



## DETERMINACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE POLÍMEROS PLÁSTICOS Y CELULÓSICOS POR DOS AISLADOS FÚNGICOS EN CO-CULTIVO

Christian Sujham Silva Rodríguez<sup>1</sup>, Lériida Liss Flores Villavicencio<sup>1</sup>, Juan Magaña Martínez<sup>1</sup>, José Pedro Castruita Domínguez<sup>2</sup>, Patricia Ponce Noyola<sup>1</sup>, Julio César Villagómez Castro<sup>1\*</sup>

cs.silvarodriguez@ugto.mx, \*castroj@ugto.mx

<sup>1</sup>Departamento de Biología, DCNE campus Guanajuato, Universidad de Guanajuato.

<sup>2</sup>Departamento de Ecología, CUCBA, Universidad de Guadalajara.

### Resumen

Los procesos físicos y químicos no son suficientes para disponer de los polímeros naturales y plásticos, por lo que resulta atractiva la búsqueda de microorganismos capaces de degradarlos, dando lugar a una intensa investigación en el campo de la biorremediación, que representa una esperanza alentadora para la problemática de los plásticos. En este sentido, hemos recuperado un consorcio fúngico del cual se han aislado diferentes hongos, algunos de ellos con la capacidad para degradar PET (tereftalato de polietileno). En este estudio presentamos los resultados del análisis del co-cultivo de dos de los aislados (denominados A2 y A3), en cuanto a su capacidad de degradación de polímeros sintéticos y naturales. Se realizó una caracterización macroscópica de ambos aislados, en diferentes medios de cultivo (PDA, YPD y MMM). En el caso de la caracterización microscópica, se utilizó la técnica de microcultivo y posterior tinción con azul de lactofenol y blanco de calcofluor. Las muestras fueron observadas en microscopia de campo claro y epifluorescencia. Los aislados fúngicos, en co-cultivo, se inocularon en MMM en presencia de polímeros celulósicos (celofán dulce, carboximetilcelulosa y celulosa cristalina) o polímeros plásticos (tereftalato de polietileno, poliestireno, polietileno de alta densidad y celofán amargo o polietileno de baja densidad). Los cultivos fúngicos se realizaron por inóculo de un bocado (5 mm de diámetro) de cada uno de los aislados en matraces de 25 mL conteniendo 8 mL de medio de cultivo adicionado del polímero a estudiar. La incubación se realizó a 28 °C, 125 rpm, 15 días. Al término de ésta, las muestras se centrifugaron a 2655 g, durante 10 minutos a 4 °C. En la fracción libre de células se determinó el perfil total de proteínas secretadas (SDS-PAGE, 10%) y la actividad secretada de las glicosidasas utilizando sustratos acoplados a 4-metilumbeliferona (4-MU-glucósido, 4-MU-celobiósido), la fluorescencia liberada se determinó a una longitud de onda de excitación y emisión de 350 y 440 nm, respectivamente y se cuantificó con una curva de calibración de 4-MU. La morfología en los dos aislados indican la presencia de micelio con hifas hialinas y septadas, así como estructuras de conidióforos, métula, fiálides y conidios



esféricos. El análisis del perfil total de las proteínas secretadas en el aislado A2, mostró dos bandas de proteína secretadas de 66 y 76 kDa independientemente de la fuente de carbono y el aislado A3, cultivado con los polímeros sintéticos, proteínas de 66 y 76 kDa. En cambio, en los cultivos con los polímeros celulósicos se observaron bandas de 37, 51, 58, 66, 76 y 103 kDa. Al analizar la secreción de proteínas en los cultivos A2 y A3, se observó un incremento en la secreción de proteínas de manera diferencial, dependiendo de la fuente de carbono adicionada al MMM.; comportamiento diferencial que también se manifestó en la determinación de actividad enzimática (celobiosidasa y  $\beta$ -glucosidasa), resultando la carboximetilcelulosa el mejor sustrato para inducir las. Consideramos que el avance en el estudio bioquímico de las actividades enzimáticas y la caracterización molecular de estos aislados fúngicos capaces de degradar polímeros naturales y sintéticos, será de relevancia en el impacto ecológico.

*Palabras clave: Polímeros; Hongos; Biorremediación; Degradación; Actividad enzimática.*

## **DETERMINATION OF THE DEGRADATION OF PLASTIC AND CELLULOSIC POLYMERS BY TWO FUNGAL ISOLATES IN CO-CULTURE**

### **Abstract**

Physical and chemical processes are not sufficient to dispose of natural and plastic polymers, so the search for microorganisms capable of degrading them is attractive, giving rise to intense research in the field of bioremediation, which represents an encouraging hope for the problem of plastics. In this sense, we have recovered a fungal consortium from which different fungi have been isolated, some of them with the ability to degrade PET (polyethylene terephthalate). In this study we present the results of the analysis of the co-culture of two of the isolates (named A2 and A3), in terms of their ability to degrade synthetic and cellulosic polymers. A macroscopic characterization of both isolates was performed in different culture media (PDA, YPD and MMM). In the case of microscopic characterization, the technique of microculture and subsequent staining with lactophenol blue and calcofluor white was used. The samples were observed under brightfield and epifluorescence microscopy. Fungal isolates, in co-culture, were inoculated into MMM in the presence of cellulosic polymers (sweet cellophane, carboxymethyl cellulose and crystalline cellulose) or plastic polymers (polyethylene terephthalate, polystyrene, high-density polyethylene and bitter cellophane or low-density polyethylene). Fungal cultures were performed by inoculating a bite (5 mm in diameter) of



each of the isolates in 25 mL flasks containing 8 mL of culture medium with the polymer to be studied. Incubation was carried out at 28 °C, 125 rpm, 15 days. At the end of incubation, the samples were centrifuged at 2655 g for 10 minutes at 4 °C. In the cell-free fraction, the total secreted protein profile (SDS-PAGE 10%) and the secreted glycosidase activity were determined using 4-methylumbelliferone-coupled substrates (4-MU-glucoside, 4-MU-cellobioside), the released fluorescence was determined at an excitation and emission wavelength of 350 and 440nm, respectively and quantified with a 4-MU calibration curve. The morphology of the two isolates indicates the presence of mycelium with hyaline and septate hyphae, as well as conidiophore structure, métula, phialides, and spherical conidia. Analysis of the total profile of secreted proteins in isolate A2, showed two secreted protein bands of 66 and 76 kDa independently of the carbon source and isolate A3, cultured with the plastic polymers, proteins of 66 and 76 kDa. In contrast, bands of 37, 51, 58, 66, 76, and 103 kDa were observed in cultures with cellulosic polymers. When analyzing protein secretion in cultures A2 and A3, an increase in protein secretion was observed differentially, depending on the carbon source added to the MMM; differential behavior that was also manifested in the determination of enzymatic activity (cellobiosidase and  $\beta$ -glucosidase), with carboxymethylcellulose being the best substrate for inducing them. We consider that progress in the biochemical study of enzymatic activities and molecular characterization of these fungal isolates capable of degrading natural and synthetic polymers will be of relevance in the ecological impact.

*Keywords: Polymers; Fungi; Bioremediation; Bioremediation; Degradation; Enzyme activity.*

## 1. INTRODUCCIÓN

La sobreproducción y acumulación de polímeros plásticos es un problema que atañe a la población mundial, esta problemática aumenta con el crecimiento de la población todos los días. El Instituto Nacional de Geografía y Estadística reportó que, en el 2018 de los desechos generados en México, el 42% correspondía a algún tipo de plástico

(INEGI, 2021). En este sentido, entre la búsqueda de soluciones factibles que no dañen al ambiente, la biorremediación se presenta como una alternativa bastante atractiva para dar solución a este problema, refiriéndose a la aplicación de bacterias, hongos, plantas o las enzimas resultantes de estos para la restauración del ambiente (Garzón y col., 2017; Fecker y col., 2018; Falah y col., 2020). Además, se pretende que con estas estrategias no se generen más subproductos contaminantes ni mayor



huella de carbono, así como la reducción del tiempo y costos.

Se ha reportado que, para la degradación de los polímeros plásticos el primer mecanismo involucrado es la adhesión y colonización a la superficie polimérica. Posteriormente, inicia la hidrólisis del polímero, para ello, enzimas secretadas como lipasas, cutinasas y esterases secretadas por los microorganismos participan en la modificación del polímero (Wei, R. & Zimmermann, W., 2017). Particularmente, se ha reportado una pérdida de peso del 97%, aproximadamente, de PET amorfo, por una cutinasa secretada por el hongo *Thermomyces insolens* (*Humicola insolens*) (Wei & Zimmermann, 2017). Por otra parte, en *Ideonella sakaiensis* se logró aislar una PETasa que muestra una elevada actividad y especificidad en la degradación del PET, teniendo un mejor rendimiento al degradar este polímero, ofreciendo una diferencia en comparación con las cutinasas o lipasas (Joo, y col., 2018).

A este respecto, en el grupo de investigación se han aislados hongos de un consorcio que se desarrolló en una

suspensión acuosa de polietilentereftalato (PET) pulverizado. Actualmente, se analizan los aislados fúngicos del consorcio, para determinar su capacidad de biodegradación de polímeros plásticos y celulósicos (Ruano & Villagómez, 2018; Gutiérrez Vicencio y col., 2018; Silva-Rodríguez, 2019), identificando que uno de los aislados (denominado A4) pertenece al género *Talaromyces* y caracterizada dentro de la especie *amestolkiae* con base a su morfología y a 3 marcadores moleculares (Pérez-Méndez, 2021). Este aislado, presenta una elevada actividad degradativa de compuestos como la celulosa y sus derivados industriales como celofán dulce, carboximetilcelulosa y Avicel (Magaña-Martínez y col., 2022; Pérez-Méndez, 2021), indicando la presencia de celulasas. En este contexto, es relevante la actividad enzimática encontrada en este aislado, ya que las celulasas tienen un alto potencial de aplicación en diversas industrias incluyendo la industria papelera, la textil, de detergentes, de alimentos (Kuhad, y col., 2011), cosmética, (Gutiérrez-Rojas, y col., 2005) principalmente.

En este trabajo, se presentan los resultados obtenidos de la capacidad de degradación



de polímeros plásticos y celulósicos de un co-cultivo de 2 aislados fúngicos del consorcio denominados A2 y A3 con el fin de determinar si existe sinergia en cuanto a su actividad celulolítica, determinada previamente en cultivos individuales (Magaña-Martínez J., y col., 2022).

## 2. METODOLOGÍA

### 2.1 Caracterización Macroscópica y Microscópica

Se sembró un bocado de 5 mm para ambos aislados cultivándolos por 8 días a 28°C en medio agar papa dextrosa (PDA); medio mínimo de Mathur con pH 4.5 (MMM) y medio dextrosa-peptona-extracto de levadura con pH 4.5 (YPD). A la par se registraron los datos de crecimiento y se realizó la caracterización macroscópica. Por otra parte, se realizó un microcultivo de ambos aislados fúngicos para analizar la morfología microscópica mediante tinción de azul de algodón y blanco de calcofluor y se observó en un microscopio de epifluorescencia (Leica DMLS) con una cámara AxioCam ICc1 (Carl Zeiss) usando el filtro UV Excitación-Emisión: 400-420 nm.

### 2.2 Cultivo de los aislados en MMM con polímeros sintéticos y naturales

Una vez finalizada la caracterización macroscópica de los aislados, se tomó un bocado de 5 mm de diámetro de ambos aislados en MMM para crecerlos en co-cultivo con 8 mL de MMM líquido, pH 4.5 a 28°C y 125 rpm por 15 días como se muestra en la Figura 2, adicionando como fuentes de carbono un control de glucosa (GLC, 0.1% p/v) o polímeros plásticos o celulósicos (0.1% p/v), tales como: celulosa cristalina (CEL), carboximetilcelulosa (CMC), celofán dulce (CD), celofán amargo (CA, polietileno de baja densidad) polietileno de alta densidad (PE), poliestireno (PS) y tereftalato de polietileno (PET). Una vez concluida la incubación, se centrifugaron las muestras a 2655 g por 10 minutos y 4°C, obteniendo una pastilla y un sobrenadante (SN), el SN fue alicuotado y almacenado a -20°C para su posterior análisis.

### 2.3 Electroforesis en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE 10%).

Al SN del co-cultivo, en cada condición de crecimiento, se les realizó una electroforesis en condiciones desnaturizantes, en geles de



poliacrilamida al 10 %. Las condiciones para la separación de las proteínas se realizaron a 100 V / 1.5 h a temperatura ambiente, al término de la electroforesis el gel fue teñido con plata.

#### 2.4 Actividad enzimática secretada

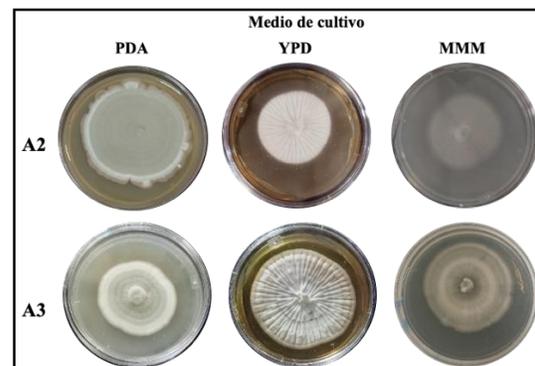
En el SN se determinó la proteína mediante el método de Lowry, empleando albúmina de suero bovino (BSA) como referencia. Las mediciones se llevaron a cabo a 750 nm en un espectrómetro Epoch BioTek. Posteriormente, se determinó la actividad enzimática de  $\beta$ -glucosidasa y celobiosidasa usando como sustratos: 4-metilumbeliferil-glucósido (4-MUG) y 4-metilumbeliferil-celobiosido (4-MUC); para ello se utilizó el sustrato a concentración 0.1  $\mu$ M y volúmenes variables del sobrenadante en solución amortiguadora de citrato-fosfato 0.1 M pH 4.5. Se incubó la reacción 30 min a 45°C. Una vez terminada la incubación, la reacción se paró por adición de 2 mL de solución amortiguadora de bicarbonato de sodio-hidróxido de sodio, 0.1 M pH 10.4 y la fluorescencia liberada se determinó a una longitud de onda Excitación - Emisión: 350 y 440 nm, respectivamente,

utilizando un espectrofluorómetro Perkin-Elmer LS-5.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

#### 3.1 Características morfológicas de los aislados fúngicos A2 y A3.

La caracterización macroscópica de los aislados nos permitió apreciar que existen similitudes entre los dos aislados dependiendo del medio de cultivo (Fig. 1).



**Figura 1.** Morfología macroscópica de los aislados A2 y A3 crecidos en diferentes medios de cultivo pH 4.5 a 28 °C durante 7 días. PDA (agar papa dextrosa), YPD (extracto de levadura de peptona y dextrosa) y MMM (Medio Mínimo de Mathur sales).

En YPD ambos aislados presentan una coloración blanca algodonosa con surcos y una elevación; en este medio se presentó el crecimiento más acelerado para los 2 aislados. Por otro lado, en los medios MMM y PDA se observó un menor desarrollo fúngico, siendo en este último

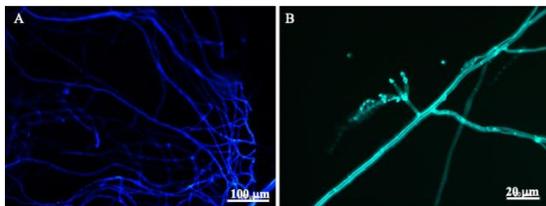


donde presentaron el menor índice de crecimiento, presentando coloraciones similares, pero cambios en la superficie, forma y borde de las colonias.

**Tabla 1.** Caracterización macroscópica de los aislados A2 y A3.

	Medio	Forma	Elevación	Borde	Superficie	Color
A2	YPD	Irregular	Elevada	Lisa	Con surcos	Blanco algodonoso
	MMM	Irregular	Plana	Lisa	En sectores	Verde grisáceo
	PDA	Filamentosa	Plana	Lobulado	En sectores	Verde grisáceo y blanco
A3	YPD	Irregular	Elevada	Lisa	Con surcos	Blanco algodonoso
	MMM	Semicircular	Plana	Lisa	En sectores	Verde grisáceo y blanco
	PDA	Filamentosa	Plana	Lisa	En sectores	Blanco y verde grisáceo

Con respecto a la morfología microscópica, los aislados A2 y A3 presentaron micelio septado y en A3 se pudieron apreciar estructuras de conidióforos, con esporas redondas (Figura 2).

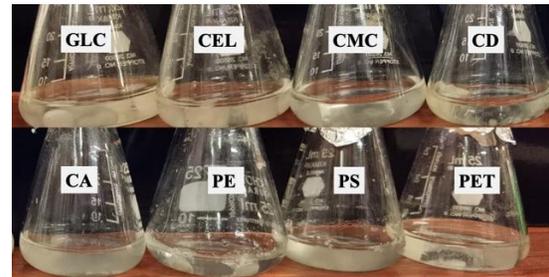


**Figura 2.** Características microscópicas de los aislados A2 y A3. A. Micelio septado de A2. B. Se observan estructuras de conidióforos con micelio septado en A3. Tinción con blanco de calcofluor.

### 3.2 Características del co-cultivo de los aislados A2 y A3.

En el co-cultivo de los aislados A2 y A3 con los polímeros, se observó la formación de la biomasa en la superficie del

polímero, independientemente de su naturaleza, además se observó la adhesión de los aislados A2 y A3 a los mismos (Figura 3).



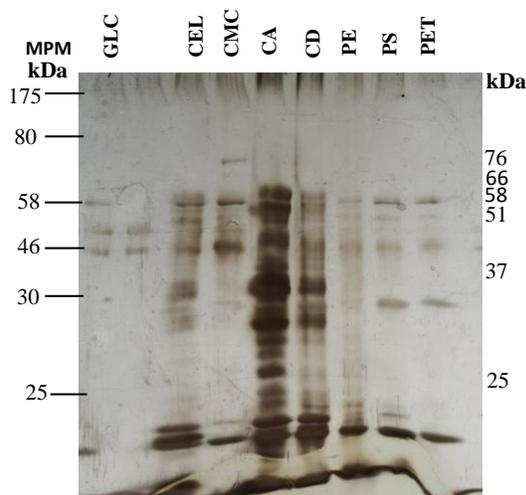
**Figura 3.** Co-cultivo de A2 y A3 a los 15 días a 28°C / 125 rpm, en MMM con polímeros naturales o sintéticos estos son Glucosa (GLC), Celulosa (CEL), Carboximetilcelulosa (CMC), Celofán dulce (CD), Celofán amargo (CA), Polietileno (PE), Poliestireno (PS) y Polietilen-tereftalato (PET).

### 3.3 Patrón electroforético de las proteínas secretadas en el co-cultivo de A2 y A3 en polímeros plásticos y celulósicos.

En un estudio previo, se analizó que la secreción de proteínas de los aislados A2 y A3 cultivados de manera independiente en los diferentes polímeros plásticos y celulósicos, donde se observó la secreción de proteínas de 76 y 66 kDa en el aislado A2 y de 103, 76, 66, 58, 51 y 37 kDa en el aislado A3 (Magaña Martínez J. y col., 2022). Por otro lado, los resultados en el co-cultivo de A2 y A3 mostraron una



mayor cantidad de proteínas secretadas en el rango de 76 - 25 kDa. Además de un bandeo diferencial dependiente del polímero usado como fuente de carbono (Figura 4), que se caracterizó por la mayor secreción de proteínas en el cultivo con celofán amargo (CA) seguido del hongo cultivado en celofán dulce (CD).



**Figura 4.** Proteínas secretadas en el co-cultivo de A2 y A3 con polímeros plásticos y celulósicos. SDS-PAGE 10%, teñido con nitrato de plata. MPM. Marcador de peso molecular.

### 3.4 Determinación de la actividad enzimática secretada del co-cultivo A2 y A3 en polímeros plásticos y celulósicos.

Independientemente de que el co-cultivo A2 y A3 creció en los diferentes polímeros celulósicos y plásticos (Fig. 2), los resultados de la determinación de la actividad enzimática secretada (Tabla 2),

utilizando el sustrato 4-MU-glucósido mostraron actividad de  $\beta$ -glucosidasa en las fuentes de carbono de CEL, CMC, CA, PE y PS. En contraste, cuando se utilizó el sustrato 4-MU-celobiósido, se determinó la actividad enzimática de celobiosidasa en todos los sustratos celulósicos (CEL, CMC, y CD) y sólo en el polímero plástico: celofán amargo (CA).

**Tabla 2.** Determinación de la actividad enzimática secretada del co-cultivo de A2 y A3 para  $\beta$ -Glucosidasa y Celobiosidasa utilizando los sustratos 4-MU-glucósido y 4-MU-celobiósido respectivamente. ND = No detectado

	$\beta$ -Glucosidasa	Celobiosidasa
Fuente de carbono	Actividad (nmoles/ $\mu$ L)	Actividad (nmoles/ $\mu$ L)
GLC	ND	ND
Cel	0.193	0.169
CMC	0.898	0.441
CD	ND	0.390
CA	0.016	0.358
PE	0.168	ND
PS	0.041	ND
PET	ND	ND



#### 4. CONCLUSIONES

En el co-cultivo de A2 y A3, se observó un patrón diferencial en la secreción de proteínas, con respecto a la secreción de proteínas en cultivos individuales (Magaña-Martínez J. y col., 2022). La actividad enzimática secretada se observó en sustratos como CEL, CMC, CD, CA, PE y PS; indicando estos resultados la presencia de enzimas celulolíticas. Sin embargo, el crecimiento en presencia de polímeros plásticos no puede ser explicado con estos resultados. Sugiriendo que tanto en el consorcio fúngico inicial, como en el co-cultivo de A2 y A3, cada organismo participa para favorecer su crecimiento en presencia de polímeros plásticos o celulósicos. Se requiere un estudio bioquímico más amplio de las enzimas secretadas por ambos microorganismos, tanto en condiciones individuales y en co-cultivo, así como el de todos los miembros del consorcio inicial, con el fin de determinar si cada uno de los aislados fúngicos tiene una posible aplicación biotecnológica en un futuro, o bien, si es necesario el co-cultivo de ellos.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Garzón, J. M., Rodríguez Miranda, J. P., & Hernández Gómez, C. (2017). Aporte de la biorremediación para solucionar problemas de contaminación y su relación con el desarrollo sostenible. *Universidad y Salud*, 19(2), 309. <https://doi.org/10.22267/rus.171902.93>

Gutiérrez Vicencio, J. P., Flores Villavicencio, L. L., & Villagómez Castro, J. C. (2018). Estudio de la degradación de PET por consorcios fúngicos. *Jóvenes en la Ciencia* 4(1).

Gutiérrez Roja, I. Moreno Sarmiento N. & Montoya Dolly. (2015). Mecanismos y regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Revista Iberoamericana de Micología*, 32(1), 1-12.

INEGI. (2021). Medio ambiente. Cuéntame de México. <https://cuentame.inegi.org.mx/territorio/ambiente/basura.aspx?tema=T>

Joo, S., Cho, I. J., Seo, H., Son, H. F., Sagong, H. Y., Shin, T. J., Choi, S. Y., Lee, S. Y., & Kim, K. J. (2018). Structural insight into molecular mechanism of poly(ethylene terephthalate) degradation. *Nature communications*, 9(1), 382.

Kuhad, R. C., Gupta, R., & Singh, A. (2011). Microbial cellulases and their industrial applications. *Enzyme research*, 280696.



Magaña Martínez, J., Cendejas Mares, X. L., Martínez Gallardo, R. A., Aguilera Domínguez, S., Flores Villavicencio, L. L., & Villagómez Castro, J. C. (2022). Caracterización de aislados fúngicos en medio mínimo de Mathur adicionado con diferentes polímeros naturales y sintéticos. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 16

Pérez Méndez, M.L., (2019). Caracterización bioquímica y molecular de diferentes aislados fúngicos, Tesis de Licenciatura: Biología experimental, Universidad de Guanajuato

Ruano Najarro, M. J., & Villagómez Castro, J. C. (2018). Estudio de la degradación de PET por consorcios fúngicos II. *JÓVENES EN LA CIENCIA*, 4(1), 1076–1082.

Silva Rodríguez, A.V., (2019). Caracterización de microorganismos degradadores de PET, Tesis de

Licenciatura: QFB, Universidad de Guanajuato.

Fecker T., P.G., Davison-Galaz, P., Engelberger F., Narui Y., Sotomayor M., Parra L., C., Ramírez-Sarmiento S.A. (2018). Active Site Flexibility as a Hallmark for Efficient PET Degradation by *I. sakaiensis* PETase. *Biophysical Journal*, 114: 1302-1312.

Wajeaha F., Fu-Jia C., Bibi Z., Tahir H., Qaisar M., Abdolghaffar E., En-Zhong L. (2020). Active site flexibility as a hallmark for efficient PET degradation by *I. sakaiensis* PETase Polyethylene Terephthalate Degradation by Microalga *Chlorella vulgaris* Along with Pretreatment. *Materiale Plastice*, 57 (3): 260-270.

Wei, R. & Zimmermann, W. (2017). Microbial enzymes for the recycling of recalcitrant petroleum-based plastics: how far are we?. *Microbial biotechnology*, 10: 1308-1322.