

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS

**CAPACIDAD BIODEGRADATIVA DE HONGOS FILAMENTOSOS
FRENTE AL POLIETILENO**

PRESENTADA POR:

VICKY CRISTINA GONZALES ALCOS

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

PUNO, PERÚ

2019

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL ALTIPLANO

ESCUELA DE POSGRADO

DOCTORADO EN CIENCIAS DE LA SALUD



TESIS

CAPACIDAD BIODEGRADATIVA DE HONGOS FILAMENTOSOS FRENTE

AL POLIETILENO

PRESENTADA POR:

VICKY CRISTINA GONZALES ALCOS

PARA OPTAR EL GRADO ACADÉMICO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS DE LA SALUD

APROBADA POR EL SIGUIENTE JURADO:

PRESIDENTE



.....
Ph.D. SABINO ATENCIO LIMACHI

PRIMER MIEMBRO



.....
Dr. MOISÉS APAZA AHUMADA

SEGUNDO MIEMBRO



.....
Dra. SHEYLA LENÑA CERVANTES ALAGÓN

ASESOR DE TESIS



.....
Dra. MARÍA TRINIDAD ROMERO TORRES

Puno, 18 de setiembre de 2019

ÁREA : Ciencias de la Salud

TEMA : Biodegradación

LÍNEA: Problemas de Salud Pública

DEDICATORIA

En memoria de mis padres Felipe Gonzales
y María Alcos cuyo carácter y sabiduría fue
mi mayor ejemplo a seguir.

A mis grandes tesoros: Alberth Steve,
Patrick Kevin y Miguel Ángel fuentes de mi
inspiración, de quienes aprendí el
significado de la esperanza y la lucha por la
vida.

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional del Altiplano, mi alma mater, por haberme brindado la oportunidad de realizarme como profesional.

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
DEDICATORIA	i
AGRADECIMIENTOS	ii
ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE TABLAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE ANEXOS	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT	x
INTRODUCCIÓN	1

CAPÍTULO I**REVISIÓN DE LITERATURA**

1.1	Marco teórico	5
1.1.1	Hongos filamentosos	5
1.1.2	Curva de crecimiento de hongos filamentosos	6
1.1.3	Condiciones de crecimiento	6
1.1.4	Requerimientos nutricionales de hongos filamentosos	6
1.1.5	Medios de cultivo para hongos filamentosos	7
1.1.6	Clasificación y taxonomía de hongos filamentosos	8
1.1.7	Cultivo e Identificación de hongos filamentosos	13
1.1.8	1.1.8. Métodos de observación microscópica	14
1.2	Residuos sólidos plástico (RSP)	15
1.2.1	Plásticos	16
1.2.2	Bolsas de plástico	17
1.3	Efecto de los plásticos en la salud humana	19
1.4	Biodegradación	21
1.5	1.5. Degradación de polímeros	21
1.6	Antecedentes	22
1.6.1	Biodegradación	22
1.6.2	Biodegradación del polietileno (PE)	22
1.6.3	Micromicetos biodegradadores del polietileno	23
1.6.4	Identificación de hongos filamentosos	26
		iii

1.6.5	Medios de cultivos para la biodegradación del polietileno	26
1.6.6	Polución por plásticos y efectos en la salud y animales	27
1.7	Marco referencial	28

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1	Identificación del problema	31
2.2	Enunciado del problema	33
2.3	Justificación	33
2.4	Objetivos	33
2.4.1	Objetivo general	33
2.4.2	Objetivos específicos	33
2.5	Hipótesis	34
2.5.1	Hipótesis general	34
2.5.2	Hipótesis específica	34

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1	Lugar de estudio	35
3.1.1	Toma de muestras	35
3.2	Población	35
3.3	Muestra	35
3.4	Método de investigación	35
3.5	Metodología	36
3.5.1	Identificación de hongos filamentosos con capacidad de Biodegradación del polietileno	36
3.5.2	Determinación de las condiciones de pH y temperatura donde los hongos filamentosos logran mayor actividad frente al polietileno	40

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1	Hongos filamentosos con capacidad biodegradativa frente al polietileno	44
4.2	Condiciones de pH y temperatura donde los hongos filamentosos logran mayor actividad degradativa frente al polietileno	48
	CONCLUSIONES	55
	RECOMENDACIONES	56



BIBLIOGRAFÍA

57

ANEXOS

65

ÍNDICE DE TABLAS

	Pág.
1. Caracterización macro morfológica y micro morfológica de hongos filamentosos	39
2. Claves taxonómicas para la identificación de aspergillus spp. Desarrollados en ASbG	40
3. Tabla utilizado para calificar la actividad degradadora de los micromicetos degradadores de polietileno	40
4. Peso inicial para proceso de biodegradación	42
5. Frecuencia de hongos filamentosos aislados del botadero de Cancharani	44
6. Actividad degradadora de hongos filamentosos frente al polietileno (ASM a 22°C, pH: 5)	46
7. Condiciones de pH y temperatura donde los hongos filamentosos logran mayor actividad frente al polietileno	50
8. De análisis de varianza	52
9. Características macroscópicas de hongos filamentosos aislados en el botadero de Cancharani	67
10. Resultados de crecimiento en masa de los micromicetos aislados	68
11. Crecimiento de cultivo axenico de hongos filamentosos	69
12. Crecimiento mixto de hongos filamentosos	69
13. Crecimiento mixto de hongos filamentosos	70

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
1. <i>Aspergillus niger</i> (macromorfología) y (Micromorfología)	10
2. <i>Aspergillus flavus</i> (macromorfología) (Micromorfología)	11
3. <i>Fusarium spp.</i> (macromorfología) (Micromorfología)	12
4. <i>Mucor spp</i>	12
5. Bolsa chequera	18
6. Botadero de Cancharani-Puno	37
7. Cepas axénicas de <i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus niger</i>	41
8. Hongos filamentosos según masa de crecimiento	45
9. Frecuencia y promedio en masa de hongos filamentosos	45
10. Resultados cualitativos después de los 60 días a T° de 20°C y 30°C y pH de 4.5 y 8.0	49
11. Población normal entre los hongos <i>A. Flavus</i> y <i>A. Niger</i>	50
12. Biodegradación de hongos a temperaturas de 20 °C y 30 °C	51
13. Biodegradación de hongos a PH 4.5 y 8 <i>Considerando el pH</i>	52
14. Interacción hongo - pH	53

ÍNDICE DE ANEXOS

	Pág.
1. Flujograma para el aislamiento de hongos filamentosos con capacidad de biodegradación del polietileno	66
2. Tablas	67
3. Características macro y microscópica de hongos filamentosos	71
4. Actividad degradadora de hongos filamentosos frente al polietileno en asm a 22°C A PH: 4.5	72
5. Comparación de medias	73

RESUMEN

La biodegradación del polietileno por microorganismos, es una solución para la reducción de la contaminación por plásticos constituyéndose una alternativa importante desde el punto de vista de la salud humana, del medio ambiente y del factor económico; la presente investigación tuvo como objetivo determinar la capacidad biodegradativa de los hongos filamentosos frente al polietileno; los hongos fueron aislados de residuos sólidos obtenidos del botadero de Cancharani, la identificación taxonómica de hongos filamentosos con capacidad degradativa frente al polietileno se realizó en base a características macroscópicas de crecimiento en placa y el estudio microscópico empleando la técnica de Microcultivo en lamina; la capacidad degradativa se determinó a pH :5 y 20°C durante 20 días y para determinar las condiciones de pH y temperatura donde los hongos filamentosos con capacidad biodegradativa logran mayor actividad frente al polietileno se realizó mediante la técnica de Kavelman y Kendrick a temperaturas de 20 y 30°C y a pH de 4.5 y 8.0. Se aisló cinco especies de hongos filamentosos; *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor sp.* y *Fusarium sp.*, resultando tener capacidad biodegradativa en diferentes escalas de calificación y estadísticamente son biodegradadores frente al polietileno así mismo *Aspergillus flavus* demostró tener mayor capacidad biodegradativa frente al *Aspergillus niger* a un pH de 4.5, siendo indiferente la temperatura a 20 y 30°C, estadísticamente ambos son buenos biodegradadores frente al polietileno lo cual resalta la importancia de esta investigación.

Palabras clave: Biodegradación, hongos filamentosos, plástico de baja densidad, polietileno y residuos sólidos plásticos.

ABSTRACT

The biodegradation of polyethylenes by microorganisms is a solution for the reduction of contamination by plastics, constituting an important alternative from the point of view of human health, the environment and the economic factor; The purpose of this research was to determine the biodegradability of filamentous fungi against polyethylene; the fungi were isolated from solid plastic waste obtained from the Cancharani dump, taxonomic identification of filamentous fungi with degradative capacity against polyethylene was carried out on the basis of macroscopic characteristics of plate growth and microscopic study using the Microculture sheet technique; The degradative capacity was determined at pH 5 and 20 ° C for 20 days and to determine the pH and temperature conditions where filamentous fungi with biodegradative capacity achieve greater activity against polyethylene was performed using the Kavelman and Kendrick technique at temperatures of 20 and 30 ° C and at pH 4.5 and 8.0. Five species of filamentous fungi were isolated; *Aspergillus Flavus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Mucor sp.* and *Fusarium sp.*, resulting in having biodegradative capacity at different rating scales and are statistically biodegradable against polyethylene. *Aspergillus flavus* also showed a greater biodegradability compared to *Aspergillus niger* at a pH of 4.5, the temperature being indifferent at 20 and 30 ° C, Statistically, both are good biodegradators against polyethylene, which highlights the importance of this research.

Keywords: Biodegradation, filamentous fungi, low density plastic, plastic solid waste and polyethylene.

INTRODUCCIÓN

Los hongos como eucariotas y heterótrofos, se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, desempeñan conocidas actividades en la descomposición de una gran variedad de sustancias orgánicas participando en los ciclos biológicos (Arenas, 2014) como saprofito toma sus nutrientes de materia orgánica muerta o en descomposición y la segunda como parasito cuando se nutre de materia viva (Bonifaz, 2014).

En la actualidad, los plásticos son productos muy utilizados y fabricados en grandes cantidades, sin embargo por su difícil degradación se han vuelto en un serio problema a nivel mundial (Ecomundo, 2011) la acumulación de estos residuos plásticos, está dando lugar al surgimiento de problemas de salud, manejo de la gestión ambiental y de residuos sólidos, los productos elaborados con polietileno presentan dos tipos de problemas: el deterioro cuando están siendo utilizadas y la contaminación ambiental posterior a su uso

A nivel mundial uno de los países que más genera residuos sólidos es Estados Unidos, de una totalidad de 2 515 millones de toneladas al año provenientes de actividades económicas y hogares con una representación del 9% (213 millones de toneladas) en plásticos, actualmente existe una gestión inadecuada de estos residuos incinerándolos, con un alto costo de inversión y deterioro directamente al medio ambiente (Eurostat, 2012) américa latina produjo en el 2014 el 5% de la producción total (Plastics Europe, 2014) siendo el polietileno el de mayor demanda con un 37 % y el 9% corresponde al LDPE (Maldonado, 2012).

En el Perú los residuos se dividen como restos orgánicos de cocina y de alimentos, un 47,0% del total de residuos generados, seguido de los plásticos con un 9,5%, entre ellos los plásticos no reciclables como el Polietileno (PS) (MINAM, 2013) la tasa de degradación del polietileno es muy lenta en los rellenos debido a que es un ambiente anaerobio, siendo en alrededor de 500 años (Alka, 2015 y Lapidos, 2007).

Los estudios científicos demuestran que aditivos comunes del plástico son muy peligrosos para la salud ,entre ellos destacan los bisfenoles, los ftalatos, el cloruro de vinilo ,el estireno, algunos son disruptores endocrinos, lo cual significa que imitan el comportamiento de las hormonas inclusive existen pequeñísimas concentraciones (partes por billón) que pueden producir mutaciones graves a nivel celular en ambos sexos donde los niños y los fetos son susceptibles, observándose las enfermedades como el cáncer de

mama, ovarios, vagina cérvix, cáncer del cerebro y sistema nervioso ,leucemias, cáncer de pulmón y del sistema respiratorio, cáncer de próstata y testículos, obesidad, diabetes es decir casi todas las dolencias; y según la OMS y la UNEP han declarado conjuntamente que la disrupción endocrina(uno de los efectos del plástico) como una crisis global.

Paralelamente a estas cualidades se han presentado graves problemas en el campo de los desechos debido al limitado o nulo ataque biológico hacia ellos por parte de los microorganismos, esta situación ha permitido que estos materiales productos manufacturados con plásticos permanezcan visibles en muchos ambientes terrestres (Klenchuk, 1989).

Se han reportado trabajos sobre degradación biológica de plásticos y se considera que es importante esta alternativa 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; el proceso más importante para degradar plásticos es aquel en que sus componentes son utilizados como fuente de carbono.

Lee *et al.* (1991) aislaron micromicetos del suelo capaces de degradar productos de polietileno es así que hay grandes posibilidades de desarrollo en una tecnología de biopelículas para una mayor biodegradación de polímeros (Kirchman, 1982).

Los microorganismos son responsables de la degradación de plásticos y los hongos filamentosos tienen mejores rendimientos en la biodegradación del polietileno, que cultivados en medios sólidos como el compost o en medios líquidos minerales realizan esta tarea sintetizando enzimas intra y extracelulares para transformar sustratos orgánicos y participando en la oxidación de algunos compuestos inorgánicos (Atagana *et al.*, 2004).

El problema de los residuos plásticos en Puno tiene un efecto negativo directo sobre el desarrollo de la ciudad ,en la actualidad los pobladores del ámbito lacustre producen entre 90 y 104 toneladas de residuos sólidos, frente a este problema el municipio ha creado puntos críticos de acumulación como son el mercado Central avenidas Titicaca , Simón Bolívar ,jirones 1 de Mayo y Carabaya, esta última es la que acapara más, y se recolecta aproximadamente 10 toneladas de residuos sólidos por día; utilizando maquinaria pesada para su recojo debido a que los fines de semana se realiza la feria sabatina (Rodríguez *et al.*, 2014) los plásticos son fabricados en miles y descartados a los 15 minutos, convirtiéndose en basura que termina en el botadero de Cancharani ,que al ser un

xenobiótico representa una amenaza para los ecosistemas y la salud de los puneños producidos por los bisfenoles y ftalatos que contiene el material plástico (Rubin Bisphenol, 2011) ,más aun sabiendo que no existe una planta de tratamiento para residuos sólidos (RS) y menos para residuos plásticos solidos (RPS) ,existiendo únicamente el botadero de Cancharani a cielo abierto , siendo uno de los problemas ambientales más peligrosos y contaminantes del suelo ,aire y agua (Rodríguez *et al.*, 2014) de la ciudad de Puno ,el cual posee una biodiversidad en la flora y fauna no sabiendo aun , que microorganismos se encuentra en dicho botadero con actividad biodegradativa, tampoco se puede pensar en las posibilidades de un total o parcial reciclaje industrial, mediante incineraciones ya que estas producen sustancias toxicas (ac. Clorhídrico, dioxinas Etc.) Produciendo graves daños biológicos a los seres vivos y un sin número de organismos (Palit & Bhattacharya, 1976) este problema álgido de salud pública y los escasos estudios respecto a micromicetos y biodegradación de los plásticos por hongos de la zona, los avances son limitados, por lo que ha motivado realizar la investigación.

Se investigó la presencia e identificación de los diferentes hongos filamentosos que se desarrollan en el botadero de Cancharani y las condiciones óptimas en la biodegradación de los plásticos mediante experimentos en laboratorio para lo cual se empleó modelos y ensayos in vitro ,métodos de identificación fúngica, medios de cultivo selectivos, utilizando a las bolsas plásticos de polietileno como única fuente de carbono ; además proporciona conocimientos básicos para aislar ,caracterizar e identificar hongos filamentosos , capaces de formar biofilamentos sobre el plástico de baja densidad , diseño de nuevos materiales y conservación de las mismas.

Así mismo muestra resultados del estudio realizado para aislar e identificar el consorcio de micromicetos nativos los cuales servirán para realizar investigaciones in vitro sobre biodegradación por otros micromicetos, también servirá como base de investigación para los microbiólogos y científicos que necesitan participar en investigación de polietileno y continuar con estudios de identificación de hongos de otras zonas del Perú, que tienen el problema de los RSP. Con el presente trabajo de investigación pretendemos dar un aporte a la investigación científica en el área de las Ciencias de la Salud.

El presente trabajo de investigación se encuentra dividido en los siguientes capítulos: capitulo I. Fundamentos teóricos de la investigación, se expone las teorías centrales y

referenciales que corresponden a las variables dependientes e independientes a ello se acompaña los objetivos de la investigación y las hipótesis.

Capitulo II. El problema que refiere al planteamiento del problema que conlleva a la investigación seguida de la justificación.

Capitulo III Describe la metodología de la investigación, ubicándose el método, diseño tipo y nivel de investigación que le dan orientación al estudio al igual que la cobertura del estudio de la muestra, las técnicas e instrumentos que han viabilizado para el recojo de la información.

Capitulo IV resultados y discusión.-Dedicado a los resultados de la investigación con aplicación de instrumentos en los diferentes cuadros estadísticos, contrastación de hipótesis; culmina con las conclusiones, recomendaciones, bibliografía consultada y los anexos referidos.

CAPÍTULO I

REVISIÓN DE LITERATURA

1.1 Marco teórico

1.1.1 Hongos filamentosos

Los hongos filamentosos son organismos eucariontes pluricelulares, heterótrofos, su crecimiento permite desarrollar un micelio aéreo con órganos de fructificación, se reproducen sexual y asexualmente, no realizan fotosíntesis porque no tienen clorofila y se nutren a partir de materia orgánica, tienen la pared celular formada por quitina fuertemente rígida (Arenas, 2014).

La estructura fúngica está compuesta por un complejo denominado micelio, la cual está compuesta de hifas; siendo la fuente de carbono más utilizada en su metabolismo la glucosa, también necesitan pequeñas cantidades de hierro, Zinc, cobre, magnesio, fósforo, potasio; suele desarrollarse a temperaturas que pueden oscilar entre los 0°C y los 60°C siendo su temperatura óptima de crecimiento de 22-30°C. Estos organismos son fundamentales en la degradación de la materia orgánica, en los flujos de nutrientes, y en diferentes tipos de simbiosis; se desarrollan preferentemente en lugares húmedos y oscuros, y no necesitan de la luz para sobrevivir (Arenas, 2014) estos hongos filamentosos se caracterizan por tener un aspecto algodonoso, aterciopelado o polvoriento y poseen diferentes colores, su característica fundamental es que van a estar conformados por muchos filamentos microscópicos con la capacidad de crecer de manera longitudinal y de ramificarse, los cuales se disponen para dar origen a las diferentes estructuras microscópicas. La mayoría de los hongos filamentosos son aerobios estrictos (García & Sanchez, 2012) y tienen una amplia tolerancia de multiplicarse a

diferentes pH y crecer en concentraciones relativamente altas de ácido, así como en medios bastante alcalino. El rango de pH para una gran mayoría es de 2.0 a 9.0, pero casi todos crecen mejor a un pH ácido, el óptimo se encuentra alrededor de 5.6 la mayoría prosperan en condiciones cálidas con valores cercanos a los 25°C. Y ambientes con presencia de azúcares en el medio (Arenas, 2014).

1.1.2 Curva de crecimiento de hongos filamentosos

La curva de crecimiento de los hongos según Cochrane y Kavanach (2005) presentan tres fases, la primera es una fase neutra de crecimiento, seguida de la fase logarítmica denominado también fase de rápido crecimiento con la utilización de carbohidratos, nitrógeno y fosfatos, además de aparecer las esporas, fisiológicamente los hongos filamentosos se adaptan a condiciones más severas e inclusive soportan concentraciones de azúcares elevados hasta el 10% y finalmente una tercera fase sin crecimiento neto de autólisis, la cual termina en una disminución en peso seco del micelio (Moreno y Moreno, 2009).

1.1.3 Condiciones de crecimiento

La mayoría de los hongos crecen entre 0 y 55°C, teniendo por lo general un rango de temperatura ideal entre 20 y 30°C, clasificándose como: Psicrófilos: los que desarrollan entre 0 y 20°C; temperatura óptima alrededor de 15 y 17°C; mesófilos: con amplio rango de crecimiento: 0 a 50°C, rango óptimo entre 15 y 40°C y termófilos que tienen su rango de crecimiento entre 20 y 50°C, son acidófilos la luz no es vital (Bonifaz, 2014). Estos hongos a un pH alto se afectan los sistemas enzimáticos, el ingreso de vitaminas esenciales, ácidos orgánicos y la toma de minerales, siendo su pH óptimo entre 4 y 6 (Cochrane & Kavanach, 2005).

1.1.4 Requerimientos nutricionales de hongos filamentosos

Los hongos crecen mejor en hábitats oscuros y húmedos, pero se encuentran donde hay materia orgánica disponible. Para su crecimiento necesitan carbohidratos como fuente de carbono, sobre todo glucosa, sacarosa, maltosa, nitrógeno (proteínas o sales de nitrógeno) y agua; precisan también de los iones inorgánicos más comunes, en especial nutrientes mayores como potasio, fósforo, magnesio y como nutrientes menores: hierro, cobre, zinc y molibdeno (Bonifaz, 2014) la mayoría de los hongos tienen respiración aerobia, aunque algunos son

anaerobios facultativos (fermentativos) y en menor cantidad anaerobios estrictos. Desde el punto de vista metabólico los hongos son heterótrofos, y son versátiles desde el punto de vista bioquímico, de manera que producen metabolitos tanto primarios (p. ej., ácido cítrico, etanol, glicerol) como secundarios (p. ej., antibióticos: penicilina, aflatoxinas) (Murray, 2013).

1.1.5 Medios de cultivo para hongos filamentosos

Medio de cultivo es una mezcla de determinadas sustancias con o sin gelificación sobre el cual o dentro de él crecen los microorganismos los microorganismos son extraordinariamente diversos en sus características fisiológicas y sus requerimientos nutricionales, en condiciones naturales, los nutrientes requeridos para sintetizar su material celular, generar energía y efectuar su fundamento son tomados del ambiente.

En tanto que para cultivarlos in vitro se han diseñado múltiples medios de cultivos que son disoluciones acuosas con base a sustancias orgánicas, inorgánicas o ambas que proporcionan los nutrientes requeridos por los mismos (Ramírez *et al.*, 2015).

El medio de cultivo puede ser químicamente definido o no definido, dependiendo de cómo se conoce o no la composición completa y la estructura química de cada componente. Normalmente consiste de sales inorgánicas, (macro elementos y micro elementos), una fuente de energía (generalmente un azúcar), complementos orgánicos (principalmente vitaminas y fuente de nitrógeno reducido) reguladores de crecimiento y gelificantes.

Extracto de malta. El caldo extracto de malta; se utiliza como medio para demostración, aislamiento y numeración de hongos, especialmente, en diversos materiales de investigación, cultivo de cepas de ensayo. Se emplea para aislar, detectar y enumerar mohos; se puede aislar *Aspergillus niger* (Mendo y Valenzuela, 2005).

Agar czapek – dox. Este medio se prepara de acuerdo con la fórmula original de Thom y Church. Es utilizado para multiplicar hongos, levaduras y bacterias del suelo; es un medio sintético que contiene sacarosa, nitrato como únicas fuentes de carbono y de nitrógeno, En este medio se produce un crecimiento moderadamente

energético de casi todos los *Aspergillus* saprofitos, los organismos a identificar son *Aspergillus niger*, su crecimiento es de bueno a excelente (Mendo y Valenzuela, 2005).

Caldo C. Czapek. Es un medio de cultivo definido para el cultivo de hongos capaces de utilizar el nitrato sódico como única fuente de nitrógeno. Tanto en su forma líquida como sólida es un medio de cultivo general de composición química definida en el que la única fuente de nitrógeno es el nitrato y la de carbono la sacarosa. Basaron las identificaciones de las especies de *Aspergillus* spp, crecimiento de buena a excelente (Koneman, 2015).

1.1.6 Clasificación y taxonomía de hongos filamentosos

La taxonomía de los hongos del Reino fungi están integrados por: *Chytridiomycota*, *Zygomycota*, *Basidiomycota*, *Ascomycota*, *Pseudomycota*, *Oomycota*, *Hypochytriumycota*, *Plasmodiophoromycota* (Bonifaz, 2014).

La taxonomía de los hongos se ha basado principalmente en criterios morfológicos y en las características de las estructuras de reproducción sexuada, sin que haya necesidad de analizar los atributos bioquímicos o fisiológicos (Arenas, 2014).

El reino de los hongos (fungae) se compone de una escalera taxonómica, y la familia está compuesta de géneros y estos contienen las especies, dada su histórica asociación con las plantas, la clasificación de los hongos ha seguido las reglas establecidas por el Comité Internacional de Nomenclatura Botánica.

Los criterios seguidos hasta el momento para clasificar las especies del género *Aspergillus* y sus teleomorfos son principalmente morfológicos. No obstante, en algunas secciones se han realizado además estudios bioquímicos o moleculares encaminados a resolver algunos de los problemas planteados en su clasificación de etiología clínica en la clínica médica (Arenas, 2014).

Clasificación taxonómica:

Reino : Fungae

División : Eumycota

Filo (Phylum) : Glomeromycota (*Zygomycota*)

Subfilo (Subphylum): Mucoromycotina (Zygomycotina)

Clase : Glomeromycetes (Zygomycetes)

Orden : Mucorales

Filo (phylum): Glomeromycota,

sub-filos (subphylum) :Mucoromycotina.

Subfilo Clase: Deuteromycotina (asexuada)

Clase: Hyphomycetes

Familia: Aspergillaceae

Género: *Aspergillus niger*, *A.fumigatus*, *A.flavus*.

Fusarium sp.

Genero Aspergillus

a) *Aspergillus niger*

Las colonias se desarrollan con rapidez, transformándose en colonias planas, granulosas, negras e ilimitadas; al reverso no presentan pigmento. Al microscopio se observan hifas tabicadas de 2-4 μm de diámetro (de nutrición); las hifas reproductivas son más anchas, de 4-8 μm ; estas terminan con las clásicas “cabezas aspergilares” que miden en total de 80-200 μm de diámetro; están compuestas por conidióforos cenocíticos largos (100-200 μm), vesículas redondas (25-100 μm de diámetro), de donde nacen dos series de filoides en un ángulo de casi 360° (biseriadas); las primeras filoides son más grandes (8-10 μm) que las segundas (5-7 μm); de estas nacen microconidios redondos o elípticos de 3.5-5 μm , negros y equinulados (Van Tieghem, 1867) crece en los medios de cultivo ordinarios como Sabouraud y papa dextrosa agar (PDA) a 28°C.



Figura 1. *Aspergillus niger* (macromorfología) y (Micromorfología)
Fuente: Manual de hongos INS 2017. Lima.

b) *Aspergillus fumigatus*

Las colonias se desarrollan entre 3 y 5 días; son planas, ilimitadas, polvosas o aterciopeladas, de color verde y en ocasiones presentan un halo micelial blanco alrededor de la colonia; al reverso raras veces se ve un pigmento de color ocre. Al microscopio se observan hifas de nutrición tabicadas de 2 a 4 μm de diámetro, e hifas reproductivas casi siempre cenocíticas de 4-6 μm , que terminan en las clásicas cabezas aspergílicas, las cuales son más pequeñas que las de *A. Níger*; miden de 30-50 μm y presentan conidióforos cortos (20-30 μm), que terminan con una vesícula ligeramente alargada, de la que nace una sola serie de fiálides que miden de 20 a 30 μm de diámetro cada una, con tendencia a disponerse hacia arriba en un ángulo aproximado de 180° (como “pelos parados”); de las fiálides nacen microconidios redondos de aproximadamente 2.5-3 μm (Fresenius, 1863). Crece en los medios ordinarios de Sabouraud y PDA a 28°C.

c) *Aspergillus flavus*

Link (1809) Crece en los medios de cultivo ordinarios como Sabouraud y PDA a 28°C; las colonias se desarrollan con rapidez de 3 a 5 días: son ilimitadas, polvosas o aterciopeladas, de color verde amarillento (Arenas, 2014).

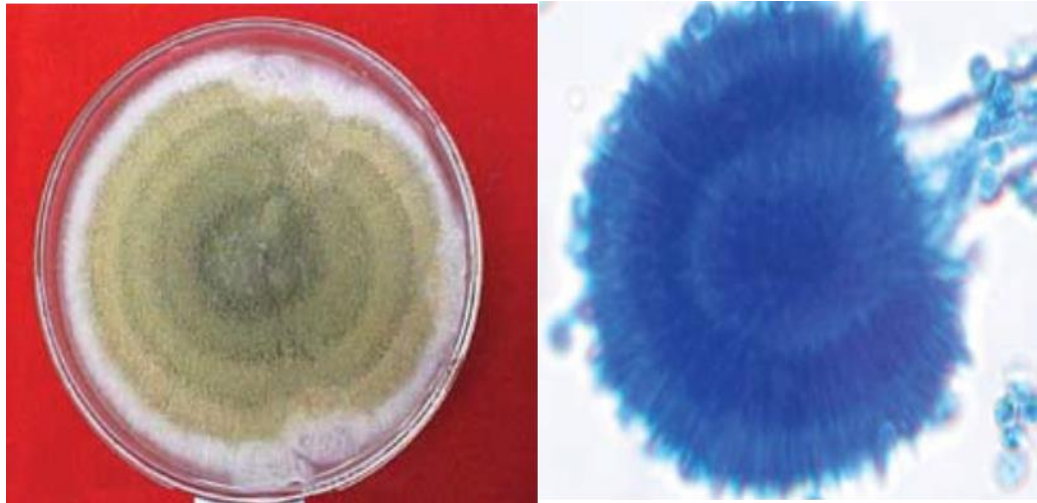


Figura 2. *Aspergillus flavus* (*macromorfología*) (*Micromorfología*)

Fuente: Manual de hongos INS 2017 Lima.

d) **Fusarium**

Es un hongo dematiáceo, crecen con rapidez y muestran una morfología aplanada algodonosa a lanosa que tiende a extenderse con una coloración verde-azulada, roja, violácea.

Características macroscópicas. Anverso es de tamaño ilimitado color; en un inicio es de 1 a 3 días, es de color blanco, luego se torna en tonalidades de color naranja, café, violeta. Lila/dependiendo de la especie) su aspecto es vellosa, seca, se adhiere a las paredes del tubo reverso, presenta color naranja o violeta y es difusible al medio.

Micromorfología. El tipo de micelio es macro sifonado de 1 a 2 μm de diámetro, septado y hialino, modalidad de micelio las hifas se organizan en coremium. Su reproducción es anamórfica a base de macroconidios fusiformes de 5 a 8 μm de largo por 1 a 2 μm de ancho y micro conidios fusiformes de 1 a 3 μm de largo por 1 μm de ancho, estos pueden variar en tamaño y formadependiendo de la especie, estructuras especializadas, presenta conidióforos delgados que miden de 5 a 10 μm de largo, la fase teleomorfica se han reportado en algunas especies (Zurita *et al.*, 2017).

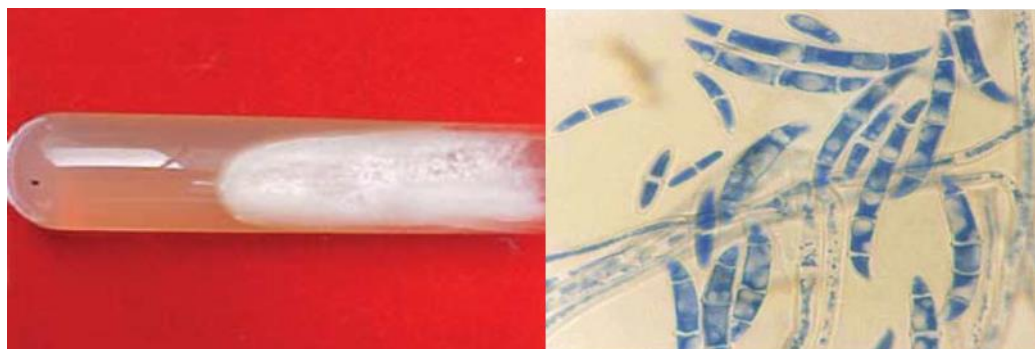


Figura 3. *Fusarium* spp. (macromorfología) (Micromorfología)

Fuente: Manual de hongos INS 2017. Lima.

e) Mucorales

La mayoría de los hongos mucorales tienen un hábitat ubicuo, aunque prefieren los climas cálidos y húmedos. Se aíslan con frecuencia del suelo, materia orgánica en descomposición, frutas y, sobre todo, de pan de trigo y centeno; lo cual explica la vía de entrada para los casos gastrointestinales. Este tipo de hongos se encuentran también en el ambiente; microorganismos como *Mucor* y *Rhizopus* ocupan el tercer o cuarto lugar dentro de los hongos contaminantes más frecuentes del aire solo superados por *Penicillium* sp., *Aspergillus* sp., *Cladosporium* sp., y *Alternaria* sp. (Bonifaz, 2014) los esporangios son transportados en las puntas de esporangiosporas similares a un tallo que terminan en una tumefacción bulbosa denominada columela.

La presencia de estructuras radicales, denominadas rizoides, es útil para identificar géneros específicos dentro del orden Mucorales comprende los géneros *Lichtheimia* (antes *Absidia*), *Mucor*, *Rhizopus* y *Rhizomucor* (Murray, 2013).

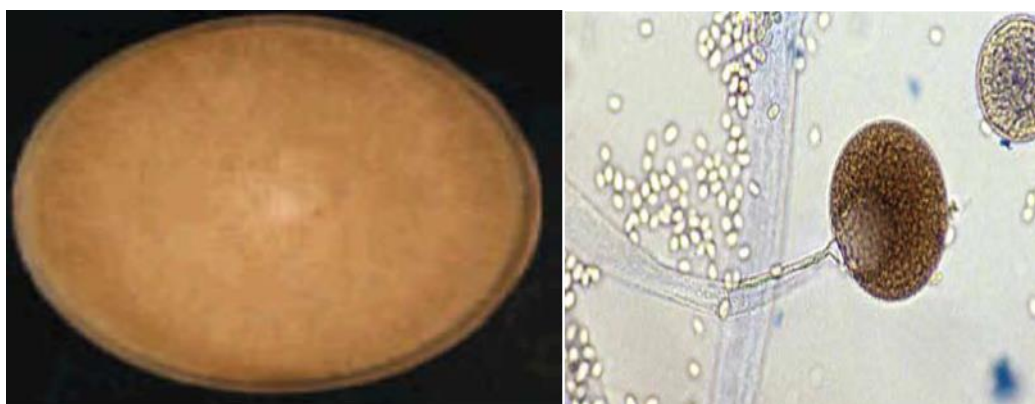


Figura 4. *Mucor* spp

Fuente: Manual de hongos INS 2017. Lima

1.1.7 Cultivo e Identificación de hongos filamentosos

El cultivo es un procedimiento de diagnóstico específico que nos permite identificar con certeza el género y la especie de hongos filamentosos. El diagnóstico se basa fundamentalmente en el uso de claves taxonómicas que aplica criterios morfológicos, macro y microscópicos, relacionado con la fase de reproducción asexual que observamos en el cultivo (Zurita *et al.*, 2017) las cuales varían con el medio de cultivo, la naturaleza de los azúcares, la pureza de peptona el pH, el grado de humedad y temperatura. Por eso es preferible utilizar siempre medio glucosado de Sabouraud para estudiar y comparar características estándar en las mismas condiciones de humedad y temperatura, evitando contaminaciones (Arenas, 2014).

La morfología macroscópica que se debe tener en cuenta es el color de las colonias, en general colores claros, desde tonos blanquecinos, verdes amarillentos a marrón claro o negro (Zurita *et al.*, 2017) así mismo, la forma, tamaño, color en la superficie, difusión del pigmento, textura: yesosa, glabra, terrosa, granulosa, vellosa, lanosa, cética, cremosa, Superficie: elevada o plana, levantamiento central (agregaciones micelianas), aspecto: plegado, radiado, cerebriforme, crateriforme, gotas de exudado, rapidez de crecimiento: Los agentes oportunistas crecen en 24 a 48 h, y los dermatofitos en 5 a 10 días (Arenas, 2014).

Respecto a la morfología microscópica son las que determinan su identificación en la mayoría de casos, observando a 40X y aplicando los siguientes criterios taxonómicos: para *A. fumigatus*.- cabezas conidiales formando una columna compacta; conidios esféricos, para *A. flavus* colonias verde amarillentas en agar Czapeck y conidios equinulados, para *A. niger* colonias negras, *Fusarium* spp. Colonias de crecimiento lento (menos de 2 cm de diámetro en 7 a 10 días) y colonias de crecimiento rápido, más de 2cm, usualmente entre 4-8 cm a los 7 a 10 días y *Mucor* sp. Esporangiosporas no ramificadas o solo ligeramente, esporangiosporas repetidamente ramificadas (Zurita *et al.*, 2017).

1.1.8 1.1.8. Métodos de observación microscópica

Se utilizan los métodos siguientes:

- a) **Análisis de un fragmento del cultivo:** Consiste en tomar un fragmento de la colonia, dilacerarlo y observarlo con azul de lactofenol, es un método habitual, pero puede destruir los aparatos esporíferos y dificultar la identificación.
- b) **Método de la cinta adhesiva transparente (Rush-Munro):** es una variante de la técnica anterior y permite observar las estructuras fúngicas casi sin alteración. Se recorta un pequeño cuadrado de cinta y se adhiere a la parte terminal del asa de platino, después se aplica la parte adhesiva sobre la colonia y luego se coloca sobre un portaobjetos con una gota de colorante y se retira el asa, se añade otra gota de colorante, se pone un cubreobjetos y se observa al microscopio.
- c) **Cultivo en lámina o micro cultivo:** Es el más preciso y permite observar las estructuras fúngicas in situ. Consiste en obtener un cultivo sobre un portaobjetos y observar el hongo sin deterioro de su morfología.
- d) **Principales características fúngicas.**
 - Talo. disposición de las fiálides sobre la vesícula
 - Forma y diámetro de las vesículas
 - Longitud y anchura de las fiálides
 - Forma, diámetro, ornamentación y color de los conidios
 - Forma, tamaño y color de las ascosporas.
- e) **Tinciones y exploración por microscopia directa de hongos filamentosos**

En general, se considera que el estudio por microscopia directa constituye uno de los métodos más rápidos y rentables de diagnosticar la presencia de hifas a nivel microscópico. En algunos casos, la microscopia permite no solamente detectar el hongo, sino identificarlo por medio de sus

inconfundibles características morfológicas, se puede utilizar hidróxido de potasio al 10%, azul de lactofenol, azul de metileno (Arenas 2014 y Zurita, 2017).

La microscopia directa tiene una clara utilidad en el diagnóstico de hongos dispone de una sensibilidad menor que los cultivos, y la obtención de resultados negativos no descarta la existencia de la presencia de hongos, se emplean diversas tinciones y técnicas microscópicas para detectar y caracterizar directamente los hongos (Murray, 2013).

Los adelantos que han aparecido más recientemente, como la PCR a tiempo real y la tecnología de *chips* génicos, facilitaran el uso generalizado de estas técnicas, aunque de momento no se dispone de ellas en casi ningún laboratorio de micología (Murray, 2013).

f) **Preservación de cultivos**

El objetivo de conservarlos es preservar su viabilidad, sin degeneración, variación ni mutación. Se pueden mantener en agar, transfiriendo de forma periódica a medios frescos inclinados. Para hongos filamentosos, es posible usar medio de Sabouraud simple, agar-papa, extracto de malta, harina de maíz (*corn meal*), y para levaduras, de preferencia medio de Sabouraud y extracto de malta (Arenas y Bonifaz, 2014).

1.2 **Residuos sólidos plástico (RSP)**

Los residuos sólidos plásticos (RSP) constituyen uno de los grandes problemas ambientales con diferentes impactos a nivel global y local. Con el aumento de las concentraciones humanas, se fueron acumulando grandes volúmenes, tanto de residuos orgánicos, como de inorgánicos, cuya difícil descomposición dificulta su reintroducción en los ciclos naturales lo que resulta en una fuerte incidencia en la estabilidad de los ecosistemas (Maldonado, 2012).

El gran basural a cielo abierto en el que se realiza la disposición final de residuos, al igual que los numerosos microbasurales de la ciudad, expone a los habitantes aledaños a una situación de alto riesgo sanitario, y actualmente incrementándose la polución por plásticos; no hay lugar por donde no se vea objetos multicolores, livianos, de múltiples

formas y tamaños, regados por doquier, colgando de árboles y hasta volando por los aires, denominados los “Plásticos”. La idea de la macromolécula no fue aceptada por la mayoría de los que trabajaban con estas cosas a principios de siglo; ya entrados los años 20, un gran científico: Hermann Staudinger, laureado luego con el premio Nobel, en 1953, por sus trabajos, logró que muchos entendieran la idea de que existían compuestos macromoleculares, que no eran agregados moleculares ni coloides. Al darse este paso el mundo de la ciencia pudo entonces abrir un área con nombre propio, con sus leyes y principios, y gracias a los descubrimientos del momento ya se podía hablar de macromoléculas de origen natural y sintético (Carnevalli, 2002).

1.2.1 Plásticos

La industria del plástico se ha insertado en el mercado mundial cubriendo gran diversidad de necesidades del consumidor. Muchos aditivos del plástico son peligrosos para la salud aun en muy bajas dosis, la composición de muchos plásticos es un secreto industrial, ahora mismo hay más de 80,000 tipos de plásticos registrados la mayoría protegidos por un patente que convierte su composición en secreto industrial ; hasta más del 50% de aditivos del plástico se debe a decenas de aditivos que le otorgan su propiedad de dureza flexibilidad rigidez color ,pero no hay manera de saber exactamente que aditivos son y en qué cantidades porque su composición es un secreto industrial . Las bolsas de plástico pueden estar echas de polietileno de baja densidad, de alta densidad, polietileno lineal, polipropileno, polímero de plástico no biodegradable, su espesor vario de 18 a 30 micrómetros. Anualmente circulan en todo el mundo entre 0.5 y 1 billón de estos objetos.

China es el principal productor de plásticos seguido de Europa, Norte América y Asia ,la mayor parte de los plásticos se emplea en la fabricación de envases, es decir en productos de un solo uso (Greenpeace); representando una amenaza para la biodiversidad marina donde los animales se enredan con estos y pueden resultar heridos, inmóviles o muertos.

Alrededor de 8 millones de residuos llegan al océano cada día, siendo uno de los principales factores para la destrucción de la fauna y flora marina ya que los residuos que se encuentran en su totalidad ahí son los plásticos, objetos hechos a base de plásticos como botellas, fundas, tapas etc. (Ecomundo, 2011).

Se calcula que pueden tardar entre 100 y 1000 años para degradarse dependiendo del tipo de plástico (42, 40, 50). La American Society for Testing Materials (ASTM) define plástico como: “Cualquier material de un extenso y variado grupo que contiene como elemento esencial una sustancia orgánica de gran peso molecular, siendo sólida en su estado final.

1.2.2 Bolsas de plástico

Desde el punto de vista químico e industrial, los plásticos (del griego ‘plastikos’: que adopta cualquier forma) fueron inventados en 1869 por el norteamericano John Wesley Hyatt, quien estaba buscando un material que reemplazara al marfil, el cual se usaba para hacer bolas de billar. Su éxito fue instantáneo. Su invento (mezclando celulosa del algodón con alcanfor) logró imitar al marfil, que proviene de los cuernos de animales y del caparazón de las tortugas. Las bolsas de plástico están hechas de etileno, producto derivado del gas y del petróleo (Uribe, 2010).

Los plásticos hacen parte de un grupo de compuestos orgánicos denominados polímeros los cuales están conformados por largas cadenas macromoleculares que contienen reacciones químicas entre diferentes materias primas de origen sintético o natural.

Entre los polímeros sintéticos se encuentra el polietileno que se obtiene mediante la polimerización de eteno (un compuesto denominado también etileno). El polietileno se usa para la producción de una gran cantidad de productos, como caños, recipientes, bolsas y otros.

Las bolsas de plástico están hechas de tres categorías de este material: Polietileno (PE), policloruro de vinidileno (PVCD) y policloruro de vinilo (PVC): las resinas de plástico son derivadas del petróleo. Se pueden agregar plastificantes, colorantes o compuestos anti condensación (Quispe, 2017).

En el Perú, las bolsas de polietileno quedan estandarizadas su clasificación de la siguiente manera: Bolsas de polietileno $xxyyzz$, siendo xx espesor en micras (μm) siendo yy medidas de ancho y largo expresado en cm. ejm bolsa de polietileno 2 μm X 26 in con fuelle 6cm, observándose dos tipos de este material en la fabricación de las bolsas de polietileno, los cuales se clasifican de acuerdo a su

densidad (de acuerdo al código de identificación de resinas de las normas de ASTM).

- a) **Polietileno de alta densidad** (PEAD o HDPE): resistente, opaco, ejm. las bolsas de supermercado, su densidad es mayor (0.950-0.965 g/cm³), así como su rigidez.
- b) **Polietileno de baja densidad** (PEBD o LDPE): es flexible más brillante, suave al tacto y resistente para productos con bordes afilados y pesados (es el más usado) para las bolsas de congelados, envoltorios de plástico adherente, este material ofrece variedad de colores, medidas, impresiones.

Se trata de un polietileno con una cadena muy ramificada, lo que implica mayor volumen y, por ello, su densidad es menor (0.915-0.930 g/cm³) (Sáenz, 2008 y Quispe, 2017).

El término utilizado para describir el grosor de una bolsa, dependerá del uso que se le vaya a dar, un calibre muy delgado puede provocar que la bolsa se rompa un calibre muy grueso puede ser un gasto innecesario. Las bolsas del supermercado generalmente se fabrican en calibre de 20 micras.

En cuanto a la transparencia, las bolsas de polipropileno son más transparentes que las de propileno, según la catalogación de la oficina de tecnologías de la información -MEF, se tiene que las bolsas con cierre hermético (zipper), bolsa trilaminada con valculas, bolsas con fuelle, bolsas con asa, y bolsa chequera (la de uso común), bolsa desglosable, bolsa para basura, bolsa impresa (Quispe, 2017).



Figura 5. Bolsa chequera

Fuente: Catalogación Ofic.Tec.informacion MEF 2017-Peru.

1.3 Efecto de los plásticos en la salud humana

Una bolsa de plástico tarda 150 hasta 400 años para descomponerse totalmente, los efectos de la contaminación por plástico no solo afectan al medio ambiente, principalmente a los océanos sino también a nuestra salud. Los estudios en animales son variados, en humanos la investigación científica es preliminar.

Erler (2010) explica que son dos las sustancias químicas que están bajo la mira de los investigadores: El Bisfenol A y Ftalatos. Ambas sustancias actúan derritiendo el sistema de cascada con que se producen las hormonas masculinas y femeninas, afectando más a los hombres que a las mujeres. El bisfenol a es usado en la fabricación de plásticos y forma parte del proceso de producción de un tipo de resina.

Los micro plásticos se convertirán en nano plásticos que miden menos de 100 milmillonésima de metro en tamaño, y estas son las partículas que pueden penetrar tejidos y órganos, presentando una toxicidad potencial para las personas con consecuencias graves debido a su bioacumulación en nuestro sistema.

La organización mundial de la salud y la UNEP han declarado conjuntamente que la disrupción endocrina (uno de los efectos del plástico) lo toma como una crisis global. La Agencia Internacional de Investigación de Cáncer (IARC) de la Organización Mundial de la Salud y del 13avo Reporte de Cancerígenos del Programa Nacional de Toxicología del Departamento de Salud de los Estados Unidos indica que el estireno está relacionado a leucemias y linfomas en trabajadores expuestos a esa sustancia, siendo aún muy preliminar el conocimiento del daño al público general; siendo la gran pregunta de salud pública es si esos plásticos, sinónimos de adelanto, progreso y comodidad, contienen sustancias químicas que ingresan al organismo cuando por ejemplo los niños se ponen objetos de plástico en la boca o cuando sentimos ese inconfundible “olor a plástico” en objetos de plástico nuevos.

Hay dos sustancias que resaltan en su toxicidad y ya están siendo prohibidos: el bisfenol A (BPA) y los ptalatos. El BPA tanto es así, que los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades de EEUU (CDC) estiman que el 93% de las personas mayores de 6 años tienen niveles detectables de BPA en la sangre. Investigaciones recientes han demostrado que los bebés recién nacidos que estuvieron en una unidad de cuidados

intensivos tienen ya 10 veces más BPA y plátalos en la sangre, comparados con bebés de la población general.

Se piensa que las mujeres embarazadas, los fetos y los niños pequeños serían los más susceptibles a esas sustancias químicas y al respecto, un estudio japonés demostró mayor riesgo de abortos espontáneos producidos por el BPA. Pues eso es cierto, nadie ha dicho que el poliestireno cause cáncer, pero el estireno, del cual el poliestireno está hecho si lo está.

Los investigadores de la Comunidad Valenciana ha detectado una relación significativa entre la exposición de ratones al componente de los plásticos Bisfenol-A (BPA) durante el embarazo y el desarrollo de pre-diabetes en las madres y en los machos de la primera generación.

La exposición a una cantidad minúscula de estas sustancias sintetizadas (que se utilizan en todo, desde pesticidas a botellas de agua), pueden alterar nuestras hormonas. Esta interferencia puede activar las células grasas, haciéndolas “engordar” aún más, o provocar un error de interpretación haciendo que el páncreas segregue un exceso de insulina, una hormona que regula el metabolismo de la grasa y los carbohidratos.

Según la Agencia de los Alimentos y los Medicamentos de Estados Unidos (FDA) y el Instituto Nacional de Toxicología, estudios recientes dan motivos de preocupación sobre los efectos potenciales del BPA en el cerebro, el comportamiento y la próstata de fetos, bebés y niños. La mayoría de los estudios se han realizado en animales pero, en 2008, la revista estadounidense de investigación médica JAMA comparó las tasas de diabetes y enfermedad cardiovascular en adultos según los niveles de BPA presentes en la orina (Noticias salud artículo 27-2012).

En el Perú, el congreso de la República ha promulgado la ley que regula el plástico de un solo uso y los recipientes o envases descartables, en el Art. 2, Reducción progresiva de bolsas de base polimérica. 2.1 indica que los supermercados, autoservicios, almacenes comercios en general u otros establecimientos similares así como sus contratistas o prestadores de servicios, dentro del plazo de 36 meses, contados desde la vigencia de la presente ley, deben reemplazar en forma progresiva la entrega de bolsas de base polimérica no reutilizable por bolsas reutilizables u otras cuya degradación no generen

contaminación por microplástico o sustancias peligrosas y que aseguren su valorización (El Peruano, 2019).

1.4 Biodegradación

Biodegradación es la transformación bioquímica de los compuestos por la acción de microorganismos, la cual ocurre debido a la actividad de varias enzimas, que son producidas por los microorganismos (Limón, 2001) el material polimérico sirve como fuente para la obtención de carbono, sin embargo, el ataque microbiano sólo se produce en determinados intervalos de temperaturas, por lo que este tipo de proceso de degradación, es muy poco frecuente (Sáenz, 2008) las enzimas pueden atacar los segmentos más pequeños, generando productos intermediarios de bajo peso molecular que serían incorporados a la biomasa celular o ser mineralizados, es decir, completamente degradados hasta bióxido de carbono y agua en condiciones aeróbicas, o metano y bióxido de carbono en condiciones anaeróbicas (Limón, 2001 y Gutiérrez, 2013).

1.5 Degradación de polímeros

La degradación de polímeros es un proceso dirigido a modificar la estructura del polímero, para hacerlo vulnerable y perecedero; es decir, que desaparezca como residuo (Limón, 2001) los materiales orgánicos, por su propia naturaleza, tienen una mayor afinidad para participar como reactivos en determinadas reacciones químicas y perder a lo largo del tiempo sus propiedades, tanto físicas como químicas. La degradación de un material sintético es un proceso complejo, causado por la escisión de determinados enlaces químicos (Sáenz, 2008) en el proceso de la degradación de un plástico, se observan variaciones tanto físicas como químicas. Entre las modificaciones físicas pueden citarse: pérdida de brillo y color, formación de grietas, aparición de zonas pegajosas y endurecimientos, con la consiguiente pérdida de sus propiedades. La degradación de los polímeros es causada principalmente, por reacciones que producen el rompimiento de los enlaces en las macromoléculas y puede ser: Física: mecánica, térmica, por efecto de radiaciones de energía alfa y foto degradación, Química, Ambiental y Biológica denominada biodegradación (Sáenz, 2008).

La revista de normalización española tiene la prueba acreditada por ENAC que indica que esta norma determina la acción de los microorganismos (hongos, bacterias o microorganismos del suelo) sobre materiales plásticos, deteriorándolos, bien al ser

utilizados sus componentes como nutrimentos por los microorganismos, o por alterarse su aspecto debido al efecto de algunos metabolitos de los macroorganismos sobre el color u otras características del plástico, para la evaluación del resultado en las pruebas con hongos, se realiza un examen visual y con microscopio estereoscópico asignándose una gradación de 0 a 5 según la ausencia o intensidad del crecimiento grado. Para las variaciones de masa las piezas una vez limpias y secas deben pesarse con una aproximación de 0.1 mg y realizarse los cálculos correspondientes. Las intensidades de crecimiento obtenidas permiten establecer una interpretación de la ausencia o presencia en este caso la cuantía de sustancias nutritivas para microorganismos en el plástico (UNE, 2019).

1.6 Antecedentes

1.6.1 Biodegradación

En la labor de recolección de basuras para que los envases y productos de polietileno se recojan y no lleguen a los rellenos sanitarios, sino que inicien un proceso de degradación consistente es la pulverización de las láminas de polietileno y posteriormente agujerear las partículas sometiéndolas en reactor de alta presión lograron la disminución de peso del PE en dos años, para posteriormente irradiarlo con luz solar y finalmente introducirlo en medio sólido (compost) y líquido (medio mineral) (Fontanella *et. al.*, 2010).

1.6.2 Biodegradación del polietileno (PE)

La biodegradación es regida por diferentes factores que incluyen características del polímero, tipo de organismo, y la naturaleza del pretratamiento. Las características del polímero como es la movilidad, tacticidad, cristalinidad, peso molecular, tipo de grupos funcionales y los sustituyentes presentes en su estructura, y plastificantes o aditivos adicionados al polímero, todos juegan un papel importante en la degradación (Shah *et al.*, 2008).

La biodegradación es un proceso por el cual sustancias orgánicas son descompuestas por organismos vivos. La principal estrategia empleada para biodegradar el polietileno es el cultivo aerobio de microorganismos, el cual proporciona condiciones de crecimiento ideales para la actividad enzimática de los microorganismos empleados, logrando mejores resultados si se implementa

una primera etapa de degradación oxidativa abiótica por acción de la luz ultravioleta (UV) (foto- degradación) o por degradación térmica y la incorporación de oxígeno en la cadena principal de carbono del polímero produce una formación de grupos funcionales como carboxílico o ácidos hidro-carboxílicos, ésteres así como aldehídos y alcoholes, que son utilizados por parte de los microorganismos y sus enzimas (mecanismo catalítico), como fuente de carbono.

En esta primera etapa (oxidación abiótica) se determina la velocidad de todo el proceso Ammala *et al.* (2011) la segunda etapa es la biodegradación de los productos de la oxidación por microorganismos (bacterias, hongos, actinomycetes y arqueas) que consume los fragmentos de las cadenas de carbono oxidadas para formar CO₂, H₂O y biomasa.

El papel de estas moléculas es vital para que el microorganismo pueda utilizar el PE como fuente de carbono o asimilarlo como biomasa, porque sin su acción compuestos de alto peso molecular son poco susceptibles al ataque microbiano. Es por eso que la mayoría de los autores destacan su función en los diferentes procesos desarrollados para la biodegradación del polímero (Ammala *et al.*, 2011); para favorecer la formación de moléculas de menor tamaño y lograr la formación de oligómeros, dímeros y/o monómeros (Ammala *et al.*, 2011).

1.6.3 Micromicetos biodegradadores del polietileno

Diferentes microorganismos degradadores de polietileno han sido descubiertos como los reportados por Roy *et al.* (2008) quien afirmó que la degradación de película de polietileno de baja densidad que contenían estearato de cobalto como pro-oxidante fue llevado a cabo por especies bacterianas del género *Bacillus* como *B. pumilus*, *B. cereus* y *B. halodenitrifican*, que utilizaron compuestos de bajo peso molecular oxigenados o no oxigenados extraíbles del polímero, generando pérdidas del 8% de su peso.

Otros estudios también han reportado la colonización y degradación de la superficie de películas de polietileno oxidado por hongos previamente aislados, identificados pero no nombrados por Corti y Motta *et al.* (2010) *Curvularia sp.*, presentó una colonización lenta de las láminas de polietileno completada hasta las

9 semanas con penetración de las láminas de PE como también encontró Zahra *et al.* (2010) con *Aspergillus fumigatus* y *Aspergillus terreus* coinciden en que el género *Aspergillus* es capaz de degradar el polietileno, así como hongos del género *Penicillium* encontrados por (Ojeda *et al.*, 2009).

Resalta que para obtener una degradación en mayor proporción del polietileno la degradación abiótica y biótica deben ser combinadas sinérgicamente. Para que los hongos colonicen y biodegraden el polietileno se emplea un sistema en el cual las láminas son introducidas en placas de agar mínimo con micronutrientes o en agar sabouraud, Motta *et al.* (2009) aislaron cepas de hongos capaces de degradar el polietileno utilizando la técnica del Microcultivo en lamina y la actividad biodegradadora con el método de Kavelman y Kendrick , obteniendo 20 cepas de micromicetos pertenecientes a los géneros *Aspergillus* ,*penicillum*,*cladosporium*,*geotrichum*,*mucor*,*Helmintosporium*,*Chaetomium*,*Fusarium* *Hermodendrum*, *cladosporium* y *nigrospora*.

Así mismo evidenciaron en un 25% la capacidad de degradar el plástico polietileno a la temperatura de 20°C :a pH 4,5 y ninguna cepa degrado a pH6,5,y respecto a la temperatura de 30°C ,6 cepas evidenciaron capacidad de degradar con un pH de 4,5, Uribe *et al.* (2010) utilizaron la metodología de filtración y selección en sales minerales para hongos y bacterias ; aislaron seis cepas identificadas como *pseudomonas sp*,*penicillium sp*, *Rhodotorula sp*, *Hyalodentrun sp*, y una levadura no identificada, la acción degradativa del consorcio microbiano fue evidenciado por variaciones en el espectro infrarrojo del polietileno, observándose la reducción del carbonilo en un 83,89% a pH 7, y 4.08 a un pH 5.5 y finalmente se observó una pérdida de peso de 5.4% a pH de 7 y4,8 % a pH de 5.5.en cambio , Bueno y Gallardo (1998) conservo 26 cepas de los géneros : *Aspergillus niger*, *Aspergillus andius*, *Fusariumsp*, *Fusarium moliforme*, *Mucor griseocyanum*, *Syncephalastrum sp*, *Trihoderma sp*, *Trichoderma harzianum* y *Trichoderma koningii*, los cuales aseguraron el 100% de supervivencia durante dos años.

La biodegradación del polietileno se puede comparar con la biodegradación de la parafina. El hongo filamentoso *A. niger* es un productor de tanasas de amplio espectro , por lo cual es posible su utilización en la degradación parcial de los

taninos condensados, ya que es capaz de crecer en medio líquido con extracto de acacia como única fuente de carbono y energía; los actinomicetos y los hongos filamentosos son los microorganismos con mejores rendimientos en la biodegradación del polietileno y que cultivados en medios sólidos como el compost o en medios líquidos minerales realizan esta tarea (Martín, 2012).

Todos los géneros de hongos aislados del relleno sanitario «El Zapallal» en diferentes tipos de sustrato en Lima, 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 fueron *Aspergillus* y *Penicillium*; 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* (Méndez, 1998) 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.

Otros investigadores como Whitekettle (1991) sostuvo 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 su estudio, las condiciones favorables de temperatura y pH pudieron haber facilitado la producción de mucílago extracelular por los micromicetos probados.

El porcentaje de peso perdido obtenido mediante el empleo de las levaduras y los hongos aislados fue de 4,8% (pH 5,5), las pruebas realizadas utilizaron una única fuente de carbono durante todo el periodo de incubación, principal característica de toda prueba de biodegradación. El desarrollo de biopelículas o micelas en la superficie del polietileno indicaría la acción degradativa de microorganismos (Uribe *et al.*, 2010).

1.6.4 Identificación de hongos filamentosos

Aspergillus niger. Estos hongos son de color negro, marrones, amarillos, blancos y de otro color, forman hifas tabicadas ramificadas que producen cabezas conidiales compuesta por un conidióforo y una vesícula terminal la cual porta una o dos capas de fiálides o esterigmas (Murray, 2013). Oxidan la glucosa con ayuda de la glucosa oxidasa directamente en ácido glucónico el cual es segregado en la vía de la pentosafosfato y el peróxido de hidrógeno, tóxico para los organismos que forma la reacción queda destruido enzimáticamente.

1.6.5 Medios de cultivos para la biodegradación del polietileno

Las estrategias para utilizar los medios de cultivo se pueden agrupar en sólidos y líquidos. Zahra *et al.* (2010) empleo un medio constituido por desperdicios orgánicos con material vegetal, materiales con alto contenido de carbono y una parte de compost y láminas de polietileno de baja densidad. En cultivos a base de compost los porcentajes de mineralización de láminas con aditivos estuvieron en rangos muy similares pero con diferencia en el tiempo 23.3% en 90 días de incubación Ojeda, *et al.*, (2009) 23% en 8 meses en cambio, Husarova *et al.* (2010) y 22% en 300 días del ensayo.

En los cultivos sólidos también se han empleado suelo para simular las condiciones naturales a las que puede ser sometido el plástico en especial la participación de microorganismos que podrían estar presentes su biodegradación. Los índices de mineralización son menores y más lentos comparados con los obtenidos en cultivos que contienen compost (Husarova *et al.*, 2010) como encontró Fontanella *et al.* (2010) analizando tres láminas de polietileno de alta, baja y lineal densidad con aditivos cultivados en suelo que perdieron menos de 5%, 9% y 12 % respectivamente y en compost 6%, 16% y 24 % respectivamente. La mayoría de las bacterias existen en los 30 cm superiores del suelo (Posada, 2006).

La catálisis es un proceso por el cual se aumenta la velocidad de una reacción química, debido a la participación de enzimas producidas por microorganismos Albertsson *et al.* (1995) fueron los primeros y hasta el momento los únicos en descubrir que la degradación o asimilación de los productos intermedios de la

degradación abiótica del polietileno se realiza por medio de la β -oxidación, removiendo dos fragmentos de carbono mediada por enzimas peroxidasa e hidrolasas (Albertsson *et al.*, 1995).

1.6.6 Polución por plásticos y efectos en la salud y animales

La gestión de los residuos sólidos urbanos capitaliza en la ciudad una importante porción de su presupuesto y de su personal. Esta inversión está asociada a un servicio de recolección que generalmente es deficiente y una disposición final en “basurales”. Con el aumento de las concentraciones humanas, se fueron acumulando grandes volúmenes, tanto de residuos orgánicos, como de inorgánicos, cuya difícil descomposición dificulta su reintroducción en los ciclos naturales lo que resulta en una fuerte incidencia en la estabilidad de los ecosistemas (Maldonado, 2012).

Los microplásticos (trozos de fibras de plástico invisible al ojo humano), según una reciente investigación de la organización periodística Orb, se encuentran en el 83% de las muestras de agua potable de casi un centenar de territorios, entre los que estaban EE.UU. (94%), Europa (75%), Uganda (85%) y Quito (75%). Es decir, con el agua que tomamos todos los días, estamos ingiriendo también nanoplásticos y microplásticos. Otro estudio de Orb - que en marzo de este año ha motivado una investigación de la Organización Mundial de la Salud- encontró que el agua embotellada que se vende comercialmente contiene también estos residuos microscópicos.

Asimismo, diversos trabajos han demostrado que los microplásticos son consumidos por el plancton marino otros animales de consumo humano, los nanoplásticos y microplásticos están ya dentro de nuestros cuerpos, sin que se sepa cuál es su impacto (Battocletti, 2011).

Los estudios realizados respecto a la salud demuestra que los efectos producen disrupción endocrina, esto llevo a estudiar de forma transversal las concentraciones de BPA y el estado de salud de la población en EE.UU. (datos derivados del informe de *National Health and Nutrition Examination Survey* o NHANES 2003-2004) Erler y Carwille *et al.*, (2011) basados en la medición de BPA en la orina de 1455 adultos, se encontró que el aumento de BPA en la orina

se asocia a una mayor incidencia de diabetes, enfermedades cardiovasculares y alteraciones en las enzimas hepáticas.

Los efectos más preocupantes han sido los relacionados con la actividad hormonal del BPA y los efectos en el desarrollo físico, neurológico, conductual y endocrinológico (Bisfenol, 2011) los estudios realizados en animales los cuales se han estudiado en ratas y ratones. El BPA aumenta la liberación de prolactina y estimula el crecimiento del útero, vagina y mama (Erler *et al.*, 2010).

En hembras se evidenciaron cambios estructurales en la glándula mamaria en exposiciones a BPA durante la gestación y la lactancia. Aumenta la mortalidad al nacer y disminuye la viabilidad de células neuronales mesencefálicas; en otras especies la exposición a BPA produjo efectos adversos en la reproducción en la vida salvaje en anélidos, moluscos, crustáceos, insectos, peces y anfibios así como alteraciones en el desarrollo embrionario y aberraciones genéticas de crustáceos y anfibios (Huang y Wong., 2011).

Un nuevo estudio de NHANES del 2005-2006 observó una asociación entre niveles elevados de BPA en orina y obesidad abdominal y *obesidad* en general en la población adulta de EE.UU. (n = 2747). (Carwile *et al.*, 2011) estos datos sugieren la necesidad de nuevas evaluaciones de los posibles efectos del BPA en los adipocitos, en la regulación de glucosa, insulina, lípidos, diabetes y síndrome metabólico (FAO y Carwile *et al.*, 2011).

En estudios que muestran prevalencia en la exposición humana, se han examinado las concentraciones urinarias de BPA. En estudios realizados junto al Instituto Nacional de Salud en EE.UU. se evidenció una amplia gama de efectos estructurales y cambios neuroquímicos como hiperactividad, déficit de aprendizaje, agresividad, dependencia a drogas de abuso, anomalías en la producción de esperma, anomalías en los ovocitos femeninos, interrupción de la producción hormonal normal, infertilidad, trastornos inmunes y trastornos en la maduración sexual (FAO y Erler *et al.*, 2011).

1.7 Marco referencial

- **pH.**- La acidez o alcalinidad de un medio se expresa por su pH. Los hábitats en que crecen los microorganismos varían ampliamente desde valores de pH entre 1

y 2, en el extremo ácido, hasta pH entre 9 y 10. La mayor parte de los hongos prefiere estar en medios ligeramente ácidos, con valores de pH de 4 a 8 (Tortora *et al.*, 2017).

- **Temperatura.**-Cada microorganismo tiene una temperatura óptima en la cual su crecimiento es más rápido; una temperatura mínima por debajo de la cual no crece y una temperatura máxima por encima de la cual el crecimiento no es posible, estas tres temperaturas se denominan temperaturas cardinales y son características de cada microorganismo.

En condiciones por debajo de la temperatura óptima un aumento en la temperatura eleva la velocidad de crecimiento, porque la velocidad de una reacción catalizada por enzimas, como la de cualquier reacción química casi se duplica por cada aumento de temperatura de 10°C. Como la velocidad de cada reacción aumenta, el metabolismo en general es más activo a temperaturas altas y el microorganismo crece más rápidamente. A partir del punto (temperatura óptima), un mayor aumento disminuye la velocidad de crecimiento, y temperaturas más altas llegarán a ser letales. Las altas temperaturas ocasionan daños a los microorganismos y a desnaturalizar las enzimas, las proteínas transportadoras, y otras proteínas. El calor también deteriora las membranas microbianas; la doble capa lipídica puede fundirse y desintegrarse (Prescott *et al.*, 2008).

- **Degradación.**-La degradación corresponde a un proceso de tipo químico que es la degradación por la pérdida de átomos de carbonos. Existen tipos de degradación, termodegradación, fotodegradación, degradación química y la biodegradación (Ecoembes, 2017).
- **Biodegradación.** La biodegradación es la transformación catalizada biológicamente de un compuesto a formas más simples de polímeros, normalmente se refiere al ataque de los microorganismos sobre materiales plásticos; la biodegradación es un proceso biológico natural llevado a cabo por procesos bioquímicos y que puede ser clasificado en función al producto final (Volque, 1997).
- **Bolsa de plástico.** Material u objeto cotidiano, utilizado para transportar pequeñas cantidades de mercancía, de distribución gratuita (Quispe, 2017).

- **Hongo filamentoso** o mohos, son microorganismos eucariotas y se reproducen por esporas, de crecimiento rápido, sus reservorios son el suelo, plantas animales y vegetales muertos (Arenas, 2014).
- **Polietileno. PE.**- Es un polímero de cadena ramificada, por lo que su densidad es más baja, se caracteriza por una buena resistencia química.
- Polietileno de baja densidad, es un termoplástico comercial, semicristalino (un 50% típicamente), transparente y más bien flexible, liviano, impermeable, inerte con poca estabilidad dimensional, pero de fácil procesamiento y de bajo costo (Manfron y Telm, 2008).

CAPÍTULO II

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

2.1 Identificación del problema

El auge en la utilización del polietileno en diversidad de empaques y productos constituye un problema ambiental y su reciclaje en porcentaje mínimo. El polietileno (PE) al igual que todos los demás plásticos posee una vida de alrededor de 1000 años y debido a que su velocidad de degradación es mucho menor que su producción, es una amenaza para la diversidad biológica global que está gravemente afectada en los ríos, mares, suelos y contaminando la población.

A nivel mundial uno de los países que más genera residuos sólidos es Estados Unidos, de una totalidad de 2 515 millones de toneladas al año provenientes de actividades económicas y hogares con una representación del 9% (213 millones de toneladas) en plásticos, actualmente existe una gestión inadecuada de estos residuos incinerándolos, con un alto costo de inversión y deterioro directamente al medio ambiente (Eurostat, 2012).

América latina produjo en el 2014 el 5% de la producción total (Plastics Europe, 2014) siendo el polietileno el de mayor demanda con un 37 % y el 9% corresponde al LDPE (Maldonado, 2012) gran parte será desechado y terminara en los ecosistemas naturales, considerando que cuenta con el mayor número de países más ricos en biodiversidad.

Los estudios científicos demuestran que aditivos comunes del plástico son muy peligrosos para la salud, entre ellos destacan los bisfenoles, los ftalatos, el cloruro de vinilo, el estireno, algunos son disruptores endocrinos, lo cual significa que imitan el comportamiento de las hormonas inclusive existen pequeñísimas concentraciones (partes

por billón) que pueden producir mutaciones graves a nivel celular en ambos sexos donde los niños y los fetos son susceptibles, observándose las enfermedades como el cáncer de mama, ovarios, vagina cérvix, cáncer del cerebro y sistema nervioso ,leucemias, cáncer de pulmón y del sistema respiratorio, cáncer de próstata y testículos, obesidad, diabetes es decir casi todas las dolencias; y según la OMS y la UNEP han declarado conjuntamente que la disrupción endocrina(uno de los efectos del plástico) como una crisis global.

En el Perú los residuos se dividen como restos orgánicos de cocina y de alimentos, un 47,0% del total de residuos generados, seguido de los plásticos con un 9,5%, entre ellos los plásticos no reciclables como el Polietileno (PS). (MINAM, 2013) la tasa de degradación del polietileno es muy lenta en los rellenos debido a que es un ambiente anaerobio, siendo en alrededor de 500 años (Alka 2015 y Lapidis, 2005).

En la actualidad, los pobladores de la ciudad lacustre produce entre 90 y 104 toneladas de residuos sólidos y en fechas festivas aumenta en treinta toneladas más, lo cual representa una amenaza para los ecosistemas de los puneños; frente a este problema el municipio ha creado puntos críticos de acumulación de residuos sólidos de la ciudad como son el mercado central ,avenidas Titicaca , Simón Bolívar, jirones 1 de Mayo y Carabaya, esta última es la que acapara más, y se recolecta aproximadamente 10 toneladas de residuos sólidos por día más y se utiliza maquinaria pesada para su recojo debido a que los fines de semana se realiza la feria sabatina (rev 37GRP) lo que termina en el botadero de Cancharani.

El problema de los residuos plásticos (RSP)en la ciudad de Puno tiene un efecto negativo directo sobre el desarrollo de la ciudad ,la falta de una gestión del manejo inadecuado que con llevaría a la proliferación de enfermedades ya mencionados, riesgo de salud ambiental y deterioro del paisaje de la ciudad, representando una amenaza para los ecosistemas puneños, más aun sabiendo que no existe una planta de tratamiento para residuos sólidos y menos para residuos plásticos ,existiendo únicamente el botadero a cielo abierto de Cancharani siendo uno de los problemas ambientales más peligrosos y contaminantes del suelo aire y agua de la ciudad de Puno ,el cual posee una biodiversidad en la flora y fauna por lo que es crucial proponer alternativas de solución para su degradación y descontaminación en beneficio de la salud humana y de todo ser viviente, así mismo , no se sabe que micromicetos se encuentra en el botadero de Cancharani que tenga acción degradativa frente al polietileno ni los factores condicionantes para una

mayor capacidad biodegradadora; razón por la cual se realizó el presente trabajo de investigación con las siguientes interrogantes:

2.2 Enunciado del problema

- ¿Qué tipo de hongos filamentosos tienen capacidad biodegradativa frente al polietileno?
- ¿En qué condiciones de pH y temperatura los hongos filamentosos logran la mayor actividad biodegradativa frente al polietileno?

2.3 Justificación

A partir de los resultados, proponer indicadores que relacionan la propagación de enfermedades de salud pública producida por RPP contaminantes causadas por el uso de bolsas plásticas, ya que al momento existe evidencia científica de las afecciones de la salud en relación directa con los residuos plásticos y es importante conocer los efectos benéficos que pueden ejercer los microorganismos sobre el polietileno al emplearlo como fuente de carbono para disminuir el impacto negativo que produce este xenobiótico; plantear alternativas para el tratamiento de este polímero con microorganismos identificados capaces de degradarlo, así mismo proporcionara conocimientos básicos para aislar, caracterizar e identificar hongos filamentosos nativos, comprensión de la acción de los microorganismos sobre el plástico de baja densidad y conservación de las mismas, servirá como base de investigación para los microbiólogos y científicos que necesitan participar en estudio de polímeros y continuar con estudios de identificación de hongos de otras zonas del Perú, que tienen el problema de los RSP.

2.4 Objetivos

2.4.1 Objetivo general

Determinar la capacidad biodegradativa del polietileno por hongos filamentosos.

2.4.2 Objetivos específicos

- Identificar hongos filamentosos con capacidad biodegradativa frente al polietileno.

- Determinar las condiciones de pH y temperatura donde los hongos filamentosos con capacidad biodegradativa logran mayor actividad degradativa frente al polietileno.

2.5 Hipótesis

2.5.1 Hipótesis general

Todos los hongos filamentosos aislados, tienen capacidad biodegradativa frente al polietileno.

2.5.2 Hipótesis específica

H1: *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* tienen capacidad biodegradativa frente al Polietileno.

H1: Los hongos filamentosos biodegradadores tienen mayor actividad degradativa frente al polietileno a 30°C y a un pH de 4.5

CAPÍTULO III

MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Lugar de estudio

3.1.1 Toma de muestras

Botadero de Cancharani, ubicado en el Departamento, Provincia y distrito de Puno, Comunidad de Cancharani; colinda con la zona denominada Utupallani, a unos 9.5 Km del centro de la ciudad, sobre la vía asfaltada Puno Laraqueri a una altitud de 3,995 msnm, se ubica sobre un terreno accidentado con zonas bajas y rodeado de cerros y quebradas.

Procesamiento de muestras: Laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional del Altiplano, Laboratorio de Micología del INS. Lima.

3.2 Población

Bolsas de plástico tipo chequera.

3.3 Muestra

Veinte bolsas de plástico (PEBD) 0.910-0.940 g/cm³

3.4 Método de investigación

La investigación es experimental.

3.5 Metodología

3.5.1 Identificación de hongos filamentosos con capacidad de Biodegradación del polietileno

La metodología utilizada para la identificación de hongos filamentosos con capacidad de biodegradación del polietileno se realizó en cuatro fases: F. de campo, F. pre analítica, Analítica y F. post analítica.

Materiales y equipos. Microscopio óptico compuesto y de epifluorescencia, autoclave, Incubadora de 22 y 30°C, refrigerador, destiladora de agua.

Reactivos.- Azul algodón de lactofenol, KOH al 10%. Medios de cultivo: agar de sales minerales (ASM) (Fontanela *et al.*, 2003) compuesto de (g.l⁻¹), MgSO₄(7H₂O), 0.5g; KH₂PO₄, 0.5gr; Na₂HPO₄(12H₂O), 2.52g; NH₄Cl, 1gr; CaCl₂, 0.002gr; MnSO₄(7H₂O), 0.007gr; FeSO₄(7H₂O), 0.001gr y ZnSO₄(7H₂O), 0.007g, agar 20gr.+ 3% de extracto de levadura, agar Sabouraud glucosado. Caldo concentrado de Czapek;

MgSO₄(7H₂O), 0.5g; KH₂PO₄, 0.5gr; Na₂HPO₄(12H₂O), 2.52g; NH₄Cl, 1gr; CaCl₂, 0.002gr; MnSO₄(7H₂O), 0.007gr; FeSO₄(7H₂O), 0.001gr y ZnSO₄(7H₂O), 0.007g - (Koneman, 2005).

a. Fase de campo

La fase de campo se realizó en el botadero de Cancharani de la ciudad de Puno en los meses Febrero a Marzo 2018, se seleccionó 20 muestras de residuos sólidos plásticos que contenían residuos contaminantes que fueron tomados de 20 a 50 cm de profundidad en diferentes puntos seleccionados por conveniencia, luego se colocaron en bolsas plástico de primer uso y se trasladó a laboratorio de Microbiología de la Facultad de Ciencias Biológicas para su procesamiento (Méndez, 1998).



Figura 6. Botadero de Cancharani-Puno

b. Fase pre analítica

b.1. Preparación de muestras y medios de cultivo

La preparación del material fungible se realizó en el laboratorio de acuerdo a las normas microbiológicas, estandarización de equipos (incubadora y autoclave), luego se preparó los, medios de cultivo como son agar Czapeck dox (ASM) a pH 5 con adición de extracto de levadura al 3%, agar papa dextrosa (APD) y agar Sabouraud glucosado.

Seguidamente, se sacó las muestras en recipientes estériles, se lavaron con solución salina al 0.85% quitando todos los residuos posibles hasta que quede sin adherencias, se enjuago con agua destilada estéril, luego se fraccionaron y finalmente se colocaron en una solución de cloranfenicol a una concentración de 0.5 mg/ml durante 60 minutos y fueron enjuagadas con agua destilada estéril durante 20 minutos (Mendez y Vergaray, 2013).

c. Fase analítica

Se fraccionaron las muestras en cuadrados de 1cm x1cm previamente secadas y se sembraron en placas con agar ASM Dox +extracto de malta al 3% y ASabG; se incubo a 22°C por 20 días (Mendez y Vergaray, 2014).

Se tomó una muestra del consorcio de hongos de las placas Petri y se realizaron diluciones seriadas; se sembraron en agar papa dextrosa (PDA) a pH5, y se

incubaron a 37°C por 48 horas, para obtener cultivos puros (Koneman y Bonifaz, 2014).

Después de la incubación correspondiente se realizó la lectura macroscópica que permitió caracterizar y tipificar el género y supuesta especie, de colonias de hongos filamentosos, según tablas de caracterización.

Al mismo tiempo se realizó la técnica del micro cultivo en porta objetos colocando el hongo axénico en la orilla del círculo del AsabG y luego se colocó las laminillas (Koneman, 2005) la placa contenedora contenía papel filtro estéril y se incubó a temperatura de 22 °C ,durante 24 horas, seguidamente se realizó la confirmación e identificación de la lectura de los órganos de fructificación en microscopio óptico compuesto y epifluorescencia con filtro azul ,emisión de 490 nm, con apoyo de las claves taxonómicas (Guevara, Kóneman y Zurita, 2017).

Las cepas de hongos filamentosos se mantuvieron viables para su posterior utilización (Rico *et al.*, 2004 y Zurita *et al.*, 2017).

d. Fase post analítica

Esta fase corresponde a las lecturas finales y de confirmación, se utilizó las tablas de comparación para describir las características macro morfológicas a partir del agar Sabouraud y ASM.

Tabla 1
Caracterización macro morfológica y micro morfológica de hongos filamentosos

Hongos	Macromorfología	Micromorfología
<i>A.flavus</i>	<p>Anverso: tamaño ilimitado, tiende a cubrir todo el medio;</p> <p>color: verde paico, amarillento, con un halo micelial blanco;</p> <p>forma y aspecto: plana, polvosa y aterciopelada.</p> <p>Reverso: no presenta pigmentos</p>	<p>Micelio macrosifonado (2-4 μm), septado y hialino. Reproducción anamorfica: a base de microconidios redondos de 2-3.5 μm, equinulado estructuras, cabeza aspergilar, dos series de esterigmas (biseriado).</p>
<i>A. niger</i>	<p>Anverso: ilimitado, tiende a cubrir todo el medio;</p> <p>color: al inicio (1 a 2 días) forma una colonia blanca amarillenta y luego se convierte a negra;</p> <p>forma y aspecto: polvoso; reverso: no presenta pigmentos.</p>	<p>Tipo de micelio: el micelio nutritivo es macrosifonado (2-4 μm), septado y hialino; el reproductivo pocas veces septado y hialino.</p> <p>Microconidios redondos de 2-5 μm. estructuras especializadas: la cabeza aspergilar.</p>
<i>A.fumigatus</i>	<p>Anverso: tamaño ilimitado, tiende a ocupar todo el medio;</p> <p>color: verde, con un halo micelial blanco y en ocasiones rosa,</p> <p>forma y aspecto: plana, polvosa, aterciopelada y seca.</p> <p>Reverso: no presenta pigmentos.</p>	<p>Macrosifonado (2-4 μm), tabicado y hialino. Reproduccion por microconidios redondos de 2-5 μm;</p> <p>cabeza aspergilar mide de 30-50 μm; está compuesta por vesícula semirredonda.</p>
<i>Mucor sp.</i>	<p>Anverso. Tamaño ilimitado, tiende a ocupar toda la placa y se le conoce como levanta tapas, aspecto lanoso de color mate brillante, no presenta pigmentos, excepto cuando el cultivo envejece.</p>	<p>Tipo de micelio: Lanoso.</p> <p>Reproducción: por anamórfica.</p> <p>Producción de esporangiosporas.</p> <p>Estructura especializada por cabeza de esporangio.</p>
<i>Fusarium sp.</i>	<p>Anverso: Color blanquecino crecimiento ilimitado.</p> <p>Color: en un inicio (1 a 3 días) es blanca, para tornarse en tonalidades naranja, café o violeta- lila. Velloso- seca. Reverso: presenta color naranja o violeta, difusible al medio.</p>	<p>Tipo de micelio: macrosifonado de 1-2 μm, septado y hialino;</p> <p>Micelio: las hifas se organizan en coremium.</p>

Fuente: Guevara *et al.*, 2007, Zurita *et al.*, 2017).

Tabla 2

Claves taxonómicas para la identificación de aspergillus spp. Desarrollados en ASbG

Especie	Color de colonia (superficie)	Disposición esterigmas	Textura
A. fumigatus	Verde-azul oscuro	1	Aterciopelada, afelpada
A. flavus	Verde claro	1-2	Rugoso y lanoso
A. niger	Negro	2	Granular
A. terreus	Marrón claro	2	Velosa, aterciopelada

Fuente: Zurita *et al.* (2017).

Tabla 3

Tabla utilizado para calificar la actividad degradadora de los micromicetos degradadores de polietileno

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

Fuente: Zurita *et al.*, 2017.

3.5.2 Determinación de las condiciones de pH y temperatura donde los hongos bfilamentosos logran mayor actividad frente al polietileno

La determinación de las condiciones de pH y T° donde los hongos filamentosos logran mayor actividad degradativa frente al polietileno se realizó con cepas axenicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*, mediante la prueba cualitativa y cuantitativa de la degradación del polietileno, después de los 60 días de incubación.

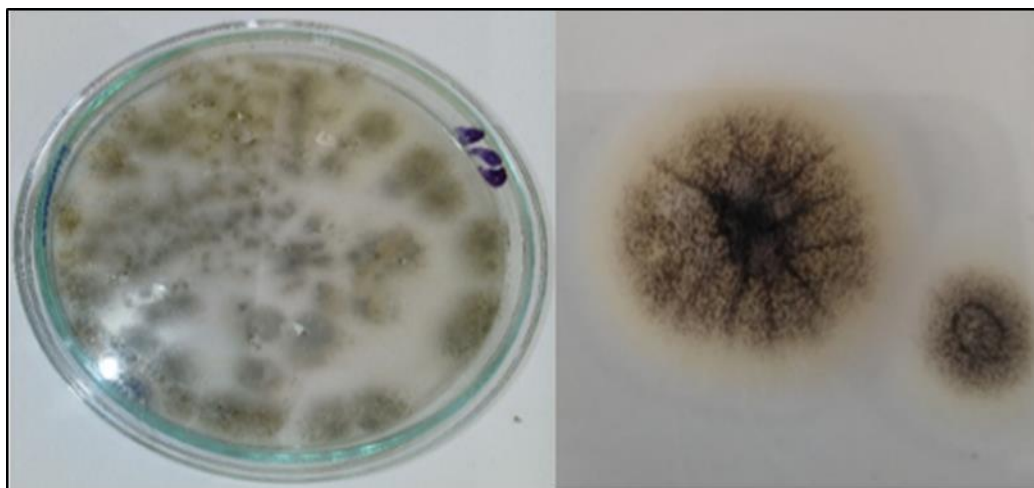


Figura 7. Cepas axénicas de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus niger*

Prueba cualitativa del LPDE.- Esta evaluación se realizó mediante la observación al estereoscopio y descripción de los cambios que presento en cuanto refiere a la pérdida de color, brillo, presencia de porosidad, fisuras o grietas en las superficies crecimiento sobre y debajo de la superficie, presencia de biopelículas.

Prueba cuantitativa de la degradación del LPDE Para realizar esta prueba, se ha realizado en las siguientes fases:

a. Fase pre- analítica

1. Se procedió nuevamente a fraccionar el material plástico en cuadrados de 2 X 2 y se pesaron en balanza analítica (Kavelman, 1978).
2. De los hongos filamentosos mantenidos viables , se seleccionó a *Aspergillus niger* y *A. flavus* y se preparó el inóculo mediante un barrido de la superficie del cultivo puro de cada cepa del APDS y se suspendió 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 un frasco conteniendo 100 ml de caldo Czapeck concentrado sin carbohidrato ni agar ; se ajustó el Ph a 4.5 .0 y otro a Ph 8.0 y como control se utilizó el CCSM sin polietileno con cepas fúngicas.

b. Fase analítica

1. Se colocaron el material plástico a cada frasco que contenía CCSM y la suspensión fúngica.

2. Luego se llevó a incubación in vitro a 20°C y 30°C durante 60 días , periódicamente se fueron agitando y observando el ataque fúngico (que significa actividad degradadora) (Méndez,1998) según el cuadro siguiente:

Tabla 4
Peso inicial para proceso de biodegradación

Medio de cultivo	Micromiceto	Incubación por 60 días.			
		T°	pH	P/I	P/F
C.czapeck	<i>A. niger</i>	20	4.5	0.024	
			8.0	0.026	
		30	4.5	0.027	
	8.0		0.024		
	<i>A.flavus</i>	20	4.5	0.030	
			8.0	0.037	
30		4.5	0.028		
			8.0	0.025	

Fase post analítica. Después de los sesenta días de incubación se separó el material plástico del CCSM, colocándolos en una luna de vidrio y se hizo las observaciones cualitativas :formación de biofilm, pérdida de color, brillo ,formación de porosidades; luego se desinfectaron para eliminar la película generado en la superficie con fluconazol durante 60 minutos ,luego se lavaron con agua destilada estéril , fueron secados con papel filtro y colocado a la estufa a 40°C por 15 minutos para que se encuentre seca y el pesaje sea un valor real.

Metodología estadística. Se determinó la frecuencia de hongos más frecuentes como también el crecimiento en masa con el test de Shapiro Wilk demostrando previamente que los datos provienen de una población normal, con la prueba de levene:

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median").

Luego se aplicó el estadístico no paramétrica, de Kruskal-Wallis, equivalente a ANOVA de la estadística paramétrica, para demostrar que no existe diferencia entre los grupos. Y para demostrar la eficacia de *A. flavus* y *A. niger* frente al polietileno a 20°C - 30°C y pH de 4.5-8.0; se realizó la prueba de normalidad de

Shapiro-Wilk normality test; $W = 0.9098$, $p\text{-value} = 0.0544$. Seguidamente se determinó si existe una diferencia significativa entre los grupos de hongos, según temperatura y pH, se realizó la prueba de comparación de medias de t-student y demostrar si los dos grupos no presentan diferencia significativa ($0.1058 > 0.05$). Se realizó un diseño factorial de 2×2 , considerando el factor A: El hongo dividido en dos niveles y el Factor B: el PH dividido en 2 niveles 4.5 y 8.

El modelo aditivo del diseño factorial es como sigue:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \beta_j + (\tau\beta)_{ij} + \xi_{ij} \quad ,$$

Donde

y_{ij} : Representa la observación correspondiente al nivel (i) del factor A y al nivel (j) del factor B.

μ : Efecto constante denominado media global.

τ_i : Efecto producido por el nivel i-ésimo del factor A.

β_j : Efecto producido por el nivel j-ésimo del factor B.

$(\tau\beta)_{ij}$: Efecto producido por la interacción entre $A \times B$

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Hongos filamentosos con capacidad biodegradativa frente al polietileno

Se aislaron cinco especies de hongos *filamentosos*: *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. fumigatus* *Mucor sp.* y *fusarium sp.*

Tabla 5

Frecuencia de hongos filamentosos aislados del botadero de Cancharani

	Frecuencia	Porcentaje	Crecimiento
<i>A. Niger</i>	14	46.67%	2.1
<i>A. flavus</i>	5	16.67%	1.8
<i>A. fumigatus</i>	5	16.67%	1.8
<i>Mucor, sp.</i>	4	13.33%	2.3
<i>Fusarium sp.</i>	2	6.67%	1.0

En la tabla 4 se observa que la mayor presencia en el aislamiento de hongos filamentosos es el *Aspergillus niger* con 46.67%, habiéndose aislado en 14 placas, seguida de *A. flavus* y *A. fumigatus* con 16.67% aislados en cinco placas en forma axénica y mixtas entre sí, respectivamente y en menor frecuencia el hongo *fusarium sp.* con un 6.67%.

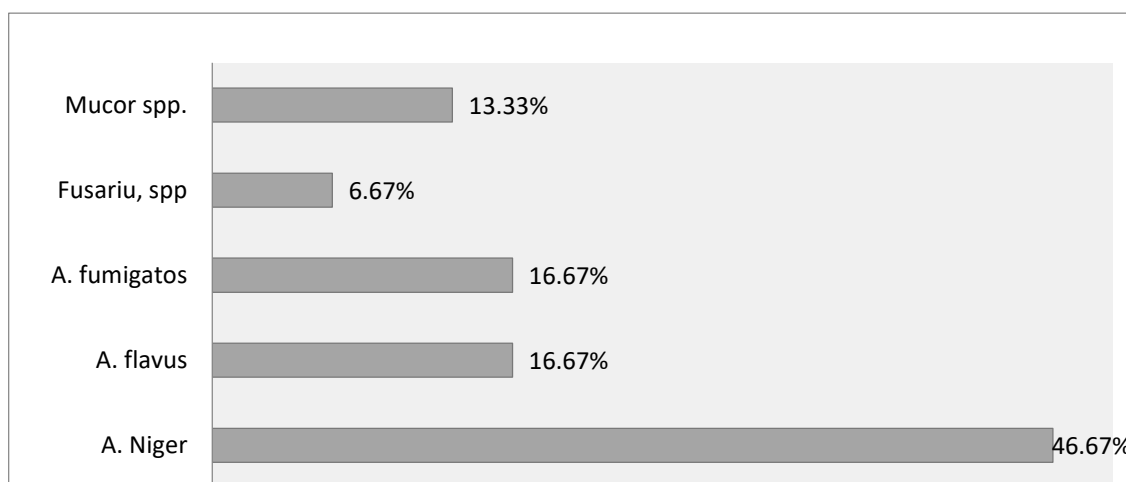


Figura 8. Hongos filamentosos según masa de crecimiento

Al figura 7 demuestra que *Aspergillus* tiene la mayor masa de crecimiento, representando un 23%, seguido de *A. fumigatus* y *A. flavus* del total y fusarium solamente un 6.7%.

Los géneros desarrollados en el botadero de Cancharani son comunes a los aislados en la zona porque son micromicetos contaminantes del medio ambiente de origen natural y son favorecidos por el incremento del polvo y las esporas fúngicas en el aire y su disposición en diferentes sustratos de humedad, oscuridad y temperatura, que facilitaron su desarrollo, estos hongos como eucariotas poseen un potente, versátil y adaptable maquinaria metabólica (enzima) capaz de digerir un gran número de sustratos orgánico como inorgánico propiciando el biodeterioro de los diferentes soportes como los plásticos (García y Sánchez, 2011).

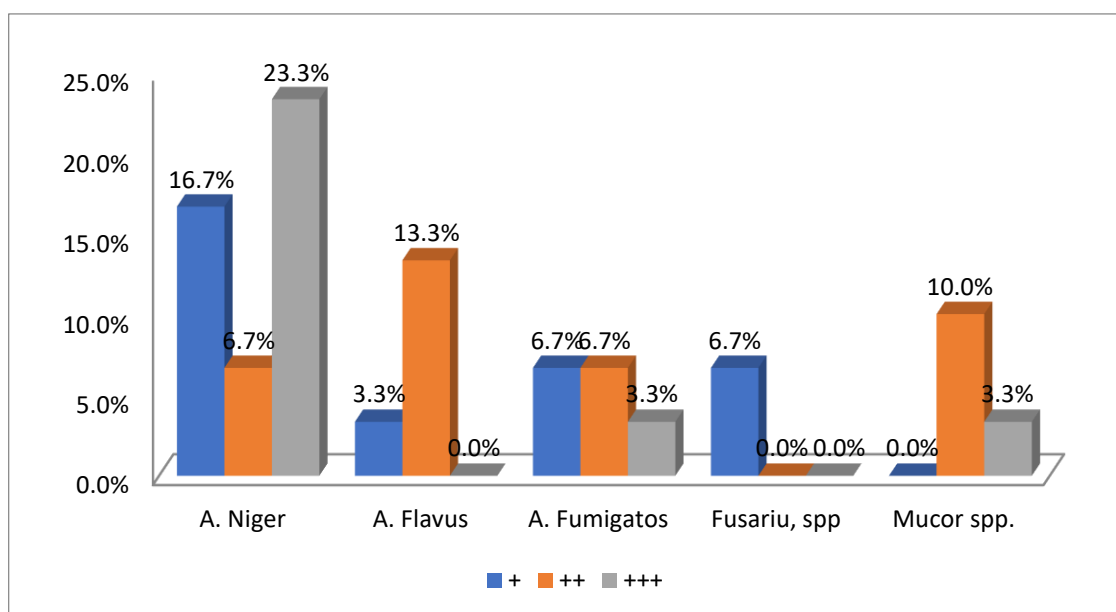


Figura 9. Frecuencia y promedio en masa de hongos filamentosos

La figura 8, muestra que *Aspergillus niger* es dominante en crecimiento frente a los demás hongos aislados, seguido de *A. flavus* y *A. fumigatus* y un crecimiento mínimo por parte de *Fusarium sp.* Estos hongos filamentosos, han sido favorecidos en su desarrollo y multiplicación en ASM más extracto de malta y para Microcultivo en agar dextrosa de saboraoud quienes proporcionaron los nutrientes para su desarrollo aislamiento e identificación respectiva.

Tabla 6

Actividad degradadora de hongos filamentosos frente al polietileno (ASM a 22°C, pH: 5)

Hongo aislados	Crecimiento	Calificación
1. <i>Aspergillus flavus</i> .	+ +++ abundante en todo el plástico	Muy buena
2. <i>Aspergillus niger</i>	+++ moderado en todo el plástico	Buena
3. <i>Aspergillus fumigatus</i> 4. <i>Fusarium spp</i>	++ moderado en la parte inferior y media del p. + + Moderado en la parte inferior y media del p.	Regular Regular.
5. <i>Mucor spp</i>	+ en la parte inferior del plástico	Pobre

En la tabla 6 los resultados obtenidos reflejan una calificación muy buena para el hongo *Aspergillus flavus* que tuvo un crecimiento abundante sobre y debajo del material plástico seguido de *A. niger* que tuvo una calificación buena, el cual tuvo crecimiento bueno por debajo y laterales del plástico y un crecimiento regular *Aspergillus fumigatus* y *Fusarium sp.* y pobre *mucor sp*, lo más resaltante es que si hubo formación de colonias fúngicas pero en diferentes escalas de calificación, y al haber presencia de micelas fúngicas de hongos en el material plástico se demuestra que si hubo ataque fúngico muy bueno por parte de *A. flavus*, pese a que este hongo desarrollo solamente en cinco placas, seguido de *A. niger* que este desarrollo en catorce placas y con mayor masa fúngica, lo cual indica que si son biodegradadores pero en diferentes escalas de calificación; el desarrollo de estas cepas se debe a que estos son colonizadores activos de los polímeros capaces de adherirse a un sustrato 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 tal como lo sustentan (Whitekettle, 1991).

Los resultados encontrados son parecidos a los que menciona Uribe *et al.* (2010) que los géneros con mayor número de aislamientos y mayor frecuencia son *Aspergillus*, *Penicillium*, *mucor* y *cladosporium*, también lo corrobora (Méndez *et al.*, 2013 y Vergaray, 2013) que los hongos que aislaron de un relleno sanitario el zapallal, lima, fueron los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, y *Nigrospora*; también Johnson *et al.* (1993) menciona que 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, en cambio Cuevas y Manaligod (1997) demostraron la misma actividad en cepas de *Penicillium*, *Aspergillus* y *Mycelia sterilia*.

El empleo de plásticos está aumentando en la vida del hombre y la presión sobre la capacidad para disponer de los plásticos de desecho; de manera que la fabricación de plásticos biodegradables y la biodegradación de los plásticos de desecho han incrementado su importancia (Ying y Ernest, 2005).

Existe una clara necesidad de entender y apreciar no solo las capacidades de descomposición de los hongos, sino también los entornos necesario para extraerlos; no todos los hongos distribuidos en la naturaleza en este caso el botadero de Cancharani son necesarios para descomponer la materia inorgánica en la naturaleza ,puede seleccionarse y aplicarse para obtener el mayor éxito. Un estudio en 1978 probó esta teoría usando varios hongos en sucesión para degradar poliépsilon caprolactona con resultados positivos (Kavelman, 1978).

Se concluye que los hongos filamentosos más frecuentes en el botadero de cancharani son *A.flavus*, *A.niger*, *A.fumigatus*, *Mucor sp* y *fusarium sp*. demostrándose con mayor masa de crecimiento al *Aspergillus niger* seguido de *Aspergillus flavus*, *A.fumigatus* *mucor sp* y *fusarium sp*. de acuerdo a los resultados obtenidos en la escala de calificación se demuestra que *Aspergillus flavus* es el hongo que demuestra mayor ataque fúngico que indica ser muy buen degradador del polietileno a 20°C y un pH 4.5 seguido de *aspergillus niger* calificado como buen degradador . Estadísticamente por la cantidad de datos al aplicar la prueba de Shapiro wilk,y la prueba de levene se rechaza la hipótesis nula, ya que la probabilidad (0.0001453) es menor al nivel de significancia ($\alpha=0.05$).

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")

<i>Df</i>	<i>F value</i>	<i>Pr (>F)</i>
<i>group 3</i>	<i>2.9701</i>	<i>0.05197 . 24</i>

*Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1*

Por lo tanto se confirma que hay homogeneidad de varianzas; al realizar la prueba de Kruskal – Wallis *rank sum test*

Kruskal-Wallis chi-squared = 1.4781, df = 3, p-value = 0.6873

Se observa que la probabilidad (0.6873) es mayor al nivel de significancia (0.05), el cual confirma la Hipótesis nula, es decir, que no hay diferencia significativa entre los grupos, concluyendo que todos los hongos filamentosos tienen capacidad degradativa frente a polietileno confirmándose estadísticamente la hipótesis planteada.

4.2 Condiciones de pH y temperatura donde los hongos filamentosos logran mayor actividad degradativa frente al polietileno

Resultados cualitativos del (LPDE) Después de dos meses de incubación, (60 días) se observó que el hongo *Aspergillus flavus* presenta una invasión masiva ,demostrando un ataque fúngico por encima y debajo del material plástico muy pronunciado al mismo tiempo formo una biopelícula gruesa con aspecto gelatinoso demostrando así la gran capacidad que tienen para adherirse al material plástico y su acción deteriorante; en cambio *Aspergillus niger* tuvo un ataque fúngico por debajo y los laterales del material plástico y formo el biofilm más delgado que *A. flavus* pero si se observa el aspecto gelatinoso formado ,característico de ataque fúngico, esta fase observada por los dos hongos resalto la importancia de esta investigación, así mismo; observándolas al estereoscopio perdieron el poco brillo que tenían e inclusive se observó falta de coloración algunos había formado un poco de porosidad ,la evaluación realizada en esta prueba confirma cambios visibles en los plásticos, lo cual demuestra un proceso metabólico de biodegradación.

El parámetro de cambios en la observación puede ser utilizado como un primer indicador de ataque fúngico, para obtener resultados cualitativos (Ishigaki *et al.*, 2011). Así mismo; la formación de películas sobre el plástico es un indicador de degradación indica Uribe

et al. (2010) en esta etapa utilizando solamente MCSM +el PEBD se pudo observar el desarrollo de las micelas y una biopelícula formada en la superficie por debajo y encima del PEBD, como se muestra en las fotos ,sobre ataque fungico (formación de miscelas sobre, debajo y laterales de *A. flavus* y *A. niger*).

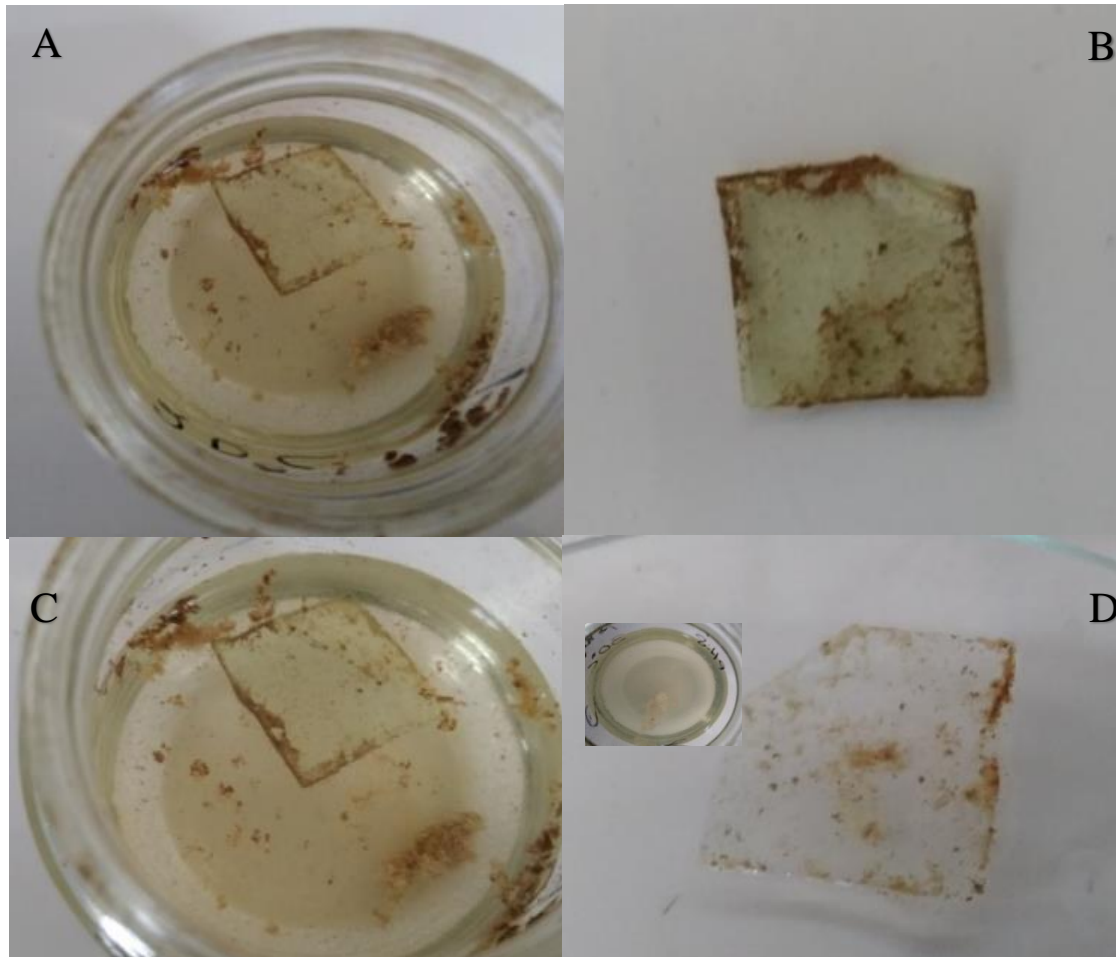


Figura 10. Resultados cualitativos después de los 60 días a T° de 20°C y 30°C y pH de 4.5 y 8.0

A= *Aspergillus Flavus*

C= *Aspergillus niger*.

B= *Biopelícula*

D= *Biopelícula*

Prueba cuantitativa de LPDE se observó que después de sesenta días de incubación en la cual se ha utilizado el plástico como única fuente de carbono en el CCSM, se realizó primeramente la comparación de pérdida de peso entre los hongos como población normal.

Tabla 7
Condiciones de pH y temperatura donde los hongos filamentosos logran mayor actividad frente al polietileno

Medio de cultivo	Micromiceto	Incubación por 60 días (2x2)			
		T°	pH	P/I	P/F
CCSM	<i>A. niger</i>	20	4.5	0.024	0.0152
			8.0	0.026	0.023
		30	4.5	0.027	0.0178
			8.0	0.024	0.0213
	<i>A. flavus</i>	20	4.5	0.030	0.0165
			8.0	0.037	0.0282
		30	4.5	0.028	0.0159
			8.0	0.025	0.0221

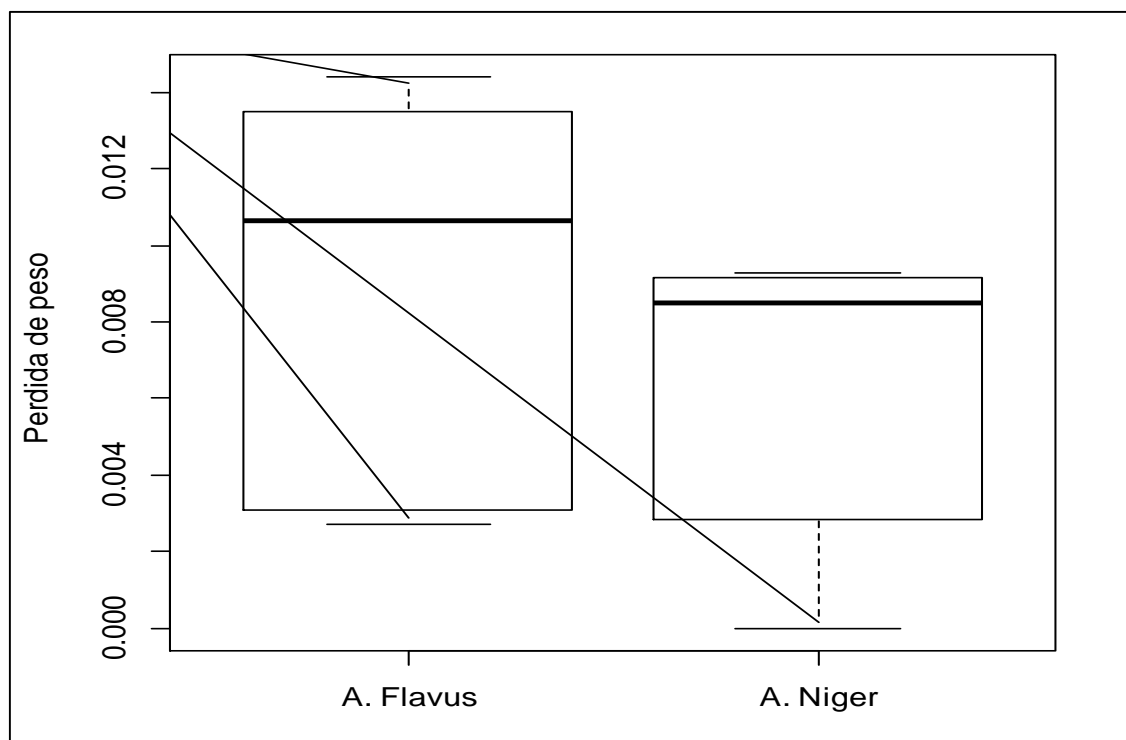


Figura 11. Población normal entre los hongos A. Flavus y A. Niger

En la figura 10, se demuestra que los datos provienen de una población normal considerando como variable respuesta la degradación del plástico según los hongos (*A. Niger* y *A. Flavus*) a una temperatura (20 °C y 30 °C) y pH (4.5 y 8), se aplica la prueba de shapiro -wilk test, resultando $W= 0.9098$, $Pv =0.0544$; ($p\text{-valor} = 0.0544 >0.05$).

Considerando la temperatura.-La comparación de medias en ambos hongos filamentosos frente al plástico la comparación de medias de t-student, considera que los dos hongos no presentan diferencia significativa, por el resultado y se confirma la hipótesis nula dado que la p-v, es mayor que el nivel de significancia ($0.1058 > 0.05$).

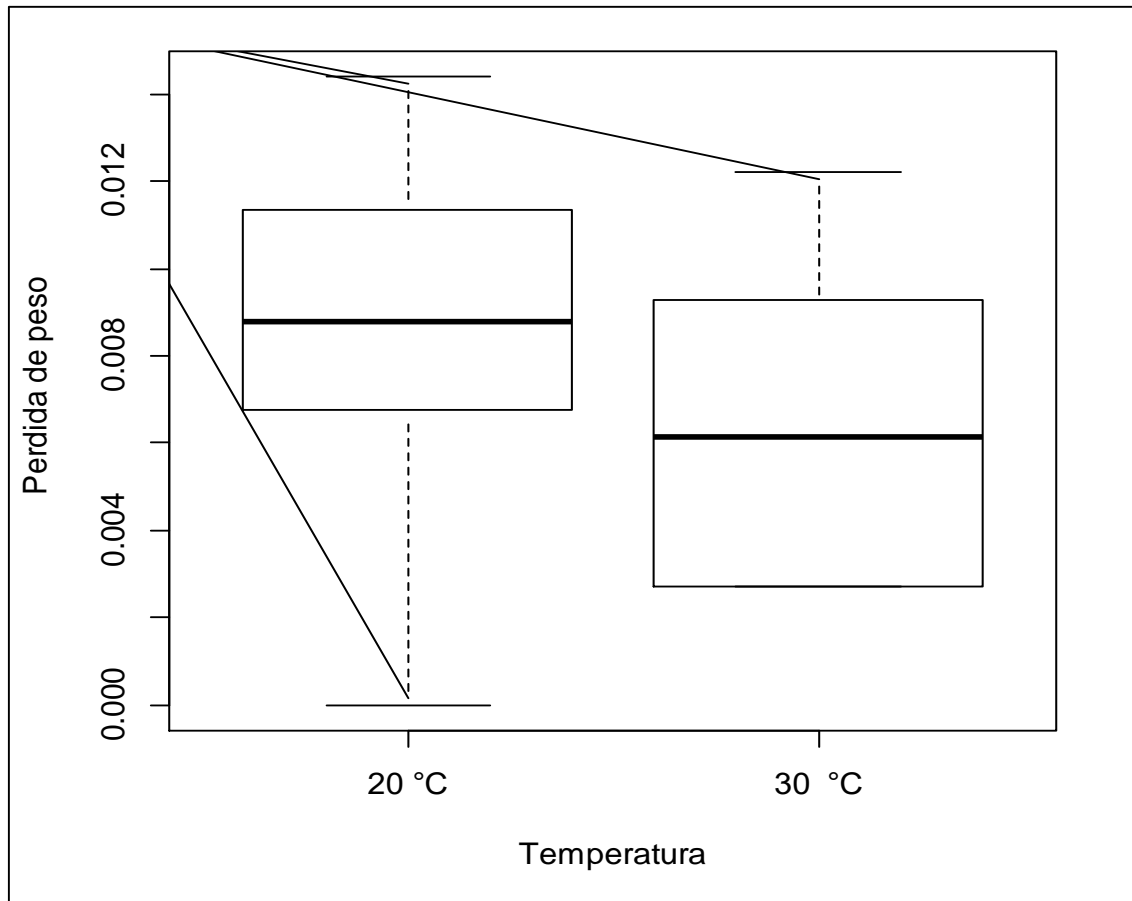


Figura 12. Biodegradación de hongos a temperaturas de 20 °C y 30 °C

La prueba de t de student como prueba de comparación en la biodegradación a 20°C y 30°C nos indica que los dos hongos no presentan diferencia significativa dado que el p-valor es mayor que el nivel de significancia ($0.3127 > 0.05$), por lo tanto la temperatura estadísticamente es indistinto, se puede utilizar temperaturas fluctuantes entre 20 y 30°C.

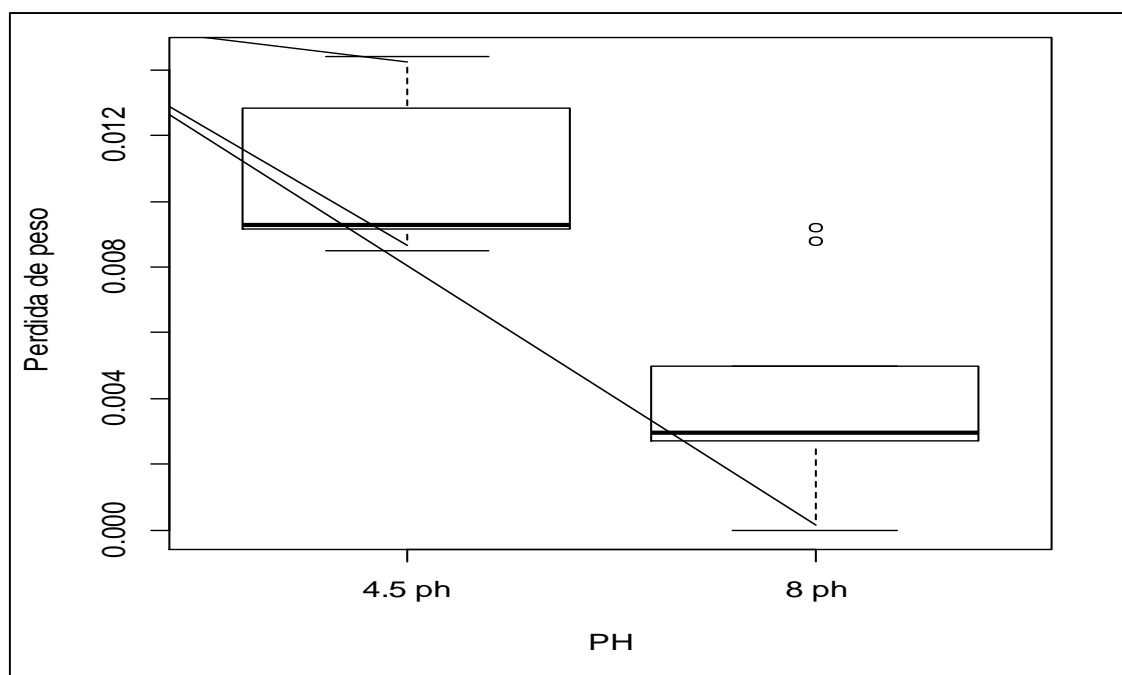


Figura 13. Biodegradación de hongos a PH 4.5 y 8 Considerando el pH

Se demuestra que los datos provienen de una población normal (por la prueba de normalidad de Shapiro Wilk) al aplicar el diseño factorial de 2x2, considerando el factor A: el hongo dividido en dos niveles y el Factor B: el PH dividido en 2 niveles 4.5 y 8. Se afirma que los efectos producidos por los hongos *A. niger* y *A. flavus* son significativos.

Tabla 8
De análisis de varianza

	Df	Sum Sq	Mean Sq ..	F value	Pr(>F)	
FactorA_hongos	1	5.21E-05	5.21E-05	14.21	0.00153	**
FactorB_ph	1	2.62E-04	2.62E-04	71.56	1.69E-07	***
FactorA_Bacteria:FactorB_ph	1	3.19E-06	3.19E-06	0.87	0.36412	
Residuals	17	6.23E-05	3.67E-06			

Sin embargo la interacción de las factores A y B no son significativos, por lo tanto podemos afirmar que existe diferencia significativa entre los hongos *A. Flavus* y *A. Niger*, también que existe efecto el nivel de PH y los niveles 4.5 y 8 son diferentes significativamente por lo tanto podemos observar que el hongo *A. Flavus* es mejor degradador en comparación con *A. Niger*, la degradación es más significativo en un pH de 4.5 como se observa en la gráfica.

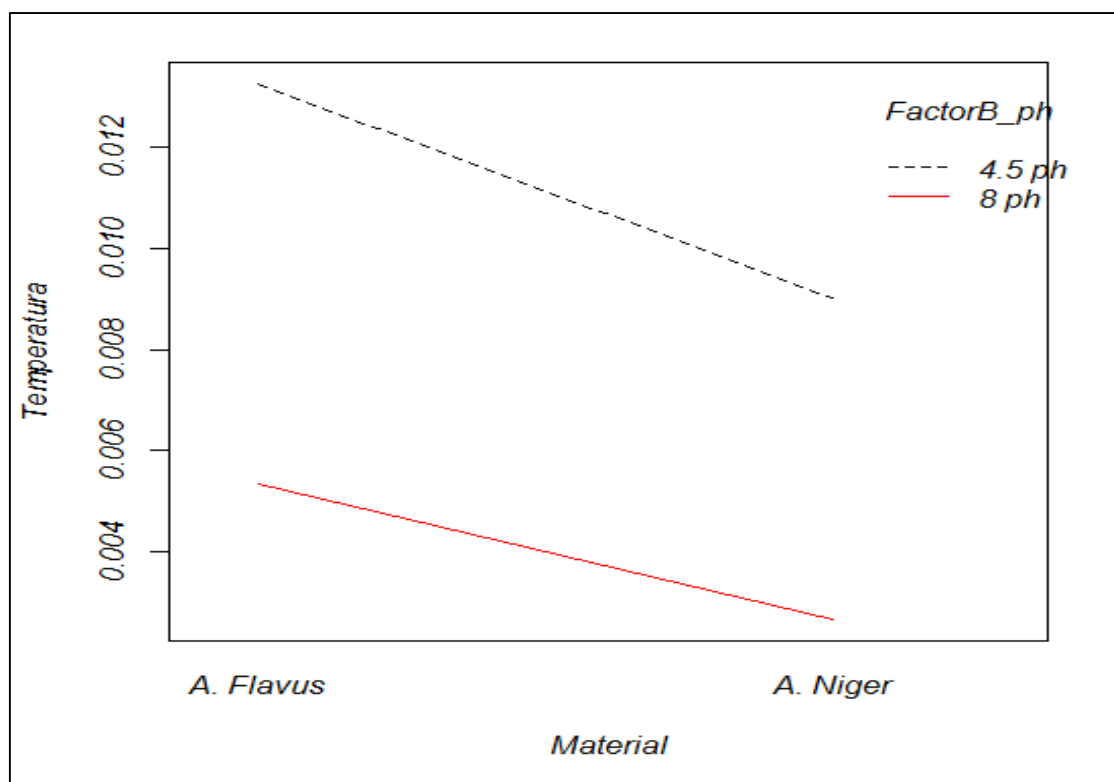


Figura 14. Interacción hongo - pH

Los resultados obtenidos son parecidos a los reportados por Méndez *et al.*, (2003) quienes obtuvieron mayor degradación a 20°C y a un pH de 4.5 y *Aspergillus flavus* demostró ser regular degradador de polietileno, y a 30°C *Aspergillus flavus* demostró ser buen degradador. Coinciden con los reportados por Méndez *et al.*, (20013), Limón (2001) quienes sustentan que hubo mayor rendimiento a 30°C, sin embargo Uribe *et al.* (2010) obtuvieron una mayor actividad degradadora a 20°C y a un pH 5 parecidos con los resultados manifestados en la presente investigación, La temperatura y el pH son parámetros que pueden influir tanto en el crecimiento como en la degradación del polímero.

Uribe Giraldo indica que el porcentaje de peso perdido obtenido mediante el empleo de las levaduras y los hongos aislados fue de 4.8%(pH 5,5), que si bien es menor, es un resultado significativo para las condiciones en las que se desarrolló la prueba. Méndez *et al.*, (2013) y Vergaray (2013) evidenciaron 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, una cepa de la especie *Aspergillus flavus* demostró ser regular degradador frente al material plástico. La cepa de *A. flavus* demostró ser buena degradadora de polietileno en

las condiciones ensayadas. De acuerdo a lo mencionado por 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. Cuevas y Manaligod (1997) demostraron la misma actividad en cepas de *penicillum*, *Aspergillus* y *Mycelia sterilia*.

La evaluación observada confirma los cambios visibles en los plásticos que es un método semicuantitativo que así mismo los efectos utilizados para describir la degradación incluyen corrosión de la superficie, la formación de agujeros la fragmentación e inclusive la decoloración y la formación de biopelículas en la superficie; estos cambios nos demuestran un proceso metabólico de biodegradación, el parámetro de cambios en la observación puede ser utilizado como un primer indicador de ataque fúngico, este método también puede ser utilizado para obtener resultados cualitativos (Ishigaki *et al.*, 2004) el empleo de plásticos está aumentando en la vida del hombre y está aumentando la presión sobre la capacidad para disponer de los plásticos de desecho; de manera que la fabricación de plásticos biodegradables y la biodegradación de los plásticos de desecho han incrementado su importancia (Ying y Ernest, 2005).

CONCLUSIONES

- Los hongos filamentosos más frecuentes en el botadero de Cancharani son *A.flavus*, *A.niger*, *A.fumigatus*, *Mucor sp* y *fusarium sp*. demostrando mayor masa de crecimiento *Aspergillus niger* (64.67%) seguido de *Aspergillus flavus*, *A.fumigatus* (23%) *mucor sp* 16.67% y *fusarium sp.con* 6.7%, todos tienen capacidad biodegradativa frente al polietileno en diferentes escalas de calificación.
- Según las condiciones de pH, *A. flavus* es un buen degradador de polietileno a un pH de 4.5 formando biopelícula gruesa con aspecto gelatinoso y tiene capacidad para adherirse al polietileno a diferencia de *A. niger* que forma biofilm más delgado y según la temperatura ambos hongos tienen capacidad biodegradativa a 20 y 30°C.
- La temperatura y el pH son parámetros que influyen en el crecimiento y la biodegradación del polietileno.

RECOMENDACIONES

- Optimizar el tiempo de incubación (más de dos meses) y determinar las enzimas que participan en la biodegradación de muestras plásticas, con otro tipo de material plástico y complementar el estudio de hongos basados en la Biología molecular.
- Retratamientos físico y químicos que favorezca la oxidación y ruptura de cadenas poliméricas del material plástico de baja densidad para facilitar el ataque fúngico en la biodegradación.
- Seguir investigando a los hongos filamentosos que forman biofilm y su capacidad deteriorativa, en otras zonas del Perú.

BIBLIOGRAFÍA

- Abarca, L. (2000). Taxonomía e identificación de especies implicadas en la *Aspergilosis nosocomial*. *Rev. Iberoamericana de Micología*, 17, S79-S84.
- Acuña, R. (2017). *Revisión bibliográfica sobre los microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material*. (Tesis de pregrado). Universidad Distrital Francisco José de Caldas, Bogotá.
- 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.
- Albertsson, C. y Karlsson, S. (2008). The three stages in degradation of polymers-polyethylene as a model substance. *Journal of Applied Polymer Science*.
- Alexopoulos, J. y Mims, C. (1979). *Introductory Mycology*. (30° ed.). España: Jhon Wiley.
- Alka, G. (2015). Polythene and environment. *International Journal of Environmental Sciences*, 5(6), 1091-1105.
- Alpízar, C. (2015). Presencia de Hongos y contaminación con micotoxinas en ensilajes para alimentación de rumiantes. *Rev veterinaria*, 33 (1) (7-31).
- Ammala, A., Bateman, S., Dean, K., Petinakis, E., Sangwan, P. & Wong, S. (2011). *An overview of degradable and biodegradable polyolefins*. *Progress in Polymer Science*, 36.
- Arenas, R. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. (5ta. ed.). México D.F.: Mc.graw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- Atagana, H. (2004). Biodegradation of phenol, o-cresol, m-cresol and p-cresol by indigenous soil fungi in soil contaminated with creosote. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20(8), 851–858.

- Battocletti, A. (2011). Controversias de la toxicidad crónica de los plásticos. *Revista Tendencias en Medicina*. Montevideo, Uruguay.
- Bisphenol, A. (2011). *Estado actual de los conocimientos y medidas futuras de la OMS y la FAO*. Retrieved from http://www.who.int/foodsafety/fs_management/No_05_Bisphenol_A_Nov09_sp.pdf.
- Bonifaz Trujillo A. (2014). *Micología Médica Básica* (4ta ed.) México. Mac Graw - Hill. Interamericana Editores, S.A .de C.V.2014..
- Bonifaz, A. (2014). *Micología Médica Básica*. (4ta ed.). México: Mac Graw - Hill. Interamericana Editores, S.A .de C.V.
- Brown, L., Bursten, B. y Burdge, J. (2004). *Química: La ciencia central*. (9na ed.). EE.UU.: *Person Educación*.
- Bueno, L. y Gallardo, R. (1998). Preservación de hongos filamentosos en agua destilada estéril. Instituto Cubano de los derivados de la Caña de azúcar, Ciudad de la Habana Cuba ICIDCA. *Revista Iberoamericana*, 15, 166-168.
- Carnevalli, M. y Hechicera, L. (2002). *Plásticos y medio ambiente*. Argentina.
- Carwile, J. y Michels, K. (2011). Urinary bisphenol A and obesity: NHANES 2003 – 2006. *Environmental Research*, 111, 825-830.
- Castrillón, L., Ramos, A. y Padilla, M. (2013). Biopelículas fúngicas. *Dermatolg Rev. Mex*, 57, 350-361.
- Cortez, J. y Mosqueda, T. (2013). Una mirada a los organismos fúngicos: fabricas versátiles de diversos metabolitos, secundarios de interés biotecnológico. *Química Viva*, 12(2), 64-90.
- Corti, A., Muniyasamy, S., Vitali, M., Imam, SH. y Chiellini, E. (2010). Oxidation and biodegradation of polyethylene films containing pro-oxidant additives: Synergistic effects of sunlight exposure, thermal aging and fungal biodegradation. *Polymer Degradation and Stability*. 95, 1106-1114.
- Cuevas, C. y Manaligod, C. (2001). Isolation of decomposer fungi with plastic degrading ability. *Philippine Journal of Science*, 126, 117-130.
- ECOEMBES (2007). *Informe deed*. Buenos Aires: Universidad Politécnica de Madrid.
- Ecomundo (2016). *Espacio de comunicación sobre el medio ambiente y desarrollo sostenible a nivel nacional e internacional*. Retrieved from <http://www.revistaecomundo.com/edu.mx/online/619-albores,micotoxinas .pdf>.

- Eggins, W., Mills, J., Holt, A. y Scott, G. (1971). Biodegradation and biodegradation of Synthesis polymers. IM. Syker, G. y Skinner, A. (Editors). Microbial Aspects of pollution. *The Society for applied bacteriology*. Symposium (1).
- Erler, Ch., Novak, J., Bisphenol, A. (2011). Exposure: Human Risk and Health Policy. *Journal of Pediatric Nursing*, 25, 400-407.
- FAO/WHO (2011). Expert meeting to review toxicological and health aspects of bisphenol A: final report, including report of stakeholder meeting on bisphenol A, 1-5 November 2010, Ottawa, Canada. *I. World Health Organization*. Retrieved from http://whqlibdoc.who.int/publication_97892141564274_eng.pdf.
- Fontanella, S., Bonhomme, S., Kountny, M., Husarova, L., Brusson, J. M., Courdavault, J. P., Pitteri, S., Samuel, G., Pichon, G., Lemaire, J., & Delort, A. M. (2010). Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability*, 95, 1011-1021.
- Frutis, I. y Huidobro, E. (2009). Micología básica, manual teórico-práctico. FES-Istacala, UNAM. México. *Rev. Perú. Biol.* 13(3), 203 – 205.
- García, M. y Sánchez, R (2012). Estudio de la concentración fúngica aérea de los depósitos del archivo municipal de Cárdenas, Cuba. *Revista dela sociedad Venezolana de Microbiología*, 32, 37-43.
- Guevara, M., Urcia, F. y Casquero, J. (2007). *Manual de procedimientos y técnicas de laboratorio para la identificación de los principales hongos oportunistas causantes de micosis humanas*. Lima: Instituto Nacional de Salud; MINSA-PERU. Serie de Normas Técnicas N. ° 44. 59-100.
- Gutiérrez Pescador, G. (2013). *Biodegradación del polietileno de baja densidad por consorcios microbianos* (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Autónoma de México, México.
- Gutiérrez, S., Casquero, J. y Martin, F. (2000). Los hongos como factorías celulares biodiversidad de metabolitos secundarios. *Revista iberoamericana de Micología* 17, S54-S60.
- Huang, Y., Wong, C., Zheng, J., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L., & Wong, M. H. (2011). Bisphenol A. (BPA) in China: A review of sources, environmental levels, and potential human health impacts, *Environment International*, 42, 91-99.

- Husarova, L., Machovsky, M., Gerych, P., Houser, J. y Kountny, M. (2010). Aerobic biodegradation of calcium carbonate filled polyethylene film containing prooxidant additives. *Polymer Degradation and Stability*. 95, 1794-1799.
- Ishigaki, T., Sugano, W., Ike, M. y Fujita, M. (2011). Enzymatic degradation of cellulose acetate plastic by novel degrading bacterium *Bacillus* sp. S2055. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 90(4), 400-405.
- Johnson, E., Pometto, L. y Nikolov, L. (1993). Degradation of degradable Starch-Polyethylene Plastics in compost Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 59(4), 1155-1161.
- Kavelman, B. (1978). Degradation of a plastic Polyepsiloncaprolactone by hiphomycetes. *Micologia*, 70, 87-103.
- Kirchman, L. (2017). *Biodegradabilidad teórica de envases plásticos. Metabolismo en la degradación de polietileno de baja densidad por hongos*. Madrid, España.
- Klenchuk, P. (setiembre - 1989). Degradability II Chemistry of Plastics costs a negative vote. *Plastics International*, 82-85.
- Klich, M. y Pitt, J. (1988). Laboratory guide to common *Aspergillus* species and their teleomorphs. *Commonwealth Scientific and industrial research organization*. Australia: North Ryde.
- Koneman, E. W. y Roberts, G. (1985). *Diagnóstico Microbiológico/ DMicrobiological diagnosis* (6ta ed.). New York: Medica Panamericana.
- Koneman, E.W., y Roberts G. (1987). *Micología .Practica de Laboratorio* (3ra ed.). México: Médica Panamericana S.A.
- Koneman, E.W., Allen, S.D., Janda, W.M., Schreckenberger, P.C. & Washington, C.W. *Diagnóstico Microbiológico/ DMicrobiological diagnosis* (6ta ed.).New York. Ed.Medica Panamericana.
- Lapidos, J. (2007). *Will My Plastic Bag Still Be Here in 2507? How scientists figure out how long it takes your trash to decompose*. Retrieved from <https://slate.com/news-and-politics/2007/06/do-plastic-bags-really-take-500-years-to-break-down-in-a-landfill.html>
- Lee, B., Pometto, L., Fratzke, A. y Bailey, R. (1991). Biodegradation of degradable plastic Polyethylene by *Phanaerochaete* and *Streptomyces* Species. *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 678-685.

- Ley N° 30884-Poder legislativo (2017). *Ley que regula el plástico de un solo uso y los recipientes o envases descartables*. EL PERUANO *Diario oficial del Bicentenario*.
- Limón, M. (2001). Biodegradación de polietileno de baja densidad por hongos filamentosos. México: Universidad Autónoma de México.
- Maldonado, L. (2012). *La complejidad de la problemática ambiental de los residuos plásticos: una aproximación al análisis narrativo de política pública en Bogotá*.
- Manfron, O. y Telm, F. (2009). *Biodegradabilidad de materiales*.
- Mangiarotti, A. M., Giuseppe, C. y Piontelli, E. (1994). *Biodeterioro de materiales plásticos por microhongos*. *Boletín Micológico*. 9(1-2).
- Martin, F. (2012). *Bioprospección de la degradación del polietileno*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana.
- Mendez, A. y Moreno, E. (2009). Las micotoxinas: contaminantes naturales de los Alimentos Ciencia. *Revista Ciencia*. Retrieved from <http://eppursimuoveqfitos.blogspot.com/2011/12/las-micotoxinas-contaminantes-naturales.html>
- Méndez, R. (1998). *Micromicetos en arenas costeras de Lima*. (Tesis de maestría). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Méndez, R., Vergaray, G., Béjar, R. y Cárdenas, J. (2013). Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno. *Revista Peruana de Biología UNMSM*. 13(13).
- Mendo Rubio, M. y Valenzuela Tume, M. (2005). *Medios de Cultivo en Microbiología: manual de Laboratorio (6ta ed.)*. Lima, Perú: Ediciones Laborales SRL.
- Motta, O., Proto, A., De Carlo, F., De Caro, F., Santoro, E., Brunetti, L. y Capunzo (2009). Utilization of chemically oxidized polystyrene as co-sustrate by filamentous fungi. *International Journal of Hygiene and EnvironmentalHealth*. 212(1), 61-66.
- Mumtaz, T., Khan, R. y Hassan, A. (2010). Study of environmental biodegradation of LDPE films in soil using optical and scanning electron microscopy. *Micron*. 41, 430-438.
- Murray, P. (2013). *Microbiología medica España*. España: Elsevier.
- Ojeda, M., Dalmolin, E., Forte, C., Jacques, S., Bento, M. y Camargo, O. (2009). Abiotic and biotic degradation of oxo-biodegradable polyethylenes. *Polymer Degradation and Stability*, 94(6), 965–970.

- Palit, R. y Bhattacharya, S. (1976). *Plastics and environment Science and culture*.
- Perdomo, G. A. (2002). Plástico y medio ambiente. *Revista Iberoamericana polímeros. Fundación Mérida*. 3(2).
- PLASTIFIVIDA. (2012). *Degradación de los materiales plásticos*. CIT Centro de información Técnica. *Boletín técnico informativo*, (21). Argentina: Gerencia Técnica. Argentina. Entidad técnica profesional especializada en plásticos y Medio ambiente.
- Pometto, L. y Nikolov, L. (1993). Degradation of degradable Starch-Polyethylene Plastics in compost Environment. *Applied and Environmental Microbiology*. 58(2), 731–733.
- Posada, B. (2008). No hubo cielo. *Revista Universidad Eafit* (94).
- Prescott, L. M., Harley, J., Klein, D. A. (2008). *Microbiología*. (5ta ed.). México: McGraw-Hill.
- Quispe, N. (2017). *Ficha estándar de familia del catálogo de bienes, servicios y obras del MEF*. Lima, Perú: Oficina General de tecnologías de la información del Ministerio de Economía y finanzas-Catalogación 2017.
- Ramírez, S., Domínguez, D., Salmerón, J. J., Villalobos, G., Ortega, J.A. (2015). Producción y calidad del forraje de variedades de avena en función del sistema de siembra y de la etapa de madurez al corte. *Rev Arch. Zootec*, 64(247), 237-244.
- Rico, M., Piattoni, V., Gonzalez, C., Monela, R., Latorre, G. y Lura, C. (2004). Viabilidad de cepas fúngicas conservadas mediante diferentes métodos catedra de Microbiología General. *Revista FABICIB*. 8.
- Rodríguez, R. M., Machaca, L., Choque, A. y Flores, C. N. (2014). *Plan Regional de acción ambiental Puno 2014 – 2021*. Puno, Perú: Gerencia Regional de Recursos Naturales y del Medio Ambiente.
- Rojas, M. (2016). *Evaluación de la calidad físico química de las fuentes de agua vertidos con lixiviados del botadero de residuos sólidos y sus efectos en la salud pública de la población de la zona periférica del botadero de Cancharani - Puno* (tesis de maestría). Universidad Nacional del Altiplano de Puno, Perú.
- Roussos Sevastianos, .P. G. (1996). Fisiología y bioquímica de microorganismos utilizados en procesos de fermentación en medio sólido. (Galindo E. ed.) *Fronteras in biotecnología y bioingeniería*. México: Sociedad Mexicana de Biotecnología y Bioingeniería, 341-348. Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, 6., Ixtapa (MEX),

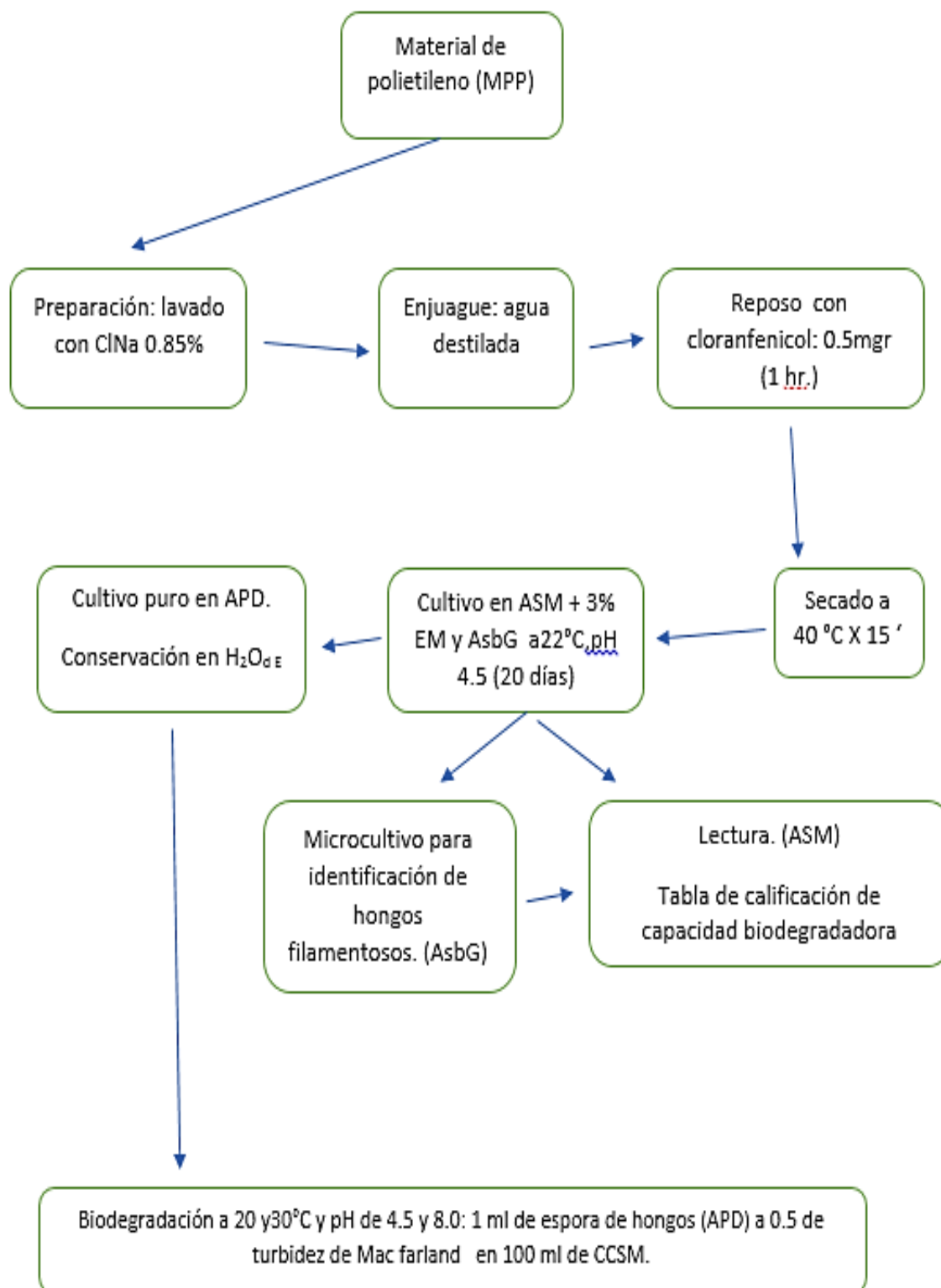
- Roy, K., Titus, S., Surekha, P., Tulsi, E., Deshmukh, C. y Rajogopal, C. (2008). Degradation of abiotically aged LDPE films containing por-oxidant by bacterial consortium. *Polym. Degrad. Stab.* 93(10), 1917-1922.
- Rubin, S. y Bisphenol, A. (2011). *An endocrine disruptor with widespread exposure and multiple effects.* *J Steroid Biochem Mol Biol.* 127(1-2), 27-34.
- Sáenz De Juano Arbona, V. (2008). Contribución al estudio de la degradación ambiental de poliolefinas fotoestabilizadas. (Tesis doctoral). Universidad Politécnica de Valencia, Valencia, España.
- Sáenz, V. (2008). *Contribución al estudio de la degradación ambiental de poliolefinas fotoestabilizadas.* España: Universidad Politécnica de Valencia.
- Shah, A., Hasan, F., Hameed, A. y Ahmed, S. (2008). Biological degradation of plastics: A comprehensive review. *Biotechnology Advances.* 26, 246-265.
- Sudhakar, M., Doble, M., Murthy, S. y Venkatesan, R. (2008). Marine microbe- mediated biodegradation of low- and high-density polyethylene's. *International Biodeterioration y Biodegradation,* 61, 203-213.
- Tortora, G., Funke, B. y Case, C. (1987). *Introducción a la microbiología* (9na ed.). Buenos Aires, Argentina: Medica Panamericana, S.A.
- UNE (2019). Actualidad sobre normalización Europea e internacional UNE UNN, COPANT, CEN, CENELECMETSI. ISO 846-Accion de microorganismos sobre plásticos, UNE -EN ISO 846-1998. *Revista de normalización Española.* Instituto Valenciano de Microbiología. (IVAMI) Bétera (valencia) CIF B-9637217.
- Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S. y Merino, F. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Rev. Perú Biol.* 17(1).
- Uribe, D., Giraldo, S. y Fernando, M. (2010). Biodegradación de polietileno por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. *Rev. Perú Biol Laboratorio de Microbiología y Biotecnología microbiana.* 17(1), 133-136.
- Vergaray, G. (1989). *Aislamiento, selección y caracterización de hongos nativos amiloliticos y fermentadores alcohólicos* (Tesis de doctorado). Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima, Perú.
- Volke, T. (2013). *Efecto -de tratamientos físicoquímicos y metabolismo en la degradación de polietileno de baja densidad por hongos filamentosos.* (Tesis de doctorado). Universidad Autónoma Metropolitana, México. Retrieved from <http://148.206.53.84/tesiuami/UAM6412.pdf>.

- Whitekettle, K. (1992). Effect of Surface-active chemicals on microbial adhesion. *Journal of Indian Microbiology*. 7,105-116.
- Ying, Z. y Ernest, A. (2005). Review of Plastic Waste Biodegradation. *Critical Reviews in Biotechnology*. 25,243-250.
- Zahra, S., Abbas, S., Mahsa, T. y Mohsen, N. (2010). Biodegradation of low- density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *Waste Management* 30, 396-401.
- Zurita Macalupú, S., Urcia Ausejo, F. & Navarro Mariñas, A. (2017). *Manual de procedimientos técnicos para el diagnóstico micológico*. Lima: Ministerio de Salud, Instituto Nacional de Salud, 2017.



ANEXOS

Anexo 1. Flujograma para el aislamiento de hongos filamentosos con capacidad de biodegradación del polietileno



Anexo 2. Tablas

Tabla 9

Características macroscópicas de hongos filamentosos aislados en el botadero de Cancharani

	Color	Textura	Epifluorescencia /Especie
M1	Negro	granular	<i>Aspergillus niger</i>
M2	Verde azul oscuro,	aterciplada afelpada	<i>Aspergillus fumigatus</i>
M3	Negro	granular	<i>Aspergillus niger</i>
M4	Negro	Granular.	<i>Aspergillus. niger</i>
	Color te	lanoso	<i>mucor sp.</i>
M5	Negro	granular	<i>Aspergillus. niger</i>
M6	Negro	granular	<i>spergillus niger</i>
M7	Negro	granular	<i>Aspergillus niger</i>
M8	Verde olivo, claro amarillento.	Rugoso,lanoso	<i>Aspergillus flavus</i>
M9	Negro	granular	<i>Aspergillus niger</i>
M10	Negro.	Granular	<i>Aspergillus niger</i>
	Blanquesino	algodonoso	<i>fusarium sp</i>
M11	-Negro	Granular	<i>Aspergillus niger</i>
	-Verde oliva, amarillento.	Rugoso,lanoso	<i>Aspergillus flavus</i>
M12	Negro.	Granular,	<i>Aspergillus niger</i>
	Verde azul oscuro	aterciplada afelpada	<i>Aspergillus fumigatus</i>
M13	Negro	granular	<i>Aspergillus. niger</i>
M14	Verde azul oscuro.	aterciplada afelpada	<i>Aspergillus fumigatus.</i>
	Color te	lanoso	<i>Mucor sp..</i>
M15	-Verde olivo, amarillento.	Rugoso,lanoso.	<i>Aspergillus flavus</i>
	-Rosado	algodonoso	<i>fusarium</i>
M16	-Verde azul oscuro.	Aterciplada afelpada.	<i>A. fumigatus</i>
	-Color te	lanoso	<i>Mucor sp.</i>
M17	-Verde olivo,claro amarillento	Rugoso,lanoso	<i>Aspergillus flavus.</i>
M18	-Negro.	Granular.	<i>Aspergillus niger</i>
	-Blanquesino	algodonoso	<i>fusarium sp.</i>
M19	-Negro.	Granular	<i>Aspergillus niger</i>
	-Color te	Lanoso.	<i>Mucor sp.</i>
M20	-Negro.	Granular.	<i>Aspergillus niger</i>
	-Verde olivo,amarillento.	Rugoso, lanoso	<i>Aspergillus flavus</i>

Fuente: Gonzales y Romero (2018).

Tabla 10
Resultados de crecimiento en masa de los micromicetos aislados

	Color	Textura	Microcultivo.	Epifluorescencia /Especie
M1	Negro	granular	2	<i>A. niger</i> (XXX)
M2	Verde azul oscuro,	atercipelada afelpada	1	<i>A. fumigatus</i> (xxx)
M3	Negro	granular	2	<i>A.niger</i> (x)
M4	Negro	Granular.	2	<i>A. niger</i> (x),
	Color te	lanoso		<i>mucor spp</i> (xxx)
M5	Negro	granular	2	<i>A. niger</i> (xxx)
M6	Negro	granular	2	<i>A. niger</i> (xxx)
M7	Negro	granular	2	<i>A. niger</i> (xxx)
M8	Verde olivo, claro amarillento.	Rugoso,lanoso	1y 2	<i>A. flavus</i> (xx)
M9	Negro	granular	2	<i>A. niger</i> (xxx)
M10	Negro.	Granular	2	<i>A.niger</i> (xx)
	Blanquesino	algodonoso		<i>fusarium sp</i> (x)
M11	-Negro	Granular	2	<i>A. niger</i> (xx),
	-Verde oliva, amarillento.	Rugoso, lanoso	1 y 2	<i>A. flavus</i> (xx)
M12	Negro.	Granular,	2	<i>A. niger</i> (x)
	Verde azul oscuro	atercipelada afelpada	1	<i>A. fumigatus</i> (xx)
M13	Negro	granular	2	<i>A. niger</i> (x)
M14	Verde azul oscuro.	atercipelada afelpada		<i>A.fumigatus</i> (xx).
	Color te	lanoso	1	<i>Mucor spp.</i> (xx)
M15	-Verde olivo, amarillento.	Rugoso, lanoso.	1 y 2	<i>A. flavus</i> (xx)
	-Rosado	algodonoso		<i>fusarium</i> (x).
M16	-Verde azul oscuro.	Atercipelada afelpada.		<i>A. fumigatus</i> (x).
	-Color te	lanoso	1	<i>Mucor spp</i> (xx),
M17	-Verde olivo, claro amarillento	Rugoso, lanoso	1	<i>A. flavus</i> (xx).
M18	-Negro.	Granular.	2	<i>A. niger</i> (xxx),
	-Blanquesino	algodonoso		<i>fusarium spp</i> (x)
M19	-Negro.	Granular	2	<i>A. niger</i> ((x),
	-Color te	Lanoso.		<i>Mucor spp</i> (xx)
M20	-Negro.	Granular.	2	<i>A.niger</i> (xxx),
	-Verde olivo,amarillento.	Rugoso, lanoso		<i>A.flavus</i> (xx)

Tabla 11
Crecimiento de cultivo axenico de hongos filamentosos

Micromicetos	crecimiento	N°	%
Aspergillus niger	Escaso(x)	5	35.7
	Regular (xx)	2	14.2
	Abundante(xxx)	7	50
	Total	14	
Aspergillus flavus	Regular (xx)	5	100
	Total	5	
Aspergillus fumigatus	Escaso(x)	1	25
	Regular(xx)	2	50
	Abundante(xxx)	1	2
	Total.	4	5
Mucor sp.	Escaso(x)	0	-
	Regular(xx)	3	
	Abundante(xxx)	1	75
	Total.	4	25
Fusarium sp.	Escaso(x)	3	100
	Regular(xx)	0	-
	Abundante(xxx)		-
	Total	3	

Tabla 12
Crecimiento mixto de hongos filamentosos

Micromicetos puros	N°	%
Aspergillus niger	7	35
Aspergillus flavus	1	5
Aspergillus fumigatus	2	10
Total.	10	50

Tabla 13
Crecimiento mixto de hongos filamentosos

Micromicetos puros	N°	%
- Aspergillus niger y mucor sp.	2	10
- Aspergillusniger y fusarium sp.	2	10
- Aspergillus niger y A. flavus	2	10
- Aspergillus niger y A. fumigatus	1	5
- Aspegillus fumigatus y mucor sp.	2	10
- Aspergillus flavus y fusarium sp	1	5
Total	10	50

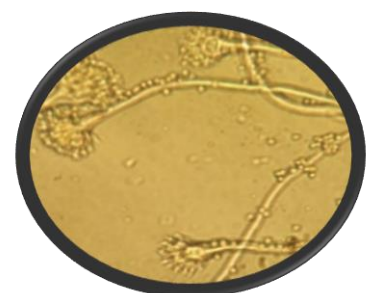
Anexo 3. Características macro y microscópica de hongos filamentosos

MACROSCÓPICA

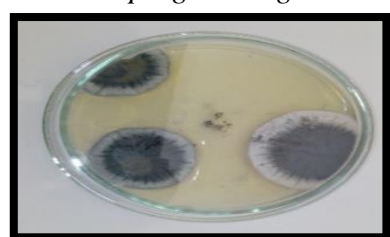
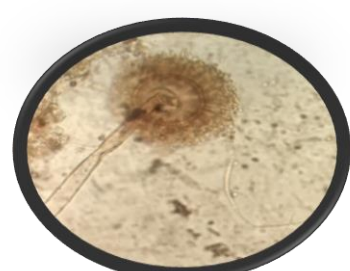
MICROSCOPIA



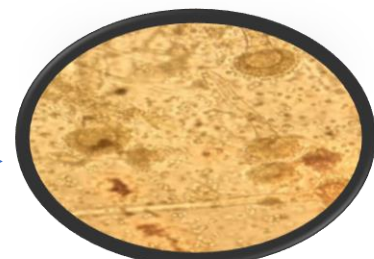
Aspergillus flavus



Aspergillus niger



Aspergillus fumigatus

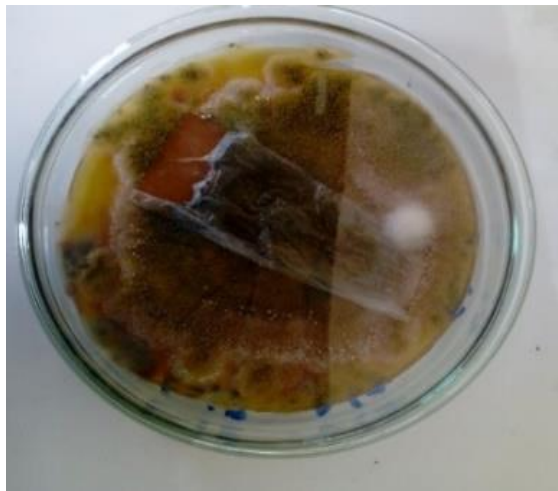


Fusarium sp

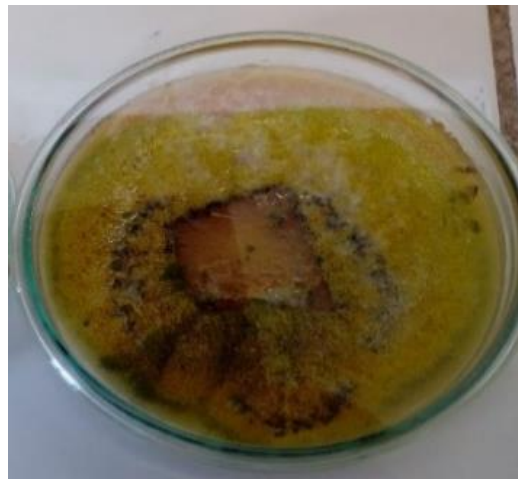


Anexo 4. Actividad degradadora de hongos filamentosos frente al polietileno en asm a 22°C A PH: 4.5

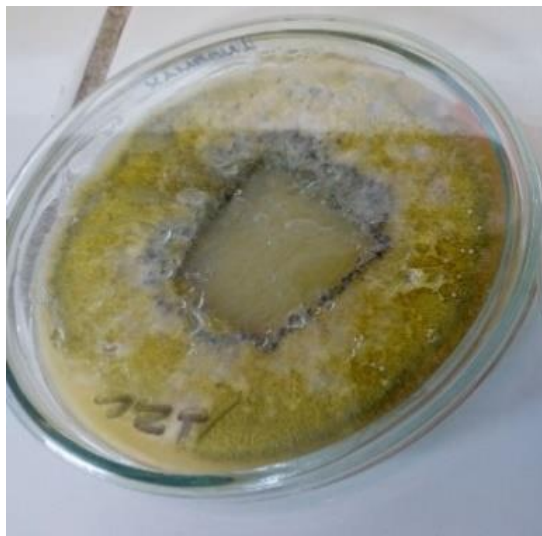
1.- *A. flavus*. (Rdo Muy 72uen++++)



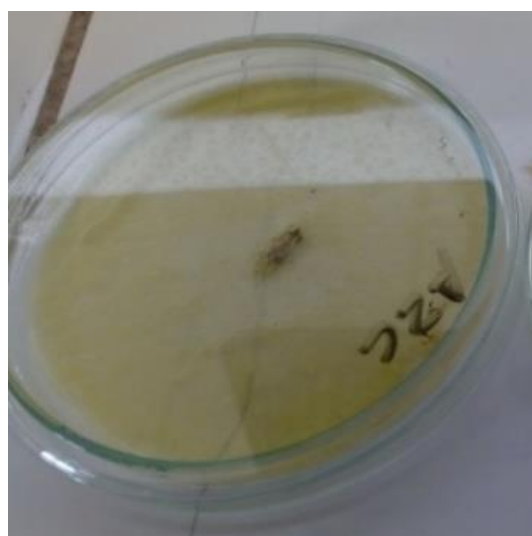
2.- *A. niger*. Rdo:72uen (++++)



3.- *Aspergillus fumigatus* (Rdo Regular ++)



4.- *Mucor sp.* (Rdo Regular ++)



5.- *Fusarium sp* (Rdo: pobre +)



Anexo 5. Comparación de medias

- Comparación de medias, (prueba de normalidad).pv=(0.005)

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")

Df	F value	Pr (>F)
group 3	2.9701	0.05197 .

- Prueba de Kruskal – Wallis,(diferencia o no entre los grupos).

Kruskal-Wallis chi-squared = 1.4781, df = 3, p-value = 0.6873.

Shapiro-Wilk normality test (comparacion de medias)

W = 0.9098, p-value = 0.0544.

Comparación considerando temperatur

Prueba de comparación de medias de t-student. Welch Two Sample t-test

t = 1.0371, df = 18.999, p-value = 0.3127.

Comparación Considerando el PH.-

Prueba de comparación de medias

de t-student.(pH 4.5 y 8.0).

Welch Two Sample t-test. t = 6.0253, df = 17.263, p-value = 1.278e-05.