

Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno

Isolation and characterization of polyethylene-biodegrading mycomycetes

Carmen R. Méndez, Germán Vergaray, Vilma R. Béjar y Karina J. Cárdenas

Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Instituto de investigaciones de Ciencias Biológicas Antonio Raimondi.

Email Carmen Méndez: cmendezf@unmsm.edu.pe

Resumen

La biodegradación del polietileno por microorganismos es una solución para la reducción de la contaminación por plásticos. En el presente trabajo se muestran los resultados del aislamiento y caracterización de cepas de hongos capaces de degradar el polietileno, así como la determinación de las condiciones de pH y temperatura en las que se logran la mayor actividad. Los hongos fueron aislados de productos elaborados con polietileno obtenidos de relleno sanitario, la identificación taxonómica en base a características macroscópicas del crecimiento en placa petri y el estudio microscópico empleando la técnica de microcultivo en lámina. La actividad biodegradadora se determinó con la técnica de Kavelman y Kendrick, a temperaturas entre 20 y 30 °C y a pH 4,5 – 8,0. Veinte cepas de micromicetos fueron aisladas e identificadas, en 5 (25%) se evidenció la capacidad de biodegradar el polietileno a 20 °C, siendo el pH 6,5 el óptimo, la cepa de mayor rendimiento pertenece a la especie de *Aspergillus flavus*. A temperatura de 30 °C, 6 (30%) cepas evidenciaron actividad degradadora, siendo pH 6,5 el óptimo, la cepa de mayor rendimiento fue la misma del caso anterior.

Palabras claves: Polietileno, *Aspergillus flavus*, biodegradación, plásticos, micromicetos.

Abstract

The polyethylene biodegradation by microorganisms is a solution for the reduction of the plastics pollution. Isolation and characterization of the fungi capable to degrade the polyethylene are reported, as well as the conditions of pH and temperature in which they showed the higher activity. Fungi were isolated from polyethylene products obtained of sanitary landfill; the identification was realized in base to growth in petri plate and the technique of microculture in sheet. Biodegradative activity was determined with the Kavelman and Kendrick technique, for temperatures between 20 and 30 °C and to pH 4,5 – 8,0. Twenty strains of micromicete were isolated and identified. Five strain (25%) shown polyethylene biodegradative capacity to 20 °C, and pH 6,5. Six strain (30%) showed activity biodegradative to 30 °C, and pH 6,5. In both cases, *Aspergillus flavus* was the strain with greater performance.

Keywords: Polyethylene, *Aspergillus flavus*, biodegradation, plastics, mycomycetes

Introducción

Los hongos son organismos heterotróficos que sintetizan enzimas intra y extracelulares, estas tienen capacidad para transformar prácticamente cualquier tipo de sustrato orgánico y participan en la oxidación en algunos compuestos inorgánicos. Los plásticos son materiales poliméricos orgánicos; la mayoría elaborados con derivados del petróleo y en los últimos decenios han tenido una enorme difusión gracias a su versatilidad, durabilidad, estabilidad, resistencia a condiciones ambientales, bajo costo y múltiples posibilidades industriales. El polietileno (PE), es un plástico compuesto por monómeros de oleofinas, que conjuntamente con el cloruro de polivinilo son los plásticos de mayor uso en el Perú y en el mundo; se utilizan principalmente en la fabricación de rollos de plástico transparente para envolturas, películas, tuberías y botellas de bebidas gaseosas.

Los productos elaborados con polietileno presentan dos tipos de problemas: el deterioro cuando están siendo utilizados y la contaminación ambiental posterior a su uso. En este último caso debido a sus características de resistencia, no son degradados por los microorganismos del suelo y permanecen visibles en el medio ambiente por tiempo indefinido (Mangiarotti et al., 1994), a ello se debe agregar la formación de dioxinas, toxinas que están asociadas a: cáncer, daño del sistema reproductor y trastornos en el desarrollo de los seres vivos (Klenchuk, 1989).

Se han reportado trabajos sobre degradación biológica de plásticos y se considera que esta alternativa es importante desde el punto de vista de la salud humana, del medio ambiente y del factor económico, además es posible utilizar los subproductos como fuente de energía. Eggin et al. (1971) señalan que el proceso más importante para degradar plásticos es aquel en que sus componentes son utilizados como fuente de carbono. Por otro lado Lee et al. (1991) reportaron la degradación del polietileno por cepas de hongos y bacterias; y Pometto et al. (1992) lograron aislar una enzima fúngica capaz de degradar plásticos. Cuevas y Manaligod (1997) aislaron micromicetos del suelo capaces de degradar productos de polietileno y en 2001 Clutario y Cuevas demostraron que el micromiceto *Xylaria* sp. es capaz de colonizar el polietileno. El presente estudio tiene como objetivos aislar cepas de micromicetos capaces de degradar el polietileno, identificarlas, caracterizarlas y determinar las condiciones ambientales en las que se logra la mayor actividad biodegradadora.

Material y métodos

El estudio realizado fue del tipo correlacional, explicativo y prospectivo longitudinal, Se efectuó un muestreo no probabilístico intencional y en la recolección de datos se aplicó la técnica observacional, sistemática y estructurada.

De los rellenos sanitarios de desechos sólidos de la ciudad de Lima se seleccionó el relleno sanitario «El Zapallal», por su anti-

güedad y porque en el se encontró gran cantidad de desechos de plástico. El muestreo se hizo entre los meses de Enero y Marzo de 2004, en los diferentes puntos del relleno sanitario y aproximadamente a 1.0 m de profundidad, se tomaron 30 muestras correspondientes a envolturas transparentes de plástico, bolsas de basura y botellas de bebidas; posiblemente elaboradas con polietileno de baja densidad (LDPE), polietileno de alta densidad (HDPE) y tereftalato de polietileno respectivamente; con signos de deterioro, luego se colocaron en bolsas plásticas de primer uso.

En el laboratorio, las muestras se lavaron enérgicamente empleando cepillo y agua destilada estéril, en algunos casos se raspó la muestra con cuchillo hasta que quedó libre de adherencias. Luego se fraccionaron y cada fracción fue lavada con una solución de cloramfenicol en agua destilada estéril, con una concentración final de 0,5 mg/mL durante 60 minutos y luego con agua destilada estéril durante 30 minutos. Para el aislamiento de los hongos, posibles causantes de biodegradación, se volvieron a fraccionar las muestras en partículas minúsculas y se sembraron en placas con agar Czapeck-Dox a pH 5,0 al que se le adicionó extracto de levadura al 3%.

Para obtener cultivos puros de los hongos aislados se empleó el medio agar papa dextrosa (APD) y la técnica de diluciones seriadas. Para la identificación taxonómica se hizo el estudio macroscópico en placa petri y el estudio microscópico empleando la técnica de microcultivo en lámina. Las cepas aisladas se mantuvieron en el medio agar extracto de malta a temperatura ambiental.

El ensayo de la actividad degradadora de polietileno se realizó según los procedimientos descritos por Kavelman y Kendrick (1978), utilizando como única fuente de carbono el producto el polietileno sometido a prueba. Para la preparación del inóculo se hizo un barrido de la superficie del cultivo de cada cepa y se suspendieron las fracciones del hongo en agua destilada estéril hasta obtener una turbidez de 0,5 de la escala de Mac Farland, se colocó un mililitro de la suspensión en una placa petri estéril de 9 cm de diámetro y se le adicionó el medio agar Czapeck (ACZ) sin carbohidrato, fundido a 45 °C; las muestras a degradar (polietileno en forma de pellets) se colocaron en el centro de la placa; como control se empleó el mismo ACZ sin polietileno. Periódicamente se fue observando la actividad degradadora, haciendo la lectura cada semana.

Como prueba de biodegradación se observaron, con el estereoscopio, cambios en el brillo y fisuras o grietas en las muestras; en las mediciones del diámetro de las colonias se consideró el crecimiento observado en la superficie de la muestra, de acuerdo a los criterios mencionados en la tabla 1. Se aceptó la prueba si la cepa no desarrolló o lo hizo lentamente en el control correspondiente.

La experiencia se repitió con variaciones graduales de temperaturas (20 - 30 °C) y de pH (4,5; 6,5; 8,0), la lectura final se hizo a las 10 semanas.

Tabla 1. Criterio utilizado para calificar la actividad degradadora de las cepas de micromicetos degradadores de polietileno.

Calificación	Crecimiento
Muy Buena	++++ Abundante en todo el plástico.
Buena	+++ Moderado en todo el plástico.
Regular	++ Moderado en la parte inferior y media del plástico
Pobre	+ En la parte inferior del plástico
Sin actividad	- No hubo crecimiento

Tabla 2. Micromicetos aislados de rellenos sanitarios y su actividad degradadora de Polietileno a 20 °C. Actividad degradadora, + = pobre, ++ = regular, +++ = buena.

Micromiceto	pH		
	4,5	6,5	8,0
1. <i>Penicillium</i> sp. 001	-	+	-
2. <i>Penicillium</i> sp. 002	-	-	-
3. <i>Penicillium implicatum</i>	-	+	+
4. <i>Geotrichum</i>	-	-	-
5. <i>Mucor</i>	-	-	-
6. <i>Aspergillus niger</i>	-	+	+
7. <i>Aspergillus flavus</i>	-	++	+
8. <i>Aspergillus nidulans</i>	-	-	-
9. <i>Aspergillus</i> sp. 001	-	-	-
10. <i>Aspergillus</i> sp. 002	-	-	-
11. <i>Aspergillus</i> sp. 003	-	-	-
12. <i>Cladosporium</i> sp. 001	-	-	-
13. <i>Cladosporium</i> sp. 002	-	-	-
14. <i>Helminthosporium</i> sp. 001	-	+	-
15. <i>Helminthosporium</i> sp. 002	-	-	-
16. <i>Chaetomium globosum</i>	-	-	-
17. <i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
18. <i>Hormodendrum</i> sp.	-	-	-
19. <i>Cephalosporium</i> sp.	-	-	-
20. <i>Nigrospora</i> sp.	-	-	-

Resultados

De las 30 muestras de productos plásticos con signos de deterioro y sometidas al proceso de limpieza enérgica se aislaron 20 cepas de micromicetos pertenecientes a los géneros: *Aspergillus* (06), *Penicillium* (03) *Cladosporium* (02), *Geotrichum* (01), *Mucor* (01), *Helminthosporium* (02), *Chaetomium* (01), *Fusarium* (01), *Hormodendrum* (01), *Cephalosporium* (01) y *Nigrospora* (01).

De las 20 cepas estudiadas en 5 (25%) se evidenció la capacidad de degradar el plástico polietileno a la temperatura de 20 °C; a pH 4,5 ninguna cepa degradó el polietileno; a pH 6,5 lo degradaron 5 (25%) cepas y a pH 8, 3 (15%); una cepa de la especie *Aspergillus flavus* demostró ser regular degradadora del polietileno. Tabla 2.

Cuando se empleó la temperatura de 30 °C, 6 (30%) cepas evidenciaron capacidad de degradar el polietileno; a pH 4,5 ninguna cepa lo degradó; a pH 6,5 lo hicieron 6 (30%) cepas y a pH 8, 3 (15%). La cepa de *A. flavus* demostró ser buena degradadora de polietileno en las condiciones ensayadas. Tabla 3.

Discusión

Todos los géneros de hongos aislados de los artículos de polietileno recolectados en el relleno sanitario «El Zapallal» son comunes a los aislados en diferentes tipos de sustrato en Lima, por lo tanto es posible pensar que se trataría de cepas de micromicetos de origen común que se adaptan a metabolizar distinto tipo de sustrato debido a su variado potencial enzimático. Los géneros con mayor número de cepas aisladas *Aspergillus* y *Penicillium* también están entre los aislamientos de mayor frecuencia (Méndez, 1998; Whitekettle, 1991).

Se tomaron 30 muestras de productos elaborados con polietileno con signos de deterioro, sin embargo sólo se aislaron 20 cepas de micromicetos, ello posiblemente se debió a que el deterioro también pudo haber sido producido por bacterias (Lee et al., 1991; Pometto et al., 1992; Vergaray, 1989) o la técnica de aislamiento empleada no fue la adecuada.

El proceso de biodegradación del polietileno fue mayor cuando se empleó la temperatura de 30 °C, Clutario y Cuevas (2001)

Tabla 3. Micromicetos aislados de rellenos sanitarios y su actividad degradadora de Polietileno a 30 °C. Actividad degradadora, + = pobre, ++ = regular, +++ = buena

Micromiceto	pH		
	4,5	6,5	8,0
1. <i>Penicillium</i> sp. 001	-	+	-
2. <i>Penicillium</i> sp. 002	-	-	-
3. <i>Penicillium implicatum</i>	-	+	+
4. <i>Geotrichum</i>	-	-	-
5. <i>Mucor</i>	-	-	-
6. <i>Aspergillus Niger</i>	-	+	+
7. <i>Aspergillus flavus</i>	-	+++	++
8. <i>Aspergillus nidulans</i>	-	-	-
9. <i>Aspergillus</i> sp. 001	-	-	-
10. <i>Aspergillus</i> sp. 002	-	-	-
11. <i>Aspergillus</i> sp. 003	-	-	-
12. <i>Cladosporium</i> sp. 001	-	-	-
13. <i>Cladosporium</i> sp. 002	-	-	-
14. <i>Helminthosporium</i> sp. 001	-	+	-
15. <i>Helminthosporium</i> sp. 002	-	+	-
16. <i>Chaetomium globosum</i>	-	-	-
17. <i>Fusarium</i> sp.	-	-	-
18. <i>Hormodendrum</i> sp.	-	-	-
19. <i>Cephalosporium</i> sp.	-	-	-
20. <i>Nigrospora</i> sp.	-	-	-

reportaron un mayor rendimiento entre 25 °C y 28 °C, debemos mencionar que ellos utilizaron también la temperatura de 29 °C - 31 °C y tiras de polietileno, mientras que en nuestro trabajo utilizamos la temperatura de 20 °C y 30 °C y el polietileno en pellets. Respecto a las condiciones de pH, se observó que en ningún caso hubo actividad degradadora a pH 4,5; la mayor actividad se observó a la temperatura de 30 °C y a pH 6,5; Clutario y Cuevas (2001) utilizando el hongo *Xylaria* sp. y obtuvieron un mayor rendimiento a la temperatura de 25 °C - 28 °C y a pH 5,0.

La cepa de mayor rendimiento fue de la especie *Aspergillus flavus*, pero también se observó capacidad biodegradadora de polietileno en cepas de *Penicillium*, *Cladosporium* y *Helminthosporium*. Cuevas y Manaligod (1997) demostraron la misma actividad en cepas de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mycelia sterilia*.

De acuerdo a Johnson et al. (1993) los organismos que crecen en materiales plásticos pueden utilizar la molécula plastificante (por ejemplo el almidón o celulosa) o la molécula del polímero, en nuestro caso sólo se utilizó el polímero.

Otros investigadores como Whitekettle (1991) y Milstein et al. (1992) sostuvieron que los colonizadores activos de los polímeros son capaces de adherirse a sus sustratos debido a su capacidad para producir polímeros exocelulares compuestos primariamente de

polisacáridos no iónicos y aniónicos, considerando que tal adhesión a la superficie de los sustratos es un paso decisivo en la corrosión microbiana. En nuestro estudio, las condiciones favorables de temperatura y pH pudieron haber facilitado la producción de mucílago extracelular por los micromicetos probados.

Literatura citada

- Cuevas V. C. & Manaligod R. C. 1997. Isolation of decomposer fungi with plastic degrading ability. *Philippine Journal of Science* 126: 117-130.
- Clutario M. T and Cuevas V. C. 2001. Colonization of Plastics by *Xylaria* sp. *Philippine Journal of Science*. Vol. 130, N°2.
- Eggins H. O. W., Mills J., Holt A. & Scott G. 1971. Biodegradation and biodegradation of Synthesis polymers, 267-279. IM. Syker G. & Skinner F. A. (Editors). *Microbial Aspects of pollution. The Society for applied bacteriology. Symposium series N° 1*. Academic Press, London -New York.
- Johnson K. E., Pometto III A. L. & Nikolov Z. L. 1993. Degradation of degradable Starch-Polyethylene Plastics in compost Environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 59: 1155-1161.
- Kavelman R. & Kendrick B. 1978. Degradation of a plastic Polyepsiloncaprolactone by hiphomycetes. *Micologia* 70: 867-103.
- Klenchuk P.P. 1989. Degradability II Chemistry of Plastics costs a negative vote. *Plastics International*. September: 82-85.
- Lee B., Pometto III A. L., Fratzke A. and Bailey J. R. 1991. Biodegradation of degradable plastic Polyethylene by Phanaerochaete and Streptomyces Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 678-685.
- Mangiarotti A.M., Caretta G., Nelli, E. & Piotelli, E. 1994. Biodeterioro de materiales plásticos por Microhongos. *Boletín Micológico*. Vol. 9 (1-2): 39-47
- Méndez F.C.R. 1998. Micromicetos en arenas costeras de Lima. Tesis. Magister en Microbiología. Fac. Farmacia y Bioquímica. UNMSM. Lima-Perú
- Milstein O., Gersonde R., Hutterman A. Chem., M. H. & Meister J. J. 1992. Fungal Biodegradation of lignopolystyrene Graft Copolymers. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 3225- 3232.
- Orhan Y., Hrenovic J. and Briyükgungor H. 2004. Biodegradation of Plastic compost Bags under controlled soil conditions. *Acta Chim Slow*. 51: 579-588.
- Pometto III A.L., Lee B. and Johnson K. 1992. Production of an extracellular Polyethylene - degrading Enzyme (s) by Streptomyces Species. *Applied and Environmental Microbiology*. 58: 731-733.
- Vergaray U. G. 1989. Aislamiento, selección y caracterización de hongos nativos amiloliticos y fermentadores alcohólicos. Tesis de Doctor en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Biológicas. Lima- Perú
- Whitekettle W K. 1991. Effect of Surface-active chemicals on microbial adhesion. *Journal of Indian Microbiology*. 7:105-116

