

AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS CON CAPACIDAD DEGRADORA DE PLASTICOS DEL RELLENO SANITARIO “LOS CORAZONES” EN LA CIUDAD DE VALLEDUPAR

ISOLATION OF MICROORGANISMS WITH DEGRADING CAPACITY OF PLASTICS FROM SANITARY FILLING "LOS CORAZONES" IN THE CITY OF VALLEDUPAR.

Ana Cristina Carrillo Ardila ⁽¹⁾ Luisa Fernanda Daza Martínez ⁽²⁾, Yenni Carolina Barraza ⁽³⁾, Yarima Guerrero ⁽⁴⁾

3. Microbióloga, Centro Biotecnológico del caribe. Instructora. Grupo de investigación BIOTEC, Valledupar, Colombia.
criscarrilloana@hotmail.com
4. Microbióloga, MSc en Genética, Centro Biotecnológico del Caribe (CBC). Investigadora. Grupo de BIOTEC, Valledupar, Colombia.
lu.ferdaza@gmail.com
2. Tecnóloga en control ambiental, Centro Biotecnológico del Caribe (CBC). Investigadora. Grupo de BIOTEC, Valledupar, Colombia
carolina_j30@hotmail.com
3. Aprendiz de programa control ambiental, Centro Biotecnológico del Caribe (CBC). Joven investigador. Grupo de BIOTEC, Valledupar, Colombia
guerreroyarima@gmail.com

RESUMEN

Los productos plásticos han tenido gran acogida en la economía mundial por sus ventajas innegables, son económicos y prácticos, hoy en día se encuentran en todo lo que utilizamos; el problema radica en su lento proceso de degradación. Existen considerables investigaciones sobre la degradación de plásticos existentes, dado que se ha comprobado que ciertos microorganismos son capaces de degradar la mayor parte de los materiales orgánicos e inorgánicos. El objetivo del presente trabajo fue aislar microorganismos a partir de muestras de lixiviados y suelo contaminado del relleno sanitario “los corazones” ubicado en la ciudad de Valledupar y evaluar su capacidad utilizar poliestireno como única fuente de carbono. Se aislaron 5 bacterias y 4 hongos de la muestra de lixiviados y 2 bacterias de la muestra de suelo. Las bacterias fueron identificadas por pruebas bioquímicas y los hongos a través de sus características microscópicas identificando: *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* y *Cladoporium sp*.

Palabras Claves: Bacterias, Biodegradación; Hongos, Lixiviados, Poliestireno, suelos.

ABSTRACT

The plastic products have had great acceptance in the world economy for its undeniable advantages, they are economical and practical, nowadays they are in everything we use; The problem lies in its slow degradation process. There is considerable research on the degradation of existing plastics, given that it has been found that certain microorganisms are capable of degrading most of the organic and inorganic materials. The objective of the present work was to isolate microorganisms from leachate samples and contaminated soil of "los corazones" sanitary landfill located in the city of Valledupar and evaluate its capacity to use polystyrene as the sole carbon source. 5 bacteria and 4 fungi were isolated from the leachate sample and 2 bacteria from the soil sample. The bacteria were identified by biochemical tests and the fungi through their microscopic characteristics identifying: *Bacillus sp*, *Pseudomonas sp*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus* and *Cladoporium sp*.

Keywords: Bacteria, Biodegradation; Mushrooms, leachates, polystyrene, floors.

1. INTRODUCCIÓN

La producción global de plásticos se ha disparado en los últimos 50 años, Se estima que en 2020 se superarán los 500 millones de toneladas anuales, lo que supondría un 900% más que los niveles de 1980 [1]. En Valledupar se estima que diariamente se producen más de 300 toneladas de basura [2], las cuales incluyen materiales como el plástico; frente a lo anterior hay que señalar que una bolsa plástica tarda aproximadamente 55 años en degradarse y una botella plástica tarda más de 500 años, lo cual alarma las autoridades ambientales a nivel mundial y nacional las cuales buscan disminuir el consumo de plásticos y de acelerar la degradación de estos en ambientes naturales. Existe un gran interés en la degradación microbiana

del material plástico y de polietileno, Kambe et al. en 1995, fue el primero en aislar y caracterizar una bacteria del suelo que utiliza poliuretano de poliéster como única fuente de carbono y nitrógeno. Investigaciones realizadas por Dey et al, en 2012 revelaron que diversos microorganismos en el suelo son capaces de degradar los plásticos, aunque a un ritmo más lento. Desde el 2015 se han realizado aislamientos de microorganismos presentes en desechos plásticos presentes en diferentes océanos, donde estos crean islas y constituyen la mayor fuente de contaminación ocasionando la muerte de números peces, tal es el caso de los biofilms microbianos asociados a desechos plásticos descritos

por De tender et al. La investigación realizada por Urbanek et al, 2017, proporciono evidencia de la colonización de polímeros por microorganismos como Rhodobacetrías, Streptomyces y Cianobacterias. Y en 2016, Yoshida et al, logro aislar una nueva bacteria denominada *Ideonella sakaiensis 201-F6*, que puede utilizar el PET como única fuente de carbono. De aquí surge el interés de continuar en la búsqueda de otros microorganismos que ayuden disminuir la contaminación provocada por los plásticos. Y surge la pregunta que dio inicio a la presente investigación: ¿Es posible aislar microorganismos de muestra de suelos y lixiviados provenientes del relleno sanitario de la ciudad de Valledupar, con capacidad de utilizar el plástico como única fuente de carbono? A continuación, se describen los métodos realizados para aislar diferentes microorganismos de las muestras tomadas del relleno sanitario de la ciudad de Valledupar, los cuales en un futuro pueden

ser empleados como biorremediadores o aceleradores de la descomposición de materiales plásticos.

2. METODOLOGÍA

El presente trabajo es una investigación cuantitativa de tipo experimental; el desarrollo metodológico se realizó en diferentes fases, a continuación, se describen cada una de ellas.

2.1 Toma de Muestras

Se realizó un muestreo simple aleatorio utilizando muestras compuestas. Se tomaron 3 submuestras de diferentes lugares de la piscina N.1 de lixiviados y de suelo contaminado altamente con plásticos de la celda occidental del relleno sanitario los corazones ubicado a $10^{\circ}32'52.2''N$ $73^{\circ}14'41.7''W$. Para la muestra de lixiviados, Las muestras de 250 ml se tomaron aproximadamente a 10 cm de distancia. Las muestras de suelo se tomaron una a 50 cm y otra a una profundidad no mayor a 25 cm por

triplicado de 250 g de suelo. Luego fueron empacadas y refrigeradas hasta su análisis en las siguientes 24 horas. Los parámetros medioambientales como pH y temperatura fueron registrados.

2.2 Aislamiento de Microorganismos Degradadores de Poliestireno

De la muestra tomada de lixiviado y de suelo se realizaron diluciones seriadas con agua peptonada y diluciones 10^{-7} , 10^{-8} y 10^{-9} se sembraron en alícuotas por triplicado en medio mínimo de sales según la técnica descrita por Hemashenpagam et al., modificada empleando polvo de poliestireno esterilizado con rayos U.V. con un pH final de 6.8. Se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 días. Con el fin de probar la actividad degradadora de plástico, se realizaron ensayos donde la única fuente de carbono era el poliestireno, para los ensayos se esterilizó previamente el plástico con rayos U.V. Se empleó un medio mínimo de sales modificado según la técnica descrita por Skariyachan, 2015.

El pH final se ajustó a 6.8 y se inoculó con las cepas bacterianas y fúngicas aisladas inicialmente, se incubó a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se realizó un medio de control positivo, al cual se le

agregara sacarosa como fuente habitual de carbono y se hacen observaciones diarias durante 3 semanas.

2.3 Caracterización de Cepas Aisladas

Las características morfológicas de las bacterias aisladas se determinaron por tinción de gram. En el caso de las bacterias que eran gram negativas se utilizó agar MacConkey para realizar el aislamiento selectivo de estas bacterias y posteriormente en Agar Cetrimide específico para el aislamiento de *Pseudomonas* spp. Teniendo en cuenta que este género ha sido previamente aislado de este tipo de muestras [5]. Para la identificación preliminar se realizaron pruebas bioquímicas para las bacterias gram positivas y gram negativas aisladas. En el caso de los hongos aislados se utilizaron claves taxonómicas [6], para identificar

género y posible especie según las características macro y microscópicas.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La piscina No.1 para lixiviados presentó un pH de 6.84 y una Temperatura $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, y la celda occidental donde se tomó la muestra de suelo contaminado, presentó

un PH de 6.88 y Temperatura de 27°C; teniendo en cuenta la alta carga microbiana, se realizó diluciones hasta 10^{-9} .

3.1 Aislamiento de Microorganismos Degradadores de Polietileno

Se realizó enriquecimiento selectivo, empleando medio mínimo de sales con sacarosa y polietileno, se incubó 30 días. Después de este tiempo se sembró en medio mínimo de sales, empleando la misma metodología que para el enriquecimiento agregando agar –agar para solidificar; Se aislaron 11 morfotipos bacterianos y 8 morfotipos fúngicos de la muestra de lixiviados y 19 morfotipos bacterianos de la muestra de suelo. Para probar la actividad degradadora del

plástico, se realizó un segundo ensayo donde la única fuente de carbono es el poliestireno, en medio mínimo de sales se inocularon las bacterias y hongos aislados y se realizaron observaciones diariamente durante 23 días. En los resultados obtenidos se logró observar que el crecimiento tanto de hongos como bacterias es lento, en los tubos inoculados con las bacterias se evidenció turbiedad después de 5 días de incubación; en los

tubos inoculados con hongos se evidenció después de 4 días un leve crecimiento de micelio. Esto concuerda con lo observado por Dey et al, que los microorganismos son capaces de utilizar plásticos como única fuente de carbono, pero a un ritmo muy lento. De igual forma se observó que no todas las bacterias y hongos aislados fueron capaces de utilizar el poliestireno como única fuente de carbono, al finalizar el ensayo solo 5 cepas bacterianas y 4 de hongos aislados de la muestra de lixiviados demostraron capacidad degradadora de poliestireno, para la

muestra de suelo solo 2 bacterias mostraron esta capacidad.

3.2 Caracterización de Cepas Aisladas

Las cepas aisladas fueron caracterizadas e identificadas preliminarmente empleando pruebas bioquímicas, se lograron aislar bacilos gram positivos esporulados, bacilos gram positivos de $1\mu\text{m}$, bacilos gram negativos.

Las bacterias gram negativas fueron inoculadas en agar MacConkey y posteriormente en Agar Cetrimide específico para el aislamiento de

Pseudomonas sp., Debido a las características presentadas por la cepa y a lo expuesto por [5], [6] y [7]. En cuyos estudios a partir de muestras ambientales lograron aislar *Pseudomonas sp.* capaces de degradar diferentes tipos de plásticos.

En cuanto a los hongos aislados, con la descripción macroscópica y la identificación microscópica de sus cuerpos fructíferos y conidias se identificaron 4 géneros. Las cepas fueron purificadas y

crioconservadas. Los morfotipos aislados y su identificación de género y posible especie, se describe en la tabla 1.

Tabla 1: Resultados de la identificación de las cepas aisladas que pueden crecer con poliestireno como única fuente de carbono.

Muestra de donde se realizó el aislamiento	Morfotipo	Coloración Gram	Genero identificado preliminarmente por pruebas bioquímicas
Lixiviado	MB1	Negativo	<i>Speudomona sp.</i>
Lixiviado	MB3	Negativo	<i>Speudomona sp.</i>

Lixiviado	MB6	Positivo presencia de endosporas	<i>Bacillus sp.</i>
Lixiviado	MB8	Positivo presencia de endosporas	<i>Bacillus sp.</i>
Lixiviado	MB9	Positivo bacilos de 11µm	<i>Microbacterium sp.</i>
Suelo	MS1	Positivo presencia de endosporas	<i>Bacillus sp.</i>
Suelo	MS2	Positivo presencia de endosporas	<i>Bacillus sp.</i>
Lixiviado	MH1		<i>Aspergillus niger</i>
Lixiviado	MH3		<i>Aspergillus niger</i>
Lixiviado	MH5		<i>Cladosporium sp.</i>
Lixiviado	MH8		<i>Aspergillus Fumigatus</i>

Figura 1: Microscopia de MB1, bacterias Gram negativas.

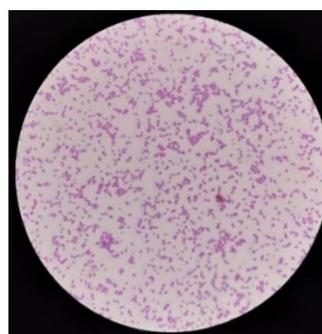


Figura 2: Microscopia de MB3, Bacteria Gram Negativa.



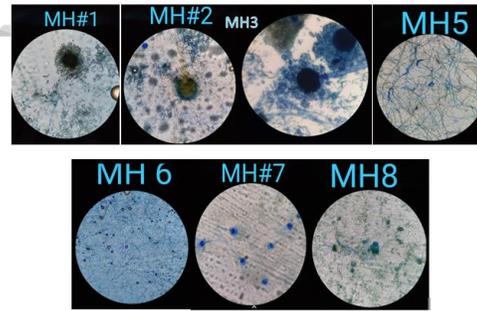
Figura 3: Microscopia de MB6, Bacteria gram positiva con endosporas.



Figura 4: Microscopia de MB 8, bacterias gram positivas con endosporas



Figura 5: Fotos de cuerpos fructíferos e hifas de las diferentes cepas de hongos aislados de muestra de lixiviado.



Una vez realizados los montajes con azul de lactofenol, se evidenciaron los cuerpos fructíferos (figura 5), las esporas y las hifas de cada una de las cepas aisladas, determinando que los morfotipo MH1, MH2, pertenecen al grupo negro del *Aspergillus niger* y MH3 pertenecen al grupo blanco del mismo hongo. Los morfotipos MH5 y MH6 son hongos dematiaceo (de hifa oscura) y se evidencio la formación de clamidosporas, se identificaron como *Clamidosporium sp.* Finalmente los morfotipos MH7 y MH8 por su conidióforo pequeño fueron identificados como *Aspergillus Fumigatus*. Logrando así la identificación de 4 hongos aislados de muestras de lixiviados del relleno sanitario “los corazones” de la ciudad de Valledupar y con capacidad degradadora de poliestireno.

Durante la realización del presente estudio se presentaron varias limitaciones, tales como, el tiempo, debido a que es una

investigación avalada por SENNOVA, los cuales requieren resultados en un determinado tiempo, por tal motivo los experimentos de crecimiento en medio mínimo de sales se realizaron por un lapso relativamente corto, o hasta evidenciar crecimiento. La misma limitación de tiempo, no permitió realizar otras pruebas como la evaluación del crecimiento sobre otros plásticos o evaluar las asociaciones de diferentes microorganismos.

El limitado acceso a pruebas moleculares no permitió realizar la identificación de los diferentes microorganismos aislados a nivel molecular, lo cual es de gran importancia, sin embargo, se realizó crioconservación de todas las cepas para continuar con la investigación.

4. CONCLUSIÓN

Se lograron aislar tres géneros bacterianos y 2 géneros de hongos capaces de utilizar el poliestireno como única fuente carbono, plástico de amplio uso en envases de alimentos y que se encuentran en gran cantidad en el relleno sanitario “los corazones” de la ciudad de Valledupar. Los géneros identificados de bacterias son similares a los encontrados en la literatura escrita por Dey et al, 2012 y Skariyachan,

2015, quienes sus estudios describen a *Spudomona* sp. *Bacillus* sp. y *Microbacterium* sp. como generos capaces de degradar plasticos. En el caso de los generos de hongos aislados, en la literatura investigada no se encontro reporte de estos, lo cual implicaría un aporte importante de esta investigación. Se requiere continuar con la identificación a nivel molecular de los generos aislados y la evaluación de su capacidad enzimatica, con el fin de determinar las enzimas que actuan en la degradación del poliestireno y evaluarlos en otros tipos de plasticos.

Tambien recomendamos retomar el estudio del crecimiento en medio minimo de sales por lapsos mas largos de tiempo y realizar ensayos con asociaciones bacterianas, ya quedurante este estudio, se evaluaron de forma individual y en la realidad los microorganismos actuan de forma simultanea y asociada, lo cual puede arrojar nuevos y mejores resultados en cuenato a la degradación.

AGRADECIMIENTOS.

Este artículo es el resultado de un proyecto de investigación aprobado y financiado por SENNOVA, en su convocatoria para el 2018 e identificado con código No. 2552

para el programa de formación de control ambiental.

Agradecemos a Tecnoparque Nodo Valledupar por su apoyo en la realización de este proyecto y a la empresa Aseo del Norte por su colaboración y acompañamiento.

REFERENCIAS

[1] GREENPEACE. Datos sobre la producción de plásticos. [En Línea] [Fecha de consulta: 10/11/2017]. Disponibilidad y acceso en: <http://archivo-es.greenpeace.org/espana/es/Trabajamos-en/Parar-la-contaminacion/Plasticos/Datos-sobre-la-produccion-de-plasticos/>

[2] EL PILÓN. Al relleno sanitario de Valledupar le quedan 11 años de uso. [En Línea] [Fecha de consulta: 10/11/2017]. Disponibilidad y acceso en: <http://elpilon.com.co/al-relleno-sanitario-valledupar-le-quedan-11-anos-uso/>

[3] KAMBE, T.N., Y.S. Akutsu, N. Nomura, F. Onuma & T. nakahara. 1999. Microbial degradation of polyurethane, polyester polyurethanes and polyether polyurethanes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 51: 134 -140.

[4] HEMASHENPAGAM, N., Growther, L., Murgalatha, N., Raj, V. S., & Vimal, S. S. (2013). Isolation and characterization of a bacterium that degrades PBSA. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 4, 335–342.

[5] SKARIYACHAN, Sinosh, et al. Selection and screening of microbial consortia for efficient and ecofriendly degradation of plastic garbage collected from urban and rural areas of Bangalore, India. *Environmental monitoring and assessment*, 2015, vol. 187, no 1, p. 4174

[6] KYAW, B. M., Chmpakalakshmi, R., Sakharkar, M. K., Lim, C. S., & Sakharkar, K. R. (2012). Biodegradation of low density polythene (LDPE) by *Pseudomonas* species. *Indian Journal of Microbiology*, 52, 411–419.

[7] JOHN, R. C., Essien, J. P., Akpan, S. B., & Okpokwasili, G. C. (2012). Polycyclic aromatic hydrocarbon-degrading bacteria from aviation fuel spill site at Ibeno, Nigeria. *Bulletin*

[8] DEY, Uttiya, et al. An approach to polymer degradation through microbes. *IOSRPHR*, 2012, vol. 2, p. 385-388.

[9] DE TENDER, C. A., Devriese, L. I., Haegeman, A., Maes, S., Ruttink, T., & Dawyndt, P. (2015). Bacterial community profiling of plastic litter in the Belgian part of the North Sea. *Environmental science & technology*, 49(16), 9629-9638.

[10] YOSHIDA, S., Hiraga, K., Takehana, T., Taniguchi, I., Yamaji, H., Maeda, Y., ... & Oda, K. (2016). A bacterium that degrades and assimilates poly (ethylene terephthalate). *Science*, 351(6278), 1196-1199.

[11] URBANEK, Aneta K., et al. (2017). Isolation and characterization of Arctic microorganisms decomposing bioplastics. *AMB Express*, vol. 7, no 1, p. 148.