizar más estudios que no sólo impliquen conocer las actividades enzimáticas involucradas, sino que permitan utilizar esta información para desarrollar un proceso de biodegradación que ayude a reducir el problema de contaminación por PU.

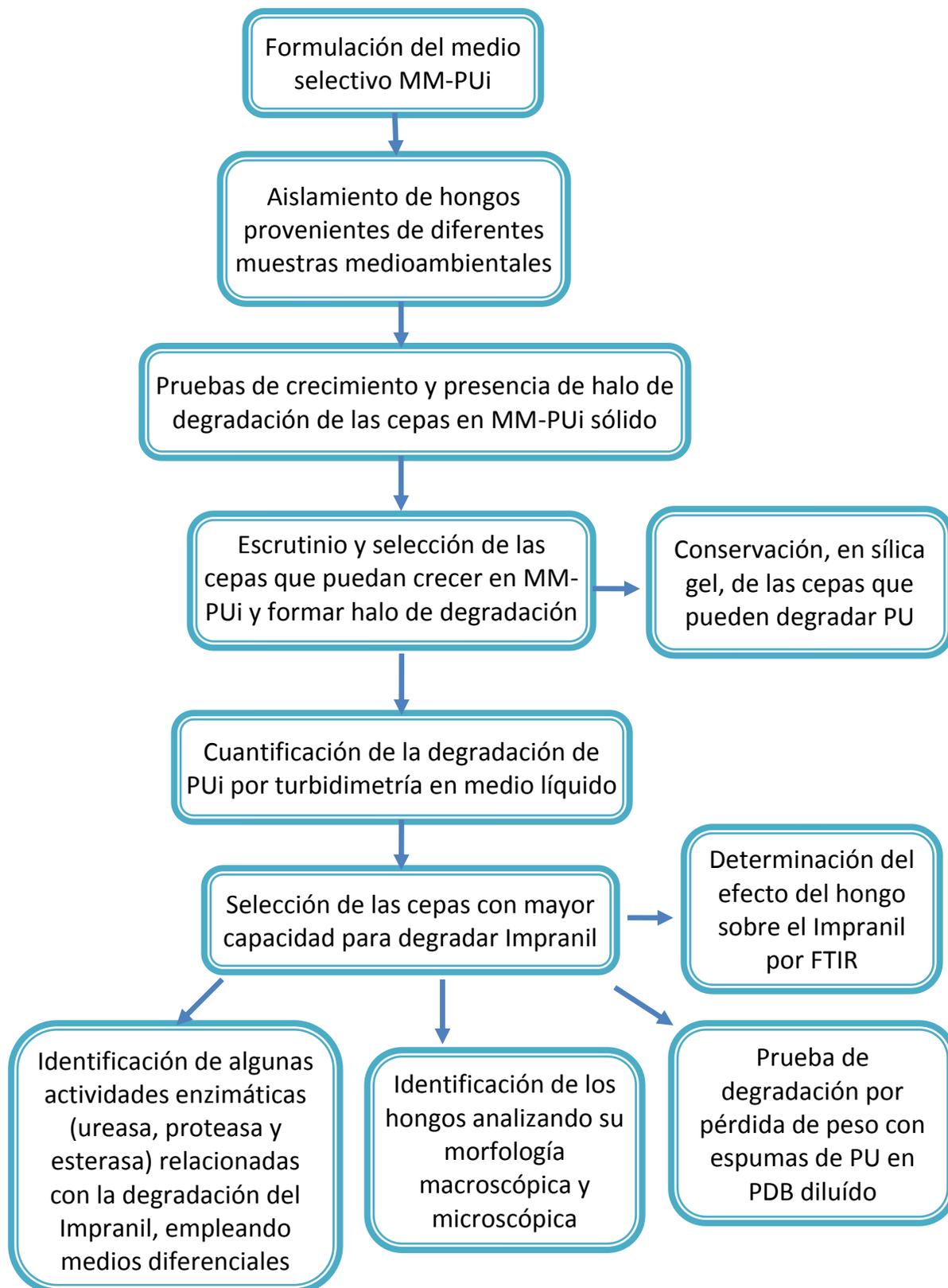
3. Objetivo

Aislar e identificar cepas de hongos capaces de utilizar poliuretano (PU) como única fuente de carbono, determinar su efecto sobre el PU así como identificar la presencia de actividades enzimáticas extracelulares relacionadas con esa capacidad.

3.1 Objetivos particulares

- 1.** Obtener cepas de hongos con la capacidad de utilizar PU como única fuente de carbono, provenientes de diferentes muestras medioambientales.
- 2.** Hacer un triple escrutinio con medios que contengan tres fuentes de carbono distintas (un poliéter PU, un poliéster PU y un poliálcool poliéster) para seleccionar las mejores candidatas para degradar PU.
- 3.** Cuantificar la degradación de los hongos seleccionados haciendo uso de un ensayo turbidimétrico en medio líquido con PU.
- 4.** Haciendo uso de medios diferenciales, determinar la presencia de las posibles actividades enzimáticas relacionadas con la degradación del PU (ureasa, proteasa y esterasa).
- 5.** Hacer un análisis por espectroscopía infrarroja (FTIR) de los posibles cambios en los grupos funcionales del MM-PUi al ser degradado por los hongos comparándolo con un control sin inocular.
- 6.** Determinar si los hongos tienen la capacidad de degradar espumas de PU.
- 7.** Identificar los géneros de los hongos aislados de acuerdo a su morfología macroscópica y microscópica.

4. Estrategia experimental



5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Formulación del medio mineral (MM) para trabajar con PU como única fuente de carbono.

Para probar que los hongos que fueran aislados pudieran crecer únicamente utilizando PU como fuente de carbono, fue necesario preparar un medio de cultivo artificial adecuado para que éstos crecieran. Este medio debe contener fuente de nitrógeno, azufre, fósforo y sales inorgánicas (Cl^- , Mg^{2+} , K^+ , Ca^{2+} , Fe^{2+}). También son necesarias otras sales minerales para propiciar el crecimiento, tales como elementos traza: Co, Cu, Zn, Mo, entre otras. Se recomienda además, la presencia de electrolitos que funcionan como captadores o donadores de electrones para las reacciones químicas que tengan lugar.

Para este trabajo se utilizó el medio mineral (MM) modificado de Russell *et al.*, 2011; cuya composición y concentraciones se muestran en la Tabla 3. La forma detallada como se preparó el medio se describe en el anexo de este trabajo.

Tabla 3. Composición del medio mineral utilizado para el crecimiento de los hongos con PUi al 0.5%, PUpl al 0.3% y PP al 0.3% (Russell *et al.*, 2011).

Fórmula	Concentración (1 L)
NaH_2PO_4	19 mM
K_2HPO_4	33.5 mM
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	7.6 mM
MgSO_4	250 μM
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	147 μM
$\text{ZnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	14 μM
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	12 μM
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	12 μM
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10 μM
CuCl_2	11 μM
MnCl_2	12 μM
HCl	1.8 mM

5.2 Aislamiento de cepas fúngicas capaces de crecer en PU

Para obtener cepas de hongos que pudieran utilizar PU como única fuente de carbono se empleó un medio selectivo que contenía una mezcla de sales (MM) y como fuente de carbono distintos barnices de PU: Impranil® DLN (PUi) al 0.5%, Hydroform® (PUh) al 0.3% o Polylack® (PUpl) al 0.3% en sólidos, empleando en algunos casos medio líquido y en otros medio sólido. Estos medios fueron inoculados con muestras obtenidas de diferentes fuentes: a) espumas de PU en descomposición colectadas en el Basurero Bordo Poniente, Cd. Nezahualcoyotl, Edo. de México (Figura 6), b) tierra de jardín colectada en el Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM y c) muestras de hongos creciendo en áreas recubiertas con plástico, como por ejemplo en un cuarto frío.



Figura 6. Muestras de espumas de PU en descomposición colectadas en el Basurero Bordo Poniente, Cd. Nezahualcoyotl, Edo. de México.

5.2.1 Muestras del Basurero Bordo Poniente

En el 2010, se llevó a cabo una colecta de muestras de hule espuma de PU en descomposición en el Basurero Bordo Poniente, Cd. Nezahualcoyotl, Edo. de México, de las cuales se obtuvieron 8 muestras (Figura 6). Estas muestras se mantuvieron en bolsas de plástico bien selladas, a 4°C. Trozos de estas muestras fueron empleados como inóculos para el aislamiento de cepas de hongos capaces de crecer en PU. Para ello se realizó lo siguiente:

1. Tomar un fragmento de aproximadamente de 1 cm³ de hule espuma de PU y colocarlo en un matraz de 125 mL con 25 mL de MM-PUi líquido (ver anexo) que contenía cloranfenicol (50 µg/mL), para inhibir el crecimiento bacteriano. Incubar por siete días a 25°C.
2. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, tomar de cada uno de los matraces, alícuotas de 250 µL y plaquearlas en cajas de Petri con medio PDA (ver anexo).
3. Después de 5 días de incubación a 25°C los hongos que crecieron fueron resembrados sucesivamente en PDA, hasta obtener cepas puras.

5.2.2 Muestras ambientales

Muestras ambientales de tierra y agua del Conjunto E de la Facultad de Química, UNAM, fueron sembradas en cajas de Petri con medio sólido MM-Impranil® DLN (MM-PUi), que contenían cloranfenicol (50 µg/mL) para inhibir el crecimiento de bacterias. Estas cajas se incubaron durante siete días a 25°C. Posteriormente, los hongos que crecieron fueron resembrados en PDA hasta obtener cepas puras.

5.2.3 Muestras de hongos creciendo en MM-PU

En nuestro laboratorio se trabaja con placas de medios de cultivo bacteriano que contienen diferentes tipos de PU como única fuente de carbono: MM-PUh y MM-PUpl (ver anexo). Estos medios frecuentemente son contaminados por hongos ambientales que de manera espontánea crecen en ellos. De estas placas contaminadas que contienen crecimiento fúngico, fueron aisladas varias cepas de hongos. Se tomaron los hongos y se inocularon en placas de PDA, las cuales fueron incubadas por siete días a 25°C para ser aislados.

5.2.4 Otras fuentes

Se tomaron dos muestras que presentaban crecimiento de moho sobre el revestimiento de PU de un cuarto frío. De estas zonas donde se encontraba el crecimiento fueron cortados algunos pequeños trozos empleando un bisturí. Estos trozos fueron inoculados en MM-PUi (ver anexo). Se incubaron por siete días a 25°C y de ahí se sembraron varias veces en PDA hasta tener cepas puras.

5.2.5 Cepa control

En algunos artículos se ha reportado el crecimiento en medio con PU, del hongo *Aspergillus niger* (Russell *et al.*, 2011), por lo que en este trabajo se probó la cepa de *Aspergillus niger* 334 perteneciente a la colección del Dr. Guillermo Aguilar (Departamento de Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM), como posible control positivo.

5.3 Sistema de nomenclatura

Con la finalidad de tener un registro de las muestras aisladas se creó un sistema de nomenclatura que permitiera identificarlos por medio de una clave de acuerdo a su procedencia y medio en el que fueron aislados:

Xa.Y.b

Donde

X: Representa el lugar donde fue obtenida la muestra.

a: Corresponde al número de muestra. En el caso de las muestras del Basurero Bordo Poniente, corresponde al número de muestra de las esponjas recolectadas.

Y: Representa el medio en el que se aisló.

b: El número de aislado.

Fuente de obtención	T1	Tierra *
	A1	Aire del laboratorio
	A2	Aire*
	A3	Ambiente del cuarto frío
	BP	Basurero Bordo Poniente
Medio de selección	H	Hydroform®
	PL	Polylack®
	I	Impranil® DLN
	IC	Impranil con cloranfenicol
	PP	Poliéster poliol

Figura 7. Abreviaturas de las claves utilizadas para identificar los hongos aislados.

* Muestras obtenidas en los jardines del Conjunto E de la Facultad de Química en la UNAM.

5.4 Prueba de degradación en PU sólido

Para comprobar que los hongos aislados a partir de la selección en medios con PU de las diferentes muestras ambientales, tenían la capacidad de utilizar PU como única fuente de carbono, se probó su crecimiento inoculándolos en tres diferentes medios sólidos disponibles en el laboratorio:

MM-PU_i, que contiene Impranil® DLN, el cual es un PS-PU. El medio de cultivo es de color blanco lechoso. En caso de degradación se ha reportado que el color se pierde y se observan halos transparentes alrededor de las colonias fúngicas con la capacidad de degradarlo (Howard, 2002).

MM-PU_{pl}, que contiene Polylack®, el cual por análisis preliminares en nuestro laboratorio tenemos evidencias de que es un PE-PU. El medio es de color crema y para determinar si es utilizado como fuente de carbono sólo se evaluó si existía o no crecimiento del hongo inoculado.

MM-PP (ver anexo) que contiene polioles tipo poliéster (Poliadipato de dietilenglicol) de la marca Rymapol® 200/107 L-83, los cuales son los precursores del poliéster-poliuretano. En caso de crecimiento y degradación se observaría un halo claro alrededor de la colonia fúngica en crecimiento.

1. Resembrar los hongos en cajas con PDA e incubar por siete días a 25°C.
2. Tomar un inóculo de cada uno de los hongos que contenga tanto hifas como conidios y sembrar en cada uno de los medios MM-PU_i, MM-PU_{pl} y MM-PP.

3. Incubar durante cinco días a 25°C para observar el crecimiento y formación del halo de degradación en el caso de los medios donde puede ser apreciado.

5.5 Conservación de las cepas

Mientras se fueron aislando cepas fúngicas puras con la capacidad de utilizar PU como única fuente de carbono, fue necesario ir preservando dichos hongos para evitar contaminación y pérdidas, para lo cual se utilizó la conservación en glicerol para el caso de hongos levaduriformes y la desecación en sílica para hongos filamentosos.

5.5.1 Conservación de hongos levaduriformes

Para conservar los hongos levaduriformes se utilizó el método de congelación de las células con glicerol. Se congelan las células en suspensión en un líquido con un agente crioprotector (glicerol) y se guardan a -70°C, con lo que el agua se congela. De esta forma, al no disponer las células de agua en forma líquida, no hay metabolismo. Cuando se quiere trabajar con las células así conservadas, se recuperan subiendo la temperatura.

1. Tomar una asada de cultivo del hongo levaduriforme, inocular en 25 mL de PDB en matraces de 125 mL e incubar por 24 h, en agitación (200 rpm) a 25°C.
2. Tomar una alícuota de 350 µL y colocar en un tubo Eppendorf de 1 mL. Agregar 150 µL de glicerol al 50% estéril.
3. Agitar en vórtex para obtener una suspensión homogénea.
4. Congelar los tubos con nitrógeno líquido y almacenarlos a -70°C.

Para determinar si las cepas fueron bien conservadas, descongelar un tubo de cada una de las cepas e inocular, con un asa estéril, una caja de PDB. Corroborar su crecimiento a las 72 horas.

5.5.2 Preservación de hongos filamentosos por desecación

La preservación por desecación se utiliza para conservar grupos de microorganismos que no resisten bien a otras técnicas como la liofilización o congelación. Es un método de conservación que reduce drásticamente el

metabolismo por eliminación de agua disponible para las células. Sin embargo, no todos los microorganismos sobreviven a este método de secado, por lo que se hace necesario añadir agentes protectores (leche descremada o glutamato sódico al 10%). Una vez secos, es importante mantener el producto sellado para evitar el contacto con el aire, ya que los agentes protectores son higroscópicos. Los soportes que se suelen utilizar son arena, tierra, sílica gel previamente secados y esterilizados por calentamiento con aire caliente (Mateos, 2002).

Para la conservación de las cepas aisladas primero es necesario obtener cultivos puros del hongo que se desea preservar:

1. Tomar una asada del hongo tocándolo con el asa micológica donde se aprecien muchos conidios e inocular en medio PDA por estría masiva. Cultivar para que el hongo se desarrolle hasta llenar la caja y tener suficientes conidios para la conservación, esto sucede alrededor de 5 a 6 días a 25°C.
2. En condiciones de esterilidad, verter en la caja Petri que contiene la biomasa fúngica, 10 mL de solución para lavar hongos (ver anexo), y raspar cuidadosamente con un asa Digirsky toda la superficie para desprender los conidios.
3. Con una pipeta de 1 mL colectar la solución para lavar hongos con el raspado y colocarla en un tubo falcon de 15 mL estéril, el cual se centrifuga a 3,500 rpm durante 5 min (centrífuga, IEC NH-511), y decantar el sobrenadante.
4. Resuspender el pellet en 5 mL de la solución para lavar hongos, centrifugar bajo las mismas condiciones para lavar el precipitado y volver a decantar el sobrenadante.
5. Utilizar 200 μ L de leche descremada al 12% (ver anexo) para resuspender el pellet agitándolo en caso de ser necesario.
6. Tomar 100 μ L y adicionarlos a viales de 4 a 6 mL con 1 cm^3 de sílica gel. Esterilizar en un horno a 200°C por mínimo 24 horas, tapar los viales ligeramente, etiquetarlos y dejarlos que se sequen por 3 días.

Realizar pruebas de control de calidad usando una piedra de sílica gel e inocular en una caja con medio PDA para asegurarse que sea la cepa de interés y que se haya conservado adecuadamente.

5.6 Prueba de degradación en MM-PUi líquido

Ha sido reportado que algunos hongos son capaces de aclarar el medio de cultivo con Impranil® DLN como resultado de la degradación del mismo (Russel *et al.*, 2011). Tomando en cuenta lo anterior, es posible cuantificar la degradación del Impranil® DLN midiendo el grado de turbidez por espectrofotometría, el cual será proporcional a la cantidad de PU no degradada por el hongo.

1. Colocar un inóculo de hongo en 25 mL de PDB (ver anexo). Incubar por siete días a 25°C.
2. Agitar en vórtex para tener una suspensión homogénea y tomar 2 mL de medio con hongo; pasarlos a un tubo eppendorf de 2 mL pre-pesado y centrifugar a 12,000 rpm por 5 minutos (centrífuga, Eppendorf Centrifuge 5417 C).
3. Retirar el sobrenadante y pesar el tubo con el pellet, para estandarizar el inóculo a 80 mg con el fin de obtener una biomasa equitativa para cada una de las cepas. Si se tiene una masa inferior a los 80 mg se debe agregar más medio con hongo; mientras que si es mayor se debe retirar biomasa y ajustar a 80 mg.
4. Una vez ajustado el inóculo resuspender el pellet con 1 mL de buffer de fosfatos 20 mM y agitarlo con vórtex, volver a centrifugar bajo las mismas condiciones, con el objetivo de lavar el PDB restante, y decantar el sobrenadante.
5. Resuspender el pellet con 1 mL de MM-PUi líquido y colocarlo en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 9 mL de MM-PUi líquido (ver anexo), el volumen final de cada tubo debe ser de 10 mL. Preparar tubos con 10 mL de MM-PUi líquido sin inocular como control. Incubar todos los tubos por 15 días a 25°C en una incubadora, sin luz y sin agitación.
6. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, homogenizar el contenido del tubo agitándolo en vórtex y filtrarlo por un filtro Whatman™ No. 41 para retirar el micelio. Realizar esta misma operación con los tubos control.
7. Tomar una alícuota del filtrado y medir la absorbancia por turbidez con un espectrofotómetro a 600 nm (espectrofotómetro, Ultrospec 2000) utilizando agua destilada como blanco.
8. Previamente, se elaboró una curva estándar con diferentes diluciones de MM-PUi líquido en agua destilada, lo que permite relacionar la absorbancia con la concentración de PU en el medio.

5.7 Determinación de cambios en la estructura de MM-PUi por FTIR al ser degradado

Una vez cuantificada la degradación en medio líquido determinando la clarificación del medio, una manera de analizar lo que sucede a nivel molecular es haciendo uso de la espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier (FTIR), que permite observar qué grupos funcionales están siendo alterados por la acción del crecimiento fúngico. Para poder llevar a cabo este tipo de análisis se realizó lo siguiente:

1. Inocular en PDB cada uno de los ocho hongos que presentaron un aclaramiento mayor al 70% en medio líquido MM-PUi, e incubarlos durante siete días a 25°C.
2. Agitar en vórtex para tener una suspensión homogénea, tomar 2 mL de medio con hongo, pasarlos a un tubo eppendorf de 2 mL pre-pesado y centrifugarlo a 12,000 rpm por 5 minutos (centrifuga, Eppendorf Centrifuge 5417 C).
3. Retirar el sobrenadante y pesar el tubo con el pellet para estandarizar el inóculo a 80 mg. En caso de que la masa sea mayor a 80 mg, se debe de retirar biomasa; en caso de ser menor a 80 mg se debe agregar más suspensión de células y repetir los pasos anteriores hasta obtener el inóculo deseado.
4. Una vez ajustado el inóculo resuspender el pellet con 1 mL de buffer de fosfatos 20 mM y agitarlo con vórtex, volver a centrifugar bajo las mismas condiciones, con el objeto de lavar el PDB restante y decantar el sobrenadante.
5. Resuspender el pellet con MM-PUi y colocarlo en tubos de ensayo de 16 x 150 mm con 10 mL de MM-PUi líquido. Se deben tener tubos con MM-PUi líquido sin inocular como control. Incubar los tubos por 15 días a 25°C sin agitación.
6. Homogenizar el contenido del tubo y filtrarlo por un filtro Whatman™ No. 41 para retirar el micelio. Tomar un mL del filtrado y colocarlo en un tubo eppendorf de 2 mL.

El filtrado obtenido fue analizado en la Unidad de Servicios y Apoyo a la Investigación (USAI) de la Facultad de Química de la UNAM, por espectroscopía de infrarrojo, empleando un FTIR (Fourier Transformed Infra Red) 1605 Perkin-Elmer de intervalo 2500-800 cm^{-1} de infrarrojo medio.

5.8 Identificación de las actividades enzimáticas extracelulares

5.8.1 Actividad esterasa

Para detectar las posibles actividades enzimáticas extracelulares involucradas en el ataque al PU, se emplearon medios diferenciales. Para la determinación cualitativa de la actividad esterasa se utilizó un medio con Tween80[®], el cual es un detergente y CaCl₂ (ver anexo). El Tween80[®] es una molécula anfipática que contiene ésteres de ácidos grasos y CaCl₂ que se encuentra disociado en el medio de cultivo en forma de Ca²⁺ y 2 Cl⁻. La hidrólisis de los enlaces éster del Tween80[®] genera como producto un grupo alcohol y un grupo ácido. Al asociarse dos moléculas de ácido a un ión Ca²⁺ se produce un complejo que precipita y se observa alrededor del crecimiento fúngico con actividad esterasa un halo brillante de precipitación.

1. Tomar una azada, proveniente de una caja con PDA que tenga 7 días de crecimiento a TA, de cada uno de los hongos deseados e inocular placas de medio Tween80[®] por picadura central. Incubar por 7 días a 25°C.
2. Después de este tiempo observar si hay halos de precipitación blanquecinos alrededor de las colonias de hongos, lo que indicaría actividad esterasa.

5.8.2 Actividad proteasa

Para determinar si hay actividad proteasa se realiza un ensayo incubando los hongos una semana en placas de MM con caseína (ver anexo) y tiñendo después de dicha incubación con azul de Coomassie, el cual se une a las proteínas. Cuando hay presencia de hidrólisis de la caseína por acción de las proteasas, se observa un halo trasparente alrededor de los hongos.

1. Tomar una azada, proveniente de una caja con PDA que tenga 7 días de crecimiento a TA, de cada uno de los hongos deseados e inocular placas de MM sólido con caseína, por picadura central. Incubar por 7 días a 25°C.
2. Después, realizar tinción de las placas con azul de Coomassie R-250 al 0.1% en ácido acético-metanol 3:1 (v/v) y dejar en reposo por 30 min.
3. Hacer un lavado a las placas con una solución de ácido acético-MeOH 3:1 (v/v) durante 20 minutos, para retirar el colorante que no se unió a la caseína.

5.8.3 Actividad ureasa

Para determinar si los hongos presentan actividad ureasa extracelular, se emplearon placas con medio de Urea de Christensen, el cual contiene urea y rojo de fenol que actúa como indicador de hidrólisis de urea por medio de un cambio de color de amarillo a rojo; debido al aumento de pH en el medio de cultivo provocado por la generación de amoníaco durante la hidrólisis de la urea.

1. Tomar una azada, proveniente de una caja con PDA que tenga 7 días de crecimiento a TA, de cada uno de los hongos deseados e inocular placas de medio urea de Christensen por picadura central. Incubar por 7 días a 25°C
2. Observar si hay un cambio en la coloración del medio. Si se observa que el medio cambió de amarillo a rojo, significa que hay presencia de actividad ureasa.

5.9 Prueba de degradación en espuma de PU

Para determinar si los hongos con un porcentaje mayor a 70% de degradación de MM-PUi líquido son capaces de degradar PU sólido, se utilizaron dos tipos de espumas de PU con estructura conocida (Tabla 4 y Tabla 5).

Tabla 4. Características de las espumas de PU

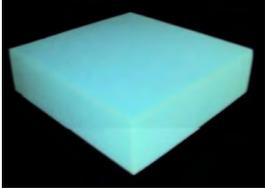
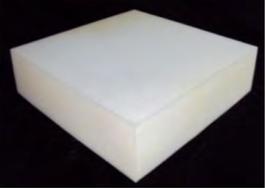
	Espuma Azul (A)	Espuma Blanca (B)
Aspecto		
Densidad	16 Kg/m ³	15.5 Kg/m ³
Retardante de flama	tri-fenil fosfato y otros productos fosfatados	no contiene
Composición	CARADOL MD30-45 : 45.2 pph	CARADOL MD30-45: 45.0 pph
	CARADOL SC56-22: 54.8 pph	CARADOL SC56-22: 55.0 pph
	TDI: 50.6 pph	TDI: 52.7 pph
	Agua: 3.85 pph	Agua: 4.05 pph
	C ₂ Cl ₂ : 4.0 pph	CH ₂ Cl ₂ : 7.7 pph

Tabla 5. Características químicas de los componentes en las espumas

TDI	
Mondur TD 80: diisocianato de tolueno, tiene una mezcla de 2,4-y 2,6-isómeros en la proporción de 80% y 20%, respectivamente	
Poliol	
CARADOL SC56-22: es un óxido de etileno / óxido de polioliol de poliéter a base de propileno	CARADOL MD30-45: óxido de etileno / óxido de propileno poliéter-polioliol adicionado con un copolímero de estireno-acrilonitrilo para aumentar la dureza

Al inocular las espumas pre-pesadas con los hongos e incubarlas durante 21 días, se puede determinar si hay cambios tanto en el peso como en la morfología y así saber si el hongo probado tuvo un efecto sobre la espuma.

1. Cortar las esponjas en rectángulos de 8 x 30 x 15 mm, pesarlas para tener registro de la masa antes de ser inoculada y esterlizar en autoclave, poniendo una esponja en un tubo tapado, en seco.

Nota: El corte de las esponjas debe ser limpio, sin rebabas. Esto es debido a que durante el experimento éstas son susceptibles a perderse lo que puede alterar los resultados. Se recomienda utilizar tijeras bien afiladas.

2. Colocar las esponjas en cajas Petri y agregarles 20 mL de PDB diluido con agua estéril al 50%. Se deben tener preparados matraces con 25 mL de PDB inoculados con los hongos a evaluar con una semana de crecimiento para obtener los inóculos.

3. Agitar en vórtex los matraces con el crecimiento fúngico para tener una suspensión homogénea y tomar 2 mL de medio con hongo; pasarlos a un tubo Eppendorf de 2 mL prepesado y centrifugarlos a 12,000 rpm por 5 minutos (centrífuga, Eppendorf Centrifuge 5417 C). Retirar el sobrenadante y pesar el tubo con el pellet para estandarizar el inóculo a 80 mg.

4. Resuspender el pellet con 1 mL de PDB al 50% y agitar en vórtex; inocular las esponjas vaciando el contenido de cada Eppendorf sobre cada esponja. Dejar esponjas sin inocular con 20 mL de PDB diluido como control.

5. Incubar las esponjas por 21 días a 25°C. Para evitar que el contenido de la caja se seque, es necesario retirar el medio circundante a la esponja y agregar 15 mL de PDB diluído al 50%, cada quinto día.

6. Cuando concluya el tiempo de incubación, retirar las esponjas y colocarlas en un matraz de 125 mL con 50 mL de solución comercial de hipoclorito de sodio (Cloralex) diluido al 30% en agua destilada (el Cloralex contiene entre 5.25% y 5.50% de hipoclorito de sodio). Dejarlas reposar por 16 hrs, con el fin de lisar a las células para eliminar el micelio y conidios de los hongos, de las esponjas.

Nota: Cuando se agrega la solución de hipoclorito de sodio, se debe agitar en vórtex durante 5 segundos para procurar que toda la biomasa tenga contacto con la solución, también hay que hacerlo con el control.

7. Mover suavemente el matraz para agitarlo y retirar la solución de hipoclorito de sodio, lavar con 30 mL de agua desionizada con agitación cuatro veces para retirar el resto de células (es necesario hacer este paso con mucho cuidado para no perder trozos de esponja ya que el cloro debilita su estructura); realizar este mismo procedimiento al control.

8. Retirar el exceso de agua de las esponjas al vacío haciendo uso de un matraz kitasato con un filtro Whatman™ No. 41 y dejarlas secar a temperatura ambiente, hasta que el peso de las esponjas secas sea constante. Registrar los pesos y observar si hay cambios tanto en tamaño como en forma.

5.10 Identificación de los hongos

5.10.1 Identificación macroscópica

Para la identificación macroscópica, se siembra cada uno de los hongos por picadura central con un asa micológica, en placas de PDA y se incuba por 5 días a 25°C; posteriormente, se observa la morfología de la colonia, se describe y se realiza un registro fotográfico.

5.10.2 Identificación microscópica

Se deben tener placas con medio PDB de cada una de las cepas puras. De éstas, se realiza una impronta colocando en la punta del asa micológica un fragmento de cinta adhesiva sobre la colonia y posteriormente adhiriéndola a un portaobjetos con solución de KOH al 20%. Ésta se observa al microscopio a 40 X

(microscopio, Olympus CX31) buscando estructuras de reproducción y crecimiento para su clasificación de acuerdo al sistema de clasificación de Saccardo. Se describe y se realiza un registro fotográfico.

6. Resultados y discusión

6.1 Aislamiento de cepas de hongos capaces de crecer en un medio mínimo de sales, con PU como única fuente de carbono.

Para obtener cepas de hongos capaces de utilizar PU como única fuente de carbono, se empleó un medio selectivo (medio mínimo de sales) con PU de diferentes tipos como única fuente de carbono y muestras de diferentes ambientes, como se describió en Materiales y métodos. Después del crecimiento en alguno de los medios selectivos, las cepas fúngicas fueron sembrados varias veces en medio PDA hasta obtener cepas puras. En la Figura 8 se presentan algunos de los pasos realizados para la selección de hongos capaces de crecer en PU. Las cepas puras de hongos filamentosos fueron conservadas por desecación en sílica gel.

Las cepas aisladas se denominaron de acuerdo al sistema de nomenclatura descrito en Materiales y métodos, el cual permite identificar a cada una de las cepas por su procedencia y el medio en el que fueron aisladas. Se aislaron 73 cepas fúngicas de las cuales 31 fueron hongos levaduriformes y 42 hongos filamentosos.

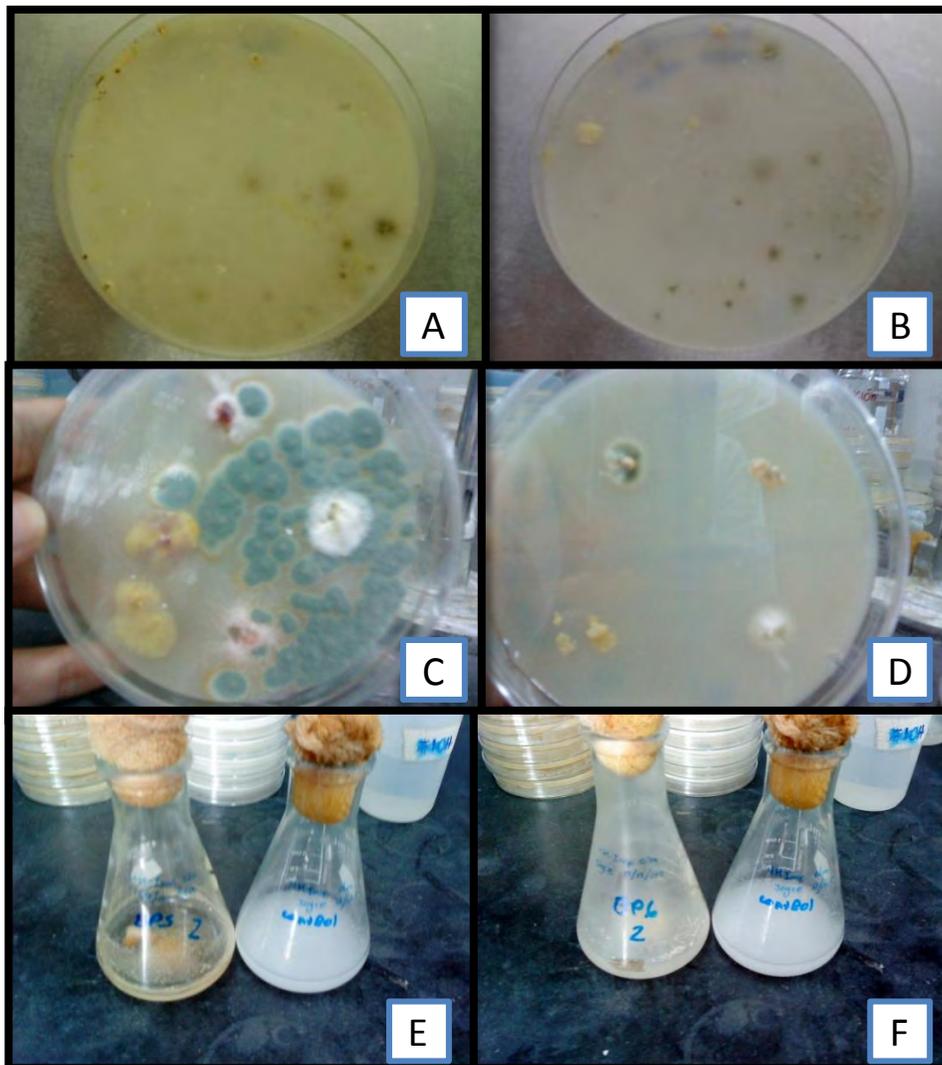


Figura 8. Selección para el aislamiento de hongos capaces de degradar PU. A) Caja de MM-PUH con crecimiento de hongos a los 15 días de haber sido inoculada con tierra. B) Caja de MM-PUpl con crecimiento de varias cepas a los 15 días de haber sido inoculada con tierra. C) Caja de PDA con hongos provenientes de MM-PUH sólido. D) Caja de PDA con cuatro hongos aislados de MM-PUpl. E) y F) Fotos de matraces con MM-PUi líquido inoculadas con trozos de espuma de PU en descomposición provenientes del Basurero Bordo Poniente (matraces del lado izquierdo de cada foto), en donde puede observarse el aclaramiento del medio de cultivo debido al crecimiento de los hongos. Los matraces del lado derecho de cada foto son los controles no inoculados.

6.2 Prueba de degradación y crecimiento en medios sólidos

Con el fin de seleccionar aquellas cepas que pudieran crecer en MM-PU y utilizarlo como única fuente de carbono, se realizaron pruebas de crecimiento de todas las cepas resultantes de la primera selección, en dos diferentes tipos de barniz de PU (Impranil® DLN y Polylack®) y un polioli poliéster (Rymsapol® 200/107 L-83). Además también se empleó como criterio selectivo, en las cepas con crecimiento en Impranil® DLN y Rymsapol® 200/107 L-83, la formación de un halo de degradación por la acción de actividades enzimáticas extra-celulares producidas por los hongos capaces de degradar PU.

Ningún hongo levaduriforme mostró crecimiento o halo de degradación en ninguno de estos medios, por lo que fueron descartadas (no se incluyeron estos resultados en la Tabla 6). En la Figura 9 se presentan resultados representativos del crecimiento en los tres medios probados. Los resultados del escrutinio del crecimiento de los hongos filamentosos en los tres diferentes medios se muestran en la Tabla 6.

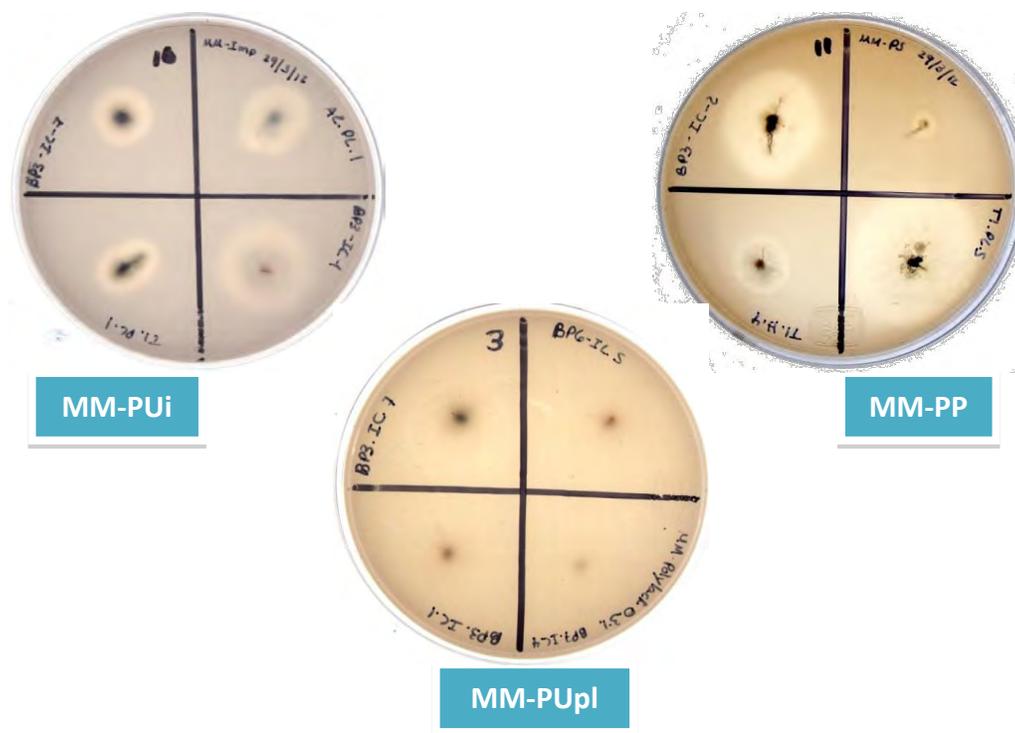


Figura 9. Crecimiento de los hongos seleccionados en los diferentes medios con PU como única fuente de carbono. Los hongos se inocularon y se incubaron durante 5 días a TA. Se observó crecimiento y formación de un halo de degradación en MM-PUi y MM-PP, mientras que en MM-PUpl no se presenta un halo de degradación, sólo se observa crecimiento.

Tabla 6. Escrutinio para la selección de cepas de hongos que degradan PU empleando diferentes tipos de PU y un PP como fuente de carbono.

Cepa de hongo seleccionado ^a	Medios de cultivo con PU y PP como única fuente de carbono ^b				
	MM-PUi		MM-PP		MM-PUpl
	Crecimiento	Halo de degradación	Crecimiento	Halo de degradación	Crecimiento
A2.H.4	+	+	+	+	+
A2.H.5	+	+	+	+	+
A1.I.1	+	+	+	+	+
A1.I.2	+	+	+	+	+
<i>A. niger</i> 334	+	-	+	-	-
A2.PL.1	+	+	+	+	+
A2.PP.1	+	-	+	-	-
A2.PP.3	+	+	+	+	-
A2.PP.5	+	+	+	+	+
A3.I.1	+	+	+	+	-
A3.I.2	+	-	-	-	-
BP3.IC.1	+	-	+	-	+
BP3.IC.2	+	+	+	+	-
BP3.IC.6	-	-	-	-	-
BP3.IC.7	+	+	+	+	+
BP3.IC.9	+	+	+	+	+
BP3.IC.12	+	-	+	-	-
BP3.IC.13	-	-	-	-	-
BP3.IC.14	+	+	+	+	-
BP3.IC.15	+	+	+	+	+
BP4.IC.1	+	+	+	+	+
BP4.IC.5	+	+	+	+	+
BP5.IC.4	+	+	+	+	-

BP5.IC.5	+	+	+	+	+
BP6.IC.3	-	-	-	-	-
BP6.IC.5	+	+	+	+	+
BP6.IC.7	-	-	-	-	-
BP6.IC.8	+	+	+	+	-
BP6.IC.9	+	-	+	-	+
BP6.IC.10	+	+	+	+	+
BP7.IC.4	+	+	+	+	-
BP7.IC.5	+	+	+	+	-
BP7.IC.7	+	+	+	+	+
BP8.IC.1	+	+	+	+	+
BP8.IC.2	+	+	+	+	-
BP8.IC.3	+	+	+	+	+
T1.H.1	+	+	+	+	-
T1.H.2	+	+	+	+	-
T1.H.3	+	-	+	-	-
T1.H.7	+	+	+	+	+
T1.PL.1	+	+	+	+	+
T1.PL.4	-	-	-	-	-
T1.PL.5	+	+	+	+	+

^a A1: ambiente del laboratorio; A2: ambiente, aire (del Conjunto E, Facultad de Química, UNAM); A3: ambiente, cuarto frío (del Conjunto E, Facultad de Química, UNAM); BP: Basurero Bordo Poniente (Cd. Nezahualcoyotl, Edo. de México); T1: tierra (del Conjunto E, Facultad de Química, UNAM); H: PS-PU marca Hydroform®; PL: PE-PU marca Polylack®; I: PS-PU marca Impranil® DLN; IC: PS-PU marca Impranil® DLN con cloranfenicol (50 µg/mL); PP: Polioli poliéster marca Rymsapol® 200/107 L-83.

^b MM-PUi: medio mínimo con Impranil® DLN al 0.5%; MM-PP: medio mínimo con poliéster polioli Rymsapol® 200/107 L-83 al 0.3%; MM-PUpl: medio mínimo con Polylack® al 0.3%. (n=1)

En la Tabla 6 se observa que de las 42 cepas de hongos filamentosos aislados originalmente, cinco (11.9%) no fueron capaces de crecer en ninguno de los MM-PU probados, lo que indica que el primer paso de selección y los posteriores aislamientos en PDA no fueron totalmente efectivos. Sin embargo, con este escrutinio, en tres medios con dos distintos PU y un PP, si fue posible determinar cuáles eran las cepas capaces de crecer en los polímeros. De 37 cepas que si crecieron en los medios probados, 20 de ellas (54%), fueron capaces de crecer en todos los medios y formaron halos de degradación, tanto en MM-PUi como en MM-PP. Once cepas crecieron en MM-PUi y MM-PP y formaron halos de degradación, pero no crecieron en MM-PUpl. Tres cepas, más *A. niger* 334 empleada como control, crecieron en MM-PUi y MM-PP pero no en MM-PUpl y no formaron halos de degradación. Dos cepas crecieron en MM-PUi, MM-PP y MM-PUpl y no formaron halos de degradación, y sólo una cepa creció solamente en MM-PUi pero no formó halo de degradación.

De los 37 hongos aislados en este triple escrutinio, el 100% se desarrollaron en MM-PUi, 36 crecieron en MM-PP y 22 crecieron en MM-PUpl, lo cual concuerda con lo que previamente se ha observado en cuanto a que el PS-PU es más fácilmente degradado, tanto por hongos como por bacterias, que el PE-PU (Darby y Kaplan, 1968; Nakajima-Kambe *et al.*, 1999). Todos los hongos que crecieron en MM-PUi, que es un PS-PU, crecieron en MM-PP, que es un polioliol-poliéster precursor de la síntesis de PS-PU, sugiriendo que las enzimas utilizadas para la degradación de ambos medios pueden ser las mismas. Por otro lado, no se encontró ninguna cepa que creciera exclusivamente en PUpl lo cual puede ser debido a que, aunque el PUpl contiene enlaces éter, también contiene el grupo funcional uretano que presenta enlaces éster, susceptibles al ataque de las mismas enzimas involucradas en la degradación del PS-PU (Nakajima-Kambe *et al.*, 1997), es decir, que para la degradación de PE-PU también se requieren enzimas capaces de hidrolizar grupos éster, estas son las esterasas.

De 37 hongos que crecieron en MM-PUi, 31 formaron halos de degradación, tanto en MM-PUi como en MM-PP, es decir existió una completa concordancia, los hongos que formaban halos de degradación en PU Impranil® DLN también los formaban en poliéster polioliol. Para explicar estas observaciones, se propone que los hongos con la capacidad de formar halos de degradación secretan enzimas extra-celulares para atacar al PU, mientras que los que no los forman, podrían estar empleando enzimas asociadas a la membrana para degradar al PU, permitiéndoles crecer.

6.3 Prueba de degradación en medio MM-PUi líquido

Dado que el Impranil® DLN clarifica al ser degradado, se empleó el MM-PUi para realizar pruebas que permitieran cuantificar la degradación del PU, por turbidimetría. Para esta prueba se utilizaron los 31 hongos filamentosos que generaron halo de degradación al crecer en MM-PUi sólido. Se sembró un inóculo de 80 mg de cada una de las cepas en tubos de ensayo de 16 x 110 mm, con 10 mL de MM-PUi líquido, se dejó un tubo sin inocular como control y se incubaron a 25°C por 15 días. Pasado este tiempo se observó la clarificación del medio así como crecimiento de micelio, en algunos casos dicho crecimiento se presentó en el fondo del tubo mientras que en otros, en la parte superior, indicando que los primeros son hongos de crecimiento microaerófilo (ejemplos: BP3.IC.9, A2.H.4, T1.PL.1) que los últimos tienen micelio estrictamente aerobio (ejemplos: BP7.IC.5, T1.PL.5, BP6.IC.5) (Figura 10).

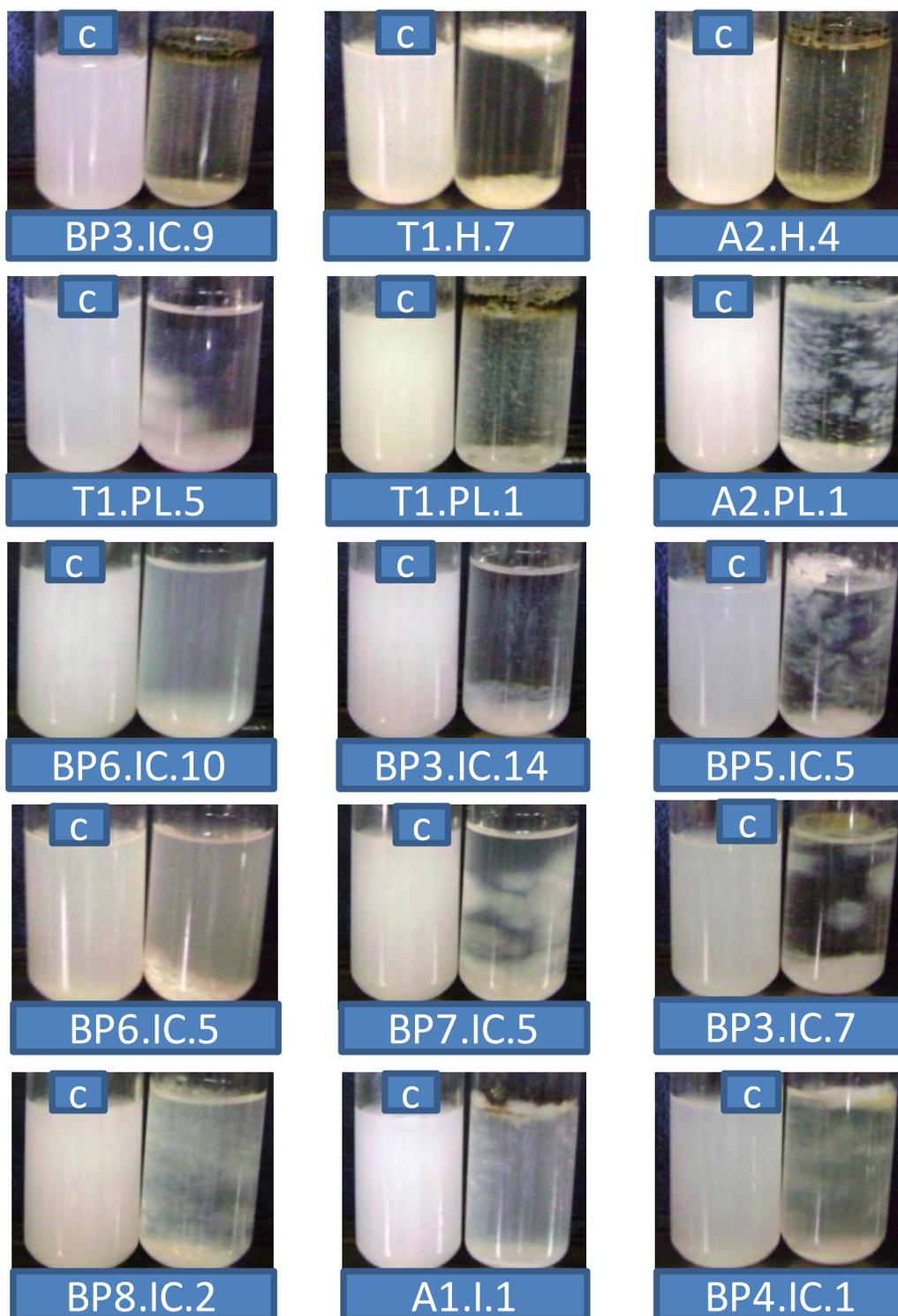


Figura 10. Cambios en el MM-PUi líquido al ser inoculado con diferentes hongos. Se muestran dos tubos en cada imagen, el control a la izquierda y el crecimiento y aclaramiento del medio en las diferentes cepas de hongos cultivadas, a la derecha. La incubación se llevó a cabo durante 15 días a 25°C. Se presentan algunas de las cepas analizadas.

Para realizar la cuantificación de la degradación de Impranil® DLN, el contenido de cada tubo (inoculados y control) fue filtrado empleando papel Whatman™ No. 41. Al filtrado se le midió la absorbancia a 600 nm (utilizando agua destilada como blanco) y se determinó, de acuerdo a una curva patrón con concentraciones conocidas de Impranil® DLN (Figura 11), el contenido de Impranil® DLN degradado en mg/mL de medio para cada uno de los hongos (Figura 12).

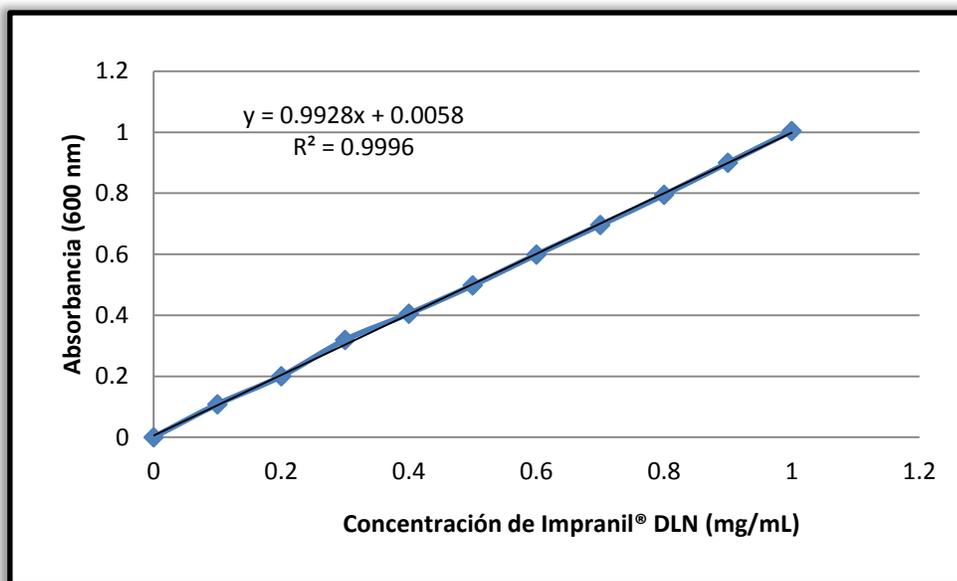


Figura 11. Curva patrón con diferentes concentraciones de Impranil® DLN. Relaciona la concentración en mg de Impranil® DLN por cada mL de medio con la abs. a 600 nm, utilizando agua destilada como blanco. (n=3).

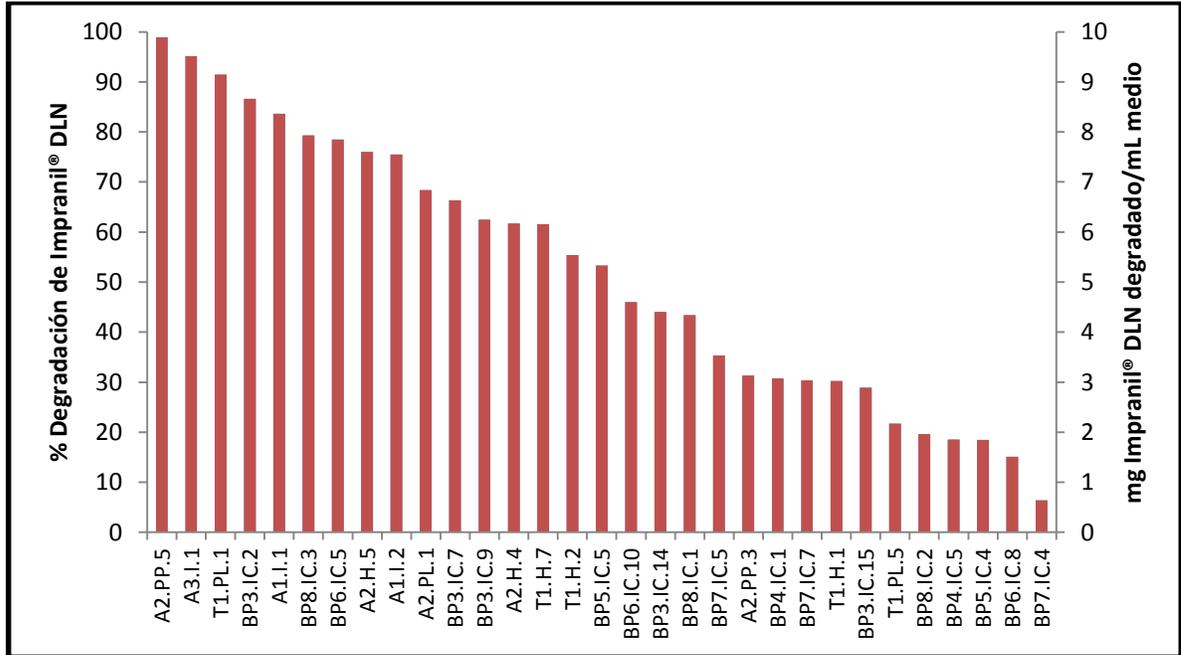


Figura 12. Cuantificación de la degradación de Impranil® DLN por aclaramiento del medio de cultivo. Los resultados son expresados en porcentaje de degradación (eje izquierdo), así como en mg de Impranil® DLN degradado por mL de medio de cultivo (eje derecho). Se analizaron los 31 hongos que formaron halo de degradación en MM-PUi sólido. Éstos fueron incubados en tubos de ensaye con 10 mL de MM-PUi durante 15 días a 25°C, el micelio fue eliminado y la absorbancia a 660 nm del sobrenadante fue determinada. Estos valores se compararon con una curva estándar para determinar la cantidad de Impranil presente en los sobrenadantes después de la incubación. (n=1).

De estos 31 hongos, los 15 que presentaban el mayor porcentaje de degradación fueron seleccionados para volver a hacer la prueba realizando repeticiones. En la Figura 13 se observan los resultados de la repetición de este experimento con las 15 mejores cepas. Se obtuvieron porcentajes de degradación en promedio, de entre 40% y 87%, esto implica que las enzimas excretadas por los hongos tienen una alta capacidad para romper los enlaces del Impranil® DLN. Para continuar con los análisis posteriores, se eligieron a las ocho cepas cuya degradación de Impranil® DLN fue mayor al 70%.

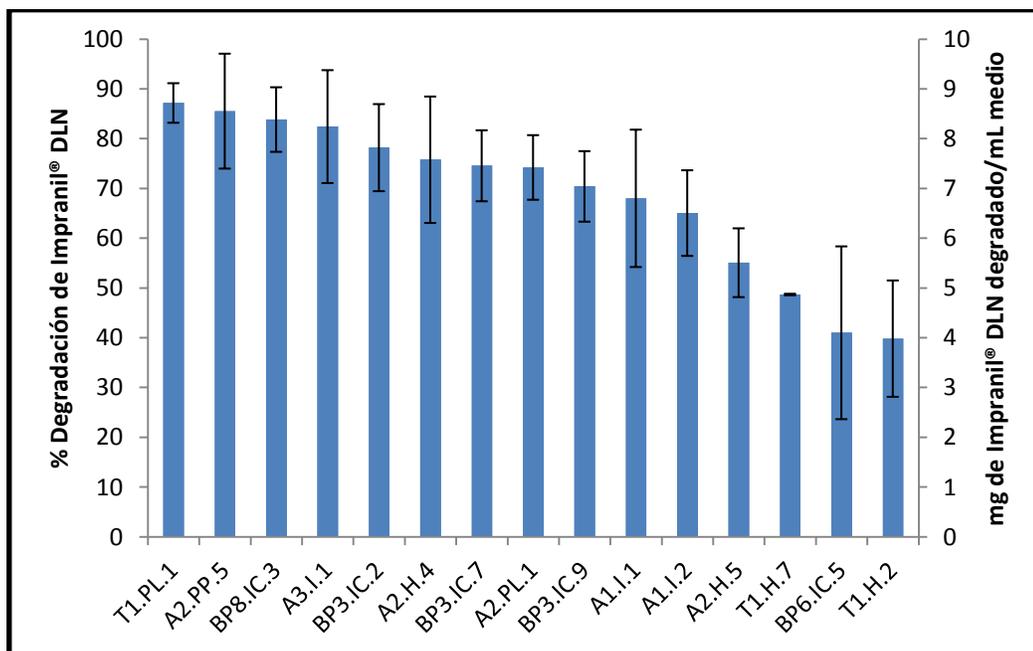
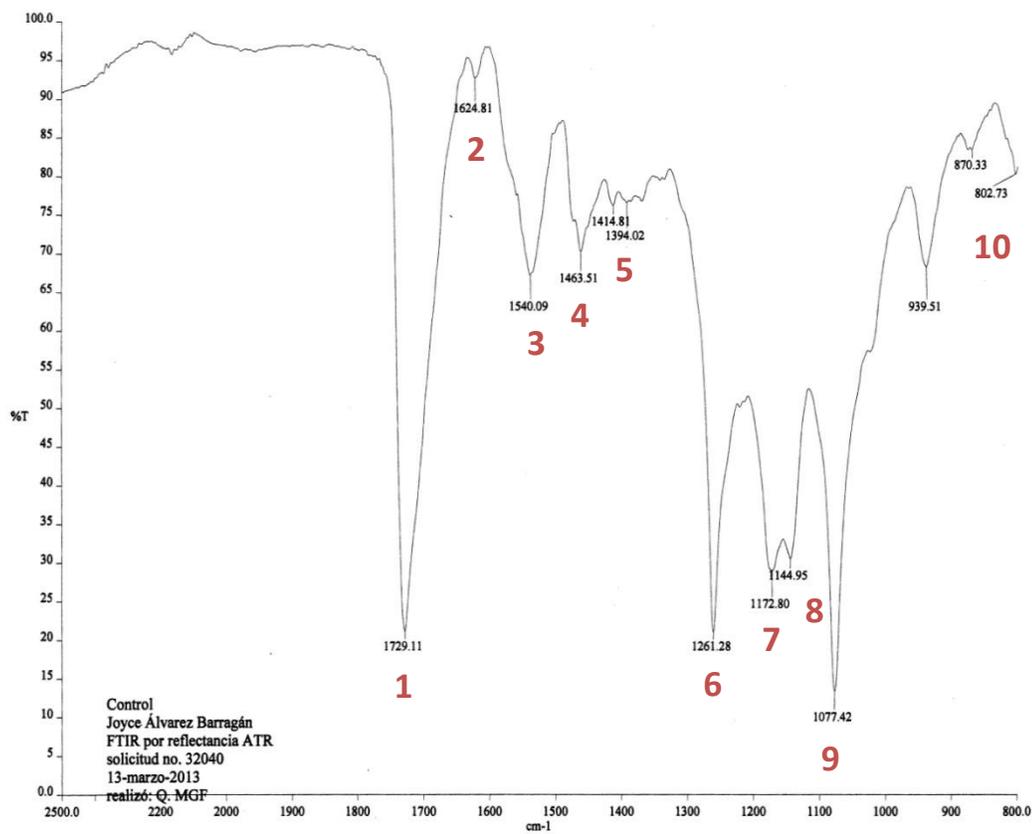


Figura 13. Cuantificación de la degradación de Impranil® DLN por aclaramiento del medio de cultivo de los 15 hongos con mayor porcentaje de degradación. Los resultados son expresados en porcentaje de degradación (eje izquierdo), así como en mg de Impranil® DLN degradado por mL de medio de cultivo (eje derecho). Los hongos fueron incubados en tubos de ensayo con 10 mL de MM-PUi durante 15 días a 25°C, el micelio fue eliminado por filtración y la absorbancia a 600 nm del sobrenadante fue determinada. Estos valores se compararon con una curva estándar para determinar la cantidad de Impranil® DLN presente en los sobrenadantes después de la incubación. (n=3).

6.4 Determinación por FTIR de los cambios en la estructura del MM-PUi al ser degradado.

Con la intención de identificar cuáles son los grupos funcionales que se encuentran en el Impranil® DLN y cuáles de éstos se ven afectados por la acción enzimática de los hongos, se llevó a cabo el análisis por FTIR (con el apoyo de la USAI, de la Facultad de Química de la UNAM), tanto del MM-PUi sin inocular como del inoculado con los diferentes hongos.

Cada uno de los ocho hongos que mejor degradaron Impranil® DLN, seleccionados previamente, se inocularon en 10 mL de MM-PUi y se incubaron por 15 días a 25°C, junto con un control de MM-PUi sin inocular. Todas las muestras inoculadas y el control se filtraron a través de papel Whatman™ No. 41 para quitar las células y realizar el análisis por FTIR del filtrado. En la Figura 14 se observa el espectro de FTIR del MM-PUi sin inocular que se utilizó como control. También se observa la interpretación de las bandas presentes en el espectro, relacionadas al grupo funcional al que corresponden, de acuerdo al artículo de McCarthy *et al.* (1997). En este artículo se hace un análisis con FTIR de la degradación de diferentes muestras de PU, con el fin de determinar cambios de los grupos funcionales característicos del polímero. Los espectros resultantes del medio tratado con los hongos se observan en las Figuras 15 a 22 comparándolas con el control sin inocular.



Banda	cm ⁻¹	Grupo funcional al que corresponde
1	1729.11	enlace de estiramiento del enlace C=O en un grupo uretano o éster
2	1624.81	enlace de estiramiento igual del enlace C=O en un grupo urea
3	1540.09	flexión del enlace N-H y vibración de tensión entre C-N
4	1463.51	flexión de grupos CH ₂ o CH ₃
5	1414.81 1394.02	estiramiento entre C-C en un anillo de benceno
6	1261.28	flexión del enlace N-H y vibración del enlace C-N en el uretano
7	1172.80	torsión CH ₂
8	1144.95	estiramiento del C-O
9	1077.55	estiramiento del enlace C-O-C en el uretano
10	939.51 876.33 802.73	flexión del C-H del benceno fuera del plano

Figura 14. Espectro de FTIR del MM-PUI sin inocular (control) e identificación de bandas presentes en el análisis (McCarthy *et al.*, 1997).

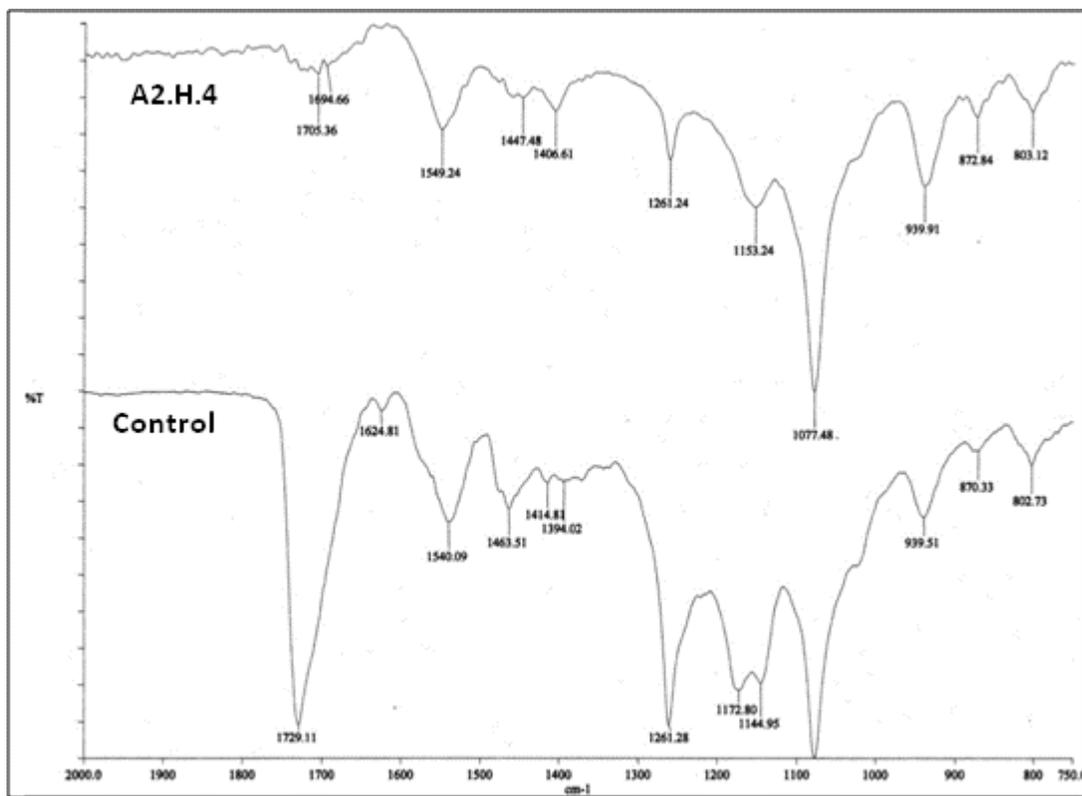


Figura 15. Espectro representativo de FTIR del MM-PUI inoculado con A2.H.4 y sin inocular (control). Los tubos con medio inoculado y sin inocular se incubaron durante 15 días a 25°C, se filtraron en papel Whatman™ No. 41 y se analizaron por FTIR, (n=3).

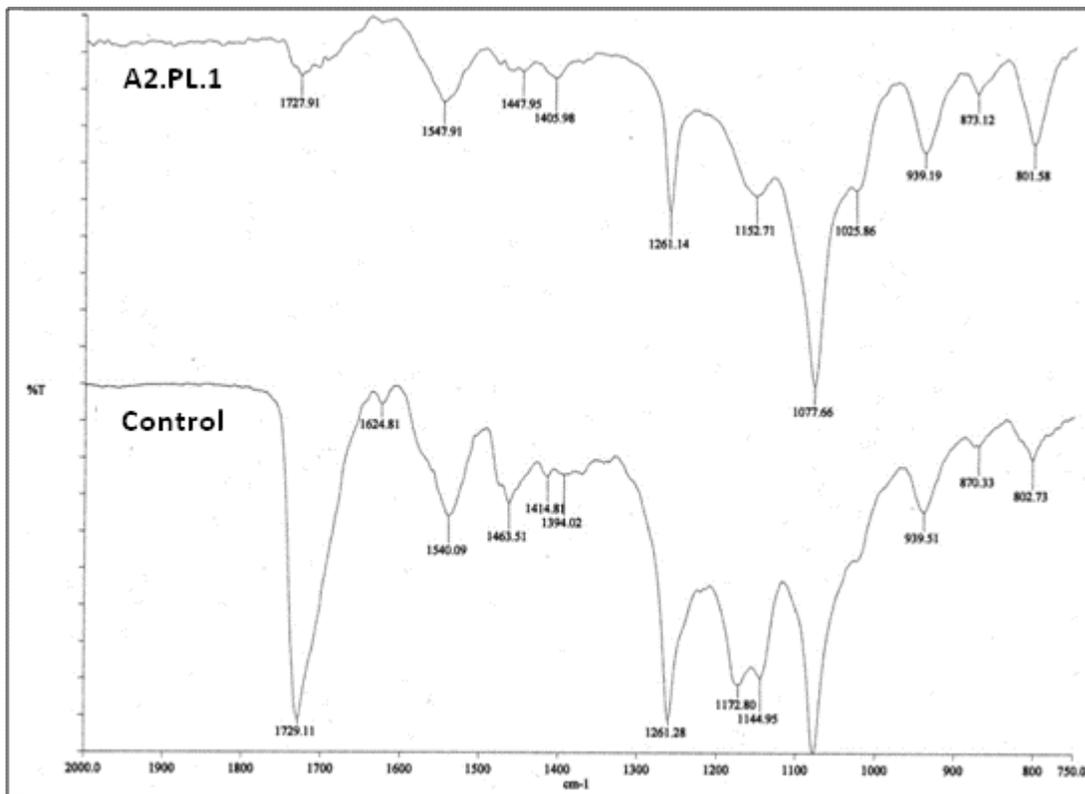


Figura 16. Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con A2.PL.1 y sin inocular (control). Los tubos con medio inoculado y sin inocular se incubaron durante 15 días a 25°C, se filtraron en papel WhatmanTM No. 41 y se analizaron por FTIR, (n=3).

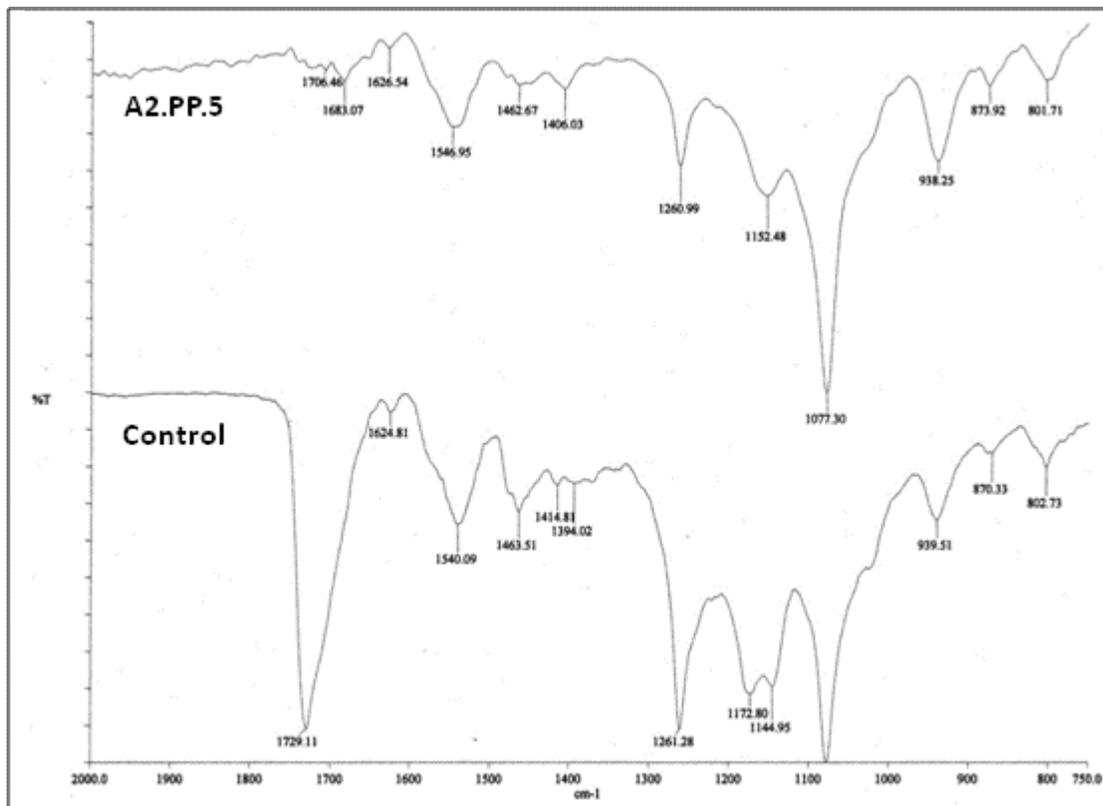


Figura 17. Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con A2.PP.5 y sin inocular (control). Los tubos con medio inoculado y sin inocular se incubaron durante 15 días a 25°C, se filtraron en papel WhatmanTM No. 41 y se analizaron por FTIR, (n=3).

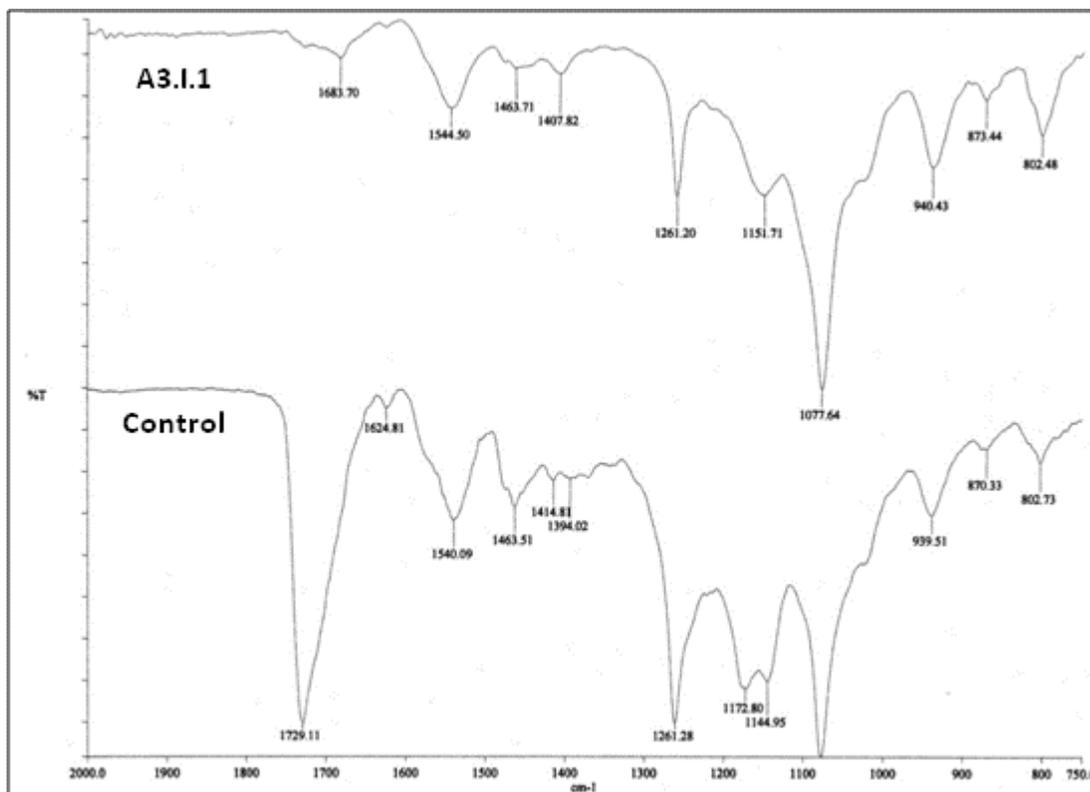


Figura 18. Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con A3.I.1 y sin inocular (control). Los tubos con medio inoculado y sin inocular se incubaron durante 15 días a 25°C, se filtraron en papel WhatmanTM No. 41 y se analizaron por FTIR, (n=3).

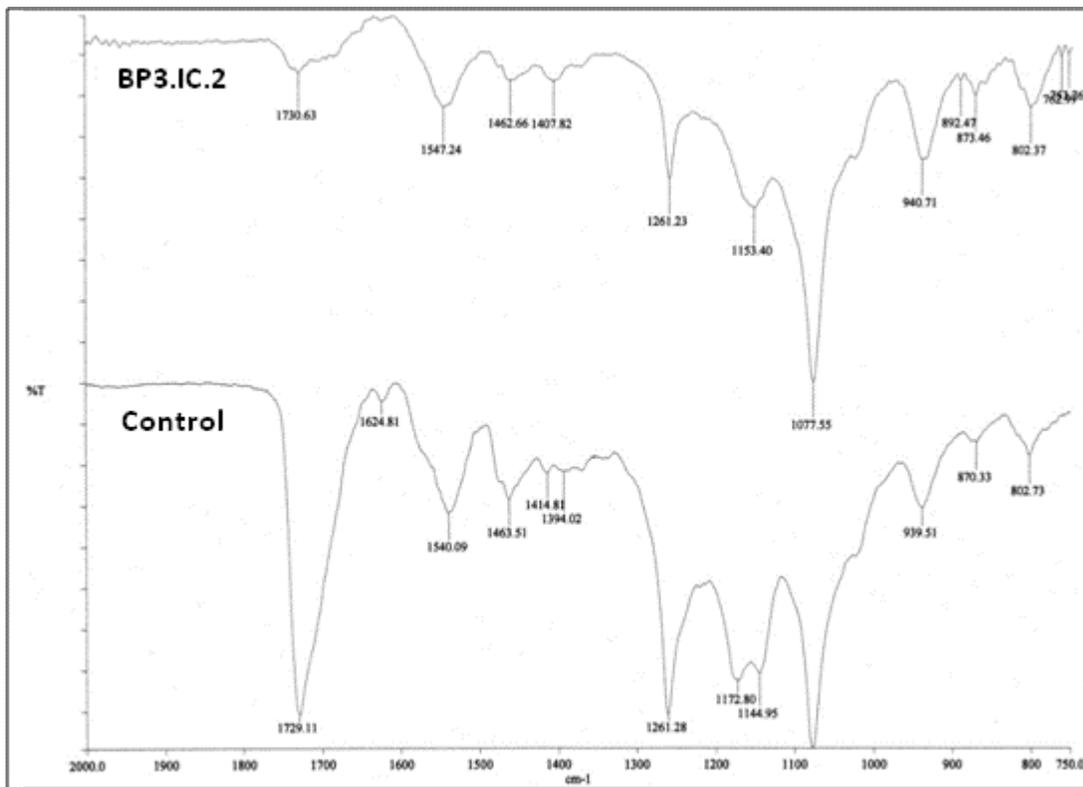


Figura 19. Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con BP3.IC.2 y sin inocular (control). Los tubos con medio inoculado y sin inocular se incubaron durante 15 días a 25°C, se filtraron en papel Whatman™ No. 41 y se analizaron por FTIR, (n=3).

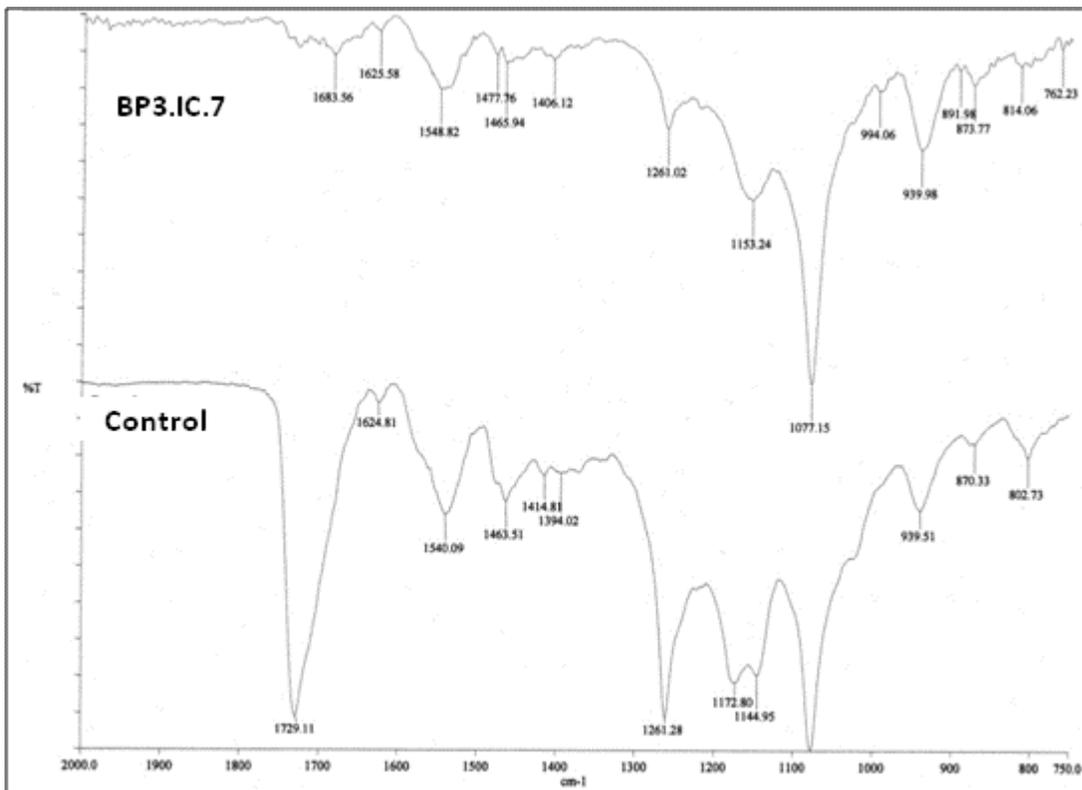


Figura 20. Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con BP3.IC.7 y sin inocular (control). Los tubos con medio inoculado y sin inocular se incubaron durante 15 días a 25°C, se filtraron en papel WhatmanTM No. 41 y se analizaron por FTIR, (n=3).

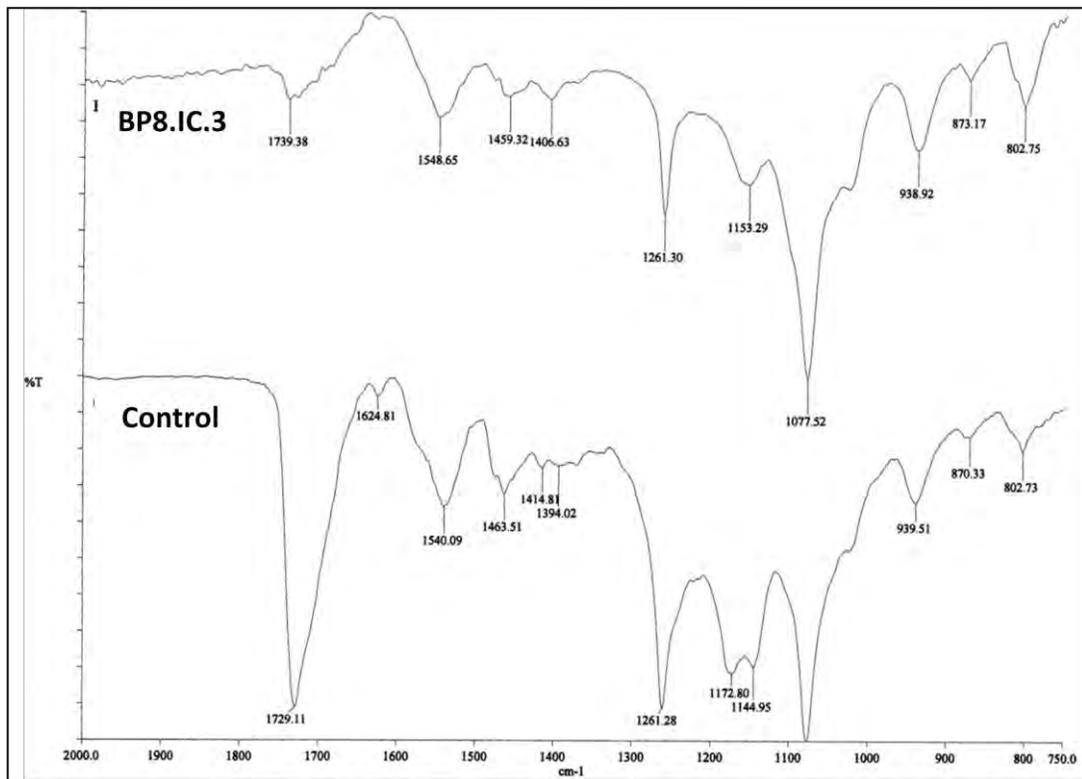


Figura 21. Espectro representativo de FTIR del MM-PUi inoculado con BP8.IC.3 y sin inocular (control). Los tubos con medio inoculado y sin inocular se incubaron durante 15 días a 25°C, se filtraron en papel WhatmanTM No. 41 y se analizaron por FTIR, (n=3).

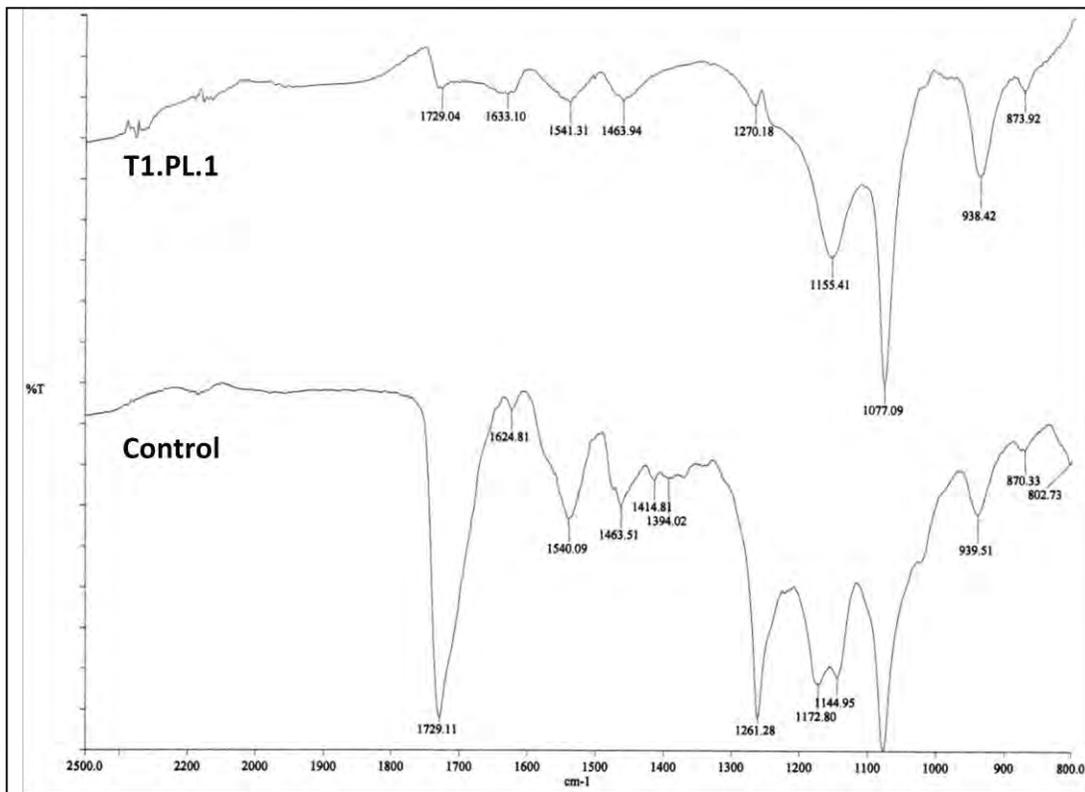


Figura 22. Espectro representativo de FTIR del MM-PUI inoculado con T1.PL.1 y sin inocular (control). Los tubos con medio inoculado y sin inocular se incubaron durante 15 días a 25°C, se filtraron en papel Whatman™ No. 41 y se analizaron por FTIR, (n=3).

Se observa una disminución, o en algunos casos, una pérdida total de la banda de 1730 cm^{-1} correspondiente al enlace C=O (carbonilo) presente en un grupo uretano o éster, lo que implica que existe hidrólisis de este enlace (Kay *et al.*, 1993) resultado de la posible actividad de una esterasa o una proteasa.

También se observa en todos los casos que existen cambios significativos en la banda de 1540 cm^{-1} característica del enlace N-H y vibración de tensión entre C-N. La disminución de esta banda implica que hay una ruptura en los enlaces donde el nitrógeno está implicado (Pettit y Abbott, 1975). La ruptura del enlace N-H se puede estar llevando a cabo por la acción de una ureasa o una deshidrogenasa con la capacidad de romper los enlaces que unen los H^+ al nitrógeno. Mientras que una proteasa podría estar implicada en la ruptura del enlace N-C debido a su capacidad para romper la unión entre el carbono y el nitrógeno dada su actividad proteolítica.

La banda de 1270 cm^{-1} también es característica de la flexión del enlace N-H y vibración del enlace C-N en el uretano, por lo que, como se explicó anteriormente, esta acción puede estar siendo realizada por actividades enzimáticas de tipo proteasa y ureasa.

Se ha reportado en la literatura que el mecanismo por el cual un enlace éter se rompe es oxidativo (Graham *et al.*, 1996) por lo que se sugiere que la disminución en la banda de 1170 cm^{-1} , correspondiente a la pérdida del grupo éter, se está llevando a cabo por una enzima oxidasa. Ejemplos de estas enzimas que se han reportado en hongos son la lignina peroxidasa reportada en una cepa de *Phanerochaete chrysosporium* (Ming y Kirk, 1988) o la manganeso peroxidasa presente en *Phanerochaete sordida* (Rüttimann-Johnson *et al.*, 1993) y en *Lentinula edodes* (Silva *et al.*, 2005). Estas enzimas catalizan la depolimerización oxidativa de la lignina, la cual es un polímero presente en las paredes celulares de vegetales y que contiene en su estructura enlaces éter.

De acuerdo a los resultados obtenidos, en todos los casos se observan cambios en las mismas bandas características de los grupos funcionales de interés (Tabla 7), sugiriendo que los productos de degradación del Impranil® DLN son los mismos. Sin embargo, la disminución de las bandas no es la misma para todas las muestras. En el caso de T1.PL.1, los picos de 1270 cm^{-1} y 1540 cm^{-1} , relacionados con los grupos funcionales con N, y el pico de 1730 cm^{-1} , asociado al grupo C=O, dan una señal mucho menor comparándola con los espectros generados por la degradación de los otros hongos. Estos resultados sugieren que T1.PL.1 tiene la mayor capacidad para degradar Impranil® DLN, lo cual también se observa en la

prueba de degradación en líquido ya que éste presenta el mayor porcentaje de degradación.

Aunque los cambios en los espectros de degradación son similares, esto no implica que el mecanismo por el cual se esté degradando el PU sea el mismo. Sería recomendable realizar el análisis de FTIR de las ocho muestras a diferentes tiempos, para observar la progresión del cambio de las bandas con el fin de hacer un análisis comparativo. Esta información podría dar a conocer cómo es que cada hongo va actuando sobre el Impranil® DLN y ayudaría a entender el mecanismo de degradación.

Tabla 7. Actividades enzimáticas relacionadas con los cambios en las bandas entre los espectros de FTIR inoculados y el espectro del MM-PUi (control).

Banda	cm ⁻¹	Grupo funcional al que corresponde	Actividad enzimática relacionada
1	1730	C=O	esterasa, proteasa
3	1540	N-H y N-C	proteasa
6	1260	N-H y N-C	ureasa o proteasa
9	1170	C-O-C	oxidasa

6.5 Identificación de las actividades enzimáticas extracelulares

Con el objetivo de detectar algunas de las actividades enzimáticas extracelulares que pudieran estar participando en la degradación del PU en cada una de las cepas, se realizaron ensayos de crecimiento en medios diferenciales para las actividades enzimáticas ureasa, esterasa y proteasa.

6.5.1 Actividad esterasa

Para esta prueba se utilizó el medio Tween80® en el que se puede detectar la presencia de actividad esterasa por la precipitación de Ca^{2+} debido a la hidrólisis de los enlaces éster alrededor del crecimiento micelial (Figura 23). Todos los hongos con excepción de BP3.IC.2 resultaron ser positivos para esta prueba. Wales y Sagar (1988) propusieron un mecanismo para la degradación de PS-PU que involucraba esterasas extracelulares. En esta propuesta, la degradación de PU es el resultado del sinergismo de la actividad de una endoesterasa y una exoesterasa. La endoenzima hidroliza la molécula de PU en sitios aleatorios dentro de la molécula, debilitándola. Mientras que la exoenzima remueven unidades monoméricas de los extremos de la cadena la cual ya ha perdido fuerza por acción de las endoenzimas. Sin embargo, no se ha encontrado evidencia que respalde esta proposición.

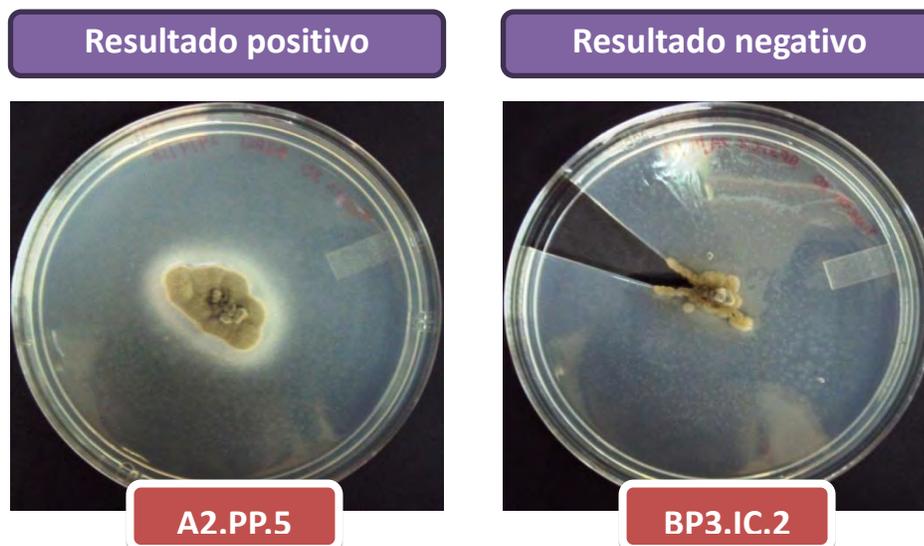


Figura 23. Prueba para la detección de esterasas extracelulares en medio Tween80®. Los ocho hongos con mayor capacidad de degradar Impranil se inocularon en el centro de la caja y se dejaron incubando por 5 días a 25°C. Actividad de esterasa se observa por la formación de un precipitado de Ca^{2+} alrededor del crecimiento (izquierda) mientras que un resultado negativo no se observa dicho precipitado (derecha).

6.5.2 Actividad proteasa

Para determinar si los hongos producían proteasas extracelulares se inocularon en MM con caseína. La caseína es una proteína que puede ser hidrolizada por proteasas. Para determinar si hay hidrólisis se tiñen las cajas con una solución de azul de Coomassie; dado que éste se fija a las proteínas, por lo que en un resultado positivo se observa la formación de un halo claro alrededor del crecimiento fúngico mientras que en uno negativo no se observa dicho halo (Figura 24).

Todos los hongos resultaron positivos para esta prueba por lo que se utilizó *Aspergillus niger* 334 como control negativo. Russel *et al.*, 2011 reportaron una proteasa extracelular, proveniente del hongo endofítico *Pestalotiopsis microspora*, capaz de degradar el PU Impranil® DLN. Para clasificarla se realizaron pruebas, en el medio libre de células, con inhibidores para actividades enzimáticas. Estas pruebas mostraron que la actividad poliuretanolítica se veía inhibida por floruro de fenilmetilsulfonilo el cual es específico para serina- hidrolasas.

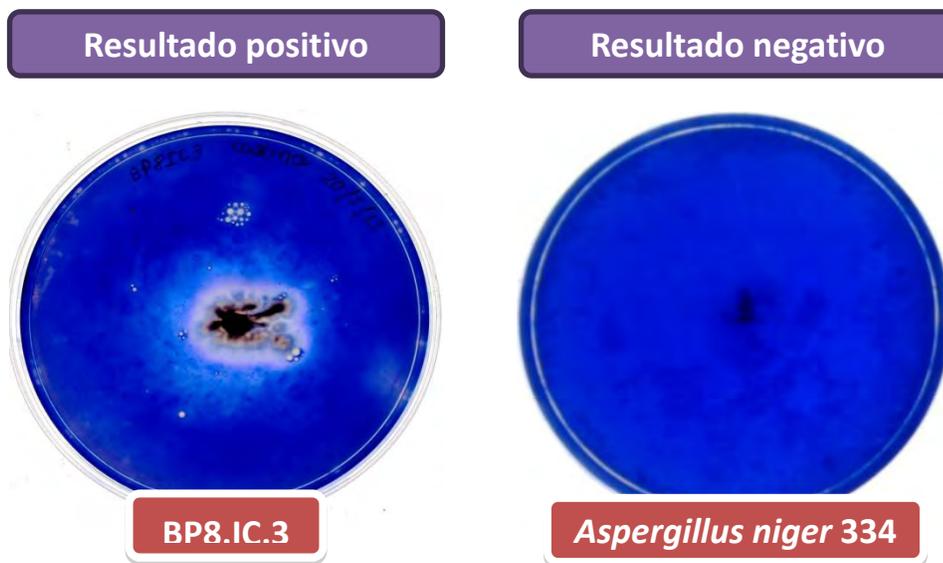


Figura 24. Prueba para la detección de proteasas extracelulares en MM con caseína. Los ocho hongos con mayor capacidad de degradar Impranil se inocularon en el centro de la caja y se dejaron incubando por 5 días a 25°C. Se tiñeron con solución de azul de Coomassie dado que este colorante se fija a las proteínas, en este caso la caseína. La actividad de proteasas se identifica por la formación de un halo alrededor del crecimiento donde hubo proteólisis (izquierda). En un control negativo no se observa dicho halo (derecha).

7.5.3 Actividad ureasa

Para la detección de la actividad ureasa se utilizó el medio Urea de Christensen que contiene urea y rojo de fenol. El rojo de fenol actúa como indicador de hidrólisis de la urea donde se observa un cambio de amarillo a rojo (Figura 25). Todas las cepas con excepción de A2.PL.1 fueron ureasa positivas.

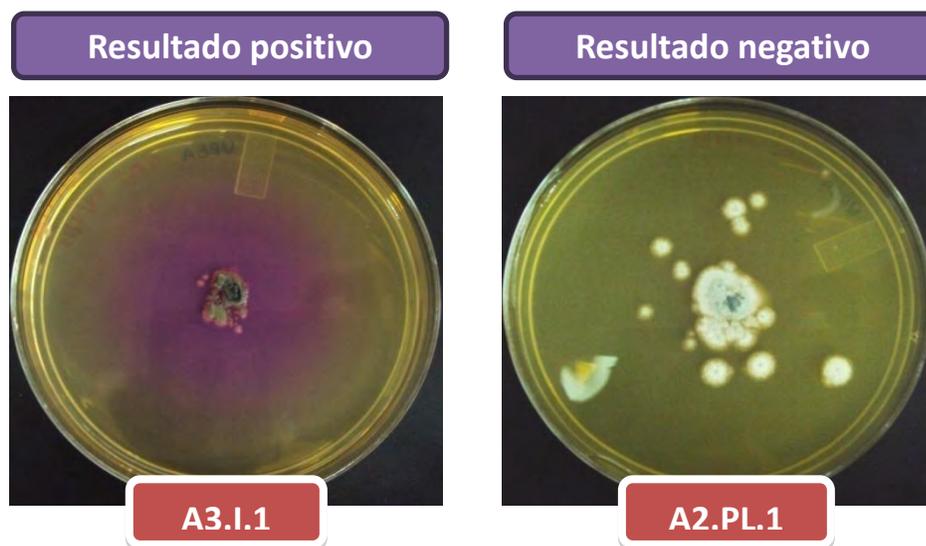


Figura 25. Prueba para la detección de ureasas extracelulares en medio Urea de Christensen. Los ocho hongos con mayor capacidad de degradar Impranil se inocularon en el centro de la caja y se dejaron incubando por 5 días a 25°C. Se observa producción de ureasas por el cambio de color del medio debido a que contiene rojo de fenol (izquierda) mientras que en un resultado negativo no se observa dicho cambio (derecha).

La mayoría de las cepas presentaron las tres actividades enzimáticas estudiadas, con excepción de BP3.IC.2 que resultó ser esterasa negativa y A2.PL.1 que es ureasa negativa (Tabla 8). Sin embargo, dado que no hubo diferencias notables entre los patrones de degradación del PU analizados por IR, entre los diferentes hongos, es posible que esas actividades ausentes en esas cepas, no fueran esenciales para la degradación del PU. Quizá los distintos grupos funcionales presentes en el PU pueden ser atacados por diferentes actividades enzimáticas, resultando en los mismos patrones de espectroscopía de IR. Es decir pudiera ser que se generen los mismos productos de degradación, pero a través de vías catabólicas distintas.

Ibrahim *et al.* (2009) reportaron una cepa de *Alternaria solani* que mostró actividad proteasa, esterasa y ureasa cuando se probó en medios selectivos, sin embargo, cuando fue cultivada únicamente en PU sólo se detectó la presencia de proteasas. Por lo tanto es necesario hacer pruebas diferenciales en MM-PU para determinar si estas enzimas están involucradas con la degradación del polímero.

Tabla 8. Resultado de las pruebas con medios diferenciales de cada uno de los hongos inoculados.

Hongo	Esterasa	Ureasa	Proteasa
A2.H.4	+	+	+
A2.PL.1	+	-	+
A2.PP.5	+	+	+
A3.I.1	+	+	+
BP3.IC.2	-	+	+
BP3.IC.7	+	+	+
BP3.IC.8	+	+	+
T1.PL.1	+	+	+

6.6 Prueba de degradación de espuma de PU

Con el objetivo de determinar si los hongos con el mayor porcentaje de degradación de Impranil® DLN podrían ser capaces de degradar residuos de PU sólidos, se realizó una prueba con dos diferentes tipos de espumas de PU (espuma A y espuma B). Estas espumas fueron cortadas en pequeños cuadros, pre-pesadas, inoculadas con los ocho hongos en medio PDB al 50%, colocadas en cajas Petri, incubadas por 21 días, lavadas y vueltas a pesar para determinar por pérdida de peso si había existido degradación, comparándolas con un control incubado en las mismas condiciones pero sin inocular. Fue necesario agregar PDB para bioestimular el crecimiento de los hongos y que éstos fueran capaces de producir las enzimas que degraden el polímero, de acuerdo a lo reportado por Cosgrove *et al.* (2010). Durante el experimento fue necesario refrescar el medio, cambiándolo cada cinco días, para evitar la saturación del sistema. Se observó crecimiento de los distintos hongos sobre los trozos de espuma de PU con el pasar del tiempo (Figura 26). El hongo visiblemente se introduce en la espuma y crece tanto dentro como fuera de la misma.

Como se muestra en las Figuras 27 y 28, existe una pérdida de peso considerable de las espumas inoculadas con los hongos en comparación con el control que fue sometido al mismo tratamiento. También se aprecia un cambio en la morfología de la esponja. No todos los hongos tuvieron la capacidad de reducir considerablemente el tamaño y el peso de las esponjas. En el caso de A2.PL.1 la reducción de la espuma B es poco perceptible.

En general, las espumas B tuvieron una pérdida de peso mayor que las espumas A, esto se puede deber a las características tanto químicas como físicas de dichas espumas. La espuma A contiene un retardante de flama que incluye moléculas fosforadas y tiene una mayor densidad (16 Kg/m^3) que la espuma B (15.5 Kg/m^3) que es más porosa. Dicha porosidad se debe a la concentración de agua y CH_2Cl_2 que actúan como agente espumante. A mayor cantidad, más porosa será la espuma. Es necesario considerar esta información dado que pudiera estar relacionada con la capacidad del hongo para introducirse en la espuma y tener mayor contacto con la misma y degradarla mejor o quizá la presencia de los compuestos fosforados inhiben el desarrollo del hongo. Esto sería un aspecto a estudiar posteriormente.

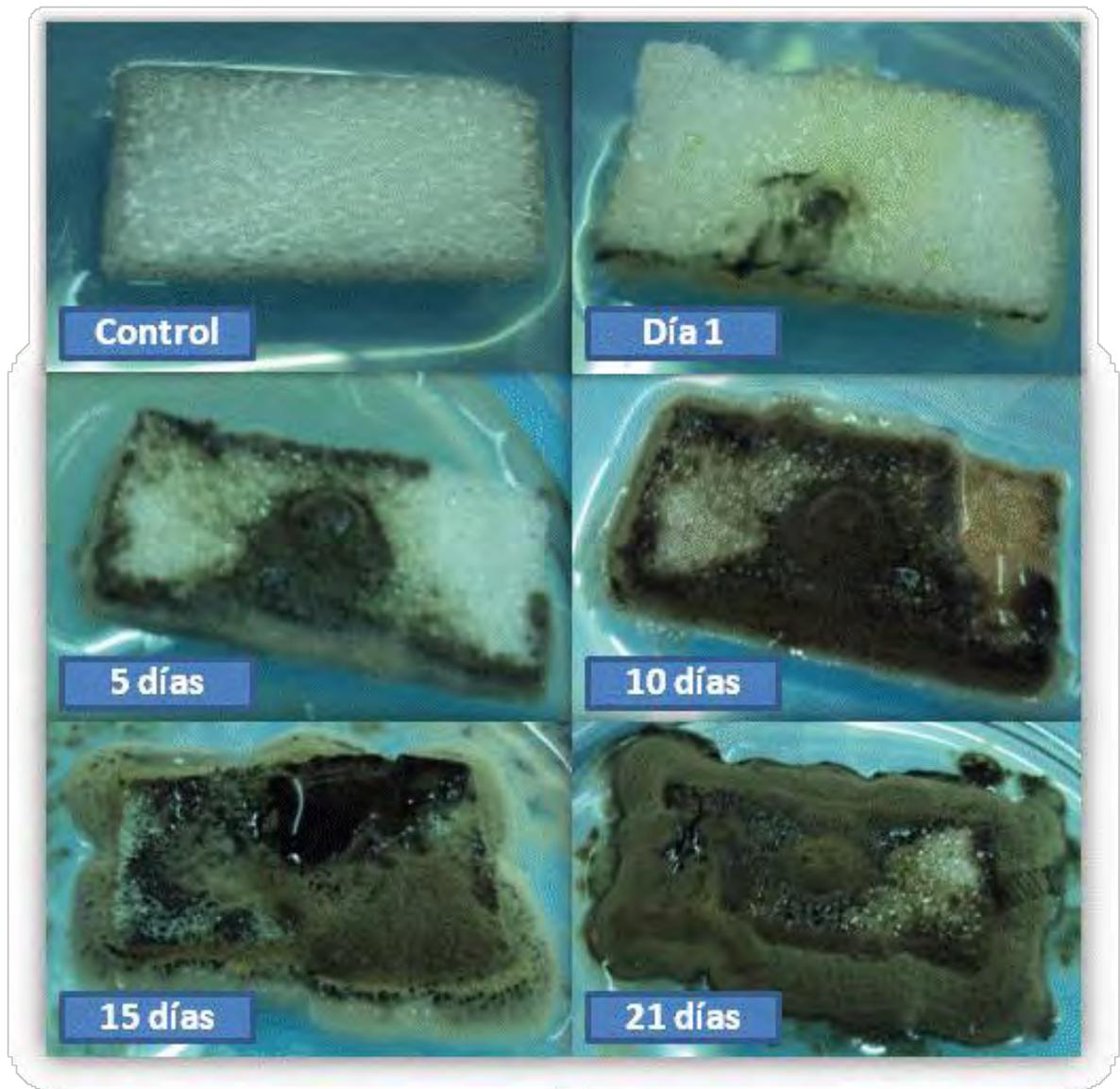


Figura 26. Progresión del crecimiento del hongo BP8.IC.3 en un trozo de espuma blanca de PU. Incubación durante 21 días en medio PDB diluido al 50% a TA comparándola con un control sin inocular, bajo las mismas condiciones.

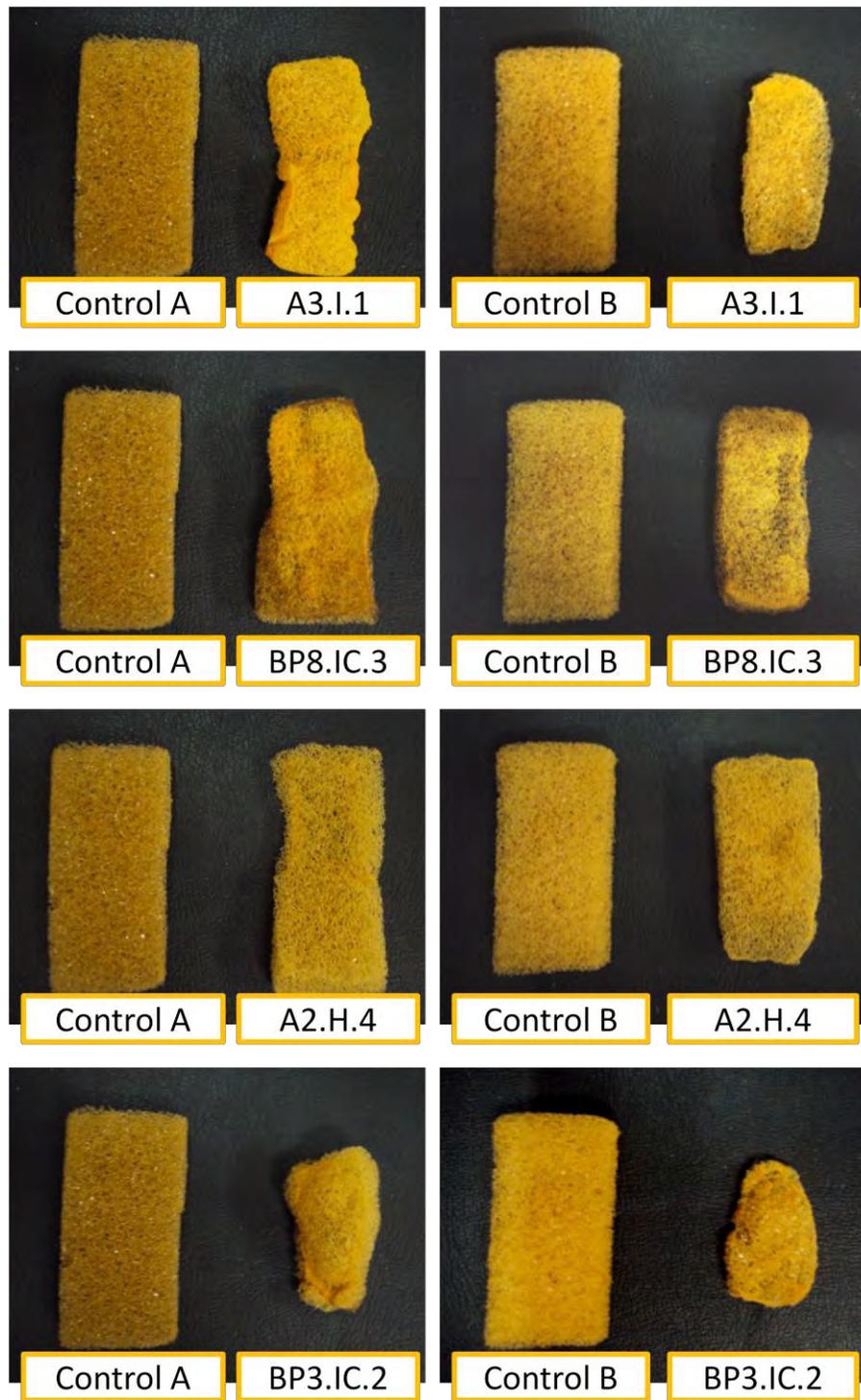


Figura 27. Degradación de espumas de PU inoculadas con los hongos con mayor capacidad de degradar Impranil® DLN. Incubación durante 21 días en medio PDB diluido al 50% a TA comparándolas con controles sin inocular, incubados bajo las mismas condiciones. Imágenes representativas de tres

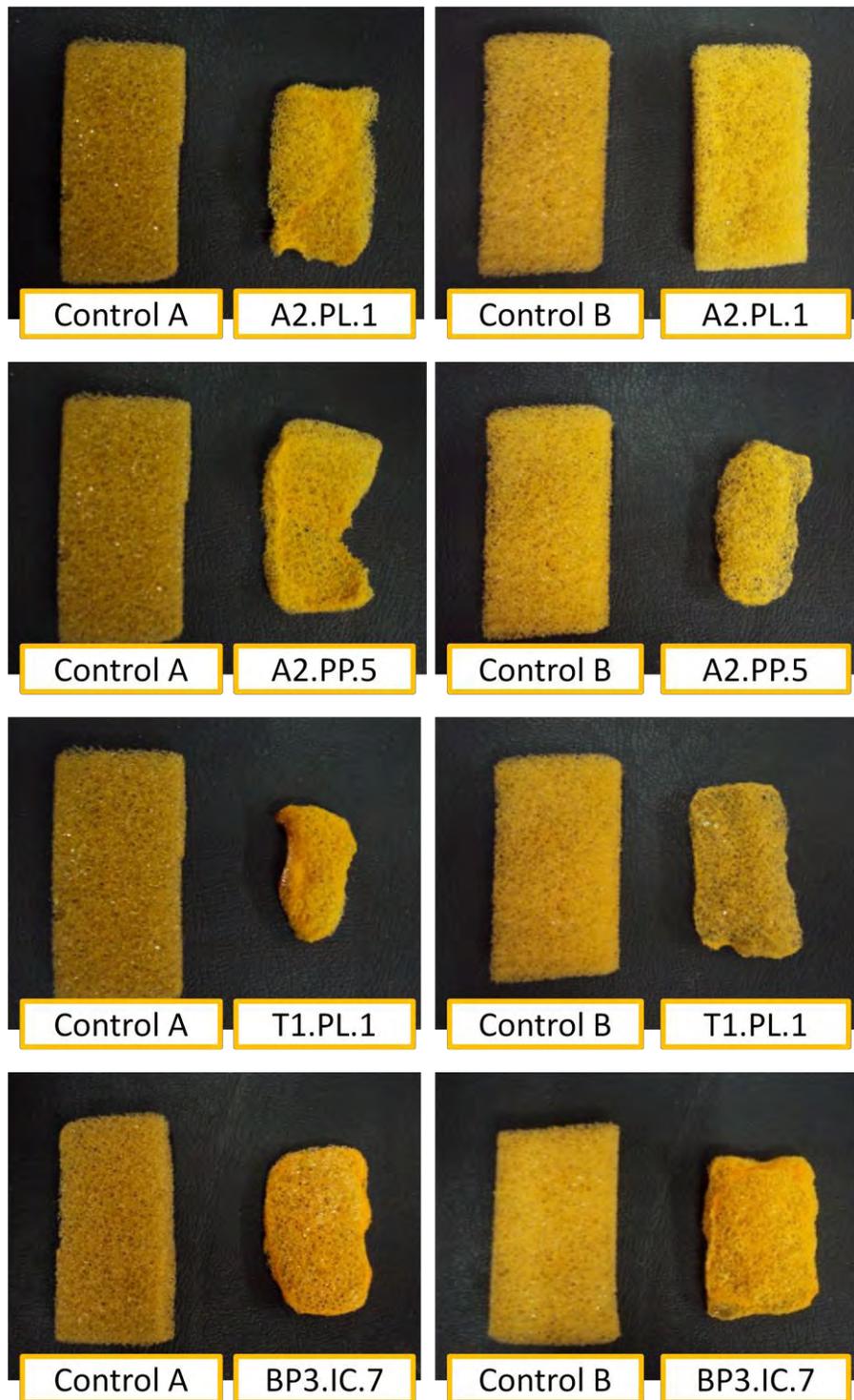


Figura 27 continuación. Degradación de espumas de PU inoculadas con los hongos con mayor capacidad de degradar Impranal[®] DLN. Incubación durante 21 días en medio PDB diluido al 50% a TA comparándolas con controles sin inocular, incubados bajo las mismas condiciones. Imágenes representativas de tres repeticiones.

Conociendo el peso inicial y final de las esponjas, después de ser lavadas con una solución de Cloralex® (que contiene hipoclorito de sodio) diluida al 30% y secadas a vacío a temperatura ambiente, se calculó el porcentaje de degradación de acuerdo a la pérdida de peso. El porcentaje de degradación fue mucho mayor para la espuma B, que alcanzó valores mayores al 60% mientras que la espuma A no llegó ni al 30% de degradación (Figura 29). Ya se ha reportado la degradación de espuma de PE-PU por una cepa de *Alternaria sp.*, sin embargo ésta no obtuvo un porcentaje de degradación mayor al 30% después 10 semanas de incubación (Matsumiya *et al.*, 2010).

El hongo con la mayor capacidad de degradar las esponjas (tanto la A como la B) fue A2.PP.5 que tuvo un porcentaje de degradación en Impranil® DLN de 86%, siendo el segundo hongo con el valor más alto de degradación en la prueba líquida. La cepa con el mayor porcentaje de degradación de Impranil® DLN fue T1.PL.1, con un valor de 87%, y alcanzó valores de degradación para la espuma B de 44.9% y para la A de 6.0%. Debido a que los valores de porcentaje de degradación en los distintos materiales no son similares, se sugiere que el mecanismo por el cual se lleva a cabo la degradación de las espumas, que son PE-PU, es diferente al mecanismo de degradación del Impranil® DLN, que es un PS-PU. Se ha reportado que los PS-PU son más susceptibles al ataque por hongos que los PE-PU (Darby y Kaplan, 1968).

A pesar de que A2.PL.1 tuvo un alto porcentaje de degradación en Impranil® DLN (alrededor del 74%), no alcanzó un porcentaje de degradación considerable en las espumas. Este hongo resultó negativo para la prueba de ureasas extracelulares y posiblemente debido a la falta de producción de estas enzimas no se observan cambios significativos en las esponjas al ser inoculadas con este hongo. Esto sugiere que las ureasas podrían estar implicadas en la degradación del PE-PU.

Cabe mencionar que no sólo las actividades enzimáticas analizadas en este trabajo son las únicas que pudieran estar relacionadas con la degradación del PU, otras enzimas como las lipasas que tiene la capacidad de romper enlaces éster y enzimas oxidativas como la lignina peroxidasa y manganeso peroxidasa que rompen enlaces éter, también podrían estar involucradas en el mecanismo degradativo. Por lo tanto, es conveniente hacer un estudio posterior para identificar otras posibles enzimas involucradas en la ruptura de los enlaces del PU. Esto último con la finalidad de dilucidar un probable mecanismo de degradación.

Hay que considerar que la variación en los patrones de degradación de diferentes muestras de PUs puede ser atribuido a las diferentes propiedades de

los mismos PUs, como son: su orientación molecular, cristalinidad, tipos de enlaces intermoleculares y grupos funcionales presentes en las cadenas aledañas, que determinan la accesibilidad de las enzimas que lo degradan (Pathirana y Seal, 1983).

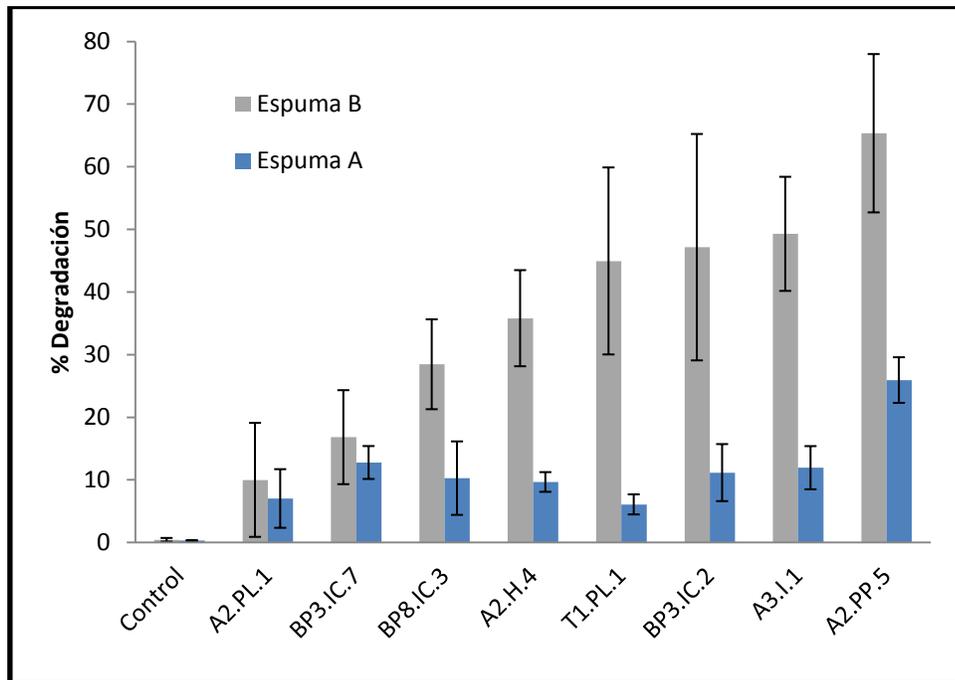


Figura 29. Porcentaje de degradación por pérdida de peso de dos tipos de espuma de PU al ser incubadas con los hongos que presentaron una degradación superior al 70% en MM-PUi. Las espumas fueron pre-pesadas e inoculadas con las diferentes cepas, se incubaron en cajas Petri con PDB al 50% durante 21 días a TA. (n=3).

6.7. Identificación de las cepas

Para la identificación taxonómica de los ocho hongos con mayor capacidad de degradación de Impranil se analizó su morfología macroscópica y microscópica de acuerdo a la clasificación de Saccardo (Tabla 9) (Barnett y Hunter, 1998). Con esta información fue posible identificar solo géneros, en un trabajo posterior será importante realizar la identificación de las especies. Para ello se realizarán reacciones de PCR empleando los primers ITS1 e ITS4 con lo que se amplificarán las regiones internas no transcritas ITS1 e ITS2 (Internal transcribed sequences),

ubicadas entre los genes ribosomales, las cuales son altamente variables y permiten la identificación de especies incluso altamente emparentadas.

Para la caracterización macroscópica se inoculó cada uno de los hongos en el centro de una caja con PDA y se incubó por 5 días a 25°C. Mientras que para la caracterización microscópica se realizó una impronta de cada cepa y se observó en el microscopio a 40X. Los hongos fueron identificados de acuerdo a las siguientes características:

BP3.IC.7 - *Penicillium sp.* (Figura 30)

Análisis macroscópico: colonia polvosa, seca, limitada, plegada, color verde, sin pigmento al reverso

Análisis microscópico: se observa micelio microsifonado, septado, hialino; de dónde nacen conidióforos que tienen métulas y esterigmas con microconidios en cadenas enteroblásticas (fiálides).

A2.PL.1 – *Aspergillus sp.* (Figura 30)

Análisis macroscópico: colonia de tamaño ilimitado, polvosa, seca, plana, color verde opaco. Al reverso presenta pigmento amarillo con un halo micelial blanco.

Análisis microscópico: se observan cabezas aspergilaes compuestas por vesículas, esterigmas de donde nacen microconidios.

A2.H.4, A2.PP.5, A3.I.1, T1.PL.1 y BP3.IC.9 – *Cladosporium sp.* (Figura 30 y 31) En este caso aunque los hongos se identificaron como del mismo género podrían ser especies diferentes de acuerdo a los resultados de las pruebas de degradación.

Análisis macroscópico: color verde oscuro, la colonia es plana, seca, aterciopelada con surcos. El reverso se observa color café oscuro.

Análisis microscópico: micelio microsifonado, septado, oscuro, de dónde nacen blastoconidios en forma de hormodendrum.

BP8.IC.3 – *Trichoderma sp.* (Figura 31)

Análisis macroscópico: la colonia es verde opaco sin bordes definidos, genera un halo blanquecino alrededor del crecimiento. Al reverso no se observa pigmento. Es plana y vellosa.

Análisis microscópico: micelio microsifonado, hialino y septado de dónde nacen conidióforos de los que emergen conidias hialinas uniceluladas.

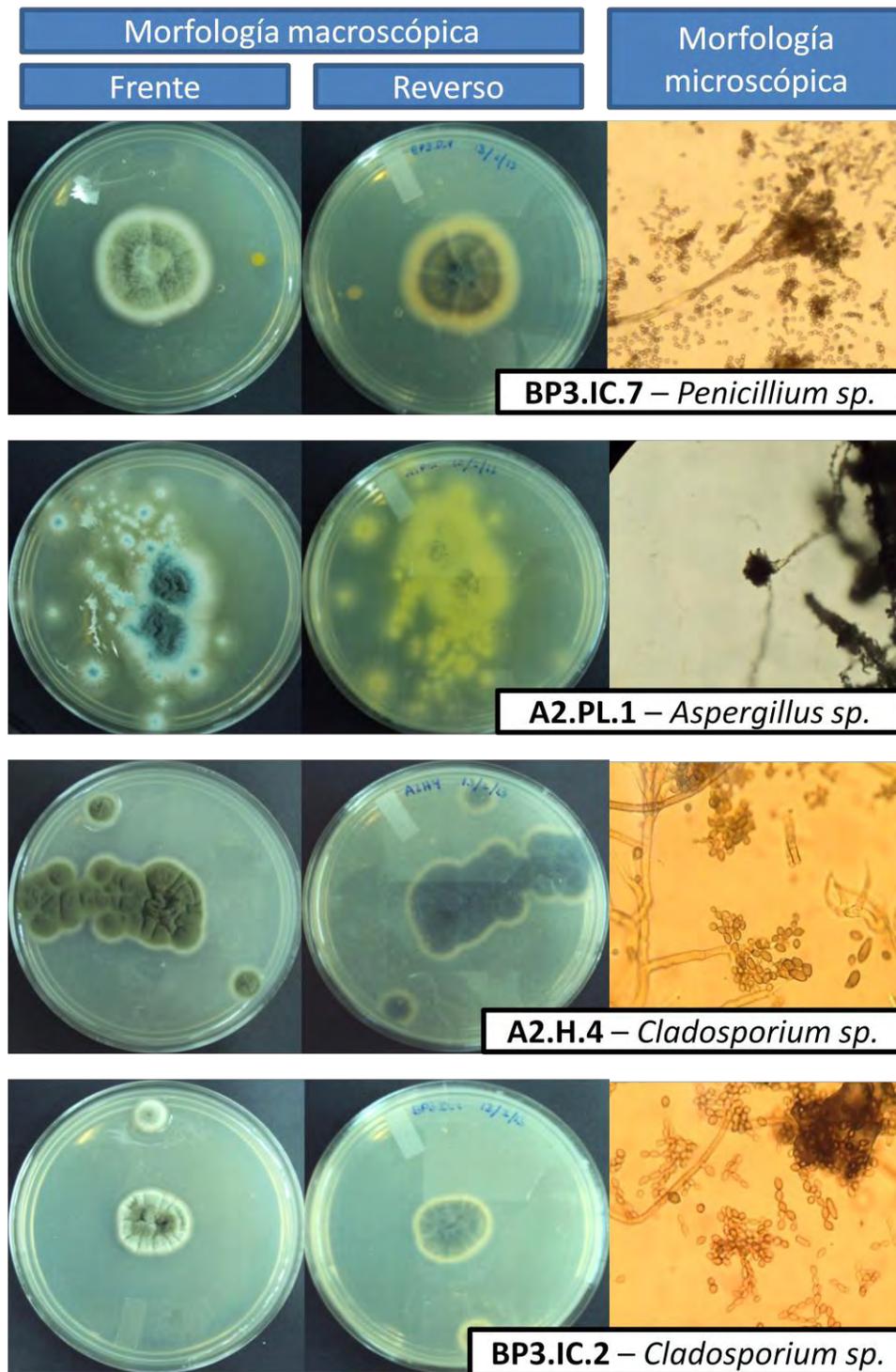


Figura 30. Identificación de las cepas con mayor capacidad para degradar PU de acuerdo a su morfología macroscópica y microscópica. Para la observación de la morfología macroscópica las cepas fueron inoculadas en PDA e incubadas 5 días a TA, para la observación microscópica se realizó una impronta y se observó en el microscopio a 40X.

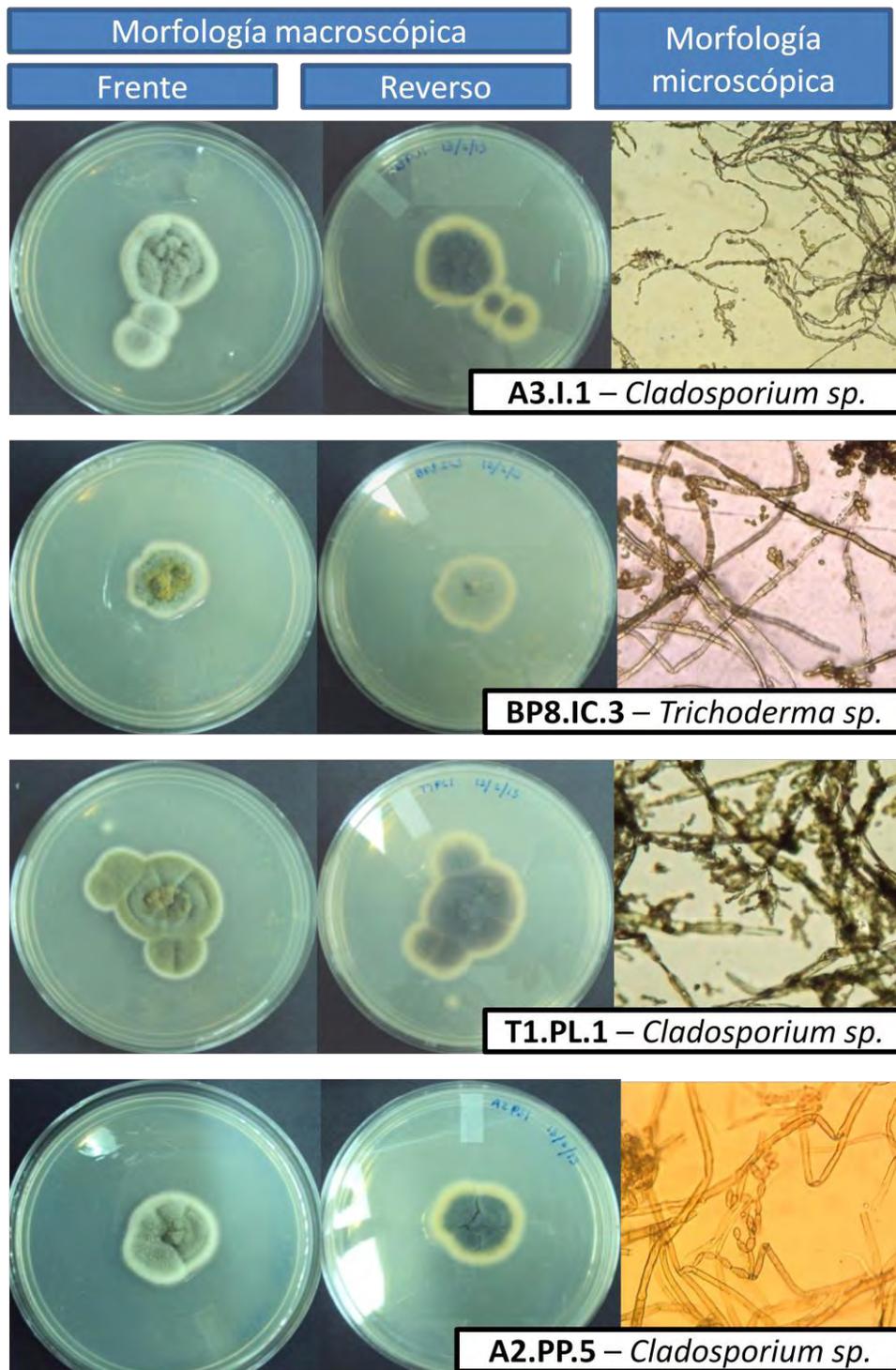


Figura 31. Identificación de las cepas con mayor capacidad para degradar PU de acuerdo a su morfología macroscópica y microscópica (continuación). Para la observación de la morfología macroscópica las cepas fueron inoculadas en PDA e incubadas 5 días a TA, para la observación microscópica se realizó una impronta y se observó en el microscopio a 40X.

Tabla 9. Identificación de los ocho mejores hongos degradadores de Impranil® DLN.

Clave	Especie
A2.PP.5	<i>Cladosporium sp.</i>
A3.I.1	<i>Cladosporium sp.</i>
BP3.IC.2	<i>Cladosporium sp.</i>
T1.PL.1	<i>Cladosporium sp.</i>
A2.H.4	<i>Cladosporium sp.</i>
BP8.IC.3	<i>Trichoderma sp.</i>
BP3.IC.7	<i>Penicillium sp.</i>
A2.PL.1	<i>Aspergillus sp.</i>

7. Conclusiones

- Se lograron aislar un número importante de hongos de diferentes muestras medio ambientales que mostraron la capacidad de crecer en un medio mínimo de sales con diferentes tipos de PU (Impranil® DLN y Polylack®) y un poliéster polioliol (Rymsapol® 200/107 L-83) como única fuente de carbono.
- De 31 cepas que formaron halo de degradación en medio mínimo con Impranil® DLN (MM-PUi) se eligieron 15 cepas para medirles la capacidad de degradar Impranil® DLN en medio líquido, empleando turbidimetría. De éstas, ocho cepas presentaron valores de degradación superiores al 70%.
- Haciendo análisis de FTIR de MM-PUi inoculado con los ocho hongos y comparándolo con controles sin inocular, se observó disminución en los picos del espectro asociados a los grupos carbonilo, amida y éter. Estos grupos están presentes en la estructura del PU por lo que la disminución de estas bandas implica ruptura de los enlaces y por lo tanto, degradación del Impranil® DLN.
- Haciendo uso de medios diferenciales para proteasa, esterasa y ureasa se analizaron los ocho hongos con la mayor capacidad de degradar el PUi y se observó que dichas actividades enzimáticas estaban presentes en la mayoría de los hongos.
- Se utilizaron los ocho hongos con el mayor porcentaje de degradación en MM-PUi para determinar si éstos podían degradar espumas de PU. Los hongos redujeron el peso y tamaño de las espumas en 21 días de tratamiento. Se obtuvieron porcentaje de degradación en algunos casos mayores al 50%.
- Se identificaron las ocho cepas con mayor capacidad de degradar PU. Los géneros identificados fueron *Aspergillus sp.*, *Trichoderma sp.*, *Penicillium sp.* y *Cladosporium sp.*

8. Perspectivas

- Realizar ensayos espectroscópicos para determinar la estructura molecular de los PUs utilizados como: espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear, cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) y cromatografía de gases.
- Probar los hongos con mayor actividad degradativa en otros tipos de PU.
- Identificar las enzimas responsables de la ruptura de los enlaces en la estructura del PU.
- Purificar la o las proteínas relacionadas con la degradación del PU y probar su actividad sobre un medio con PU.
- Identificar los genes que codifican a las proteínas que son capaces de romper los enlaces del PU.
- Sintetizar proteína recombinante en un sistema heterólogo como *Saccharomyces cerevisiae*.
- Determinar las condiciones de concentración en la fuente de nutrientes, pH y temperatura que optimicen el proceso de biodegradación de las espumas de PU.
- Probar diferentes sustratos (fuentes de carbono y nitrógeno) así como diferentes concentraciones de los mismos con el objetivo de tener un mejor rendimiento en cuanto a la degradación de las espumas de PU.
- Identificar las cepas de los hongos con mayor actividad haciendo uso de PCR.
- Probar grupos de consorcios de hongos sobre el PU con el objetivo de comparar la capacidad degradativa de estos con las cepas puras.

9. Anexo

9.1 Medio papa dextrosa agar (PDA)

Para 1 Litro

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

1. Lavar y rallar los 250 g de papa.
2. Hervir la papa en un litro de agua destilada por 20 minutos.
3. Filtrar por 5 capas de gasa.
4. Reponer el agua perdida para obtener 1 L, dividir en alícuotas de 250 mL.
5. Agregar 5 g de agar y 5 g de dextrosa por cada 250 mL, después de haber aforado.
6. Esterilizar por autoclave a 121 °C/15 minutos.

Nota: para preparar cajas de PDA el medio se debe verter en las cajas Petri cuando aún este tibio, evitando la presencia de grumos, se deja solidificar y se invierten. Todo debe hacerse en zona aséptica.

9.2 Medio papa dextrosa broth (PDB)

Para 1 Litro

Papa de cáscara blanca	250 g
Dextrosa	20 g

1. Lavar y rallar los 250 g de papa.
2. Hervir la papa en un litro de agua destilada por 20 minutos.
3. Filtrar por 5 capas de gasa y centrifugar a 8,000 rpm 10 minutos. Utilizar el sobrenadante (tirar el pellet).
4. Reponer el agua perdida para obtener 1 L, dividir en alícuotas de 250 mL.
5. Agregar 5 g de dextrosa por cada 250 mL, después de haber aforado.
6. Esterilizar por autoclave a 121 °C/15 minutos.

9.3 Medio mínimo mineral (MM)

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

Poner la receta también en concentración final, ya sea enfrente de cada compuesto o antes todo.

Solución A (10 X) para 1 L

NaH ₂ PO ₄	26.18 g
K ₂ HPO ₄	61.80 g

Solución B (100 X) para 1 L

(NH ₄) ₂ SO ₄	103.30 g
MgSO ₄	3.01 g

Solución C (1000 X) para 1 L

FeCl ₃ •6H ₂ O	39.70 g
ZnCl ₂ •4H ₂ O	2.92 g
CoCl ₂ •6H ₂ O	3.86 g
Na ₂ MoO ₄ •2H ₂ O	2.47 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	1.47 g
CuCl ₂	1.48 g
MnCl ₂	1.51 g

Ácido (10 X) para 1L

HCl	18 mL
-----	-------

1. Preparar las soluciones A y B, esterilizar en autoclave 121°C/15 min.
2. Preparar la solución C (elementos traza) disolviendo cada uno de los elementos en 50 mL de agua destilada y esterilizar por autoclave a 121°C/ 15 min, una vez estériles juntar todos los elementos traza y aforar a 1 L con agua destilada estéril.

3. Para realizar el medio, agregar la cantidad correspondiente de soluciones A, B y C. Agregar el agua desionizada (estéril) y agregar la fuente de carbono correspondiente.
4. Agregar el HCl y ajustar el pH a 6.

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

Agua Agar

Agar	20.3 g/L
Agua	1 L

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

Medio mínimo con Impranil® DLN al 0.5% (MM-PUi)

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

Medio mínimo con Polylack® al 0.3% (MM-PUpl)

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

Medio mínimo con Hydroform® al 0.3% (MM-PUh)

El Hydroform® es un barniz comercial hidrosoluble tiene una concentración de sólidos del 30%, por lo que se debe diluir 1:100 para ajustar la concentración final del medio a 0.3%.

1. Realizar una disolución 1:10 de Hydroform® en agua desionizada, con lo cual se tiene una solución 10X de Hydroform® al 3%.
2. Filtrar la solución 10X utilizando un filtro Whatman™ GF/C con una membrana de poro de 0.45 µm estéril.
3. Esta solución estéril se adiciona al medio mínimo después de agregar las soluciones A, B y C.

Medio mínimo con poliéster polioliol al 0.3% (MM-PP)

El poliéster polioliol de la marca Rymsapol® 200/107 L-83 es de consistencia viscosa. Para preparar el medio con este polioliol como fuente de carbono es necesario primero, realizar la mezcla de las soluciones A, B y el ácido en un matraz (no añadir la solución C). Posteriormente agregar lo necesario de polioliol poliéster para obtener una concentración de 0.3%. Esterilizar por autoclave 121°C/15 min. y una vez que ya este frío agregar la solución C.

Nota: para hacer el medio sólido se debe agregar a la mezcla, antes de esterilizar por autoclave, 16 g/L de agar.

9.4 Medio mínimo con caseína 0.4%

Para 1 Litro

Caseína	4 g
Agar	16 g

La caseína es una fosfoproteína proveniente de la leche de consistencia polvosa y de color crema. Se debe preparar una solución al 4% de caseína para obtener una solución al 10X.

1. Pesar 4 g de caseína y disolverlos en 100 mL de una solución de hidróxido de sodio (6.3 µM) a pH 8.8, agitar a temperatura ambiente.
2. Esterilizar por filtración haciendo uso de una membrana de 0.45 µm de poro.

Para un litro de medio sólido:

1. Preparar la mezcla de MM en un matraz: 100 mL de solución A, 10 mL de solución B y 1 mL de solución C, ya estériles.

2. Agregar 100 mL de la solución de caseína y ajustar el pH a 6 con la solución de ácido clorhídrico.
3. Pesar el agar, agregarlo en 100 mL de agua destilada y esterilizar por autoclave 121°C/15 min.
4. Una vez que la solución con agar esté tibia, agregarlo a la mezcla de soluciones con caseína.
5. Aforar a 1 L con agua destilada estéril.
6. Vaciar en cajas Petri y dejar enfriar en zona aséptica.

Se siembran las cajas con el mo de interés y transcurrido el tiempo de incubación se tiñen con solución de Coomassie por 20 minutos y se realiza un lavado por 20 minutos con solución desteñidora. Si hay hidrólisis de la caseína por la presencia de proteasas, se observa un halo claro alrededor de las colonias.

9.4.1 Colorante de Coomassie (100 mL)

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

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

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

9.4.2 Solución desteñidora para 250 mL

20% Metanol: 7.5% ácido acético

Ácido acético glacial	18.75 mL
Metanol grado técnico	50 mL

1. Medir los reactivos y aforar a 250 mL.
2. Almacenar a temperatura ambiente.

9.5 Medio urea de Christensen

Para 1 Litro

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

1. Adicionar todos los componentes, excepto el agar, a 100 mL de agua desionizada.
2. Agitar hasta disolver y esterilizar por filtración a través de una membrana de 0.45 µm (solución A).
3. Adicionar el agar a 900 mL de agua desionizada y calentar a ebullición, agitando hasta disolver.
4. Esterilizar en autoclave a 121°C/15 min.
5. Enfriar y adicionar la solución A en forma aséptica.
6. Mezclar y distribuir en cajas.

9.6 Medio Tween80®

(Lelliot y Stead, 1987)

Para 1 Litro

Peptona	10 g
NaCl	5 g
CaCl ₂ •2H ₂ O	0.1 g
Agar	16 g
Tween 80	10 mL
Agua destilada	1 L

1. Disolver en 800 mL de agua destilada la peptona, el cloruro de calcio y el cloruro de sodio.
2. Ajustar el pH a 7.4.
3. Agregar el Tween 80.
4. Aforar a 1 L.
5. Agregar el agar.
6. Esterilizar por autoclave a 121°C por 15 minutos.
7. Vaciar en cajas Petri cuando la mezcla esté tibia y se vea translúcida la solución.

10. Bibliografía

- Alavi-Nikje MM, Bagheri-Garmarudi A, Idris BA. 2011. Polyurethane waste reduction and recycling: from bench to pilot scales. *Des Monom Polym.* 14:395-421.
- Akutsu-Shigeno Y, Adachi Y, Yamada C, Toyoshima K, Nomura N, Uchiyama H, Nakajima-Kambe T. 2006. Isolation of a bacterium that degrades urethane compounds and characterization of its urethane hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70:422-429.
- Barnett HL, Hunter BB. 1998. *Illustrated genera of imperfect fungi.* 4th ed. APS Press. St. Paul Minnesota. USA. 218p.
- Barratt SR, Ennos AR, Greenhalgh M, Robson GD, Handley PS. 2003. Fungi are the predominant micro-organism responsible for degradation of soil-buried polyester polyurethane over a range of soil water holding capacities. *App Microbiol.* 95:78-85.
- Boubendir A. 1993. Purification and biochemical evaluation of polyurethane degrading enzymes of fungal origin. *Diss Abstr Int.* 53:4632.
- Cangemi JM, Dos Santos A, Neto SC, Chierice GO. 2008. Biodegradation of polyurethane derived from castor oil. *Polímeros: Ciência e Tecnologia.* 18:201-6.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Robson GD, Handley PS. 2007. Fungal communities associated with degradation of polyester polyurethane in soil. *Appl Environ Microbiol.* 73:5817-5824.
- Cosgrove L, McGeechan PL, Handley PS, Robson GD. 2010. Effect of biostimulation and bioaugmentation on degradation of polyurethane buried in soil. *Appl Environ Microbiol.* 76:810-819.
- Crabbe JR, Campbell JR, Thompson L, Walz SL, Schultz WW. 1994. Biodegradation of a colloidal ester-based polyurethane by soil fungi. *Int Biodeterior Biodegrad.* 33:103-113.
- Cregut M, Bedas M, Assaf A, Durand-Thouand M-J, Thouand G. 2013. Applying Raman spectroscopy to the assessment of biodegradation of industrial wastes. *Environ Sci Pollut Res.* DOI 10.1007/s11356-013-1772-0.

- Darby RT, Kaplan AM. 1968. Fungal susceptibility of polyurethanes. *Appl Microbiol.* 16:900-905.
- Gautman R, Bassi AS, Yanful EK, Cullen E. 2007. Biodegradation of automotive waste polyester polyurethane foam using *Pseudomonas chlororaphis* ATCC55729. *Int Biodeter Biodegrad.* 60:245-249.
- Filip Z. 1979. Polyurethane as the sole nutrient source for *Aspergillus niger* and *Cladosporium herbarum*. *European J Appl Microbiol Biotechnol.* 15:20-24.
- Gautman R, Bassi A, Yanful E. 2007. A review of biodegradation of synthetic plastics and foams. *Appl Biochem Biotech.* 141:85-105.
- Gregori B, Alba L, Brown A, Fernández M, Moura B, Hoz Y. 2007. Los poliuretanos biodegradables. Estudio bibliográfico de su síntesis y aplicaciones. <http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?jCve=223114970002>.
- Hincapié-Llanos GA, Ramírez-Cardona ME. 2009. Evaluación de la biodegradación aerobia de poliuretano residual generado en la industria de fabricación de refrigeradores. *Rev Invest Aplicad.* 5:15-25.
- Howard GT. 2002. Biodegradation of polyurethane: a review. *Int Biodeter Biodegrad.* 49:245-252.
- Ibrahim IN, Maraqa A, Hameed KM, Saadoun IM, Maswadesh HM. 2011. Assessment of potential plastic-degrading fungi in Jordanian habitats. *Turk J Biol.* 35:551-557.
- Kaplan AM, Darby RT, Greenberger M, Rodgers MR. 1968. Microbial deterioration of polyurethane systems. *Dev Ind Microbiol.* 82:362-371.
- Loredo-Treviño A, Gutiérrez-Sánchez G, Rodríguez-Herrera R, Aguilar CN. 2012. Microbial enzymes involved in polyurethane biodegradation: a review. *J Polymer Environ.* 20:258-65.
- Mathur G, Prasad R. 2012. Degradation of polyurethane by *Aspergillus flavus*. *Appl Biochem Biotechnol.* 167:1595-1602.
- Matsumiya Y, Murata N, Tanabe E, Kubota K, Kubo M. 2010. Isolation and characterization of an ether-type polyurethane-degrading micro-organism and analysis of degradation mechanism by *Alternaria sp.* *Appl Microbiol.* 108:1946-1953.

- McCarthy SJ, Meis GF, Mitchell N, Gunatillake PA, Heath G, Brandwood A, Schindhelm K. 1997. In-vivo degradation of polyurethanes: transmission-FTIR microscopic characterization of polyurethanes sectioned by cryomicrotomy. *Biomater*. 18:1387-1409.
- Nakajima-Kambe T, Shigeno-Akutsu Y, Nomura N, Onuma F, Nakahara T. 1999. Microbial degradation of polyurethanes, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 51:134-140.
- Oceguera-Cervantes A. 2005. Aislamiento de bacterias capaces de crecer en un medio con poliuretano (Hydroform) como única fuente de carbono y caracterización de las actividades enzimáticas relacionadas con su degradación. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.
- Ossefort ZT, Testroet FB. 1966. Hydrolytic stability of urethane elastomers. *Rubber Chem Technol*. 39:1308-1327.
- Ottow C, Glathe H. 1968. Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl Environ Microbiol*. 16:170-171.
- Owen S, Otani T, Masaoka S, Ohe T. 1996. The biodegradation of low-molecular-weight urethane compounds by a strain of *Exophiala jeanselmei*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 60:244-248.
- Pathirana RA, Seal KJ. 1983. *Gliocadium roseum* (Bainier), a potential biodeteriogen of polyester polyurethane elastomers. *Biodeterioration*. 5:679-689.
- Rahman M, Brazel CS. 2004. The plasticizer market: an assessment of traditional plasticizers and research trends to meet new challenges. *Prog Polym Sci*. 29:1223-48.
- Ren X. 2003. Biodegradable plastics: a solution or a challenge? *J Clean Prod*. 11:27-40.
- Ruiz C, Main T, Hilliard N, Howard GT. 1999. Purification and characterization of two polyurethane enzymes from *Pseudomonas chlororaphis*. *Biodeter Biodegrad*. 43:43-47.
- Russel JR, Huang J, Anand P, Kucera K, Sandoval AG, Dantzler KW. 2011. Biodegradation of polyester polyurethane by endophytic fungi. *Appl Environ Microbiol*. 77:6076-84.

- Seo JS, Keum YS, Li QX. 2009. Bacterial degradation of aromatic compounds. *Int J Environ Res.* 6:278-279.
- Shah AA, Hasan F, Hameed A, Ahmed S. 2008. Biological degradation of plastics: a comprehensive review. *Biotech Advances.* 26:246-265.
- Shibasaki S, Kawabata A, Tanino T, Kondo A, Ueda M, Tanaka M. 2009. Evaluation of the biodegradation of polyurethane and its derivatives by using lipase-displaying arming yeast. *Biocontrol Sci.* 14:171-175.
- TecnaPol S. A. de C. V. 2008.
<http://www.tecnapol.com/content/view/42/41/lang.es/>
- Urbanski J, Czerwinski W, Janicka K, Majewska F, Zowall H. 1977. Handbook of analysis of synthetic polymers and plastics. Ellis Horwood Limited, Chichester.
- Wales DS, Sagar BR. 1988. Mechanistic aspects of polyurethane biodeterioration. *In: Houghton DR, Smith RN, Eggins HOW. Biodeterioration, 7th ed.* Elsevier Applied Science, London, pp 351-358.
- Zavenhoven R. 2004. Treatment and disposal of polyurethane wastes: options for recovery and recycling. Energy Engineering and Environmental Protection Publications. Helsinki University of Technology Department of Mechanical Engineering. Pp 6-36.