

a) **Evaluación del potencial de biodegradación de ácido tereftalato (TPA) y PET (tereftalato de polietileno) por cepas fúngicas aisladas de envases tipo PET.**

Evaluation of the biodegradation potential of terephthalate acid (TPA) and PET (polyethylene terephthalate) by fungal strains isolated from PET-type containers.

Yuliana Estrada Poumian¹, Zahir Aleksander Padilla García¹, Julia Jatziry Zamudio Rios¹, Luis Mario Magaña Maldonado², Kazimierz Wrobel², Alma Rosa Corrales Escobosa²

¹⁻³Instituto tecnológico de Villahermosa; Campus Villahermosa. ³⁻⁶Departamento de Química, División de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad de Guanajuato
yulianapoumian09@gmail.com¹, Zahirpadilla22@gmail.com², jatziryzamudio12@gmail.com³, lm.maganamaldonado@ugto.mx⁴, kazimierz@ugto.mx⁵, alma_rce@ugto.mx⁶

Resumen

La acumulación de plásticos como el polietileno tereftalato (PET) representa un desafío ambiental crítico debido a su creciente producción, consumo y mal manejo de residuos, así como la generación de microplásticos y compuestos de lixiviación potencialmente tóxicos. En este estudio se evaluó el potencial biodegradador de un consorcio fúngico obtenido previamente en el laboratorio y conformado por cuatro cepas fúngicas. Se realizaron tres condiciones cultivo: glucosa (GLC), glucosa + ácido tereftálico (GLC-TPA) y glucosa + PET (GLC-PET, libre de antimonio). La identificación de cepas mediante MALDI-TOF Biotyper® permitió confirmar la presencia de *F. proliferatum* (Cepa 1) y *F. verticillioides* (Cepa 2). El consumo de glucosa se determinó mediante el método de DNS, mientras que el ácido tereftálico (TPA) se cuantificó espectrofotométricamente a 242 nm. Se registraron espectros de absorbancia UV (200–400 nm) para detectar posibles interferencias de metabolitos fúngicos. Los resultados indicaron que la Cepa 2 mostró el mayor crecimiento y producción de proteínas en medio GLC-PET. Por su parte, la Cepa 4, aún no identificada, exhibió un crecimiento diferencial en GLC-TPA, con alta producción proteica, lo que sugiere una respuesta específica al TPA. La Cepa 1 presentó crecimiento moderado en ambos medios, pero su contenido proteico no fue considerado al encontrarse por debajo de los límites de cuantificación (LOQ). En contraste, la Cepa 3 fue descartada por ausencia de desarrollo en los medios evaluados. A partir del día 10, las cepas 1, 2 y el consorcio consumieron completamente la glucosa, favoreciendo la formación de micelio, condición relevante para la degradación del sustrato; en contraste, la Cepa 4 mostró un retraso en este proceso. Dada la interferencia espectral observada en la detección de TPA, se recomienda la implementación de HPLC para una cuantificación más precisa. Estos hallazgos evidencian el potencial de cepas fúngicas seleccionadas en la biodegradación de PET y sus derivados, aportando herramientas para el desarrollo de estrategias biotecnológicas sostenibles.

Introducción

En 2023, la producción mundial de plásticos alcanzó 413,8 millones de toneladas, de las cuales solo una fracción provino de fuentes sostenibles: 8,7 % reciclado mecánicamente, 0,2 % reciclado químicamente y 0,7 % de origen biológico. Dentro de este total, las botellas de PET (tereftalato de polietileno) representaron el 6,2 % del uso global de plásticos, destacándose como una de las aplicaciones más relevantes en el sector de envases y en la industria textil (Europe & EPRO, 2023). La amplia demanda es debido a sus características físicas como resistencia al impacto mecánico, ligereza, buena resistencia química, además de ser un plástico 100 % reciclable. A pesar su potencial de reciclabilidad, es uno de los plásticos más contaminantes del mundo, debido a la mala disposición de sus residuos, lo cual provoca acumulación de macroplásticos que con el paso de tiempo genera microplásticos debido a la fragmentación física, química y biológica (Ayalde Valderrama, 2022).

De acuerdo con la IUPAC, la degradación de polímeros es un proceso complejo mediante el cual un material pierde sus propiedades originales como resultado de la exposición a condiciones ambientales o al desgaste por uso. Aunque desde el punto de vista funcional esta pérdida no es deseable, el estudio de los mecanismos de degradación resulta fundamental para diseñar estrategias de mitigación de la contaminación derivada del

uso masivo de plásticos. En este contexto, el análisis de la degradación de polímeros, así como la cuantificación de los productos generados, resulta clave para avanzar hacia soluciones más sostenibles.

El PET es un polímero sintético de la familia de los poliésteres, formado por la polimerización por condensación del ácido tereftálico (TPA) y el etilenglicol (EG). Su estructura química (Figura 1) consiste en unidades repetitivas de grupos aromáticos rígidos (anillos de benceno) unidos a ésteres alifáticos. En el ambiente, el PET puede permanecer intacto durante cientos de años.

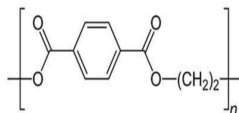


Figura 1. Estructura química del PET

En la última década, se han descrito algunas bacterias y hongos con capacidad de degradar a PET, destacando a la bacteria *Ideonella sakaiensi*. Cabe señalar que el proceso de biodegradación depende tanto de la maquinaria enzimática de microorganismo, así como de las propiedades de estos materiales como es estructura química, cristalinidad, la masa molar del monómero y grado de ramificación, etc. (Restrepo-Flórez, Bassi, & Thompson, 2014).

En general, el proceso de biodegradación consiste en dos etapas: en la primera, los microorganismos colonizan los plásticos provocando una reducción en el tamaño del polímero en el espacio extracelular debido a la acción enzimática de cutinasas, lipasas, hidrolasas, entre otras, las cuales catalizan la hidrólisis de los enlaces éster del PET, generando la liberación de los oligómeros cortos, dímeros y monómeros. Posteriormente, estos los fragmentos pueden ser absorbidos por las células y sometidas a las siguientes etapas de degradación mediante actividad de las enzimas intracelulares. Esta etapa puede seguir varias rutas y producir diversos metabolitos intermediarios hasta lograr la mineralización completa con liberación de productos finales CO_2 y H_2O .

Frente a este panorama, el desarrollo de estrategias sostenibles para el manejo de residuos plásticos se vuelve prioritario. La degradación enzimática del PET abre la posibilidad de utilizar microorganismos como herramientas biotecnológicas viables tanto para la remediación ambiental como para el reciclaje de productos plásticos. Sin embargo, aún se requiere profundizar en el estudio microorganismos, los mecanismos moleculares y rutas metabólicas responsables de biodegradación de polímeros en un mayor número de especies bacterianas y fúngicas, con el fin de ampliar el conocimiento sobre los procesos de despolimerización y transformación de estos compuestos y diseñar estrategias eficientes de biorremediación. (Amobonye, Bhagwat, Singh, & Pillai, 2021). Para facilitar la biodegradación, los plásticos pueden ser parcialmente despolimerizados antes de ponerlos en contacto con los microorganismos; para ello pueden utilizarse tratamientos físicos tales como calentamiento, enfriamiento, congelación, descongelación, así como procesos de degradación química.

Por todo lo anterior, es necesario avanzar en estudios que aborden tanto la despolimerización del PET como el metabolismo de sus monómeros como el TPA, ya que estos compuestos no solo es un intermediario clave en la biodegradación, sino también un valioso precursor químico.

Antecedentes

Con el paso del tiempo se han desarrollado diferentes tipos de alternativas para biodegradar el PET a nivel mundial, sin embargo, su degradación en el ambiente es extremadamente lenta, lo que genera una problemática ambiental significativa. En respuesta a este desafío, el uso de microorganismos con capacidad para degradar PET ha surgido como una solución prometedora dentro de la biotecnología ambiental. En particular, la identificación de hongos capaces de metabolizar PET o sus derivados, como el ácido tereftálico (TPA), se ha convertido en una línea de investigación de gran relevancia para el desarrollo de estrategias sostenibles de reciclaje.

Un ejemplo reciente es el trabajo de (Kotnis, Gulati, Sun, & Bioengineering, 2025), quienes reportaron un sistema innovador basado en la inmovilización de dos enzimas (FAST-PETase y MHETase) en nanopartículas magnéticas. Este enfoque permitió una degradación más eficiente del PET, con una mayor liberación de TPA y otros monómeros en menor tiempo. Además, el sistema mostró una notable estabilidad, permitiendo la reutilización de las enzimas sin pérdida de actividad.

En este contexto, y como parte de una línea de investigación que nuestro grupo ha venido desarrollando, el presente estudio se enfocó en la evaluación de cepas fúngicas aisladas de residuos plásticos urbanos. Como parte del seguimiento a esfuerzos previos orientados a la identificación de metabolitos derivados de la degradación de PET por microorganismos, se recolectaron botellas de PET en distintos puntos de la ciudad de Guanajuato, México. Estas muestras fueron seleccionadas por presentar signos visibles de deterioro, como fisuras, decoloración, pérdida de integridad mecánica y evidencia de colonización microbiana.

Los fragmentos de estas botellas fueron expuestos durante varios meses en medios mínimos conteniendo ácido tereftálico (TPA) como única fuente de carbono, con el fin de someter a los microorganismos a condiciones de estrés, adaptación y consumo del compuesto. Posteriormente, se realizaron cultivos en medio PDA para el aislamiento y purificación de las cepas fúngicas presentes, las cuales fueron seleccionadas para su evaluación en el presente estudio.

Este trabajo da continuidad al estudio de un consorcio fúngico con capacidad para utilizar como única fuente de carbono al monómero TPA derivados del PET y contribuye a la generación de conocimiento para el desarrollo de estrategias de reciclaje más sostenibles mediante el uso de microorganismos.

Objetivo

El objetivo general de proyecto consistió en evaluar la capacidad para biodegradar a TPA (ácido tereftálico) y PET (tereftalato de polietileno) de cepas fúngicas aisladas de envases tipo PET. Para ello, se planteó dos objetivos específicos: el primero, identificar las cepas fúngicas del consorcio mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI Biotyper®) y el segundo, evaluar la capacidad de biodegradación de PET y TPA por las cepas fúngicas (individualmente y en consorcio), utilizando medios suplementados con glucosa-PET y glucosa-TPA y su control (glucosa). Esta evaluación se realizó mediante: a) Crecimiento microbiano (peso seco), b) Determinación de proteínas extracelulares (método de Bradford), c) Consumo de glucosa (método DNS) y d) determinación de TPA (Espectrofotométricamente a $\lambda = 242 \text{ nm}$).

Metodología

Instrumentación

Para la identificación de microorganismos se utilizó un espectrómetro de masas con sistema de desorción/ionización láser asistido por matriz y analizador de tiempo de vuelo (MALDI-TOF/TOFMS, modelo Ultraflex, Bruker Daltonics). Para evaluar la actividad enzimática, así como la disminución de glucosa y ácido tereftálico (TPA) se utilizó un espectrofotómetro de microplacas Thermo Scientific™ Multiskan™ GO operado con el software SkanIt™. Liofilizadora Labconco™ FreeZone™ 2.5 L -50 °C permite conservar metabolitos termosensibles eliminando el agua. Cabina de flujo laminar de bioseguridad clase II, modelo 11231BBC86, la cual proporciona un entorno estéril mediante flujo laminar y filtros HEPA. Autoclave All American modelo 50X. pH-metro Agilent Technologies modelo 320p, Balanza analítica Citizen modelo CX220. Centrífuga Hermlet modelo 236HK,

Preparación de medios

El medio Czapek-Dox modificado fue preparado disolviendo 6 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3 g de KCl, 3 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 3 g de KH_2PO_4 y 20 mg de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 3 litros de agua mili-Q. La mezcla fue suplementada con 30 g de glucosa (10 g/L) como para permitir el crecimiento inicial. Posteriormente, el volumen total fue distribuido en tres fracciones iguales, cada una destinada a una condición experimental distinta: Condición 1 (control glucosa): Medio Czapek-Dox con glucosa (10 g/L) únicamente. Condición 2 (TPA): Medio Czapek-Dox con glucosa + ácido tereftálico (TPA) a una concentración final de 0.1 mg/mL. Condición 3 (PET): Medio Czapek-Dox con glucosa + fragmentos de PET (libres de antimonio) a una concentración estimada de 0.1 mg/mL.

El ácido tereftálico (TPA) se preparó como una solución stock a partir de 1 g de TPA sólido, el cual fue transferido a un matraz y disuelto mediante neutralización con NaOH 1 M. Posteriormente, se aforó con medio Czapek-Dox sin glucosa hasta alcanzar el volumen deseado. La solución fue mantenida en agitación constante a 180 rpm durante 24 horas para favorecer la disolución completa. Finalizado este periodo, se procedió a su filtración estéril mediante un filtro de acetato de celulosa de 0.22 μm dentro en una campana de flujo laminar. Finalmente, para verificar la integridad del compuesto, se registraron espectros de absorbancia (rango de λ 200 - 400 nm) antes y después del filtrado, sin observarse diferencias, esto confirmó la estabilidad del TPA durante el proceso. Posteriormente, se añadieron 5 mL de la solución stock de TPA a

un volumen de un litro del medio Czapek-Dox con glucosa, con el fin de alcanzar una concentración final de 0.1 mg/mL de TPA en cada matraz. El PET libre de antimonio se obtuvo mediante el procedimiento descrito por (Magana-Maldonado et al., 2023), el cual consistió en disolver 1 g de fragmentos pequeños de PET en 7 mL de ácido trifluoroacético (TFA), bajo agitación constante durante 30 minutos. Posteriormente, la solución fue precipitada mediante la adición de una mezcla fría de metanol:agua (1:1, v/v). El material precipitado se filtró al vacío y se lavó sucesivamente con ácido clorhídrico 1 M y metanol frío para eliminar impurezas residuales. El sólido obtenido se dejó secar al aire durante 48 horas. Para su uso en los ensayos de cultivo, se pesaron 100 mg del PET tratado, los cuales se colocaron en un tubo Falcon de 15 mL con etanol al 70%, dejándose en reposo durante 1 hora. Posteriormente, se realizaron tres lavados con agua mili-Q estéril, cada uno seguido de una centrifugación a 5000 rpm durante 5 minutos. Finalmente, el pellet fue resuspendido en una fracción del medio Czapek-Dox con glucosa, ajustando la concentración final de PET a 0.1 mg/mL.

El aislamiento de microorganismos se realizó en placas con medio PDA (Agar papa dextrosa). Para ello, se pesó 19.5 g del preparado comercial de agar papa dextrosa (Bioxón) y se disolvieron en agua mili-Q hasta completar un volumen final de 500 mL. Para la identificación de microorganismo se preparó medio Sabouraud Dextrosa (SAB). Para ello se pesó 10 g de peptona y 40 g de dextrosa y se disolvieron en agua mili-Q.

Identificar las cepas fúngicas del consorcio mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI-Biotyper®)

Protocolo de extracción de proteínas para la identificación por espectrometría de masas

Una vez aisladas las cepas en medio PDA a partir del consorcio fúngico, se procedió a su cultivo en medio Sabouraud en tubos de vidrio, incubándolas durante 48 horas a 28 °C y con agitación constante a 180 rpm. La biomasa obtenida fue transferida a un tubo Eppendorf de 2 mL y sometida a centrifugación a 13,000 rpm durante 2 minutos para eliminar el medio de cultivo. Se desecharon el sobrenadante, y la pastilla fue lavada con 1 mL de H₂O. Inmediatamente, se procedió a mezclar en vortex por 1 min y posteriormente se centrifugó durante 2 min a 13,000 x g. Este paso se repite 2 veces. Se continuó con el lavado de la pastilla (biomasa) obtenida, añadiendo 300 µL de H₂O y 900 µL de etanol (EtOH) al 70 %, nuevamente se agitó en vortex, se centrifugó a 13,000 x g durante 2 minutos, se eliminó el sobrenadante y la pastilla se secó en el speedvac a 37 °C durante 10 minutos para la eliminación de restos de EtOH. Finalmente, dependiendo de la cantidad de material biológico, se añadió entre 10 a 50 µL de ácido fórmico al 50 % y adicionalmente una misma cantidad de MeCN. La mezcla resultante se agitó en vortex y centrifugó a 13,000 x g por 2 min para obtener el extracto de proteínas. Posteriormente se depositó 1 µL del extracto obtenido en un pocillo de la placa "Polisheet Steel", seguido de la adición de 1 µL de matriz HCCA a una concentración de 10 mg/mL y se dejó secar antes de ingresar al equipo de MALDI-TOF MS. Adicionalmente, un pocillo fue cargado con 1 µL del estándar BTS (Bacterial Test Estándar) y 1 µL de HCCA.

Identificación por MALDI Biotyper®

Para la adquisición y análisis de los espectros de masas, se empleó el software FlexControl para operar el espectrómetro MALDI-TOF, seleccionando los métodos MBT_AUTOX y MBT_FC, con una frecuencia de disparo de 200 Hz y calibración en modo cuadrático. Previamente, el equipo fue calibrado utilizando el estándar BTS (Bruker Test Standard), que representa un perfil proteico y peptídico típico de *Escherichia coli* DH5α en análisis MALDI-TOF, cubriendo un rango de masas entre 3.6 y 17 kDa. Esta calibración se realizó mediante asignación automática de señales, con un margen de error inferior a 300 ppm. Los espectros fueron adquiridos en modo lineal positivo, en un rango de masas de 2,000 a 20,000 Da, con una energía de láser ajustada al 80 %. La adquisición de los espectros de todas las muestras se realizó manualmente, seleccionando las áreas con la mejor relación señal/ruido, a fin de optimizar la calidad del análisis espectrométrico. Posteriormente, los espectros obtenidos fueron procesados con el software Biotyper™ Compass 4.1, el cual cuenta con la base de datos Biotyper™ versión 3.3.1.0. Esta incluye la MBT-BDAL-5989 MSP Library para bacterias y la Library v1.0 para hongos filamentosos, ambas proporcionadas por Bruker Daltonics. Para la identificación de microorganismos, MALDI-Biotyper™ evalúa la concordancia entre el espectro experimental y los espectros de referencia de la base de datos, considerando tres parámetros: los valores de *m/z*, la intensidad de las señales y la frecuencia de aparición. Con base en estos, el sistema calcula un puntaje de similitud (log score) en una escala logarítmica de 0 a 3.0. Los valores ≥2.0 permiten una asignación confiable a nivel de especie, los valores entre 1.7 y 2.0 indican una identificación probable a nivel de género, y los ≤1.7 no permiten una asignación confiable. Además, se asigna una letra de confiabilidad (A, B o C), donde A corresponde a una identificación a nivel de especie, B a nivel de género y C a baja

confiabilidad. Los resultados de identificación son presentados en tablas de puntuación generadas automáticamente mediante el software Compass Explorer MBT, en función de la similitud entre los patrones de señales m/z de las muestras y los espectros de referencia.

Condiciones de cultivo para evaluar

Se añadieron 50 mL de las fracciones estériles de los medios Czapek-Dox suplementados con glucosa, glucosa-TPA y glucosa-PET (tres replicas biológicas por cada condición experimental) como se muestra en la Figura 2. Cada matraz fue inoculado con una suspensión concentrada de conidios, ajustando la concentración final a 1×10^6 conidios/mL para cada una de las cepas. Se incluyeron los controles abióticos: medio mínimo con GLU-TPA y GLU-PET, correspondientes al medio sin inoculación de microorganismos. Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente y sin agitación. Durante 17 días consecutivos, se recolectó diariamente una alícuota de 1 mL de cada matraz, las cuales fueron almacenadas a -20°C y para la posterior determinación de glucosa, TPA y proteína extracelular. Al finalizar el experimento, la biomasa residual fue recolectada y lavada con agua mili-Q. Posteriormente, se sometió a un proceso de liofilización para su conservación y cuantificación, obteniéndose así el peso seco de cada muestra.

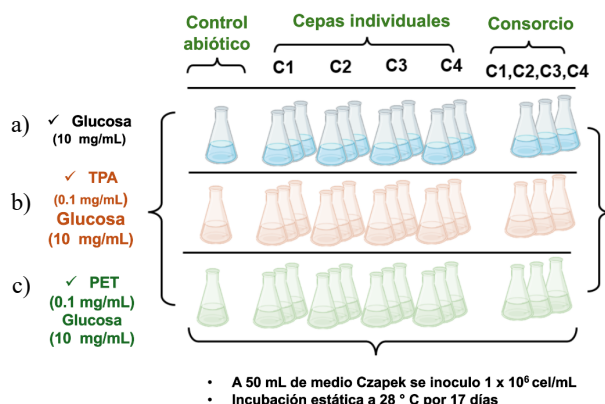


Figura 2. Condiciones experimentales de cultivo de cepas fúngicas en medios Czapek-Dox suplementados con: a) glucosa, b) glucosa y ácido tereftálico (TPA), o c) glucosa y fragmentos de PET libres de antimonio.

Determinación de Glucosa

El análisis de glucosa en el medio de cultivo se realizó mediante la determinación de azúcares reductores por el método ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS). Este método se basa en una reacción redox, en la cual los grupos funcionales aldehído o cetona de los azúcares reductores reducen el DNS (amarillo) a ácido 3-amino-5-nitrosalicílico (naranja-rojizo) en medio alcalino, generando un complejo coloreado cuya intensidad es proporcional a la concentración de azúcar presente. Para la preparación del reactivo DNS se preparó una solución reactiva de DNS al 3 %, en NaOH al 3 %, con la adición de fenol al 0.6 % y sulfito de sodio al 0.15 %. Esta mezcla se mantuvo protegida de la luz para preservar su estabilidad. Como agente estabilizador, se utilizó una solución de tartrato de sodio y potasio al 40 %. Asimismo, se preparó una curva de calibración utilizando soluciones estándar de glucosa en un rango de concentraciones de 0.072 a 0.72 mg/mL, distribuidas en cinco puntos de referencia. El procedimiento consistió en mezclar 40 μL de la solución de DNS con 200 μL de cada solución estándar de glucosa o muestra. Las mezclas se calentaron a 90°C durante 15 minutos para favorecer la reacción redox entre los azúcares reductores y el reactivo DNS. Posteriormente, se añadieron 60 μL de la solución de tartrato al 40 % para estabilizar la coloración desarrollada. Una vez enfriadas a temperatura ambiente, las muestras fueron agitadas en vórtex durante 5 minutos y centrifugadas a 10,000 rpm por 5 minutos. Finalmente, se tomaron 200 μL del sobrenadante y se transfirieron a una placa de 96 pocillos para la lectura de absorbancia a 575 nm mediante espectrofotometría.

Determinación espectrofotométrica de TPA

Las alícuotas de 1 mL recolectadas diariamente durante el experimento, fueron descongeladas a temperatura ambiente antes de su análisis. A cada muestra se le añadieron 5 μL de una solución de NaOH 6 M para

ajustar el pH a 9, favoreciendo la solubilización de compuestos derivados del ácido tereftálico (TPA). Posteriormente, las muestras se centrifugaron a 10,000 rpm durante 5 minutos, y el sobrenadante fue utilizado directamente para los análisis. Para la cuantificación de TPA, se depositaron 2 μ L del sobrenadante alcalinizado en una placa tipo μ Drop, realizándose la lectura espectrofotométrica a 242 nm. Esta misma solución también fue empleada para la determinación de glucosa mediante el método de DNS, descrito previamente. Así mismo, se preparó una curva de calibración utilizando soluciones estándar de TPA en un rango de concentraciones de 0.025 a 0.125 mg/mL, distribuidas en cinco puntos de referencia.

Determinación de proteína del medio extracelular

La determinación de proteína se realizó por el método de Bradford, que se basa en la interacción del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 está en forma catiónica (rojo-marrón) con la proteína en la solución. Al unirse a las proteínas, el colorante cambia a su forma aniónica (azul), debido a interacciones electrostáticas y de van der Waals con los aminoácidos básicos (principalmente arginina, lisina e histidina) y grupos aromáticos (fenilalanina, triptófano y tirosina) formando un complejo-proteína que absorbe a 595 nm. Para la preparación del reactivo de Bradford, se pesan 100 mg de azul brillante Coomassie G-250 y se disuelven en 50 mL de etanol absoluto. La disolución se agita suavemente a temperatura ambiente hasta que el colorante esté completamente disuelto. Posteriormente, en una campana de extracción y bajo agitación constante, se adicionan lentamente 100 mL de ácido fosfórico concentrado (85 %). Esta adición debe realizarse con precaución, ya que es una reacción exotérmica y puede generar calor. Una vez que la mezcla es homogénea, se completa el volumen a 1 L con agua milli-Q. La solución resultante se filtra utilizando papel de filtro Whatman No. 1 para eliminar partículas no disueltas. Finalmente, el reactivo se transfiere a un frasco de vidrio ámbar o recipiente opaco y se almacena a temperatura ambiente, protegido de la luz solar directa. Para la preparación de proteínas extracelulares, se tomaron 1.5 mL del medio de cultivo al finalizar los 17 días del experimento y se transfirieron a un tubo tipo Eppendorf. Las muestras fueron centrifugadas a 10,000 x g durante 2 minutos para separar las células y residuos sólidos, recuperándose cuidadosamente el sobrenadante. De este volumen, se tomaron 1 mL, el cual fue sometido a liofilización durante un periodo de 24 a 48 horas con el objetivo de concentrar las proteínas presentes. El pellet seco resultante se rehidrató con 100 μ L de agua ultrapura (mili-Q) y se homogeneizó completamente. Para la cuantificación de proteínas, se mezclaron 20 μ L de la muestra con 200 μ L del reactivo de Bradford en una placa tipo Elisa de 96 pocillos, agitando suavemente para favorecer la reacción. Asimismo, se preparó una curva de calibración utilizando soluciones estándar de albúmina sérica bovina (BSA), en un rango de concentraciones de 0.125 a 0.625 mg/mL, distribuidas en cinco puntos de referencia.

Resultados

Para caracterizar las cepas fúngicas provenientes del consorcio previamente aislado de residuos de botellas PET y el cual demostró capacidad de crecer y utilizar al TPA como única fuente de carbono, se procedió a llevar a cabo el aislamiento de las cepas individuales en medio PDA, con el fin de obtener colonias aisladas para su identificación, así como posteriormente llevar a cabo la evaluación para utilizar TPA y biodegradar PET de manera individual y en consorcio.

De las cepas fúngicas aisladas que se presentan en la Figura 3, es posible observar diferencias evidentes en su morfología macroscópica. Cada cepa muestra características distintivas en cuanto a textura, coloración, borde del micelio y patrón de crecimiento, lo cual sugiere variabilidad fenotípica entre los aislados. Estas diferencias morfológicas podrían estar relacionadas con su origen ambiental, así como con su capacidad de adaptación y degradación del sustrato.

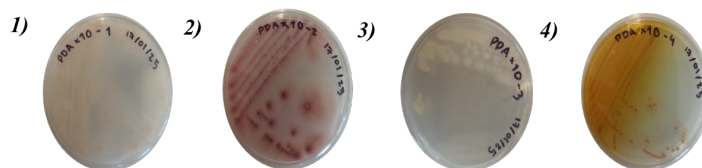


Figura 3. Ejemplo de crecimiento de microorganismos aislados en placa Petri de PDA para 1) Cepa 1; 2) Cepa 2; 3) Cepa 3 y 4) Cepa 4

Identificación de las cepas fúngicas del consorcio mediante espectrometría de masas MALDI-TOF (MALDI Biotyper®)

En la Figura 4 se muestran los espectros de masas obtenidos mediante espectrometría MALDI-TOF para las cuatro cepas fúngicas aisladas del consorcio, junto con el espectro de referencia correspondiente a *Escherichia coli*, empleado como control interno del sistema para la identificación. Asimismo, se incluyen los espectros de dos cepas previamente caracterizadas por el grupo de trabajo: *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma harzianum*, utilizadas como referencias comparativas. La comparación visual de los perfiles espectrales permite identificar similitudes y diferencias entre los patrones de picos, lo cual es útil para apoyar la identificación taxonómica preliminar de los aislados en estudio.

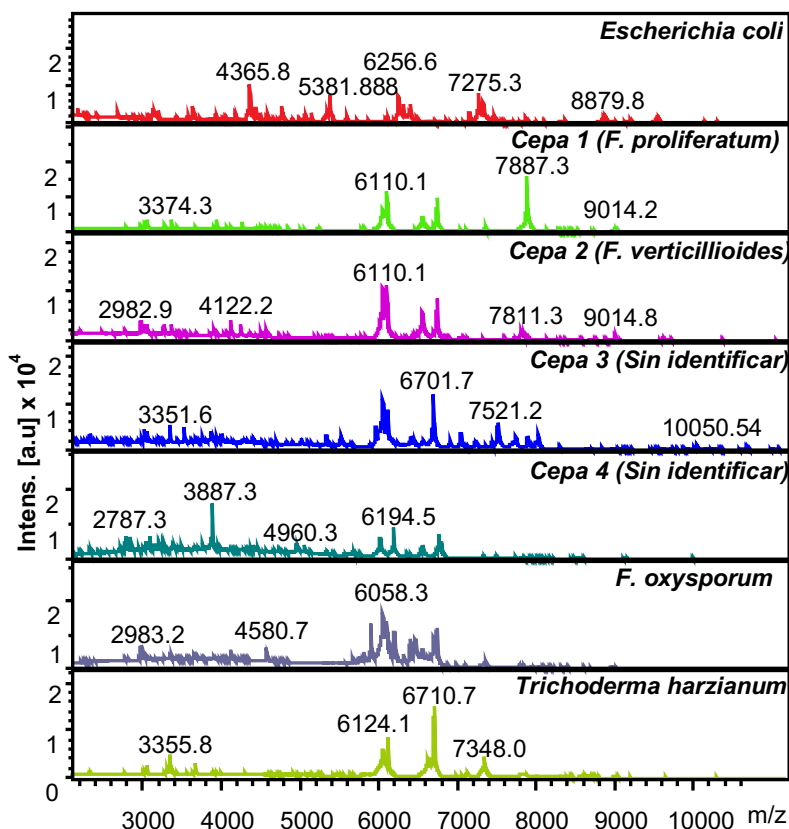


Figura 4. Típicos espectros de masas obtenidos por MALDI TOF MS

Una vez obtenidos los espectros de masas, se procedió a llevar a cabo la identificación mediante MALDI Biotyper. Los resultados obtenidos se resumen en la Tabla 1, donde se muestran los valores de score obtenidos para cada muestra analizada. Como control interno, *Escherichia coli* presentó scores elevados (2.32 y 2.31) para la primera y segunda mejor coincidencia, respectivamente, lo que confirma la capacidad de identificación a nivel especie de manera confiable. Para las cepas fúngicas aisladas, las cepas 1 (C1) y 2 (C2) mostraron valores de score que indican una identificación confiable a nivel de especie dentro del género *Fusarium*. La cepa 1 fue identificada principalmente como *Fusarium proliferatum* (score 2.28), con *Fusarium verticillioides* como segunda mejor coincidencia (2.11). De manera inversa, la cepa 2 fue asignada principalmente a *Fusarium verticillioides* (2.24) y secundariamente a *Fusarium proliferatum* (2.05). Estos resultados reflejan la cercanía taxonómica entre ambas especies, sin embargo, se pueden distinguir morfológicamente por la pigmentación. Por otro lado, las cepas 3 (C3) y 4 (C4) no pudieron ser identificadas con confianza, ya que no se obtuvieron scores asignables (valores de score menor a 1.7), lo que puede indicar que no se encuentran representadas en la base de datos del MALDI Biotyper, ya que se obtuvieron espectros de masas (Figura 4). Para observar la relación con las cepas de referencia *Fusarium oxysporum* y *Trichoderma harzianum* laboratorio, se adquirió los espectros de masas de estas cepas. Estas cepas mostraron scores inferiores a 2.0, con valores cercanos a 1.8, lo que indica una identificación a nivel de género o grupo, pero no concluyente a nivel de especie según los criterios estándares de la técnica. Esto puede ser debido a que no se encuentran los espectros de masas principales de estas cepas en la base de datos. Adicionalmente, se puede concluir, que las cepas de *Fusarium* presentes en el consorcio, no corresponde la especie *oxysporum*, ya que presentan un perfil de proteínas distinto (Figura 4)

En conjunto, estos resultados demuestran la eficacia del MALDI Biotyper para la identificación rápida y confiable de algunas cepas del género *Fusarium*, mientras que para otras cepas es necesario complementar con métodos moleculares para lograr una identificación definitiva.

Tabla 1. Identificación de microorganismos por MALDI-Biotyper.

Analyte Name	Organism (best match)	Score Value	Organism (second best match)	Score Value
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>	2.32	<i>Escherichia coli</i>	2.31
Cepa 1 (C1)	<i>Fusarium proliferatum</i>	2.28	<i>Fusarium verticillioides</i>	2.11
Cepa 2 (C2)	<i>Fusarium verticillioides</i>	2.24	<i>Fusarium proliferatum</i>	2.05
Cepa 3 (C3)	Sin identificar	-	Sin identificar	-
Cepa 4 (C4)	Sin identificar	-	Sin identificar	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	<i>Fusarium sp</i>	1.87	<i>Fusarium equiseti</i>	1.83
<i>Trichoderma harzianum</i>	<i>Trichoderma hamatum</i>	1.88	<i>Trichoderma hamatum</i>	1.75

Comparación del crecimiento microbiano expuesto a TPA y PET

Con la finalidad de evaluar si la presencia de TPA y PET tiene un efecto en el desarrollo de los aislados fúngicos (C1, C2, C3 y C4) cultivados de manera individual o en consorcio, se analizó la producción de biomasa después de 17 días de cultivo en medio Czapek-Dox adicionado con TPA (GLC-TPA) o PET (GLC-PET) y glucosa sola (GLC) control de crecimiento de acuerdo con lo descrito en el diagrama de la Figura 2 y en la sección de materiales y métodos. Cabe señalar que los cultivos fueron adicionados con glucosa como fuente carbono inicial para promover el crecimiento y la biomasa generada pueda utilizar a los sustratos de interés (TPA y PET) una vez agotada la glucosa.

Los resultados de la producción de biomasa por las cepas cultivadas individualmente o consorcio en los medios con distintos sustratos son presentados en la Figura 5, donde se observa una respuesta diferencial entre las cepas. La cepa 2 mostró la mayor producción de biomasa en todos los medios analizados, alcanzando un máximo de 94.3 mg en el medio GLC-PET, seguida por 84.9 mg en GLC y 83.03 mg en GLC-TPA. Esto sugiere una alta capacidad de esta cepa para crecer y adaptarse en presencia de PET y TPA. La cepa 1 presentó valores intermedios, con producciones de 75.9 mg en GLC-TPA, 65.3 mg en GLC-PET y 65.5 mg en GLC, no observándose diferencias entre sustratos, pero menor crecimiento en comparación con la cepa 2. Por otra parte, no se observó crecimiento de la cepa 3 (resultado no mostrado), por lo que esta cepa fue descartada para más estudios. Mientras que la cepa 4 fue la que presentó el menor crecimiento en todas las condiciones probada, y una respuesta diferencial entre sustratos. La mayor producción de biomasa fue en GLC-TPA con 40 mg, seguido de GLC con 27.4 mg y GLC-PET con 21.1 mg y, lo cual sugiere una adaptación en medio con TPA.

El consorcio fúngico mostró una producción de biomasa similar a la cepa 1, con valores de 78.7 mg en GLC-TPA, 69.8 mg en GLC-PET y 70.67 mg en GLC, lo que sugiere que tanto el TPA o PET, no tiene efecto en el crecimiento. En conjunto, estos resultados evidencian diferencias en la capacidad de generación de biomasa entre las cepas, destacando a la cepa 2 como la más eficiente para crecer en medios con PET y TPA, mientras que la cepa 3 fue incapaz de crecer y la cepa 4 es la que genera a menor producción de biomasa en estos medios de cultivo.

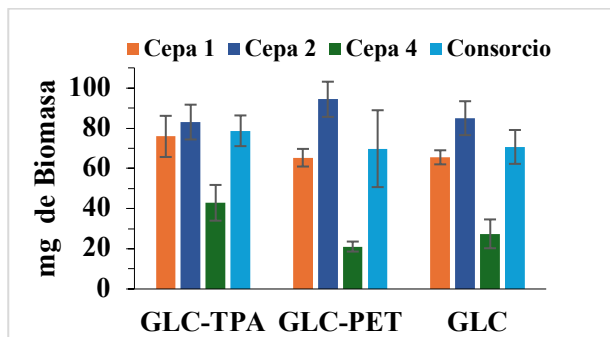


Figura 5. Producción de biomasa por las cepas 1, 2, 4 y del consorcio fúngico después de 17 días de cultivo en medios suplementados con 0.1 mg/mL de ácido tereftálico (TPA) + 10 mg/mL de glucosa, 0.1 mg/mL de PET + 10 mg/mL de glucosa, y control (glucosa a 10 mg/mL).

Determinación de proteínas extracelulares

Para examinar la capacidad la secreción de proteínas extracelulares y la posible relación con actividades enzimáticas relacionadas con la asimilación TPA y biodegradación de PET, se llevó a cabo la determinación de proteínas utilizando el método de Bradford. Para ello se utilizó una curva de calibración externa con albúmina sérica bovina (BSA) como estándar proteico. El rango de trabajo establecido fue de 0.125 a 0.625 mg/mL, dentro de una curva de regresión lineal con un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9908$, la ecuación de la curva fue $y = 1.7853x + 0.7476$. El método presentó un límite de detección (LOD) de 0.027 mg/mL y un límite de cuantificación (LOQ) de 0.090 mg/mL, por lo tanto, las muestras con concentraciones por debajo del LOQ fueron consideradas no cuantificables y, por lo tanto, excluidas del análisis comparativo. Todas las determinaciones se realizaron por triplicado

Los resultados de la cuantificación de proteínas extracelulares (Figura 6) para la cepa 2, 4 y el consorcio después de 17 días de cultivo en medios con glucosa + TPA (GLC-TPA), glucosa + PET (GLC-PET) y el control con glucosa (GLC), reportando también sus respectivas desviaciones estándar. En los resultados presentados en la Figura 6, se observa que la cepa 2 produjo las mayores concentraciones de proteína en todas las condiciones evaluadas, alcanzando una producción de valor promedio de 0.167 mg/mL en el medio GLC-PET, seguido por 0.148 mg/mL en GLC y 0.109 mg/mL en GLC-TPA. La cepa 4 alcanzó la mayor concentración proteína (0.162 mg/mL) en el medio GLC-TPA, mientras que en GLC-PET y GLC presentó niveles similares de proteína (0.099 y 0.096 mg/mL, respectivamente). Estos resultados sugieren que la presencia de TPA podría inducir la producción de enzimas para degradar el TPA. El consorcio presentó concentraciones similares de proteína entre condiciones analizadas (valores entre 0.125 y 0.143 mg/mL), no observándose efecto inductor entre las condiciones. Cabe señalar que la cepa 1 no fue incluida en la gráfica de la Figura 6, ya que presentó concentraciones de proteína por debajo del LOQ del método de Bradford utilizado. Este resultado indica que esta cepa secreta menos proteínas en el medio extracelular

En resumen, con estos resultados se observan diferencias en la producción de proteínas extracelulares entre las cepas evaluadas y las condiciones de cultivo evaluadas, sugiriendo que la cepa 2 podría secretar más proteínas en presencia de PET comparado con TPA y el control; mientras que la cepa 4, secreta más proteínas en medio con TPA. Estos resultados podrían sentar las bases para realizar posteriormente ensayos de actividades enzimáticas y relacionarlos con su capacidad de biodegradación de PET y TPA en las cepas analizadas

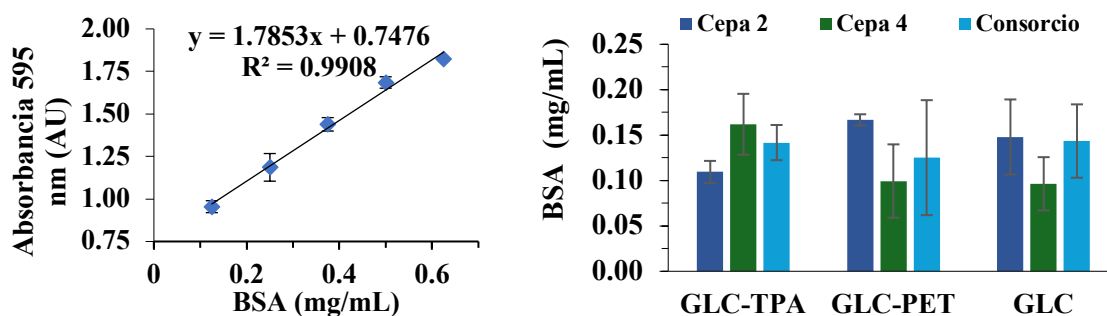


Figura 6. Determinación cuantitativa de proteínas extracelulares en medios de cultivo fúngico mediante el método colorimétrico de Bradford a 595 nm.

Consumo de glucosa (método DNS)

El diseño experimental consistió en la adición de glucosa al 1 % (m/v) como fuente de carbono fácilmente asimilable en todas las condiciones, con el fin de garantizar el crecimiento fúngico inicial y posterior utilización de sustratos más complejos como TPA o PET. Con el fin de evaluar el momento de agotamiento de glucosa y posible cambio de metabolismo para utilizar sustrato TPA y PET, se llevó a cabo el seguimiento del consumo de glucosa a lo largo de 17 días de en todos los tratamientos.

Las determinaciones se realizaron mediante calibración externa, utilizando el estándar de glucosa en un rango lineal de 0.072 a 0.72 mg/mL. La curva de calibración obtenida presentó una ecuación de regresión lineal de $y = 1.4623x - 0.0313$ y un coeficiente de correlación de $R^2 = 0.9954$, con límite de detección (LOD) fue de 0.011 mg/mL y el límite de cuantificación (LOQ) de 0.038 mg/mL.

La figura 7 presenta la cinética de consumo de glucosa por parte de diferentes cepas fúngicas (Cepa 1, Cepa 2, Cepa 4) y del consorcio en presencia de distintos tratamientos: solo glucosa (GLC), glucosa + tereftalato de ácido (GLC-TPA), y glucosa + PET (GLC-PET). La cepa 1 como la cepa 2 y el consorcio presentaron el consumo total de glucosa al cabo de 10 días en todas condiciones de cultivo. En contraste, la cepa 4 mostró una cinética de consumo más lento frente a la cepa 1 y 2 y el consorcio, presentando el agotamiento de glucosa total hasta los 17 días de cultivo. Por otra parte, la presencia de TPA y PET, no se mostró alteración en el consumo de glucosa en todos los tratamientos analizados, lo que descarta un efecto inhibitorio por estos sustratos.

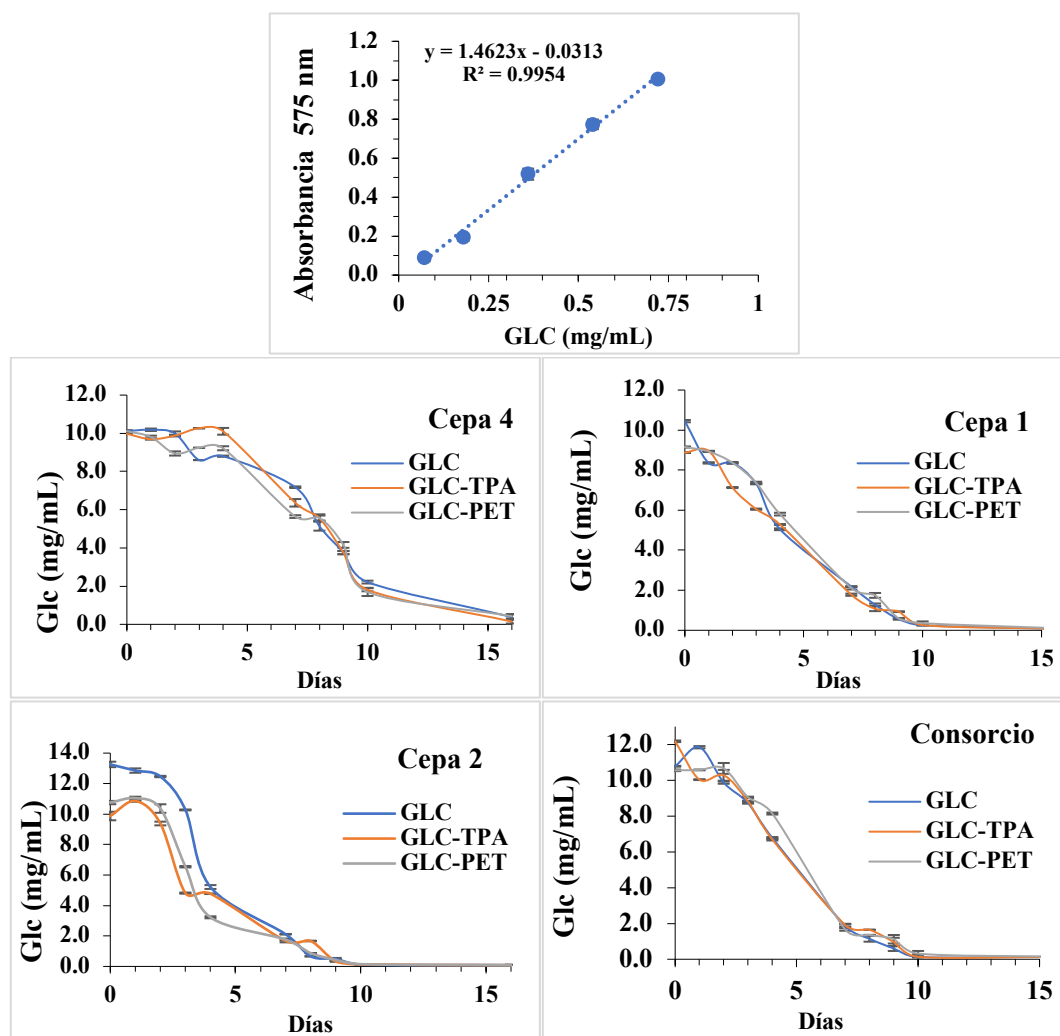


Figura 7. Determinación espectrofotométrica de glucosa en medios de cultivo fúngico mediante la reacción redox con ácido 3,5-dinitrosalicílico (DNS).

Degradación de TPA (Espectrofotométricamente a $\lambda = 242$ nm)

La evaluación de la degradación de ácido tereftálico (TPA) se realizó mediante espectrofotometría UV a 242 nm, una longitud de onda característica del anillo aromático presente en TPA. La curva de calibración mostró una linealidad excelente ($R^2 = 0.9998$), un bajo límite de detección ($LOD = 0.003$ mg/mL) y límite de cuantificación ($LOQ = 0.012$ mg/mL), lo que confirma la confiabilidad del método analítico en soluciones estándares. Adicionalmente, el análisis del comportamiento espectrofotométrico del TPA en función del pH muestra una estabilidad de la señal a partir de pH 4, lo que valida las lecturas obtenidas en condiciones fisiológicas de cultivo.

En la figura 8, se presenta las gráficas de determinación de TPA en los cultivos fúngicos individuales de la cepa 1, cepa 2 y cepa 4, así como en consorcio en medio con GLC, GLC-TPA y GLC-PET. A diferencia de lo esperado en el medio con GLC-TPA, no se observó una clara disminución conforme pasa el tiempo e inclusive se observa un aumento en los valores de concentración en todos los tratamientos a partir del décimo día. Además, en los controles GLC o GLC-PET, se observó también un aumento en los valores después de los 10 días.

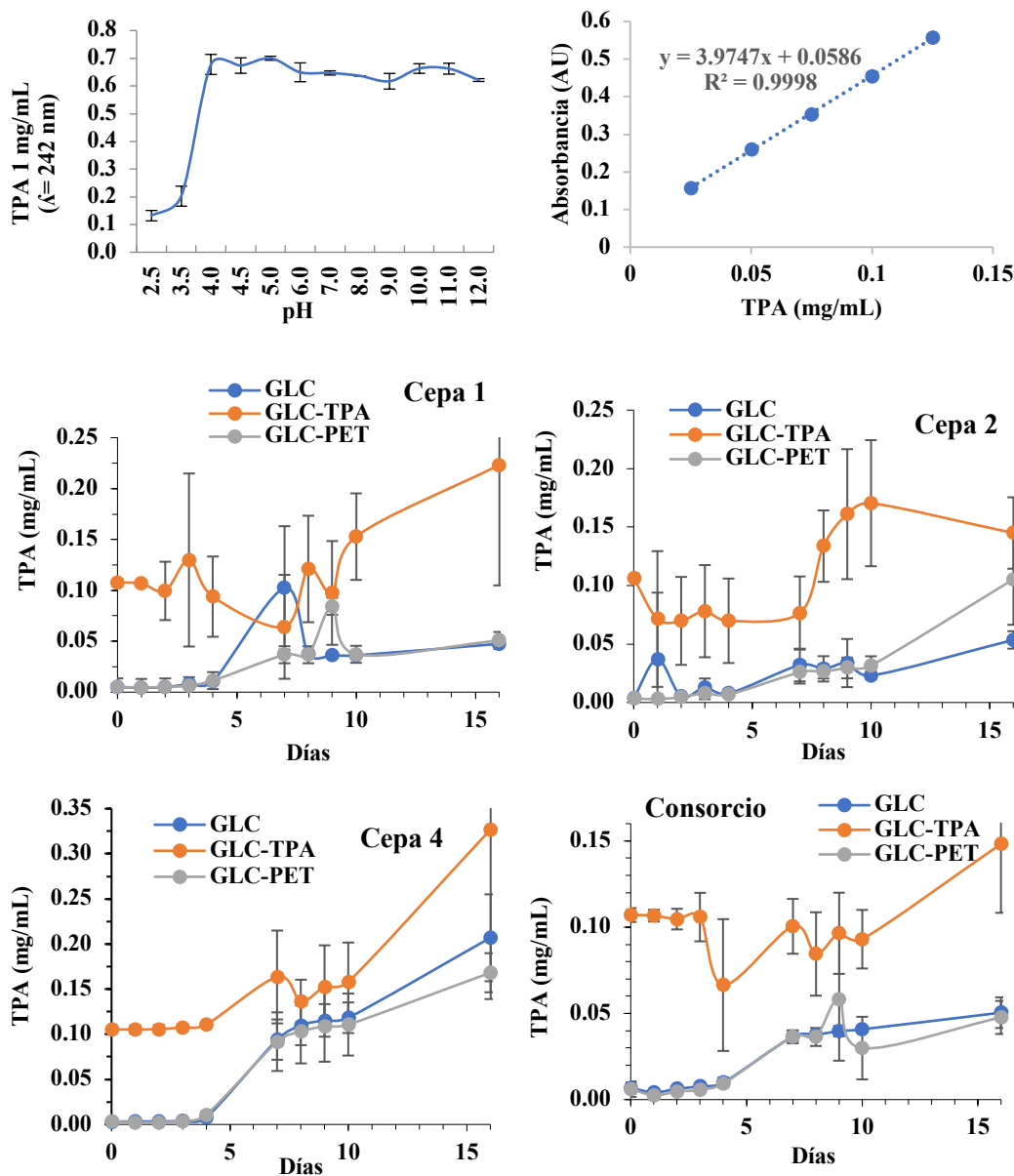


Figura 8. Determinación de TPA (método espectrofotométrico directo).

Un aspecto importante para considerar en el método para determinar la concentración de TPA directamente midiendo absorbancia a 242 nm de los cultivos, es la posible interferencias fisiológicas y analíticas cuando se adquiere en el rango UV, ya la absorbancia en esta región no es exclusiva del TPA, ya que otros compuestos aromáticos intermedios del metabolismo fúngico o productos de degradación parcial del PET, como mono-(2-hidroxietil) tereftalato (MHET) o bis-(2-hidroxietil) tereftalato (BHET) pueden absorber en esta región del espectro UV. Por lo tanto, el aumento en la absorbancia a 242 nm observado puede tener inferencias, y las variaciones en los valores de absorción no necesariamente implica una acumulación

exclusiva de TPA, sino que también puede reflejar la formación de metabolitos intermediarios derivados aromáticos por el crecimiento de las cepas o el hongo. A pesar de esta falta de especificidad, se optó por este procedimiento como primera aproximación para evaluar la degradación de TPA y PET.

Para evaluar las posibles interferencias en el método para la determinación de TPA a λ 241 nm, se realizó la adquisición de los espectros de absorción en el rango UV (200 y 400 nm), cuyos resultados se presenta en la Figura 9. Las diferencias en los perfiles espectrales entre tratamientos y cepas sugieren la presencia de distintos compuestos aromáticos a lo largo del experimento, apoyando la hipótesis de que la señal a 242 nm puede estar compuesta por una mezcla de TPA y sus derivados. Este enfoque espectral complementario sugiere la necesidad de realizar las determinaciones de TPA mediante HPLC-UV o HPLC-MS debido la complejidad de la matriz, la cual aumenta conforme pasa el tiempo de incubación. Finalmente se puede observar que las diferencias entre los espectros de las diferentes cepas y tratamiento son debido principalmente por la producción de diferentes metabolitos que absorben en esta región

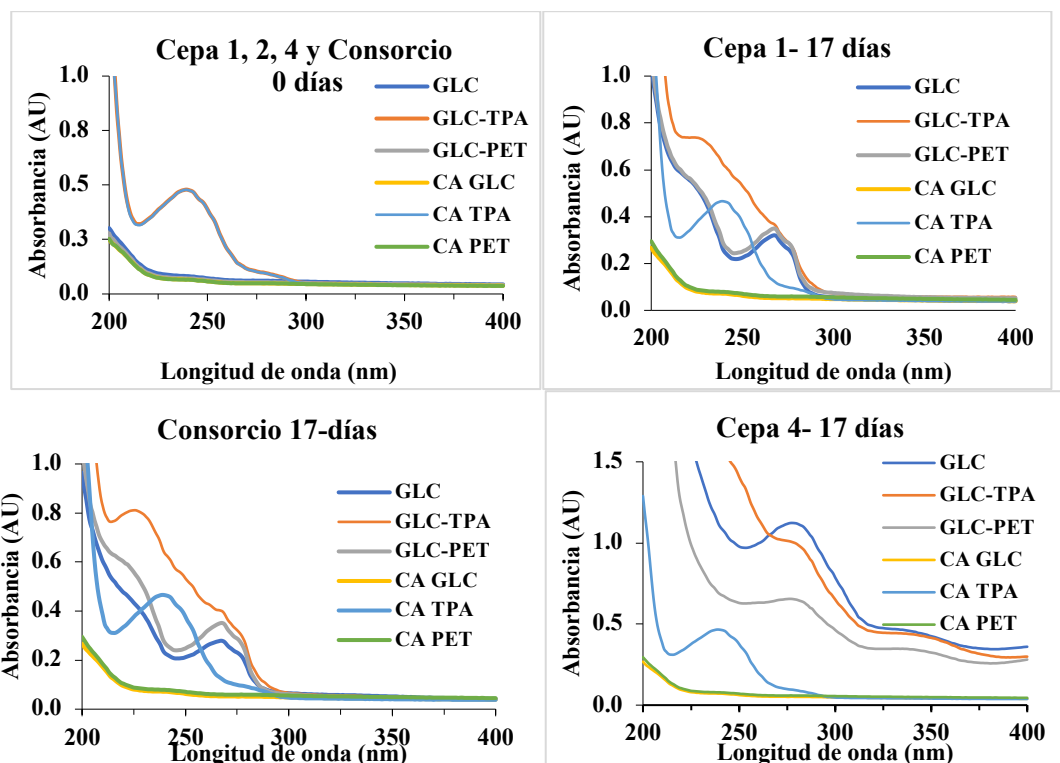


Figura 9. Análisis espectrofotométrico de la degradación del TPA y PET por cepas individuales y consorcio durante al inicio y al final del experimento

Conclusiones

Los resultados obtenidos en este estudio generaron datos que permitieron avanzar en la caracterización del potencial de biodegradación de TPA y PET por parte del consorcio fúngico aislado previamente de envases plásticos. Mediante espectrometría de masas MALDI-TOF-Biotyper se logró identificar a nivel de especie a dos de los cuatro aislados que conforma el consorcio: la Cepa 1 identificada como *F. proliferatum* y la Cepa 2 como *F. verticillioides*. Esta información es importante para estudios futuro en el aspecto proteómico y para estudios comparativos con cepas de referencia.

La Cepa 2 demostró el mejor crecimiento en todos los tratamientos (GLC, GLC-TPA y GLCPET), seguida por la Cepa 1 y el consorcio fúngico. Adicionalmente, la Cepa 2 presentó la mayor concentración de proteínas en medio GLC-PET, sugiriendo una respuesta hacia el sustrato PET y una potencial producción de enzimas como cutinasas o hidrolasas. Mientras que la Cepa 3 fue descartada al no presentar crecimiento detectable en

ninguna condición evaluada. Mientras que la Cepa 4 presentó un comportamiento diferencial de acuerdo con el sustrato, observándose el doble de crecimiento en medio GIC-TPA y mayor producción de proteína en comparación con GLC-PET y GLC, lo que sugiere una respuesta metabólica específica frente al ácido tereftálico.

Por otra parte, el consumo de glucosa al 1 % fue total a los 10 días cultivo para las cepas C1, C2 y el consorcio, mientras que la cepa 4 requirió 17 días, y no se observó ningún efecto inhibitorio por la presencia de TPA o PET. Estos resultados sugieren que una vez agotada la glucosa, las cepas (especialmente C2 y C4) podrían activar su metabolismo para utilizar TPA/PET,

Dado que el método de determinación directa de TPA en el medio de cultivo (Espectrofotométricamente a $\lambda = 242$ nm) presentó interferencias debido al aumento en la aparición de señales en regiones del espectro UV, por lo que es necesario emplear técnicas cromatográficas más precisas (HPLC) que permitan discriminar entre el TPA y otros metabolitos aromáticos producidos durante la degradación. La adquisición de espectros de la región UV (200- 400 nm) confirmó la producción de diversos metabolitos que absorben en este rango, sugiriendo la necesidad de realizar estudios metabólicos empleando técnicas de separación especializadas para eliminar las posibles interferencias de matriz.

Bibliografía

- Amobonye, A., Bhagwat, P., Singh, S., & Pillai, S. (2021). Plastic biodegradation: Frontline microbes and their enzymes. *Sci Total Environ*, 759, 143536. doi:10.1016/j.scitotenv.2020.143536
- Ayalde Valderrama, M. (2022). Obtención de BHET a partir de residuos de botellas plásticas de PET mediante glicólisis catalizada con ceniza de cáscara de naranja.
- Europe, P., & EPRO. (2023). Plastics – the Facts 2023: An analysis of European plastics production, demand and waste data. *Plastics shape the future*.
- Kotnis, S., Gulati, S., Sun, Q. J. B., & Bioengineering. (2025). High-Efficiency PET Degradation With a Duo-Enzyme System Immobilized on Magnetic Nanoparticles. 122(6), 1397-1401.
- Magana-Maldonado, L. M., Wrobel, K., Espinoza Cruz, T. L., Yanez Barrientos, E., Corrales Escobosa, A. R., & Wrobel, K. (2023). Application of hydride generation - microwave plasma - atomic emission spectrometry and partial least squares regression for the determination of antimony directly in water and in PET after alkaline methanolysis. *Chemosphere*, 313, 137316. doi:10.1016/j.chemosphere.2022.137316
- Restrepo-Flórez, J.-M., Bassi, A., & Thompson, M. R. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene – A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 83-90. doi:10.1016/j.ibiod.2013.12.014