

CANTUA. 2017; 16: 54-63

Fecha de recepción: 21.05.2017

Fecha de aceptación: 18.10.2017

**Efectividad de cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* en la degradación de polietileno de baja densidad aislados en los botaderos de los Distritos de Sicuani y Calca- Cusco.**

**Effectiveness of *Aspergillus* and *Penicillium* strains in the degradation of low-density polyethylene isolated in the dumps of the Districts of Sicuani and Calca-Cusco.**

**Autores: Martha N. Mostajo-Zavaleta<sup>1, a</sup>, María L Ochoa-Cámara<sup>1, b</sup>, Ruth L. Ambur-Soncco<sup>1, c</sup>**

<sup>1</sup> Escuela profesional de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional De San Antonio Abad del Cusco. Cusco, Perú.

<sup>a</sup>ORCID: 0000-0002-4350-9283

<sup>b</sup>ORCID: 0000-0002-3917-6172

<sup>c</sup>ORCID: 0000-0003-1798-1485

**RESUMEN**

El plástico es un material sintético, casi indispensable en la vida cotidiana, la producción desmesurada ha llevado a la acumulación de aproximadamente 1.000 millones de toneladas de plásticos en el planeta, causando un impacto ecológico en suelos y océanos. Se evaluó la eficiencia de degradación de Polietileno de baja densidad por cepas de *Aspergillus* y *Penicillium*, aislados de los botaderos de los distritos de Calca y Sicuani- Cusco. Para el aislamiento de hongos de residuos de plástico, se utilizó el método por incrustación, la identificación taxonómica de las cepas se realizó utilizando el sistema de identificación para especies de *Aspergillus* y *Penicillium* propuesto por Pitt. La concentración de esporas y la actividad degradadora de polietileno se determinó por el Método de Kavelman. & Kendrick. Se aislaron 7 cepas degradadoras de polietileno, de las cuales 4 corresponden a *Aspergillus flavus*, y 1 cepa a *Penicillium sp*, proveniente del botadero de Sicuani; 2 cepas a *Aspergillus terreus* aisladas del botadero de Calca. Las cepas más eficientes en degradación de polietileno fueron

3AS y 3BS aisladas de superficie con 50 y 29 % de eficiencia y la cepa 1BS aislada a 50 cm de profundidad con una eficiencia de degradación de 29 %, todas pertenecen a la especie de *Aspergillus flavus*, la cepa 2AS de *Penicillium sp*, se aisló a 50 cm de profundidad, con 15 % de eficiencia, aisladas del botadero de Sicuani. Las cepas 1AC, 1EC de *Aspergillus terreus*, con 15 y 17 % de eficiencia, fueron aisladas de superficie del botadero de Calca respectivamente. El Consorcio I constituido por 3 cepas de *Aspergillus flavus* fue el más eficiente degradando 44.3 % de polietileno, los consorcios II y III presentaron la misma eficiencia de degradación estadísticamente con 26 y 19 %.

**PALABRAS CLAVE:** *Aspergillus flavus*, cepas, degradación, polietileno, consorcio.

## **ABSTRACT**

Plastic is a synthetic material, that is almost indispensable in everyday life, but excessive production has led to the accumulation of approximately 1 billion tons of plastics on the planet, causing an ecological impact on soils and oceans. The purpose of the research work was to evaluate the degradation efficiency by *Aspergillus* and *Penicillium* strains in the degradation of low density polyethylene isolated in the dumps of the Sicuani and Calca districts- Cusco. We used the incrustation for the isolation of fungi from the plastic residues. The taxonomic identification of the strains was performed using the Watanabe guide and the system proposed by Pitt for *Aspergillus* and *Penicillium*. The spore concentration and the polyethylene degradation activity was determined by the Kavelman and Kendrick. Seven polyethylene degrading strains were isolated, of which 4 correspond to *Aspergillus flavus*, and 1 to *Penicillium sp*, from the Sicuani dump; 2 *Aspergillus terreus* strains isolated from the Calca dump. The most efficient strains in polyethylene degradation were 3AS and 3BS isolated from the surface with 50 and 29% efficiency and the 1BS strain isolated at 50 cm depth with a degradation efficiency of 29%, all belong to the *Aspergillus flavus* species, the 2AS strain of *Penicillium sp*, was isolated at 50 cm depth, presented an efficiency of 15%, isolated from the Sicuani dump. The 1AC and 1EC strains of *Aspergillus terreus* have a degradation efficiency of 15 and 17%, isolated from the surface and 5 cm deep from the Calca dump. Consortium I, made up of 3 strains of *Aspergillus flavus*, was the most efficient, degrading 44.3% of polyethylene. Consortia II and III presented the same degradation efficiency statistically with 26 and 19%.

**KEYWORDS:** *Aspergillus flavus*, strains, polyethylene, degradation, consortium.

## INTRODUCCIÓN

El polietileno es un material plástico usualmente presente en envases descartables. En la actualidad, los plásticos son muy utilizados y fabricados en grandes cantidades (Allsopp et al. 2007). Está 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 para envolturas, películas, tuberías y botellas de bebidas gaseosas (Sudhakar, 2008).

Cada año se consume aproximadamente alrededor del mundo, entre 500 billones y un trillón de bolsas plásticas (Programa de las Naciones Unidas para el medio ambiente. 2005 (PNUMA); los cuales son considerados como un problema ambiental debido a su difícil degradación, como contaminantes más importantes de los suelos que ocupan espacio en los vertederos de basura, cuerpos de agua, ríos y océanos (Allsopp et al. 2007).

La acumulación de residuos plásticos en el mundo está dando lugar a problemas en el manejo de la gestión ambiental y de residuos sólidos, especialmente los plásticos de baja densidad, debido a que tienen muy poca masa, reciclar no es económicamente viable. (Albertsson AC. et. al. 1995).

La ciudad del Cusco tiene una población de 348 935 habitantes (INEI, 2007), que genera un promedio total de 4,072.26 toneladas métricas mensual de residuos sólidos, con una producción per cápita de 0.82 kilogramos por habitante, , aproximadamente un 18.18 % de este, es plástico (Municipalidad Distrital del Cusco, 2011) proveniente del consumo creciente de múltiples productos de uso cotidiano, rural o industrial, cuyos residuos son llevados a diario a los botaderos, a esto se suma la mala actividad de la población en cuanto a la quema de plásticos, generando así la eliminación de contaminantes como dioxinas y furanos , que producen enfermedades principalmente a nivel de las vías respiratorias del ser humano (Efectos de la quema de plásticos sobre la salud 2014). La presencia de una alta masa de plásticos de baja densidad aumenta el volumen de los residuos sólidos en los botaderos ya que su degradación demora entre 400 a 1000 años (Estadísticas sobre las bolsas plásticas - VeoVerde 2010), lo que genera persistencia en el ambiente y por ende un elevado impacto ambiental.

Sony et al 2009. reportaron la degradación del polietileno por cepas de hongos y bacterias logrando aislar una enzima fúngica capaz de degradar plásticos. Por lo que, en el presente trabajo, se probó la efectividad de cepas de *Aspergillus* y *Penicillium* como biodegradadores de polietileno de baja densidad (LDPE), aislados de residuos de plásticos presentes en los botaderos de Sicuani y Calca; se aisló e identificó especies de hongos que degradan polietileno

de baja densidad a diferentes profundidades de los botaderos del distrito de Sicuani y Calca, se determinó cepas con mayor eficiencia en la degradación de LDPE y se evaluó la eficiencia de consorcios de cepas seleccionadas en base al porcentaje de degradación de polietileno.

## **METODOLOGÍA**

### **Trabajo en Campo**

Determinación de los puntos de muestreo.

Las muestras se colectarán en los botaderos de los distritos de Sicuani y Calca. El muestreo se realizó al azar, en cinco puntos de los botaderos de basura, en superficie y 50 cm de profundidad, las muestras de restos de bolsas de plástico fueron colocadas en frascos de vidrio estériles y llevadas en material refrigerante al laboratorio de Ecología de la Escuela Profesional de Biología-UNSAAC.

### **Trabajo en laboratorio**

#### ***Aislamiento de Hongos***

Las muestras de bolsas de plástico se lavaron con agua destilada estéril, seguidamente se colocaron en una solución de cloranfenicol al 0.5mg/ml por 60 minutos, luego fueron enjuagadas con agua destilada estéril durante 30 minutos. Posteriormente se fraccionaron en trozos más pequeños, y se procedió a la siembra en placas petri con agar PDA, incubándose a 25°C por 5 días. Una vez desarrolladas las colonias de hongos, se realizó la purificación de cepas, con el propósito de obtener cultivos puros, obteniéndose los ceparios que fueron conservados a 4°C en refrigeración correctamente codificados.

#### ***Identificación Taxonómica de los hongos aislados***

Para la identificación taxonómica se realizó un estudio macroscópico describiendo las características de las colonias y el estudio microscópico observando los conidios y estructuras reproductivas de los hongos. Para la determinación de género de micromycetos se consultó la guía de Watanabe T. (2002).

Características utilizadas en la identificación de especies de *Aspergillus*. Para clasificar las especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos se utilizó el sistema de identificación propuesto por Pitt (2001), utilizando tres medios de cultivo y dos temperaturas de incubación. Cada cepa se sembró en tres puntos en dos placas de medio CYA (Czapek Yeast extract agar), una placa de CYA con 20% de sacarosa (CY20S), y una placa de MEA (agar extracto de malta). Una de las placas de CYA se incubó a 37° C y las restantes a 25° C. Tras siete días de

incubación se procedió a la observación de las características morfológicas macroscópicas y microscópicas de los cultivos.

Principales características macros-cópicas:

- diámetro de las colonias
- coloración del anverso y del reverso de las colonias
- presencia de esclerocios
- presencia de gotas de exudado
- presencia de pigmento difusible
- textura de las colonias

Principales características micros-cópicas:

- disposición de las mótulas o fiálides sobre la vesícula
- longitud y anchura de los estipes
- forma y diámetro de las vesículas
- longitud y anchura de las mótulas y fiálides
- forma, diámetro, ornamentación y color de los conidios
- forma, tamaño y color de las células de Hülle
- forma, tamaño y color de las ascosporas. Pitt, J. (2001).

#### ***Determinación de la concentración de esporas***

Obtención de esporada. (Método de Kavelman R. & Kendrick B. 1978). Obtenida la esporada en placas Petri, se transfirió 10 ml de agua destilada con 1% de twenn estéril a cada placa. Luego este inoculo fue trasferido a un erlen meyer conteniendo 50 ml de agua destilada con 1% de Twenn, se homogenizo y se procedió al recuento de esporas en una cámara Neubauer, se realizó diluciones si fue necesario hasta obtener una concentración de  $10^5$  esporas por ml.

#### ***Actividad degradadora de polietileno descritos por Kavelman R. & Kendrick B. 1978***

Una vez obtenida la concentración de esporas de cada cepa se procedió a evaluar la eficiencia degradadora de polietileno de baja densidad, para lo cual se prepararon láminas de bolsas de plástico de baja densidad. Se transfirió 3 láminas de plástico de un mismo peso a un erlen meyer conteniendo 250 ml de medio liquido carente de fuente de carbono más 1% de tween, al cual se inoculo 10 ml de una concentración de  $10^5$  esporas y se incubo a temperatura de 25°C durante 45 días. Este procedimiento se realizó para cada una de las cepas aisladas.

Al final de la incubación se desinfecto con una solución de hipoclorido de sodio al 5% las láminas de plástico, para eliminar el biofilm generado en la superficie, luego estas laminas

fueron sometidas a secado hasta obtener peso constante; posteriormente se pesaron en una balanza de precisión analítica gravimétrica, modelo S 2000 ( $\pm 0,0001g$ ), con el propósito de determinar el peso perdido por la degradación de los hongos, finalmente se determinó el porcentaje de degradación de cada cepa evaluada. Posteriormente se formaron 3 consorcios de cepas seleccionadas en base a la eficiencia de degradación y se evaluó el incremento en cada consorcio. La metodología para la evaluación de la eficiencia de degradación de los consorcios fue la misma que se utilizó para la evaluación de cepas, con la diferencia de que se utilizó un erlen meyer conteniendo 1 litro de medio carente de fuente de carbono más 1% de tween, al cual se adiciono 20 ml de inóculo de  $10^5$  esporas de cada una de las cepas seleccionadas para cada consorcio. Se incubo a  $25^{\circ}C$  por un tiempo de 45 días. A cada medio líquido de cultivo se adiciono una fuente de oxígeno, para lo que se utilizó un motor de aireación para acuario, modelo AP-208.

Se formaron 3 Consorcios de cepas seleccionadas agrupadas en base al porcentaje de degradación, evaluando el incremento de degradación en cada consorcio por diferencia de peso.

#### ***Tratamiento Estadístico de datos***

Para el análisis de datos estadísticos se utilizó ANOVA y Prueba Múltiple de Rangos para Peso Degradado por Consorcio de cepas, con la finalidad de determinar los consorcios de cepas más eficientes en la degradación de polietileno de baja densidad.

## **RESULTADOS**

#### ***Identificación y determinación de cepas degradadoras de polietileno de baja densidad aisladas de los botaderos de Sicuani y Calca***

Se aislaron siete cepas degradadoras de polietileno de baja densidad, cinco del botadero de Sicuani y dos del botadero de Calca. Las cepas 3ASy 3BS aisladas de la superficie del botadero de Sicuani, degradaron con mayor eficiencia polietileno de baja densidad y corresponden a la especie *Aspergillus flavus*, teniendo un rendimiento de 50, 29 % a excepción de la cepa 2CS que degrado un 14 %; a 50 cm se aislaron la cepa 1BS que corresponde a *A .flavus* y la cepa 2AS a *Penicillium sp*, con una capacidad de degradación de polietileno de baja densidad de 29 y 15 % respectivamente. Las cepas 1AC y 1EC aisladas de la superficie del botadero de Calca, corresponden a la especie *A. terreus*, degradaron 17 y 15 % de polietileno de baja densidad (tabla 1).

**Tabla 1.**

Especies de hongos degradadores de LDPE aislados a diferentes profundidades de los botaderos de Calca y Sicuani.

Profundidad	Cepas-Sicuani	% Degradación	Cepas-Calca	% de Degradación
Superficie	3AS <i>A.flavus</i>	50	1AC <i>A.terreus</i>	15
	3BS <i>flavus</i>	29		
	2CS <i>A.flavus</i>	14	1EC <i>A.terreus</i>	17
	---	-----		
50 cm	1BS <i>A.flavus</i>	29	-----	-----
	2AS <i>Penicillium</i>	15		
	<i>sp</i>			

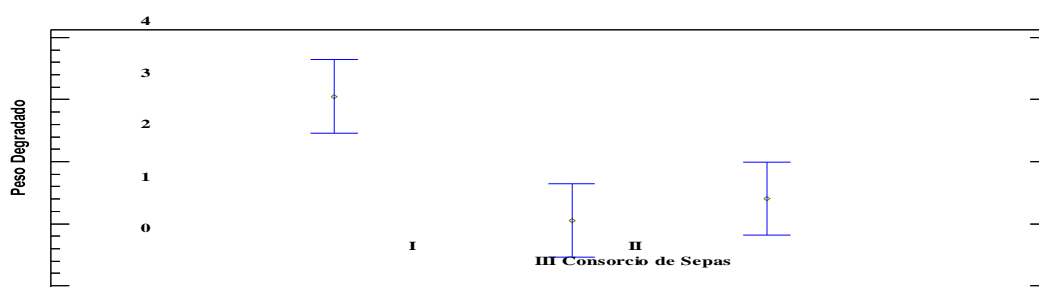
#### ***Evaluación de la eficiencia de Consorcios de cepas por peso degradado de polietileno***

Resultados en relación a la eficiencia de degradación por consorcios de cepas, revelaron que existe diferencia al 95 % de significancia, en la degradación de LDPE en los tres consorcios evaluados ( $F_{2,6} = 10,22; P < 0,001$ ). Los resultados indican la relación positiva entre el efecto de los consorcios y pesos degradados de polietileno (expresado en %). Así el Consorcio I constituido por 3 cepas de *Aspergillus flavus*, fue el que presentó mayor eficiencia en la degradación de LDPE (44.3 %), el Consorcio II degradó 26 %, constituido por dos cepas de *Aspergillus terreus* y el Consorcio III un 19 % formado por una cepa de *Aspergillus flavus* y una cepa de *Penicillium sp*, teniendo estadísticamente la misma eficiencia (Tabla.2 y fig. 1)

**Tabla 2.**

Porcentaje de degradación de polietileno de Consorcios de cepas.

Consortio de cepas	% de degradación
I 3AS <i>A.flavus</i> 3BS <i>A.</i> <i>flavus</i> 2CS <i>A.flavus</i>	44.5
II 1AC <i>A.terreus</i> 1EC <i>A.terreus</i>	26
III 2CS <i>A. flavus</i> 2AS <i>Penicillium sp.</i>	19



**Figura 1.** Eficiencia de degradación de polietileno de los 3 Consorcios de cepas evaluadas.

## DISCUSIÓN

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo el 57 % de cepas que degradan polietileno corresponden a *Aspergillus flavus* provenientes del botadero de Sicuani, de las cuales las cepas aisladas de superficie fueron las más eficientes con un promedio de degradación de LDPE de 36 %, coincidiendo con Arancibia (2014) quien obtuvo buenos resultados de degradación en condiciones de aerobiosis. Méndez et al. (2012), en su trabajo aisló una cepa de la especie *Aspergillus flavus* que demostró ser regular degradadora del polietileno. El 29 % de cepas degradadoras corresponden a *Aspergillus terreus* que degradaron en un rango de 17 a 15% provenientes del botadero de Calca y el 14% de cepas degradadoras corresponden a *Penicillium sp.* provenientes del botadero de Sicuani que degradó 15% de polietileno, estas especies también fueron aisladas por Méndez et al. (2012) y Uribe et al. (2010), demostrando que las especies del género *Aspergillus* y *Penicillium* son degradadoras de



polietileno.

Al evaluar la eficiencia de los consorcios de cepas degradadoras de polietileno, se ha observado, que la agrupación de cepas incrementa la degradación, es así que el Consorcio I formado por 3 cepas de *A. flavus* incrementó el porcentaje de degradación de dos de ellas en un 15.3 %, lo mismo ocurrió con el consorcio II constituido por 2 cepas de *A. terreus* donde se incrementó un 11% la degradación y en el consorcio III formado por una cepa de *A. flavus* y una cepa de *Penicillium sp* se incrementó en un 6 %, indicándonos que la agrupación de cepas de diferentes géneros potencia en menor cantidad la degradación. Coincidiendo con (Restrepo. J &Thompson. M, 2014) quien menciona que los estudios se hacen con cepas puras, lo cual es improbable que ocurra naturalmente y son consorcios enteros los que participan en la biodegradación, y la biodiversidad de éstos varía de acuerdo al tipo de ambiente.

## CONCLUSIONES

Se aislaron 7 cepas degradadoras de polietileno, de las cuales 4 corresponden a *Aspergillus flavus* provenientes del botadero de Sicuani, tres cepas aisladas de superficie, una a 50 cm de profundidad, y la cepa de *Penicillium sp*, aislada a 50 cm de profundidad; dos cepas de *Aspergillus terreus* aisladas de la superficie del botadero de Calca. Las cepas más eficientes en la degradación de polietileno de baja densidad, corresponden a *Aspergillus flavus* con un promedio de 36 %, aisladas de superficie y 50 cm de profundidad, del botadero de Sicuani. El Consorcio I constituido por 3 cepas de *Aspergillus flavus* fue el más eficiente con 44.3% de degradación de polietileno de baja densidad. El Consorcio II, constituido por dos cepas de *Aspergillus terreus* y el Consorcio III formado por una cepa de *Aspergillus flavus* y una cepa de *Penicillium sp*. presentaron un 26 % y 19 %, promedios estadísticamente iguales.

### **Autor correspondal.**

Martha N. Mostajo- Zavaleta

Correo electrónico. martha.mostajo@unsaac.edu.pe

## REFERENCIAS

Albertsson, A.C., Barenstedt, C., Karlsson, S. & Lindberg, T. (1995). Degradation product pattern and morphology changes as means to differentiate abiotically and biotically aged degradable polyethylene. *Polymer*, 36, 3075-3083.

Arancibia, C. (2014). *Caracterización de Alternaria alternata aislada de contenedores residuales urbanos y su potencial uso en la degradación de 6*

*polímeros de Importancia ambiental*. [Tesis de Grado]. Escuela de Tecnología Médica , Universidad Santo Tomas.

Sanchez, N ( 2010). *Estadística sobre bolsas las bolsas plásticas*. Nueva Mujer. <https://www.nuevamujer.com/lifestyle/2010/03/15/estadisticas-sobre-las-bolsas-plasticas.html>

Georgina. (2014). *Efectos de la quema de plásticos sobre la salud*. Vida Natural y Saludable <http://vidanatur.com/efectos-de-la-quema-de-plasticos-sobre-la-salud>

Instituto Nacional de Estadística e Informática (2015). *Poblacional de la Provincia del Cusco- Perú*. Instituto Nacional de Estadística e Informática.

Méndez, R., Vergaray, G., Béjar, R. & Cárdenas, J. (2012). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Rev peru biol*, 13(3), 203 - 205

Municipalidad Provincial del Cusco. (2011). *Plan de Manejo de Residuos Sólidos de la Municipalidad Provincial del Cusco. - Perú*. Municipalidad Provincial del Cusco.

Allsop, M., Walters, A., Santillo, D. & Johnston, P. (2007). *Contaminación por plásticos en los océanos del mundo*. Greenpeace.

Pitt, J. (2001). *A Laboratory guide to commom aspergillus and pennicillium especies and their teleomorphs*. United States Departament of Agricultural Research Service.

Sudhakar, M., Doble, M., Murthy, P. & Venkatesan, R. Marine (2008). Microbemediated biodegradation of low- and high-density polyethylene's. *International Biodeterioration& Biodegradation*, 61, 203-213.

Restrepo B & Thompson, M. (2014). Microbial degradation and deterioration of polyethylene e A review. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 88, 83-90.

Uribe, D., Giraldo,D., Gutiérrez, S. & Merino, F. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Rev Peru biol*, 17(1), 133 – 136.

Watanabe, T. (2002). *Pictoryal Atlas of soil seed Fungy*. CRC Press.