

00381

lej. 3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA de MEXICO.

DIVISION de ESTUDIOS SUPERIORES

FACULTAD de CIENCIAS.

Degradación Fúngica del Acetato de Polivinilo.

Antonio García Trejo

TESIS para obtener el grado de DOCTOR en CIENCIAS,
BIOLOGIA.

México, D. F. Febrero de 1986.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

CONTENIDO

RESUMEN

INTRODUCCION

	1
Características Generales	
de los Plásticos	5
Impacto Ambiental	12

MATERIAL y METODOS

	13
Aislamiento de los Microorganismos	13
Selección de Cepas	14
Preparación del Inóculo	15
Condiciones de Cultivo	15
Determinación de pH	16
Determinación de Peso Seco	16
Determinación de Proteína	16
Determinación de Azúcares Totales	17
Determinación de DNA	17
Preparación del Extracto Enzimático	18
Determinación Cualitativa de	
la Actividad Esterásica	18
Determinación Cuantitativa de	
la Actividad Esterásica	19
Localización de la Enzima	22

Ensayo de la Viscosidad	23
Decremento en la Viscosidad del Sustrato	29

RESULTADOS

Lista de Experimentos (Evidencias)	30
Cinéticas de Crecimiento	34
Degradación del Sustrato	38
Efecto del Extracto de Levadura	43
Análisis Cualitativo y Cuantitativo de la Actividad Esterásica	48
Análisis Cualitativo de la Actividad Enzimática (Fotos)	49
Localización de la Actividad Enzimática	55
Pérdida de la Viscosidad	56

DISCUSION

La Concentración y Estructura del Polímero	57
La Proporción del Inóculo Inicial	62
La Intensidad y Tiempo de Agitación	62
El pH durante la Incubación	63
Tipo de Crecimiento del Microorganismo	63

Dinámica de las Proteínas	65
Dinámica de los Azúcares	66
Dinámica del DNA	67
La Esporulación	67
La Relación C/N	69
La Actividad Enzimática	71
Cambios en el Sustrato, Viscosidad	73
Conclusión	76
Comentario Final	77

BIBLIOGRAFIA

78 a 87

RESUMEN.-

Los plásticos son compuestos químicos que perduran en el medio ambiente por que se degradan muy lentamente o no se degradan. Los microorganismos, en especial los hongos son capaces de degradarlos aunqua en proporciones discretas. En este trabajo se muestran evidencias cuantitativas acerca de la degradación del acetato de polivinilo que se usó como sustrato. La degradación se relaciona con la fisiología de los hongos involucrados durante el proceso. También se analiza la relación C/N, las condiciones de crecimiento limitado y la acción de la esterasa que es la enzima responsable de la fragmentación inicial del polímero.

RESUME.-

Plastics are synthetic compounds able to persist in the the environment because of a slow degradation or not degradation at all. Microorganisms, specially fungi do degrade them even in small proportions. In this thesis, quantitative evidences are shown on the degradation of polyvinyl acetate used as substrate. The degradation process is related with the fungal physiology during the whole process. The C/N ratio is also analyzed and discussed, as well as the conditions of limited growth and finally the esterase role in the initial breakdown of the polymer.

INTRODUCCION

El hombre como ente biológico ha sufrido una serie de cambios morfológicos, fisiológicos y psicológicos que le han permitido sobrevivir y perpetuarlo como especie. Toda esta dinámica lenta y gradual constituye el proceso evolutivo desde su aparición — hasta nuestros días, situación que le ha permitido manifestarse como el ser racional con mayor capacidad para optimizar y explotar los recursos que le rodean.

Uno de los logros más significativos del hombre moderno ha sido el desarrollo de una tecnología química basada en la transformación de los numerosos hidrocarburos derivados del petróleo. A través de esta tecnología ha mostrado un talento especial para diseñar e introducir nuevos compuestos en la naturaleza, los cuales al surgir en el medio ambiente han tenido cierta dificultad para incorporarse a la dinámica natural del Ciclo del Carbono. Es decir, por ser extraños al medio, éste no posee los mecanismos necesarios para degradarlos o eliminarlos en forma eficiente; ello se traduce en una acumulación gradual que va incrementándose en función del tiempo, hasta llegar a considerarse — como una contaminación.

El afán de confort y bienestar que el hombre ha manifestado en las últimas tres décadas se ha reflejado en el incremento de la producción de artículos desechables y su correspondiente con

sumo. Esto a su vez ha propiciado una alarmante proliferación de desechos sólidos que contaminan el suelo y los cuerpos de agua. Entre los contaminantes más resistentes a la degradación se encuentran los plásticos. La causa principal de su persistencia estriba en su estructura molecular que ofrece escasa o nula posibilidad de reacción, debido a que los radicales reactivos están bloqueados por las fuerzas intermoleculares del polímero ³⁰. Además de la estructura, el complejo molecular resulta ser altamente hidrofóbico. Estas características hacen que los plásticos se degraden en forma casi imperceptible, de tal manera que la velocidad con que se degradan estos polímeros es infinitamente menor a la magnitud con que aparecen en el ambiente, generándose así la contaminación. Para evitarla, se ha recurrido a diversas alternativas, tales como la incineración, la reducción a partículas de menor tamaño seguidas de un reproceso o una combustión ¹, el relleno sanitario, la reclamación y circulación en otro tipo de artículos y tubería de uso inespecífico, ^{2,3}. Inclusive, algunas compañías transnacionales consideran a los plásticos como un excelente material energético en el suministro de calor y electricidad ⁴, todos estos procedimientos aún están en desarrollo; es posible que estén optimizados, solo que al parecer, los costos de operación son bastante elevados por ahora, poco prácticos (mano de obra, costo de combustibles, transporte, tiempo, contaminación por humos, polvos y partículas indeseables, etc.).

Es un hecho que la contaminación por plásticos es un problema mundial especialmente en aquellos países con mayor capacidad de consumo; sin embargo, otros que no son fuente de contaminación también se han visto afectados por la dispersión de estos materiales ⁵. El hecho de que sean muy ligeros les permite flotar y dejarse llevar hasta sitios muy lejanos con respecto a su lugar de origen, ^{6,7} .

Es natural que la contaminación a "control remoto" persista en las aguas superficiales y cause estragos en la fauna marina. De hecho, ya se han reportado algunos casos de daño mecánico (oclusión y asfixia) en peces, ^{8,9,10}.

Ante toda esta problemática tan compleja, el hombre en un afán de redimirse ha orientado su mejor esfuerzo para resolver esta situación y se ha abocado a ensayar diversas alternativas. A continuación se mencionarán y comentarán las que a nuestro juicio se consideran las más promisorias en virtud de su viabilidad económica y que no implican elementos de contaminación secundaria. Dichas alternativas son:

- a).- Degradación de plásticos por vía microbiana
- b).- Incorporación de materiales biodegradables durante la manufactura de láminas plásticas.
- c).- Degradación inducida por exposición a la radiación ultravioleta (rayos solares).

En las dos primeras se considera a los microorganismos como

los únicos capaces de degradar diversos materiales plásticos. De hecho ya han surgido algunos reportes descriptivos de estas experiencias, 11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25 y 26.

El tercer método es ya una realidad gracias a los estudios realizados por el Dr. Gerald Scott de la Universidad de Birmingham en Aston, en 1972 ²⁷. El profesor Scott descubrió que la dosificación y el agregado de los aditivos durante el momento específico de la manufactura son decisivos en la fotodegradación de estos materiales ²⁸. Además de Inglaterra, Canada y Suecia han experimentado esta posibilidad con éxito. Sin embargo, al parecer, son razones socioeconómicas las que hasta ahora han retardado el desarrollo y la aplicación de esta metodología ²⁹.

Aunque ahora no podemos afirmar categóricamente que los microorganismos sean una solución a este problema; sin embargo, pudiera ser que en el futuro, mediante técnicas bioquímicas y genéticas se les indujera a metabolizar estos sustratos con mayor rapidez y eficiencia.

El objetivo de este trabajo es presentar evidencias cuantitativas de la degradación del acetato de polivinilo por microorganismos, en especial por especies del género Aspergillus. Al mismo tiempo, mostrar algunos resultados logrados con cepas capaces de degradar el acetato como única fuente de carbono, así como interpretar algunos cambios que se verifican en el transcurso de la degradación. Las conclusiones son generales y para comprender los aspectos finos, serán necesarios estudios posteriores. Esperamos que este modesto conocimiento promueva el interés de otros a buscar estrategias más efectivas.

Características Generales de los Plásticos.

Plásticos.- Vocablo proveniente del latín plasticus o del griego plastikós, que significa moldeable, se dice que los plásticos siempre son polímeros sintéticos susceptibles al moldeo por acción del calor y la presión. Dichos polímeros de alto peso molecular están formados por monómeros constituidos básicamente por carbono e hidrógeno. Son sólidos en su estado terminado ^{33,34}.

Por regla general se utilizan el calor y la presión combinados para moldearlos, en algunos basta solo con el calor o solo con la presión o por vaciado. La industria moderna de los plásticos opera principalmente con materiales moldeables fabricados partiendo de compuestos químicos. ^{31, 32}.

Composición.- La composición y estructura de los plásticos consiste fundamentalmente en un agregado de moléculas orgánicas y un porcentaje menor de materias lubricantes. ³⁵. Para mejorar sus propiedades suelen contener cargas minerales o vegetales, plastificantes, rellenos, estabilizadores, etc.

Los plastificantes, ya sean líquidos o sólidos son compuestos que poseen baja tensión de vapor, se añaden en proporción de 10-40% en peso de la composición final con el fin de mejorar la calidad del moldeo, aumentar la plasticidad y flexibilidad y la resistencia a la flexibilidad. Como ejemplo de estos coadyuvantes, se pueden citar a los ftalatos, los fosfatos, etc.

Los rellenos, se usan para dar al producto plástico las propiedades mecánicas y eléctricas deseadas, confieren resistencia al calor, al agua y a otros agentes químicos. Aproximadamente constituyen un 20-50% en peso de la composición final. Los rellenos más usuales son: harina de madera, asbesto, mica, harina de mármol, etc.

Colorantes y pigmentos, generalmente son colores orgánicos que también pueden servir como materiales de relleno.

Estabilizadores, son los agentes químicos encargados de conferir mayor resistencia a alguna fuerza degradante externa como el calor, la luz UV, etc. Los más comunes son ésteres de ácidos grasos de elevado peso molecular.

Los Compuestos de Vinilo.- Las resinas de ésteres de vinilo se conocen desde hace más de cien años, pero su desarrollo comercial en los Estados Unidos es mucho más reciente. Los más importantes para la industria son los acetatos y los cloruros polivinílicos, los copolímeros de cloruro y acetato de vinilo y acetales polivinílicos. Klotte y Rollett ³⁵ reportaron en 1917 la formación de una resina a partir del acetato de vinilo en presencia de óxidos o peróxidos. En 1929 Ostromislenky ³⁵ describió la preparación de cloruros polivinílicos de diversas solubilidades. En 1932, Lawson ³⁵ patentó un método para fabricar el copolímero cloruro-acetato.

Acetato de Vinilo ^{33,35} el acetato de vinilo $\text{CH}_2\text{:CHOOCCH}_3$ tiene un peso molecular de 86.09 ; es un líquido incoloro, móvil, inflamable, con olor penetrante característico pero no desagradable. Sus vapores tienen efectos irritantes sobre los ojos, probablemente por su hidrólisis en ácido acético y acetaldehído. Se usa principalmente en adhesivos y revestimientos para papel, textiles y cuero. En la preparación de polímeros, copolímeros y resinas derivadas de sus polímeros, como el - alcohol polivinílico y los acetales de polivinilo. También en la síntesis de medicamentos y como agente de acetilación.

Propiedades: en la Tabla 1 se dan algunas propiedades del acetato de polivinilo.

TABLA I. Algunas propiedades físicas del acetato de vinilo

Propiedad	Valor
P.eb., °C.	72-73 (14, 17, 26)
P.f., °C.	-100.2 (9)
d_4^{20}	0.9342 (17), 0.9354 (5)
d_4^{25}	0.9312 (11)
n_D^{20}	1.3956-1.3958 (5, 17, 28)
Viscosidad a 20° C., centipoises	0.432 (17), 0.4213 (28)
Presión de vapor a 20° C., mm Hg	90 (17), $\log_{10} P_{\text{mm}} = -\frac{0.05223 \times 34433}{T} + 8.091$ (14)
Temperatura crít., °C.	228.9 (14)
Presión crít., atm.	22.4 (39)
Tensión superficial a 20° C., dinas/cm ²	23.95 (11, 21)
Paracoro	205 (11)
Momento dipolar ($M \times 10^{18}$)	1.75 (13)
Calor específico (vapor de 1 atm., $p = 1$) (10)	$C_p = 22.5$ (20° C.); 27.3 (100° C.)
Punto de inflamación (vaso abierto Cleveland), °C.	-5 (17), -1 (2)
Temperatura de autoignición, °C.	427 (2, 23)
Calor latente de vaporización, Kilocal./mol	7.8 (17), 8.21 (14)
Calor de formación a partir de acetileno y ácido acético, Kilocal./mol	$\Delta H = -28.3$ (17)
Calor de combustión, Kilocal./mol	495 (17)
Calor de polimerización, Kilocal./mol	21.3 (8, 13)

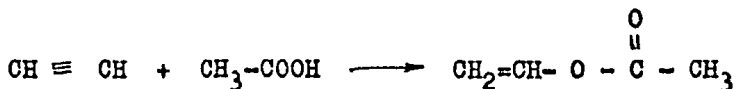
Tomada de Dickstein y Bouchard ³⁵.

El acetato de vinilo es soluble en el agua en proporción de 2.5 g/100 g de agua a 20° C y de 2.1 g/100 g de agua a 50° C.

Reacciones, la reacción más importante del acetato de vinilo es su fácil polimerización en presencia de un peróxido o de -- otros catalizadores, pero tiene poca tendencia a polimerizarse en ausencia de catalizadores y de la luz. Esta reacción es la fuente y el punto de partida para la síntesis en gran escala del acetato de polivinilo, del alcohol polivinílico y los acetales polivinílicos. El acetato de vinilo se hidroliza con -- ácidos o álcalis diluidos, formándose ácido acético (o la sal correspondiente cuando se usa álcali) y el acetaldehído. La facilidad del acetato de vinilo para formar ácido acético y la volatilidad del acetaldehído hacen del acetato de vinilo un agente de acetilación conveniente para los alcoholes; por ejemplo, se prepara fácilmente acetato de n-butilo calentando una mezcla de acetato de vinilo (que contenga la sal cúprica como inhibidor de la polimerización) y el alcohol n-butílico con indicios de ácido sulfúrico y separando continuamente el subproducto acetaldehído en la columna. El acetato de vinilo se condensa con el acetaldehído y forma acetales; con el fenol forma o-vinilfenol y a alta temperatura acetato de fenilo. Por calentamiento con ácido acético en presencia de -- ácido sulfúrico se forma diacetato de etilideno, que a temperatura más alta se descompone y produce anhídrido acético y acetaldehído.

El acetato de vinilo se usa en la preparación de ésteres vinílicos de alto punto de ebullición, mediante una reacción de intercambio.

Manufactura,³⁵ en la fase líquida: este viejo proceso comercial consiste en la reacción del acetileno con ácido acético a unos 80° C en presencia de una sal mercurica del ácido sulfúrico.



El reactor está adaptado con un condensador que se mantiene a 72-74° C y que permite el paso del acetato de vinilo en fase gaseosa (la cual es barrida posteriormente por una corriente de acetileno), haciendo regresar el ácido acético. Los vapores se enfrían, el acetileno se recircula y el acetato de vinilo se purifica por destilación.

En fase de vapor: dentro de un reactor se mezclan acetileno (en exceso) y ácido acético gaseoso. La operación se realiza a 190-220° C. El tubo de la reacción contiene un catalizador de acetato o silicato de zinc que promueven una conversión del 50% del ácido acético. Los vapores resultantes se enfrían, el acetileno se recircula y el líquido se destila para obtener el acetato de vinilo y el ácido acético. Este también se recircula. Existen otros procedimientos para producir el acetato de vinilo donde se utilizan otras materias primas y otros catalizadores. La metodología y los detalles están descritos en el trabajo de Dickstein y Bouchard³⁵.

Polimerización, la primer producción comercial del acetato de polivinilo se realizó en Alemania en 1920²⁷. El acetato de polivinilo se puede polimerizar en varias formas; a granel, en solución, en suspensión y en emulsión. En la práctica comercial se prefiere la polimerización en emulsión debido a que se usa directamente en productos solubles en agua, como los adhesivos y las pinturas^{31, 32}.

Polimerización en Emulsión

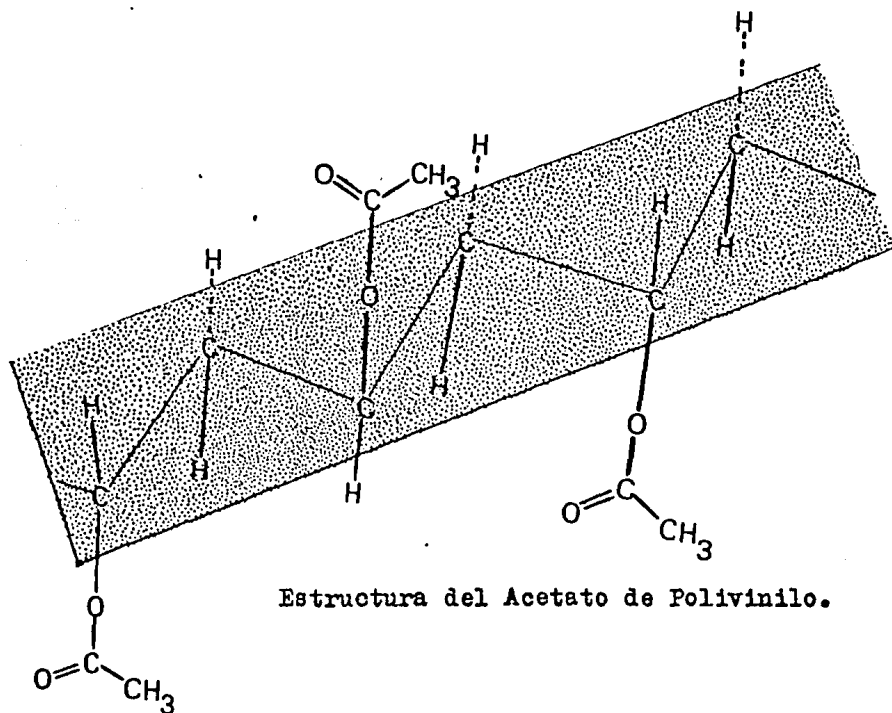
Como un ejemplo del tipo de proceso que se lleva a cabo en la polimerización, se describe someramente la preparación de emulsificantes. Generalmente se lleva a cabo en un reactor con agitación, con chaqueta para calentar y enfriar. Como ejemplo, se puede considerar la siguiente formulación³⁵:

Acetato de vinilo (libre de inhibidor)	100 partes
Agua	100
Hidroxietilcelulosa	2.5 coloide
Poli (etilén glicol) éter del alcohol láurico	2.5 tensoactivo
Dodecibencensulfonato de Sodio	0.1 tensoactivo
Bicarbonato de sodio	0.5 amortiguador
Persulfato de potasio	0.5 iniciador

La reacción se realiza a 75-80 °C durante 2 horas. Es altamente exotérmica, de tal manera que es preferible trabajar con un tamaño fino de partícula. El amortiguador sirve para disminuir

la hidrólisis del acetato de vinilo. El resultado es una emulsión.

Estructura, el alcohol polivinílico adopta durante el proceso una estructura de cola a cabeza. Esta configuración se demuestra cuando no hay reacción ni consumo del ácido peryódico o del tetraacetato de plomo. Se considera que ambos reactivos fragmentarían los dióles en posición 1-2 si la disposición no fuese cola a cabeza. Esta situación abre la posibilidad de que existan dos tipos de ramificación en la configuración del acetato de polivinilo. La alcoholólisis del acetato de polivinilo sugiere la --eliminación de las arborescencias de las cadenas transferidas --hacia el grupo acetato, de tal manera que no se eliminan las arborescencias que han reaccionado por adición a la cadena.



Por lo anterior, se deduce que el alcohol polivinílico tiene un grado de polimerización mucho más bajo que el acetato, del cual se deriva. Al parecer, las arborescencias del acetato provienen de la transferencia del radical acetato. Además, el acetato de polivinilo es amorfo, mientras que el alcohol polivinílico es cristalino. Es posible que el radical hidroxilo sea lo suficientemente pequeño como para incluirse en una estructura cristalina que es muy semejante a la del polietileno.

Impacto Ambiental

Aunque en nuestro país no existen estudios acerca del impacto ambiental del acetato de polivinilo, por las características señaladas se puede inferir que se hidroliza fácilmente acidificando el medio, por lo tanto altera el pH del medio circundante. Siendo una materia prima y producto a la vez, es un agente que al descargarse en los efluentes de salida altera también la DBO ya que es un compuesto de fácil descomposición en el estado líquido. Durante la fabricación de resinas y pinturas causa irritaciones en la piel y las vías respiratorias del personal expuesto al compuesto. El daño o la irritación es proporcional al tiempo de exposición y a la concentración del plástico. Este, en condiciones de poca solubilidad adopta la forma sólida -- característica de estos polímeros. Su adherencia es tal que -- inclusive, también se usa en la industria de pegamentos.

No se tienen datos acerca de los volúmenes utilizados en nuestro país, ni la toxicología del mismo.

MATERIAL Y METODOS

Aislamiento de microorganismos. En esta etapa se aislaron microorganismos mediante la técnica del cultivo selectivo, es decir, microorganismos que tuvieran la capacidad de crecer y multiplicarse en un medio cuya única fuente de carbono fuese el plástico; en este caso, una suspensión de acetato de polivinilo. Este material fué proporcionado por un fabricante de telas ahuladas bajo el nombre clave de DM-60, donde la cifra corresponde precisamente al porcentaje de plástico en dicha suspensión-

Los medios de cultivo utilizados fueron:

Medio 1

K_2HPO_4	1.0 g/l
KCL	0.5 g/l
$(NH_4)_2 SO_4$	0.5 g/l
$MgSO_4$	0.2 g/l

Medio de Suzuki 36.

$(NH_4)_2 SO_4$	1.0 g/l
$KH_2 PO_4$	0.4 g/l
$K_2 HPO_4$	3.2 g/l
$MgSO_4$	0.2 g/l
NaCl	0.1 g/l
$FeSO_4$	0.01 g/l

En ambos casos se ajustó el pH a 4.5 y 7.0 con el fin de favorecer el crecimiento de hongos y bacterias respectivamente. El plástico, una suspensión de DM 60 se adicionó a los medios en proporción de 1.0 g/l. El fabricante, aunque no proporcionó la fórmula exacta, informó que la suspensión contenía ftalato como plastificante y además un fungicida mercurial en concentración de 0.3 - 0.8 %.

Los medios de cultivo utilizados para purificar y conservar las cepas aisladas fueron: Agar Nutritivo y Sabouraud Glucosa 4 % Agar. En todos los casos, los medios se prepararon y esterilizaron de acuerdo con las indicaciones del fabricante. Todos los reactivos utilizados fueron de grado analítico.

Selección de las Cepas.- En virtud de que se considera al plástico como un sustrato difícil de degradar, se decidió - realizar los cultivos selectivos en líquido. Los inóculos se tomaron de aguas negras y de sitios donde existían plásticos sólidos acumulados. En el caso de las aguas, se tomaron muestras de 1 ml y se diluyeron con 9ml de agua estéril. El rango de dilución final fue de 1;500 . Cuando se trató de un inóculo de suelo, se añadió 1.0 g de suelo a matraces que contenían 49 ml de medio estéril. En este caso la dilución fue de 1 : 50 . Como explicamos anteriormente, se realizaron aislamientos para hongos y para bacterias en función de la acidez-alcalinidad del medio. En todos los casos, los matraces se mantuvieron en incubación estacionaria. Los medios diseñados para el crecimiento bacteriano fueron incubados a

33° C y los de crecimiento fúngico a 25° C. La incubación duró 28 días, durante los cuales se retiraron alícuotas a los 0, 7, 14, 21 y 28 días respectivamente para examen microscópico y para estriado sobre el mismo medio solidificado con agar al 2%. Esta modalidad nos permitía apreciar la morfología microbiana y al mismo tiempo comprobar el desarrollo en forma colonial, lo cual se consideró sinónimo de viabilidad.

Preparación del Inóculo. Las cepas que mostraron capacidad de sobrevivencia y viabilidad fueron fúngicas. Ninguna de las cepas bacterianas permaneció viable a lo largo de la incubación, de tal manera que las cepas seleccionadas se hicieron crecer en Sabouraud Glucosa 4 % Agar a temperatura ambiente durante 4 días, que fué tiempo suficiente para permitir el desarrollo de esporas. Estas se suspendieron en agua destilada estéril y se contaron en una cámara de Neubauer. Los inóculos siempre se realizaron ajustando el volumen necesario de la suspensión de esporas hasta obtener una concentración final de 3×10^3 esporas ml^{-1} .

Condiciones de Cultivo. Para los estudios de degradación se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml conteniendo 50 ml del medio de Suzuki ajustado a un pH de 5.0. El inóculo se preparó en la forma descrita previamente. La incubación se realizó durante 11 días a temperatura ambiente (22-25° C) en

condiciones de agitación (150 rpm) en un agitador rotatorio New Brunswick. A lo largo de la incubación se fueron tomando alícuotas para determinar pH, peso seco, azúcares totales, proteína y DNA.

Determinación de pH. A los intervalos señalados se tomaron diversas alícuotas a las cuales se les determinó el pH en un potenciómetro digital Orion previamente calibrado con - amortiguador de pH 4.0 .

Determinación de Peso Seco. El contenido total de cada matraz se centrifugó a 10,000 rpm durante 7 minutos en una centrífuga Sorvall RC 25; en todos los casos se desechó el sobrenadante después de cada lavada. Para lavar la biomasa, se le resuspendió con agua destilada durante 3 a 4 ocasiones; finalmente se transfirió el micelio a receptáculos de papel aluminio previamente tarados. Estos se introdujeron a una estufa para secado a 60 - 70 ° C hasta obtener pesos constantes. En forma paralela se introdujo un testigo bajo las mismas condiciones con el propósito de corregir la cantidad de APV residual en el micelio. Los resultados se expresan en mg de micelio seco/ml. En todos los casos, se tomó micelio seco para realizar las determinaciones, excepto en el de la cuantificación del DNA, que fué en peso conocido del micelio húmedo.

Determinación de Proteína. Para realizar esta determinación, se tomaron muestras de micelio seco previamente pesado. Dichas -- muestras se hidrolizaron con NaOH 0.1 N a ebullición durante 5

minutos, la cuantificación se realizó de acuerdo con la técnica de Lowry ³⁷ usando un espectrofotómetro Zeiss PM II a 275 nm. La curva tipo se preparó en un rango de 0-200 mg utilizando como estandar albúmina de suero bovino. Los resultados se expresan - como μg de proteína/ mg de micelio seco.

Determinación de Azúcares Totales. Igual al caso anterior, las muestras consistieron en pesos conocidos de micelio seco. La determinación se realizó mediante la técnica de la antrona ³⁸, - utilizando para la cuantificación un espectrofotómetro Zeiss PM II a 540 nm. La curva patrón se realizó con una solución de glucosa en un rango de 0 - 100 mg. Los resultados se expresan como μg de azúcares/ mg de micelio seco.

Determinación de DNA. El ácido desoxiribonucleico se cuantificó por el método de Burton ³⁹ con una modificación que consistió en sensibilizar la reacción mediante la adición de 0.1 ml de acetaldehído acuoso (16 mg ml^{-1}) por cada 20 ml de reactivo de difenilamina e incubar los tubos a 30°C durante 16 - 20 h. Para lograr mayor precisión, se extrajo el micelio húmedo en 3 ocasiones con 3 ml de HClO_4 0.5 N; cada una a 70°C durante 15 minutos en un baño con termostato. Los extractos obtenidos se colectaron y se aforaron a 10 ml con HClO_4 0.5 N de los cuales se tomaron alícuotas de 1 ml para el análisis en un espectrofotómetro Zeiss PM II a una longitud de onda de 360 nm. La curva tipo se realizó con DNA comercial (Sigma D 2001) - extraído de Escherichia coli, se estableció una curva patrón

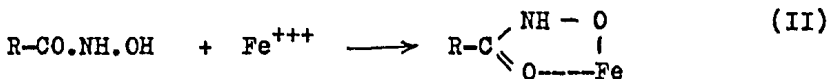
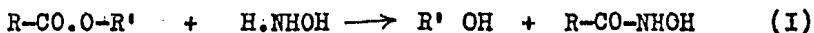
de 0 - 100 μg . Los resultados se expresan como μg de DNA/mg de micelio seco.

Preparación del Extracto Enzimático. Los extractos donde se realizó la cuantificación de la actividad esterásica se obtuvieron de acuerdo con la técnica de Neelson y Garber ⁴⁰. Dicha técnica recomienda recolectar los micelios a los intervalos señalados pasándolos a través de varias capas de gasa estéril. El micelio se resuspende en amortiguador de fosfatos 0.05 M (pH 6.5) usando aproximadamente μg de micelio por cada 3 ml de amortiguador, la suspensión se guarda en el refrigerador. Los extractos se prepararon por maceramiento en un mortero asentado en un baño de agua hielo o bien utilizando un sonicador Braun tipo MSK - operado en el canal 6 durante 46 - 60 segundos. En ambos casos, los extractos se centrifugaron a 5000 rpm en una centrífuga refrigerada Sorvall RC 25 durante 20 minutos. La determinación cuantitativa se realizó en los sobrenadantes y el precipitado resuspendido en el mismo amortiguador.

Determinación Cualitativa de la Actividad Esterásica. Las evidencias preliminares de actividad esterásica se desarrollaron "in situ". Las diferentes cepas fúngicas se sembraron en placas conteniendo el medio de Suzuki complementadas con el sustrato plástico en la concentración habitual. Cuando las cepas empezaban a esporular, se colocaron papeles fieltro estériles impregnados con concentraciones conocidas de un sustrato idóneo, en este caso, el β naftil acetato ⁴³. El color original de éstos es

amarillento, la presencia de radicales éster se manifiesta con un vire al color azul.

Determinación Cuantitativa de la Actividad Esterásica. El ensayo para determinar la actividad esterásica está basado en las reacciones descritas por Mann y Saunders ⁴¹, y el método de Rapport y Alonzo ⁴². La determinación se basa en las reacciones de los radicales éster con una hidroxilamina alcalina para formar un ácido hidroxámico (I), éste forma un complejo con las sales férricas en un medio ácido (II). La coloración es directamente proporcional a la reacción y presenta un máximo de absorción en el rango de 530 nm.



Reactivos. El éster utilizado para elaborar la curva patrón fué el acetato de etilo (PM 98.3). Las concentraciones se prepararon en soluciones diluidas con agua destilada. El regulador de fosfatos (pH 7.0) se preparó a base de KH_2PO_4 0.1 M y Na_2HPO_4 0.1 M. De estas concentraciones se realizó una mezcla de 34 + 66 ml respectivamente. El clorhidrato de hidroxila-

mina al 10 % se alcalinizó con NaOH al 10 % libre de CO_2 . La mezcla final se produjo en relación 1:1. El cloruro férrico para desarrollar la reacción se preparó al 1 % en una solución de HCl 0.2 N.

Cálculo de la preparación del sustrato (acetato de etilo) con peso molecular de 98.3. Se disuelven 0.983 ml de acetato en etanol acuoso al 50 %, la solución se efectúa en un matraz -- aforado de 100 ml, de ésta se toma una alícuota de 1 ml y se diluye 1:10 con agua destilada. Esta dilución corresponde a 1×10^{-5} moles/ml o sean 10 μ moles/ml.

Preparación del Clorhidrato de Hidroxilamina al 10 %. Se disuelven 5 g de hidroxilamina en 50 ml de agua destilada. Por separado se prepara la sosa al 10 %, disolviendo 5 g de NaOH en 50 ml de agua destilada libre de CO_2 . El reactivo de la hidroxilamina alcalina se obtiene mezclando partes iguales de los reactivos anteriores (10 + 10 ml).

El cloruro férrico al 1 % en HCl 0.2 N se prepara mediante la solución de 1 g de FeCl_3 en 100 ml de HCl 0.2 N, éste a su vez se preparó diluyendo 1.7 ml de HCl (36 %) al aforo con 100 ml de agua destilada. Este reactivo debe prepararse momentos antes de cada determinación.

La implementación de la curva se realizó sin problemas, la determinación fué automática al registrar el incremento de absorbancia a 530 nm versus concentración (μ moles).

Sin embargo hubo algún problema para definir el método de análisis del APV suministrado por el fabricante, así como de

las muestras obtenidas del sobrenadante. Después de numerosos ensayos, se procedió a hidrolizar al polímero para fragmentarlo y poder cuantificar los radicales éster en función del tiempo. Con el fin de obtener condiciones homogéneas, las muestras (2 ml) se vertieron en ampolletas de 5 ml y se procedió al siguiente tratamiento:

- a) Agregar 1 ml de KOH al 5 % (sol. metanólica)
- b) Sellar las ampolletas
- c) Hidrolizar a 90 °C durante 3 h
- d) Enfriar a temperatura ambiente
- e) Vaciar los contenidos a tubos de ensayo
- f) Agregar 0.4 ml H_2SO_4 conc. y 3 ml de etanol
- g) Esterificación durante 20-24 h a temp. ambiente.
- h) Agregar 7 ml Na_2SO_4 saturado (35% acuoso)
- i) Extraer 3 veces con éster etílico (5 ml a la vez)
- j) Concentrar los extractos (filtración a través de papel Whatman No. 5)
- k) Separar alícuotas de 1 ml de los filtrados y agregarles 2ml de una mezcla de KOH al 10 % v/v acuosa (libre de CO_2) y clorhidrato de hidroxilamina al 10 % .
- l) Calentar las mezclas a 60° C durante 30 minutos
- m) Enfriar a temperatura ambiente
- n) Agregar 1.5 ml de HCl 1.0 N
- o) Agitar (Vortex)

- p) Agregar 3.5 ml de cloruro férrico 1 % HCl 0.2 N
- q) Dejar reposar por 30 minutos
- r) Leer $A_{530 \text{ nm}}$

El blanco consistió en un tubo con todos los reactivos, excepto el sustrato. Los resultados son representativos de experimentos en duplicado y en ocasiones por triplicado. Se expresan en la Tabla No. 2.

La curva patrón del acetato de etilo y su relación con las diferentes cepas esta expresada en la Figura No. 17.

Localización de la Enzima. Con el fin de comprobar el sitio de biosíntesis enzimática, se procedió a ensayar la actividad según el método espectrofotométrico descrito. Para ello se siguió la siguiente secuencia:

1. Ensayo en el medio de cultivo (Fracción 1)
2. Ruptura burda de una porción miceliar.

Una suspensión del micelio se rompe por acción mecánica en un mortero previamente enfriado en un baño helado. La actividad se determina en el sobrenadante (Fracción 2) y en el precipitado (Fracción 3). Este se resuspende en amortiguador y se vuelve a determinar la actividad en la fracción sobrenadante (Fracción 4)

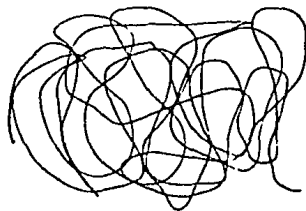
y el precipitado (Fracción 5). Las centrifugaciones se realizaron en una centrifuga refrigerada a 7500 rpm durante 20 min (Fracciones 2 y 3) y a 10,000 rpm durante 60 min (Fracciones 4 y 5).

Ensayo de la Viscosidad. Otra de las técnicas que se utilizaron para determinar la degradación del acetato de polivinilo fué el decremento en la viscosidad del sustrato en el transcurso de los intervalos de tiempo previstos.

Si partimos de la premisa de que los líquidos por naturaleza presentan moléculas unidas por enlaces que precisamente determinan el grado de viscosidad, tendremos que inclusive el agua presenta una viscosidad aunque sea mínima. Una molécula de cadena larga en solución adquiere una forma algo torcida o enortijada, intermedia entre una masa muy enrollada y una conformación lineal rígida. Es de esperarse que estan representados todos los posibles grados de enortijamiento debido al movimiento browniano interno de las cadenas flexibles. Pero si el polímero se extiende libre-

mente como lo muestra la figura (debido a que un disolvente que no provee calor al polímero hace que adopte esta configuración cuya viscosidad intrínseca es alta. En cambio, al usar un

disolvente pobre, que proporciona calor al polímero, hará que los segmentos de la macromolécula se atraigan entre si, con mucho más fuerza que con las que se atraen las moléculas del disolvente,



por esa razón la macromolécula adopta una forma más compacta, se dice que la viscosidad intrínseca es más baja.

En general las macromoléculas tienden a aumentar la viscosidad de una solución, ya que su propia estructura interacciona por medio de fuerzas de atracción haciendo más homogénea la unión intermolecular. En el Siglo XVII Newton dedujo la siguiente fórmula para definir la viscosidad:

$$\text{fuerza de la fricción} \propto \left(\frac{\partial \mu}{\partial x} \right) \partial A$$

donde: $\partial \mu$ = velocidad relativa con que se mueve una porción del líquido en relación a otra de la misma naturaleza.

∂A = define el área de contacto entre los dos líquidos, uno que se mueve con respecto al otro.

∂x = describe la distancia inversamente proporcional a la distancia entre los centros del flujo, es decir, éste será más fácil en el centro que en las capas adyacentes a las paredes del vidrio debido a la resistencia que se opone al flujo continuo.

A la ecuación anterior se introduce una constante de proporcionalidad η quedando:

$$\text{fuerza de la fricción} = \eta \left(\frac{\partial u}{\partial x} \right) \delta A$$

donde η representa la viscosidad (coeficiente de fricción).

La viscosidad de un líquido se puede medir experimentalmente de muchas maneras, la más práctica es midiendo la velocidad de flujo de un líquido a través de un tubo capilar ⁴⁴. Es lógico que un líquido viscoso fluirá más lentamente a través del capilar en comparación con un líquido menos viscoso. La velocidad de flujo a través de un tubo es directamente proporcional a la viscosidad si el tubo es lo suficientemente estrecho como para permitir el flujo laminar. Esto implica que cualquier porción del volumen en el tubo fluye constantemente en una dirección paralela a las paredes. En el capilar del viscosímetro siempre se obtiene un flujo laminar debido a que se necesita una carga de baja presión y un capilar de diámetro pequeño para mantener la velocidad por debajo del nivel crítico donde empezaría la turbulencia.

Por medio de la ecuación de Poiseuille:

$$\mu = \frac{V}{t} = \frac{\pi P a^4}{8 l \eta}$$

es factible determinar el tiempo de flujo para un volumen determinado de líquido a través de un capilar y comprobar que

Este es directamente proporcional a su viscosidad e inversamente proporcional a la presión P aplicada al líquido. Dado que la presión es debida solo al peso del líquido en el tubo, debe ser directamente proporcional a la densidad ρ de ese líquido, es decir, a la altura del menisco en el tubo del viscosímetro. Si las dimensiones a y l son propias del viscosímetro, entonces la viscosidad de un líquido se puede determinar con solo saber su densidad y el tiempo de flujo en un viscosímetro previamente calibrado. Entonces es factible relacionar las propiedades mencionadas en la ecuación:

donde: $\eta = k \rho t$

k = constante característica del viscosímetro

ρ = densidad del líquido

t = tiempo de flujo

Los valores para η se expresan en dinas por centímetro cuadrado por unidad de velocidad. Ejm: $\text{g.cm}^{-1} \text{seg}^{-1}$; también se le llama poise y se considera la unidad.

Descripción del Viscosímetro.

- a) Diagrama del viscosímetro usado en el experimento. El tubo capilar se extiende de x_1 a x_2 . El tiempo de flujo se mide a partir de que el menisco pasa de x_0 al tiempo que alcanza x_1 .

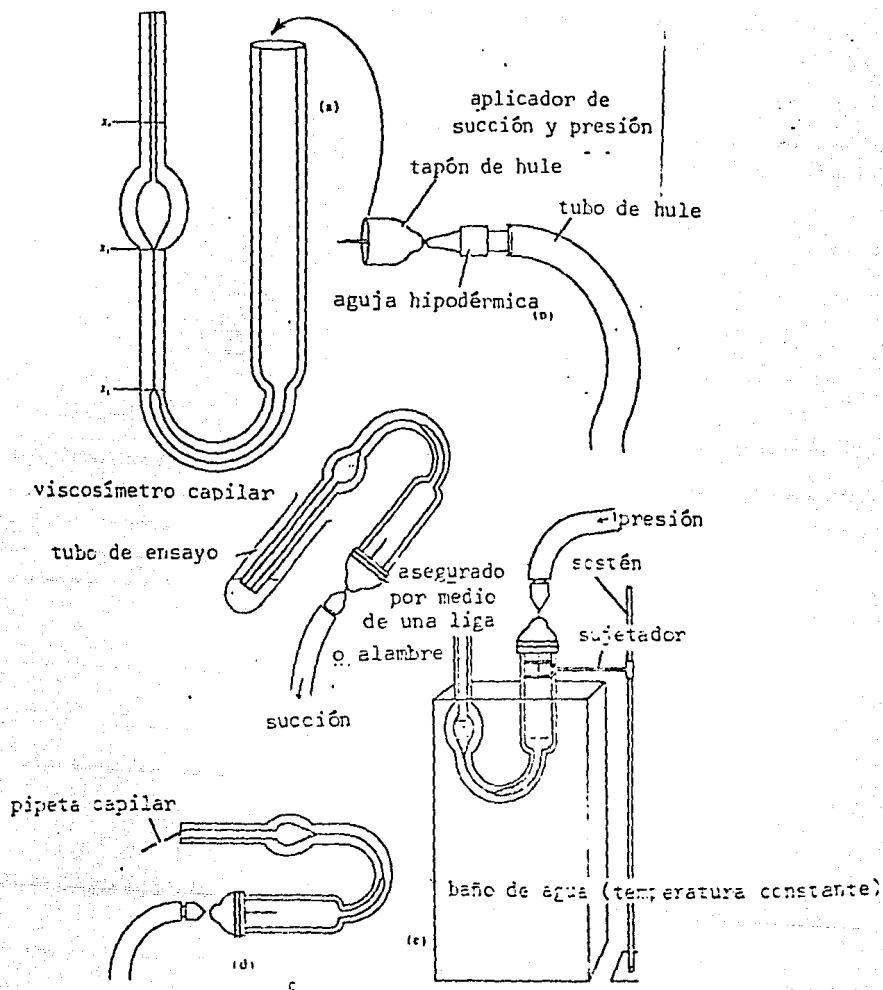
- b) Este aditamento se utiliza para inducir presión en el brazo más largo del viscosímetro y se asegura a él mediante un capuchón de hule. Se utiliza para inyectar líquido en el sistema y para desalojarlo. Como se puede apreciar, es una aguja hipodérmica adaptada a tubería de hule. La aguja precisamente se inserta en el capuchón para garantizar la hermeticidad.

Operación del Viscosímetro.

- c) Para operarlo, se llena el viscosímetro por su porción más estrecha y se succiona hasta que la muestra haya llegado al punto x_2 . Con el viscosímetro en posición horizontal, ajuste el nivel del líquido al punto x_2 , para lograrlo retire el exceso de líquido con una pipeta capilar. Vuelva el viscosímetro a su posición normal, introdúzcalo en un baño de agua previamente ajustado a 25°C y asegúrelo con un sujetador. Ajuste con el dispositivo hipodérmico el nivel del menisco hasta la marca x_0 . Deje que el flujo baje. Cuando el menisco está exactamente en la marca x_0 , empiece a registrar el tiempo con un cronómetro. La operación de registro se termina cuando el mecanismo llega a la marca de x_1 .

Ver las figuras de la página siguiente.

Operación del Viscosímetro:



Decremento en la Viscosidad del Sustrato. Como se mencionó anteriormente, este ensayo también se utilizó como evidencia de la degradación del plástico. La disminución en la viscosidad del polímero se realizó en alícuotas de 5.0 ml del medio de cultivo retirados a los intervalos señalados. Como testigo se utilizó un matraz con el polímero, pero desprovisto de inóculo microbiano. Las viscosidades se determinaron en un viscosímetro de Ostwald sumergido en un baño de agua a 30° C. Para lograr la homogenización de las muestras, éstas se disolvieron con benceno. Las impurezas se eliminaron al filtrar los extractos en papel Whatman No. 1. La actividad enzimática interpretada como la pérdida de la viscosidad se determinó de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de la pérdida de la viscosidad} = \frac{V_o - V_t}{V_o - V_b} \times 100$$

donde:

V_o es el tiempo transcurrido para el testigo

V_t para la alícuota después de 15 minutos:

V_b para el benceno.

Los resultados del ensayo se muestran en la Figura No. 18 y están expresados como el porcentaje del decremento de la viscosidad en función del tiempo.

A continuación se describen los experimentos realizados para demostrar la degradación fúngica de una concentración (4.5 g/l) de acetato de polivinilo.

- = Aislamiento de las cepas capaces de desarrollarse en un medio mineral suplementado con acetato de polivinilo como única fuente de carbono.
- = Optimización de las condiciones de incubación de las cepas aisladas.
- = Cinética de crecimiento y concentración de proteínas, azúcares y DNA.
- = Verificación de la capacidad degradativa del APV.
Experimentos alternos con DOF y extracto de levadura.
- = Efecto de la concentración del extracto de levadura sobre el crecimiento de las diferentes cepas en el Medio de Suzuki suplementado con APV.
- = Demostración cualitativa de la actividad esterásica en los cultivos fúngicos.

= Evidencias cuantitativas de la actividad esterásica en los medios de cultivo. Establecimiento de una curva patrón.

= Localización de la enzima.

= Ensayo de la viscosidad en el sustrato (APV).

RESULTADOS.

Aislamiento de las cepas. Durante la etapa preliminar de aislamientos, se obtuvieron 21 cepas fúngicas y 7 bacterianas. En ocasiones se comprobó que algunas cepas fúngicas eran aislamientos repetidos, por lo que se restringió el número original. Las cepas bacterianas sobrevivieron en un principio pero no lograron desarrollarse en forma satisfactoria, por lo cual fueron descartadas. Las cepas seleccionadas fueron todas fúngicas y se denominaron 1, 3, 8 y Aspergillus niger. De acuerdo con microcultivos y observaciones microscópicas realizadas, las cepas 1 y 3 corresponden al género Aspergillus. La cepa 8 se identificó como Penicillium sp. Es interesante hacer notar que durante las incubaciones bacterianas se presentó un contaminante que resultó ser una Beijerinckia. Dadas las características específicas de fijación de nitrógeno, esta cepa sobrevivió gracias a su autotrofia, pero sin mostrar alguna capacidad degradadora.

Optimización de las Condiciones de Cultivo. La optimización de las condiciones de incubación fué una fase muy laboriosa, máxime que no había descripción precisa ni antecedentes acerca de esta degradación de plástico en el sentido estricto de la palabra. Si bien es cierto que Osmon y colaboradores¹³, y Mills y colaboradores¹⁴ diseñaron sus sistemas de degrada-

ción, éstos fueron con plastificantes y no con plásticos. Las condiciones de incubación establecidas fueron: a temperatura ambiente (22 - 27° C) y con agitación rotatoria a 150 rpm. En base a éstas se determinó la cinética del crecimiento así como los contenidos de proteína, azúcares y DNA. Al principio los datos no fueron muy demostrativos, por lo que se decidió agregar extracto de levadura (1.0 g/l) como complemento vitamínico y fuente de nitrógeno adicional.

Los resultados se pueden apreciar en las Figuras 1 - 4.

También se verificó el pH en el que se desarrollaron cada una de las cepas a lo largo de la incubación. En todos los casos, el medio de cultivo varió de 5.0 a 5.8 - 6.1, manteniéndose constante.

Las cepas 1, 3, 8, y A. niger tuvieron un rendimiento promedio de 1.1 g/l. La cepa 8 fué menor (0.9 g/l). Sin embargo, esta última clarificó el medio en forma casi total.

CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA 1 EN MEDIO DE SUSUJKI CON EXTRACTO DE LEVADURA Y DM 60

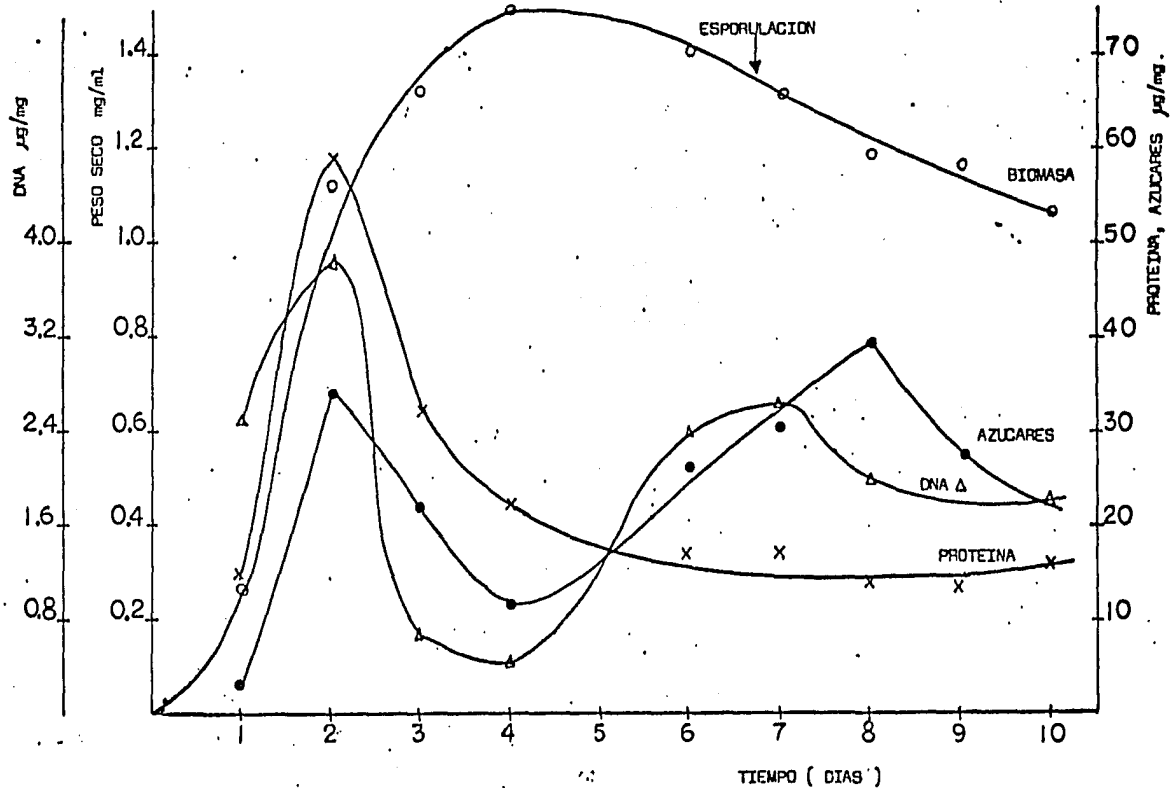
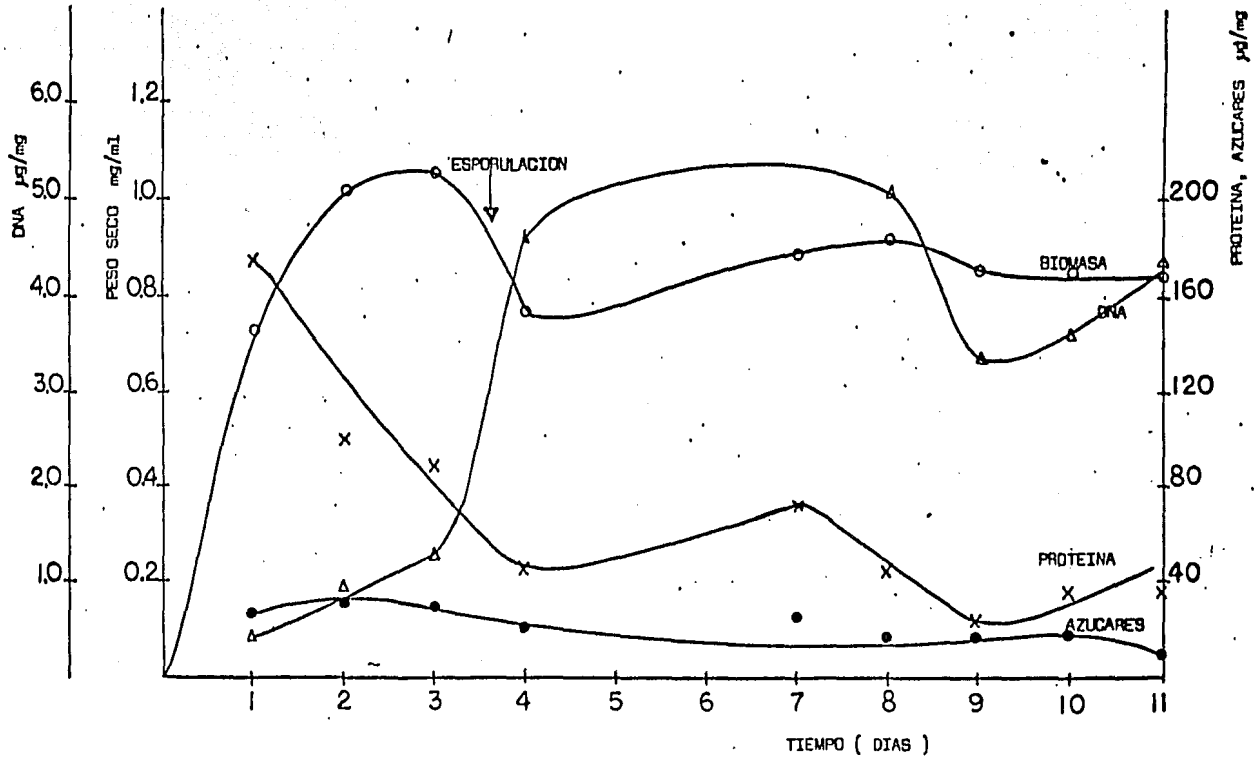


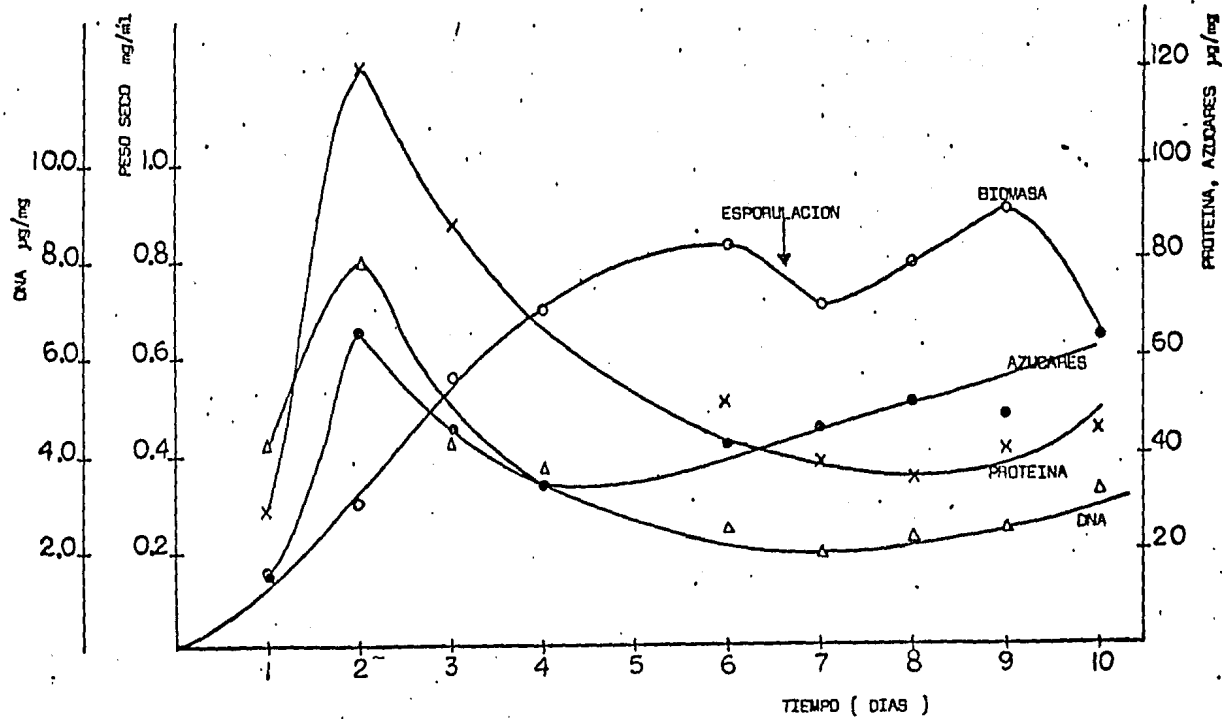
FIGURA No 2

CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA 3 EN MEDIO DE
SUSUKI CON EXTRACTO DE LEVADURA Y DM 60

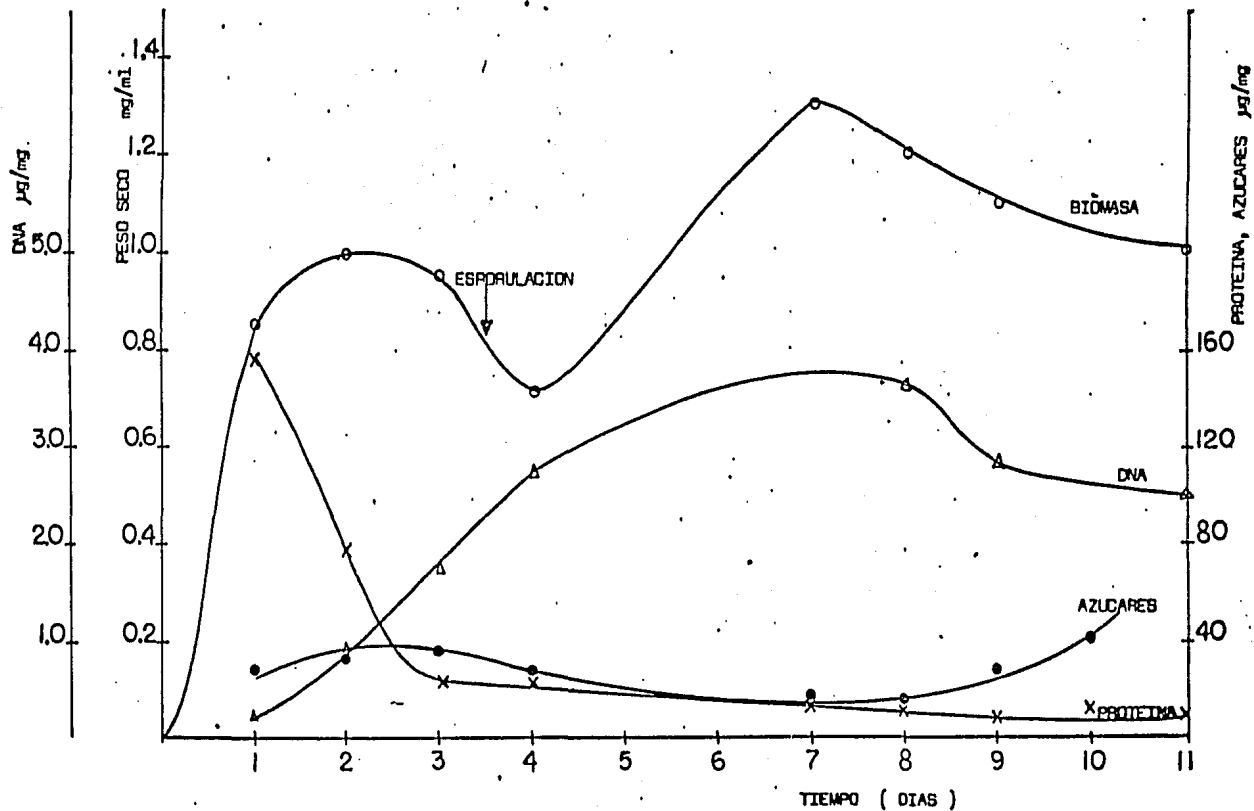


F I G U R A N o 3

CINETICA DE CRECIMIENTO DE LA CEPA 8 EN MEDIO DE BUSUKI CON EXTRACTO DE LEVADURA Y DM 60°



CINETICA DE CRECIMIENTO DE *A. niger* EN MEDIO DE SUSUKI CON EXTRACTO DE LEVADURA Y DM 60



Capacidad Degradativa del APV. Una vez que se obtuvieron las cinéticas y la variación de los constituyentes químicos en la forma establecida, se procedió a verificar si las cepas seleccionadas realmente degradaban el sustrato. Para esto, se diseñó y realizó el siguiente protocolo:

- a) Medio de Suzuki + Extracto de levadura (1.0 g/l)

- b) Medio de Suzuki + Di-octil ftalato (DOP) (2.25 g/l)
+ Extracto de levadura (1.0 g/l)

- c) Medio de Suzuki + DM 60 (4.5 g/l) + Extracto de Levadura (1.0 g/l)

Los matraces se inocularon con 2×10^3 esporas/ml en las condiciones mencionadas. La incubación duró 9 días. El micelio se separó por filtración al vacío sobre papel Whatman No. 1 se lavó con agua destilada 3 - 4 veces y se secó a $60 - 70^\circ \text{C}$ hasta lograr un peso constante. Los resultados se expresan en las Figuras 5, 6, 7, y 8.

FIGURA No 5

CRECIMIENTO DE LA CEPA 1 CON DIFERENTE SUSTRATO

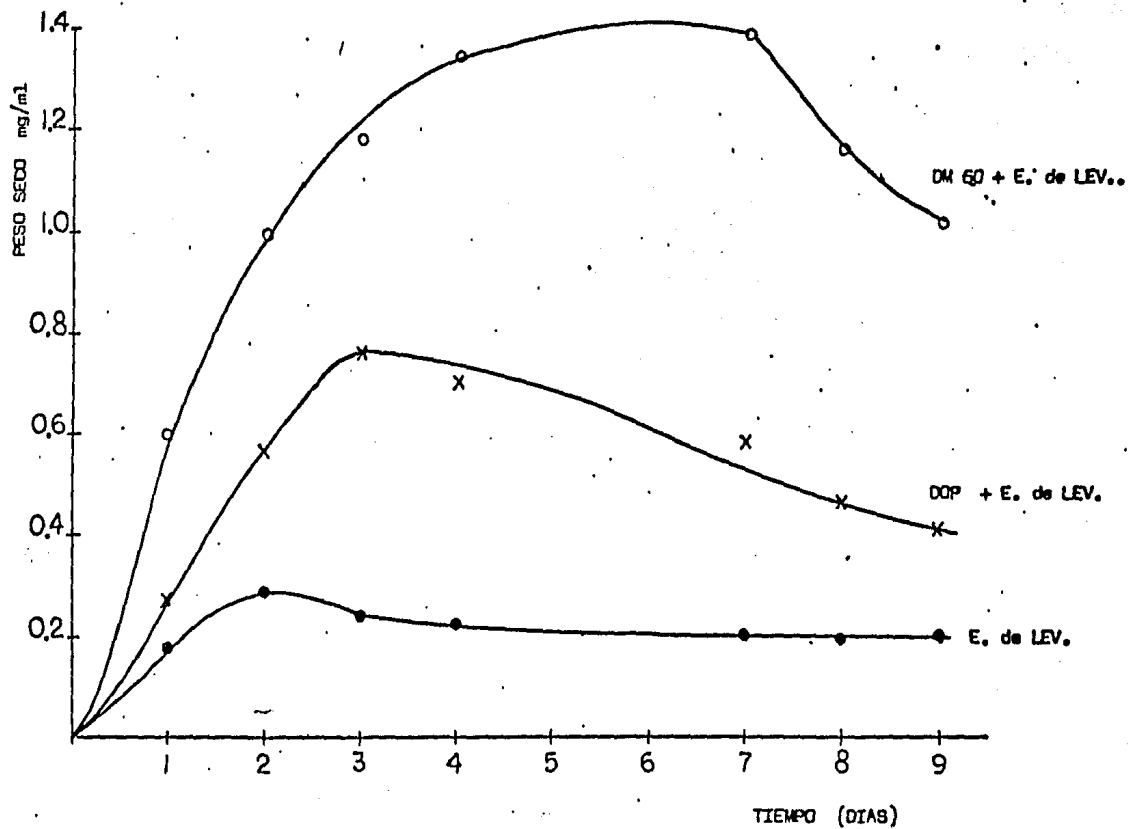


FIGURA No 6

CRECIMIENTO DE LA CEPA 3 CON DIFERENTE SUSTRATO

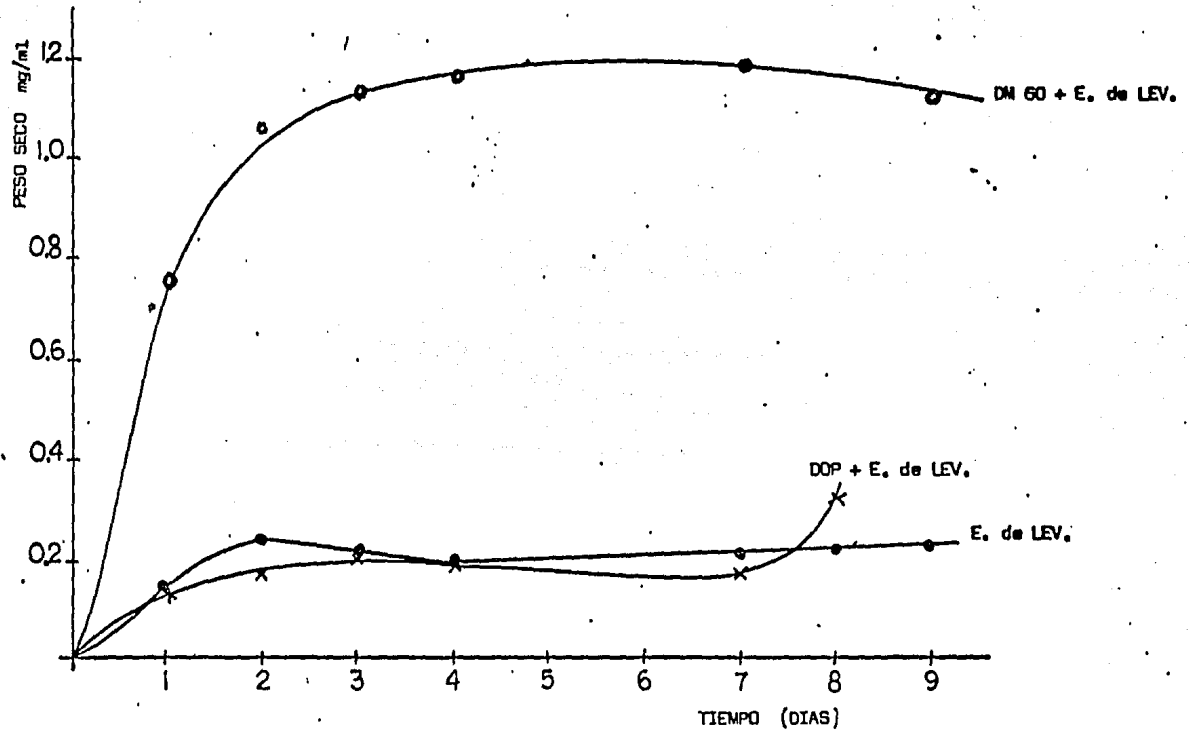


FIGURA. No 7

CRECIMIENTO DE LA CEPA 8 CON DIFERENTE SUSTRATO

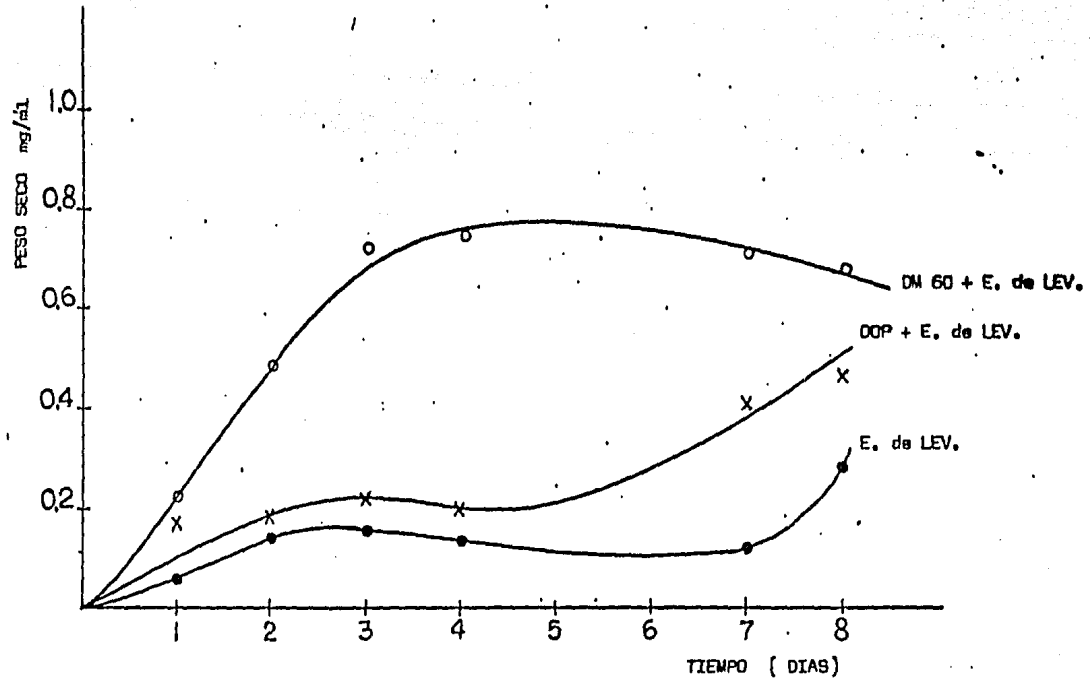
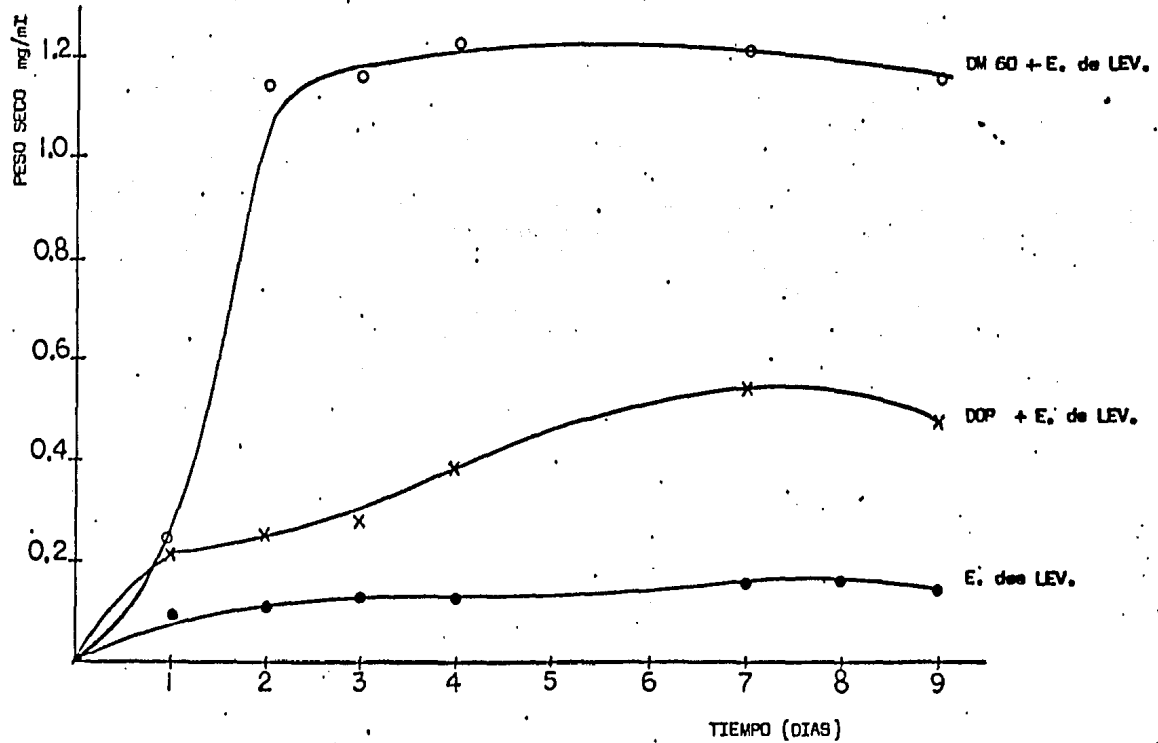


FIGURA No 8

CRECIMIENTO DE *A. niger* CON DIFERENTE SUSTRATO



Efecto del Extracto de Levadura. En virtud del resultado anterior, se procedió a cuantificar el efecto real del extracto de levadura durante el crecimiento de las cepas en el medio de Suzuki y DM 60. Los resultados se presentan en las Figuras 9, 10, 11 y 12.

FIGURA No 9

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE EXTRACTO DE LEVADURA SOBRE EL
CRECIMIENTO DE LA CEPA 1 EN MEDIO DE SUSUKI CON DM 60

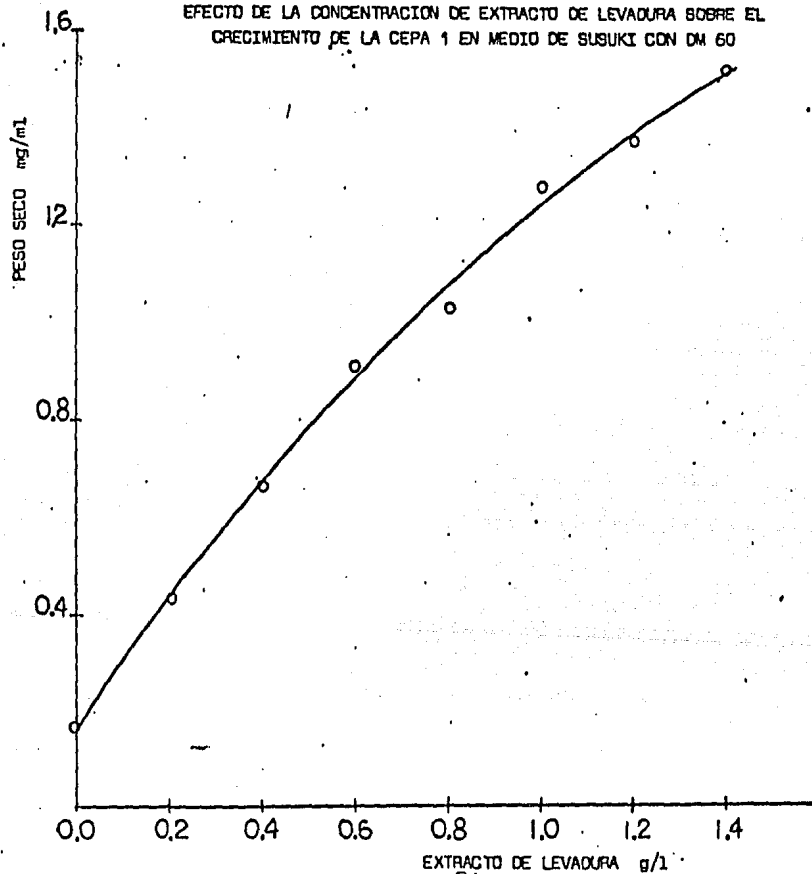


FIGURA No 10

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE EXTRACTO DE LEVADURA SOBRE EL
CRECIMIENTO DE LA CEPA 3 EN MEDIO DE SUSUMI CON DM 60

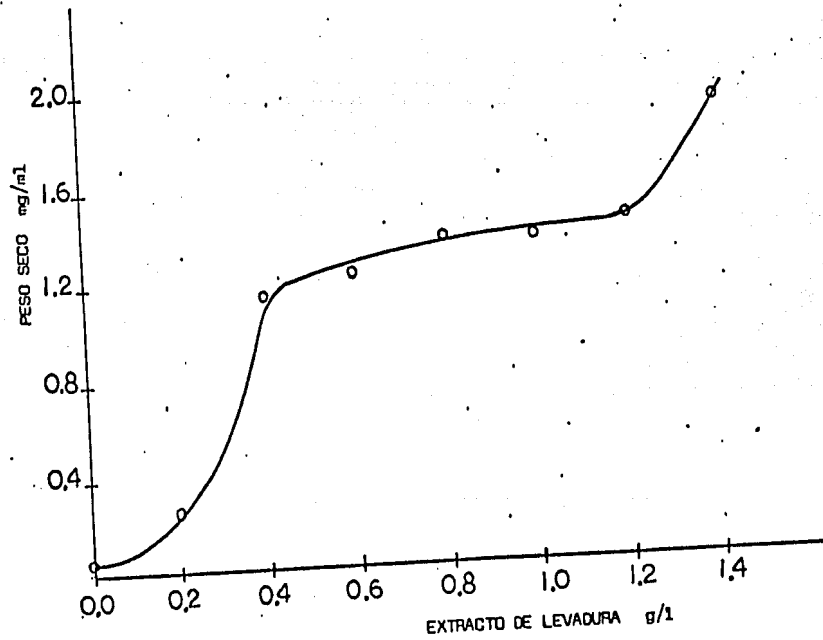


FIGURA No 11

EFEECTO DE LA CONCENTRACION DE EXTRACTO DE LEVADURA SOBRE EL
CRECIMIENTO DE LA CEPA 8 EN MEDIO DE SUSUKI CON DM 60

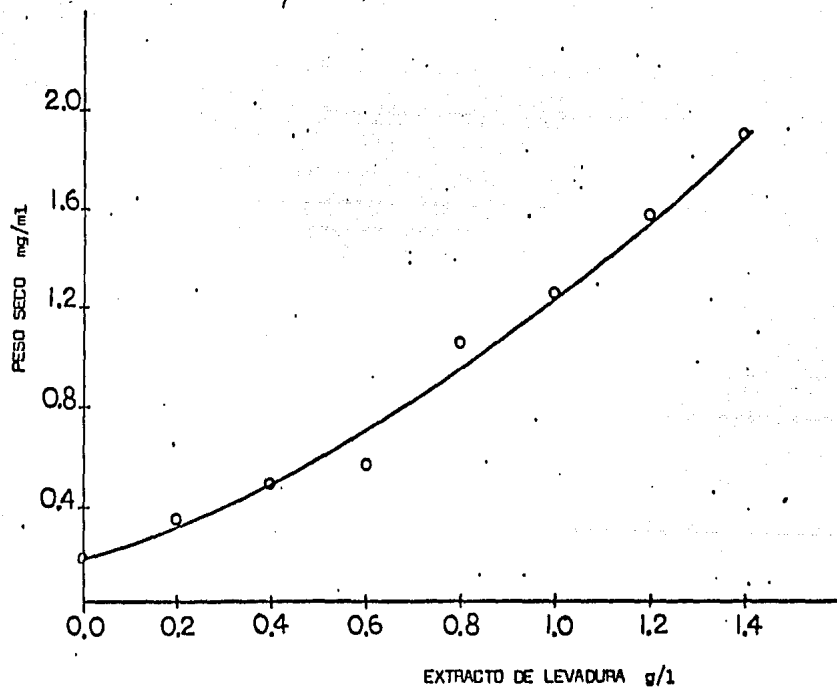
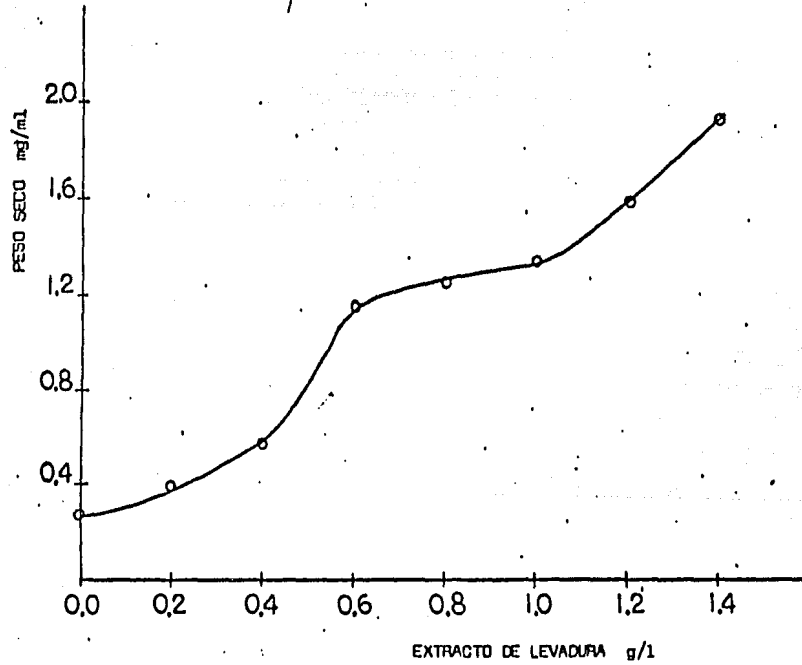


FIGURA No 12

EFFECTO DE LA CONCENTRACION DE EXTRACTO DE LEVADURA SOBRE EL
CRECIMIENTO DE A. niger EN MEDIO DE SUSUKI CON DM 60



Análisis Cualitativo de la Actividad Esterásica. La actividad esterásica se comprobó siguiendo la descripción previa en MATERIALES y METODOS. El cambio de color se realiza en 5 - 8 minutos, alcanzando un máximo hacia los 30. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente y según se pudo constatar es proporcional al crecimiento fúngico. Las fotos (Figuras 13, 14, 15 y 16) muestran la evidencia de la actividad enzimática presente en el medio.

Determinación Cuantitativa de la Actividad Esterásica. El ensayo de la enzima fué realizado de acuerdo con la descripción previa en MATERIALES y METODOS. Los resultados se presentan en la Tabla 2 y la Figura 17.

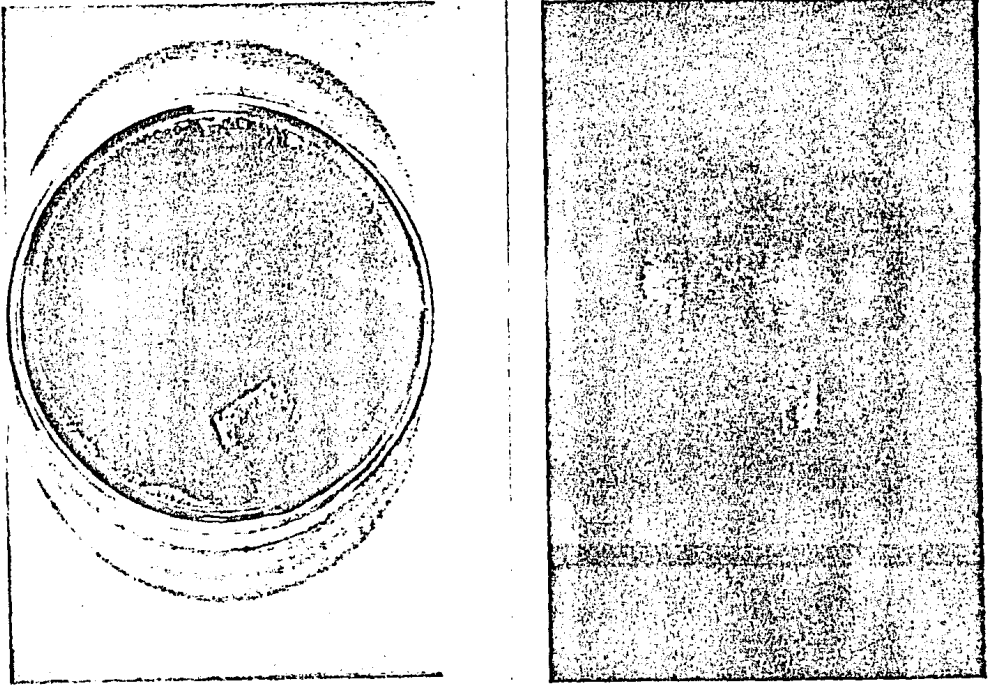


Figura 13. Inóculo de Aspergillus niger en el Medio de Suzuki, la foto de la izquierda muestra el papel filtro recién sumergido en β naftil acetato, tiempo cero. La foto de la derecha es un acercamiento de la anterior a los 11 minutos. Nótese el vire del color amarillo hacia el azul.

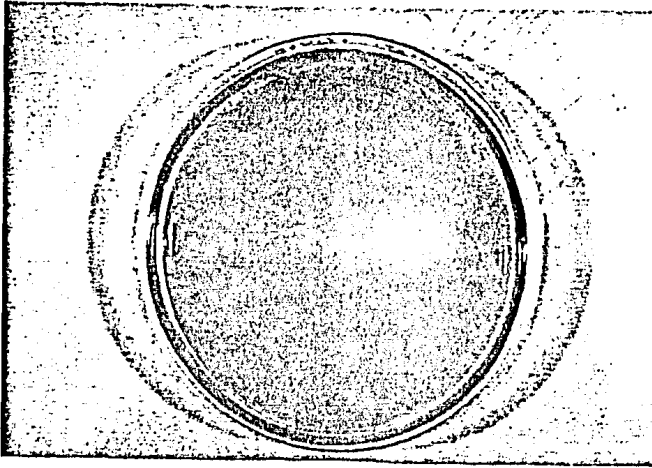


Figura 14. Determinación cualitativa de esterasa. Cepa No. 1 en el Medio de Suzuki. En algunos sitios todavía se aprecia el tono amarillento del sustrato. Tomada a los 10 minutos.

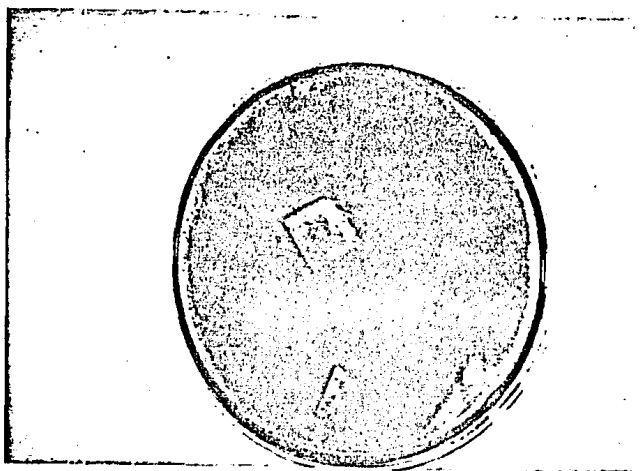


Figura 15. Determinación cualitativa de esterasa. Cepa No. 3 en el Medio de Suzuki. Fotografía tomada a los 15 minutos.

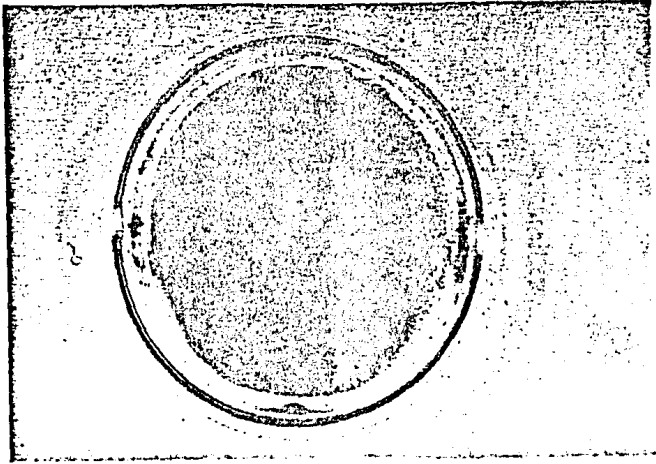


Figura 16. Determinación cualitativa de esterilidad. Cepa No. 8 en el Medio de Suzuki. Fotografía tomada a los 10 minutos.

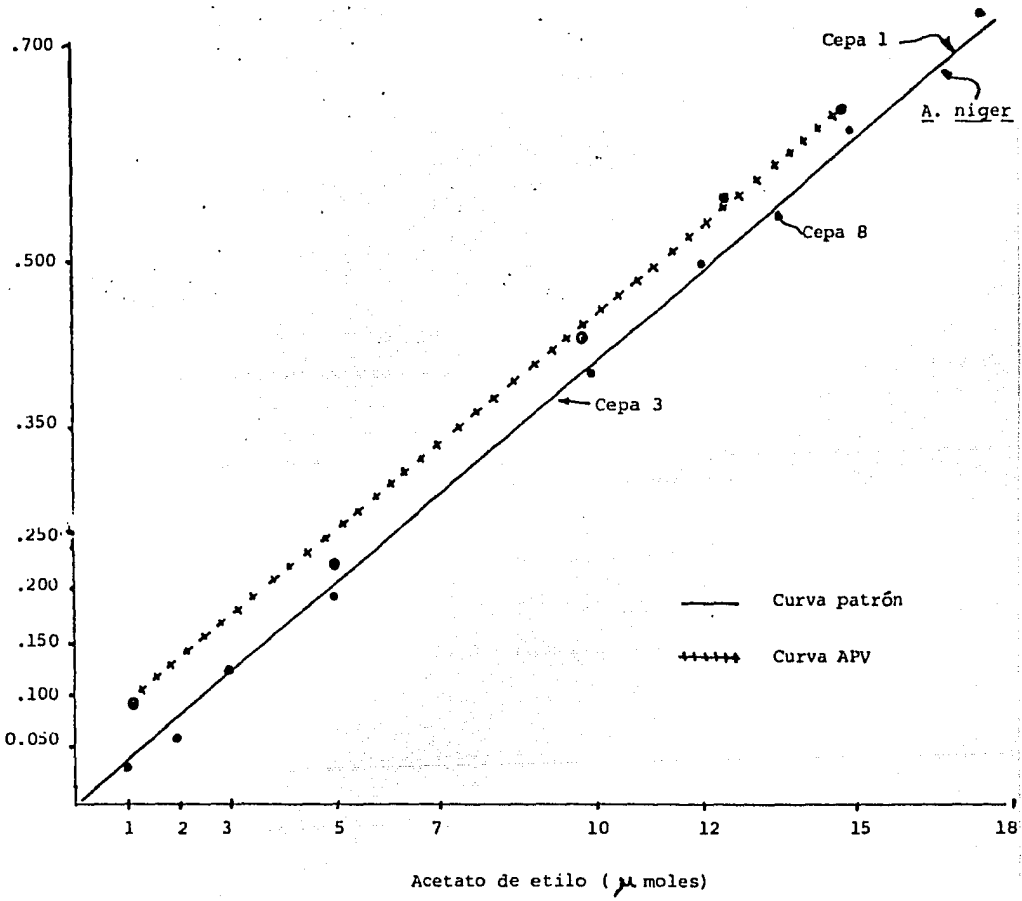


Fig. 17. Curva patrón de acetato de etilo comparada con los valores del polímero. Se incluyen las muestras experimentales.

TABLA 2

CURVA PATRON DE ACETATO DE ETILO COMPARADA CON LOS VALORES DEL
POLIMERO SUMINISTRADO (DM60) Y LAS MUESTRAS EXPERIMENTALES

TUBO	CONCENTRACION (μ moles)	A ₅₃₀
1	Testigo	- - - -
2	1	0.035
3	2	0.060
4	3	0.100
5	5	0.190
6	7	0.260
7	10	0.390
8	12	0.500
9	15	0.690
10	1	0.080
11	5	0.220
12	10	0.410
13	15	0.670
Cepa 1		0.700
Cepa 3		0.380
Cepa 8		0.550
A. Niger		0.660

Los tubos 1 - 9 corresponden a la curva patrón de acetato de etilo, --
del 10 al 13 representan muestras de DM60 hidrolizado y tratado tal --
como se describió previamente. Los datos de las cepas se presentan en
la Figura 17.

Localización de la Actividad Esterásica. Los resultados de la localización de la actividad esterásica se presentan en la Tabla 3. Los datos fueron obtenidos según la secuencia descrita en MATERIALES y METODOS.

TABLA 3
LOCALIZACION DE LA ACTIVIDAD ESTERASICA

FRACCION	ACTIVIDAD (A_{530}) expresado como % del total			
	Cepa 1	Cepa 3	Cepa 8	<u>A. niger</u>
Medio de cultivo (fracción 1)	68	45	84	70
Sobrenadante (fracción 2)	16	12	6	10
Precipitado (Fracción 3)	7	-	-	4
Sobrenadante (Fracción 4)	-	-	-	-
Precipitado (Fracción 5)	-	-	-	-

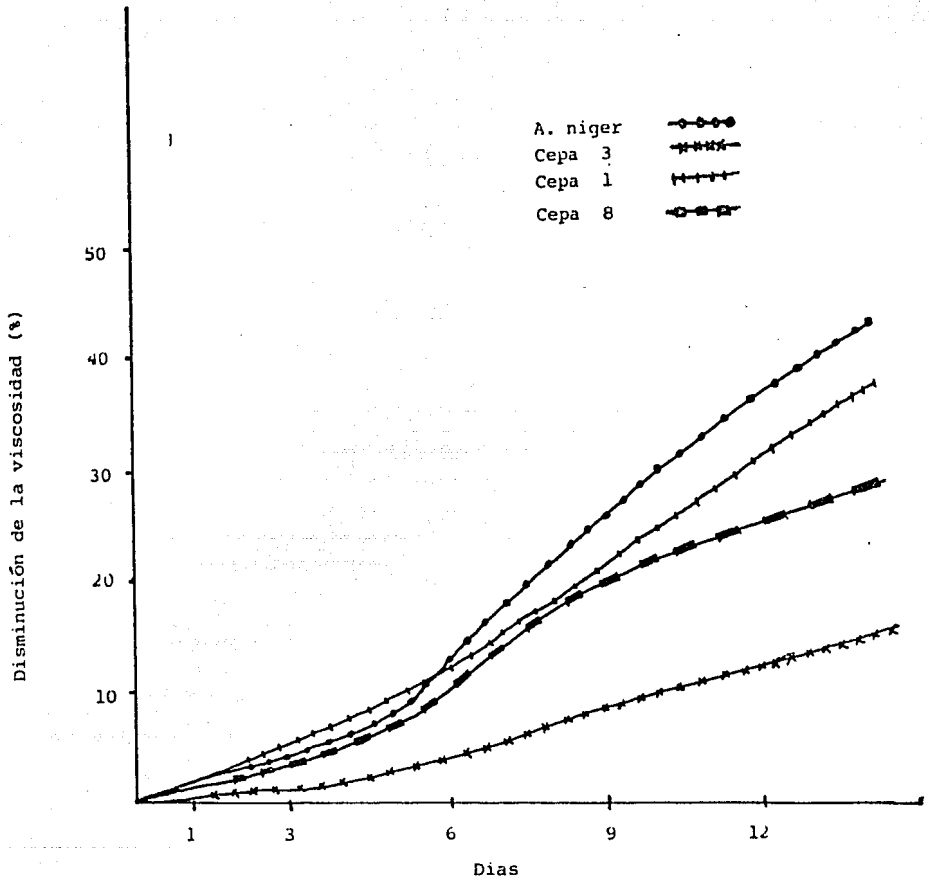


Fig. 18. Gráfica que muestra la pérdida de viscosidad del sustrato (PVA) debido a la acción enzimática de las diferentes cepas.

DISCUSION.-

Durante la Segunda Guerra Mundial, el Departamento de Logística del - Ejército Norteamericano empezó a reportar el deterioro que los hongos -- causaban en los materiales elaborados con base en fibras sintéticas. Esto se hacía más evidente en los trópicos y sitios cercanos al Ecuador, - donde la humedad y la temperatura son extremos. Desde entonces se empezaron a realizar estudios conducentes a explicar este fenómeno, apareciendo varias notas al respecto 11, 12, 13, 15. Sin embargo, al surgir otros materiales, los estudios se fueron orientando hacia los nuevos sustratos.

La degradación de plásticos comprende varias etapas que deben suceder en cierto orden y en un lapso determinado.

- 1.- Primero debe existir una fuerza de afinidad entre el microorganismo y el sustrato en la interfase.
- 2.- Posteriormente debe surgir cierta adherencia o colonización del sustrato.
- 3.- Deben realizarse una serie de reacciones enzimáticas para - que dicho sustrato pueda introducirse e incorporarse a la - dinámica metabólica del microorganismo.
- 4.- El microorganismo adaptado para la degradación deberá poseer un sistema enzimático que le permita oxidar el sustrato y -- por lo consiguiente obtener la energía necesaria para subsistir y reproducirse a expensas de éste.

Por otra parte, debemos considerar que la adaptación al medio ambiente es uno de los fenómenos más dramáticos que los microorganismos tienen que afrontar con el fin de sobrevivir y perpetuar su especie. Su grado de adaptación determina la viabilidad de las diversas especies -- dentro de sus respectivos hábitats. Las variables de éste comprenden -- factores como:

- a).- Calidad y cantidad de nutrientes
- b).- Temperatura
- c).- Humedad
- d).- Eh^0
- e).- Luz
- f).- pH

En cada caso existen condiciones y circunstancias muy especiales que deben analizarse de manera específica según el factor determinante y la especie microbiana de la cual se trate.

En la serie de experimentos realizados, es claro que los factores -- críticos son la calidad y la cantidad de los nutrientes, el Eh^0 y en -- menor grado los restantes.

Al someter a los microorganismos a diversas concentraciones de acetato de polivinilo, no solo se prueba la capacidad enzimática para degradar y asimilar al sustrato, sino también la adaptabilidad para sobreponerse a las condiciones de ayuno (starvation), en virtud de que el sustrato plástico es un compuesto xenobiótico, que como tal no puede asimilarse de inmediato, estableciéndose así las condiciones de dieta forzada.

Con el fin de mantener cierto orden en estas conclusiones, será conveniente analizar primero los factores ambientales y posteriormente la discusión de los resultados.

Tal como se mencionó previamente, los microorganismos capaces de este tipo de degradaciones deben pasar por una doble prueba consistente en:

- 1.- mantener su viabilidad a expensas de su metabolismo endógeno
- 2.- desarrollar un mecanismo de adhesión al sustrato que le permita fijarse a la partícula sintética.

Después de varias pruebas preliminares se pudo apreciar que la interacción de los microorganismos y el polímero en suspensión dependía de varios factores, tales como:

- La concentración y estructura del polímero
- † La proporción del inóculo inicial
- La intensidad y el tiempo de agitación
- El pH durante la incubación
- Tipo de crecimiento del microorganismo.

La Concentración y Estructura del Polímero

El Polímero polivinílico presenta cierta conformación en sus cadenas macromoleculares tal como se puede apreciar en el esquema de la página 11. Los substituyentes R, en este caso los $\text{CH}_3 - \text{COO}^-$ y COOH están al-

ternos en uno y otro lado del plano. A este tipo de configuración se le llama atáctico, ya que la distribución de los sustituyentes se efectúa al azar. Este tipo de polímeros posee arborescencias laterales poco voluminosas y presenta una ligera cristalinidad. La distancia de repetición a lo largo de la cadena macromolecular es de 2.52 \AA , lo cual indica una conformación en zig zag, en un plano totalmente trans. Esta característica hace que los impedimentos estéricos sean mínimos y que por lo tanto, existan bastantes posibilidades de reacción enzimática ⁴⁹. La exposición de los radicales $-\text{COOH}$ y CH_3-COO^- favorecen la formación de agregados ⁵⁰ y por lo tanto, de sitios reactivos. La concentración del polímero es importante ya que una sobresaturación podría funcionar como tóxica, además de la incapacidad para sobreponerse a las condiciones de ayuno forzoso (starvation). Otro aspecto que es crítico en la degradación es la primera interacción del microorganismo y el polímero. Este es un fenómeno bastante complejo, que a su vez depende de una gran cantidad de variables. Sin embargo, es conveniente dar una explicación breve y simple de esta situación. Primero, debemos tener en cuenta que la adhesión microbiana depende fundamentalmente de las superficies de contacto de sus estructuras externas y de las fuerzas químicas intrínsecas del polímero ⁵¹, tales como; la carga electrostática, la inhibición (wettability) y la presencia de componentes accesorios absorbidos al medio, del tipo electrolito, o las proteínas que aportan algún potencial electrostático. Estos factores determinan las propiedades de la interfase. La interfase se obtiene cuando las masas de dos fases no miscibles se ponen en contacto. Cuando un sólido se sumerge en una fase acuosa generalmente adquiere una cierta carga en su superficie, ya sea por absorción de iones suspendidos o por la ionización de los radicales próximos

a la superficie, de tal manera que la carga de la superficie depende en gran parte de la composición de la fase acuosa. Las superficies con exposición de radicales carboxilo, acetato o amino presentan cambios en la superficie cuando se cambia al pH. Es claro que una superficie cargada atraerá iones o partículas de carga contraria. Este tipo de interacción es importante en la adhesión microbiana a los sustratos hidrocarbonados. Sin embargo, también existe otra que no puede soslayarse, la imbibición. Se dice que ésta es la acción de mojar con un desplazamiento del fluido de una superficie por -- otro fluido, es decir, cuando un líquido moja a un sólido y se extiende sobre la superficie del sólido hasta formar una película -- delgada y no otra gota. Esto implica que la imbibición depende del ángulo de contacto que se forma entre las interfases sólida, líquida y gaseosa. Precisamente, la forma que adopta la gota sobre la superficie y el ángulo proyectado son los factores principales en la medición del fenómeno.

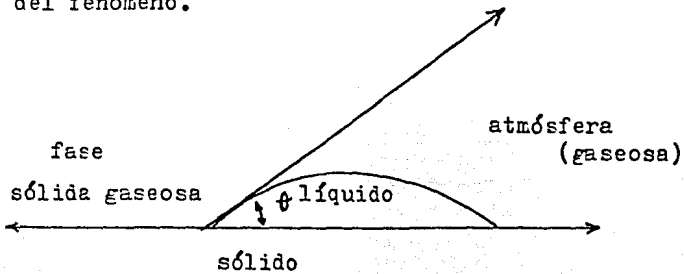


Figura 19.- Se muestra el ángulo de contacto formado por una gota de líquido sobre un sólido en una fase gaseosa (atmósfera).

Aún cuando no fué posible encontrar datos específicos sobre la capacidad de adhesión de los radicales externos para los hongos, si fué

factible encontrarlos para bacterias, por ejemplo: Zvagintev y Gusav⁵² demostraron que los grupos carboxilos de las superficies de las bacterias Gram positivas y negativas intervenían en la adsorción hacia las superficies de los sustratos. Asimismo, también se describe la importancia de los grupos aniónicos del tipo fosfato (de los ácidos teicoicos) presentes en las Gram positivas⁵³; más aún, el papel de los ácidos teicoicos en la adsorción hacia las diferentes superficies⁵⁴.

Como se puede apreciar, el fenómeno es bastante complejo y exhaustivo, de manera que solo se han presentado los aspectos más básicos en aras de comprender la importancia de esta primer etapa del proceso de la -- degradación.

La Proporción del Inóculo Inicial

Ya desde el inicio se ha mencionado que los hongos deben resistir -- una doble prueba, su capacidad de adaptación y la de resistencia a las condiciones de ayuno forzoso. Por esta razón se decidió utilizar una -- concentración final de 3×10^3 esporas ml^{-1} . De acuerdo con experimentos preliminares esto garantiza una selección adecuada capaz de germinar y substituir a las condiciones mencionadas.

La Intensidad y el Tiempo de Agitación

La agitación mecánica cumple un doble propósito, la aereación del sistema que se traducirá en mejores condiciones de oxidación del sustrato y la homogenización del mismo, es decir, asegurar que los susto

tos están en contacto directo con la biomasa fúngica y que a su vez ésta tenga la oportunidad de llevar a cabo las oxidaciones correspondientes. Existen reportes ^{46, 55} que resaltan la importancia de la agitación en este tipo de experimentos donde la única fuente de carbono es un sustrato recalcitrante. El oxígeno abastecido mediante la aereación es vital para la respiración, donde la fuente de energía, en este caso el petróleo, se oxida totalmente, y donde gran parte de la energía del compuesto ha sido asimilada por la biomasa fúngica. Además, durante las condiciones de aereación las hifas ramificadas y las sumergidas tienen la oportunidad de crecer en forma dispersa ocupando una área mayor que a su vez le proporcionará mayor contacto con el sustrato.

El pH durante la Incubación.

Al igual que en el nivel celular, el pH afecta el desarrollo de los hongos. En ocasiones el efecto es bastante específico según la especie que se trate. No se detectaron niveles anormales de NH_4^+ - proveniente de deaminaciones, ni tampoco hubo una acumulación de ácidos orgánicos. Las cepas degradadoras no mostraron cambios significativos de pH. Es posible que las concentraciones de KH_2PO_4 y de K_2HPO_4 (0.4 g l^{-1} y 3.2 g l^{-1} respectivamente) hayan actuado eficientemente como buffer a lo largo de las incubaciones.

Tipo de Crecimiento del Microorganismo

Como en otros microorganismos, el crecimiento fúngico se obtiene cuando las condiciones de cultivo son óptimas o por lo menos no son adversas a la mayoría de los procesos metabólicos. La ausencia o un mínimo

del crecimiento puede ser el resultado de una secuencia metabólica defectuosa o incompleta o puede deberse a algún factor físico desfavorable. Las gráficas 1-4 muestran las cinéticas de crecimiento de las cuatro cepas. En términos generales se puede considerar que las cepas 1, 3 y 8 siguen la cinética clásica del crecimiento fúngico. La cepa de - - A. niger tiene un comportamiento diferente, semejante a un crecimiento diaúxico. En las mismas gráficas se aprecia la disminución en las concentraciones de azúcares, ácidos nucleicos y proteínas. Esta respuesta fue específica de cada una de las cepas, ya que los factores determinantes (nutrientes, aereación, temperatura, luz, etc.) se mantuvieron constantes.

Em 1955, Ryan ⁶² describió el llamado crecimiento críptico que se manifiesta en condiciones de ayuno y produce un colapso en algunas secciones de hifas para seguir manteniendo la viabilidad de otras. Dadas las características de las curvas, pudiera pensarse que el crecimiento fúngico no se realizaba a expensas de la oxidación del acetato de polivinilo sino al crecimiento críptico. En apoyo a la hipótesis de que efectivamente los hongos oxidaban al sustrato, se verificó que las cepas 1, 3 y 8 mantienen los niveles de biomasa durante un lapso de 10-11 horas, - además de que los datos de biosíntesis de esterasa (tabla 2 y 3) se - - fueron incrementando en función del tiempo. En 1970-71, Lahoz y Miralles ⁶³ Trinci y Righelato ⁵⁹ y Bainbridge y colaboradores ⁶¹ realizaron estudios de limitación de glucosa en Aspergillus niger, Penicillium - - - chrysogenum y Aspergillus nidulans, respectivamente. Todos reportaron una drástica autólisis ocasionando que las biomásas se disminuyeran en un 50% en el quinto día de incubación. Aún considerando los restos celu

laras resultantes de la autólisis, estos hechos apoyan nuestras evidencias de que efectivamente el crecimiento fúngico se realiza a expensas del sustrato en todos los casos.

Dinámica de las Proteínas

En las cuatro gráficas (1-4) se puede apreciar que los niveles de -- proteína se abaten drásticamente; sin embargo, esto no debe considerarse como una desaparición sino que en realidad se están transformando en precursores nitrogenados de los ácidos nucleicos y de la quitina. Las cepas 1, 3 y A. niger inclusive muestran claramente la desaparición de proteína como tal y la biosíntesis acelerada de DNA, ésto se interpreta como una transformación de precursores nitrogenados. En el caso de la cepa 8, al parecer la proteína aporta nitrógeno a los monómeros constituyentes de la quitina. De hecho en esta cepa se puede apreciar un incremento posterior de biomasa a expensas de la asimilación de los nuevos constituyentes.

Algunos autores 45, 55, 56, 64 coinciden en que aproximadamente el 60-70% del nitrógeno total está como constituyente de la proteína fúngica. El resto (40-30%) del nitrógeno forma parte de los ácidos nucleicos, quitina y otros intermediarios. Esta consideración permite sugerir que la disminución de los niveles proteicos en realidad es un aporte de precursores nitrogenados para la biosíntesis de DNA y polímeros de la pared celular, tal como lo demuestran las pendientes de las cepas 1 y -- A. niger. En el primer caso el efecto se logra a los 5 días y en el segundo a los 2.5. Estos resultados demuestran que en la cepa 1 por lo -- menos un 50% de la proteína degradada se utiliza en la biosíntesis de -- los polímeros nitrogenados. En la cepa de A. niger, la proteína y los --

azúcares contribuyen a la biosíntesis del DNA principalmente. Las cepas 3 y 8 contribuyen a la síntesis de ácidos nucleicos y azúcares respectivamente. En el primer caso, las proteínas contribuyen primordialmente a la biosíntesis de DNA. En el segundo, las proteínas pudieran contribuir a la formación de polímeros de la pared celular.

Hacia el final de la incubación (10-11 días) los niveles de proteína han disminuido un 25% en las cepas 1, 3 y 8 en contraste con la cepa de A. niger que disminuyó aproximadamente un 63%.

Además de las consideraciones anteriores se podría sugerir que la síntesis enzimática se reduce a un mínimo necesario sólo para efectos de la degradación.

Dinámica de los Azúcares

Las pendientes de los azúcares muestran dos modalidades, una oscilatoria y la otra constante. Las cepas 1, 8 y A. niger presentan una dinámica oscilatoria y la cepa 3 una constante. En el caso de las tres primeras cepas se aprecia que la concentración inicial de los carbohidratos casi siempre es igual a la final, es decir, sólo existe una constante transformación de los azúcares que siendo material de reserva son utilizados como recurso energético durante la fase de ayuno y posteriormente, mediante reacciones anabólicas pasan a ser estructurales.^{46,47,48} En cambio la cepa 3 presenta una concentración de azúcares invariable durante el periodo de incubación. Se deduce que dichos azúcares son eminentemente estructurales. Los niveles oscilatorios de azúcares son muy acordes con la dinámica de crecimiento, lo cual sugiere una activa regulación metabólica encaminada a la biosíntesis de carbohidratos estructu

rales. La disminución inicial de éstos y las proteínas originan un desajuste en la relación C/N del microorganismo e induce la esporulación, -- este fenómeno se analiza en párrafos posteriores.

Dinámica del DNA

Los niveles de DNA también muestran dos modalidades; una oscilatoria y la otra casi constante. Las cepas 1, 3 y A. niger muestran cierta variación en los niveles de DNA. Aunque se muestran pronunciadas oscilaciones, las concentraciones iniciales y finales del DNA no cambian en forma drástica (1.0 - 1.5 µg/mg). En la etapa del crecimiento acelerado, las cepas 1 y 8 muestran un marcado descenso en la concentración de los ácidos nucleicos, lo cual pudiera interpretarse como una degradación progresiva en beneficio del crecimiento. Al parecer estas dos cepas son bastante "sensibles" al arresto metabólico, ya que sus principales constituyentes muestran una marcada disminución durante los primeros tres días. Se considera que en estas cepas, los ácidos nucleicos actúan como materiales de reserva. En cambio en las cepas 3 y A. niger las concentraciones de DNA van directamente proporcionales al crecimiento. Esto indica que el DNA no es una molécula susceptible a la degradación. Esta diferencia sugiere dos diferentes mecanismos reguladores del metabolismo de los ácidos nucleicos en las cuatro cepas. Otro detalle muy característico en las cepas lo constituye el incremento en los niveles del DNA en el momento de la esporulación.

Esporulación

Aunque es difícil precisar las causas de la esporulación en términos generales, ya que cada especie fúngica tiene una respuesta diferente que

induce la esporulación. Sin embargo, muchos autores coinciden en que -- los bajos niveles de nutrientes, especialmente glucosa y nitrógeno inducen este fenómeno. También se ha reportado que la inducción de estructuras reproductoras está asociada con las condiciones ambientales que deben ser poco propicias para el crecimiento ^{55,60} como por ejemplo, la nutrición forzada a través del APV como única fuente de carbono. La esporulación también está relacionada con un recambio de polímeros tanto citoplásmicos como estructurales de la pared celular, principalmente - 56,58. Zonneveld ⁵⁷ y otros autores ^{55,56} han descrito incrementos notables de enzimas catabólicas (glucanasas, proteinasas y desoxirribonucleasas) cuando prevalecen condiciones de ayuno durante la incubación. Asimismo, existen evidencias de que la depleción o ausencia de compuestos nitrogenados son inductores de la germinación en Penicillium ⁵⁵, - - - N. crassa ⁶⁰ y A. niger ^{64,65}.

Igual que en los casos anteriores, los patrones de esporulación presentan dos modalidades. Las cepas 1 y 8 esporulan hacia el séptimo día, mientras que la 3 y la A. niger lo hacen en el día 3.5. En las primeras se aprecia que los niveles de azúcares, proteína y ácidos nucleicos disminuyen drásticamente proporcionando intermediarios más simples a expensas de los cuales se realizan los procesos de biosíntesis. Las fases - - anabólicas y catabólicas están muy bien reguladas y al parecer las cepas no tienen dificultad para lograr el equilibrio. De hecho, en ambos casos las concentraciones de DNA se incrementan después de la esporulación. En cambio las cepas 3 y A. niger crecen y esporulan más rápido que las anteriores. En estas cepas los niveles de carbohidratos casi permanecen -- invariables y las proteínas sirven como precursores para la síntesis del DNA. Estos resultados pudieran implicar un estricto control en el meta-

bolismo muy activo a expensas de los intermediarios nitrogenados.

Relación C/N.-

Las condiciones experimentales durante el crecimiento de las cuatro cepas muestran desde el inicio una concentración incipiente de nitrógeno. La formulación de APV utilizada como sustrato carece de nitrógeno. El medio de cultivo posee sólo sulfato de amonio en baja concentración como único aporte nitrogenado, de tal manera que las cepas deben ajustar un equilibrio entre la relación C/N para poder funcionar eficientemente. Esto explica que las proteínas, ácidos nucleicos y carbohidratos se degraden en primer instancia y aporten metabolitos más simples que disminuyan la relación C/N. En términos generales se considera que los hongos son capaces de asimilar un 30-40% del carbono previamente degradado, para lograr esto deben mantener una relación C/N de 10:1^{64,65}. Se ha demostrado plenamente que en sistemas naturales⁶⁶ y experimentales^{11, 12, 26, 30} con bajo contenido de nitrógeno (lo que implica una amplia relación C/N) las degradaciones se realizan muy lentamente, y que éstas a su vez se estimularán por la adición de nitrógeno, aumentando en consecuencia la asimilación del carbono.

Los resultados expresados en las figuras 5-8 demuestran plenamente que el material nitrogenado en forma de extracto de levadura disminuye la relación C/N y a la vez incrementa la capacidad degradativa. También se comprueba que la esporulación de las cuatro cepas sólo se induce a bajos niveles de nitrógeno, ya que al añadirlo no se apreció esporulación alguna. De acuerdo con los resultados, la relación C/N determina -

la eficiencia de la degradación y no la disponibilidad de las fuentes energéticas. Esta consideración es válida para las cuatro cepas.

La adición del DOP [dioctil ftalato que actúa como plastificante] -- tuvo el mismo efecto en tres de las cepas, 1, 8 y A. niger, un aporte energético discreto que se tradujo en incremento de biomasa. Al igual que en el caso anterior, el plastificante carece de nitrógeno y por lo tanto, no contribuye a balancear la relación C/N. Al contrario, la incrementa. Sin embargo, en presencia del extracto de levadura se registra un crecimiento moderado que muestra claramente el papel regulador del C/N en la degradación de los compuestos aromáticos, ya que si se -- aprecia la pendiente donde el extracto de levadura es el único sustrato, se observa mayor crecimiento en la combinación de DOP/ Extracto de levadura debido al aporte y balance del carbono. Alexander ⁶⁶ estima que -- los hongos necesitan una relación C/N de 10 : 1 para poder asimilar ambos elementos. Es decir, la descomposición de 100 partes de un sustrato hidrocarbonado requerirá de 1,2 a 1,6 partes de nitrógeno.

La cepa 3 definitivamente no respondió al extracto de levadura ni a la combinación de éste con el DOP. Posiblemente por falta de inducibilidad enzimática.

La inclusión del extracto de levadura en estos experimentos tenía -- como objetivo el uniformizar las condiciones del cultivo y diferenciar ampliamente la asimilación de los tres sustratos.

Las Figuras 9, 10, 11 y 12 ilustran la influencia de diversas concentraciones del extracto de levadura en el incremento de biomasa. Los re-

ultados muestran definitivamente que las diferentes relaciones de C/N determinan la degradación y la asimilación del APV como sustrato. Recordemos que la relación C/N de un material susceptible a la asimilación - debe estar muy próximo a la relación C/N del citoplasma fúngico. Entonces es posible inferir la relación C/N para cada cepa. Para analizar estos experimentos debemos tener en cuenta que el extracto de levadura -- contiene aproximadamente un 8% de nitrógeno total [correspondiente a un 50% de proteína, según $N \times 6.25$] ^{67, 68}. Con base en este criterio, las cantidades del extracto de levadura deben considerarse a la mitad.

Las diversas concentraciones de extracto de levadura nos propician - dos efectos diferentes, uno rápido descrito mediante una pendiente exponencial, y otro lento. El primero se observa en las cepas 1 y 3 donde a concentraciones de 250 y 200 mg. de extracto de levadura se logran 0.8 y 1.0 mg. de biomasa, respectivamente. En cambio las cepas 8 y A. niger ofrecen una respuesta sigmoidal, pobre en su inicio, pero que después - se incrementa. Las cepas 3 y A. niger muestran una meseta donde no se - aprecia incremento en biomasa, pero al igual que el caso anterior, se - aumenta posteriormente. Es posible que estas dos cepas tengan algún mecanismo que regula la degradación el transporte o la asimilación del -- sustrato. Las cepas 1 y 8 mostraron un comportamiento uniforme donde el crecimiento es estimulado por concentraciones mayores del extracto.

La Actividad Enzimática.-

La determinación cualitativa de la actividad esterásica quedó de manifiesto con la técnica del β naftil acetato, tal como se puede apreciar en las Figuras 13-16. El hecho de que el micelio se haya teñido -- intensamente en derredor de las conidiosporas y el micelio sugieren que

la enzima pudiera ser extracelular. Situación que se confirma posteriormente con los datos de la Tabla 3 donde claramente se aprecia que todas las cepas secretan la enzima al medio de cultivo y que los valores máximos se observan precisamente en la fracción correspondiente a éste. La fracción 2 muestra las concentraciones de las enzimas adheridas a la fracción particulada. La fracción 3 sólo registra algo de la actividad enzimática resuspendida, que por cierto solo se produjo en las cepas con mayor producción enzimática.

La determinación cuantitativa de la actividad esterásica se expresa en la Tabla 2. Hubo necesidad de trazar dos curvas patrón para confirmar la veracidad de los valores. Para ello, se realizó una con un éster conocido de bajo peso molecular (representado en la gráfica por _____) y la otra se hizo con el hidrolizado del polímero en las condiciones descritas (representado en la gráfica por +++++). De tal manera que las cepas 1 y A. niger mostraron mayor capacidad biosintética de esterasa, siguiendo las cepas 8 y 3. Aunque los experimentos fueron realizados varias veces, e inclusive por du y triplicado los datos no concuerdan con los reportados en la Tabla 3, donde la mayor actividad enzimática corresponde a la cepa 8, A. niger, 1 y 3 respectivamente. Se considera que la discrepancia de valores obedece a que el método para esterasa no es específico para una especie enzimática determinada. Además, la composición química de las fracciones es muy heterogénea y sin duda incluye una gama de compuestos con radicales carboxílicos susceptibles a la esterificación. Esta situación debe considerarse durante la interpretación de los datos.

Aunque no era el propósito de este trabajo, se hicieron algunos intentos por aislar la esterasa involucrada. Para ello se siguieron los métodos

logías propuestas por Neilson y Garber ⁴⁰ y la de Rahim y Sih ⁶⁹. Los resultados no fueron satisfactorios. Al parecer existen algunas dificultades técnicas para poder aislar la especie enzimática responsable de la degradación. Diversos autores ^{40, 70} han encontrado que la actividad de esterasa en realidad está representada por complejos de isoenzimas (que incluyen hasta 7 especies diferentes presentes en una cepa) que actúan sobre sustratos muy selectos. Incluso, otros autores, ^{72,73,74 y 75} señalan que algunas especies de isoenzimas aparecen o se manifiestan con mayor actividad durante periodos donde se han establecido limitantes de nutrientes. Esto a su vez constituye una seria discrepancia con los fitopatólogos que utilizan técnicas de electroforesis en geles de almidón y poliacrilamida con el fin de establecer un patrón más preciso de identificación entre las diversas especies fitopatógenas ^{40, 70, 71}.

Cambios en el Sustrato. Viscosidad

La cepa 8 produjo durante la incubación cierto agente emulsificante que aclaró considerablemente el medio de cultivo. Es posible que dicho agente haya facilitado el contacto con el sustrato o bien haya servido como emulsificante de los restos de APV y los haya transportado al interior de la célula. Existen algunas evidencias en el sentido que los degradadores de hidrocarburos (alifáticos) producen agentes emulsificantes ^{76, 77}; y que inclusive, los géneros Acinetobacter y Torulopsis presentan cierta quimiotaxia positiva hacia las micelas de los hidrocarburos y que una vez que el polímero se ha fraccionado puede existir algún mecanismo de difusión facilitada ⁷⁸. Existe el caso de levaduras asimiladoras de alcanos donde el sustrato penetra muy rápido después de haber sufrido la degradación enzimática y la emulsificación ⁷⁷. En la Figura 20 se presenta un esquema de este fenómeno.

Nuevamente, sin duda los contenidos de lípidos, fosfolípidos y fosfatos de las conidiosporas son determinantes en este caso, ya que mantienen cierto potencial eléctrico en la superficie de hifas y conidias. Dicha polaridad contribuye al control de materiales insolubles y de elevado peso molecular hacia el sitio de transformación enzimática ⁷⁹.

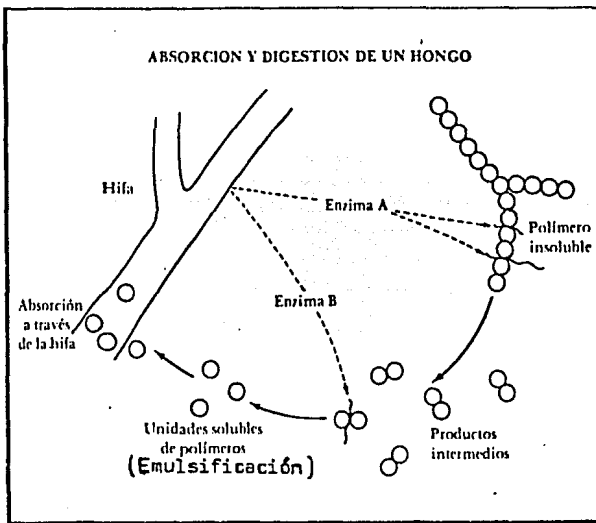


Figura 20. Esquema que ilustra el posible mecanismo de la acción enzimática y la emulsificación del sustrato. [adaptada de Moore-Landecker, E. ⁶⁴]

Los hongos tienen mayor capacidad para degradar este tipo de sustratos ya que su crecimiento requiere de bajas concentraciones de nutrientes, - además tienen la gran capacidad de regular la biomasa con base en la unidad de área del sustrato, de acuerdo con la concentración de éste en el -

medio. A medida que el hongo va colonizando el sustrato se modifica el medio ambiente aún a niveles imperceptibles. En nuestro caso, el crecimiento micelial era disperso, lo cual fué ventajoso por que -- existía mayor superficie expuesta para captar los nutrientes del medio. Este tipo de crecimiento es de naturaleza no Newtoniana, esto es, que sus viscosidades aparentes son una función de las fuerzas de fricción producidas durante la agitación. Por lo tanto, la suspensión es bastante heterogénea con respecto a la masa de los sustratos y los productos. Esta propiedad se aprovechó para establecer otra medida de la degradación del sustrato. Los resultados de la Figura 18 muestran claramente la pérdida de la viscosidad en las cuatro cepas. Donde las cepas de A. niger, la 1, 8 y 3 mostraron valores decrecientes. Nuevamente, cabe la posibilidad de que nuestra determinación enzimática no haya sido suficientemente precisa, con base en las consideraciones expresadas anteriormente. Sin embargo, es factible apreciar que la acción enzimática se manifiesta hacia el quinto día de incubación, una vez que los materiales solubles hayan sido -- recambiados y que el metabolismo se haya regulado. Después, según la actividad enzimática de cada cepa, el sustrato fué perdiendo viscosidad, lo cual se ha interpretado como sinónimo de degradación. Esta -- técnica indirecta corrobora los resultados cuantitativos expresados en la Tabla 2.

De acuerdo con las evidencias presentadas:

- a).- Crecimiento fúngico de cuatro cepas a expensas de una formulación de acetato de polivinilo como única fuente de carbono.
- b).- Efecto del balance C/N en la degradación.
- c).- Determinaciones cualitativas y cuantitativas de los niveles enzimáticos de esterazas.
- d).- Localización de la actividad enzimática.
- e).- Ensayo de la pérdida de viscosidad en el sustrato.

se concluye que las cuatro cepas efectivamente degradan, asimilan y obtienen energía a partir de un compuesto xenobiótico como el acetato de polivinilo.

La degradación es bastante incipiente y en definitivo no se puede considerar como alternativa para abatir este tipo de contaminaciones. Se considera que estas evidencias, aunque modestas, pudieran ser el inicio de futuros estudios apoyados en técnicas de biología molecular e inmovilización enzimática que pudieran representar una solución más viable y económica para degradar a estos contaminantes xenobióticos.

Comentario Final.

El haber seleccionado este tema de investigación constituía un reto en si, especialmente por que la bibliografía es difusa y carece de muchos datos cuantitativos e inclusive interpretaciones a nivel fisiológico. Este tipo de proyectos es difícil por la gran variedad de sustratos existentes y por la metodología tan sensible que debe aplicarse en cada caso.

Sin embargo, se considera que se ha cumplido el objetivo al haber demostrado cierto grado de degradación y sobre todo, el haber aportado datos cuantitativos en términos de la misma degradación.

El explicar toda la naturaleza constituye una tarea demasiado difícil para cualquier hombre y aún para cualquier época. Es mucho mejor hacer un poco con certidumbre y dejar el resto a los que vengan después de ti, que explicar todas las cosas.

Isaac Newton.

Bibliografía.-

- 1.- Anónimo. 1980 , Quality 7 ; revista técnica publicada por Shell Research Ltd. London.
- 2.- Mack, A/W. 1971 , Recycling of Plastics. Plastics World 29 No. 7; pp 44-49.
- 3.- Taylor, J. L; 1973, Polymer Degradation: Some positive aspects Chemical Technology 8, pp 552-559
- 4.- Ilgenfritz, E. M; 1975, Plastic Waste Handling: Practices in Solid Waste Management. Water, Air and Soil Pollution 4 pp 191-199.
- 5.- Shiber, J. G; 1977 , Plastic Pellets on the Coast of Lebanon. Marine Pollution Bulletin 10 (1), pp 28-30
- 6.- Gregory, M. R; 1977, Plastic Pellets on New Zealand Beaches. Marine Pollution Bulletin 8 (4) pp 82-84.
- 7.- Carpenter, E. J; Smith, K; L., 1972 Plastics on the Sargasso Sea Surface. Science 175 ; pp 1240-1241.
- 8.- Hays, H; Cormons, G ; 1974. Plastic Particles found in Tern Pellets and Coastal Beaches at Factory sites. Marine Pollution Bulletin 5 , pp 44-46.
- 9.- Carpenter, E. J ; Anderson, S. J; Harvey, G. R; Miklas, H, P; y Peck, B. P ; 1972 Polystyrene Spherules in Coastal Waters. Science 178 , pp 749-750.

- 10.- Anónimo. 1975 ; Plastic cups found in fish. Marine Pollution Bulletin 6 (10) pp 148.
- 11.- Klausmeier, R. E ; Jones, W. A ; 1961 ; Microbial Degradation of Plasticizers. publicado en Developments in Industrial Microbiology 2 pp. 47-53. Plenum Press Inc. New York.
- 12.- Klausmeier, R. E. 1968 ; Deterioration of Vinyl Resin Systems The Current Plasticizer Deterioration Study; publicado en Developments in Industrial Microbiology 9 pp 218-221 . Plenum Press, Inc. New York.
- 13.- Osmon, J. L ; Klausmeier, R/ E ; Jamison, E. T; 1970 , The Ability of Selected Yeast Cultures to Degrade Plasticized polyvinyl Systems. en: Developments in Industrial Microbiology 11 ; pp 447-452. The Society for Industrial Microbiology, Arlington, Virginia.
- 14.- Mills, J; Eiggins, H. O. W ; 1974 The biodeterioration of Certain Plasticizers by Thermophilic Fungi. International Biodeterioration Bull. 10. (2) pp 39-44.
- 15.- Booth, G. H; Robb, J. A ; 1968 , Bacterial Degradation of Plasticized PVC , Effect on some Physical Properties. Journal of Applied Chemistry 18 pp 194-197.
- 16.- Engelhardt, G; Wallnofer, P R ; 1976 , Metabolism of o- phthalic acid by different Gram Negative and Gram Positive Soil Bacteria. Archives of Microbiology 109 , pp 109-114.

- 17.- Engelhardt, G ; Wallnofer, P. R ; Hutzinger, O ; 1977 ; Biodegradation of Di-iso-Butyl Phtalate and related Dialkyl -- Phtalates by Penicillium lilacium. Chemosphere 6 pp. 347-354.
- 18.- Keyser, P ; Basayya, G. P ; Eaton, R. W y Ribbons, D. W ; 1976 ; Biodegradation of the Phtalates and their Esters by Bacteria. Environmental Health Perspectives 18 , pp. 159-166.
- 19.- Darby, R. T ; Kaplan, M. A ; 1968 , Fungal Susceptibility of Polyurethanes. Applied Microbiology 16 NO. 6 pp 900-905.
- 20.- Sharpe, A. N; Woodrow, M. N; 1971 , A Rapid Test for Biodegradability of PVC film by Pseudomonas. J. of Applied Bacteriology 34 (2) pp 485-489.
- 21.- Brown, S. B ; Mills, S. J ; Hulse, J. M ; 1974 , Chemical and Biological Degradation of Waste Plastics. Nature 250 No. 5462 pp 161-163.
- 22.- Fields, R. D ; Rodriguez, F ; Finn, R. K ; 1980 , Microbial Degradation of Polyesters: Polycaprolactone degraded by P. pullulans. J. of Applied Polymer Science 18 pp 3571-3579.
- 23.- Griffin, G. J. L ; 1976 , Degradation of Polyethylene in -- Compost Burial. J. of Polymer Science, Symposium no. 57 , pp 281-286.
- 24.- Griffin, G/ J. L ; 1977 , Degradable Plastics. Brunel Bull. Septiembre. Brunel University , Inglaterra.

- 25.- Fields, R. D ; Rodríguez, F. 1976 ; Microbial degradation of Aliphatic Polyesters, publicado en Proceedings of the 3rd International Biodegradation Symposium. pp 775-784 , University of Rhode Island, R.H. Applied Science Pub. Londres.
- 26.- Eggins, H. O. W; Mills, J; 1971 , Biodeterioration and Biodegradation of Synthetic Polymers. en Microbial Aspects of Pollution, G. Sykes y F. A. Skinner Eds. Academic Press, - London & New York.
- 27.- Anónimo. Nuevos Productos Químicos , 1975 , Salvat Editores, Barcelona, España.
- 28.- Scott, G. 1970. Vanishing Plastics? , New Scientist, 47 , p. 273.
- 29.- Higgins, J. I; Gilbert, P. D ; 1978 , The Biodegradation of Hydrocarbons. en The Oil Industry and Microbial Ecosystems. Proceedings of a Meeting Organized by the Institute of Petroleum en la University of Warwick, England. The Inst. of Petroleum , London.
- 30.- Mills, J. 1974 , The Biodeterioration of Synthetic Polymers and Plasticizers. en Critical Reviews in Environmental Control. C R C Press, Cleveland, Ohio.
- 31.- Diccionario Enciclopédico Salvat Universal. 1976 . 17 , - Salvat Editores, p 99. Barcelona, España.
- 32.- Urueta, E. 1975. Polímeros. ANUIES. México.

- 33.- Lapedes, D. N., (editor), 1978, Mc Graw Hill Dictionary of Scientific and Technical Terms. 2nd Ed. Mc Graw Hill Book Co. p. 1227. New York, London & Toronto.
- 34.- Van Nostrand's Scientific Encyclopedia. 1968 . 4a. Ed. D. Van Nostrand Co. Inc. Princeton, New Jersey, p 1366.
- 35.- Dickstein, J. ; Bouchard, R. 1964. Capítulo 5 de Manufacture of Plastics. W. M. Smith Ed. Reinhold Publishing Corp. New York.
- 36.- Suzuki, T., Ichihara, Y., Yamada, M; Tonomura, K.; 1973, Some Characteristics of Pseudomonas O-3 which utilizes Polyvinil Alcohol. Agricultural Biological Chemistry. 37 : 4 pp 743-755. Japan.
- 37.- Lowry, O. H; Rosebrough, N. J; Farr, A. L; y Randall, R. J. 1951 , Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent. Jour. of Biological Chemistry. 193 ; pp 265-275
- 38.- Trevelyan, W. E; Harrison, J. S.; 1952. Fractionation and Microdetermination of Cell Carbohydrates. Biochem. J. 50 , pp 298-305.
- 39.- Burton, K. 1956, A Study on the Conditions and Mechanism of The Diphenylamine Reaction for the Colorimetric Estimation of Deoxyribose nucleic acid. Biochem. Gournal. 62 pp. 315-323.
- 40.- Nealson, K. H; Garber, E. D; 1967, An Electrophoretic Survey of Esterases, Phosphatases and Leucine Aminopeptidases in Mycelial extracts of species of Aspergillus. Mycologia 59 ; pp 330-336

- 41.- Mann, F. G., Saunders, B. C; 1960 . Practical Organic Chemistry. Longmans, Londres.
- 42.- Rapport, M. M; Alonzo, N. 1955, Photometric Determination of Fatty Acid Ester groups in Phospholipids. J. Biol Chemistry , 217 ; 193-198.
- 43.- Kersters, K ; De Ley, J.; 1971 , Enzymatic Tests with resting cells and cell free extracts. En Methods in Microbiology Vol. 6A Editado por J. R. Norris y D. W. Ribbons. Academic Press, London.
- 44.- Thach, E. R., Newburger, R. M. 1972. Research Techniques in Biochemistry and Molecular Biology. W. A. Benjamin Inc. Menlo Park , California.
- 45.- Cochrane, V. W.; ¹⁹⁵⁸ Physiology of Fungi. John Wiley & Sons Inc. New York.
- 46.- Blumenthal, H. J.; 1963. Endogenous Metabolism of Filamentous Fungi. Annals of The New York Academy of Science. 102 pp 688-706.
- 47.- Dawes, E. A., Ribbons, D. W. , 1964 , Some Aspects of the Endogenous Metabolism of Bacteria. Bacteriological Reviews 28 No. 2 , pp 126-140.
- 48.- Dawes, E. A., 1964, Nutritional and Environmental Factors Affecting the Endogenous Metabolism of Bacteria. Proceedings of the Nutrition Society. 23 No. 2, pp. 163-170

- 49.- Champetier, G.; Monnerie, L. 1973, Introducción a la Química Macromolecular. Espasa Calpe, S. A. Madrid.
- 50.- Harris, R. H.; Mitchell, R. 1973, The Role of Polymers in Microbial Aggregation. Ann. Review of Microbiology 27 ; pp 27-50.
- 51.- Fletcher, M.; Letham, M. J.; Lynch, J. M.; Rutter, P. R. 1980. The Characteristics of Interphases and their Role in Microbial Attachment, en Microbial Adhesion to Surfaces, pp 67-78. R.C. W. Berkeley, J. M. Lynch, J. Melling; P. R. -- Rutter & B. Vincent, Editores. Society of Chemical Industry, Londres.
- 52.- Zvagintev, D. G.; Gusev, V. S.; 1971, Concentration and Separation of Bacteria on Dowex anionite. Mikrobiologiya 40 , pp 123-126.
- 53.- Wood, M. J., 1980, The Interaction of Microorganisms with Ion Exchange Resins. en Microbial Adhesion to Surfaces, pp 163-185. R. C. W. Berkeley, J. M. Lynch, J. Melling; P. R. Rutter & B. Vincent, Editores. Society of Chemical Industry, Londres.
- 54.- Ou, L.; Marquis, R. E.; 1970, Electro Mechanical Interactions in Cell Walls of Gram positive cocci. J. of Bacteriology 101 , pp 92-101.
- 55.- Bilgrami, K. S.; Verma, R. N, 1978 , Physiology of Fungi. Vikas Publishing Company, P V T, Ltd. New Delhi.

- 56.- Bull, A. T.; Trinci, A. P. J.; 1977, The Physiology and Metabolic Control of Fungal Growth. en Advances in Microbial Physiology 15. A. H. Rose y D. W. Tempest Editores. Academic Press, London.
- 57.- Zonneveld, B. J. M. 1974,. Journal of General Microbiology 81, pp 445-453.
- 58.- Righelato, R. C. ; Trinci, A. P. J.; Pirt, S. J. ; Peat, A. 1968. The Influence of Maintenance Energy and Growth Rate on the Metabolic Activity, Morphology and Conidiation of Penicillium chrysogenum. J. General Microbiology 50, pp. 399-412.
- 59.- Trinci, A. P. J.; Righelato, R. C. 1970. Changes in Constituents and Ultrastructure of Hyphal Compartments during Autolysis of Glucose-starved Penicillium chrysogenum. J. of General Microbiology 60, pp 239-249.
- 60.- Morton, A. G.; 1961. The Induction of Sporulation in Mould Fungi. Proceedings of the Royal Society. B 153, pp 158.
- 61.- Bainbridge, B. W.; Bull, A. T.; Pirt, S. J.; Rowley, B. I.; y Trinci, A. P. J.; 1971, Biochemical and Structural Changes in non-growing maintained and Autolysing cultures of Aspergillus nidulans. Transactions of the British Mycological Society 56 (3), pp 371-385.
- 62.- Ryan, F. J.; 1955. Spontaneous Mutation in non-dividing Bacteria. Genetics 40, pp. 726. Princeton.
- 63.- Lahoz, R.; Miralles, M., 1970, Influence of the Level of the Carbon Source on the Autolysis of Aspergillus niger. Journal of General Microbiology 62, pp271-276.

- 64.- Moore-Landecker, E. 1972. Fundamentals of the Fungi.
Prentice Hall, Denver.
- 65.- Smith, J. E.; Galbraith, J. C.; 1971, Biochemical and
Physiological Aspects of Differentiation in the Fungi. en
Advances in Microbial Physiology 5 , pp. 45-134.
- 66.- Alexander, M.; 1977. Introduction to Soil Microbiology.
John Wiley & Sons, Inc. 2a. Edición. New York.
- 67.- Anónimo. 1982. Trader's Guide to Fermentation Media For-
mulation. 2a. Edición Memphis, Tennessee.
- 68.- Anónimo. 1953. Difco Manual 9a. Edición, Laboratorios
Difco, Detroit, Michigan.
- 69.- Rahim, M. A.; Sih, C. J.; 1961. Microbial Steroid Este-
rases. en Methods in Enzymology Vol. 15, pp 675-684.
J. M. Lowenstein Editor. Academic Press, London, New York.
- 70.- Meyer, J. A.; Renard, J. L; 1969. Protein & Esterase --
Patterns of two Formae Speciales of Fusarium oxysporum, --
Phytopathology 68, pp 163-167.
- 71.- Gill, H. S.; Zentmyer, G. A. 1978. Identification of Phy-
tophthora species by Disc Electrophoresis. Phytopathology 68,
1409-1411.
- 72.- Dean, A. C. R.; 1972, Influence of Environment on the Con-
trol of Enzyme Synthesis. Journal of Applied and Chemical
Biotechnology 22 , pp 245-259.

- 73.- Beck, C.; von Meyenburg, H. K.; 1968. Enzyme Pattern and Aerobic Growth of Saccharomyces cerevisiae under various degrees of Glucose Limitation. J. of Bacteriology 96, No. 2. pp. 479-486.
- 74.- Tsao, M. U.; Madley, I. T.; 1969. Phosphofructokinase --- Isoenzymes of Neurospora crassa : Environmental Factor. Microbios 2 , pp 163-169
- 75.- Whitworth, D. A.; Ratledge, C.; 1975, An Analysis of Intermediary Metabolism and its Control in a Fat Synthesizing Yeast (Candida 107) growing on Glucose or Alkanes. Journal of General Microbiology 88 , pp 275-288.
- 76.- Goma, G.; Pareilleux, A.; Durand, G.; 1973 , Journal of --- Fermentation Technology. 51, pp 616-625.
- 77.- Pareilleux, A. 1979. Hydrocarbon Assimilation by Candida lipolytica, Formation of a Biosurfactant; Effects on Respiratory Activity and Growth. European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology 8 , pp. 91-101.
- 78.- Mc Lee, A. G.; Davies, S. L. 1972. Positive Chemotaxis toward Hydrocarbon Micelles. Canad. J. of Microbiology 18, pp. 315-322.
- 79.- Fisher, D. J.; Richmond, D. V. 1972. Fatty Acids and Hydrocarbon on the Surface and in the Wall of Fungal Spores. Proceeding of the Society for General Microbiology. 17 p London.