

ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE PET POR CONSORCIOS FÚNGICOS II

Ruano Najarro, Madeline Janette (1), Villagómez Castro, Julio César (2)

1 [Licenciatura en Química Biológica, Universidad de San Carlos de Guatemala] | Dirección de correo electrónico: [madeline.ruano@gmail.com]

2 [Departamento de Biología, División de Ciencias Naturales y Exactas, Campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato] | Dirección de correo electrónico: [Castro@ugto.mx]

Resumen

Introducción: El tereftalato de polietileno (PET) es usado extensivamente en productos plásticos a nivel mundial y su acumulación en el ambiente ha sido una preocupación global [1]. El uso de microorganismos con actividad enzimática degradadora de PET como estrategia de remediación ambiental y como plataforma de reciclaje de productos de desecho es viable actualmente [2]. **Materiales y Métodos:** Se determinó la cinética de crecimiento de 2 cepas fúngicas con potencial actividad para degradar PET en función de su cultivo en diferentes condiciones y posteriormente en co-cultivo para analizar el crecimiento utilizando PET como fuente de carbono. **Resultados y Discusión:** La cepa fúngica **1E** secreta mayor cantidad de proteínas extracelulares en presencia de celulosa, indicando la producción de una posible celulasas. La cepa fúngica **Rosa** mantiene una secreción constante de proteínas extracelulares con diferentes sustratos, tales como PET, como única fuente de carbono. **Conclusiones:** La cepa **Rosa** es un mejor degradador de PET y podría ser utilizada como biorremediador ambiental, mientras la cepa **1E** tienen una posible actividad celulolítica útil en la industria.

Abstract

Introduction: Polyethylene terephthalate (PET) is used extensively in plastic products worldwide and its accumulation in the environment has been a global concern[1]. The use of microorganisms with enzymatic degrading activity of PET as an environmental remediation strategy and as a recycling platform for waste products is currently viable [2]. **Materials and Methods:** The growth kinetics of two fungal strains with potential activity to degrade PET were determined according to different conditions in culture media and in co-culture to analyze the growth using PET as a carbon source. **Results and Discussion:** Fungal strain **1E** secretes a greater amount of extracellular proteins in the presence of cellulose, indicating the production of a possible cellulase. The **Rosa** fungal strain maintains a constant secretion of extracellular proteins with different substrates, such as PET, as the sole carbon source. **Conclusions:** The **Rosa** strain is a better PET degrader and could be used as an environmental bioremediator, while the **1E** strain has a possible cellulolytic activity useful in the industry.

Palabras Clave:

PET, PETS, Sustrato, Biorremediación.

INTRODUCCIÓN

El tereftalato de polietileno (PET) es usado extensivamente en productos plásticos a nivel mundial, y su acumulación en el ambiente ha sido una preocupación global. Durante el 2010 Jambeck et al., 2015 [1] describieron más de 4.8 millones de toneladas métricas (MT) de desechos plásticos flotando en el océano y estiman un aumento significativo del desechos plásticos para el año 2025 si no se implementan técnicas efectivas para su manejo[1]. La degradación enzimática de PET se ha visto limitada a unas pocas especies bacterianas y fúngicas, por lo que el uso de microorganismos como estrategia de remediación ambiental y plataforma de reciclaje de productos de desecho de PET es viable[2]. En esta investigación se evaluó la degradación de PET a partir de dos hongos cultivados en medio mínimo Mathur adicionado con PET como fuente de carbono, la posterior cuantificación de proteínas producidas y la cantidad de PET consumido.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cinética de Crecimiento

Protocolo 1. Se incubaron de tres bocados (6 mm) de cada cepa fúngica en matraces de 125 mL con 40 mL de medio mínimo Mathur preparado según el protocolo descrito por Correll et al., 1993[3] a pH 4.5 y 0.1 % de glucosa. Se añadió a cada matraz una bolsa de celofán con 0.2 g de PET pulverizado y se dejó incubando el sistema a 26 °C y 125 rpm durante 9 días.

Condiciones de Cultivo para Cinética de Tiempo Final

Protocolo 2. Se prepararon 16 matraces de 125 mL con 8 mL de medio mínimo Mathur preparado como se describe anteriormente. La mitad de los matraces fueron inoculados con un bocado de la cepa fúngica *Rosa*, mientras la mitad restante fue inoculada con el hongo *1E*. Cada cepa fue incubada por duplicado a 26 °C y 125 rpm durante 9 días bajo las siguientes condiciones: 1) 0.1 % de glucosa + PET; 2) 0.1 % de glucosa + PETS (PET sustituido con sorbitol); 3) PET y 4) PETS.

Cuantificación de Proteínas

Se realizó de acuerdo al método de Lowry descrito por Dawson et al., 1984 [4], añadiendo reactivo de Folin-Ciocalteu sin diluir para aumentar la intensidad colorimétrica del complejo reducido en la reacción. Las mediciones de absorbancia se realizaron a 750 nm[4].

Proteína Total. Para el Protocolo 1, se tomaron 100 μ L de muestra de cada cepa fúngica y se procedió a realizar la medición espectrofotométrica según la metodología descrita. Los hongos recuperados de cada condición de cultivo del Protocolo 2 fueron recolectados en tubos Falcon de 50 mL, centrifugados a 2500 x g y se recuperó sobrenadante y pastilla. Este se maceró con 5 ml de NaOH 1N durante 48 h. Se recuperó una alícuota del macerado y se cuantificó la proteína.

Proteína Secretada. Para el Protocolo 1 se separó 1 mL de muestra de cada hongo, recuperada cada 48 h durante 9 días. Las muestras fueron concentradas por liofilización y posteriormente usadas para determinar la proteína. Para el Protocolo 2 se recuperaron 2 ml del sobrenadante de cada condición de cultivo y se utilizaron para determinar proteína. Para calcular la proteína los datos resultantes se interpolaron en una curva de calibración utilizando BSA como estándar.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La biodegradación de polímeros usualmente se refiere al ataque de microorganismos hacia materiales insolubles en agua, es decir, material plástico. Esto implica que la biodegradación es un proceso heterogéneo. Debido a las propiedades insolubles y el tamaño de las moléculas de los polímeros, los microorganismos no son capaces de ingresar los polímeros directamente hacia las células y procesarlos bioquímicamente, por lo cual es necesario la producción de enzimas extracelulares que despolimericen la estructura química del polímero fuera de las células. Si la masa molar de los nuevos polímeros está reducida lo suficiente como para generar intermediarios polares, estos pueden ser transportados dentro del microorganismo y posteriormente añadirse a sus rutas *metabólicas* [5].

En el laboratorio se cuenta con diferentes aislados fúngicos con potencial actividad para degradar PET. En este ensayo se utilizaron las cepas *Rosa* y *1E*. La cepa *Rosa* presentó colonias circulares sin elevación y margen entero (ver Imagen 1). El anverso de la colonia se caracterizó por mostrar una textura pulverulenta y pigmentación verde oscuro al centro de la colonia y blanco en los bordes exteriores. En el reverso se observó pigmentación de color rosa en el centro de la colonia con bordes blancos. Se documentó el crecimiento radial de dicho hongo durante 5 días (ver Imagen 2), el cual llegó a un diámetro final de 3.6 cm. Adicionalmente, se observó al microscopio su morfología en preparaciones teñidas con azul de lactofenol. Tal como lo muestra la Imagen 3, la cepa *Rosa* presenta micelio hialino con fialides largas, conidióforos rectos y conidios esféricos.



IMAGEN 1: Morfología colonial de la cepa fúngica *Rosa*. Crecimiento del hongo sobre agar YPG. (A) Anverso de la colonia. (B) Reverso de la colonia

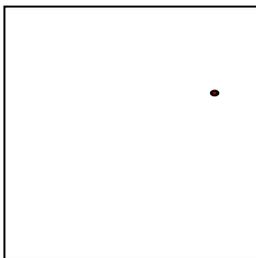


IMAGEN 2: Crecimiento radial de la cepa especie fúngica *Rosa*. Documentación del crecimiento del hongo sobre agar YPG durante 5 días, donde el punto rojo indica última medida realizada. El diámetro final fue de 3.6cm.

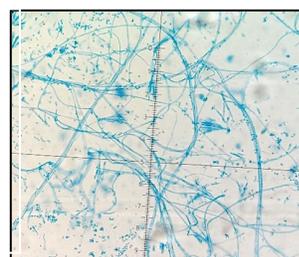


IMAGEN 3: Morfología microscópica de la cepa especie fúngica *Rosa*. A partir de cultivo en agar YPG. Azul de lactofenol, 40x.

En cuanto a la cepa *1E*, como se observa en la Imagen 4, presentó colonias circulares con elevación moderada y margen entero. Al anverso de la colonia se observó una textura algodonosa y pigmentación blanca uniforme. En el reverso se observó pigmentación de color beige y apariencia cerebriforme. Se documentó el crecimiento radial de dicho hongo durante 5 días (ver Imagen 5), donde el diámetro final fue de 4.2 cm. La observación microscópica de su morfología reveló presencia de micelio hialino, conidióforos rectos con fialides largas y seriadas, así como conidios esféricos en cadenas.



IMAGEN 4: Morfología colonial de la cepa fúngica 1E. Crecimiento del hongo sobre agar YPG. (A) Anverso de la colonia. (B) Reverso de la colonia.



IMAGEN 5: Crecimiento radial de la cepa fúngica 1E. Documentación del crecimiento del hongo sobre agar YPG durante 5 días, donde el punto rojo indica la última medida realizada. El diámetro final fue de 4.2 cm



IMAGEN 6: Morfología microscópica de la cepa fúngica 1E. A partir de cultivo en agar YPG. Azul de lactofenol, 40x.

Durante el crecimiento de las cepas fúngicas se observó una mayor cantidad de proteínas extracelulares en el hongo 1E, significativamente mayor a la observada en el hongo Rosa (ver Figura 1). La diferencia en la cantidad de proteína secretada por ambos hongos se puede deber principalmente a la especificidad enzimática por el sustrato. Teniendo esto en cuenta, es posible señalar que el factor limitante para la hidrólisis de la especie Rosa fue la accesibilidad de la enzima a través de la bolsa de celofán para llegar al sustrato, mientras que el crecimiento del hongo 1E no se vio afectado por dicha barrera, lo cual indica que el tamaño de la enzima hidrolizante es menor o bien, que existe mayor afinidad por otro sustrato diferente a PET [5].

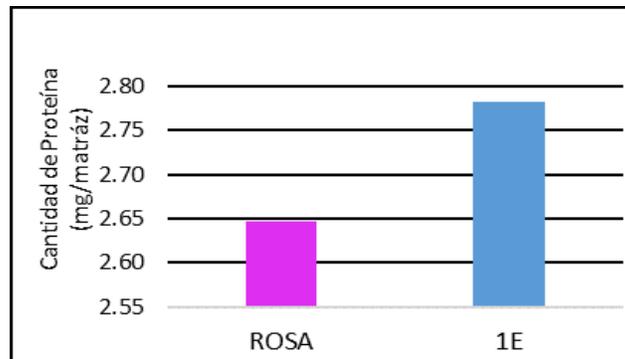


FIGURA 1: Cuantificación de Proteína secretada por las dos cepas conforme al Protocolo 1.

El aumento en la producción de enzimas extracelulares de la cepa *1E* entre el día 6 y 9 de cultivo (ver Figura 2) llama mucho la atención al relacionarse con la ruptura de la bolsa de celofán en el sexto día de incubación (Imagen 7) señalado con una flecha en la Figura 2.

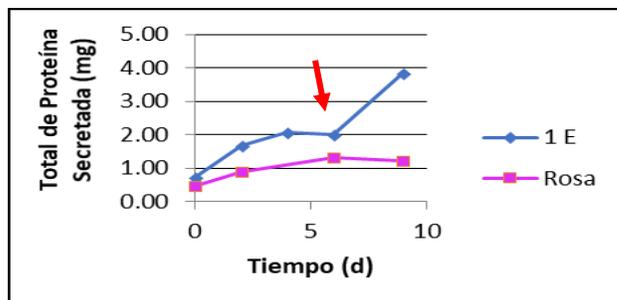


FIGURA 2: Cinética de crecimiento fúngico en función de la proteína secretada. La proteína se determinó en muestras recolectadas cada 48 horas a partir del 3er día de incubación. Las muestras fueron concentradas por liofilización.

Esto podría indicar que durante el crecimiento del hongo, las proteínas excretadas por este hongo pudieron ser las responsables de dicha ruptura ya que al compararse con el hongo *Rosa* mostrado en la Imagen 8, solo se observa crecimiento del microorganismo sobre la barrera de celofán sin ningún tipo de liberación de PET. Por otra parte, la cepa *Rosa* expresa un comportamiento menos cambiante ante la exposición de varias condiciones de cultivo. Las Figuras 1 y 3 muestran una producción proteica estable bajo presencia de glucosa como única fuente de carbono y en los ensayos con PET o PETS como única fuente de carbono. A pesar que el PET es un polímero particularmente estable y duradero investigaciones como la de Webb *et al.*, 2013 [7] han demostrado que ciertos microorganismos son capaces de utilizar como fuente de energía al tereftalato dietilenglicol (DTP), especie dimérica de PET [7].

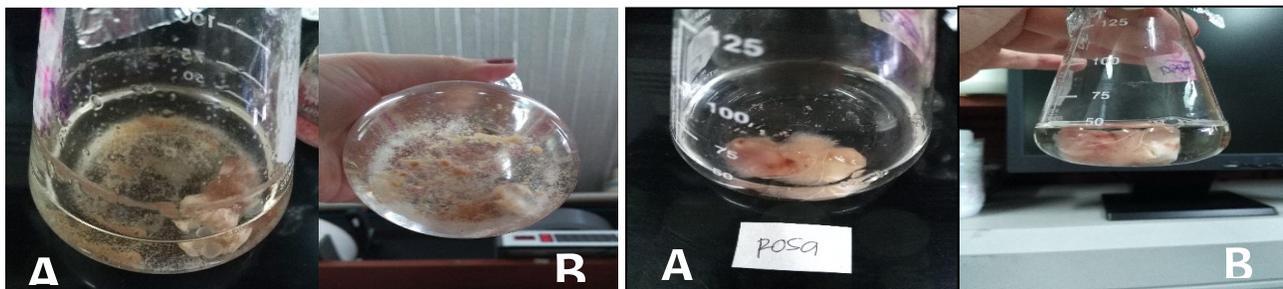


IMAGEN 7: Crecimiento de cepa fúngica *1E* en medio mínimo Mathur y Ruptura de bolsa de celofán como resultado del crecimiento del hongo. (A) Vista superior, el hongo presenta coloración anaranjada. (B) Vista inferior, partículas de PET pulverizado dispersas en el fondo del matraz.

IMAGEN 8: Crecimiento de cepa *Rosa* en medio mínimo Mathur. (A) Vista superior, pigmentación rosa. (B) Vista frontal. Se aprecia el crecimiento del microorganismo sobre la bolsa de celofán.

En la Figura 3 se observa la producción de proteínas en ambos hongos en diferentes condiciones de cultivo. El hongo *Rosa* mantiene su producción constante sugiriendo su capacidad para utilizar diferentes sustratos, mientras que el hongo *1E* produce menos proteína en cultivos sin glucosa y puede degradar celofán, similar al descrito por Gutiérrez *et al.*, 2014 [6].

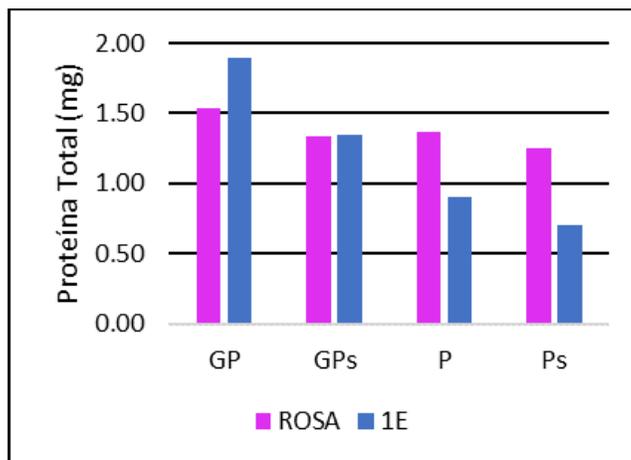


FIGURA 3: Crecimiento de especies fúngicas en diferentes condiciones de incubación. Comparación de crecimiento entre ambos hongos con diferentes sustratos como fuente de carbono. Glucosa + PET (GP), Glucosa + PETS (GPs), PET (P), PETS (Ps).

Como se ha mencionado antes, la cepa *Rosa* es capaz de utilizar distintos sustratos como fuente de carbono sin ningún problema, aunque es importante mencionar que se observó una mayor producción de proteínas en presencia de PET. Liu *et al.*, 2018 [8] indican que la actividad hidrolizante de PET se encuentra presente en varias hidrolasas de ácidos carboxílicos tales como lipasas, carboxilesterasas y cutinasas. El comportamiento de la especie *Rosa* parece indicar la presencia de alguna PETasa capaz de degradar la cadena poliéster del PET, pero no así al anillo aromático de la estructura química debido a la complejidad de la molécula y de la cantidad de energía necesaria para romper tales enlaces [8].

Otro aspecto que se exploró fue la capacidad de consorcios de microorganismos para crecer bajo las condiciones de cultivo usadas para el Protocolo 2. El hongo *Blanco* y *1A* analizados en un estudio similar distinto a este demostraron tener afinidad por el PET por lo que fueron tomados en cuenta para la elaboración de los consorcios. La especie *1E* no se incluyó en este ensayo debido a la posible carácter celulolítico, Todos los consorcios mostraron poco crecimiento en ausencia de glucosa tras 5 días de incubación sin cambio aparente en la cantidad de PET o PETS. En presencia de glucosa, los consorcios con el hongo blanco mostraron mayor crecimiento y consumo de PET, sugiriendo que este hongo crece mejor y posibilita el uso de PET para su crecimiento con otras especies.

TABLA 1. : Crecimiento cualitativo de consorcios fúngicos.

CONSORCIOS	CONDICIONES*			
	GP	GPs	P	Ps
1A + Rosa	++/+++**	++/++	+/+++	+/+++
1A + Blanco	+++/+	+++/++	+/+++	+/+++
Rosa + Blanco	+++/++	++/+++	+/+++	+/+++
1A + Rosa + Blanco	++/++	+++/++	+/+++	+/+++

*Glucosa + PET (GP), Glucosa + PETS (GPs), PET (P), PETS (Ps).

** Crecimiento del hongo/cantidad de PET o PETS restante.

CONCLUSIONES

Los resultados de este trabajo sugieren que la cepa *Rosa* es un mejor degradador de PET y podría ser utilizado como biorremediador ambiental, mientras que la cepa *1E* es un hongo con sugestiva actividad celulolítica.

AGRADECIMIENTOS

Al programa de Veranos de Investigación Científica de la UG, al Dr. Julio César Villagómez Castro por la oportunidad de participar en el proyecto, guiarme y transmitirme su amor a la investigación. A Martha Méndez, por su apoyo y amistad en mi estadía, a mis compañeros de laboratorio por su calidez y a mi familia por su amor incondicional y apoyo para cumplir mis sueños.

REFERENCIAS

- [1] Jambeck, J., Geyer, R., Wilcox, C., *et al.* (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, 347(6223), 768 – 771.
- [2] Yoshida, S., Hiraya, K., Takehana, T., *et al.* (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly(ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196 – 1199.
- [3] Cornell, J., Morelock, T. y Guerber, J. (1993). Vegetative compatibility and virulence of the spinach anthracnose pathogen, *Colletotrichum dematium*. *Plant Disease Journal*, 77. 688-691.
- [4] Dawson, J. y Heatlie, P. (1984). Lowry method of protein quantification: Evidence for photosensibility. *Analytical Biochemistry*, 140(2). 391-393.
- [5] Mueller, R. (2006). Biological degradation of synthetic polyesters-enzymes as potencial catalysts for polyester recycling. *Process Biochemistry*, 41. 2424-2128.
- [6] Gutiérrez, I., Moreno, N. y Montoya, D. (2014). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de la celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 24. 1130-1406.
- [7] Webb, H., Arnott, J., Crawford, R. & Ivanova, E. (2013). Plastic degradation and its environmental implications with special reference to poly(ethylene terephthalate). *Polymers*, 5. 1-18.
- [8] Liu, B., He, L., Wang, L., *et al.* (2018). Protein crystallography and site.direct mutagenesis analysis of the poly (ethylene terephthalate) hydrolase PETase from *Ideonella sakaiensis*. *ChemBioChem*, 10.