

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias e Ingenierías

Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad
mediada por diferentes especies de hongos

Proyecto de investigación

Luis Moisés Espinoza Arias

Ingeniería Química

Trabajo de titulación presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero Químico

Quito, 16 de mayo de 2018

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE CIENCIAS E INGENIERÍA

HOJA DE CALIFICACIÓN
DE TRABAJO DE TITULACIÓN

Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por
diferentes especies de hongos

Luis Moisés Espinoza Arias

Calificación:

Nombre del profesor, Título académico

Dra. Ing. Daniela Almeida

Firma del profesor

Nombre del profesor, Título académico

José Álvarez, Ph.D

Firma del profesor

Nombre del profesor, Título académico

Antonio León, Ph.D

Firma del profesor

Quito, 16 de mayo de 2018

Derechos de Autor

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en el Art. 144 de la Ley Orgánica de Educación Superior.

Firma del estudiante:

Nombres y apellidos:

Luis Moisés Espinoza Arias

Código:

00116520

Cédula de Identidad:

1723824445

Lugar y fecha:

Quito, 16 mayo de 2018

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis tutores, a mi familia y a todos quienes me brindaron su apoyo y ayuda a lo largo de esta investigación.

RESUMEN

La acumulación de residuos plásticos como contaminante en diversos ecosistemas de la biósfera ha despertado el interés en estudiar la capacidad de biodegradación de diversos microorganismos frente a estos materiales. En la presente investigación se evaluó la degradación de polietileno de baja densidad (LDPE) con seis especies diferentes de hongos: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma harzianum*, *Penicillium* sp. y *Pleurotus ostreatus*. El cultivo fúngico con las muestras de plástico se realizó en períodos de 30, 60 y 90 días, en medio mínimo mineral. El LDPE utilizado fue sometido a un tratamiento de envejecimiento térmico antes de ser incubado con los microorganismos. Se registró la masa de las muestras de plástico antes y después del cultivo, donde se encontró una tendencia general al aumento de peso debido a residuos de la masa de hongo y restos de sal cristalizados adheridos a su superficie. Únicamente en las muestras de LDPE tratadas con *Fusarium* se encontró pérdida en peso (0.99% +/- 0.11%), lo cual es un indicio de mayor bioasimilación de plástico por este hongo. Un análisis de espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) reveló que no hubo mayor alteración en la estructura molecular del polímero estudiado. Por su parte, en el análisis de microscopía electrónica de barrido (SEM), se encontró evidencia de actividad metabólica de los hongos, y se pudo confirmar su crecimiento y adherencia a la superficie del plástico

ABSTRACT

Plastic waste pollution in different ecosystems of the biosphere has awakened a special interest in the study of microorganisms capable of degrading such materials. In this investigation, the biodegradability of low density polyethylene (LDPE) is evaluated with six different strains of yeasts: *Aspergillus* sp., *Fusarium* sp., *Cladosporium* sp., *Trichoderma harzianum*, *Penicillium* sp. y *Pleurotus ostreatus*. Cultures were performed in periods of 30, 60 and 90 days, in minimal mineral medium. LDPE samples passed a thermal aging treatment before being inoculated with the microorganisms. LDPE samples mass was registered before and after the culture. Weight gain due to salt and fungus residues accumulation was identified as a general trend among the samples. The trials with *Fusarium* were the only ones to register weight loss (0.99% +/- 0.11%), which is an indication of greater quantity of plastic bio assimilated by the fungus. Fourier transform infrared analysis (FTIR) showed that no significant change took place in the molecular structure of the treated LDPE samples. On the other hand, scanning electron microscopy (SEM) indicated hints of fungal metabolic activity, its growth, and incorporation into the polymeric matrix of the sample could be confirmed.

TABLA DE CONTENIDO

1.- INTRODUCCIÓN	12
1.1.-Antecedentes	12
1.2.-Justificación del proyecto	14
1.3.- Objetivos	16
1.3.1.- Objetivo general	16
2.- FUNDAMENTO TEÓRICO	16
2.1.- Polímeros sintéticos	16
2.1.1.- Polietileno	17
2.1.2.-Impacto ambiental causado por el desecho inadecuado de polímeros sintéticos	18
2.1.3.- Degradación de los polímeros sintéticos	20
2.2.- Hongos como descomponedores	23
2.2.1.- Características biológicas	23
2.2.2.-Clasificación	24
2.3.- Métodos de reducción de masa residual plástica	26
2.3.1.-Reciclaje	27
2.3.2.- Compostaje	28
2.3.3.- Métodos alternativos	29
2.4.- Métodos de caracterización y análisis de las muestras experimentales	29
2.4.1.- Microscopía electrónica de barrido (SEM)	29
2.4.2.- Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	30
3.-MÉTODOS EXPERIMENTALES	31
3.1.- Selección y cultivo de las cepas de microorganismos	32
3.1.1.- Selección	32
3.1.2.- Preparación de medios de cultivo para la réplica de los microorganismos	33
3.1.3- Réplica y aislamiento	33
3.2.- Medio mínimo mineral	33
3.3.- Selección, preparación y tratamiento de las muestras de LDPE	35
3.3.1.- Preparación inicial de las muestras de LDPE	35
3.3.2.-Tratamiento físico de envejecimiento	36
3.4.- Preparación, análisis y caracterización de las muestras de cultivo	36

3.4.1.- Preparación de los controles del experimento.....	36
3.4.2.- Inoculación de las muestras experimentales.....	38
3.4.3.- Manejo de las muestras post tratamiento de degradación biológica	39
3.4.4.- Métodos de análisis y caracterización.	39
3.4.5.- Análisis estadístico.....	40
4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
4.1.- Selección y cultivo de las cepas de microorganismos.....	41
4.1.1.- Selección de microorganismos	41
4.1.2.- Réplica de las cepas seleccionadas.....	42
4.2.- Preparación y tratamiento de las muestras de LDPE.....	45
4.2.1.- Inoculación de los medios de cultivo	45
4.2.1.- Tratamiento de envejecimiento térmico	46
4.3.- Análisis y caracterización de las muestras después del tratamiento de degradación biológica.....	47
4.3.1.- Cambios durante el período de cultivo	47
4.3.2.- Manejo de las muestras post tratamiento de degradación biológica	49
4.3.3.- Pérdida en Peso	52
4.3.5.- Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).....	61
5.- CONCLUSIONES	66
6.- REFERENCIAS	67
7.- ANEXOS	71
7.1.- Anexo 1: Variación de peso	71
7.2.- Anexo 2: Microscopía electrónica de barrido	73
7.3.- Anexo 3: Controles positivos	76
7.4.- Anexo 4: Metodología para la preparación de agar de papa y dextrosa.....	78
7.5.- Anexo 5: Metodología para la réplica y aislamiento de hongos	79
7.5.1.- Réplica.....	79
7.5.2.-Aislamiento.	80

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Composición del medio mínimo mineral	34
Tabla 2: Composición de la solución de trazas	34
Tabla 3: Grupos de muestras experimentales	35
Tabla 4: Lista de microbios potencialmente capaces de degradar polímeros sintéticos	41
Tabla 5: Variación de peso de las muestras experimentales en los 3 períodos de cultivo.....	71
Tabla 6: Variación de peso en los controles positivos de crecimiento microbiano y abióticos.....	72

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Vista inferior de la capa superficial de basura de la gran isla de plástico del Pacífico Norte (National Geographic Society, 2017)	20
Figura 2: Proceso de biodegradación del plástico (Dussud & Ghiglione, 2017)	22
Figura 3: Etapas de la investigación	32
Figura 4: Muestra del LDPE usado en el experimento	35
Figura 5: Muestras envejecidas después de salir del autoclave	36
Figura 6: Preparación de muestras previo a la inoculación	38
Figura 7: Raspado previo a la inoculación (Fusarium)	39
Figura 8: Réplica de Cladosporium sp.	43
Figura 9: Réplica Aspergillus sp.	43
Figura 10: Réplica Fusarium sp.	44
Figura 11: Réplica de Pleurotus ostreatus	44
Figura 12: Réplica de Trichoderma harzianum	44
Figura 13: Réplica de Penicillium sp.	45
Figura 14: Inóculo de las cepas utilizadas; de izquierda a derecha: Fusarium, Penicillium, Cladosporium, Pleurotus, Trichoderma y Aspergillus	46
Figura 15: Muestra de LDPE después del tratamiento de envejecimiento térmico	46
Figura 16: medio inoculado con Aspergillus (izquierda); muestras experimentales inoculadas en período de cultivo (derecha)	47
Figura 17: Controles Positivos, de izquierda a derecha: Pleurotus/Penicillium; Cladosporium, Fusarium, Trichoderma, Aspergillus	49
Figura 18: Muestras de LDPE tratadas con Aspergillus retiradas a los 30 días de cultivo	50
Figura 19: Curva de distribución de la variación de peso porcentual de las 92 muestras de LDPE después del tratamiento de envejecimiento	52
Figura 20: Variación porcentual de peso de las muestras experimentales en 30 días de cultivo	53
Figura 21: Variación porcentual de peso de las muestras experimentales en 60 días de cultivo	54
Figura 22: Variación porcentual de peso de las muestras experimentales en 90 días de cultivo	54
Figura 23: Variación de peso en las muestras de control positivo de crecimiento microbiano	56
Figura 24: SEM de LDPE previo al tratamiento de envejecimiento térmico, 500x y 100x.....	57
Figura 25: SEM de LDPE posterior al tratamiento de envejecimiento térmico, 1000x	58
Figura 26: SEM de control negativo de crecimiento, 1000x	58
Figura 27: SEM de muestra de LDPE 90 días de cultivo, con Fusarium (izquierda), con Aspergillus (derecha); 1000x	60
Figura 28: SEM de control positivo de crecimiento microbiano (Penicillium) 500x 5000x	61
Figura 29: Espectro FTIR LDPE previo tratamiento de envejecimiento térmico.....	62
Figura 30: Espectro FTIR LDPE posterior al tratamiento de envejecimiento térmico	63
Figura 31: FTIR LDPE control negativo de crecimiento	63
Figura 32: FTIR LDPE tratada con Fusarium durante 90 días	64
Figura 33: FTIR LDPE control positivo de crecimiento, tratado con Penicillium durante 90 días.....	65
Figura 34: Variación de peso en LDPE inoculado con Fusarium	71
Figura 35: Variación de peso en LDPE inoculado con Aspergillus.....	71
Figura 36: Variación en peso en LDPE inoculado con Penicillium.....	72

Figura 37: Variación en peso en LDPE inoculado con Trichoderma.....	72
Figura 38: Variación de peso LDPE inoculado con Pleurotus.....	72
Figura 39: Variación en peso en LDPE inoculado con Cladosporium.....	72
Figura 40: SEM, Patrón de burbujas en LDPE posterior envejecimiento térmico (100x y 250x respectivamente)	73
Figura 41: SEM, patrón de burbujas distorsionado en control negativo de crecimiento, 500x y 1000x....	73
Figura 42: SEM Fusarium 90 días, superficie rugosa y acumulación de sal 1000x (izquierda); panorama general 100x (derecha)	74
Figura 43: SEM, Fusarium 90 días, agujeros en superficie, 500x (izquierda) y formación de hifas de Aspergillus en matriz polimérica 500x (derecha)	74
Figura 44: SEM, Fusarium 90 días, restos de sal y rugosidades, 1000x y 500x.....	74
Figura 45: SEM, Aspergillus 90 días, morfología superficial, 50x y 500x	75
Figura 46: SEM, Aspergillus 90 días, formación de hifas en matriz polimérica, 5000x y 2000x	75
Figura 47: SEM control positivo Penicillium, 1000x y 2000x	75
Figura 48: Control positivo Cladosporium (izquierda) y Trichoderma (derecha)	76
Figura 49: Control positivo Penicillium (izquierda) y Pleurotus (derecha)	76
Figura 50: Control positivo Aspergillus (izquierda) y Fusarium (derecha).....	76
Figura 51: Muestras de LDPE incubadas en control positivo con Cladosporium (izquierda) y Fusarium (derecha).....	77
Figura 52: Muestras de LDPE incubadas en control positivo con Aspergillus (izquierda) y Trichoderma (derecha).....	77
Figura 53: Muestras de LDPE incubadas en control positivo con Penicillium (arriba) y Pleurotus (abajo)	77
Figura 54: Control positivo de crecimiento, Aspergillus utilizando la muestra de LDPE como sustrato después de ser extraída del medio de cultivo	77
Figura 55: Medio de cultivo (PDA)	78
Figura 56: Autoclave	78
Figura 57: Banco de cepas (izquierda y centro) e incubadora (derecha) de la USFQ.....	79
Figura 58: Pleurotus en fase de propágulo, inoculado en un sustrato de trigo y aserrín (izquierda); Pleurotus fructificado (derecha)	80

1.- INTRODUCCIÓN

1.1.-Antecedentes

El siglo XX fue marcado por un cambio radical de la matriz energética a nivel global. La industria petrolera vivía entonces sus primeros años, y daba paso a nuevos productos derivados de la destilación del crudo. Una de las innovaciones más grandes de la industria química fue la síntesis de polímeros artificiales. A fines del siglo XIX, e inspirados en los polímeros naturales que venían usándose ya por varias centurias, los científicos de aquella época dieron los primeros pasos de lo que sería posteriormente la nueva tendencia global en materiales artificiales. La producción de polímeros sintéticos constituye hoy en día una de las industrias más grandes a nivel mundial, produciendo anualmente un aproximado de 235 millones de toneladas de material (EPRO, EuPC, EuPR, PE, 2012).

Sin embargo, lo que prometía ser una de las innovaciones más trascendentes de la ingeniería de materiales, pasó a ser una de las cargas contaminantes más representativas de la biósfera. La mayoría de esta producción se convierte en basura que muy difícilmente se descompone, e interfiere con la homeostasis de los ecosistemas terrestres. Por ejemplo, hoy en día se recicla solamente el 7% de todas las bolsas plásticas que se producen a nivel mundial. El 93% restante yace en rellenos sanitarios, botaderos, ríos, mares, entre otros (Gourmelon, 2015).

Mucho se ha estudiado acerca del deterioro y degradación de polímeros sintéticos. La revolución verde que se ha desencadenado durante las últimas décadas ha buscado alternativas para lidiar con la gran cantidad de residuos plásticos producidos por el hombre. La degradación biológica es el método natural de reducción de desechos en el medio; sin embargo, se debe recalcar la dificultad en encontrar microorganismos capaces de descomponer polímeros sintéticos de cadena larga. La explicación yace en el hecho de que estos materiales no llevan mucho más de un siglo en la biosfera terrestre, por lo tanto, bacterias y hongos no han sido expuestos a largos procesos evolutivos/adaptativos que les doten con enzimas especializadas para la degradación de plásticos (Shah, Hasan, Hameed, & Ahmed, 2008).

En el texto de Shah et al *Biological degradation of plastics: A comprehensive review* se recopilan experimentos con organismos que descomponen material realizados en décadas pasadas hasta la actualidad. En lo que respecta al *polietileno de baja densidad* o LDPE, casi una decena de estudios ha encontrado resultados positivos al poner a prueba microorganismos descomponedores (Shah, Hasan, Hameed, & Ahmed, 2008).

Es claro que la degradación de polímeros naturales como la celulosa o quitina no requiere mucho tiempo. La atención se centra en los polímeros sintéticos, aquellos cuya degradación toma de 100 a 1000 años usando tecnologías biológicas. Muchos de los experimentos propuestos en esta compilación, como los de Chandra y Rusgi (Chandra & Rustgi, 1997) o Lee et al (Lee, Pometto, Fratzke, & Bailey, 1991), proponen consorcios bacterianos y micóticos, a fin de potenciar la concentración de las enzimas adecuadas para la descomposición de este material. De esta manera, también simulan un escenario de compostaje controlado/relleno sanitario, donde los organismos descomponedores se encuentran dispersos por doquier. Estos experimentos coinciden en que efectivamente existe capacidad de descomposición de LDPE por parte de ciertos microorganismos como *Streptomyces*, *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus*, y ésta se incrementa cuando se forman consorcios entre los mismos.

Otros trabajos, como el de Albertson et al (Albertson, Barenstedt, & Karlsson, 1994) o Yamada-Onera et al (Yamada-Onera, Mukumoto, Katsuyaya, Saiganji, & Tani, 2001), sostienen que un tratamiento de envejecimiento previo a la exposición a descomposición microbiológica es indispensable. Éste puede ser de carácter térmico, foto lumínico o químico. Estos autores sostienen que para que exista degradación microbiológica de una cadena polimérica, se necesita primero modificar su estructura a nivel cristalino. El envejecimiento de una muestra de plástico produce en ésta una reducción de su hidrofobicidad, permitiendo que se adhieran a su superficie películas de microorganismos descomponedores. Éstos, mediante ciertas enzimas, pueden acceder a las cadenas poliméricas ya deterioradas y utilizar el carbono de las mismas como nutriente. El tratamiento de envejecimiento previo es también consecuente con el escenario real, ya que, en medio biológico, una muestra de plástico está expuesta a la radiación solar, temperatura ambiente, lluvia, intemperie, entre otros (Shah, Hasan, Hameed, & Ahmed, 2008).

Por ejemplo, en el experimento de Luz et al, previo a la exposición al basidiomiceto *Pleurotus ostreatus*, se realizó un tratamiento de envejecimiento foto-lumínico a las muestras de polietileno de baja densidad que se utilizaron. Se comprobó que las propiedades mecánicas y físicas de las muestras cambiaron. También se registraron cambios en la estructura química de las cadenas poliméricas (Luz, Paes, Nunes, Silva, & Megum, 2013).

En lo que respecta al medio de experimentación, todos los autores citados coinciden en la utilización de medios mínimos minerales. El objetivo de esto es reducir la disposición de carbono en el sistema, a fin de forzar al microorganismo a utilizar aquel que encuentra disponible en las muestras de LDPE como nutriente (Heide, Hauffman, & K.Vries, 1985). Un medio mineral ayuda a controlar variables experimentales, tales como la esterilidad del experimento, presencia de otros microorganismos en el sistema, presencia de fuentes de carbono adicionales a la muestra de polietileno, presencia de otras fuentes de producción de dióxido de carbono, entre otros (Gu, 2003).

1.2.-Justificación del proyecto

El siguiente proyecto busca poner a prueba la capacidad de descomposición y degradación de LDPE por parte de diferentes cepas de hongos en medios definidos. De esta manera se realizará una comparación objetiva entre las cualidades de los microorganismos estudiados, a fin de determinar cuáles son los más aptos para ser introducidos en un medio controlado de compostaje o bioreactores.

Los polímeros sintéticos se caracterizan por tener una estructura química muy estable. Son materiales inertes que, a diferencia del hierro, cobre u otros metales, prácticamente no reaccionan con agentes externos. Es esta propiedad, la misma que otorga a los polímeros sintéticos su atractivo industrial, la que hace que sean sumamente resistentes a la degradación biológica (Shah, Hasan, Hameed, & Ahmed, 2008).

Se estima que anualmente se desechan ocho millones de toneladas de plásticos en el océano (Dominguez, El mundo tira ocho millones de toneladas de plástico al mar cada año,

2015). Estos residuos son elementos intrusos en el ecosistema marino y representan una amenaza para innumerables especies. Se sabe también que miles de millones de toneladas de este tipo de residuos yacen en rellenos sanitarios y botaderos alrededor del mundo. Mucha de esta contaminación puede llegar a ser causante de incendios forestales, y de alguna u otra manera, afectarán a la fauna y flora silvestre. Los residuos plásticos son también una amenaza para la salud pública, ya que obstruyen alcantarillas y retienen agua ocasionando inundaciones (Domínguez, 2015). Expuestos estos argumentos, es justificable la búsqueda de métodos reductores de este tipo de masa residual contaminante.

A nivel mundial, naciones como Países Bajos, Dinamarca o Noruega son pioneros en la búsqueda de soluciones a problemas causados por la contaminación ambiental. Éstos poseen recursos para poner en marcha planes más elaborados para batallar este mal. El reciclaje es la primera alternativa a la hora de reducir la masa de desechos plásticos en botaderos, sin embargo, este proceso resulta costoso y no es viable en economías limitadas como la del Ecuador (EPRO, EuPC, EuPR, PE, 2012).

El objetivo 7 del Plan Nacional del Buen Vivir 2013-2017 busca garantizar los derechos de la naturaleza y promover la sostenibilidad ambiental, territorial y global. En este documento se detallan metas a cumplirse; una de ellas es aumentar el porcentaje de hogares que clasifican sus desechos: orgánicos al 25,0% e inorgánicos al 32,0% (Consejo Nacional de Planificación, 2014). Promover una cultura de reciclaje es el primer paso para poner en marcha cualquier proyecto de descomposición microbiológica de polímeros sintéticos en compostaje controlado a gran escala. El presente trabajo pretende convertirse en un sustento y referencia para futuros proyectos como el ejemplo mencionado anteriormente. Esto se logrará al dejar definida una lista de microorganismos capaces de descomponer LDPE, y al detallar minuciosamente el comportamiento, habilidad de descomposición y posibles problemas a superar en el proceso de degradación microbiológica de plásticos.

1.3.- Objetivos

1.3.1.- Objetivo general

Determinar y cuantificar el nivel de degradación en muestras de polietileno de baja densidad por parte de diferentes especies de hongos

1.3.2.- Objetivos específicos

1. Identificar, en un banco de cepas, aquellas que tengan potencial de degradación de LDPE, de acuerdo con estudios previos.
2. Determinar las condiciones adecuadas para el crecimiento de los microorganismos, donde se use el carbono presente en las cadenas poliméricas como fuente principal de energía.
3. Caracterizar fisicoquímicamente el LDPE, previo y posterior a un tratamiento de envejecimiento térmico.
4. Evaluar la degradación del polímero envejecido bajo la acción de los diferentes microorganismos mediante variación en peso, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier.

2.- FUNDAMENTO TEÓRICO

2.1.- Polímeros sintéticos

Los polímeros son compuestos formados por moléculas grandes y pesadas, las cuales a su vez consisten de un gran número de unidades idénticas llamadas monómeros. Estas estructuras se repiten de manera secuencial, formando cadenas moleculares conocidas como polímeros. Existen polímeros naturales y sintéticos. Entre los polímeros naturales están las proteínas, celulosa y almidón; mientras que los sintéticos consisten mayoritariamente en aquellos producidos por el hombre (Flory, 1995).

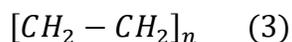
Los polímeros sintéticos pueden ser de tipo termoplástico o termoestable. Los polímeros termoplásticos, como el polietileno, son capaces de ser derretidos y reformados nuevamente. Por el contrario, los polímeros termoestables, como el poliuretano o la baquelita, sufren cambios químicos en su estructura al ser sometidos a calentamiento, por lo que no pueden ser reciclados (Flory, 1995).

2.1.1.- Polietileno

El polietileno es uno de los polímeros sintéticos más producidos en el mundo, a causa de sus propiedades termoplásticas, flexibilidad, resistencia, durabilidad y, sobre todo, bajo costo. Se calcula que mundialmente se producen alrededor de 80 millones de toneladas al año (Flory, 1995).

Como su nombre lo indica, el polietileno está formado por monómeros de eteno. El proceso donde se forman cadenas de estos monómeros se conoce como polimerización. Esta técnica consiste en romper los enlaces π de este alqueno, ya que éstos son más débiles que los enlaces σ , a fin de dotar de electrones libres a sus extremos y permitir la unión entre monómeros (Flory, 1995).

A lo largo de la historia moderna se ha explorado variedades de polímeros sintéticos, al reemplazar hidrógenos del eteno con otros radicales, con el afán de sintetizar plásticos con nuevas propiedades. Por ejemplo, al sustituir un hidrógeno del monómero de eteno con un átomo de cloro, se forma el cloro eteno, cuya cadena polimérica corresponde al poli cloro eteno, o más conocida como poli vinil cloruro (PVC). Otro ejemplo es el polipropileno, el cual está formado por monómeros de eteno donde un átomo de hidrógeno es reemplazado por un radical metilo. A continuación, se presenta la estructura química del eteno (1), seguida por su forma polimerizada (polietileno) (2) y fórmula molecular reducida (3).



(Flory, 1995)

La resistencia del polietileno es directamente proporcional a la longitud de sus cadenas monoméricas. Esto determina la densidad real del producto final. Por ejemplo, cadenas monoméricas largas resultan en polímeros con densidades de 0.945-0.965 g/cm³. Éstas corresponden a polietileno de alta densidad (HDPE), compuesto caracterizado por su rigidez y color opaco. Consecuente a esto, el HDPE es más viscoso y su proceso de producción es más laborioso. Por el contrario, el polietileno de baja densidad (LDPE) está constituido por cadenas más cortas ($\rho < 0.93 \text{ g/cm}^3$), lo que le otorga mayor flexibilidad y facilita su proceso de síntesis y reciclaje (Flory, 1995).

La durabilidad del polietileno radica en la estabilidad de su estructura, factor que dificulta el ataque de enzimas y lo convierte en un material prácticamente inerte hacia procesos de oxidación o descomposición biológica (Flory, 1995).

2.1.2.-Impacto ambiental causado por el desecho inadecuado de polímeros sintéticos

De los 310 millones de toneladas de polímeros sintéticos producidas cada año, únicamente un 5% se recicla efectivamente. Un porcentaje de la fracción restante, con suerte, va a parar en botaderos o rellenos sanitarios, mientras que el resto termina como contaminante en diferentes ecosistemas de la biósfera terrestre. Se estima que al menos 8 millones de toneladas de contaminantes plásticos acaban en los océanos anualmente (Harvey, 2017). Este problema constituye, para muchos movimientos ambientalistas, una de las preocupaciones más grandes de los últimos tiempos en lo que respecta al bienestar y homeostasis de la fauna marina.

Se ha encontrado que al menos 600 especies (desde mejillones hasta ballenas) ha incluido accidentalmente fragmentos plásticos en su dieta, y se estima que para el año 2050, el 99 % de especies de aves marinas habrá ingerido algún tipo de plástico (Dominguez, Las aves marinas se atiborran de plástico atraídas por su olor, 2016).

La introducción de residuos plásticos en la cadena alimenticia desequilibra notablemente el funcionamiento normal de los ecosistemas. Los polímeros sintéticos, en lugar de descomponerse químicamente, se reducen a porciones cada vez más pequeñas. Esto propicia la ingesta accidental de los mismos por parte de peces y aves. Por ejemplo, se ha

demostrado que la ingesta de pequeñas partículas de polímeros sintéticos por peces reduce su habilidad de reacción ante depredadores, haciéndolos más susceptibles a ser devorados. De la misma manera, estos residuos plásticos permanecen en los cuerpos de los depredadores, los cuales eventualmente se convierten en presas. Como es lógico, el contaminante recorre toda la cadena alimenticia, hasta finalmente llegar a su cabeza, es decir, el ser humano (Harvey, 2017).

Muchas especies de aves ingieren pequeños pedazos de plástico al confundirlos con alimento. Por ejemplo, cuando el krill (especie de crustáceo malacostráceo) se alimenta de algas, se emanan residuos de dimetilsulfuro al aire. Esta sustancia emite un olor característico que es percibido por las aves, el cual les indica que hay presencia de alimento. El problema surge del hecho de que los residuos de plástico flotantes en el océano atrapan restos de sustancias orgánicas, incluyendo dimetilsulfuro. Las aves confunden su aroma con el del alimento y los ingieren. Estos restos de polímeros sintéticos se almacenan en sus organismos, hasta que obstruyen su sistema digestivo y acaban con sus vidas (Barnes, Galgani, Thompson, & Barlaz, 2009).

Las aves no son las únicas en morir por comer restos de plástico. En noviembre de 2014, más de 500 leones marinos fueron hallados sin vida en una playa 400 km al norte de Lima, la capital peruana. Los científicos encargados de la investigación determinaron que la ingesta de plástico fue una de las causas del suceso (BBC News, 2014). Otros animales, como tortugas, peces y crustáceos, suelen atorarse en redes y entramados plásticos (usualmente residuos de empaquetamiento), lo que dificulta su movilidad y les impide alimentarse (Jambeck, y otros, 2015).

De no ser por la descomunal cantidad de residuos plásticos vertida en los océanos, el escenario fuese diferente. De hecho, hay tantos residuos flotando en el mar, que islas de plástico pueden ser vistas desde el espacio. La más grande está ubicada en medio de Estados Unidos y China, producto de la acumulación acarreada por la corriente del pacifico norte. Este sistema es conocido también como el vórtex de plástico del Pacífico, ya que las corrientes provenientes de la costa de Japón y China se combinan con las de la costa occidental de Estados Unidos, formando un vórtice rotacional que atrapa los residuos plásticos en una sección de

2200 km de largo por 800 km de ancho, tan grande como tres veces el tamaño de la Península Ibérica (Milman, 2016).



Figura 1: Vista inferior de la capa superficial de basura de la gran isla de plástico del Pacífico Norte (National Geographic Society, 2017)

Actualmente hay varios grupos de investigación proponiendo ideas para mejorar la situación de los océanos de la Tierra; proyectos novedosos que van desde recolección de residuos con boyas especializadas hasta la alteración genética de bacterias, dotándolas de enzimas especializadas capaces de descomponer cadenas de polímeros sintéticos (Milman, 2016). Lo que se sabe por cierto es que, si se mantiene la misma tasa de contaminación, para el 2025 se habrá vertido ya más de 150 millones de toneladas de restos plásticos en los ecosistemas marinos alrededor del mundo (Jambeck, y otros, 2015).

2.1.3.- Degradación de los polímeros sintéticos

Se considera que un polímero sintético se ha degradado cuando sus propiedades físicas y químicas cambian, dando señales de envejecimiento y deterioro. Físicamente, una de las características más apreciables del plástico degradado es una disminución de la resistencia original de material, lo cual se puede cuantificar al medir las propiedades mecánicas de la muestra. Ésta se vuelve más quebradiza, menos flexible, su textura se torna un cuanto áspera y el color cambia a un tono más opaco. Por el otro lado, en lo que respecta a cambios químicos,

la mayor señal de degradación en una muestra de plástico es la disminución de su masa molecular (Forrest, 2012). Por ejemplo, el polietileno de baja densidad tiene una masa molecular promedio de 200.000 Da. Ésta está determinada por la longitud de las cadenas poliméricas que lo conforman; por tanto, una disminución en masa molecular representa una disminución en longitud de dichas cadenas. Una fractura en las cadenas poliméricas ocurre principalmente gracias a una reacción de oxidación entre el carbono presente en el material con el oxígeno del ambiente. Este último se enlaza a los átomos de carbono del plástico, dando origen a un grupo carbonilo. Para que este proceso ocurra, es necesaria la eliminación del enlace entre dos átomos de carbono de la cadena, a fin de que éstos dispongan de electrones libres para formar un doble enlace con el oxígeno. De esta manera, la longitud de las cadenas disminuye, y por ende, la masa molecular de la muestra (Dussud & Ghiglione, 2017).

Existen varias vías de degradación de polímeros sintéticos. La vía química es aquella donde se hace uso de aditivos de hierro, cobalto o níquel, para acelerar el proceso de oxidación en el plástico. Un ejemplo es el d2w[®], aditivo que es agregado al polietileno, poliestireno, polipropileno, entre otros polímeros, al momento de su fabricación. Éste acelera el proceso de oxidación en la estructura molecular de los materiales plásticos, a fin de que éstos se descompongan entre 3 y 5 años (proceso que normalmente puede tomar más de 100 años). La concentración de este aditivo puede variarse dependiendo de la vida útil del producto al cual se lo aplica (Anderson materials evaluation, Inc., 2017).

Otra vía de degradación de los polímeros sintéticos se da por radiación electromagnética, como radiación ultravioleta y radiación gamma. La energía contenida en las ondas que chocan con el plástico deteriora el material, causando cambios físicos en el mismo, y de esta manera, acelerando el proceso de oxidación. Este fenómeno es común en las cubiertas plásticas utilizadas en invernaderos, las cuales están fabricadas de polietileno de alta densidad. La constante exposición a la radiación solar deteriora las cubiertas, a tal punto que deben ser reemplazadas cada 2 años aproximadamente. (Nguyen, 2014)

La degradación de polímeros sintéticos puede darse también por vía térmica. Los plásticos, si bien son inertes ante la mayoría de sustancias, tienen una debilidad ante el calor.

Con temperaturas suficientemente altas, los plásticos (termoformables) se funden, y en presencia de oxígeno, se combustionan (Callister & Rethwisch, 2014).

Finalmente existe la vía de degradación biológica, la cual es mediada por microorganismos. Este proceso es el método de reciclaje de la naturaleza, donde hongos y bacterias se alimentan de desechos, y los metabolizan en elementos base que se incorporan nuevamente al medio ambiente. Sin embargo, los polímeros sintéticos no son afines a los procesos de biodegradación. La explicación yace en el hecho de que los plásticos han estado presentes en la biósfera por no más de un siglo, por tanto, muy pocas bacterias y hongos han tenido tiempo para desarrollar mecanismos para la descomposición de estos polímeros.

Según Dussud y Ghiglione, existen cuatro pasos en el proceso de biodegradación de polímeros sintéticos. El primero es el bio-deterioro, etapa marcada por la acción de comunidades microbianas sobre la superficie del plástico, la cual es deteriorada y envejecida. También las propiedades físicas, químicas y mecánicas de la muestra cambian. La segunda etapa es la bio-fragmentación. Ésta se refiere a la acción catalítica que sintetiza los plásticos poliméricos en oligómeros, dímeros o monómeros, mediante enzimas y radicales libres segregados por los microorganismos. La siguiente etapa es la asimilación, proceso caracterizado por la integración de las moléculas transportadas en el citoplasma al metabolismo del microbio. Se concluye con la mineralización, etapa donde ocurre la total degradación de estas moléculas, resultado de la excreción de metabolitos completamente oxidados (dióxido de carbono, agua, nitrógeno molecular, metano, entre otros) (Dussud & Ghiglione, 2017).

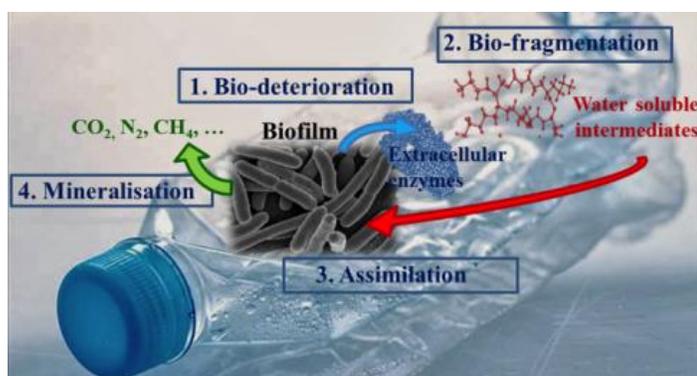


Figura 2: Proceso de biodegradación del plástico (Dussud & Ghiglione, 2017)

2.2.- Hongos como descomponedores

2.2.1.- Características biológicas

Los hongos son organismos vivientes con propiedades únicas, razón por la cual son clasificados en un reino particular: el Reino Fungi. Comúnmente, se los representa como su cuerpo fructificado de un basidiomiceto, es decir, el sombrero apoyado sobre el pedúnculo; sin embargo, no todas las especies crecen de esta manera. Su cuerpo está formado principalmente por micelio. Éste es un tejido formado por filamentos celulares que se asimilan a hilos y se conocen como hifas. En algunas especies de hongos, las hifas son células individuales, mientras que en otras, éstas están subdivididas en varias células. Si las condiciones se prestan, las hifas se reproducen rápidamente y se proyectan sobre el sustrato, pudiendo apreciarse a simple vista. En ciertas especies, el micelio abre paso al crecimiento del cuerpo fructificado del hongo, el cual en muchos casos puede ser utilizado como alimento (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

Los hongos, como todo ser vivo, necesitan una fuente de energía para sobrevivir. Al igual que los animales, éstos son organismos heterótrofos. Algunas especies se alimentan de sustratos orgánicos inertes, mientras que otros viven a costa de un huésped, al cual parasitan. Existe también la relación simbiótica entre hongos y otros organismos, generalmente especies de árboles sobre los cuales éstos crecen y ayudan al vegetal a mantenerse libre de parásitos (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

Al igual que los animales y vegetales, los hongos están formados por células eucariotas. Éstas poseen una membrana nuclear que contiene el material genético del organismo. Por otra parte, los hongos no forman embriones. Su reproducción se da a través de esporas, las cuales son pequeñas y ligeras células que se forman en gran cantidad. Éstas se diseminan con facilidad en el ambiente, a través del viento, agua, u organismos portadores, hasta alcanzar un sustrato adecuado para multiplicarse hasta formar un nuevo micelio (Durrieu, 2016).

La impresionante tasa de crecimiento que caracteriza a la mayoría de los organismos del reino fungi se explica gracias a su capacidad de reproducirse asexualmente. Ésta le permite al

hongo crecer de forma rápida en prácticamente cualquier sustrato orgánico en cualquier momento. Este mecanismo de reproducción de los hongos parte de la formación de esporas asexuales haploides por el micelio del mismo. Éstas, al caer sobre un sustrato favorable, se dividen mitóticamente hasta formar un nuevo micelio. El nuevo organismo posee la misma carga genética que el hongo progenitor, es decir que es un clon del mismo (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

La reproducción sexual, por el contrario, se da estacionalmente a lo largo de la vida del hongo. Ocurre cuando dos micelios compatibles de diferentes cepas entran en contacto, permitiendo que las hifas de ambos individuos se fusionen, de tal manera que los núcleos se juntan y eventualmente forman un cigoto diploide. Éste se divide por meiosis y produce esporas sexuales haploides. Los micelios formados por estas esporas poseen una configuración genética diferente a aquella de sus progenitores (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

En la naturaleza, los hongos cumplen distintos papeles en los ecosistemas, formando estructuras endófitas y relaciones simbióticas con vegetales; sin embargo, la labor más importante que desempeñan estos organismos es sin duda el de descomponedores. Gracias a una variedad de enzimas especializadas que se producen en sus células, los hongos son los únicos organismos capaces de destruir la lignina y celulosa presente en el tejido vegetal. Pero no se limitan a árboles o plantas muertas. Los hongos descomponen todo tipo de resto orgánico, liberando al mismo tiempo sustancias nutrientes que están presentes en la materia que están digiriendo. De esta manera cumplen con el papel de recicladores de la naturaleza; y aunque muchas especies de hongos son parásitos, la homeostasis de todo ecosistema depende de estos organismos (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

2.2.2.-Clasificación

Existen registros de más de 100.000 especies de hongos; sin embargo, se sabe que hay muchas más por descubrir. La diversidad de este reino es tan grande como aquella del reino animal o vegetal. Los hongos se clasifican en 4 filums: los quitridiomycetos, cigomicetos, ascomycetos y basidiomicetos (Durrieu, 2016). En lo que respecta a las especies utilizadas en el presente estudio, las cepas de *Fusarium*, *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Cladosporium* y *Penicillium*

pertenecen al filum *Ascomycota*, mientras que la cepa de *Pleurotus* pertenece a la familia *basidiomycota* (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

Quitridiomycetos (Chytridomycota)

Los hongos pertenecientes a este filum se caracterizan por producir esporas flageladas de tipo diploide o haploide. Celularmente, no forman septos; es decir que las hifas están formadas por células individuales con núcleos independientes. Viven mayoritariamente en medios acuáticos; y como se sabe, los primeros vestigios de vida surgieron de los océanos. Esto concuerda, ya que los quitridiomycetos fueron los primeros hongos de los que se tiene registros, siendo éstos fósiles que datan de hace más de 600 millones de años (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

La dieta de los quitridiomycetos está compuesta en su mayoría por algas muertas o residuos orgánicos marinos. También se caracterizan por ser parásitos de especies de animales y plantas, constituyendo una amenaza para otros organismos vivos (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

Cigomicetos (Zygomycota)

En contraste con los quitridiomycetos, los cigomicetos viven en la superficie terrestre. Pueden reproducirse a través de cigoesporas diploides, las cuales se forman a partir de gametangios, en un proceso conocido como copulación gametangial. Por el otro lado, su reproducción asexual se da a través de esporas haploides, producidas por unas hifas especializadas llamadas esporangióforos. Éstas tejen una estructura de aspecto negro llamada esporangio, la cual dispersa las células reproductivas en el ambiente (Curtis, Schnek, Barnes, & Massarini, 2008).

El tipo más común de cigomiceto es el moho negro que crece en el pan y en algunas frutas. pero la mayoría de especies se encuentran en ecosistemas terrestres, y se alimentan de materia orgánica producida por árboles y otros animales (Curtis, Schnek, Barnes, & Massarini, 2008).

Ascomicetos (Ascomycota)

Los ascomicetos se caracterizan por tener cuerpos fructíferos con formas llamativas. Algunos parecen tazas, y otros poseen una textura corrugada. Al igual que el resto de familias de hongos, éstos se reproducen sexual y asexualmente. En la reproducción sexual, las esporas se forman a partir del apareamiento de hifas de cepas diferentes, con la diferencia de que, como paso final, se producen unos sacos llamados ascas, los cuales encierran varias esporas (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

Los ascomicetos se encuentran principalmente en la vegetación forestal. Otros se encuentran en el ambiente doméstico, pudiendo identificarse como los mohos coloridos que aparecen en frutas u otros alimentos. Entre las especies más conocidas de ascomicetos están las levaduras y el *Penicillium* (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

Basidiomicetos (Basidiomycota)

En general, los basidiomicetos se reproducen sexualmente, razón por la cual su crecimiento es más lento que el de aquellos que se reproducen de ambas maneras. El mecanismo en esencia es el mismo; dos hifas de cepas diferentes se fusionan para formar células diploides llamadas basidios, las cuales, mediante meiosis, forman basidiosporas. Todo esto ocurre en el cuerpo fructífero del hongo, el cual se caracteriza por tener forma de clava o sombrilla. Cuando el cuerpo fructífero está maduro, se puede encontrar en su parte inferior un patrón formado por laminillas. Es precisamente en esta región donde se forman los basidios y posteriormente las basidiosporas, que serán segregadas al ambiente y transportadas por el viento (u otros portadores) hasta hallar un sustrato adecuado donde germinar (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

2.3.- Métodos de reducción de masa residual plástica

El tratamiento de residuos plásticos es una cuestión que concierne a un gran número de actores que básicamente está compuesto por ciudadanos corrientes, industrias, instituciones, autoridades locales y nacionales. La importancia de esta actividad radica en la problemática

tratada en secciones previas. Existen varios métodos para reducir la masa residual plástica, evitando que esta se acumule en botaderos o vaya a parar en lugares indeseados. El primero y más popular es el reciclaje. Sin duda una de las más grandes ventajas de los plásticos termoformables como el polietilentereftalato (PET) o el polietileno (PE) es que se les puede dar un nuevo ciclo de vida, al someterlos a calentamiento y reacondicionarlos para cumplir un propósito diferente. Un segundo método de tratamiento es el compostaje, el cual consiste en crear medios de descomposición controlados, donde los residuos plásticos, juntamente con materia orgánica residual presente en botaderos y rellenos sanitarios, se degrade de manera acelerada. Finalmente, en los últimos años han surgido métodos alternativos para el tratamiento de plásticos. Éstos se basan en la reutilización de los mismos, a través de procesos que aumentan su valor agregado. Entre éstos están la fabricación de artesanías, fibras plásticas, ladrillos de botellas, entre otros.

2.3.1.-Reciclaje.

El manejo post-consumo de desechos plásticos en el Ecuador está estandarizado por la norma INEN 2634. Ésta detalla la metodología y requisitos que deben cumplirse en los procesos de fabricación, importación, comercialización, recolección, almacenamiento, clasificación, tratamiento y disposición final de materiales plásticos (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2012).

El reciclaje consta de diversas etapas. Este proceso empieza en la misma fabricación de los productos o envases. Su diseño debe contemplar algún mecanismo que facilite su clasificación y reducción de tamaño. Así mismo, los plásticos deben incluir la rotulación adecuada que indique el tipo de plástico del que fue fabricado. También se debe evitar el uso de materiales incompatibles con el proceso de reciclaje, los que pueden encontrarse en las etiquetas, tapas u otros componentes de los productos plásticos (Forrest, 2012). El siguiente paso es la gestión de estos desechos, la cual se realiza de manera organizada. Se separan los residuos plásticos de los desechos inorgánicos, y se evita mezclar envases cuya función haya sido la contención de disolventes, hidrocarburos o productos tóxicos con aquellos cuya función fue el almacenamiento de alimentos. Posteriormente se procede a la recolección de los desechos plásticos, proceso que se limita al transporte de los mismos. Luego, éstos pasan a ser

almacenados y clasificados según la resina utilizada para su fabricación. Ésta puede identificarse fácilmente con el símbolo y código impreso en el reverso de la mayoría de envases plásticos. Finalmente se procesa el plástico. Entre los tratamientos utilizados está el aglutinado, lavado, molido, peletizado y pulverizado; operaciones que llevan a los residuos a convertirse en una nueva materia prima. También se aplican tratamientos de calor, cuyo objetivo es dar maleabilidad a los residuos plásticos. Después se agrega aditivos y éstos son moldeados nuevamente, obteniendo la forma necesitada para su nueva utilización (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2012).

Otras opciones que se les da a los residuos plásticos son la incineración y confinamiento. Ambas opciones se llevan a cabo únicamente si los residuos con los que se trabaja no pueden reciclarse de manera convencional (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2012).

2.3.2.- Compostaje.

El compostaje es una opción más viable en cuanto a tratamiento de residuos plásticos se refiere. Al igual que el reciclaje, existen normas creadas por el Instituto Ecuatoriano de Normalización que detallan metodologías a utilizarse para este fin. Entre sus ventajas está la existencia de consorcios de microorganismos que favorecen la concentración de enzimas descomponedoras de polímeros sintéticos. También, este proceso puede implementarse y controlarse fácilmente en sitios destinados para la degradación de este tipo de residuos (Instituto Ecuatoriano de Normalización, 2012).

La búsqueda de una enzima o un microorganismo que sea capaz de degradar eficazmente cadenas poliméricas artificiales es clave para potenciar la efectividad de este método. De esta forma, se podría aislar el gen responsable de la producción de dicha enzima e introducirlo en una cepa de bacterias, cuya reproducción controlada y diseminación en botaderos, compostajes o rellenos se convierta en un método efectivo y económico para la reducción de residuos plásticos (Gu, 2003).

2.3.3.- Métodos alternativos

Los métodos alternativos para la reducción de basura de plásticos son iniciativas mayoritariamente artesanales. Si bien su aplicación a gran escala no es viable, estas técnicas son una opción llamativa para pequeños proyectos o planes comunitarios.

Al igual que con otros materiales como metales o telas, los residuos plásticos son utilizados por artesanos para la fabricación de elementos ornamentales, fibras, tejidos, tramados, entre otros. También se suele construir estructuras con ladrillos de botellas de polietilentereftalato rellenas de tierra (Valdecabres, 2015).

2.4.- Métodos de caracterización y análisis de las muestras experimentales

La biodegradación de una muestra de plástico difícilmente puede ser apreciada a simple vista, al menos cuando el tiempo de exposición de la misma al material biológico es corto. Para realizar un análisis cuantitativo y cualitativo de tal proceso, es necesario el uso de diferentes herramientas y métodos de caracterización.

2.4.1.- Microscopía electrónica de barrido (SEM)

La microscopía electrónica de barrido, o SEM por sus siglas en inglés, es un método de análisis que enfoca un haz de electrones de alta intensidad sobre una muestra sólida para generar una variedad de señales en su superficie. La reacción entre estos electrones y la muestra analizada revelan información acerca de la misma, como su morfología externa, composición química, estructura cristalina y orientación de sus componentes. A lo largo del análisis se genera una imagen bidimensional, que muestra las variaciones espaciales relacionadas con estas propiedades (Swapp, 2017).

Los electrones disparados por el microscopio llevan una gran cantidad de energía cinética, la cual es disipada como una variedad de señales producto de la interacción electrón-muestra al momento de la desaceleración de los mismos al llegar a la superficie sólida. Estas señales incluyen electrones secundarios, dispersados, dispersados difractados, fotones, luz visible y calor. Los electrones secundarios dan información acerca de la morfología y topología

de la muestra. Los electrones dispersados, por su parte, ilustran contrastes y composición en muestras heterogéneas. Se considera que la microscopía electrónica de barrido es un método de análisis no destructivo, lo que significa que no hay alteración en la composición de la muestra o pérdida de masa en la misma a lo largo del análisis (Swapp, 2017).

Un microscopio electrónico de barrido puede analizar áreas cuadradas de 1 cm hasta 5 micrones, con un aumento de 20X a 30.000X y una resolución espacial de 50nm a 100nm (Swapp, 2017).

2.4.2.- Espectroscopía infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier, o FTIR por sus siglas en inglés, es un método de análisis químico cuyo fundamento es la interacción de la radiación infrarroja con la materia. El espectrofotómetro es un equipo que direcciona un haz de radiación de dicha frecuencia hacia la muestra a analizar. Ésta absorbe cierta cantidad de radiación, mientras que la porción restante la atraviesa. La radiación que traspasa la muestra es detectada por el equipo, el cual, con esta información, forma una especie de huella dactilar molecular del ejemplar analizado (Bradley, 2017).

El arreglo y fuerza de los enlaces químicos tienen un efecto directo en los modos vibracionales característicos de la molécula, lo que resulta en la formación de un espectro característico de absorción, el cual puede utilizarse para determinar y cuantificar compuestos químicos. En otras palabras, cada grupo funcional, en dependencia del tipo de enlaces que lo forman, absorbe una frecuencia característica de radiación infrarroja. De esta manera, el espectrofotómetro genera una gráfica de absorbancia (o transmitancia) versus frecuencia, donde se mostrarán picos (o depresiones) en las bandas correspondientes a los grupos funcionales presentes en la muestra analizada (Bradley, 2017).

El espectro infrarrojo de una muestra de polietileno degradada se caracteriza por la presencia de pequeños picos de absorbancia cuando la longitud de onda alcanza los 1690 cm^{-1} aproximadamente, la cual corresponde al modo vibracional de estiramiento del grupo carbonilo (Forrest, 2012). La presencia de este grupo funcional en una muestra de polietileno significa que sus cadenas poliméricas forzosamente se fraccionaron, efecto que responde al fenómeno

de degradación del material. Condiciones de prolongada exposición a la intemperie y radiación ultravioleta generan una reacción de oxidación entre el oxígeno del medio con los átomos de carbono de las moléculas del polímero. El enlace σ que mantiene juntos a los carbonos del polietileno se rompe, para luego enlazarse con un átomo de oxígeno por medio de un enlace π (Luz, Paes, Nunes, Silva, & Megum, 2013). De esta manera se crean interrupciones en las cadenas, y como consecuencia, el peso molecular del polímero disminuye (Nguyen, 2014). Se recalca que polímeros con pesos moleculares bajos son más propicios a ser asimilados por microorganismos.

3.-MÉTODOS EXPERIMENTALES

A fin de estudiar la biodegradación de plástico mediada por microorganismos, fue necesario diseñar un experimento que permitiese crear las condiciones propicias para fomentar este proceso. La fase experimental del proyecto comenzó con la obtención y preparación de las muestras de microbios a utilizarse, así como la adquisición y pretratamiento de las muestras de polímero sintético. Posteriormente se inició la fase de cultivo, donde los ejemplares de plástico a degradar fueron inoculados con material biológico, y luego incubados. Finalmente se analizó y caracterizó fisicoquímicamente las muestras de plástico por variación de peso, microscopía electrónica de barrido y espectroscopía infrarroja por transformada de Fourier. El diagrama de flujo global se aprecia en la figura 3.

El diseño experimental del presente proyecto consta de dos variables dependientes: la cepa del microorganismo a utilizarse y el tiempo de cultivo de cada muestra. El tipo de polímero sintético utilizado se mantuvo constante, al igual que la composición del medio de cultivo. Se realizaron 2 controles, un control positivo de crecimiento microbiano y un control negativo de crecimiento microbiano. Cada experimento se realizó por cuadruplicado, a excepción de los controles positivos de crecimiento que se realizaron por triplicado. En resumen, se trabajó con 6 muestras de microorganismos, cada una de las cuales se incubó durante 3 períodos de tiempo diferentes (35, 60 y 90 días), resultando en 72 corridas. A éstas se les adiciona 4 controles

negativos de crecimiento y 18 controles positivos de crecimiento, obteniéndose un total global de 96 experimentos.

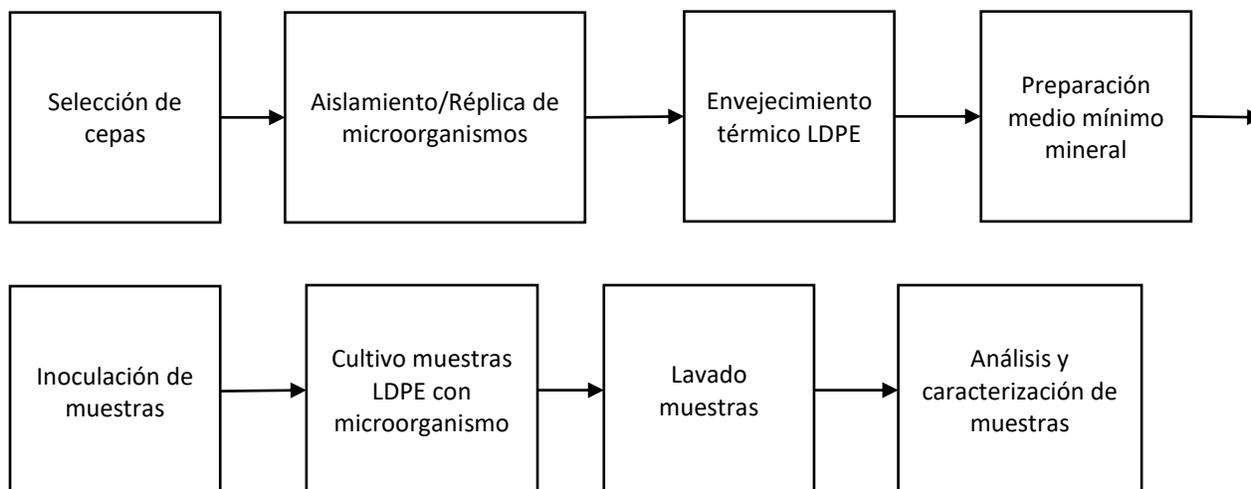


Figura 3: Etapas de la investigación

3.1.- Selección y cultivo de las cepas de microorganismos

3.1.1.- Selección

Los microorganismos elegidos para efectuar el tratamiento de degradación biológica a las muestras de polietileno de baja densidad fueron definidos en base a una extensa búsqueda bibliográfica. Se elaboró una lista de posibles candidatos, los cuales demostraron tener cierta capacidad para degradar polímeros sintéticos en experimentos previos realizados alrededor de mundo.

El siguiente criterio de selección se basó en la disposición de las cepas y su facilidad de obtención. El banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la USFQ estaba provisto de muestras de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*. Adicional a éstas, se obtuvo comercialmente una muestra de *Pleurotus*, la cual se encontraba en fase de propágulo; inoculada en un sustrato de trigo y aserrín. Se decidió

trabajar únicamente con hongos, dado la complicación adicional y tiempo que requiere el aislamiento y cultivo de bacterias.

3.1.2.- Preparación de medios de cultivo para la réplica de los microorganismos

El medio de cultivo elegido para replicar o aislar los microorganismos fue agar de papa y dextrosa (PDA), a causa de la afinidad de los hongos por el mismo (Sánchez, 2010). La metodología detallada utilizada en la investigación se encuentra detallada en el anexo 4.

3.1.3- Réplica y aislamiento

Se replicaron las cepas de *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Penicillium*, *Trichoderma* y *Fusarium*. Este proceso fue repetido hasta obtener muestras puras de cada microorganismo; libres de contaminación de bacterias u otros hongos. En cuanto a la cepa de *Pleurotus*, se procedió a aislarla en cajas petri. La metodología que se siguió en esta etapa está detallada en el anexo 5.

3.2.- Medio mínimo mineral

El tratamiento de degradación biológica del proyecto se realizó en medio mínimo mineral, el cual consiste en una mezcla de varias sales presentes en diversas concentraciones. Dichas sales proporcionan los electrolitos y minerales necesarios para el crecimiento de los microorganismos; sin embargo, los nutrientes básicos como el nitrógeno y fósforo se encuentran en cantidades limitadas. La concentración de carbono en el medio es nula, a fin de obligar al hongo a tomar aquel que está presente en las cadenas poliméricas de la muestra de plástico como alimento (Tien & Kirk, 1988).

La utilización de una solución mineral como medio de cultivo conlleva ciertas ventajas, como el control de elementos presentes que interferirán en el proceso metabólico de los microorganismos, al igual que su concentración. También, el cultivo en medio mineral asegura la asepsia del proceso, minimizando la posibilidad de que un microorganismo diferente al inoculado interfiera con el experimento (Perkins, 2006).

Al igual que para la selección de los microorganismos a utilizarse, se decidió realizar una extensa búsqueda bibliográfica, a fin de comparar las composiciones de diferentes medios y su

afinidad con las muestras de microorganismos seleccionadas para el experimento. Se optó por trabajar con la composición propuesta en la publicación de Koutny et al (Koutny, Sancelme, Dabin, & Pichon, 2005); sin embargo, fue necesario realizar algunos cambios que responden a la disponibilidad de reactivos del Departamento de Ingeniería Química de la USFQ.

El medio mínimo utilizado está compuesto por una solución principal (tabla 1) y una solución de trazas (tabla 2).

La composición del medio mineral para 1L de agua destilada se detalla en la tabla 1. La composición de la solución de trazas para 500 ml de agua destilada se detalla en la tabla 2.

Tabla 1: Composición del medio mínimo mineral

Especie	Cantidad
Na ₂ HPO ₄	3.8 g
KH ₂ PO ₄	1.8 g
MgSO ₄	0.02 g
FeSO ₄	0.03 g
CaSO ₄	0.01 g
NaCl	0.5 g
NH ₄ Cl	0.3 g
Solución de trazas	1 ml

Tabla 2: Composición de la solución de trazas

Especie	Cantidad
MnSO ₄	0.2 g
ZnSO ₄	0.022 g
Co(NO ₃) ₂	Trazas
CuSO ₄	Trazas

3.3.- Selección, preparación y tratamiento de las muestras de LDPE

El polímero sintético elegido para la realización del experimento fue el polietileno de baja densidad (LDPE). La razón de ello es fundamentalmente el hecho de que su estructura molecular es de las menos complejas que se puede encontrar en lo que a plásticos se refiere, por tanto, es la más propicia a ser oxidada y degradada.

Las muestras de LDPE utilizadas en el experimento fueron láminas plásticas que se distribuyen comercialmente bajo el nombre de Green Wrap, y son fabricadas nacionalmente por la empresa Polipack CIA. LTDA. Su aplicación principal es la envoltura de alimentos.



Figura 4: Muestra del LDPE usado en el experimento

3.3.1.- Preparación inicial de las muestras de LDPE.

Para la preparación de las muestras de LDPE se recortaron cuadrados de aproximadamente 15 cm por 20 cm de la lámina de LDPE, con un peso aproximado de 500 miligramos. Luego, se midió y registró la masa de cada muestra en una balanza analítica. Se etiquetó y dividió las láminas en 3 grupos diferentes, de acuerdo con los tratamientos a los que se las sometió. Dichos grupos se detallan en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3: Grupos de muestras experimentales

Tratamiento	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3
Envejecimiento térmico		X	X
Degradación biológica			X

Las muestras del grupo 1 no fueron sometidas a ningún tratamiento, las muestras del grupo 2 fueron sometidas a un tratamiento de envejecimiento térmico y las muestras del grupo 3 fueron sometidas a ambos tratamientos.

3.3.2.-Tratamiento físico de envejecimiento.

Se realizó un tratamiento físico de envejecimiento térmico a las muestras de plástico del grupo 2. Para ello se sumergió cada una de las muestras en 150 ml de agua destilada, en frascos de vidrio de 300 ml. Los frascos fueron tapados con papel aluminio, y posteriormente autoclavados a 121°C por 20 minutos. Después, las muestras fueron extraídas de los frascos para luego ser introducidas en una cámara de secado a 30°C por 48h. El paso final fue pesarlas nuevamente en la balanza analítica y registrar la variación de la medición con respecto al primer pesaje (Nguyen, 2014).



Figura 5: Muestras envejecidas después de salir del autoclave

3.4.- Preparación, análisis y caracterización de las muestras de cultivo

3.4.1.- Preparación de los controles del experimento

LDPE previo al tratamiento de envejecimiento térmico

Se tomó una porción de LDPE sin haber sido sometida a ningún tratamiento, del mismo lote utilizado en todos los experimentos, para ser analizada y caracterizada con los métodos propuestos. El objetivo de este control es confirmar que la composición de la muestra de plástico corresponde a aquella establecida por el fabricante. De esta manera, se obtiene el

punto de partida para comparar los resultados obtenidos en los análisis de las diversas muestras experimentales.

LDPE posterior al tratamiento de envejecimiento térmico

Se recortó cuatro láminas de LDPE de tamaño similar, se midió y registró su masa. Después se las expuso al tratamiento de envejecimiento térmico. Luego se las secó y pesó; para finalmente someterlas a los métodos de análisis y caracterización propuestos. El objetivo de este control fue analizar el efecto del tratamiento de envejecimiento térmico en las muestras de plástico, al cuantificar cualitativamente el grado de oxidación en las mismas antes de pasar por el tratamiento de degradación biológica. El análisis por FTIR brinda esta información.

Control negativo de crecimiento microbiano

Se preparó las muestras de LDPE de igual manera que para el caso anterior. Después se las sumergió en recipientes con 150 ml de medio mineral. Éstos pasaron nuevamente por el autoclave, para luego ser encubadas por un período de 90 días, en las mismas condiciones que las demás muestras experimentales. El objetivo de este control fue analizar el efecto de las sales en solución presentes en el medio mineral sobre las muestras de plástico, sin la presencia de microorganismos.

Control positivo de crecimiento microbiano

Se preparó las muestras de LDPE de igual manera que para el control negativo de crecimiento. Adicionalmente se agregaron 30 gramos de sacarosa en cada frasco, a fin de concentrarla al 20% en peso. Los frascos pasaron nuevamente por el autoclave, para luego ser inoculados con material biológico (usando la misma metodología que se detalla en la sección 3.4.2). Se inoculó 3 frascos por cada cepa de microorganismo, y se las encubó por un período de 90 días, en las mismas condiciones que las demás muestras experimentales. El objetivo de este control fue analizar la selectividad del microorganismo por la muestra de plástico, teniendo a disposición la sacarosa como fuente directa de carbono. Este control sirve también para confirmar la fuerza, crecimiento y desarrollo del microorganismo en los medios de cultivo.

3.4.2.- Inoculación de las muestras experimentales.

En primer lugar, se etiquetó frascos de 300ml suficientes para cada muestra a inocular. Después, se agregaron 150 ml del medio mineral preparado con anterioridad a cada frasco, como se observa en la figura 6. A continuación, se colocó la muestra de plástico seca y envejecida dentro de los recipientes y luego se los tapó con papel aluminio. Éstos fueron autoclavados a 121°C por 20 minutos, proceso después del cual se dejaron enfriar y se trasladaron a la cámara de siembra para su inoculación con material biológico.



Figura 6: Preparación de muestras previo a la inoculación

Con las muestras de microorganismos listas, se procedió a extraer el micelio y esporas de cada hongo utilizando la técnica de raspado. Para ello se vertió en el interior de la caja de cultivo del microorganismo a tratar una pequeña porción de medio mineral. Usando un asa, se frotó suavemente el fondo de la caja, con la intención de disolver al microorganismo en el medio de cultivo, como se aprecia en la figura 7. Después, se trasladó el contenido de la caja en un tubo ependorff, y con una micropipeta, se absorbieron 1000 microlitros de la solución de raspado y se inoculó cada una de las muestras. Finalmente, éstas fueron tapadas con papel aluminio y almacenadas para su incubación en un sitio fresco y privado de luz.

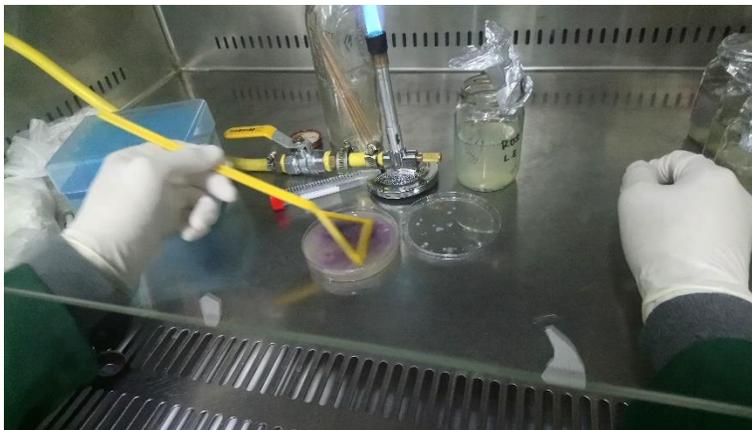


Figura 7: Raspado previo a la inoculación (Fusarium)

Este proceso se realizó en tres períodos de tiempo diferentes (35, 60 y 90 días).

3.4.3.- Manejo de las muestras post tratamiento de degradación biológica

Después de haberse cumplido el tiempo de incubación requerido para cada muestra, éstas fueron separadas del medio de cultivo, y, posteriormente, sumergidas en una solución de dodecil sulfato sódico (SDS) al 1% p/v durante 72 horas. Después, se prosiguió con un segundo lavado, igualmente sumergiendo las muestras en una solución de hipoclorito de sodio al 1% p/v, durante 72 horas. De esta manera se intenta eliminar todo resto de materia viva presente en los ejemplares de LDPE. El siguiente paso fue realizar un lavado minucioso de cada muestra con agua destilada, a fin de eliminar toda traza residual de hipoclorito de sodio presente en las mismas. Para ello se enjuagó cada ejemplar de LDPE con agua destilada, se frotó ligeramente y finalmente se los sumergió en la misma sustancia durante un período de 72h. Finalmente, se introdujo las muestras en una estufa a 60°C durante 48 horas, a fin de remover toda la humedad residual. Terminado este proceso las muestras se consideraron aptas para ser sometidas a los ensayos de análisis y caracterización.

3.4.4.- Métodos de análisis y caracterización.

Variación en peso

Se registró la masa de las muestras de LDPE antes y después de ser sometidas al tratamiento de degradación biológica. Todas las muestras se encontraban completamente secas al momento de ser pesadas. El pesaje se realizó en una balanza analítica modelo *Ohaus*

Explorer con precisión de cinco cifras significativas, perteneciente al Departamento de Ingeniería Química de la USFQ. Se tuvo especial cuidado en no contaminar las muestras con impurezas; éstas se manejaron siempre con guantes de látex y pinzas.

Microscopía electrónica de barrido (SEM)

Se eligió una muestra de cada grupo experimental para someterla a análisis por microscopía electrónica de barrido. Se tomó una muestra del Grupo I (previo al tratamiento de envejecimiento), una del Grupo II (posterior al tratamiento de envejecimiento) y del grupo 3 se tomó una de las muestras tratadas durante 90 días con cada cepa de hongo. Además, se tomó una muestra del control negativo y una muestra tratada con cada cepa de hongos en control positivo, analizándose un total de 18 muestras mediante este método.

Después de que las muestras fueron pesadas, de cada una se recortó una porción del plástico de aproximadamente 1 cm², y se la almacenó en un tubo *ependorf* debidamente etiquetado. Se prestó especial atención en no lastimar las muestras con las pinzas, ni contaminarlas de manera alguna. También, se procuró tomarlas de los sectores superficiales del plástico, ya que éstos tuvieron mayor exposición al microorganismo.

Durante el análisis, se escrutó cuidadosamente varias porciones de las muestras, a fin de obtener una idea clara de su morfología. Se capturó imágenes a distintos aumentos, desde 50X hasta 2000X. Se trabajó mayoritariamente a un voltaje de 7kV y 70 Pa de presión. El equipo utilizado fue un *JEON JSM-IT300*.

Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR)

Se recortaron pedazos de aproximadamente 5 milímetros cuadrados de cada muestra, procurando que provengan de las secciones que tuvieron mayor contacto con el medio de cultivo. Con pinzas, se colocaron las muestras en el equipo de espectroscopía infrarroja y se corrió el análisis. Después de cada corrida se retiró la muestra y se lavó el lente con alcohol. El equipo utilizado fue un *Cary 630* de *Agilent Technologies*.

3.4.5.- Análisis estadístico

Los resultados de pérdida en peso se presentan como la media +/- desviación estándar de la variación porcentual de la masa respecto al valor inicial de cada muestra. Se excluyeron

los valores atípicos en cada población de datos. Los límites fuera de los cuales los valores se consideraron atípicos se determinaron mediante las ecuaciones (1) y (2).

$$\text{Límite superior} = Q_3 + (1.5 * IQR) \quad (1)$$

$$\text{Límite inferior} = Q_1 - (1.5 * IQR) \quad (2)$$

Donde Q_1 es el primer cuartil de la población, Q_3 el tercer cuartil de la población e IQR es la diferencia entre el tercer y primer cuartil (Devore, 2008).

La desviación estándar de cada población determina los límites superior e inferior de las barras de error en los gráficos de columnas.

4.- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1.- Selección y cultivo de las cepas de microorganismos

4.1.1.- Selección de microorganismos

En la tabla 4.1 se presenta la lista de posibles microorganismos a utilizarse en el proyecto. Las especies resaltadas son aquellas con las que se decidió trabajar definitivamente.

Tabla 4: Lista de microbios potencialmente capaces de degradar polímeros sintéticos

Hongos		Bacterias	
Especie	Subespecie	Especie	Subespecie
<i>Aspergillus</i> ^[6]	<i>japonicus/terreus</i>	<i>Rhodococcus</i> ^[1]	<i>rhodochrous/ruber</i>
<i>Cladosporium</i> ^[1]	<i>cladosporoides</i>	<i>Nocardia</i> ^[1]	<i>asteroides</i>
<i>Fomes</i> ^[3]	<i>annosus</i>	<i>Comamonas</i> ^[2]	<i>acidovorans</i>
<i>Fusarium</i> ^[5]	<i>redolens/solani</i>	<i>Bacillus</i> ^[2]	<i>pumillus</i>
<i>Odontia</i> ^[3]	<i>bicolor</i>	<i>Bacillus</i> ^[2]	<i>halodenitrificans</i>
<i>Penicillium</i> ^[2]	<i>simplicissimum</i>	<i>Bacillus</i> ^[2]	<i>cerreus</i>
<i>Peniphora</i> ^[3]	<i>gigantea</i>	<i>Pseudomona</i> ^[3]	<i>siringe/lemoigney</i>
<i>Pleurotus</i> ^[8]	<i>Ostreatus</i>	<i>Flavobacterium</i> ^[3]	-
<i>Trichoderma</i> ^[4]	<i>Harzianum</i>		

(Yamada-Onera, Mukumoto, Katsuyaya, Saiganji, & Tani, 2001)^[2], (Bonhomme, y otros, 2003)^[3], (Albertson, Barenstedt, & Karlsson, 1994)^[4], (Shah, Hasan, Hameed, & Ahmed, 2008)^[1], (Luz, Paes, Nunes, Silva, & Megum, 2013)^[8], (Albertsson, 1978)^[5], (Gajendiran, Krishnamoorthy, & Abraham, 2016)^[6]

Se eligió únicamente especies de hongos dada su disponibilidad en el Banco de Cepas del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la USFQ. Otra razón por la cual no se las consideró el trabajo con bacterias es que esto implica un proceso de aislamiento y réplica complejo, actividad que se desviaba del objetivo principal del proyecto, consumiendo demasiado tiempo y recursos.

Vale recalcar que se desconoce a ciencia cierta la subespecie de las muestras con las que se trabajó, a excepción de la cepa de *Trichoderma*, cuya subespecie es *harzianum*, y de la cepa de *Pleurotus*, la cual corresponde a la subespecie *ostreatus*.

Dado que el enfoque del presente trabajo de investigación no es precisamente el campo de la biología, no se puso énfasis en la determinación de la subespecie del resto de microorganismos utilizados. De todas maneras, se almacenó en el banco de cepas del Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos de la USFQ dos cepas replicadas de cada uno, a fin de que puedan ser estudiados y caracterizados en estudios posteriores.

4.1.2.- Réplica de las cepas seleccionadas

La principal dificultad que se presentó durante el proceso de réplica fue la contaminación de los medios. Se dividió el trabajo en dos grupos, el primero compuesto por las especies de esporulación rápida (*Aspergillus*, *Trichoderma* y *Penicillium*) y el segundo compuesto por *Cladosporium*, *Pleurotus* y *Fusarium*. Las cepas del primer grupo se replicaron en la cámara de esporulación rápida, mientras que las del segundo grupo se replicaron en la cámara de flujo laminar; ambas ubicadas en el Laboratorio de Biotecnología Agrícola y de Alimentos II de la USFQ. Las muestras de *Penicillium*, *Fusarium* y *Trichoderma* se vieron contaminadas con bacterias y *Aspergillus*. Para un segundo intento, se agregó un microlitro de gentamicina a cada caja de cultivo previo a la inoculación. Luego del período de incubación, se observó que ambas muestras crecieron exitosamente.

En las figuras 8-13 se observan las réplicas realizadas de las seis cepas de hongos. Las figuras de la izquierda corresponden a la vista superior, y las figuras de la derecha corresponden a la vista inferior de las cajas petri.

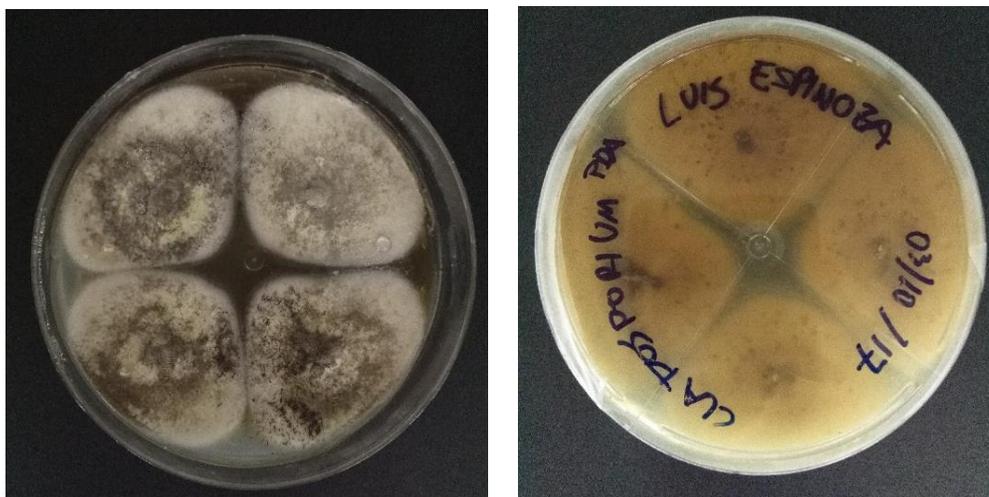


Figura 8: Réplica de Cladosporium sp.

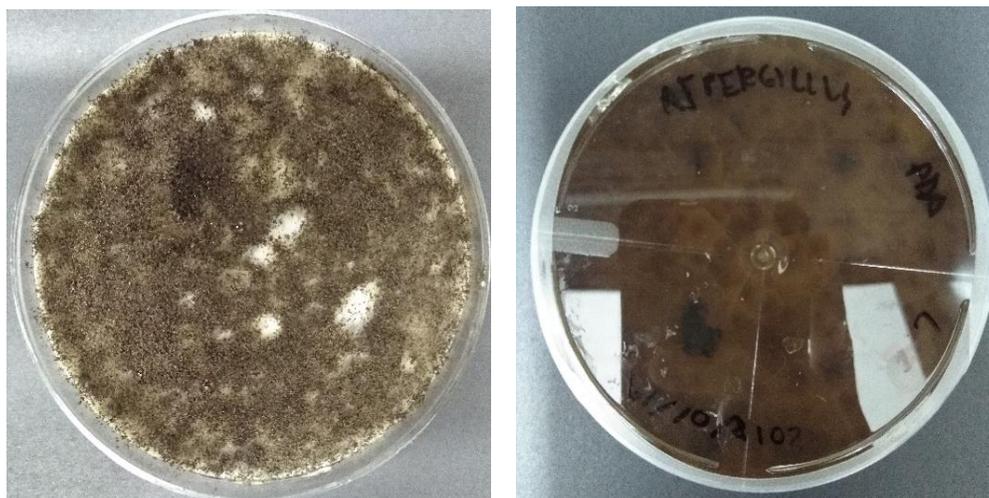


Figura 9: Réplica Aspergillus sp.

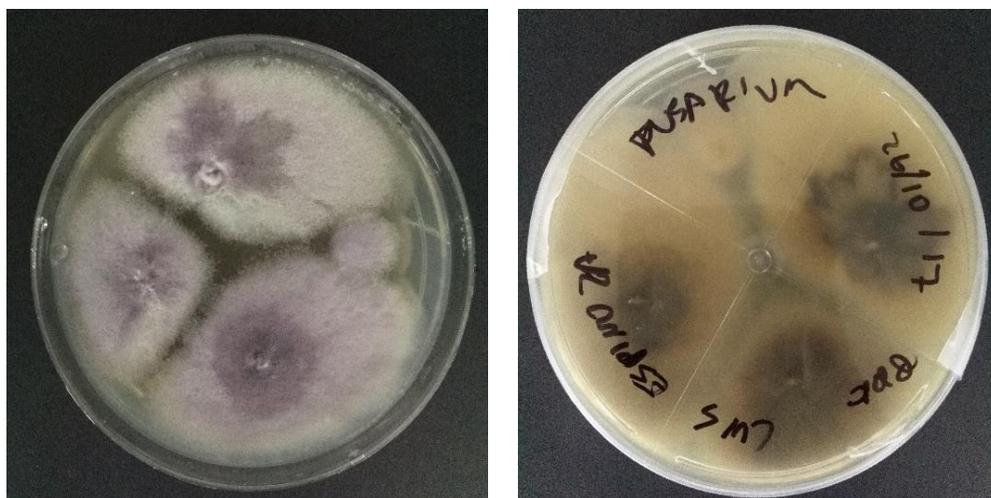


Figura 10: Réplica *Fusarium* sp.

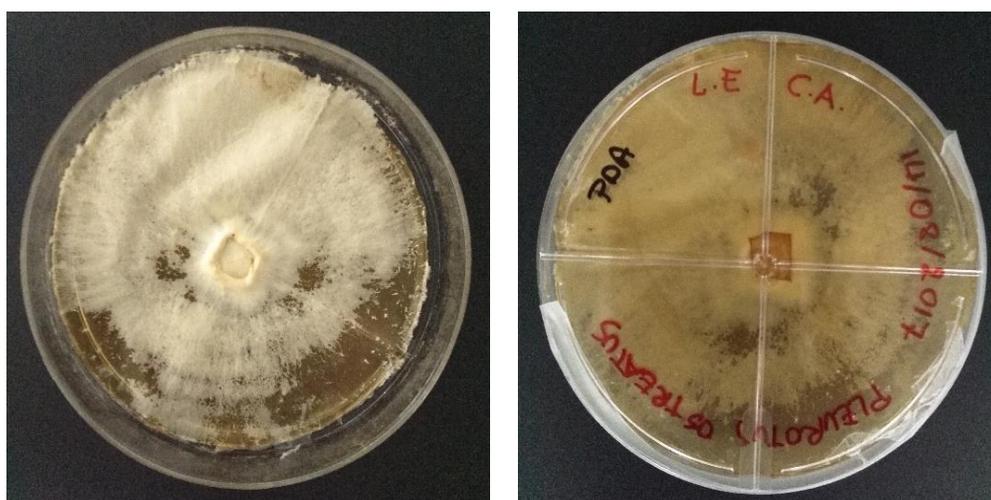


Figura 11: Réplica de *Pleurotus ostreatus*

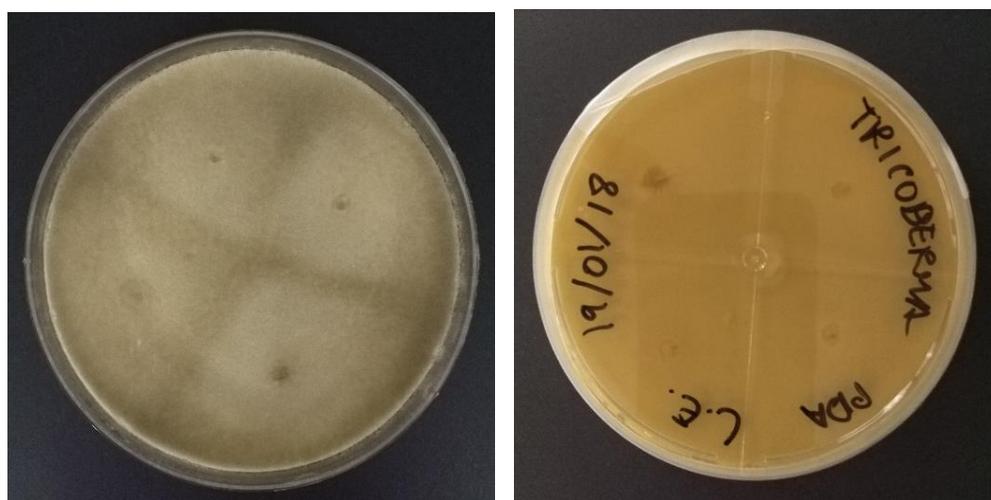


Figura 12: Réplica de *Trichoderma harzianum*



Figura 13: Réplica de *Penicillium* sp.

4.2.- Preparación y tratamiento de las muestras de LDPE

4.2.1.- Inoculación de los medios de cultivo

La inoculación de los medios de cultivo se inició con el raspado de las cepas, proceso que se realizó con cuidado, a fin de no despegar el medio de cultivo de la caja ni fragmentarlo. En el caso de la muestra de *Aspergillus*, la solución resultó más densa y concentrada que el resto, a causa de la gran cantidad de micelio que había crecido en la caja Petri. En el caso de la cepa de *Cladosporium*, se observaron pequeños cuerpos fructificados que sobresalían del micelio. Al realizar su raspado, hubo una pequeña cantidad de fragmentos sólidos que pasaron al tubo de ensayo, los cuales significaron una dificultad adicional al momento de succionar la alícuota de solución con la micropipeta. Por su parte, la cepa de *Pleurotus* presentó también fragmentos sólidos en forma de escamas que causaron problemas similares que la muestra anterior. El raspado del resto de cepas se realizó con normalidad y sin complicaciones.

En la figura 14 a continuación se aprecian los inóculos correspondientes a las 6 cepas de hongos utilizadas. Se puede notar que el color de cada solución es congruente con el color característico del micelio de cada microorganismo.

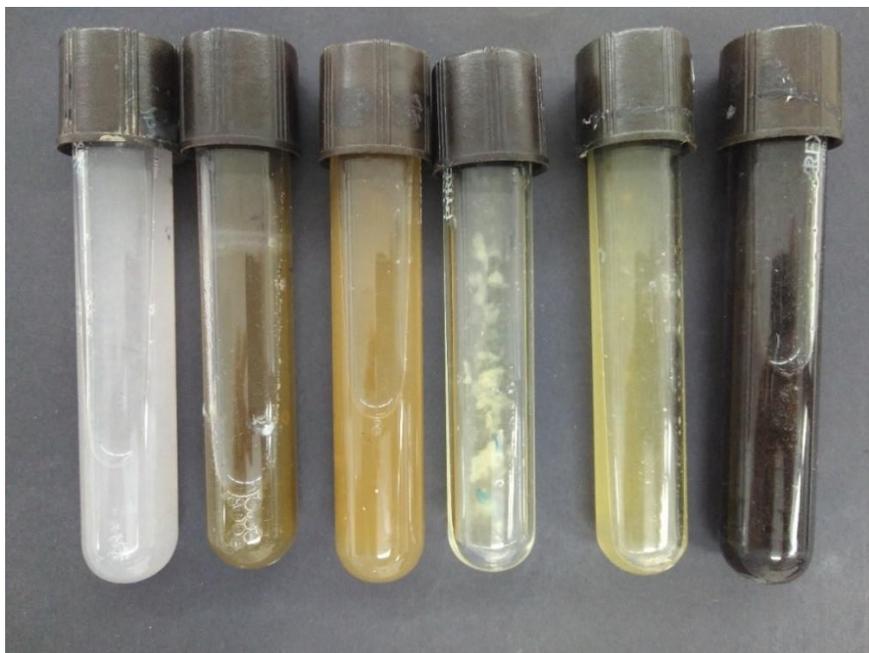


Figura 14: Inóculo de las cepas utilizadas; de izquierda a derecha: Fusarium, Penicillium, Cladosporium, Pleurotus, Trichoderma y Aspergillus

4.2.1.- Tratamiento de envejecimiento térmico

Con el tratamiento de envejecimiento térmico se inicia el proceso de degradación del LDPE. Su realización es clave para la obtención de resultados significativos en cortos tiempos de cultivo (Gu, 2003). Se encontró que, después de ser sometidas a condiciones de alta temperatura (121°C) y humedad en el autoclave, las láminas se adhirieron por sus extremos y se encogieron; tal y como se observa en la figura 15. La apariencia física de la muestra también cambió, revelando una superficie opaca y arrugada; sin embargo, ésta no se volvió significativamente más quebradiza o frágil.



Figura 15: Muestra de LDPE después del tratamiento de envejecimiento térmico

4.3.- Análisis y caracterización de las muestras después del tratamiento de degradación biológica

4.3.1.- Cambios durante el período de cultivo

Muestras experimentales.

La primera observación de las muestras inoculadas se realizó a los 15 días de haberse iniciado el período de cultivo. Lo más destacable que se encontró fue una ligera sedimentación del medio mineral en el fondo de los frascos. Esto ocurrió en todas las muestras, y se explica dada la falta de agitación en el sistema. Si bien al momento de la inoculación, el medio conformaba una mezcla aparentemente homogénea, el enfriamiento y reposo produjeron una precipitación de solutos (Harris, 2011). En la imagen 16 se observa un medio de cultivo inoculado con *Aspergillus* (izquierda) y las muestras experimentales de LDPE en cultivo con las otras especies de hongos (derecha).



Figura 16: medio inoculado con *Aspergillus* (izquierda); muestras experimentales inoculadas en período de cultivo (derecha)

En cuanto al crecimiento y desarrollo de los microorganismos, la única variación que pudo identificarse macroscópicamente en el medio de cultivo ocurrió en las muestras de *Aspergillus*. Se pudo notar la presencia de cúmulos flotantes de color negro en distintas zonas de los recipientes. Al momento de retirar las muestras del medio, con una pinza se extrajo cuidadosamente los cúmulos más grandes encontrados en cada frasco, y se comprobó que correspondían a pequeñas colonias de hongo que flotaban en el medio. Este es un indicio de

que el microorganismo (en este caso el *Aspergillus*), es capaz de crecer en las condiciones experimentales propuestas.

En lo que respecta a las muestras que permanecieron en cultivo 60 y 90 días, la única variación observada, aparte de las ya mencionadas, fue un aumento paulatino de la coloración de la superficie de las muestras de LDPE. Esto indicó la adherencia del microorganismo a las muestras de polímero sintético, lo que se comprobó en los análisis realizados al finalizar el período de cultivo.

Control positivo de crecimiento microbiano

Por su parte, las muestras inoculadas en los controles positivos crecieron rápidamente. Al cabo de 24 horas, ya podía apreciarse porciones de micelio asentadas en la superficie del plástico. Se pudo observar claramente que el micelio que creció en los medios de cultivo presentaba la misma apariencia y color que mostraban las cepas originales al estar aisladas en sus respectivas cajas Petri. También, se notó que el hongo creció mayoritariamente en la superficie del medio de cultivo, aunque también hubo porciones de micelio que crecieron sobre la superficie de las muestras de plástico. Esto se debe a que este tipo de microorganismos crecen y se desarrollan más fácilmente en condiciones aerobias (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008).

Al momento de extraer las muestras de plástico de sus medios de cultivo, lo que primero se notó fue la gran cantidad de material biológico que se desarrolló, el cual se encontraba adherido a las muestras. Las acumulaciones de material biológico tomaron una forma circular, acorde a la geometría de los recipientes. Se apreció también que la tonalidad del medio de cultivo cambió significativamente en ciertas cepas. En unas conservó una tonalidad amarillo intenso, mientras que en otras se observó tonos naranja rojizos (figura 17). La explicación yace en los metabolitos generados por las diferentes especies de hongos (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008). Vale recalcar que la actividad metabólica de los microorganismos en los controles positivos es mucho mayor a aquella ocurrida en las muestras experimentales, ya que en éstos se adicionó sacarosa.



Figura 17: Controles Positivos, de izquierda a derecha: Pleurotus/Penicillium; Cladosporium, Fusarium, Trichoderma, Aspergillus

Cuando se aisló las muestras de LDPE de los restos de hongo, se pudo observar que la tonalidad de éstas estaba mucho más marcada que en el resto de las muestras experimentales. Esto sugiere que el microorganismo utilizó al plástico como sustrato, adhiriéndose al mismo al desarrollarse. Imágenes adicionales de las muestras y medios de cultivo del control positivo se encuentran en el anexo 3.

4.3.2.- Manejo de las muestras post tratamiento de degradación biológica

Después de finalizado el tiempo de cultivo planificado para cada muestra, éstas fueron retiradas del medio mineral en el que se encontraban. Mediante una primera observación se confirmó la presencia de colonias de hongo pegadas en la superficie del plástico. Éstas se concentraron mayoritariamente en la parte inferior del mismo, lo cual es congruente con el

arreglo de los cultivos. Las muestras de plástico no lograron sumergirse completamente, y el contacto de éstas con el medio inoculado se limitaba a su mitad inferior en la mayoría de los casos. De todas maneras, se logró comprobar que los hongos, en efecto son capaces de adherirse a la superficie del polietileno de baja densidad al encontrarse en medio mínimo, lo que da indicios de que están usando este material como fuente de nutrientes, y por ende, de que lo están degradando.

En cuanto a cada cepa, macroscópicamente se observó que las muestras de plástico que fueron inoculadas con *Pleurotus*, *Cladosporium* y *Trichoderma* presentaron una tonalidad amarillenta, mientras que las muestras inoculadas con las otras especies adquirieron la tonalidad característica de cada hongo. Las muestras tratadas con *Penicillium* mostraron una ligera tonalidad verdosa. En las muestras tratadas con *Fusarium* se vio un tono violeta, y en las muestras tratadas con *Aspergillus* se apreció claramente un tono café oscuro/negro, como se muestra en la figura 18.



Figura 18: Muestras de LDPE tratadas con *Aspergillus* retiradas a los 30 días de cultivo

El tratamiento post degradación biológica se ajustó en función de los resultados obtenidos con las muestras de 30 días de cultivo con *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium* y *Trichoderma*, las cuales fueron el primer lote que se retiró del medio de cultivo. Después de la extracción, estas fueron lavadas con agua destilada y posteriormente secadas en el horno; sin

embargo, al pesarlas se encontró un aumento considerable en su masa, correspondiente a los restos de material biológico adherido a su superficie. Para resolver el problema, se decidió incrementar un lavado con una solución de hipoclorito de sodio al 1% en la metodología. Se lavó estas muestras y se las volvió a pesar.

Los resultados de la nueva metodología fueron más favorables, ya que las muestras estaban notoriamente más limpias y libres de manchas (aunque éstas no se eliminaron en su totalidad). Se registró pérdida de peso en las muestras de *Fusarium* y *Aspergillus* de 60 días. Sin embargo, las muestras de las otras cepas continuaron registrando una tendencia al alza. A fin de corregir este problema, se intentó eliminar el material biológico del plástico en su totalidad, para lo que se incluyó un lavado de las muestras con dodecilsulfato sódico (SDS), tensoactivo aniónico con aplicaciones bioquímicas. Nuevamente, se obtuvo mejores resultados; sin embargo, este paso de la metodología fue una medida tomada en función de los resultados preliminares obtenidos en el curso del experimento, razón por la cual se aplicó únicamente al último lote de muestras de LDPE que se extrajo del medio de cultivo a los 90 días.

Durante el lavado con SDS no se observaron cambios apreciables en las láminas de plástico; no obstante, pasadas 48 horas del inicio del lavado con hipoclorito de sodio, se notó una gran cantidad de fragmentos sólidos con coloración opaca que precipitaron en el fondo de los frascos. Estos residuos corresponden a los restos de masa de hongo que se encontraban adheridos a las muestras al momento de retirarlas del medio de cultivo. En este paso del experimento se pudo comprobar una vez más la tendencia de los microorganismos a adherirse a la superficie del plástico.

Después del lavado, se pudo observar una desaparición considerable de las manchas de colonias en la superficie de las mismas, aunque ésta no fue total. Se notó que muchas muestras, aunque perdieron gran parte de las tonalidades adquiridas después del tratamiento biológico, desarrollaron otro tipo de manchas oscuras en diferentes secciones, indicador de oxidación de los restos biológicos (Audesirk, Audesirk, & Byers, 2008). Los resultados encontrados al pesar las muestras después de ser lavadas con hipoclorito de sodio y surfactante fueron más concluyentes.

4.3.3.- Pérdida en Peso

En el curso de esta investigación es relevante evaluar la variación de peso en las muestras de LDPE, a fin de tener una noción de la actividad metabólica de los microorganismos. Su desarrollo y crecimiento en el medio de cultivo implica que están usando el plástico como sustrato y fuente de alimento; por tanto, la masa de la muestra debe variar (Shah, Hasan, Hameed, & Ahmed, 2008).

LDPE posterior al tratamiento de envejecimiento térmico

Después de pesar 94 muestras de LDPE antes y después del tratamiento de envejecimiento térmico, se registró una pérdida leve de $0.088 \pm 0.576\%$. La distribución de los valores experimentales obtenidos se observa en la figura 19 a continuación.

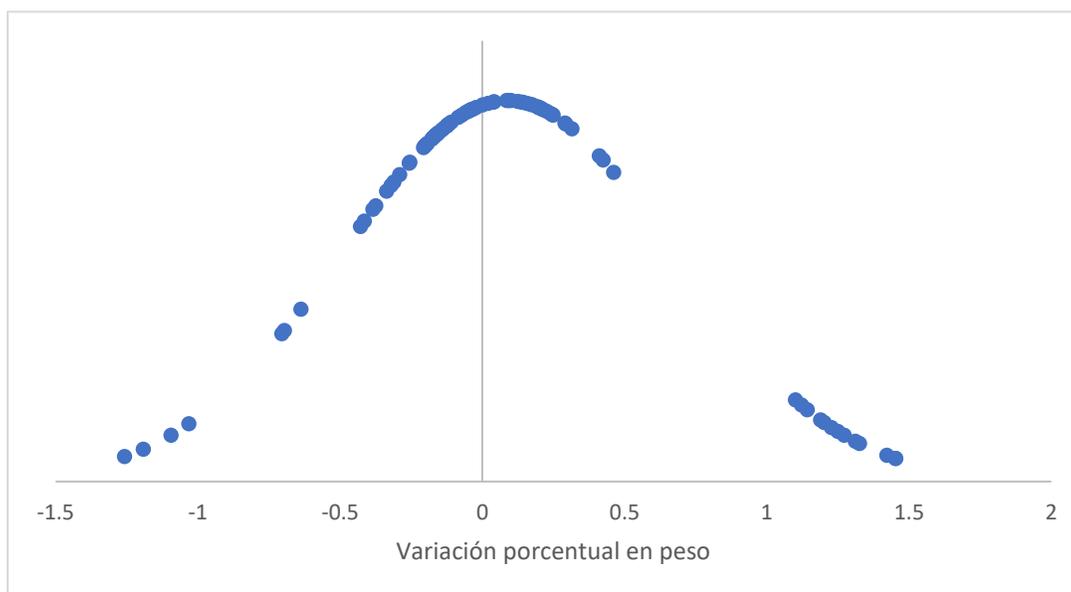


Figura 19: Curva de distribución de la variación de peso porcentual de las 92 muestras de LDPE después del tratamiento de envejecimiento

La tendencia de la curva de distribución obtenida confirma la hipótesis inicial, donde se esperaba una ligera pérdida de masa en las muestras después de ser sometidas al tratamiento mencionado. Esto es, de igual manera, una consecuencia del proceso de oxidación explicado anteriormente, lo que causa erosión superficial y pérdida de material (Albertson, Barenstedt, & Karlsson, 1994). Esta prueba no es concluyente, dada la amplia dispersión obtenida en los resultados.

Control negativo de crecimiento

Después de haber sumergido las muestras de LDPE en el medio mineral, éstas fueron llevadas a incubación en las mismas condiciones que el resto de las muestras experimentales. No se observó ningún cambio significativo en la apariencia externa del plástico. De la misma manera, el color y la turbidez del medio mineral permanecieron constantes a lo largo del período de cultivo. Después de extraerlas, se las sometió al mismo tratamiento y lavados que al resto de muestras. Al pesarlas, se encontró que las éstas ganaron un promedio de 0.602% +/- 0.066% de su peso original después de la incubación. Esta alza sugiere la existencia de residuos de humedad y sales cristalizadas provenientes del medio de cultivo, al igual que en el resto de las muestras experimentales.

Muestras experimentales

En las figuras 20, 21 y 22 a continuación se presentan un resumen de los resultados de la prueba de variación de peso para cada especie de hongo en los diferentes períodos de cultivo. La pérdida en peso se denota en el cuadrante positivo, mientras que el cuadrante negativo corresponde a la ganancia de peso. Los resultados completos se encuentran detallados en la sección de anexos.



Figura 20: Variación porcentual de peso de las muestras experimentales en 30 días de cultivo

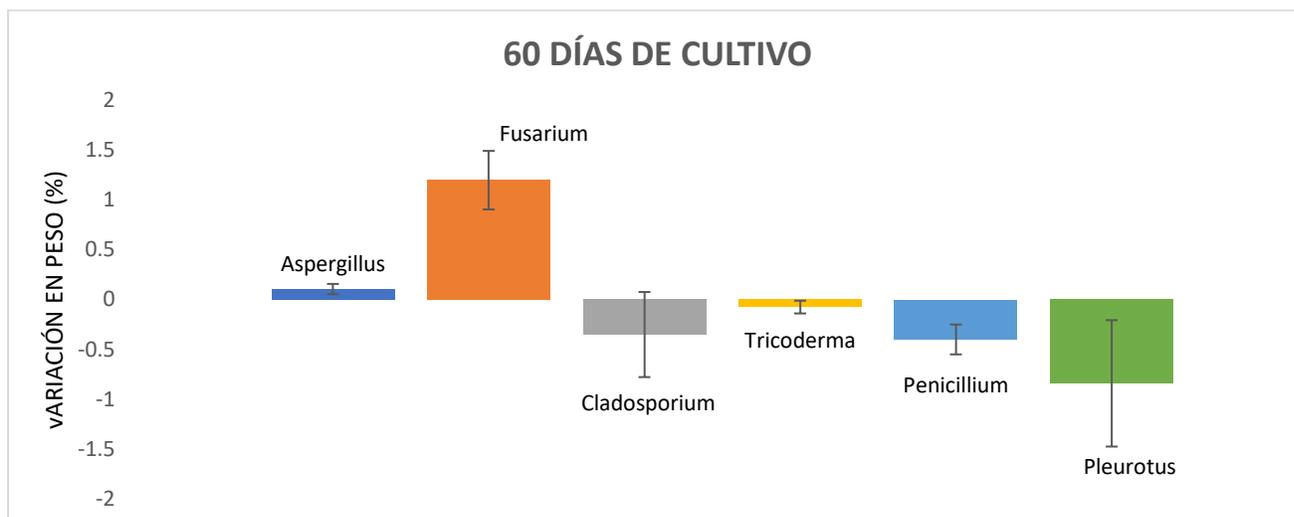


Figura 21: Variación porcentual de peso de las muestras experimentales en 60 días de cultivo



Figura 22: Variación porcentual de peso de las muestras experimentales en 90 días de cultivo

La primera observación general que se realiza es la amplia dispersión de los datos recabados. Esta falta de uniformidad se refleja en las barras de error de los gráficos, que en algunos casos incluso superan el valor de la media. Vale recalcar que las únicas muestras que ciertamente registraron pérdida en peso fueron aquellas tratadas con *Fusarium*, obteniéndose

en el período de cultivo más largo una pérdida de 0.99% +/- 0.11%. El resto de las muestras registraron un aumento en su peso.

El hecho de que las muestras tratadas con algunas especies pierden peso y otras ganan responde al equilibrio que existe entre el peso ganado correspondiente a las sales cristalizadas, el peso ganado correspondiente al microorganismo que se desarrolla y adhiere a las muestras de plástico y el peso perdido a causa de la bioasimilación del material y erosión de la superficie. En el caso de las muestras de *Fusarium* y *Aspergillus*, los resultados encontrados sugieren que su actividad metabólica fue mayor que la del resto de cepas, por tanto, la masa bioasimilada y erosionada se sobrepone a la masa ganada por sales cristalizadas en superficie y restos del microorganismo adheridos a la muestra. En el caso del resto de cepas, el aumento de peso de las muestras experimentales tratadas con *Cladosporium*, *Trichoderma*, *Penicillium* y *Pleurotus* puede significar que hay masa del microorganismo que se adhiere a la superficie (afirmación corroborada por la coloración de las muestras y restos biológicos oxidado en los lavados con NaClO); no obstante, la actividad metabólica de estas cepas de hongos es baja, ya que no hay bioasimilación significativa que cause disminución de la masa de los plásticos tratados.

El aumento de peso registrado en las muestras no es del todo un indicador negativo sobre desempeño descomponedor de los microorganismos. Estudios realizados por Mahalaksmi et al, en lugar de caracterizar pérdida en peso, mide el aumento de peso correspondiente al desarrollo del microorganismo en la matriz de polietileno como indicador metabólico del hongo. En períodos de 2, 4 y 6 meses de cultivo reporta un aumento de peso entre 2 a 4 mg de biomasa seca por ml de suspensión medio/microorganismo. Este estudio se realizó con cepas de *Penicillium sp* y *Rhizopus arrhizus* (Mahalakshmi & Niren, 2012).

En otros estudios, Shah et al reporta que el análisis por pérdida de peso puede verse afectado significativamente por la imperfecta limpieza de la muestra posterior al tratamiento de degradación biológica. Además, afirma que este parámetro no es un indicador fiable de metabolismo microbiano, dado que una gran parte de la masa perdida corresponde a erosión superficial de la muestra y no a bioasimilación (Shah, Hasan, Hameed, & Ahmed, 2008).

Adicionalmente, cabe recalcar que con las condiciones experimentales utilizadas en la presente investigación no se pueden alcanzar altas tasas de degradación en las muestras de LDPE, ya que éstas están sujetas al ataque de una sola especie, en un medio aséptico donde no interfieren otros microorganismos y por períodos de tiempo relativamente cortos. Con el afán de contrastar, un estudio realizado por Valdemar et al reporta pérdidas de peso de hasta 90% en materiales a base de polímeros naturales, degradados por *Pleurotus ostreatus*, en 68 días de cultivo y en compostaje (Valdemar, S, I, & A., 2011). La actividad de enzimas depolimerazas aumenta considerablemente cuando se forman consorcios bacterianos/micóticos (Roy, y otros, 2008).

Control positivo de crecimiento microbiano

Se identificó una tendencia al aumento de peso entre 0.5% y 1.4%, a excepción de las muestras de *Fusarium*, las cuales registraron un aumento medio de 5.56% +/- 2.32%. El detalle del análisis se aprecia en la figura 23. Estos resultados respaldan lo encontrado en las muestras experimentales inoculadas con *Fusarium*, al sugerir una mayor fijación del microorganismo al plástico.

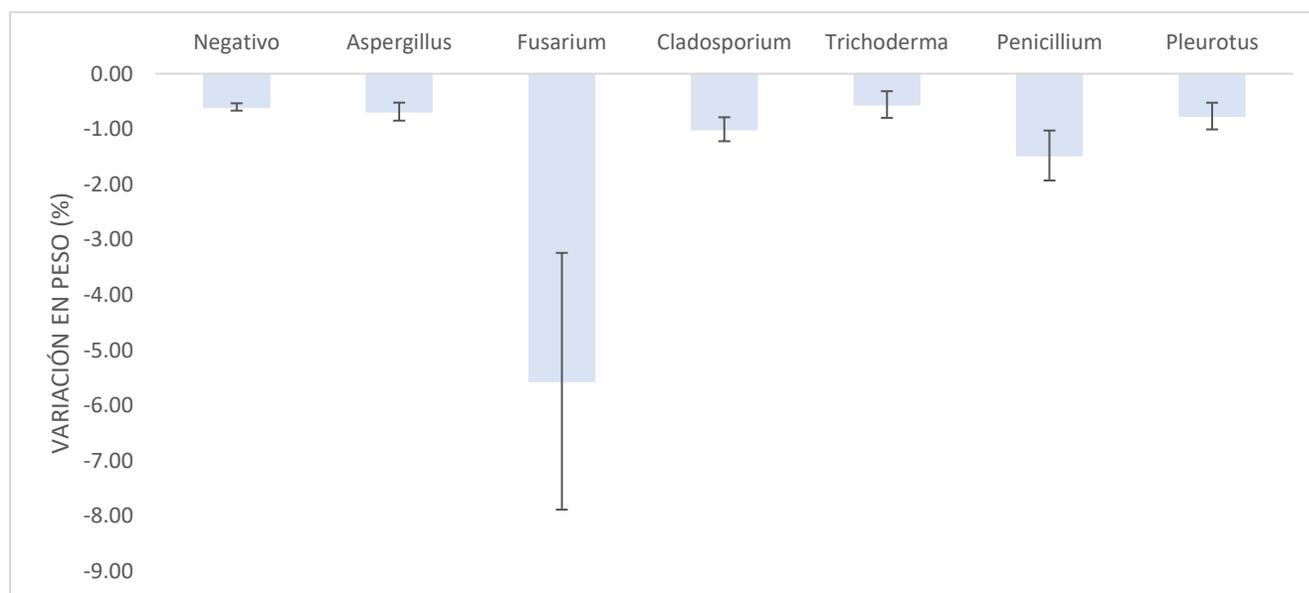


Figura 23: Variación de peso en las muestras de control positivo de crecimiento microbiano

4.3.4.- Microscopía electrónica de barrido (SEM)

El análisis por microscopía electrónica de barrido proporcionó valiosa información acerca de la morfología de la superficie de las muestras de plástico tratadas.

LDPE previo al tratamiento de envejecimiento térmico

En primer lugar, se observó la muestra de LDPE previo al tratamiento de envejecimiento térmico. Se pudo comprobar una morfología superficial lisa, con muy pocas irregularidades. Incluso en acercamientos de 500x no se observa patrones de irregularidad o porosidad. Tampoco se observó ningún indicio de erosión superficial (figura 24).

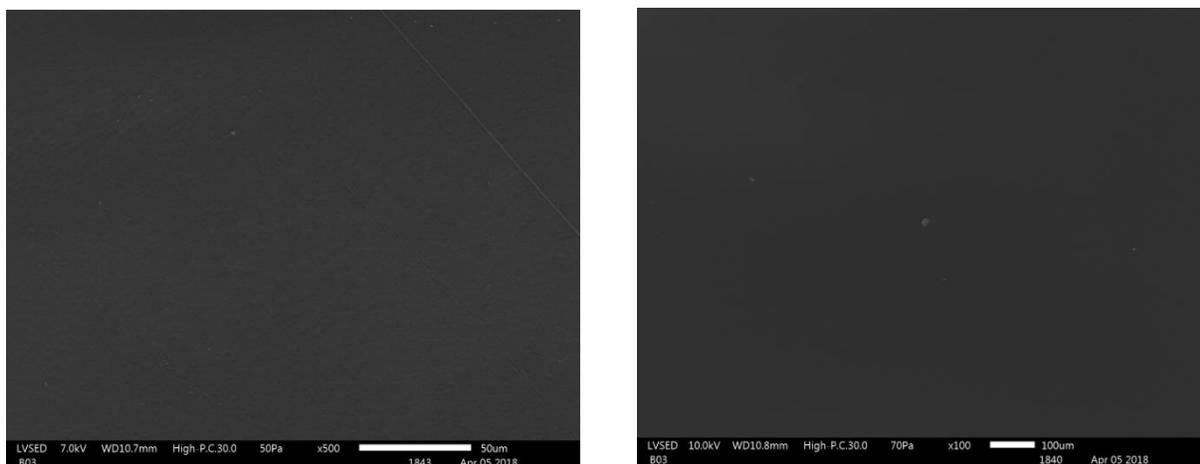


Figura 24: SEM de LDPE previo al tratamiento de envejecimiento térmico, 500x y 100x

LDPE posterior al tratamiento de envejecimiento térmico.

Estas muestras arrojaron resultados más interesantes. Se encontró una morfología superficial más rugosa que aquella del plástico previo al tratamiento de envejecimiento térmico. Adicionalmente, se notó la aparición de un patrón de figuras circulares con diámetros entre 30 y 150 μm , como se observa en la figura 25. Sin embargo, no se encontraron agujeros o fisuras de tamaño considerable. El patrón formado en la superficie del plástico se debe al método de envejecimiento utilizado. (Shah, Hasan, Hameed, & Ahmed, 2008) Estando embebidas en agua destilada durante el proceso de autoclavado, se presume que las marcas encontradas en el análisis SEM se deben a pequeñas burbujas de aire a alta temperatura y

presión que se forman en la superficie de la muestra y la marcan de esta manera particular. Estudios de envejecimiento higrotérmico realizados en resinas epoxi reportan la formación de patrones similares en muestras tratadas con procesos de envejecimiento higrotérmicos (Nguyen, 2014). Con el afán de contrastar, procesos de envejecimiento por radiación ultravioleta aplicados en polímeros sintéticos causan que la muestra se vuelva frágil y quebradiza. Microscópicamente se aprecian formaciones morfológicas diferentes, en forma de fisuras y grietas (Nguyen, 2014).

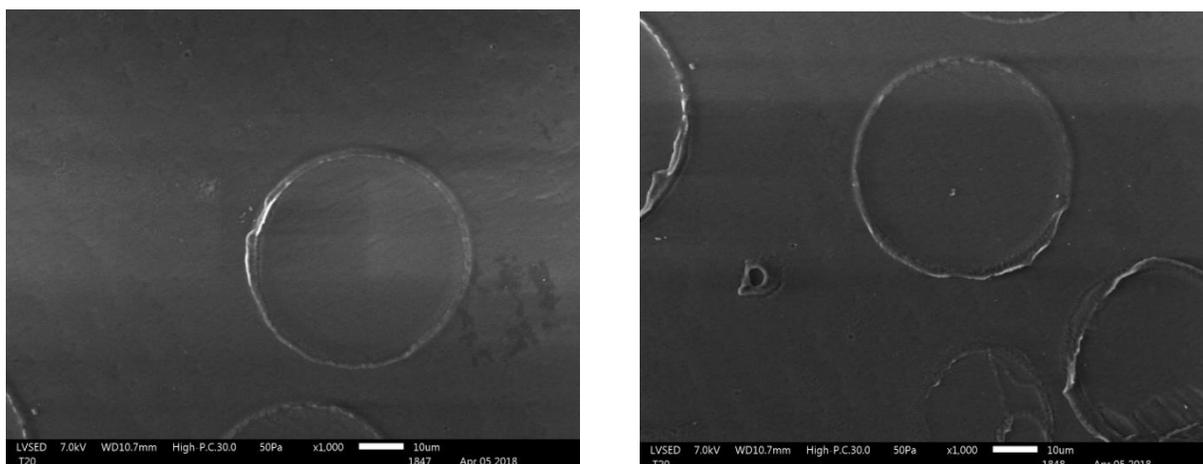


Figura 25: SEM de LDPE posterior al tratamiento de envejecimiento térmico, 1000x

Control negativo de crecimiento.

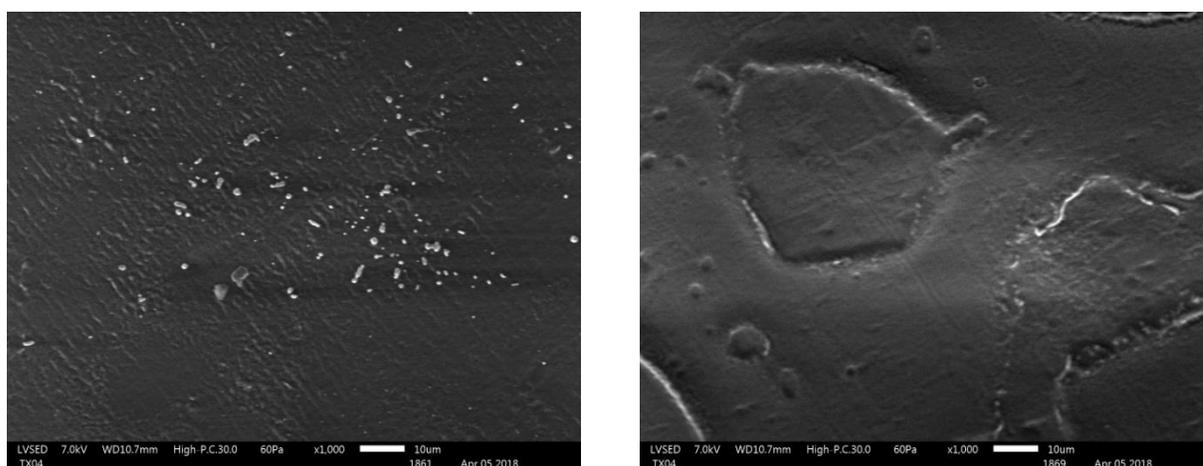


Figura 26: SEM de control negativo de crecimiento, 1000x

A diferencia de las anteriores muestras analizadas, en los controles negativos de crecimiento microbiano se encontraron pequeños residuos esparcidos en ciertos sectores de su superficie de la muestra, lo que se presume podría tratarse de restos de sal del medio de cultivo, tal y como se observa en la figura 26 (izquierda). Esta suposición se fundamenta en que este elemento no estuvo presente en la muestra de LDPE envejecido, por tanto, no tienen origen en el pretratamiento de degradación térmica; y dado que el control negativo de crecimiento no fue inoculado con ningún microorganismo, se descarta que se trate de algún metabolito. En cuanto a otros aspectos la morfología superficial, esta muestra no presenta nuevos patrones de fisuras o agujeros, aparte de aquellos ya observados en la muestra del LDPE envejecido.

Muestras experimentales.

Posteriormente, se analizaron las muestras cultivadas durante 90 días con las seis especies de hongos estudiadas. Como primera observación, se pudo notar una mayor rugosidad en la superficie del plástico, en comparación con las muestras previo y posterior al tratamiento de envejecimiento térmico y biológico. También se observaron las formaciones circulares originadas en el tratamiento de envejecimiento térmico. Al igual que en las muestras del control negativo de crecimiento, también se pudo observar restos de sal en la superficie. Particularmente, en las muestras biodegradadas se encontraron formaciones que sugieren actividad microbiana, como erosión superficial, agujeros, fisuras, rugosidades especiales, entre otros; elementos que estuvieron presentes únicamente en este grupo experimental, mas no en los controles blancos ni negativo de crecimiento. En la muestra tratada con *Aspergillus* se encontró una peculiar formación, con morfología similar a las hifas de un hongo, tal y como se aprecia en la figura 27.

Alrededor de esta estructura se aprecia una rugosidad especialmente marcada, al igual que fisuras y grietas. Zahra et al, en un estudio con *Aspergillus terreus* y LDPE, reporta resultados similares; es decir, imágenes microscópicas donde se aprecia hifas del microorganismo penetrando e incorporándose a la matriz polimérica (Zahra, Abbas, Mahsa, & Mohsen, 2009). Por su parte, la muestra tratada con *Fusarium* presentó la aparición de agujeros marcados y grietas. Koutny et al obtuvo irregularidades similares en estudios de degradación de

polietileno de alta y baja densidad con *N. Asteroides* y *R. Rhodochrous* (Koutny, Sancelme, Dabin, & Pichon, 2005). Resultados similares, aunque en menor cantidad, se encontraron en las muestras tratadas con las otras especies de hongos.

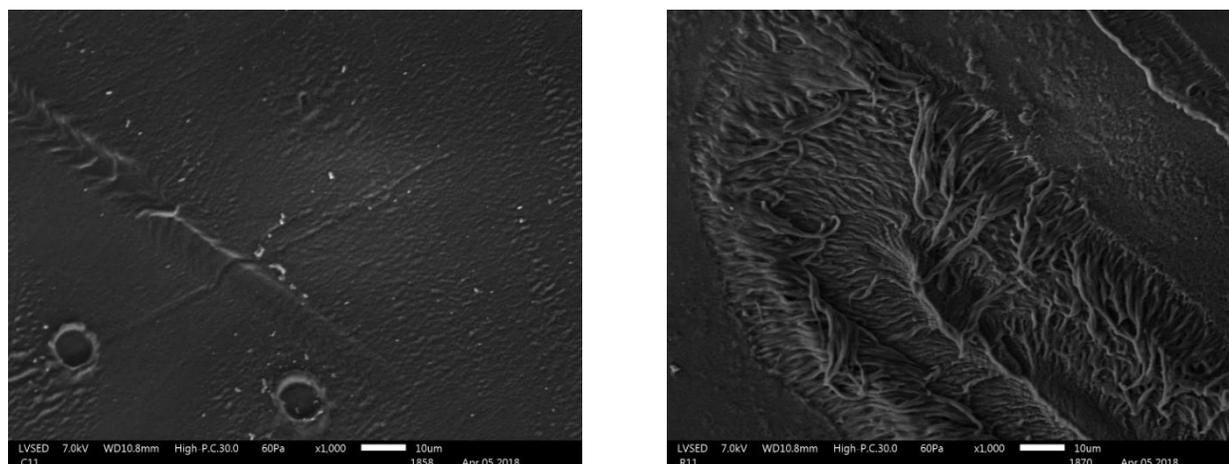


Figura 27: SEM de muestra de LDPE 90 días de cultivo, con Fusarium (izquierda), con Aspergillus (derecha); 1000x

Bonhomme et al reporta que los microorganismos tienden a desarrollarse alrededor de las fisuras y grietas formadas en la superficie, sin embargo, no se encuentran sobre las mismas en sí. Resultados similares se observaron en las muestras estudiadas. A pesar de no haberse podido trabajar a aumentos mayores a 1000x, se notó que los agujeros y grietas, producto del tratamiento de degradación biológica, se concentraban alrededor de las formaciones circulares que aparecieron después del tratamiento de degradación térmica. Esto sugiere que la mayor parte de nutrientes de bajo peso molecular migran a la superficie desde las capas más oxidadas del polímero (Bonhomme, y otros, 2003).

Cabe mencionar que el análisis por microscopía electrónica no pudo realizarse en condiciones de presión y voltaje óptimas, ya que el equipo que se utilizó no disponía de los accesorios adecuados para las muestras tratadas. Sin ellos, voltajes por encima de los 7kV resultaron ser demasiado fuertes y quemaban la superficie de las láminas de plástico. De todas maneras, la resolución alcanzada fue suficiente para captar imágenes claras de la morfología de las muestras analizadas.

Control positivo de crecimiento microbiano.

El análisis SEM (imagen 28) reveló una mayor rugosidad de la superficie de los controles positivos de crecimiento en comparación con el resto de las muestras experimentales. También se pudo notar una mayor concentración de agujeros e irregularidades y formaciones de hifas. Estas observaciones corroboran la suposición de que el aumento de peso en los controles positivos de crecimiento, al igual que en la mayoría de las muestras experimentales, se debe a la incorporación de los microorganismos a la matriz polimérica del material (Gajendiran, Krishnamoorthy, & Abraham, 2016).

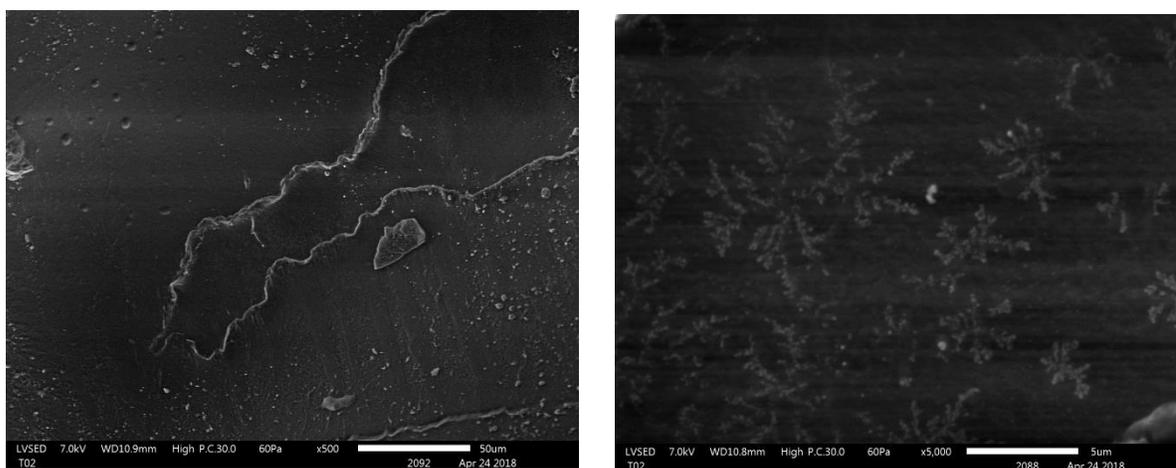


Figura 28: SEM de control positivo de crecimiento microbiano (Penicillium) 500x 5000x

4.3.5.- Espectroscopía infrarroja por transformadas de Fourier (FTIR).

El análisis por FTIR permite determinar la existencia de cambios en la composición química de las muestras analizadas, como la formación de nuevos grupos funcionales, reacciones de oxidación, sustitución, supresión de enlaces, entre otros.

Los espectros obtenidos a partir de las muestras de LDPE tratadas con las diferentes especies de hongos son muy similares al espectro patrón del polietileno de baja densidad previo al tratamiento de envejecimiento térmico. Esto sugiere que no hubo cambios significativos en las muestras analizadas.

A pesar de que en algunas se observa un desfase en las bandas alrededor de 1460 cm^{-1} y 720 cm^{-1} , se descarta cualquier cambio de importancia, ya que esta variación responde a la

diferencia en el número de mediciones brindadas por el equipo. Los bancos de datos de la mayoría de las muestras analizadas incluyen 900 puntos medidos; sin embargo, en algunas éstos diferían por 10 o 15 mediciones. Adicionalmente se excluyó puntos corruptos de cada banco de datos, a fin de tener un espectro legible. El número de puntos corruptos fue también distinto para cada muestra, lo que produce este tipo de defectos.

LDPE previo al tratamiento de envejecimiento térmico.

Con esta muestra se obtuvo el espectro característico del polietileno de baja densidad, con bandas fuertes y agudas en las longitudes de onda de 2848 cm^{-1} y 2915 cm^{-1} , que corresponden al estiramiento que se genera en los enlaces del grupo metileno C-H₂ gracias a la radiación infrarroja. También se encuentran bandas agudas de intensidad media en las longitudes de 719 cm^{-1} y 730 cm^{-1} , y 1461 cm^{-1} y 1473 cm^{-1} , correspondientes al grupo metileno, pero en otros modos vibracionales; balanceo y flexión respectivamente (Alhajji, 2016). Todo esto se aprecia en la figura 29.

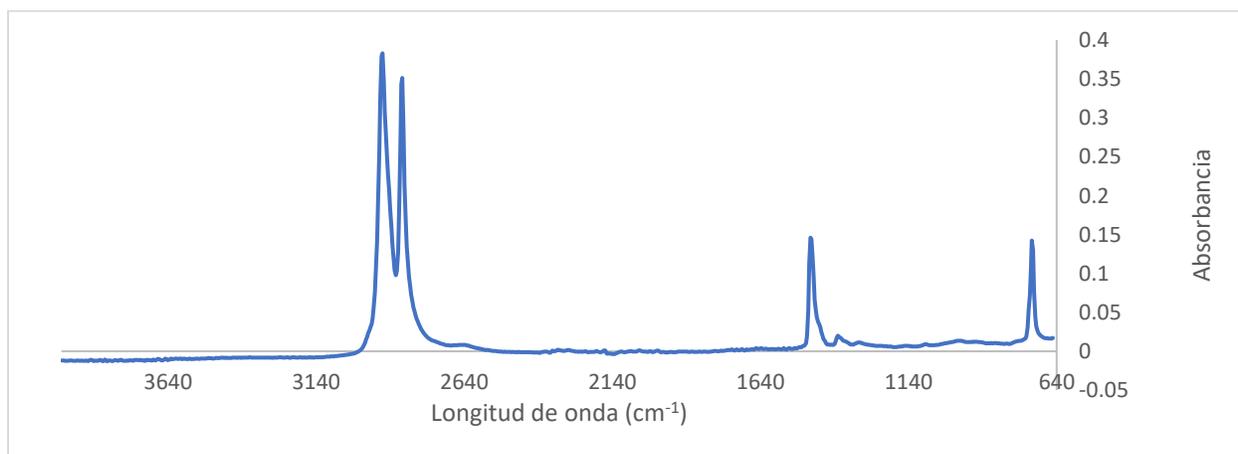


Figura 29: Espectro FTIR LDPE previo tratamiento de envejecimiento térmico

LDPE posterior al tratamiento de envejecimiento térmico.

No se encontraron cambios significativos en la composición química de esta muestra. No se evidenció variación entre el espectro del LDPE previo y posterior al tratamiento de envejecimiento, hecho que se aprecia en la figura 30.

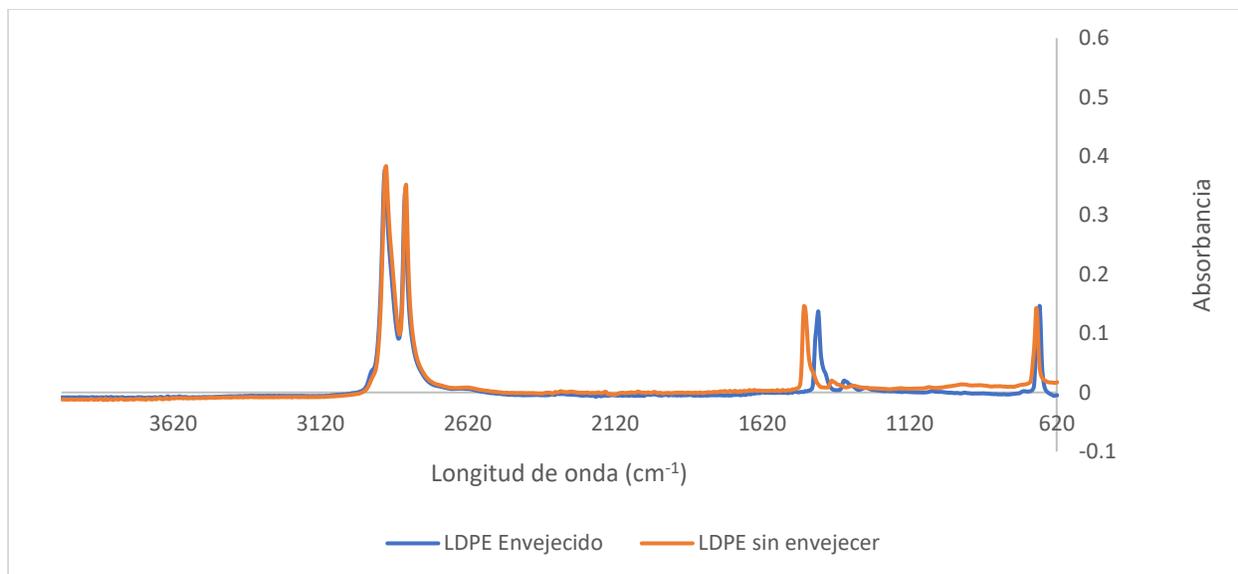


Figura 30: Espectro FTIR LDPE posterior al tratamiento de envejecimiento térmico

Estudios realizados por Luz et al reportan resultados similares para muestras de LDPE oxo-biodegradable envejecido con radiación ultravioleta (UV) durante 120 días. El espectro de FTIR que se obtuvo fue similar al espectro de la muestra sin envejecimiento UV (Luz, Paes, Nunes, Silva, & Megum, 2013).

Control negativo de crecimiento.

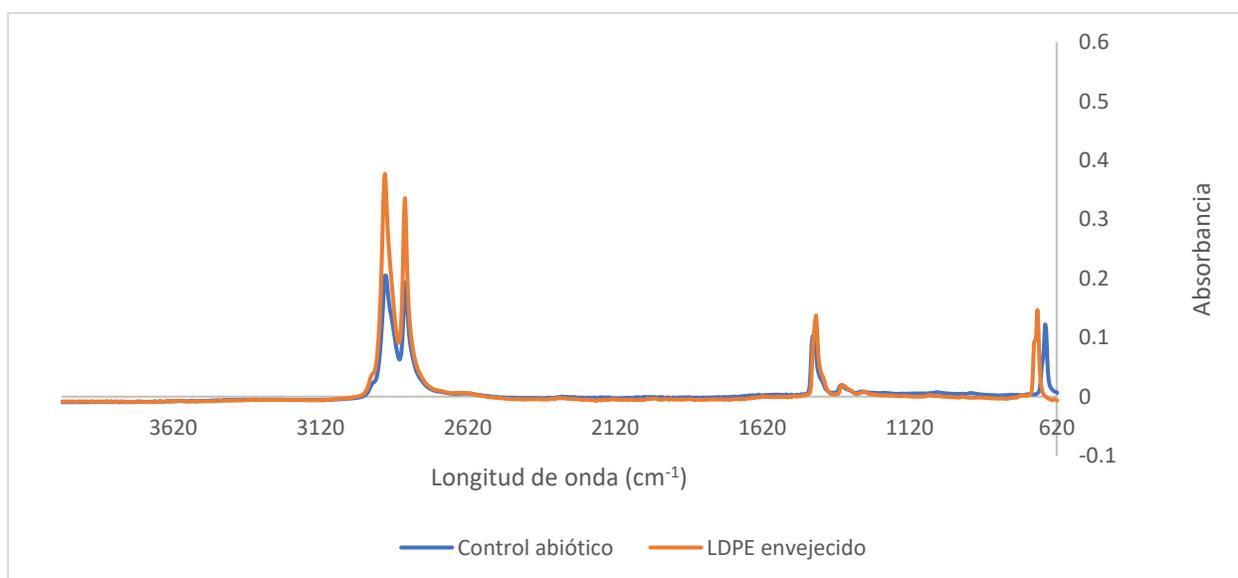


Figura 31: FTIR LDPE control negativo de crecimiento

El espectro obtenido al someter la muestra a análisis con el espectrofotómetro infrarrojo (figura 31) reveló que no hubo creación ni eliminación de grupos funcionales en la estructura molecular de las muestras de LDPE. De esta manera se confirma que el medio mineral utilizado es químicamente inerte con respecto al polietileno de baja densidad, por tanto, los indicadores de oxidación que se encontró en las muestras experimentales corresponden únicamente a la actividad biológica de los microorganismos.

Muestras experimentales

No se encontró cambios significativos en el espectro infrarrojo de las muestras experimentales en comparación con el espectro característico del polietileno de baja densidad. De la misma manera que con las otras muestras analizadas, los espectros se mostraron similares a los del LDPE que no recibió ningún tratamiento.

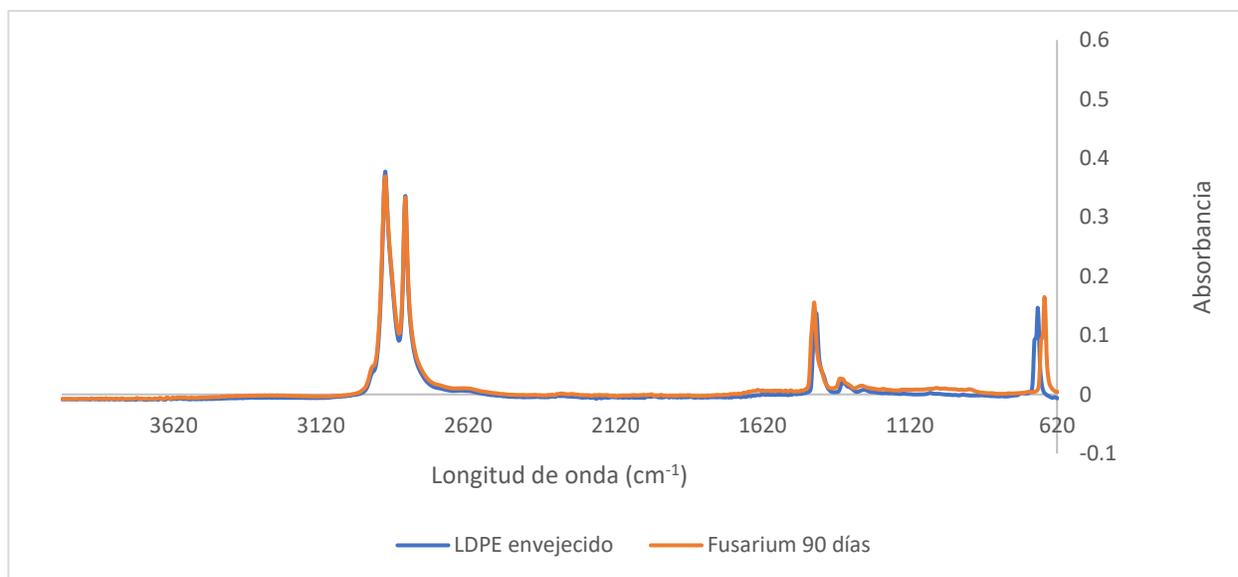


Figura 32: FTIR LDPE tratada con Fusarium durante 90 días

Gajendiran et al reporta un crecimiento considerable del espectro entre los 1710 cm⁻¹ y 1750 cm⁻¹, en estudios realizados con LDPE degradado con *Aspergillus clavatus* aislado de tierra de relleno sanitario. Igualmente, Da Luz et al observó la aparición de grupos carbonilo en el espectro infrarrojo obtenido a partir de muestras de LDPE oxo-biodegradable cultivado con *Pleurotus ostreatus* (Luz, Paes, Nunes, Silva, & Megum, 2013).

Control positivo de crecimiento microbiano.

Igualmente, no se identifica cambios considerables en el espectro de una muestra LDPE del control positivo de crecimiento respecto al espectro del LDPE envejecido térmicamente, como se aprecia en la figura 33.

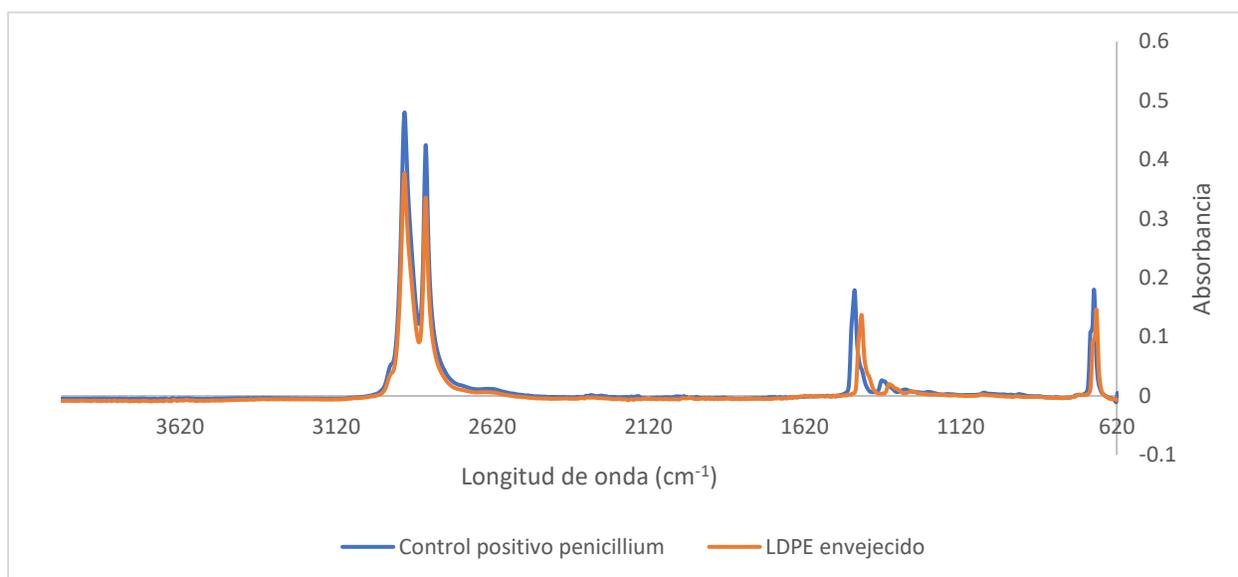


Figura 33: FTIR LDPE control positivo de crecimiento, tratado con *Penicillium* durante 90 días

5.- CONCLUSIONES

La cepa de *Fusarium* utilizada reveló ser la más apta para degradar LDPE entre todas las especies estudiadas, mostrando una pérdida en peso media de 0.99% +/- 0.11% en las muestras de LDPE cultivadas durante 90 días con el mismo. El desempeño de la cepa de *Aspergillus* fue satisfactorio, aunque en menor grado. Se comprobó también que las cepas de los microorganismos estudiados estaban activas al momento de la inoculación, y que éstos son capaces de crecer y desarrollarse, en diferentes grados, en las condiciones experimentales propuestas.

En cuanto a los análisis realizados; si bien no se halló cambios significativos en la composición molecular del LDPE tratado biológicamente, en la microscopia electrónica de barrido se encontró evidencia que sugiere la actividad metabólica de los hongos, como rugosidad superficial, agujeros, grietas e incluso formaciones de hifas integradas a la matriz polimérica del material. Estos hallazgos explican la tendencia al aumento de peso que se encontró en la mayoría de las muestras de LDPE.

De todas maneras, el análisis por variación de peso no es un indicador verás para cuantificar masa bioasimilada, debido a que factores como la erosión de superficie, adherencia de cristales salinos, adherencia de hongo, restos de metabolitos, entre otros entran como nuevas variables a ser tomadas en consideración.

Para futuros estudios que profundicen el contenido de esta investigación, se recomienda utilizar agitación en las muestras experimentales, a fin de aumentar la superficie de contacto del microorganismo con el plástico. Se recomienda también buscar una alternativa en cuanto al arreglo de las muestras de LDPE en el medio de cultivo, ya que éstas tienden a encogerse, reteniendo humedad y otros residuos que alteran significativamente su masa. Otro punto importante es incluir un método de caracterización cuantitativo de metabolismo de los hongos, como conteo inicial y final de esporas.

6.- REFERENCIAS

- Albertson, A., Barenstedt, C., & Karlsson, S. (1994). Abiotic degradation products from enhanced environmentally degradable polyethylene. *Acta Polym*, 45, págs. 97-103.
- Albertsson, A.-C. (1978). Biodegradation of Synthetic Polymers. II. A Limited Microbial Conversion of 14C in Polyethylene to 14CO₂ by some soil fungi. Estocolmo.
- Alhajji, E. M. (3 de Marzo de 2016). Fourier Transform Infrared Spectroscopy: Low Density Polyethylene, High Density Polyethylene, Polypropylene and Polystyrene. North Carolina State University. Recuperado el 20 de Abril de 2018, de https://emanalhajji.weebly.com/uploads/2/6/2/0/26200212/fourier_transform_infrared_spectroscopy.pdf
- Anderson materials evaluation, Inc. (3 de noviembre de 2017). Plastic / Polymer Testing and Analysis. Columbia. Obtenido de <http://www.andersonmaterials.com/plastic.html>
- Audesirk, T., Audesirk, G., & Byers, B. (2008). *Biología la vida en la Tierra* (Vol. 8). México DF, México: Pearson education.
- Barnes, D., Galgani, F., Thompson, R., & Barlaz, M. (14 de junio de 2009). Accumulation and fragmentation of plastic debris in global environments. *The Royal Society*. doi:10.1098/rstb.2008.0205
- BBC News. (24 de noviembre de 2014). *BBC News*. Obtenido de Latin America: <http://www.bbc.com/news/world-latin-america-30172690>
- Bonhomme, S., Cuer, A., Delort, A., Lemaire, J., Sancelme, M., & Scott*, G. (3 de enero de 2003). Environmental biodegradation of polyethylene. Birmingham, Reino Unido.
- Bradley, M. (2017). FTIR basics. Thermo Fisher Scientific. Recuperado el 05 de enero de 2018, de <https://www.thermofisher.com/us/en/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-basics.html>
- Callister, W., & Rethwisch, D. (2014). *Materials Science and Engineering* (9na ed.). Iowa: Wiley.
- Chandra, R., & Rustgi, R. (1997). Biodegradation of maleated linear low density polyethylene and starch blends. *Polym Degrad Stab*, 56, págs. 185-202.
- Consejo Nacional de Planificación. (2014). *Plan Nacional del Buen Vivir*. Quito: Secretaría Nacional de Planificación y Desarrollo.
- Curtis, H., Schnek, A., Barnes, S., & Massarini, A. (2008). *Biología* (7ma ed.). Santiago: Editorial Panamericana.
- Devore, J. (2008). *Probabilidad y Estadística para Ingenierías y Ciencias* (7ma ed.). San Luis Obispo: CENAGE Learning.

- Dominguez, N. (12 de Febrero de 2015). El mundo tira ocho millones de toneladas de plástico al mar cada año. *EL PAÍS*.
- Dominguez, N. (10 de Noviembre de 2016). Las aves marinas se atiborran de plástico atraídas por su olor. *EL PAÍS*.
- Durrieu, G. (2016). Association Mycologique de Toulouse. *Place des champignons dans le règne vivant*. Toulouse, France. Recuperado el 20 de octubre de 2017, de <http://www.associationmycologiquetoulouse.ups-tlse.fr/spip.php?article23>
- Dussud, C., & Ghiglione, J.-F. (2017). Bacterial Degradation of Synthetic Plastics. Expeditions Foundation. Recuperado el 03 de enero de 2018, de <http://oceans.taraexpeditions.org/en/m/science/news/bacterial-degradation-of-synthetic-plastics/>
- EPRO, EuPC, EuPR, PE. (2012). Situación . *Plastics Europe*, págs. 5-6.
- Flory, P. (1995). *Polymer Chemistry* (16th ed.). New York, United States of America: Cornell University Press.
- Forrest, M. (2012). Analysis of Plastics. Shawbury, Shrewsbury, United Kingdom: Rapra Technology Limited. Recuperado el 05 de enero de 2018, de <http://www.polymerjournals.com/pdfdownload/872185.pdf>
- Gajendiran, A., Krishnamoorthy, S., & Abraham, J. (6 de junio de 2016). Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. doi:10.1007/s13205-016-0394-x
- Gourmelon, G. (2015). Global Plastic Production. World Watch Institute. Recuperado el 4 de mayo de 2018
- Gu, J.-D. (2003). Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances. *ELSEVIER*, 69-91. doi:10.1016/S0964-8305(02)00177-4
- Harris, D. (2011). *Quantitative chemical analysis*. New York, NY: Freeman and Co.
- Harvey, F. (16 de agosto de 2017). Fish mistaking plastic debris in ocean for food, study finds. The Guardian. Recuperado el 1 de mayo de 2018, de <https://www.theguardian.com/environment/2017/aug/16/fish-confusing-plastic-debris-in-ocean-for-food-study-finds>
- Heide, S. V., Hauffman, H., & K.Vries. (1985). Cultivation of Fungi in Synthetic and Semi-Synthetic Liquid Medium. *Allergy*, 592-598.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2012). *Disposición de desechos plásticos post-consumo. Requisitos*. Quito.
- Instituto Ecuatoriano de Normalización. (2012). *Método de ensayo para determinar la biodegradación aeróbica de materiales plásticos bajo condiciones controladas de compostaje*. Quito.

- Jambeck, J., Geyer, R., Wilcox, C., Siegler, T. R., Perryman, M., & Andrady, A. (2015). Plastic waste inputs from land into the ocean. *Science*, *347*(6223), 768-771. doi:10.1126/science.1260352
- Koutny, M., Sancelme, M., Dabin, C., & Pichon, N. (2005). Acquired biodegradability of polyethylenes containing pro-oxidant additives. *Polymer degradation and stability*, 1495-1503.
- Lee, B., Pometto, A., Fratzke, A., & Bailey, T. (1991). *Appl Environ Microbiol.* *57*, págs. 678-685.
- Luz, J. M., Paes, S. A., Nunes, M. D., Silva, M. d., & Megum, C. (2013). Degradation of Oxo-Biodegradable Plastic by *Pleurotus ostreatus*. *PLOS ONE*, *8*. doi:https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069386
- Mahalakshmi, V., & Niren, A. (2012). Assessment of Physicochemically treated plastic by fungi. Madras: Scholars Reseach Library.
- Milman, O. (4 de octubre de 2016). Great Pacific garbage patch' far bigger than imagined, aerial survey shows. The Guardian. Recuperado el 5 de octubre de 2017, de <https://www.theguardian.com/environment/2016/oct/04/great-pacific-garbage-patch-ocean-plastic-trash>
- National Geographic Society. (2017). *Great Pacific Garbage Patch*. Recuperado el 10 de octubre de 2017, de <https://www.nationalgeographic.org/encyclopedia/great-pacific-garbage-patch/>
- Nguyen, T. H. (6 de Febrero de 2014). Vieillissement artificiel et vieillissement naturel en tropicale de composites modeles epoxy/verre :approche nanoscopique de l'etude des interphases. Université de Toulon.
- Pathmashini, L., Arulnandhy, V., & Wijeratnam, W. (2008). CULTIVATION OF OYSTER MUSHROOM (PLEUROTUS OSTREATUS) ON SAWDUST. *Cey. J. Sci. (Bio.Sci)*, 177-182.
- Perkins, D. D. (18 de 04 de 2006). *How to choose and prepare media*. Obtenido de Fungal Genetics Stock Center: <http://www.fgsc.net/neurosporaprotocols/How%20to%20choose%20and%20prepare%20media.pdf>
- Roy, P., Titus, S., Surekha, P., E.Tulsi, C.Deshmukh, & C.Rajagopal. (2008). Degradation of abiotically aged LDPE films containing pro-oxidant by baterial consortium. *ELSEVIER*, 1917-1922. doi:10.1016/j.polymdegradstab.2008.07.016
- Sánchez, C. (2010). Cultivation of *Pleurotus ostreatus* and other edible mushrooms. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1321-11337. doi: 10.1007/s00253-009-2343-7
- Shah, A. A., Hasan, F., Hameed, A., & Ahmed, S. (2008). Microbiological degradation of plastics: A comprehensive review. *ELSEVIER*, 246-265. doi:10.1016/j.biotechadv.2007.12.005
- Swapp, S. (26 de mayo de 2017). Scanning Electron Microscopy (SEM). University of Wyoming. Recuperado el 03 de enero de 2018, de https://serc.carleton.edu/research_education/geochemsheets/techniques/SEM.html
- Tien, M., & Kirk, T. (1988). Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium* . *Methods in 238 enzymology-Biomass*, 238-2349.

- Valdemar, E., S, T.-M., I, D.-A., & A., V.-M. (2011). Disposable diapers biodegradation by the fungus *Pleurotus ostreatus*. *ELSEVIER*. doi:10.1016/j.wasman.2011.03.007
- Valdecabres, E. (05 de noviembre de 2015). Construir casas con botellas de plástico. Madrid, España: El Mundo. Recuperado el 20 de octubre de 2017, de <http://www.elmundo.es/economia/2015/11/05/55fbe61ee2704e0c4b8b4582.html>
- Yamada-Onera, K., Mukumoto, H., Katsuyaya, Y., Saiganji, A., & Tani, Y. (2001). Degradation of polyethylene by a fungus *penicillium simplicissimum* YK. *Poly Degrad Stab*, 72, págs. 323-327.
- Zahra, S., Abbas, S. S., Mahsa, M.-T., & Mohsen, N. (21 de Septiembre de 2009). Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi. Tehran, Iran.

7.- ANEXOS

7.1.- Anexo 1: Variación de peso

Tabla 5: Variación de peso de las muestras experimentales en los 3 períodos de cultivo

Especie/Variación en peso	30 días		60 días		90 días	
	Media (%)	STD (%)	Media (%)	STD (%)	Media (%)	STD (%)
Aspergillus	-0.256	0.024	0.105	0.052	0.441	0.419
Fusarium	0.702	0.058	1.198	0.294	0.996	0.115
Cladosporium	-0.323	0.006	-0.351	0.427	-0.689	0.159
Trichoderma	-0.676	0.099	-0.075	0.064	-0.741	0.031
Penicillium	-0.967	0.943	-0.400	0.150	-0.754	0.207
Pleurotus	-0.319	0.768	-0.841	0.634	-0.756	0.436

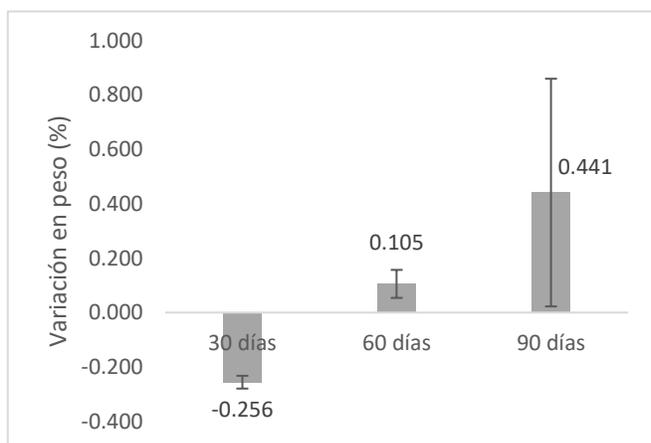


Figura 35: Variación de peso en LDPE inoculado con Aspergillus

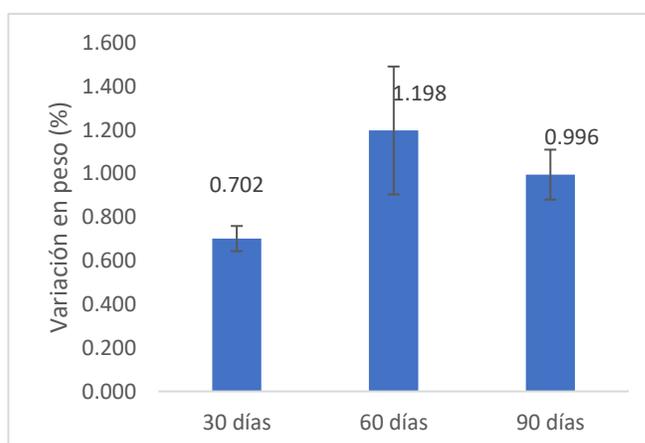


Figura 34: Variación de peso en LDPE inoculado con Fusarium

}



Figura 39: Variación en peso en LDPE inoculado con *Cladosporium*

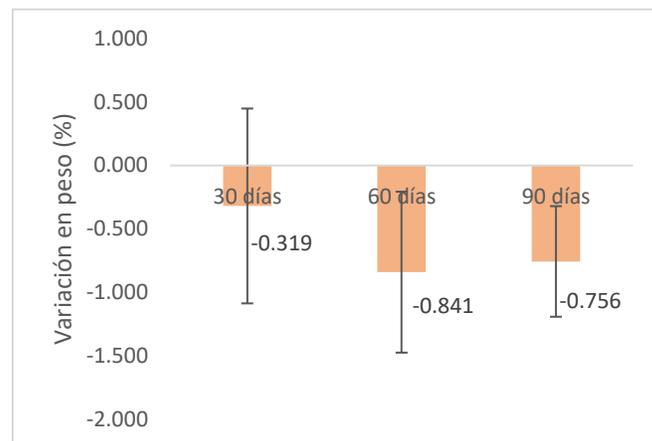


Figura 38: Variación de peso LDPE inoculado con *Pleurotus*

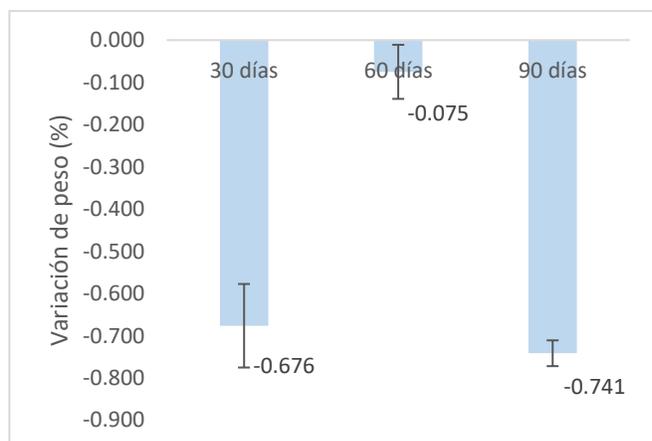


Figura 37: Variación en peso en LDPE inoculado con *Trichoderma*

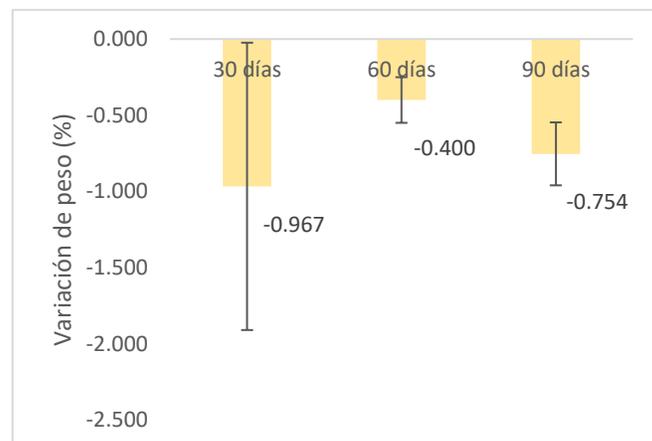


Figura 36: Variación en peso en LDPE inoculado con *Penicillium*

Tabla 6: Variación de peso en los controles positivos y negativo de crecimiento microbiano

	Media (%)	STD (%)
Negativo de crecimiento	-0.60	0.07
Aspergillus	-0.69	0.16
Fusarium	-5.56	2.32
Cladosporium	-1.00	0.22
Trichoderma	-0.56	0.24
Penicillium	-1.48	0.45
Pleurotus	-0.77	0.24

7.2.- Anexo 2: Microscopía electrónica de barrido

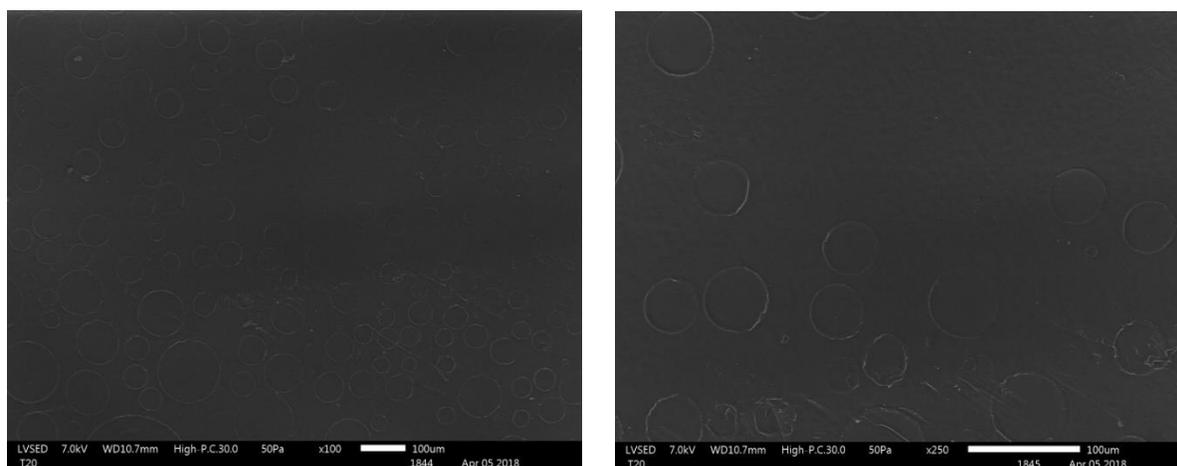


Figura 40: SEM, Patrón de burbujas en LDPE posterior envejecimiento térmico (100x y 250x respectivamente)

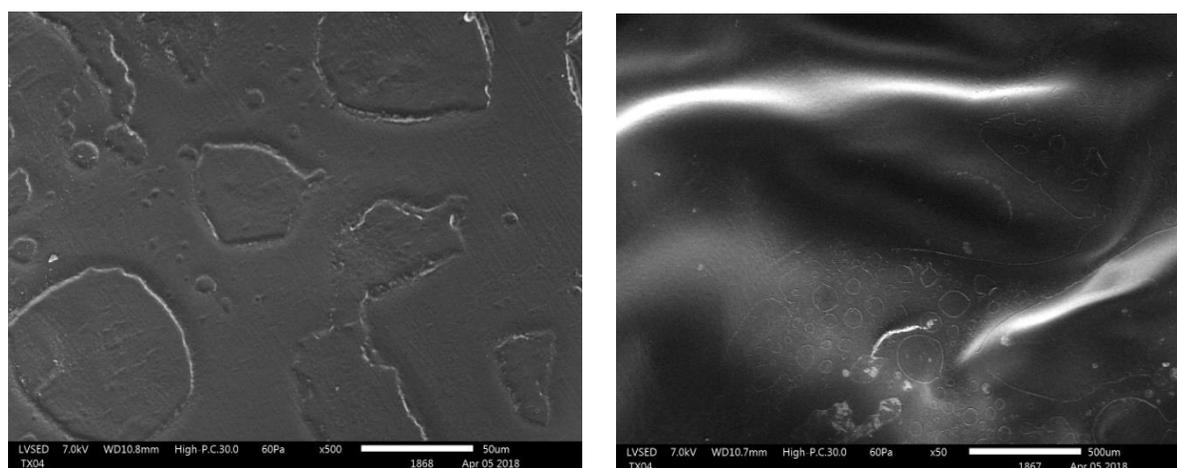


Figura 41: SEM, patrón de burbujas distorsionado en control negativo de crecimiento, 500x y 1000x

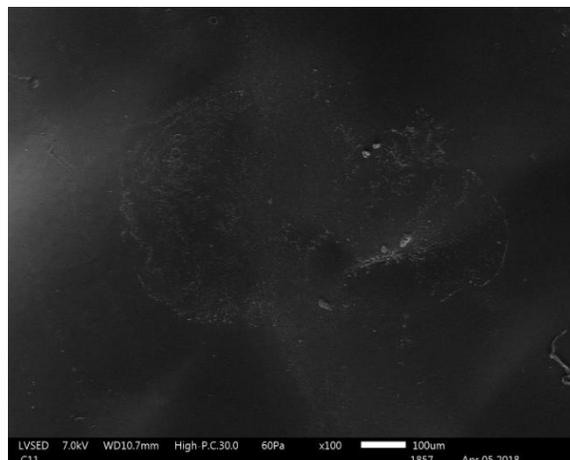
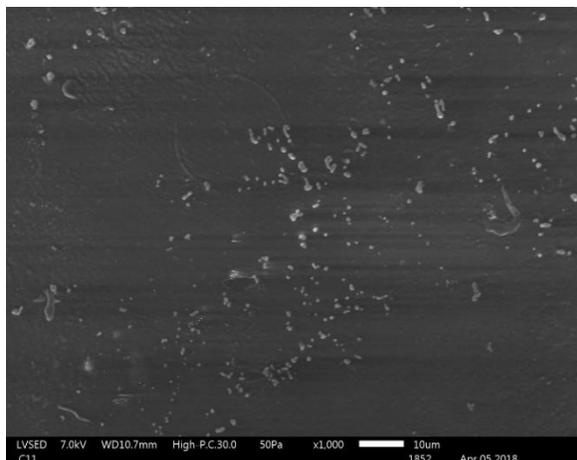


Figura 42: SEM Fusarium 90 días, superficie rugosa y acumulación de sal 1000x (izquierda); panorama general 100x (derecha)

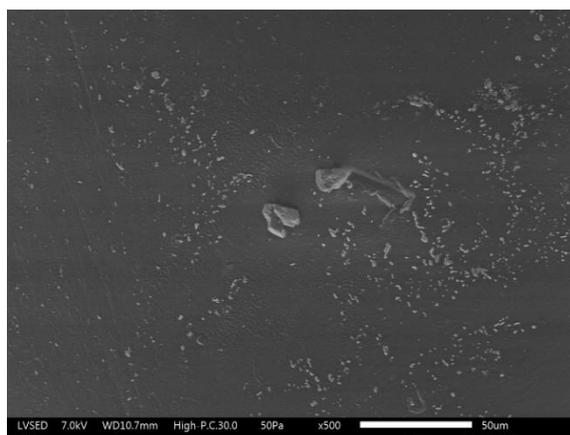
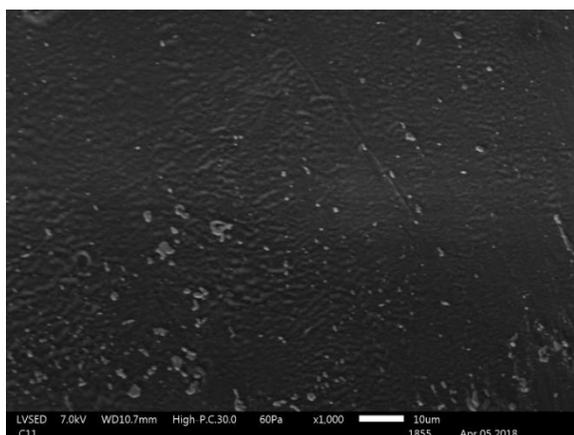


Figura 44: SEM, Fusarium 90 días, restos de sal y rugosidades, 1000x y 500x

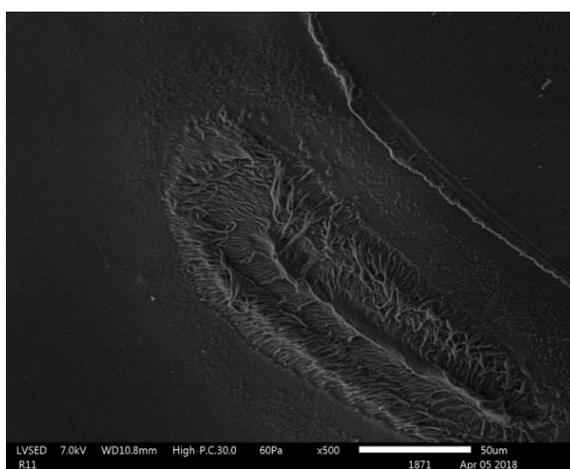
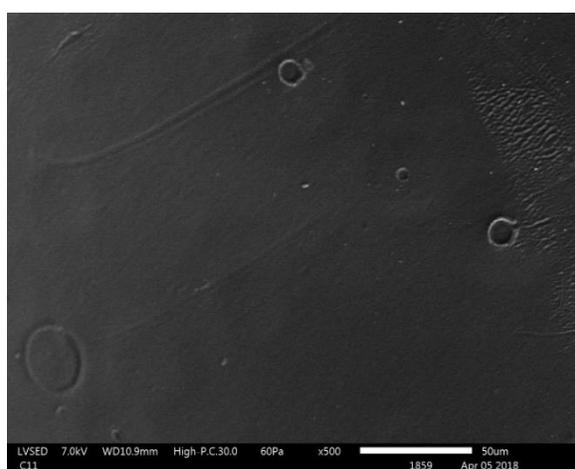


Figura 43: SEM, Fusarium 90 días, agujeros en superficie, 500x (izquierda) y formación de hifas de Aspergillus en matriz polimérica 500x (derecha)

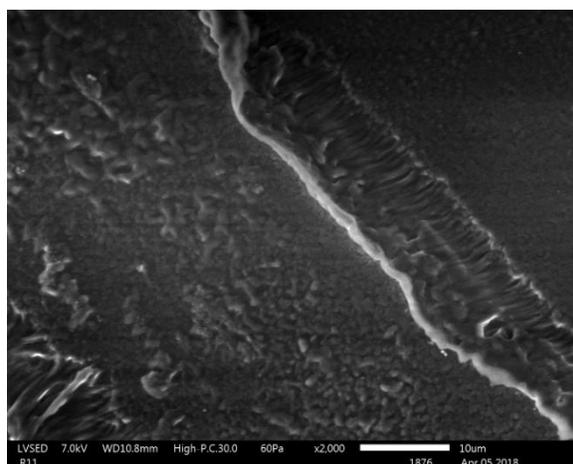
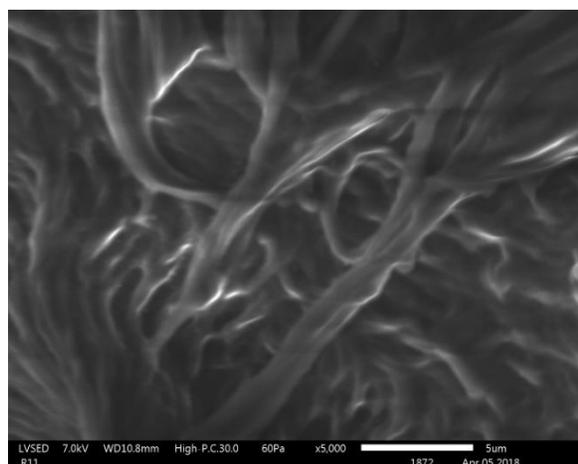


Figura 46: SEM, *Aspergillus* 90 días, formación de hifas en matriz polimérica, 5000x y 2000x

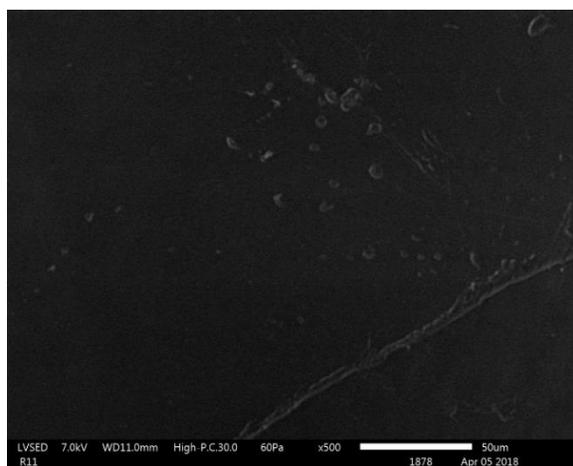
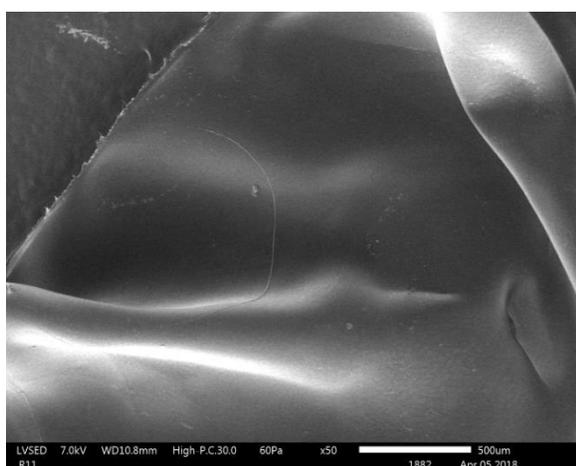


Figura 45: SEM, *Aspergillus* 90 días, morfología superficial, 50x y 500x

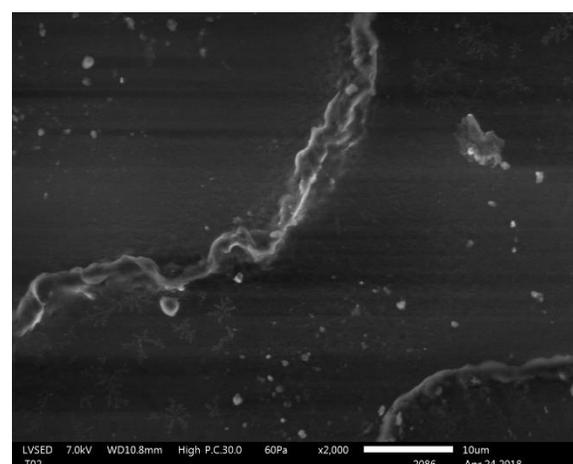
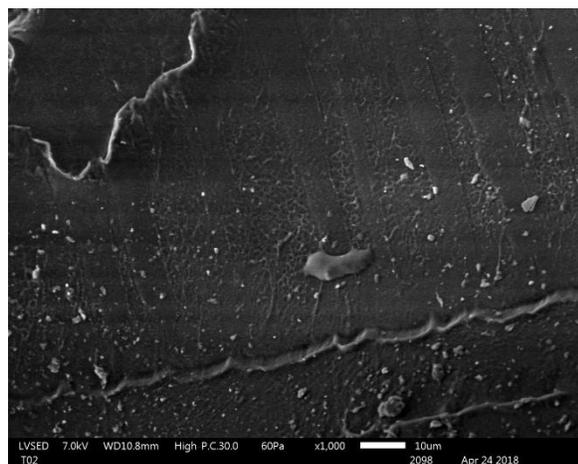


Figura 47: SEM control positivo *Penicillium*, 1000x y 2000x



Figura 50: Control positivo *Aspergillus* (izquierda) y *Fusarium* (derecha)

7.3.- Anexo 3: Controles positivos



Figura 49: Control positivo *Penicillium* (izquierda) y *Pleurotus* (derecha)



Figura 48: Control positivo *Cladosporium* (izquierda) y *Trichoderma* (derecha)



Figura 51: Muestras de LDPE incubadas en control positivo con *Cladosporium* (izquierda) y *Fusarium* (derecha)



Figura 52: Muestras de LDPE incubadas en control positivo con *Aspergillus* (izquierda) y *Trichoderma* (derecha)



Figura 54: Control positivo de crecimiento, *Aspergillus* utilizando la muestra de LDPE como sustrato después de ser extraída del medio de cultivo



Figura 53: Muestras de LDPE incubadas en control positivo con *Penicillium* (arriba) y *Pleurotus* (abajo)

7.4.- Anexo 4: Metodología para la preparación de agar de papa y dextrosa

En primer lugar, se calculó cuánto PDA en polvo se necesitaría para el volumen de medio requerido. La cantidad a utilizar por litro de solución es detallada por el fabricante. Usualmente, 800ml de medio en solución rinden para 25-30 cajas Petri.



Figura 56: Autoclave



Figura 55: Medio de cultivo (PDA)

En una botella de vidrio se disolvió el medio en polvo con agua destilada, para luego someter la mezcla a calentamiento en una hornilla. Este procedimiento se realizó con agitación constante, hasta el punto de ebullición de la solución. Posteriormente, se la introdujo en el autoclave durante 20 minutos a 121°C.

Acabado el proceso de esterilización, se extrajo la botella del equipo y se la enfrió hasta que ésta fue tolerable al tacto. Inmediatamente, se procedió a dispensar el medio en cajas Petri, a fin de que el agar no se solidificase en la botella. Este procedimiento se realizó en la cámara de flujo laminar de Laboratorio de Biotecnología Agrícola y Ambiental I, bajo condiciones de asepsia. Finalmente, se guardó los medios en una bolsa plástica, la cual se etiquetó y almacenó a 4°C.

7.5.- Anexo 5: Metodología para la réplica y aislamiento de hongos

7.5.1.-Réplica.

La réplica de un microorganismo consiste en reproducir el ser vivo en un medio de cultivo diferente, a fin de que crezca exitosamente, pueda ser utilizado, y la muestra original pueda ser conservada para futuras réplicas. A fin de obtener resultados fehacientes, es indispensable que la muestra madre de cada microorganismo sea lo más pura posible, es decir, que no esté contaminada por agentes bióticos o abióticos externos que puedan interferir en el proceso de experimentación. Los microorganismos replicados fueron las cepas de *Aspergillus*, *Fusarium*, *Trichoderma*, *Penicillium* y *Cladosporium*.

Se procedió entonces a replicar las muestras de interés a partir de cultivos almacenados en el Banco de Laboratorios de Biotecnología Agrícola y de Alimentos II de la USFQ (figura 57). El medio de cultivo (PDA) fue preparado con antelación, de manera que las cajas Petri estaban listas al momento de la siembra. Los cultivos se abrieron cuidadosamente y se reprodujo cada uno de ellos por técnica de punción. Este procedimiento se realizó por duplicado, en cámara de siembra, con material autoclavado y cumpliendo con todas las condiciones de asepsia del caso. Finalizado el proceso, se sellaron y etiquetaron todas las cajas. Para su crecimiento, éstas fueron introducidas en una incubadora a 30°C.



Figura 57: Banco de cepas (izquierda y centro) e incubadora (derecha) de la USFQ

El tiempo de crecimiento varía en los microorganismos utilizados. Generalmente les toma de 3 a 5 días en crecer. Se desechó las muestras contaminadas y se repitió el proceso hasta obtener una muestra pura de cada microorganismo.

Finalmente se trasladó las muestras de la incubadora al frigorífico, donde estas se conservan y su crecimiento se detiene.

7.5.2.-Aislamiento.

La cepa de *Pleurotus*, a diferencia del resto, no estaba disponible en el banco del laboratorio de biotecnología agrícola y de alimentos, por tanto, fue necesario aislarla a partir de una muestra del microorganismo inoculada en un sustrato de aserrín y grano de trigo. Ésta fue adquirida comercialmente en fase de propágulo.



Figura 58: Pleurotus en fase de propágulo, inoculado en un sustrato de trigo y aserrín (izquierda); Pleurotus fructificado (derecha)

Se cultivó el hongo en condiciones de humedad, sombra, y temperaturas relativamente bajas (10-14°C) (Pathmashini, Arulnandhy, & Wijeratnam, 2008). La muestra demoró aproximadamente 5 semanas en fructificar; punto donde se procedió a extraer una muestra de micelio y de cuerpo fructificado para su siembra en cámara de cultivo (Sánchez, 2010). Para ello se realizó una serie de 10 diluciones 1:10, de las cuales se eligió las últimas 3 impares para su posterior siembra en cajas Petri. A continuación, se trasladó las cajas a la cámara de cultivo, donde permanecieron aproximadamente 20 días en período de crecimiento. Finalmente, se las trasladó al frigorífico, donde fueron almacenadas a 4°C.