

# DEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD POR *ASPERGILLUS NIGER*

Fecha de aceptación: 01/07/2024

### **Fátima Medina Mercado**

Laboratorio de Micología Experimental  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de San Luis  
Potosí, S.L.P.  
San Luis Potosí, S.L.P., México

### **Adriana Rodríguez Pérez**

Universidad Autónoma de San Luis Potosí  
Centro de Investigación y Extensión de la  
Zona Media. El Balandran  
Cd. Fernández, San Luis Potosí  
<https://orcid.org/0000-0002-6570-6579>

### **Juan Fernando Cárdenas González**

Universidad Autónoma de San Luis Potosí.  
Centro de Investigación y Extensión de la  
Zona Media. El Balandran  
Cd. Fernández, San Luis Potosí  
<https://orcid.org/0000-0002-3502-5959>

### **Claudia M. Martínez Rodríguez**

Laboratorio de Micología Experimental  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de San Luis  
Potosí, S.L.P.  
San Luis Potosí, S.L.P., México  
<https://orcid.org/0000-0002-5335-6137>

### **Ismael Acosta Rodríguez**

Laboratorio de Micología Experimental  
Facultad de Ciencias Químicas  
Universidad Autónoma de San Luis  
Potosí, S.L.P.  
San Luis Potosí, S.L.P., México  
<https://orcid.org/0000-0001-8620-2727>

**RESUMEN:** En este trabajo, se analizó la capacidad de degradación de poliuretano de baja densidad por el hongo *Aspergillus niger*. En las condiciones analizadas, el hongo no degrada el sustrato, pues no se observa ninguna diferencia en el peso seco de los mismos, después del periodo de incubación, aunque se observa que si hay crecimiento del hongo (determinado por peso seco) aunque en muy baja proporción, mientras que también se observa la producción de proteína extracelular (determinada por la absorbancia a 750 nm), en muy baja cantidad, en las condiciones analizadas. Además, se analizó la producción de las enzimas lacasa y esterasa extracelulares, obteniendo una actividad de lacasa de 0.16 U/mL, y de esterasa de 0.09 U/mL, mientras que en el control sin sustrato no se observó actividad enzimática. En conclusión, el hongo no degrada el polietileno de baja

densidad, lo cual puede deberse a que no tiene esta capacidad, a que se requiere más tiempo de incubación o a que se necesitan otras condiciones de incubación y/u otros microorganismos.

**PALABRAS CLAVE:** Degradación, poliuretano, hongos, biorremediación

**ABSTRACT:** In this work, the degradation capacity of low-density polyurethane by the fungus *Aspergillus niger* was analyzed. Under the conditions analyzed, the fungus does not degrade the substratum, since no difference is observed in their dry weight after the incubation period, although it is observed that there is growth of the fungus (determined by dry weight) although in very low proportion, while the production of extracellular protein (determined by the absorbance at 750 nm) is also observed, in a very low quantity, under the conditions analyzed. In addition, the production of extracellular laccase and esterase enzymes was analyzed, obtaining a laccase activity of 0.16 U/mL, and a esterase activity of 0.09 U/mL, while in the control without substrate no enzymatic activity was observed. In conclusion, the fungus does not degrade low-density polyethylene, which may be because it does not have this capacity, because more incubation time is required, or because other incubation conditions and/or other microorganisms are needed.

**KEYWORDS:** Degradation, polyurethane, fungi, bioremediation

## INTRODUCTION

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 olefinas, 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. Durante los últimos 30 años, la producción de plásticos ha crecido exponencialmente, al tiempo que ha aumentado la preocupación por el medio ambiente. Según los expertos, los residuos plásticos generados por el hombre tardan una media de 100 años en descomponerse (Martínez Arroyo et. al., 2020). 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).

Por otro lado, 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. Eggins 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, la biodegradación de polietileno por *Bacillus subtilis* (Ortega y Acosta, 2021; Ortega Rojas et al., 2021), y dos cepas de *Alicyclophilus* sp., que degradan poliuretano (Oceguera Cervantes, et. al., 2007).

También se ha reportado, que diferentes hongos pueden degradar poliuretano de baja densidad, como el macromiceto *Pleurotus* sp., originario de los bosques brasileños, el cual es capaz de degradar nutrientes de polímeros sintéticos para convertirlos en materias orgánicas, por lo que este hongo surge como un posible mecanismo para reciclar los crecientes desechos mundiales de plástico que amenazan el medio ambiente ya que demoran siglos en degradarse naturalmente (Cuevas y 1997), así como *Fusarium solani* (Ortega y Acosta, 2021) y *A. niger* (Mathur et. al., 2011). Hasta ahora todas las formas de descartar el plástico, como la incineración, el depósito bajo suelo o su reciclaje, son contaminantes y arriesgadas para el medio ambiente, siendo la biodegradación por hongos una alternativa más ecológica. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad del hongo *Aspergillus niger* para degradar poliuretano, para, posteriormente tratar de establecer su función en la degradación de desechos plásticos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Cepa utilizada

El hongo utilizado, *Aspergillus niger*, se obtuvo del cepario del Laboratorio de Micología Experimental del CIEP/FCQ/UASLP.

### Estudios de degradación

El plástico utilizado fue obtenido de bolsas de plástico incoloro, comerciales y nuevas, recortando en cuadros de aproximadamente 1cm<sup>2</sup>. Cada uno se pesó y se colocó en un matraz Erlenmeyer de 250 mL, con medio de Lee modificado (0.25% de fosfato monobásico de potasio, 0.2% de sulfato de magnesio, 0.5% de sulfato de amonio, 0.5% de cloruro de sodio y 0.25% de dextrosa y se afora a un litro con agua destilada. En estos experimentos, se sustituye la glucosa por el plástico como única fuente de carbono, y calibrado a 3 pH's diferentes (4.0, 5.3 y 7.0), y esterilizados a 15 libras de presión/20 min. Posteriormente, se sembraron 1 x 10<sup>6</sup> esporas/mL del hongo, y se incubaron en un baño

con agitación constante, a 28°C, durante 11 semanas, tomando cada semana, 3 matraces a diferente pH, y se filtraron en papel filtro Whatman, No 1, previamente pesado; así mismo, se separaron y lavaron el plástico y el papel filtro con el hongo, y se secaron durante 12 horas a 60°C, para obtener el peso seco del plástico (para determinar si se reduce el peso inicial de éste) y del hongo (para determinar su crecimiento como peso seco, utilizando el plástico como única fuente de carbono), respectivamente. También, se determinó al filtrado del hongo, proteína por el método de Lowry.

### **Determinación del crecimiento del hongo por peso seco**

Este parámetro se analizó inoculando  $1 \times 10^6$  esporas/mL en matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 100 ml de medio mínimo de Lee modificado, conteniendo el plástico obtenido de bolsas de plástico incoloro, comerciales y nuevas, y recortado en cuadros de aproximadamente 1cm<sup>2</sup> como fuente de carbono, incubando a 28°C a 100 rpm durante 11 semanas. Después, se cosechó el sobrenadante por filtración en papel Whatmann No. 1, previamente tarado. El paquete celular se seco a 80°C, durante 12 h, y se peso el papel filtro, determinando por diferencia el peso seco de la muestra, comparando el crecimiento con un control crecido en las mismas condiciones sin la adición plástico y con glucosa como fuente de carbono. Todos los experimentos se realizaron mínimo 3 veces por duplicado.

### **Estudios de proteína**

La cantidad de proteína se determinó por el método de Lowry (Lowry y col., 1951) utilizando albúmina de suero bovino como estándar.

### **Determinación de las actividades enzimáticas**

Las actividades enzimáticas se determinaron espectrofotométricamente en el sobrenadante de los cultivos, obtenido de la filtración de las muestras.

### **Lacasa**

La mezcla de reacción contenía 900  $\mu$ L de 2,6-dimetoxifenol 2 mM como sustrato (Sigma Chemical Company), en regulador de acetatos 0.1 M pH 4.5, y 100  $\mu$ L del extracto enzimático (sobrenadante), incubando a 40°C durante 1 minuto (Díaz et al., 2013), y determinando la actividad de lacasa como el cambio en la absorbancia a una longitud de onda de 568 nm en un Espectrofotómetro de luz UV-Visible (Shimadzu modelo 160-A), usando como referencia un blanco preparado con agua tridesionizada de acuerdo al procedimiento anterior. Una unidad de actividad de lacasa se definió como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en la mezcla de reacción (Córdoba-Sosa et al., 2014). Los resultados se expresan como el promedio de 3 determinaciones independientes.

## Esterasa

La mezcla de reacción contenía 10  $\mu\text{L}$  de p-nitrofenilbutirato [1.76% (v/v)] (Sigma Chemical Company) en acetonitrilo, 790  $\mu\text{L}$  de regulador de acetatos 50 mM pH 7.0, Triton X-100 0.04% (v/v) y 100  $\mu\text{L}$  del extracto enzimático (sobrenadante), incubando a 37°C durante 5 minutos (Alves-Macedo & Fontes-Pio, 2005), y determinando la actividad de esterasa como el cambio en la absorbancia a una longitud de onda de 405 nm en un Espectrofotómetro de luz UV-Visible (Shimadzu modelo 160-A), usando como referencia un blanco preparado con agua tridesionizada de acuerdo al procedimiento anterior. Una unidad de actividad de esterasa se definió como la cantidad de enzima que produce un incremento de una unidad de absorbancia por minuto en la mezcla de reacción (Córdoba-Sosa et al., 2014). Los resultados se expresan como el promedio de 3 determinaciones independientes.

## RESULTADOS

En las condiciones analizadas, el hongo no degrada el polietileno de baja densidad, pues no se observa ninguna diferencia en el peso seco de los mismos (Tabla No. 1), aunque se observa que si hay crecimiento del hongo (determinado por peso seco) aunque en muy baja proporción (Tabla No. 2), mientras que también se observa la producción de proteína (determinada por la absorbancia a 750 nm), también en muy baja cantidad, (Tabla No. 3), además de poca actividad de lacasa (0.16 U/mL) y esterasa (0.09 U/mL) extracelulares (Tabla No. 4), mientras que los controles sin el sustrato no produjeron actividad enzimática.

Pesos iniciales de los plásticos			Pesos finales de los plásticos		
Número de plástico	Peso inicial	Peso final	Número de plástico	Peso inicial	Peso final
1	0.019	0.019	15	0.012	0.012
2	0.02	0.021	16	0.015	0.015
3	0.014	0.015	17	0.01	0.01
4	0.017	0.017	18	0.014	0.014
5	0.014	0.013	19	0.017	0.017
6	0.018	0.019	20	0.012	0.014
7	0.017	0.018	21	0.017	0.017
8	0.016	0.016	22	0.01	0.01
9	0.012	0.013	23	0.016	0.016
10	0.018	0.022	24	0.014	0.014
**11	0.011	0.011	25	0.013	0.014
**12	0.016	0.018	26	0.011	0.011
13	0.015	0.015	27	0.016	0.017
14	0.013	0.013	28	0.023	0.035
			*29	-	-

  

pH 4.0	**Glucosa
pH 5.3	*Sin Glucosa
pH 7.0	

Tabla No. 1.- Determinación del peso seco de los plásticos

Número de papel filtro	Peso inicial	Peso final	Diferencia de pesos	Diferencia de pesos	Número de papel filtro	Peso inicial	Peso final	Diferencia de pesos
1	1.234	1.24	0.006	0.006	15	0.965	0.971	0.006
2	1.096	1.135	0.039	0.039	16	1.476	1.465	-0.011
3	0.922	0.926	0.004	0.004	17	1.229	1.215	-0.014
4	1.445	1.453	0.008	0.008	18	0.914	0.915	0.001
5	1.186	1.191	0.005	0.005	19	0.785	0.782	-0.003
6	0.917	0.928	0.011	0.011	20	1.251	1.218	-0.033
7	0.737	0.746	0.009	0.009	21	1.261	1.228	-0.033
8	1.188	1.169	-0.019	0	22	1.19	1.204	0.014
9	0.958	0.941	-0.017	0	23	1.009	1.004	-0.005
10	1.016	0.993	-0.023	0	24	1.433	1.408	-0.025
**11	1.067	1.116	0.049	0.049	25	1.128	1.103	-0.025
**12	1.244	1.297	0.053	0.053	26	1.203	1.185	-0.018
13	1.147	1.133	-0.014	0	27	0.771	0.77	-0.001
14	1.148	1.178	0.03	0.03	28	1.262	1.225	-0.037
					*29	0.964	0.942	-0.022

pH 4.0	**Glucosa
pH 5.3	*Sin Glucosa
pH 7.0	

Tabla No. 2.- Crecimiento por peso seco del hongo en presencia de plástico como fuente de carbono

Número de papel filtro	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Número de papel filtro	Absorbancia 1	Absorbancia 2
1	0.003	0.007	15	0.014	0.018
2	0.005	0.003	16	0.004	0.003
3	0.013	0.009	17	0.009	0.020
4	0.011	0.013	18	0.010	0.007
5	0.027	0.025	19	0.005	0.001
6	0.002	0.007	20	0.023	0.014
7	0.007	0.002	21	0.011	0.014
8	0.016	0.023	22	0.034	0.025
9	0.014	0.013	23	0.009	0.034
10	0.014	0.015	24	0.008	0.008
**11	0.081	0.060	25	0.007	0.003
**12	0.140	0.104	26	0.013	0.010
13	0.012	0.008	27	0.013	0.005
14	0.007	0.040	28	0.025	0.022
			*29	0.018	0.029

pH 4.0	**Glucosa
pH 5.3	*Sin Glucosa
pH 7.0	

Tabla No. 3.- Determinación de proteína extracelular por absorbancia a 750 nm, de los cultivos del hongo.

Control Lacasa	0.00
Problema Lacasa	0.16
Control Esterasa	0.00
Problema Esterasa	0.09

Actividad enzimática

(U/mL)\*

\*Promedio de las muestras analizadas

Tabla No. 4.- Producción de y esterasa extracelulares por *A. niger*. 28oC. 11 semanas de incubación. Condiciones estáticas (1 x 10<sup>6</sup> células/mL). (1, 2 y 3.- Problemas y 4.- Control).

## CONCLUSIONES

En las condiciones analizadas, el hongo no degrada el polietileno de baja densidad, lo cual puede deberse a que no tiene esta capacidad, a que se requiere más tiempo de incubación o a que se necesitan otras condiciones de incubación y/u otros microorganismos, aunque si hay crecimiento del hongo, producción de proteína extracelular y actividad de enzimas extracelulares.

## REFERENCIAS

Alves-Macedo, G. and Fontes-Pio, T. 2005. A rapid screening method for cutinase producing microorganisms. *Brazilian Journal of Microbiology*, 36, 388–394. <https://doi.org/10.1590/S1517-83822005000400016>.

Clutario M. T and Cuevas V. C. 2001. Colonization of Plastics by *Xylaria* sp. *Philippine Journal of Science*. Vol. 130, No. 2, pp 13-18.

Córdoba-Sosa, G., Torres, J.L., Ahuactzin-Pérez, M., Díaz-Godínez, G., Díaz, R., and Sánchez, C. 2014. Growth of *Pleurotus ostreatus* ATCC 3526 in different concentrations of di(2-ethylhexyl) phthalate in submerged fermentation. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences*, 4 (5), 96–103. ISSN: 2249-1929.

Cuevas V. C. and Manaligod R. C. 1997. Isolation of decomposer fungi with plastic degrading ability. *Philippine Journal of Science* 126: pp 117-130.

Díaz, R., Téllez-Téllez, M., Bibbins-Martínez, M.D., Sánchez, C., Díaz-Godínez, G. & Soriano-Santos, J. (2013). Influence of initial pH of the growing medium on the activity, production and expression profiles of laccases produced by *Pleurotus ostreatus* in submerged fermentation. *Electronical Journal of Biotechnology*, 16, 1–13. <http://dx.doi.org/10.2225/vol16-issue4-fulltext-6>

Eggs H. O. W., Mills J., Holt A. and 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.

Klenchuk P.P. 1989. Degradability II Chemistry of Plastics costs a negative vote. *Plastics International*. September: pp. 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: pp 678-685.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Far, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193. pp. 265-275.

Mangiarotti A.M., Caretta G., Nelli, E. and Piotelli, E. 1994. Biodeterioro de materiales plásticos por Microhongos. Boletín Micológico. Vol. 9 (1-2): 39-47.

Martínez Arroyo, M.A., Ruíz Suarez, L.G., Gavilán García, A., Mendoza Cantú, A. & Ramírez Muñoz, T. 2020. Panorama General de las Tecnologías del Reciclaje de plásticos en México y en el Mundo. Instituto Nacional de Ecología y Cambio Climático. Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales. [https:// biblioteca.semarnat.gob.mx](https://biblioteca.semarnat.gob.mx).

Mathur, G., Mathur, A., Ramasare, P. 2011. Colonization and Degradation of Thermally Oxidized High-Density Polyethylene by *Aspergillus niger* (ITCC No. 6052) Isolated from Plastic Waste Dumpsite. Bioremediation Journal, 15:(2), 69-76. DOI: 10.1080/10889868.2011.570281

Oceguera-Cervantes, J.A., Carrillo-García, A., López, N., Bolaños-Nuñez, S., Cruz-Gómez, C.W. and Loza-Tavera, H. 2007. Characterization of polyurethanolytic activity of two *Alicyclophilus* sp., Methylpyrrolidone Able To Degrade Polyurethane and N-Methylpyrrolidone. Applied and Environmental Microbiology. 73(19): 6214. DOI: 10.1128/AEM.01230-07.

Ortega, R.I. y Acosta, I. 2021. Degradación de polietileno de baja densidad por *Fusarium solani*. Avances en Ciencias e Ingeniería. 12:(2), 13-31. ISSN: 0718-8706.

Ortega Reyes, R.I. and Acosta Rodríguez, I. 2021. Low density polyethylene biodegradation by *Bacillus subtilis*. Journal of Multidisciplinary and Environmental Science and Technology. (JMEST). Vol. 8, No. 5, pp. 14031-14039. 13842-13847. May 30. ISSN: 2458-9403. JMESTN42353731. [www.jmest.org](http://www.jmest.org)

Ortega Rojas, I., Rodríguez Pérez, A., Cárdenas González, J.F., Martínez Juárez, V.M., Enríquez Domínguez, E., Tovar Oviedo, J. y Acosta Rodríguez, I. 2021. Biodegradation Capacity and Activity Enzymatic of *Bacillus subtilis* against Low-Density Polyethylene. Asian Journal of Research in Biochemistry. 9(3): 9-22 DOI: 10.9734/ajrb/2021/v9i330201. Published: 24 November 2021. ISSN: 2582-0516.

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: pp. 731-733.