

ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE PET POR CONSORCIOS FÚNGICOS

Gutiérrez Vicencio José Pablo (1), Flores Villavicencio Lérica Liss (2),
Villagómez Castro Julio César (2)

¹[Lic. Biología Experimental, Universidad de Guanajuato] | [jp.gutierrezvicencio@ugto.mx]

²[Departamento de Biología, DCNE campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | [leri_00@hotmail.com, castroj2407@hotmail.com]

Resumen

El consumo excesivo de los recursos naturales ha aumentado durante los últimos años, las nuevas tecnologías comienzan a brindarnos comodidad con todo lo que podemos llamar "desechable" y con ello viene un punto crítico, la contaminación y la manera de resolverla. En el presente trabajo se evaluaron 3 cepas que se sospecha tienen la capacidad de degradar PET como una posible alternativa para biorremediación de zonas con alta cantidad de este. Estas cepas fueron aisladas de un consorcio de microorganismos que creció sobre PET pulverizado como fuente de carbono. Se sometieron las tres cepas a diferentes condiciones de cultivo tratando de inducir la producción de enzimas que le permitiesen utilizar el PET. Los hongos se crecieron en medio mínimo de Mathur adicionado de 0.1 % de glucosa y en presencia de PET libre o PET colocado en una bolsa de celofán y, como control, el cultivo en presencia de la bolsa de celofán vacía. Las tres especies ensayadas presentaron crecimiento escaso, sugiriendo una capacidad muy pobre para utilizar el PET como fuente de carbono, sin embargo, presentan una posible actividad celulolítica ya que crecieron bien en presencia de la bolsa vacía de celofán.

Abstract

Excessive consumption of natural resources has increased during the last few years, new technologies begin to offer us comfort with everything we can call "disposable" and with it comes a critical point, pollution and how to solve it. In the present work, 3 strains suspected of having the ability to degrade PET as a possible alternative for bioremediation of areas with a high amount of PET are evaluated. These strains were isolated from a consortium of microorganisms that grew on pulverized PET as a carbon source. The three strains were subjected to different culture conditions trying to induce the production of enzymes that would allow them to use PET. The fungi were grown in minimal Mathur medium added with 0.1 % glucose and in the presence of free PET or PET placed in a cellophane bag and, as a control, the culture in presence of the empty cellophane bag. The three species tested showed scanty growth, suggesting a very poor capacity to use PET as a carbon source; however, they present a possible cellulolytic activity as they grew well in the presence of this empty cellophane bag.

Palabras Clave

Tereftalato de polietileno, hongos, degradación, celobiasas, lipasas

INTRODUCCIÓN

El PET (tereftalato de polietileno), es el plástico de más fácil obtención y manejo. A partir de él se obtienen diversos derivados los cuales son empleados en distintas industrias, tales como la textil, la alimenticia, para productos de uso diario etc.

En México el informe N°3469 de la cámara de diputados [1], reporta que de las 722 mil toneladas de botellas que se desechan al año, 90 millones de ellas llegan a ríos y por consecuencia al mar. El órgano gubernamental ECOCE, reporta en el informe anual del 2017 [2], que México es líder en América Latina en recuperación de PET para su reciclado y comercialización, recuperando aproximadamente el 57% de la producción anual.

El PET, por su facilidad para moldeado y su bajo costo de producción, se produce en masa desde hace varios años y por ende su acumulación en el planeta ha ido al alza; ésta ha comenzado a ser monumental y las opciones para su reciclado son escasas y costosas. Es importante entonces, buscar alternativas de biorremediación. Se han reportado distintos microorganismos para el estudio de la biodegradación de PET, tales como bacterias de los géneros *Micrococcus*, *Moraxela*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, o *Pseudomonas* y hongos como *Aspergillus glaucus* y *A. niger* [3]. En este trabajo se presenta la caracterización de tres cepas aisladas de un consorcio de microorganismos que crece sobre PET como fuente de carbono.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo de los hongos: Las cepas C1, C2 y B2 fueron crecidas en medio PDA natural (Agar Papa Dextrosa), YPG (Extracto de levadura-Peptona-Glucosa) sólido y líquido por 7 días a 24°C. El crecimiento radial se analizó con un microscopio invertido (Primo Vert Carl Zeiss acoplado con una cámara ERc5s) y en un microscopio estereoscópico.

Morfología microscópica de los hongos estudiados. Microcultivos de las 3 cepas fueron teñidas con Blanco de Calcoflúor y observadas en un microscopio de Epifluorescencia (Leica, DMLS) con una cámara AxioCam ICc1 (Carl Zeiss).

Condiciones de crecimiento: Los hongos se crecieron en 4 condiciones para realizar los ensayos de degradación del PET, como se describe a continuación. Se prepararon matraces con 30 mL de medio mínimo de Mathur suplementado con glucosa 0.1 %; Glucosa 0.1 % + una bolsa de celofán; Glucosa 0.1 % + una bolsa de celofán conteniendo 0.125 g de PET; o, glucosa 0.1 % + 0.125 g de PET y se incubaron a 24°C, por un periodo de 0-20 días con agitación constante (125 rpm).

Determinación de la masa micelial y la proteína secretada: A diferentes tiempos de cultivo se realizó la cuantificación de la proteína secretada, para ello, los cultivos fueron centrifugados a 1438 x g/10min/4°C, se recuperó el sobrenadante y se realizó la cuantificación de la proteína secretada utilizando el método de Lowry [4]. Por otra parte, la masa micelial recuperada a los 14 días de crecimiento fue hidrolizada con NaOH 1 M durante 12 h a temperatura ambiente. El sobrenadante de esta maceración se utilizó para cuantificar proteína por el método de Lowry. Previamente se realizó una curva estándar de calibración con albumina sérica bovina.

Determinación enzimática de lipasa y celobiasa: Se ensayaron los cultivos de los hongos a diferentes tiempos y condiciones de crecimiento incubándolos en medio sólido Tween 80 (peptona bacteriológica-agar-cloruro cálcico y sódico) por 3 días a 24 °C para determinar su actividad lipolítica. La actividad de celobiasa se realizó utilizando 4-metil-celobiosa como sustrato. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 30 min, finalmente se determinó la fluorescencia liberada en un espectrómetro Perkin Elmer utilizando longitud

de onda de Exc, 350 nm y Em, 440 nm. La concentración de 4-Mu liberada se cuantificó interpolando los resultados en una curva de calibración con 4-MU.

Determinación de la degradación del PET: Se realizó la determinación del cambio de peso seco en las bolsas de celofán recuperadas: bolsa vacía y bolsa con PET (celofán-PET).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La morfología macroscópica y microscópica de los hongos designados como C1, C2 y B2, indican que C1 y C2 crecen como micelio, mientras que B2 es levaduriforme (Fig.1). Además, se observó una firme adhesión de los hongos al PET libre (Fig. 2).

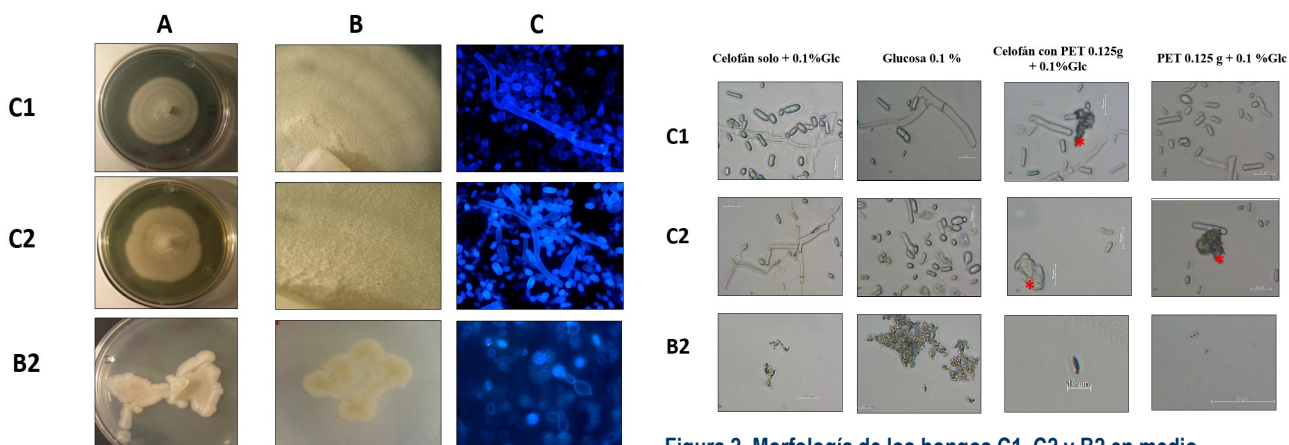
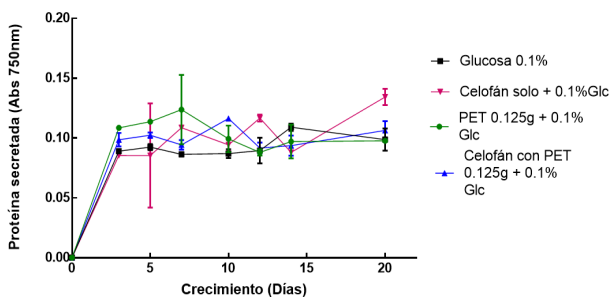


Figura 1. Morfología de los hongos C1, C2 y B2 en medio sólido. . A, crecimiento radiad de los hongos en agar YPD. B, morfología macroscópica y C, morfología

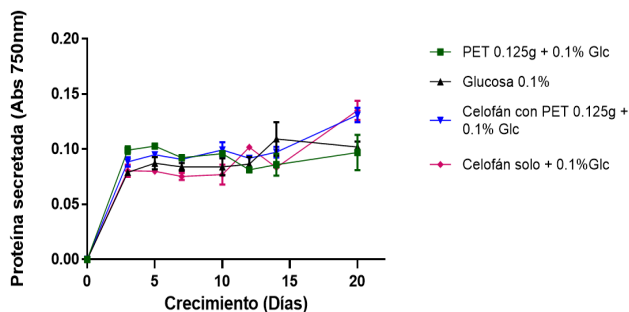
Figura 2. Morfología de los hongos C1, C2 y B2 en medio líquido en las diferentes condiciones de cultivo. Se observan pequeños acúmulos de PET (asterisco).

El crecimiento de los hongos fue lento. Particularmente, al evaluar la proteína secretada por los 3 hongos cultivados en las diferentes condiciones, todos mostraron una pequeña secreción de proteína al medio de cultivo en presencia de PET (Fig. 3). Asimismo, se puede observar que el hongo C2 ve favorecido su crecimiento y secreción de proteínas en presencia de la bolsa de celofán, ya sea que esta esté vacía o conteniendo el PET, indicando que el factor que favorece el crecimiento sea posiblemente el celofán porque pueda secretar enzimas que le ayuden a su degradación.

Proteína secretada del hongo C1



Proteína secretada del hongo C2



Proteína secretada del hongo B2

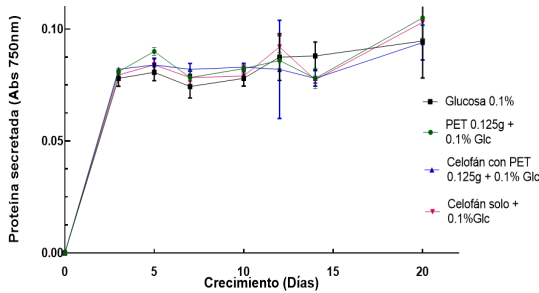


Figura 3. Proteína secretada por los hongos C1, C2 y B2 en las diferentes condiciones de cultivo.

Por otra parte, el aumento de la masa micelial para C1 y C2 fue evidente en dos condiciones: glucosa 0.1 % y PET 0.125 g + Glucosa 0.1%. Sin embargo, el hongo B2 no presentó diferencias significativas en su masa levaduriforme (Fig.4).

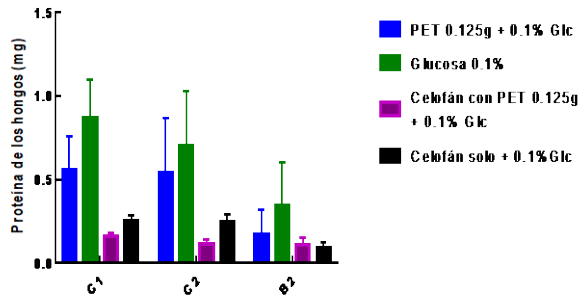


Figura 4. Determinación de la masa fúngica de los hongos C1, C2 y B2 a los 14 días de crecimiento en diferentes condiciones de cultivo. Los resultados son el promedio de dos experimentos independientes

Para cuantificar con precisión la degradación del PET por los hongos, se diseñó un experimento en condiciones controladas del peso de PET presente en el medio de cultivo, mediante la determinación de la diferencia de peso seco del PET inicial con respecto al final, cuando el PET se contuvo en una bolsa de celofán en el medio de cultivo. Al finalizar el experimento, se observó que no hubo diferencias significativas entre el peso inicial del PET y el final, independientemente del hongo (Fig. 5).

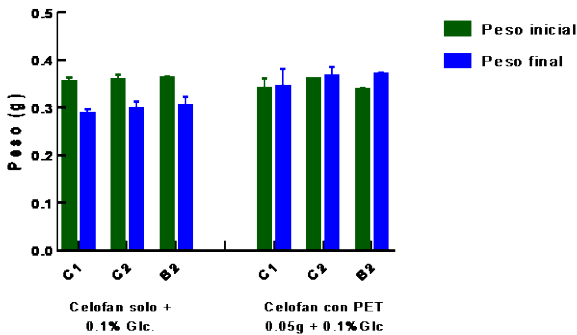


Figura 5. Determinación de la degradación del PET por los hongos C1, C2 y B2.

En cambio, al determinar el peso seco de las bolsas de celofán, en el ensayo control con la bolsa de celofán vacía con respecto al peso inicial de la bolsa se pudo observar en el control una disminución en el peso final de la bolsa de celofán sin PET; sugiriendo su posible degradación por la presencia de enzimas celulolíticas (endoglucanasas, celobiohidrolasas o celobiasas) secretadas en el medio de cultivo por los hongos en

crecimiento. Estos datos correlacionan con el ligero incremento observado en la proteína secretada en los ensayos bajo la condición de cultivo: celofán + glucosa 0.1 %, independientemente del hongo ensayado.

Considerando que los hongos podrían estar secretando hidrolasas con el fin de encontrar un sustrato que pudiesen hidrolizar, se realizaron ensayos para determinar la presencia de lipasas o celulasas en el medio de cultivo. Se inocularon los sobrenadantes recuperados de los cultivos de los tres hongos cultivados en las diferentes condiciones de cultivo en medio sólido Tween 80 para la determinación de lipasas (Fig. 6) y al término de tres días se analizó el crecimiento fúngico. Como se observa en la figura, el hongo B2 fue incapaz de crecer en estas condiciones, sin embargo, los hongos C1 y C2 mostraron crecimiento, independientemente de las condiciones de cultivo inicial y el tiempo de este, sugiriendo la presencia de lipasas.

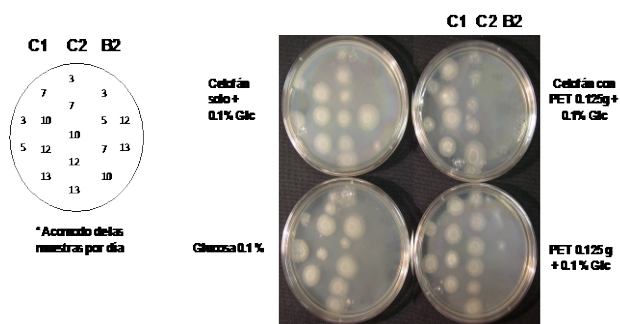


Figura 6. Determinación de la actividad de lipasas por los hongos C1, C2 y B2

Adicionalmente se determinó la actividad de celobiohidrolasa secretada por los diferentes hongos en las condiciones de cultivo ensayadas. Como se observa en la tabla 1., los hongos C1 y C2, secretan al medio de cultivo una actividad enzimática capaz de degradar el sustrato fluorescente 4-MU-celobiosido. Cabe aclarar que este ensayo se realizó únicamente con los sobrenadantes recuperados 14 días después de inoculados los hongos, por tal motivo no es posible determinar con precisión en que momento los hongos secretan esta actividad de celobiohidrolasa.

Tabla 1: Determinación de actividad de celobiasa en el sobrenadante de los cultivos de 14 días de los 3 hongos en diferentes condiciones.

	Glucosa 0.1 %		PET 0.125 g + 0.1 %Glc		Celofán solo + 0.1%Glc		Celofán con PET 0.125g + 0.1%Glc	
	Intensidad	Concentración	Intensidad	Concentración	Intensidad	Concentración	Intensidad	Concentración
C1	86.44	5.731	90.094	5.961	102.2755	7.226	47.888	2.092
C2	159.9005	12.666	221.531	18.450	213.66	35.481	108.134	7.777
B2	34.827	0.859	37.914	1.1505	33.969	0.778	39.822	1.3305

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Los hongos C1, C2 y B2, los cuales pertenecen a un consorcio de microorganismos degradadores de PET, muestran diferencias de crecimiento en cultivos con PET. Dos de ellos presentan crecimiento micelial y el tercero, que mostró baja actividad celulolítica y nula actividad de lipasa secretadas, tiene una morfología de levadura. Particularmente los cultivos de los hongos en presencia del celofán mostraron una mayor cantidad de proteína secretada. Cabe hacer notar que ambos hongos con crecimiento micelial presentan actividad de lipasa como se observó en la figura 6 y de celobiosidasa, como se observa en la Tabla 1.

En conclusión, sugerimos que los hongos C1 y C2 secretan al medio de cultivo, en condiciones de estrés por baja concentración de fuente de carbono, enzimas que le ayudan a hidrolizar los sustratos del entorno, entre ellas lipasa y un posible celobiohidrolasa. Asimismo, son incapaces de degradar PET de forma individual, lo que sugiere que en el consorcio del cual fueron aislados podría jugar un papel diferente al de ser organismos degradadores de PET

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Julio César Villagómez Castro y a la C. a Dr. en C., Lérica Liss Flores Villavicencio por su apoyo para la realización de este proyecto. A la C. A. Fernanda Rosiles Ortega por su apoyo, compañía y tiempo durante la realización del proyecto. A la Universidad de Guanajuato por la oportunidad que me brindaron, mi primer verano de investigación científica.

REFERENCIAS

- [1] <http://www5.diputados.gob.mx/index.php/esl/Comunicacion/Boletines/2017/Abril/13/3469-En-Mexico-90-millones-de-botellas-de-plastico-de-refrescos-y-agua-son-lanzados-a-la-via-publica-rios-y-mares>
- [2] <https://ecoce.mx/files/Informe-ECOCE-2017.pdf>
- [3] http://www.scielo.sa.cr/scielo.php?pid=S0034-774420030003000003&script=sci_arttext
- [4] Lowry O.H., Rosebrough N.J. & Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 193(1), 265-75.