



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD  
POR CONSORCIOS MICROBIANOS

TESIS  
PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
BIOLOGA  
PRESENTA:  
JAZMIN GABRIELA GUTIÉRREZ PESCADOR

DIRECTOR. M. EN C. SERGIO PALACIOS MAYORGA  
INSTITUTO DE GEOLOGÍA. DEPARTAMENTO DE EDAFOLOGÍA, UNAM.  
APARTADO POSTAL 70-296. CIUDAD UNIVERSITARIA,  
C.P. 04510, MÉXICO, D.F.



FES  
ZARAGOZA

ASESOR INTERNO. BIÓL. MARÍA DE LOS ÁNGELES GALVÁN VILLANUEVA

México, D.F

Mayo 2013

# Contenido

Índice de Cuadros	II
Índice de Figuras	III
<b>RESUMEN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>ANTECEDENTES</b>	4
<b>MARCO TEÓRICO</b>	7
<b>Polímero</b>	7
Polietileno	8
PEAD	9
PEBD	9
<b>Degradación de polímeros</b>	10
Tipos de degradación	11
Consortios microbianos	13
Biopelícula	14
<b>Descripción de zona de estudio</b>	15
<b>JUSTIFICACIÓN</b>	17
<b>HIPÓTESIS</b>	18
<b>OBJETIVOS</b>	19
<b>MATERIAL Y MÉTODOS</b>	20
<b>RESULTADOS</b>	25
<b>DISCUSIÓN</b>	43
<b>CONCLUSIONES</b>	48
<b>REFERENCIAS</b>	49
Anexo I	52

## Índice de Cuadros

<b>Cuadro 1;</b> Características generales del polietileno	8
<b>Cuadro 2.</b> Degradación de PEBD en medio MSM a pH 5 y 7	26
<b>Cuadro 3.</b> Degradación de PEBD en Medio MSM con Agitación Constante	28
<b>Cuadro 4.</b> Degradación de diferentes sustratos en medio MSM	30
<b>Cuadro 5.</b> Identificación de las cepas aisladas del consorcio (biopelícula)	41
<b>Cuadro 6.</b> Clasificación taxonómica del género <i>Pseudomonas</i>	41
<b>Cuadro 7.</b> Clasificación de hongos filamentosos identificados	42
<b>Cuadro 8.</b> Clasificación de levaduras identificadas	42

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Composición de Residuos Sólidos Urbanos en México en 2007	5
<b>Figura 2.</b> Reciclaje de Residuos Sólidos Urbanos por composición en México, 2007	6
<b>Figura 3.</b> Molécula de polietileno ramificado, o polietileno de baja densidad	9
<b>Figura 4.</b> Formación de biopelícula	15
<b>Figura 5.</b> Vista satelital del área de disposición final de los residuos sólidos urbanos del Distrito Federal, “Bordo Poniente”	16
<b>Figura 6.</b> Observación de la biopelícula con microscopía óptica a 100x: (a) Tinción con rosa de bengala, (b) Tinción de Gram (fotomicrografías tomadas con microscopía óptica)	25
<b>Figura 7.</b> Degradación de PEBD en medio MSM a pH 5 y 7	27
<b>Figura 8.</b> Comparación estadística porcentual a diferentes pH.	27
<b>Figura 9.</b> Degradación de PEBD con/sin agitación	28
<b>Figura 10.</b> Comparación estadística con/sin agitación	29
<b>Figura 11.</b> Degradación de los tres sustratos	30
<b>Figura 12.</b> Comparación estadística de los tres sustratos	30
<b>Figura 13.</b> Fotomicrografías en muestras con un aumento de 800x.	32
<b>Figura 14.</b> Fotomicrografías en muestras con un aumento de 3700x	34
<b>Figura 15.</b> Fotomicrografías en muestras con un aumento de 7500x.	36
<b>Figura 16.</b> Fotomicrografías en muestras con un aumento de 15000x.	38
<b>Figura 17.</b> Fotomicrografías en muestras con un aumento de 30000x.	40

## *Agradecimientos*

*Una vez concluido este trabajo, quiero expresar mi agradecimiento más sincero a todas aquellas personas que en su momento me apoyaron y me dieron la posibilidad de poder realizarlo.*

*En primer lugar a Mis Padres y Hermanos por su apoyo y comprensión en los momentos malos y buenos de mi vida y por ser el pilar más importante en mi formación como persona. Gracias por estar siempre conmigo, ya que sin ustedes no podría haber logrado esta meta.*

*Al M. en C. Sergio Palacios Mayorga, por todos sus comentarios y acertadas críticas a lo largo de este proyecto. Gracias por el apoyo que me ha brindado durante mi estancia en el Instituto y el apoyo incondicional, en la dirección de este trabajo.*

*A la Dra. Margarita Reyes Salas, por su importante participación en la preparación y observación de las muestras en el microscopio electrónico de barrido, la revisión del manuscrito y sus excelentes observaciones y sugerencias y a la M. en C. Sonia Ángeles García, por su valioso apoyo técnico en las observaciones con el microscopio electrónico de barrido.*

*A la M. en C. María Berenit Mendoza Garfias, por su participación en el secado a "Punto Crítico" de las muestras.*

*A la QFB Ana María Rocha, por la revisión del manuscrito y las valiosas observaciones y sugerencias a la redacción del mismo.*

*Al M. en C. Armando Cervantes por el apoyo brindado en el manejo del programa estadístico.*

*También agradezco a la Maestra María de los Ángeles Galván, por el apoyo académico brindado en la realización del trabajo, así como por sus palabras de aliento para seguir adelante.*

## RESUMEN

Durante los últimos años, la producción de plásticos ha crecido en forma considerable, particularmente la de aquellos relacionados directamente con la industria de empaques y embalajes al grado de que, actualmente, alcanza el 40% del volumen total de la basura urbana (Secretaría de Obras y Servicios, 2010). Este hecho se ha convertido en una gran problemática ambiental, ya que los residuos plásticos, principalmente bolsas y botellas, obstruyen los drenajes y se acumulan en barrancas, ríos y lagos llegando hasta los mares. Esta situación debería ser suficiente motivo para reducir su producción, o bien propiciar su reciclaje a nivel global. Aunque se ha pensado que la biodegradación de plásticos (como el polietileno y el PET), podría ser la solución, aún no se han encontrado microorganismos que en corto tiempo sean capaces de biodegradarlos totalmente.

En el presente trabajo se muestran los resultados del estudio realizado para encontrar y aislar consorcios de microorganismos capaces de degradar plásticos, como el polietileno de baja densidad, con el que se fabrican millones de bolsas que diariamente se convierten en basura y que se encuentra indiscriminadamente en el ambiente. Para este propósito, se planteó utilizar medios de cultivo selectivos utilizando estos mismos plásticos como única fuente de carbono. Los materiales utilizados para el aislamiento de microorganismos con potencial para degradar estos materiales, fueron plásticos enterrados por más de veinte años. Las muestras corresponden a un lugar específico adjunto a la Planta de Composteo, correspondiente al del sitio de disposición final de residuos de la Ciudad de México, conocido como "Bordo Poniente". Los puntos de recolección fueron seleccionados con base en la riqueza de los materiales en el lugar. A través del cultivo en medios líquidos y sólidos, así como a la observación al microscopio óptico y electrónico de barrido, se detectó el crecimiento de las colonias, de los consorcios microbianos. Se pudo apreciar la gran capacidad que tienen estos microorganismos para adherirse al polietileno y formar una biopelícula. La actividad degradadora de los consorcios, se definió por el aspecto físico de las muestras de polietileno, observadas al microscopio electrónico de barrido y por la pérdida de peso del material plástico luego del periodo de incubación, después de haber sido utilizado como única fuente de carbono en el medio de cultivo.

La identificación taxonómica se logró con base a las características macroscópicas y al crecimiento en medios líquidos y sólidos en placa específicos, en los que se identificaron seis hongos filamentosos, tres levaduras y un grupo de bacterias. La evidencia de una mayor capacidad para biodegradar el polietileno, se detectó con el consorcio microbiano conformado por hongos y levaduras, en un medio de cultivo líquido a pH 5 con agitación constante. Se concluye que los consorcios microbianos aislados de fragmentos de polietileno (PEBD) de baja densidad, presentan biopelícula con capacidad biodegradadora.

## INTRODUCCIÓN

En el Distrito Federal se concentra, aproximadamente, la octava parte de los residuos sólidos urbanos generados en todo el país. La creciente generación de residuos urbanos convertidos en basura es el resultado de que, durante muchas décadas, el país careció de un esfuerzo gubernamental efectivo que concientizara a la ciudadanía, sobre su separación obligatoria desde la fuente de origen, dando como resultado un enorme desequilibrio ambiental, debido a la proliferación de tiraderos de basura a cielo abierto, en todo el territorio nacional. Desafortunadamente, esta situación es desconocida por un sector importante de la población que vive en las grandes ciudades. La cantidad de basura que diariamente se genera, sigue siendo un gran problema nacional por el alto costo económico y ambiental que significa su manejo y disposición final, para los gobiernos de las grandes urbes del país (Secretaría de Obras y Servicios, 2010).

Uno de los grandes problemas es la creciente presencia de residuos plásticos en los tiraderos a cielo abierto y “rellenos sanitarios”, provenientes de los empaques y embalajes utilizados por el comercio en general y por la industria, entre la que destaca la alimenticia. Por sus propiedades físicas, como densidad y resistencia mecánica, estos materiales pueden permanecer inalterados y ocupando el mismo volumen, por períodos que pueden fluctuar de 20 a 500 años, dependiendo de la presencia de residuos orgánicos y de su exposición al sol. Además, su baja densidad origina que su manejo sea costoso y difícil (Caín, 1992). Actualmente, del volumen total de basura generado en la Ciudad de México, los residuos plásticos ocupan del 30 al 40% (Secretaría de Obras y Servicios, 2010).

Los productos elaborados con polietileno presentan dos tipos de desventajas: (1) el deterioro cuando, después de ser utilizados, se convierten en basura y (2) la contaminación ambiental visual y física posterior a su uso. En este último caso, debido a sus características de resistencia, son muy difícilmente degradados por los microorganismos del suelo, permaneciendo visibles en el ambiente por tiempo indefinido (Mangiarotti *et al.*, 1994). A ello se debe agregar el hecho de que, cuando son quemados a baja temperatura, generan sustancias volátiles tóxicas como las dioxinas y furanos, asociadas a cáncer en el ser humano, daño en el aparato reproductor y trastornos en el desarrollo de la mayoría de los seres vivos (Klemchuk, 1990).

En años recientes, la degradación microbiana de los plásticos, se ha considerado como una alternativa para solucionar el problema de la disposición final de estos residuos que, a diferencia de la incineración, presenta condiciones de operación que no serían drásticas ni costosas. De los trabajos publicados sobre este tema, se ha tomado en cuenta el beneficio a la salud humana y al ambiente, así como la posibilidad de utilizar los subproductos, como una fuente de energía. Algunos científicos han señalado que la biodegradación del polietileno por microorganismos, podría ser una solución para reducir la contaminación por plásticos (Méndez *et al.*, 2007; Limón, 2001 y Silva, 2009). En la información publicada se hace referencia al desarrollo de procesos, que permitan la biodegradación de residuos plásticos de uso común, como alternativa viable a la gestión en vertedero (Villa *et al.*, 2008). Por otra parte, se han descubierto ciertas bacterias del género *Pseudomonas* y *Sphingomina*s, capaces de degradar bolsas plásticas en un período de tres meses (Burd, 2008), además de hongos *ligninolíticos* también aptos para degradar polietileno (Silva, 2009).



## ANTECEDENTES

En muchos países, el primer problema que se sigue planteando en la literatura en relación a los residuos urbanos, ha sido el de su eliminación más que el de su reciclaje, recuperación y reutilización. Por otra parte, la solución que la sociedad da al problema de la basura es aún bastante primitiva, es decir, apartarlos de su vista, arrojándolos o enterrarlos para ocultar el problema. De todo el mundo, México, con sus más de 26, 009,337.9 toneladas al año, equivalentes a 71,258.46 toneladas diarias, ocupaba en el año 2000, el décimo lugar entre los países que más generan basura en el mundo; considerando que Estados Unidos ocupa el primero (SEMARNAT, 2011).

El aumento de la generación de residuos plásticos se debe, por una parte, a la explosión demográfica, desarrollo económico y crecimiento y, por la otra, al desarrollo de la industria de envases y embalajes plásticos. En la primera causa, se hace referencia al desarrollo creciente de grandes centros urbanos variando, de acuerdo con la zona de la ciudad, los patrones de consumo, actividad comercial e industrial, así como el nivel socioeconómico de los habitantes de dichas zonas. La generación de residuos sólidos urbanos, en general, sigue la tendencia ascendente marcada por el consumo final nacional privado (CFNP), así como del PIB; el primer caso (CFNP), se refiere al valor total de todas las compras en bienes y servicios de consumo, individuales y colectivos, realizadas por los miembros de los hogares de residentes, las instituciones sin fines de lucro y el gobierno federal. Finalmente, se supone que a mayor consumo, existe un mayor potencial de generación de residuos.

Por regiones, la zona metropolitana del D.F. genera 47% del total de los residuos del país, mientras que las zonas rurales o semi-urbanas generan un 12% de residuos (SEMARNAT, 2012).

En el año 2006, el país produjo cerca de 31, 928,791.1 toneladas de residuos, con una producción de basura por persona de 1.4 kilogramos al día. Existe una disparidad en las cifras que se manejan, en relación con la cantidad de basura que se produce en el Distrito Federal, ya que el volumen creciente de los residuos sólidos urbanos y su manejo inadecuado, promueven la proliferación de tiraderos sin control, que generan riesgos al ambiente y a la salud humana. Sin embargo, los datos de generación que se tienen, son de 12,707.00 toneladas por día, que significaron 4, 638,055.00 toneladas al año, en 2009. Este indicador muestra, tanto

la demanda de infraestructura, como la magnitud de riesgo potencial, ante el manejo inadecuado de los residuos urbanos (SEMARNAT, 2011).

En cuanto al tipo de materiales que componen los residuos urbanos, ha habido un cambio; por ejemplo, en el año 1995 era de 1, 336 mil toneladas, de basura no biodegradable (plásticos), mientras que en el 2006 se incrementó a más del doble. Tan sólo en el año 2007, la composición de Residuos Sólidos Urbanos (RSU) del país era de: residuos orgánicos (50%), papel y cartón (14.9%), vidrio (6.4%), plástico (6%), metal (3.5%) y textiles (1.5%) ver Figura 1.

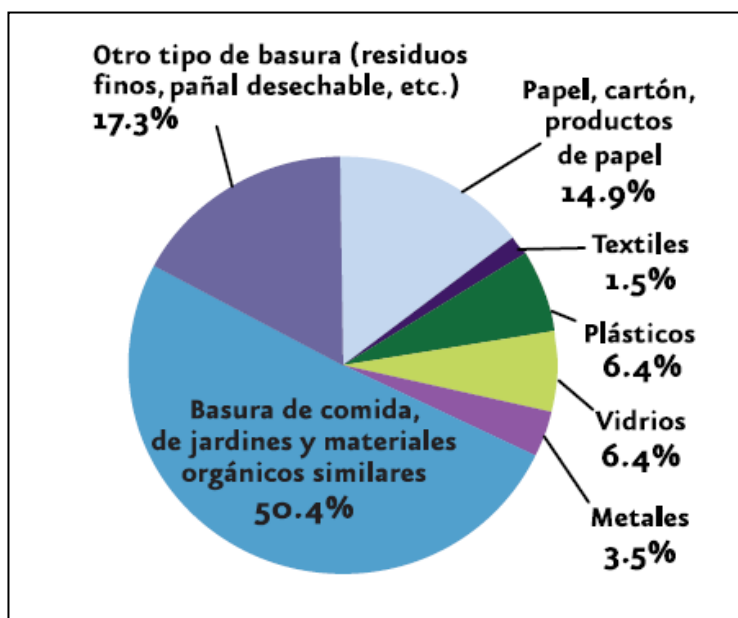


Figura 1. Composición de Residuos Sólidos Urbanos en México en 2007

Fuente: SEMARNAT, 2012.

Como sucede en muchos países del mundo, en México no se permite la utilización de plásticos reciclados en la producción de nuevos envases y embalajes para productos alimenticios, entre otros, debido a restricciones sanitarias. Esto tiene como consecuencia, que los materiales provenientes de envases y embalajes de post-consumo sean dirigidos, en caso de que sean reciclados, a productos no utilizables en la industria alimentaria.

El volumen de residuos plásticos que se recicla en el país, es muy bajo aunque se ha incrementado. De acuerdo con las cifras obtenidas de los sitios de disposición final de residuos, en 2007 se recicló 0.5% del volumen de los residuos plásticos generados (Figura 2).

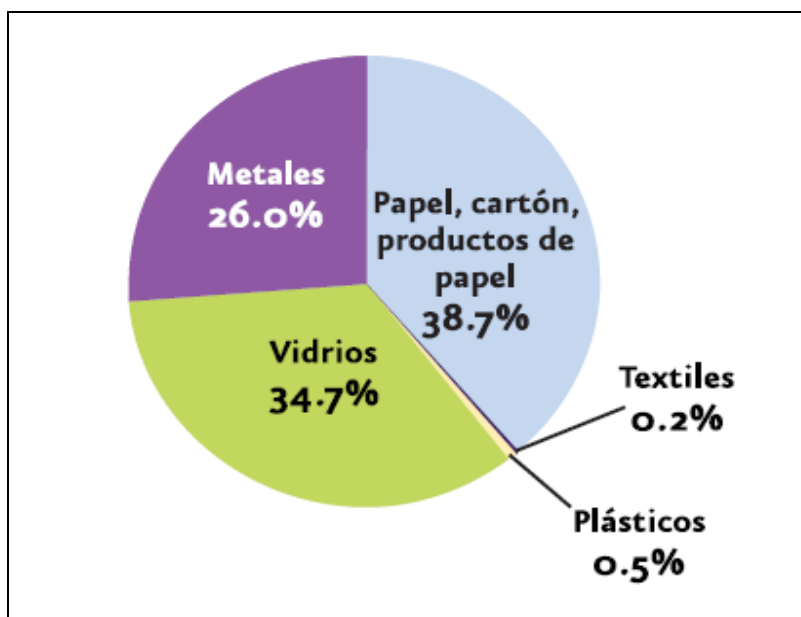


Figura 2. Reciclaje de Residuos Sólidos Urbanos por composición en México, 2007  
Fuente: SEMARNAT, 2012.

Desde su aparición, la industria dedicada a la fabricación de materiales plásticos ha tenido un auge importante. Este desarrollo se ha debido principalmente, a su amplio campo de aplicación, ya que los plásticos pueden ser ocupados lo mismo para envases, paquetería, construcción o electrónica, llegando a sustituir al vidrio, papel, madera y otros materiales utilizados en construcción, uso doméstico, comercial e industrial.

En los últimos años se han tratado de encontrar soluciones biológicas, como la biodegradación, para reducir el problema de la acumulación de residuos plásticos. En este sentido, se ha observado que en algunos polímeros de baja densidad, como el polietileno, se ha detectado desarrollo microbiano que genera su degradación. Otros autores han sometido a estos polímeros a tratamientos físicos, como los térmicos a temperaturas de: 90, 105, 120, 135 y 150°C (Limón, 2001), o químicos con la aplicación de ácidos, bases y disolventes (Zheng *et al.*, 2005) y otros produciendo envejecimiento acelerado (Limón, 2001).

En investigaciones más recientes, se ha encontrado que los microorganismos no actúan de forma individual, sino que es un trabajo conjunto de varios grupos de microorganismos llamados consorcios, capaces de degradar polietileno de baja densidad, sin un tratamiento previo, ya sea químico o físico. Estos microorganismos son similares a los mencionados por Méndez *et al.* 2007 y Uribe *et al.* 2009, en los que se encuentran tres grupos de microorganismos: bacterias, hongos y levaduras.

## MARCO TEÓRICO

### Polímero

Son macromoléculas que se forman a partir de la unión de moléculas pequeñas o monómeros. El proceso por el que se unen los monómeros, se llama polimerización, en donde se encuentran dos clases:

- 1) Son los de condensación, en donde las unidades que los integran y que se repiten, están unidas por medio de enlaces de valencia, resultantes de la eliminación de grupos sencillos ( $H_2O$ ,  $HCl$  y  $NH_3$ ).
- 2) Corresponde a los denominados de adición. En éstos, las unidades que se repiten están unidas por medio de enlaces de valencia, asociados por saturación (Keenan y Wood, 1976).

Pueden ser clasificados en varias formas: por su origen o naturaleza, composición, estructura, reacción de polimerización, comportamiento frente al calor o su área de aplicación (Maier, 2008).

La gran utilidad actual, se debe a que se puede sintetizar el polímero que cumpla una serie de propiedades requeridas (dureza, plasticidad, densidad, etc.). En general, tienen alta resistencia mecánica, debido a que las grandes cadenas poliméricas se atraen. Las fuerzas de atracción intermoleculares dependen de la composición química del polímero y pueden ser de varias clases, siendo las más comunes: fuerzas de Van der Waals, fuerzas de atracción, enlaces de Hidrógeno y fuerza iónica (Brown *et al.*, 2004).

Las propiedades son determinantes, cuando se requiere decidir la aplicación que se le dará. Por ejemplo, se desea construir un objeto que sea elástico, deberá estar hecho de uno con propiedades elásticas, es decir, interesará principalmente su capacidad de elongación y resistencia a la flexión. En este caso sus propiedades de dureza o ductilidad, tendrán escasa importancia.

Estos pueden ser resistentes a la compresión o al estiramiento. Es decir, pueden tener la capacidad de soportar la presión ejercida sobre ellos, sin alterar su estructura o, en el segundo caso, su capacidad para no estirarse con facilidad. También hay resistentes al impacto, es decir, que no se destruyen al ser golpeados (Santillana, 2010).

## Polietileno

Pertenece al grupo de poliolefinas, derivados de hidrocarburos con dobles enlaces. Son polímeros de alto peso molecular y pocos reactivos, debido a que están formados por hidrocarburos saturados. Sus macromoléculas no están unidas entre sí químicamente, excepto en los productos reticulados.

Este polímero, cuya unidad monomérica es la más sencilla desde el punto de vista químico y estructural (dos átomos de carbono y dos átomos de hidrógeno), se produce por la polimerización del etileno (C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>), siendo la olefina más simple. Ahora bien, las posibilidades de ramificación de dicha macromolécula son grandes y dependerán del sistema y condiciones de polimerización empleados. También se debe destacar que las ramificaciones pueden ser de cadena corta y larga (Sáenz, 2006).

El polietileno ha encontrado amplia aceptación en virtud de su buena resistencia química, falta de olor, no toxicidad, poca permeabilidad al vapor de agua, excelentes propiedades eléctricas y ligereza de peso. Se emplea en tuberías, fibras, películas, aislamiento eléctrico, revestimientos, envases, utensilios caseros, aparatos quirúrgicos, juguetes y artículos de fantasía. Es necesario agregar, que para poder ser reintegrado a la naturaleza tarda cientos de años, como veremos más adelante. Debido a su amplia gama de aplicaciones, ocupa un lugar preferente en el consumo. Existen muchas más características (Cuadro 1), por lo que las aplicaciones de este polímero son amplias.

Cuadro 1; Características generales del polietileno.

% de polietileno	55%	62%	70%	85%
Característica				
Punto de fusión (°C)	109	116	125	133
Densidad (g/cm <sup>3</sup> )	0.92	0.93	0.94	0.96
Rigidez (Kg/cm <sup>2</sup> )*	1.75809	3.30520	5.27426	11.6034
Límite elástico (Kg/cm <sup>2</sup> )	119.550	175.809	232.068	358.650

\*Las unidades físicas de la prueba de rigidez son Kg/cm<sup>2</sup> x 10<sup>-3</sup>. (Brown *et al.*, 2004).

El polietileno se clasifica principalmente con base en su densidad (de acuerdo al código de identificación de resinas de las normas de ASTM).

#### Polietileno de Alta Densidad (PEAD o HDPE)

Se obtiene sometiendo el etileno a baja presión (30 atmósferas) y a temperaturas del orden de los 60-120°C.; la presencia de catalizadores estereoespecíficos, da lugar a cadenas lineales muy poco ramificadas. Se trata de poca o nula ramificación en su cadena, permitiendo un empaquetamiento más estrecho. Obviamente su densidad será mayor (0.950-0.965 g/cm<sup>3</sup>), así como su rigidez (Sáenz, 2006). Contiene menos de una cadena lateral, por cada 200 átomos de carbono de la cadena principal. Se funde a unos 135°C, su peso molecular es del orden de 200.000 a 500.000 g/g-mol y es un polímero altamente cristalino (90%). Tiene mayor resistencia a la tracción y mayor dureza. En espesores de 60 micras, prácticamente es opaco.

#### Polietileno de Baja Densidad (PEBD o LDPE)

Se trata de un polietileno con una cadena muy ramificada (Figura 3), lo que implica mayor volumen y, por ello, su densidad es menor (0.915-0.930 g/cm<sup>3</sup>) (Sáenz, 2006).

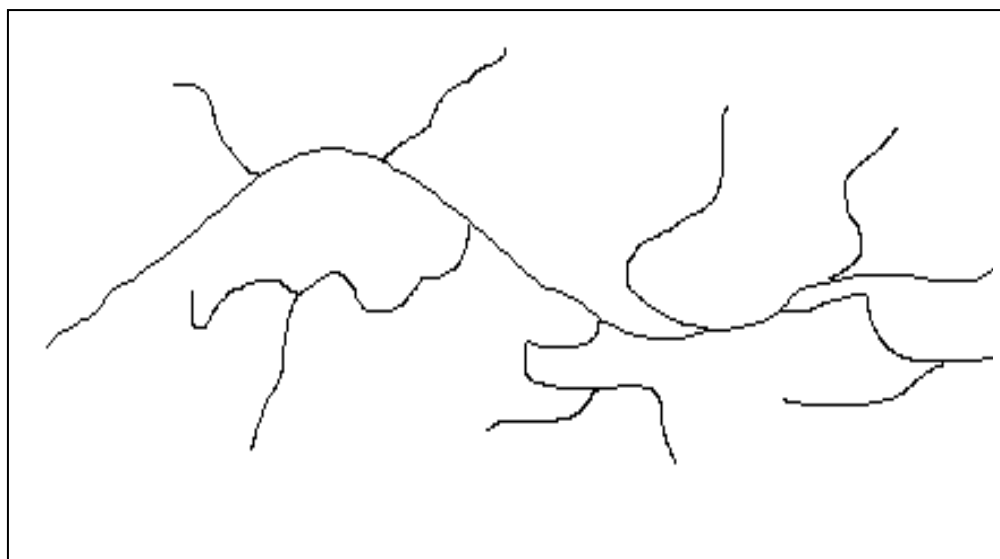


Figura 3. Molécula de polietileno ramificado, o polietileno de baja densidad

Se obtiene por polimerización vinílica con radicales libres a presiones muy altas, requiriendo oxígeno y peróxidos para iniciar la reacción. El producto resultante, es un polímero formado por macromoléculas con cadenas laterales.

Es un sólido parcialmente cristalino (50 – 60%), que funde alrededor de los 150°C. La existencia de las cadenas laterales impide el empaquetamiento y por lo tanto, da lugar a polímeros de baja densidad 0,91 – 0,94 g/cm<sup>3</sup>.

Para su obtención se requieren temperaturas del orden de los 250°C y presiones entre 1.500 y 3.000 atm. La temperatura necesaria es de 60-80°C. Un factor a tener en cuenta, a la hora de diseñar piezas que se trabajen a diferentes temperaturas y que tengan tolerancia estrecha, es el coeficiente de dilatación  $K = 2,5 \cdot 10^{-4} \text{ K}^{-1}$ .

Como todas las poliolefinas, tiene una gran resistencia a los agentes químicos, debido a la naturaleza no polar de los enlaces C-C y C-H. Solamente se disuelven a temperaturas elevadas (60-140°C) en hidrocarburos aromáticos y en derivados halogenados. Lo atacan los ácidos oxidantes concentrados, pero los resiste bien si son diluídos (Bilurbina y Liesa, 1990).

No conducen con facilidad la corriente eléctrica, de ahí su aplicación como aislante y su resistencia dieléctrica es de 2.25-2.35 (1000 ciclos) (Billmeyer, 1971).

### **Degradación de polímeros**

Es un proceso dirigido a modificar la estructura del polímero, para hacerlo vulnerable y perecedero; es decir, que desaparezca como residuo (Limón, 2001). Los materiales orgánicos, por su propia naturaleza, tienen una mayor afinidad para participar como reactivos en determinadas reacciones químicas y perder a lo largo del tiempo sus propiedades, tanto físicas como químicas.

La degradación de un material sintético es un proceso complejo, causado por la escisión de determinados enlaces químicos (Sáenz, 2006). En el proceso de la degradación de un plástico, se observan variaciones tanto físicas como químicas. Entre las modificaciones físicas pueden citarse: pérdida de brillo y color, formación de grietas, aparición de zonas pegajosas y endurecimientos, con la consiguiente pérdida de sus propiedades.

Los cambios químicos producidos, se relacionan fundamentalmente con la aparición de grupos funcionales nuevos que, se ha comprobado, facilitan la ruptura de las cadenas macromoleculares (Limón, 2001).

Para su estudio, se clasifican en función del modo como se lleva a cabo, la escisión de los enlaces que inician la degradación. Sin embargo, debe tenerse en cuenta que estos procesos difícilmente son puros y se producen de forma aislada. En la mayoría de los casos, actúan conjuntamente varios procesos degradativos a la vez (Sáenz, 2006).

### Tipos de degradación

La degradación de los polímeros es causada principalmente, por reacciones que producen el rompimiento de los enlaces en las macromoléculas.

Según el modo de iniciación de los procesos está el que sea de diferente índole, por lo que la degradación puede ser:

- Física: mecánica, térmica, por efecto de radiaciones de energía alfa y fotodegradación.
  - Química
  - Ambiental o por intemperismo.
  - Biológica o biodegradación
- Degradación mecánica.

Cuando se producen cambios macroscópicos por efecto de fuerzas de corte, si se aplica una tensión suficientemente elevada al material polimérico, se pueden producir rupturas en los enlaces de las cadenas moleculares, que inician las reacciones de degradación (Sáenz, 2006).

- Degradación térmica.

Se presenta cuando el polímero experimenta cambios químicos, después de ser sometido a temperaturas altas sin la intervención simultánea de otro compuesto. Sin embargo, suelen ser los aditivos o impurezas presentes en el material, los que se descomponen por efecto de la temperatura y reaccionan con la matriz (Limón, 2001; Sáenz, 2006). Es difícil distinguir entre una degradación térmica y una termoquímica, debido a que los materiales poliméricos son raramente "químicamente puros" (Limón, 2001).



- Degradación por radiación de energía alfa.

Es inducida por radiación electromagnética (rayos X o Y) o radiación de partículas (*alfa*, neutrones, productos de fusión) y no es específica de la absorción (Limón, 2001). Las radiaciones son capaces de generar reactivos intermedios, generalmente iones y radicales libres en el sustrato polimérico, que producen alteraciones significativas en la matriz del material (Sáenz, 2006). La existencia de grupos cromóforos, no es un pre-requisito, como en el caso de la fotodegradación, ya que todas las moléculas son capaces de interactuar con la radiación (Limón, 2001). La extensión y el carácter de los cambios químicos y físicos que se producen, dependen de la composición química del material irradiado e indudablemente de la naturaleza de la radiación.

En muchas ocasiones, las reacciones químicas que tienen lugar cuando se somete un determinado material polimérico a un tipo de radiación, son reacciones intermoleculares, mediante las cuales el material se entrecruza formando nuevos enlaces entre las macromoléculas individuales. Este proceso puede ser considerado como opuesto a la degradación, ya que conduce a un incremento en el tamaño de las macromoléculas.

- Fotodegradación.

Se refiere a los cambios físicos y químicos producidos por la radiación con luz UV o visible. Para que el grado de conversión sea realmente significativo y la luz ultravioleta o visible sea absorbida por el material, debe poseer grupos cromóforos; es decir, capaces de absorber dicha radiación. Estos grupos pueden formar parte de la propia molécula o permanecer en el sustrato en forma de aditivos (Sáenz, 2006). Generalmente dichos grupos absorben radiación, en una escala de longitudes de onda menores de 400 nm.

- Degradación química.

Es inducida por reactivos químicos (ácidos, bases y disolventes). En muchos casos, se observa una serie de conversiones químicas de los compuestos presentes en el material (Limón, 2001); sin embargo, este modo de iniciación del proceso de degradación, necesita una energía de activación muy alta por lo que, generalmente, sólo se observan grados de conversión significativos, si el proceso se produce a temperaturas elevadas (Sáenz, 2006).

- Degradación ambiental.

Los materiales poliméricos sufren un deterioro cuando están expuestos a la acción de la luz solar, en combinación con otras variables climáticas como

cambios de temperatura, humedad ambiental, viento, contaminación, etc. Este deterioro puede manifestarse superficialmente por modificaciones tanto del color como de pérdida de brillo pero, generalmente, afecta también a las cadenas moleculares. Debido a esto, se producen modificaciones en las características mecánicas tales como la resistencia a golpes y rotura, reduciendo estas propiedades iniciales, para los que fueron diseñados.

Se trata de un ejemplo típico de participación o acción conjunta, de varios modos de degradación, que actúan en sinergia para producir la degradación final. Ésta degradación es, por tanto, el resultado de la acción simultánea de la radiación solar, oxígeno, temperatura, viento y erosión por las partículas en suspensión (Sáenz, 2006).

- Degradación biológica o biodegradación.

Es la transformación bioquímica de los compuestos por la acción de microorganismos. La biodegradación de un compuesto ocurre debido a la actividad de varias enzimas, que son producidas por los microorganismos (Limón, 2001). El material polimérico sirve como fuente para la obtención de carbono. Sin embargo, el ataque microbiano sólo se produce en determinados intervalos de temperaturas, por lo que este tipo de proceso de degradación, es muy poco frecuente (Sáenz, 2006). Las enzimas pueden atacar los segmentos más pequeños, generando productos intermediarios de bajo peso molecular que serían incorporados a la biomasa celular o ser mineralizados, es decir, completamente degradados hasta bióxido de carbono y agua en condiciones aeróbicas, o metano y bióxido de carbono en condiciones anaeróbicas (Limón, 2001).

#### Consortios microbianos

La degradación biológica de la materia es un proceso complejo, ya que involucra la participación de diversos grupos microbianos, los cuales no obstante ser independientes, pueden convertirse en un consorcio microbiano. Por consorcio se debe entender, una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas, de diferentes especies, que actúan conjuntamente como una comunidad en un sistema complejo, en la que unos se benefician de las actividades de los demás. En un consorcio se pueden encontrar microorganismos con diferentes habilidades metabólicas (Valdez y Poggi, 2006).

Esta asociación puede generar mayor resistencia a las fluctuaciones del ambiente y promover la estabilidad de los miembros. Por ello, existen tres aspectos a considerar: (1) los miembros se comunican por el intercambio de sustancias o por señales moleculares, ejerciendo un control positivo o negativo en su crecimiento y/o metabolismo; (2) la división del trabajo, como consecuencia de

la comunicación entre los miembros y (3) su habilidad para desempeñar funciones que requieren múltiples pasos, dado que algunos miembros pueden realizar tareas más complejas y soportar los entornos más cambiantes (Brenner, You y Arnold, 2008).

Los consorcios microbianos pueden resistir los periodos de limitación de nutrientes, por la diversidad metabólica disponible. También se han caracterizado en función del uso de los recursos, es decir, si se encuentran juntos es porque tienen los mismos requerimientos ambientales y comparten los elementos de su nicho, o dependen de la presencia de un factor común. Sin embargo, bajo condiciones extremas, pueden desarrollar estrategias como la Adaptación y la Mutación (Ochoa y Montoya, 2010).

### Biopelícula

Una biopelícula es un sistema microbiano organizado, conformado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complejas. El “exopolímero” que es producido por los mismos microorganismos, forma una matriz adherente en donde éstos quedan atrapados y comienzan a organizarse en colonias con diferentes requerimientos metabólicos.

En muchos ambientes, representa una estrategia de supervivencia, pues proporciona una protección contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana y cuenta con un sistema de canales, que le permite establecer un vínculo con el medio externo para hacer intercambio de nutrientes y eliminar metabolitos de desecho (Betancourth *et al.*, 2004).

Es tan diverso el lugar donde se pueden formar las biopelículas, que se han encontrado en hojas de perejil, rocas, dientes e incluso en recipientes de aluminio para el almacenamiento de combustible nuclear.

La formación de biopelículas consta de tres etapas: adsorción reversible, adsorción irreversible y crecimiento. Pueden llegar a ser tan desarrolladas que se vuelven visibles (Figura 4). Además de crecer en superficies inanimadas, pueden formarse en tejido vivo y provocar infecciones similares a las desarrolladas por bacterias en estado libre, presentando una mayor resistencia tanto a los antibióticos, como al sistema inmunológico (Marquez *et al.*, 2008).

Los microorganismos formadores de biopelículas, tienen ventajas sobre los microorganismos suspendidos, como por ejemplo una mayor persistencia dentro del sistema, mayores tasas de crecimiento, de actividad metabólica y de resistencia a la toxicidad (Betancourth *et al.*, 2004).

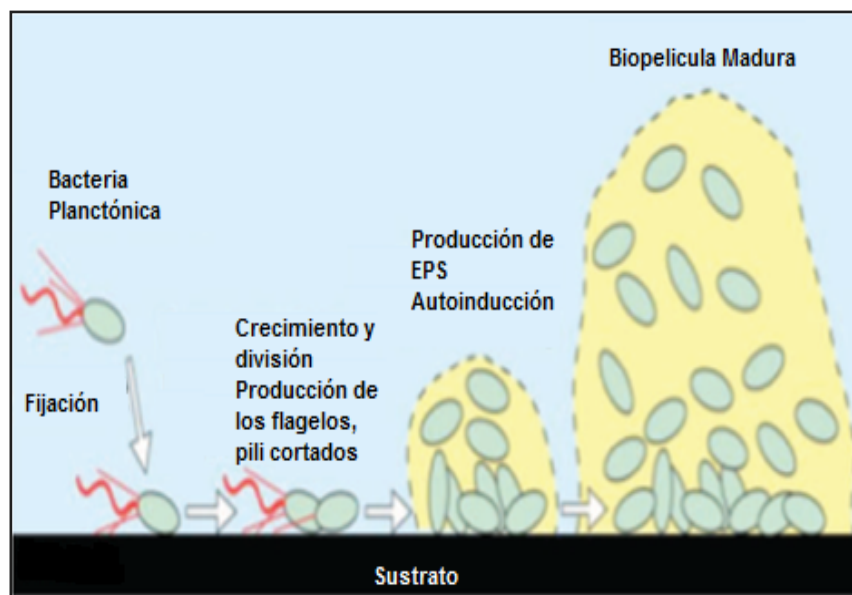


Figura 4. Formación de biopelícula

Fuente: Navia *et al.*,2010.

### Descripción de la zona de estudio

El sitio de recolección corresponde al área de disposición final, de los residuos sólidos urbanos del Distrito Federal, llamado “Bordo Poniente” (Figura 5), ubicado al NE del aeropuerto internacional Benito Juárez, al OE de la ciudad de México, en el km 2.1 de la autopista México -Texcoco en el Estado de México, dentro de la Zona Federal del Ex-Lago de Texcoco. Sus coordenadas geográficas son: 19° 21´30” latitud Norte y 99° 15´45” longitud Oeste, a una altura de 2,250 msnm (INEGI, 2004).

El clima de la región del Ex-Lago de Texcoco, está determinada por los sistemas atmosféricos tropicales y extra-tropicales; distinguiéndose dos estaciones bien definidas: la estación seca concentrada en invierno, de noviembre al mes de abril, y la estación lluviosa de mayo a octubre. Presenta precipitación pluvial mínima de 460 mm y máxima de 600 mm por año, comenzando en mayo y terminando en octubre; la temperatura máxima de 32°C ocurre en abril y junio; y de octubre a marzo, la temperatura mínima es cercana a 0°C (RHRAP, 2011).

En el área del Bordo Poniente se encuentran materiales del cuaternario lacustre, que predominan en todos los municipios ubicados en el área del Ex-Lago de Texcoco. Dentro de los problemas de este tipo de suelos, está el que tienen características poco favorables para el uso urbano, su baja resistencia a la compresión, el efecto corrosivo de la salinidad y su susceptibilidad a la sismicidad

Según la FAO, los suelos son de tipo solonchack, que se caracterizan por ser salinos-sódicos. En algunas partes de la superficie o en todo el perfil del suelo se presentan costras blancas de carbonato de sodio, sobre todo en época de sequía (DUMAC, 2005).

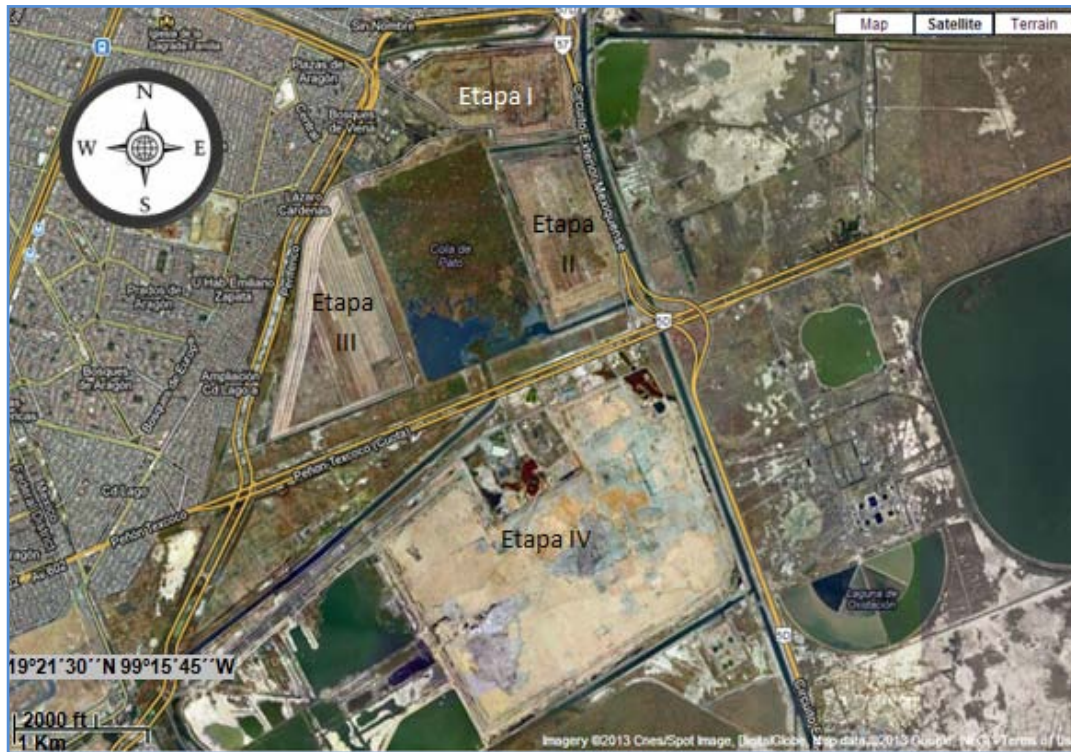


Figura 5. Vista satelital del área de disposición final de los residuos sólidos urbanos del Distrito Federal, "Bordo Poniente"

Fuente: Google maps, 20013

## JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, los plásticos son productos muy utilizados y fabricados en grandes cantidades; sin embargo, debido a su difícil mineralización, los residuos plásticos generados y convertidos en basura urbana, son uno de los contaminantes más importantes de los suelos, ríos, lagos y océanos.

Debido a su característica de ser inertes, los materiales plásticos tampoco son atacados fácilmente por los microorganismos presentes en el ambiente, razón por la que estos materiales, actualmente de uso masivo y derivados del gas natural o del petróleo, se han considerado prácticamente no biodegradables. Frente a este problema, las investigaciones se han dirigido a la búsqueda de diferentes alternativas, de separación y reuso o degradación física. Recientemente, se han producidos variantes de materiales plásticos, que contienen pro-oxidantes o polímeros biológicamente degradables, que permiten su completa mineralización como: (1) Oxo-biodegradables, en los que la descomposición se da vía un proceso de etapas múltiples, usando aditivos químicos para iniciar su degradación; (2) Foto-degradables, aquellos que se degradan por la acción de los rayos ultravioleta de la radiación solar, de tal manera que pierden resistencia y se fragmentan en partículas diminutas y (3) Biodesintegrables, los que están constituidos por una mezcla de una parte orgánica biodegradable con poliolefinas, como por ejemplo mezclas de almidón con polietileno, polipropileno y sus copolímeros.

Por lo antes expuesto, en la actualidad, están adquiriendo especial importancia las investigaciones enfocadas a los consorcios microbianos, que pudieran biodegradar de manera óptima estos polímeros, o que determinen las condiciones que favorezcan esta acción en el ambiente.



## **HIPÓTESIS**

Si los consorcios microbianos del suelo, son capaces de adaptarse a diferentes condiciones ambientales para obtener el carbono que requieren, entonces, al estar en suelos ricos en residuos de polietileno de baja densidad, podrían ser capaces de asociarse y desarrollar, a través del tiempo, biopelículas y los mecanismos bioquímicos para degradar estos materiales. De ese modo, llegarían a ser capaces de tomar el carbono que forma parte de la estructura molecular de estos polímeros.

## OBJETIVOS

### **Objetivo general:**

Determinar si en los consorcios microbianos contenidos en los residuos de polietileno de baja densidad, recolectados en los sitios seleccionados, son capaces de biodegradar este tipo de polímeros.

### **Objetivos particulares:**

Determinar si los consorcios de microorganismos pueden: (1) formar biopelículas en el polietileno de baja densidad; (2) erosionar el polímero como paso inicial para tomar el C de su estructura molecular y (3) determinar si en las biopelículas, existen microorganismos capaces de degradar al polietileno de baja densidad, ya sea en fragmentos moleculares o de mineralizarlo hasta bióxido de carbono.



## MATERIAL Y MÉTODOS

Muestreo del material de estudio.

En el sitio de disposición final de residuos sólidos urbanos de la Ciudad de México, conocido como “Bordo Poniente”, se seleccionó un sitio en la planta de composteo, donde se identificaron suelos que habían sido utilizados como taludes y que mostraban una abundante cantidad de residuos de polietileno (bolsas de polietileno de baja densidad). Estos residuos se colectaron a una profundidad que varió entre 50 y 80 centímetros. Las muestras se colocaron en bolsas de polietileno, adicionando un poco de suelo húmedo del mismo sitio, para tratar de conservar la humedad original de los materiales. Posteriormente se trasladaron al laboratorio, conservándose en refrigeración (4°C), hasta su procesamiento.

Microscopia óptica.

En el laboratorio, se tomaron fragmentos de las muestras de plásticos seleccionadas aleatoriamente y se procesaron, de la siguiente manera:

Los fragmentos de polietileno fueron colocados en recipientes de vidrio, con agua de la llave hervida y enfriada a temperatura ambiente, agitándose a 121 rpm, a temperatura ambiente durante 240 min. El propósito de este tratamiento, fue el de eliminar todos los residuos ajenos a la biopelícula, es decir, que no formaran parte de la misma.

Posteriormente, utilizando el gabinete de flujo laminar, se colocaron en un vidrio de reloj, agregando una gota de rosa de bengala y dejando este colorante durante un minuto. En seguida se aplicaron tres lavados con agua para eliminar el exceso de colorante. Para su observación al microscopio, los fragmentos de polietileno teñidos se colocaron en portaobjetos cubiertos con cubreobjetos. Fue utilizado un microscopio compuesto Carl Zeiss, con el propósito de apreciar la biopelícula, morfología de los microorganismos y el grado de deterioro del plástico a 10x, 40x y 100x aumentos.

Cultivo y Aislamiento de consorcios microbianos.

De las muestras de polietileno recolectadas en campo, se tomaron aleatoriamente fragmentos de 10 cm<sup>2</sup> para ser sumergidos en solución Ringer y después agitados vigorosamente, con el propósito de eliminar los residuos ajenos a la biopelícula. Se obtuvieron muestras de biopelícula (por raspadura), para inocular los medios de enriquecimiento, a pH 7 para el aislamiento de bacterias y a pH 5, para la selección de hongos y levaduras.

Los microorganismos con capacidad para biodegradar el polímero, fueron preseleccionados en un medio de sales minerales (MSM). Suplementado con extracto de levadura 0,02% y con 4 g de perlas de polietileno de baja (PEBD) densidad, químicamente puro (como única fuente de carbono).

Los cultivos se desarrollaron en recipientes cerrados, ocupando un volumen de 30 mL; fueron incubados durante 45 días a temperatura de 22-24 °C y considerando controles sin inoculación para ambas condiciones (pH 7,0 y 5,5). Después de 45 días, 5 mL del cultivo de enriquecimiento fueron trasladados a un nuevo medio MSM + PEBD (de uso común para bolsas, laminado de 25 mm de grosor) previamente esterilizado y pesado (peso inicial), sin extracto de levadura. Este cultivo se incubó por 60 días.

Al final de la incubación, el medio de cultivo se eliminó por filtración y se lavó el polietileno con agua destilada para eliminar las sales. Posteriormente, el PEBD se lavó con detergente y con una solución desinfectante (hipoclorito de sodio al 10% (v/v), se lavó con agua destilada estéril temperada a 80° C y con alcohol etílico de 70° para eliminar la biopelícula. El plástico remanente una vez seco se pesó (hasta peso constante) para, de este modo, obtener el peso final necesario para determinar el porcentaje de peso perdido durante la incubación

Aislamiento de consorcios microbianos de las muestras de residuos de polietileno mantenidos en agitación constante.

A porciones de 50 mL del medio MSM (caldo), se les adicionó 0,2 g de polvo de polietileno químicamente puro (como fuente de carbono); este nuevo medio de cultivo se inoculó con muestras de biopelícula (raspadura) del cultivo anterior y se incubó a 24 °C durante 45 días en agitación constante (200 rpm), considerando controles no inoculados. Posteriormente, 5 mL de este caldo sirvieron de inóculo para porciones de 50 mL de medio líquido (caldo) MSM + polietileno, que se incubaron bajo las mismas condiciones antes descritas, durante 60 días.

Al final del periodo de incubación, como en los casos anteriores, el medio de cultivo, se filtró para obtener el PEBD, se lavó y desinfectó con solución de detergente e hipoclorito de sodio al 10% (v/v), agua estéril temperada a 80 °C y alcohol etílico de 70°. El PEBD recuperado, libre de sales y biopelícula, para eliminar las sales remanentes y la biopelícula, procediendo a pesarlo (peso final), con el propósito de obtener el porcentaje de degradación (Uribe *et al.*, 2010).

Degradación de tres diferentes sustratos.

A porciones de 30 mL del medio MSM se les adicionó tiras de polietileno, papel y madera (como fuente de carbono) previamente pesados; este nuevo medio de cultivo se inoculó con el consorcio de microorganismos aislados del

medio MSM con pH 5 y se incubó a 24 °C durante 60 días, considerando controles sin inoculación.

Al final del periodo de incubación, como en los casos anteriores, el medio de cultivo, se filtró y se lavaron los remanentes de PEBD, papel y madera, para obtenerlos libres de sales y de biopelícula. Una vez secos hasta peso constante, se registró el peso final, con el propósito de obtener el porcentaje de degradación de estos materiales durante el proceso de incubación.

#### Determinación de la biodegradación

Por diferencia de peso del polietileno expresado en g:

$$P_0 - P_1 = P_p \dots\dots\dots \text{(Ecuación 1)}$$

Donde:

$P_0$  = peso inicial

$P_1$  = peso final

$P_p$  = peso perdido

Determinación de porcentaje de degradación:

$$(P_p)(100) / P_0 = \% \text{ de degradación} \dots\dots\dots \text{(Ecuación 2)}$$

#### Método estadístico.

Para calcular el nivel de significancia se utilizó el programa StatGraphics Centurión versión 16-1-11. En la determinar de la degradación de las muestras, con diferente pH, con y sin agitación, se empleó la prueba de t de Student. Finalmente, para evaluar los experimentos con diferentes sustratos o materiales, se aplicó el método ANOVA.

#### Microscopía electrónica de barrido

Para poder observar la biopelícula en el microscopio electrónico de barrido, fue necesario hacer un tratamiento previo para fijar los microorganismos, como a continuación se indica:

- (1) Lavado. Las muestras se colocaron en una solución buffer de fosfatos, manteniéndolas en agitación durante un minuto, con el propósito de eliminar las sales del medio de cultivo.

- (2) Fijación o estabilización de las muestras. Para este propósito, se utilizó como fijador una solución de paraformaldehído al 2.5% (100 mL). La presión osmótica del fijador fue regulada utilizando 900 ml de una solución buffer de fosfatos (solución amortiguadora). Las muestras se mantuvieron en el fijador durante una hora, en constante agitación. Una vez fijadas, se aplicaron tres lavados, de 15 minutos cada uno, con solución amortiguadora.
- (3) Deshidratación. Se realizó en forma gradual, aplicando baños crecientes el agente deshidratante; es decir, colocando las muestras en soluciones de etanol al: 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 90%. Para finalizar, se dieron tres lavados de 10 minutos cada uno, con etanol al 100%.
- (4) Desecación. Para ello, se aplicó el método del "Punto Crítico" utilizando un equipo de secado SEM/TEM K850; éste consistió en colocar la muestra en unas cestas con etanol al 100%, dentro del equipo, manteniendo una temperatura de 4°C y añadiendo CO<sub>2</sub> líquido, el cual desplazó el etanol. Después se llevó la muestra al punto crítico del CO<sub>2</sub> (31°C y a 74 bares de presión); una vez que se alcanzó la estabilidad del equipo, se eliminó el gas de la cámara y las muestras quedaron desecadas. Las muestras se colocaron en un soporte de aluminio especialmente diseñado para el microscopio, usando plata coloidal como adherente.
- (5) Recubrimiento. Para su observación al microscopio, las muestras requieren ser sombreadas con oro dentro de una cámara de vacío. Este recubrimiento provee a las muestras de una superficie conductora de la electricidad y del calor (Campo, 2007).

La observación se realizó en un microscopio electrónico JEOL-6300 Scannig Microscope.

#### Identificación de los microorganismos del consorcio

Para el aislamiento se utilizaron medios de cultivo específicos para cada grupo microbiano:

**Hongos.** Se usó un medio de sales minerales (MSM) y aserrín en partículas finas; para ello, el aserrín fue pasado por una malla de No. 200 para obtenerlo en grado fino. Posteriormente, se hirvió en agua destilada por dos horas. Una vez hervido, fue colocado en cajas Petri, sin el sobrenadante; las cajas fueron esterilizadas en el autoclave (15 minutos a 15 libras de presión); después se

añadió el medio MSM estéril y se inocularon tomando una porción 0.5 mL del aislamiento anterior a pH 5 y se incubaron a 30° C.

Para la identificación de los hongos, fue necesaria la observación al microscopio compuesto, con base en sus características morfológicas y de acuerdo con la clave de Watanabe (2002).

**Bacterias.** Se utilizó un medio compuesto por el sobrenadante (sólo el líquido donde se hirvió el aserrín y se añadió agar (15 g/L); el medio se dispuso en cajas Petri; se aplicó como inóculo una porción 0.5 mL del aislamiento anterior a pH 7; incubándose a 30 °C durante 3 días. Una vez pasado este tiempo, se observó el crecimiento bacteriano y se procedió a realizar la tinción de Gram, para su observación al microscopio.

Para la identificación, fue necesario realizar un aislamiento en un medio selectivo para *Pseudomonas*.

**Levaduras.** Se utilizaron los siguientes medios agarificados selectivos para su identificación: malta-glucosa; malta acético y malta-50% glucosa, dispuestos en cajas Petri. El inóculo procedió de los cultivos anteriores a pH 5 y las cajas fueron incubadas a 25-30°C durante dos semanas.

Se tomaron muestras de las colonias, que fueron teñidas con azul de metileno, para la observación de su morfología al microscopio óptico y llevar a cabo su identificación, de acuerdo a la clave de Pitt y Hotcking (1997).

## RESULTADOS

### Microscopia óptica

El material de estudio fue polietileno de baja densidad (PEBD), consistente en fragmentos de bolsas desechadas como basura, que estuvieron enterradas en los distintos sitios seleccionados, en suelos del sitio de disposición final de residuos sólidos de la ciudad de México, conocido como “Bordo Poniente”. En estos materiales, se observaron consorcios de microorganismos formando biopelículas.

La observación al microscopio compuesto Carl Zeiss, aplicando las distintas técnicas de tinción utilizadas, permitió apreciar la biopelícula sobre el PEBD, formada por los consorcios microbianos (Figura 6). La biopelícula aparece formada por colonias de bacterias, hongos y levaduras.

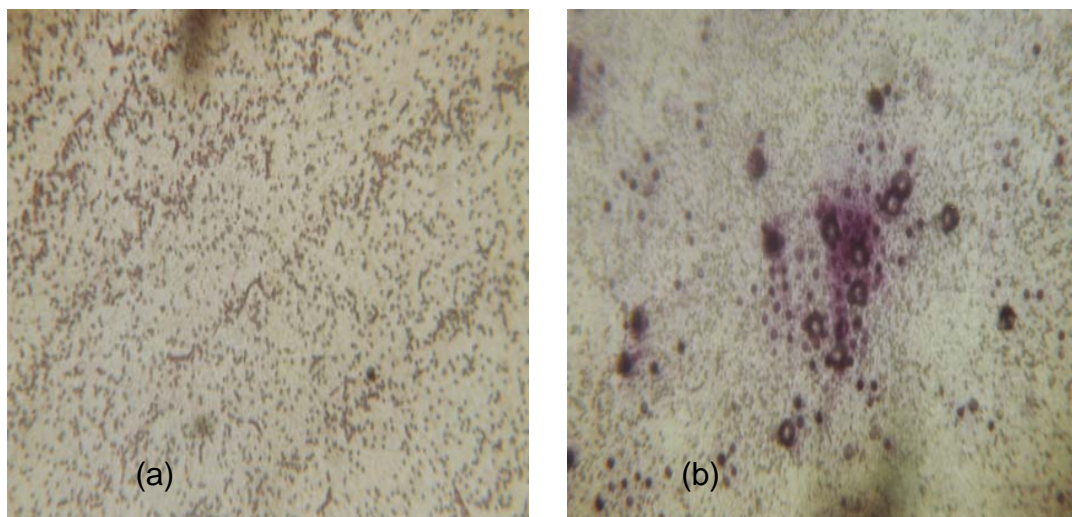


Figura 6. Observación de la biopelícula con microscopía óptica a 100x: (a) Tinción con rosa de bengala, (b) Tinción de Gram (fotomicrografías tomadas con microscopía óptica)

(a) La tinción con rosa de bengala, facilitó la observación del material vivo adherido a la muestra de PEBD, es decir, “el tapete microbiano”

(b) Con la tinción de Gram, se puede apreciar con más definición la morfología de los microorganismos, tamaño y diversidad. Con la tinción, se identificaron las bacterias Gram negativas, más abundantes que las Gram positivas. Las estructuras más grandes teñidas en violeta, corresponden a hongos principalmente unicelulares (levaduras) y, en menor grado están presentes los filamentosos. Las bacterias son los organismos más abundantes.

La detección de la biopelícula ratifica en parte la hipótesis de trabajo. Por lo tanto, la siguiente etapa de la investigación se orientó al aislamiento y caracterización fisiológica de los microorganismos para, finalmente, comprobar la biodegradación del PEBD.

#### Biodegradación por consorcios microbianos

Para evaluar la biodegradación del PEBD, se experimentó con el medio MSM a pH 5 y 7, utilizando como inóculo, la raspadura de las muestras extraídas del “Bordo Poniente” y un valor conocido en gramos de PEBD virgen, en forma de perlas. Durante los primeros 15 días de incubación a 24°C y condiciones estáticas, se logró la formación de una biopelícula tenue, cubriendo las perlas de PEBD. Al transcurrir los días de incubación, la biopelícula fue más evidente, presentando cambios de color notándose, además, la pérdida del brillo original de las perlas, lo que se interpretó como la evidencia del ataque microbiano incipiente.

La biodegradación se estimó con base en la pérdida de peso del PEBD, a pH ácido y neutro. Los resultados obtenidos se aprecian en el Cuadro 2 y Figura 7, a los dos meses de incubación, donde la biodegradación se expresa en valores porcentuales, indicando que el proceso fue positivo tanto a pH ácido, como neutro. Sin embargo, los valores más altos en biodegradación corresponden al medio de cultivo a pH 5, que favoreció el desarrollo de hongos filamentosos, aunque predominaron los hongos levaduriformes.

Cuadro 2. Degradación de PEBD en medio MSM a pH 5 y 7

MUESTRAS CON pH 7				MUESTRAS CON pH 5			
P <sub>0</sub> (g)	P <sub>1</sub> (g)	P <sub>p</sub> (g)	% DEGRADACION	P <sub>0</sub> (g)	P <sub>1</sub> (g)	P <sub>p</sub> (g)	% DEGRADACION
0.309	0.290350614	0.018649386	6.0354	0.3081	0.282099749	0.026000251	8.4389
0.3025	0.28499856	0.01750144	5.7856	0.3218	0.296105557	0.025694443	7.9846
0.3067	0.287967991	0.018732009	6.1076	0.4153	0.387746922	0.027553079	6.6345
0.3069	0.290551744	0.016348256	5.3269	0.2572	0.234089037	0.023110963	8.9856
0.3109	0.292001944	0.018898057	6.0785	0.2962	0.270597953	0.025602047	8.6435
0.3063	0.287972846	0.018327154	5.9834	0.2766	0.250807603	0.025792397	9.3248

\*Donde: P<sub>0</sub>= peso inicial, P<sub>1</sub>= peso final y P<sub>p</sub>= peso perdido, durante 60 días.



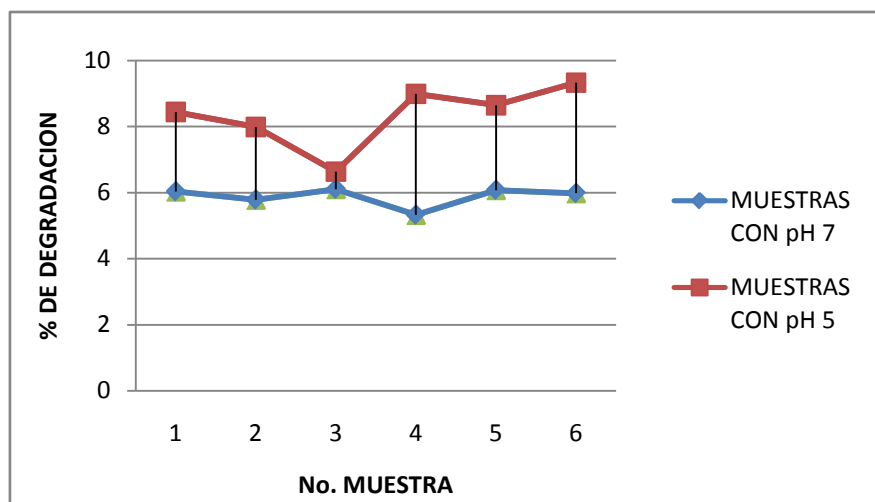


Figura 7. Degradación de PEBD en medio MSM a pH 5 y 7

Box-and-Whisker Plot

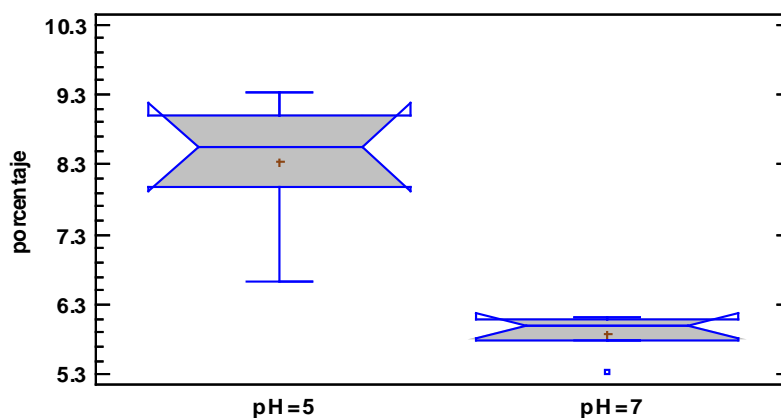


Figura 8. Comparación estadística porcentual a diferentes pH.

En el caso de la degradación evaluada a pH diferentes, la comparación estadística realizada, permitió observar diferencias altamente significativas entre ambas muestras, dando un valor de  $p = 0.000967855$ .

#### Cultivo bajo condiciones de agitación

El cultivo se estableció bajo las mismas condiciones que el cultivo estático, en lo que se refiere al medio de cultivo, fuente de carbono e inóculo; en lo relativo al pH, con base en los resultados del experimento estático, se eligió el ácido, en vista de que en estas condiciones, se promovió un mayor desarrollo del consorcio microbiano. Para esta prueba se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad, conteniendo 50 mL de medio de cultivo. A los matraces se les aplicó una agitación rotativa de 200 rpm. Los resultados de este experimento, muestran



valores notablemente más altos de biodegradación, que los alcanzados en los cultivos estáticos, donde no se aplicó agitación.

Cuadro 3. Degradación de PEBD en Medio MSM  
Con Agitación Constante

P <sub>0</sub> (g)	P <sub>1</sub> (g)	P <sub>p</sub> (g)	% DEGRADACION
0.4392	0.35857957	0.08062043	18.3562
0.4321	0.354384222	0.077715778	17.9856
0.4334	0.356883663	0.076516337	17.6549
0.4317	0.34829556	0.08340444	19.32
0.4379	0.36497301	0.07292699	16.6538
0.4355	0.353673034	0.081826966	18.7892

\*Donde: P<sub>0</sub>= peso inicial, P<sub>1</sub>= peso final y P<sub>p</sub>= peso perdido, durante 60 días.

En relación a la degradación del PEBD, el valor promedio en agitación fue de 18.12 % comparado, con el 8.33% logrado en condiciones estáticas a pH 5. Los resultados antes indicados, permiten interpretar que la agitación estimula un mayor desarrollo del consorcio, lo que significa que se trata de microorganismo aeróbios. Por otra parte, los cultivos con diferentes fuentes de carbono, indicaron que en el consorcio se encuentran microorganismos degradadores de: papel (celulolíticos), madera (ligninolíticos) y de polietileno de baja densidad (PEBD).

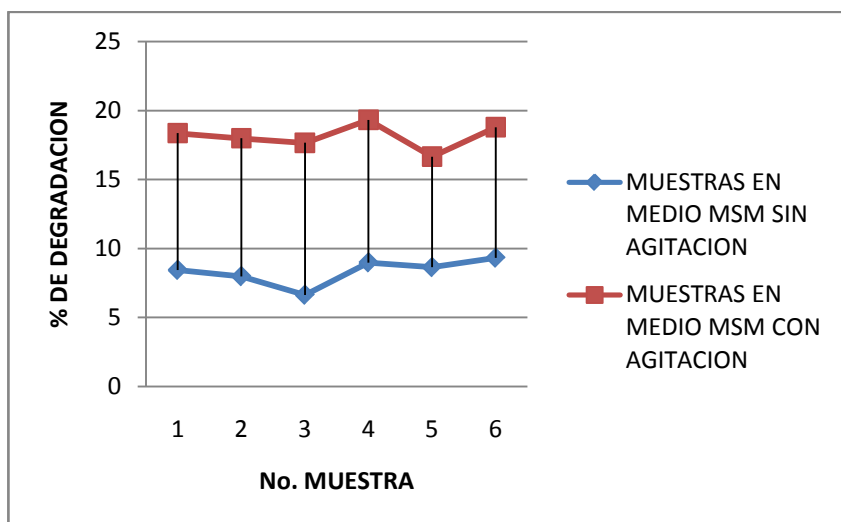


Figura 9. Degradación de PEBD con/sin agitación

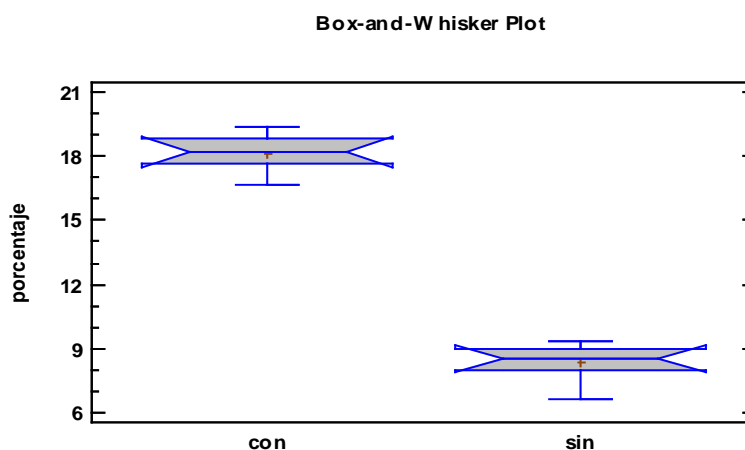


Figura 10. Comparación estadística con/sin agitación

En la comparación estadística de la degradación del PEBD con/sin agitación, el cálculo se ilustró con los gráficos presentes en esta figura 10 correspondientes a cada muestra. Se observó que existen diferencias estadísticas altamente significativas, obteniéndose el siguiente valor exponencial de  $p$  entre las dos muestras  $p = 5.91136 \times 10^{-9}$ .

#### Degradación de otros sustratos por los consorcios aislados

Considerando que la literatura nos indica, que los microorganismos degradadores de plásticos se caracterizan, además, por degradar materiales celulósicos y lignínicos (Lee et al., 1990), se procedió a llevar a cabo la prueba correspondiente. Las condiciones relativas al medio de cultivo para esta prueba, fueron las mismas que para los cultivos estáticos con PEBD; las fuentes de carbono fueron tres: celulosa, lignina y PEBD; el pH fue de 5; la temperatura de incubación de 30°C y el periodo de incubación, de 60 días. Los resultados indicaron que los consorcios degradadores de PEBD en estudio, también degradan papel (celulosa) y madera (material vegetal rico en lignina). La celulosa en forma de papel, resultó el material más fácilmente biodegradable, en seguida la madera y el más difícil de biodegradar por los consorcios, fue el PEBD (Figura 11).

Cuadro 4. Degradación de diferentes sustratos en medio MSM

DEGRADACION DE PAPEL				DEGRADACION DE MADERA				DEGRADACION DE PEBD			
P <sub>0</sub> (g)	P <sub>1</sub> (g)	P <sub>p</sub> (g)	% DEGRADACION	P <sub>0</sub> (g)	P <sub>1</sub> (g)	P <sub>p</sub> (g)	% DEGRADACION	P <sub>0</sub> (g)	P <sub>1</sub> (g)	P <sub>p</sub> (g)	% DEGRADACION
0.1414	0.0962	0.0452	31.96605375	1.1138	1.0313	0.0825	7.407074879	0.1096	0.1085	0.0011	1.003649635
0.1513	0.106	0.0453	29.94051553	1.3509	1.2477	0.1032	7.639351543	0.1205	0.1191	0.0014	1.161825726
0.136	0.0925	0.0435	31.98529412	1.4939	1.3755	0.1184	7.92556396	0.1238	0.1224	0.0014	1.13085622
0.1484	0.1034	0.045	30.32345013	1.2586	1.1675	0.0911	7.238201176	0.1158	0.1145	0.0013	1.122625216
0.1371	0.1	0.0371	27.06053975	1.5214	1.4072	0.1142	7.506244249	0.1272	0.1256	0.0016	1.257861635
0.145	0.1005	0.0445	30.68965517	1.3456	1.2471	0.0985	7.320154578	0.11938	0.118	0.00138	1.155972525

\*Donde: P<sub>0</sub> = peso inicial, P<sub>1</sub> = peso final y P<sub>p</sub> = peso perdido, durante 60 días.

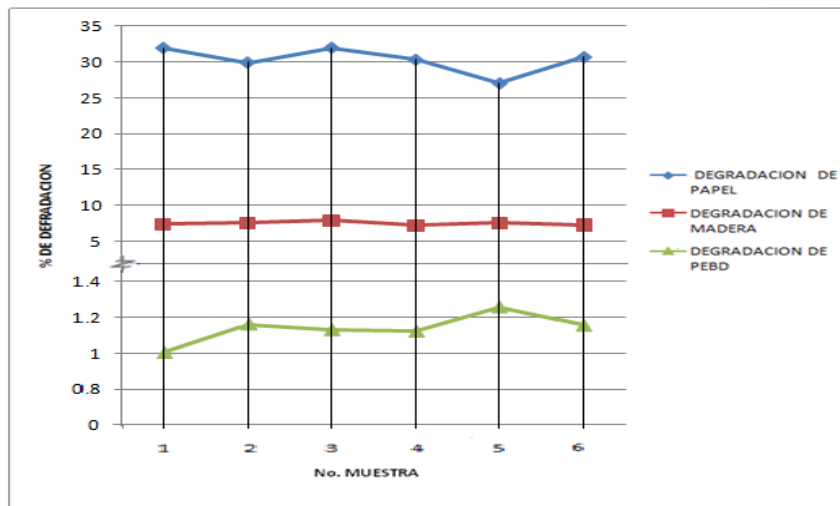


Figura 11. Degradación de los tres sustratos

Box-and-Whisker Plot

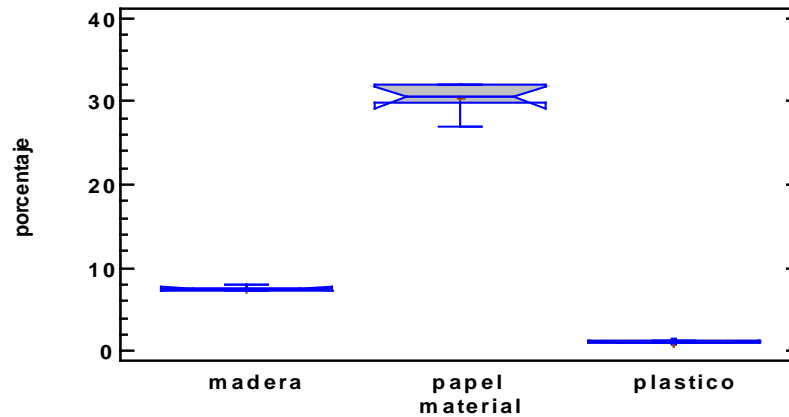


Figura 12. Comparación estadística de los tres sustratos

Para la comparación estadística de los valores medios en los tres diferentes de materiales o sustratos, se elaboraron los gráficos arriba mostrados en la Figura 12. La prueba de F en la tabla de ANOVA, probó que existen diferencias altamente significativas, ya que el valor de P resultó menor a 0.01.

#### Microscopia electrónica de barrido

Se utilizó un microscopio electrónico de barrido JEOL- 6300 y las condiciones de trabajo fueron las siguientes: 20 KV, distancia de trabajo 15 mm, las imágenes obtenidas por electrones secundarios

Las observaciones fueron realizadas en tres muestras de PEBD: (1) muestra  $P_1$ , correspondiente al “Control o testigo”, es decir, no incubada y carente de biopelícula microbiana y por lo tanto, carente de cualquier proceso degradativo; (2) muestra  $A_3$ , incubada en medio MSM con pH 5. En esta muestra se desarrollaron consorcios de hongos filamentosos y levaduriformes y (3) muestra en medio a pH 7, en donde predominó el desarrollo de la flora bacteriana de los consorcios.

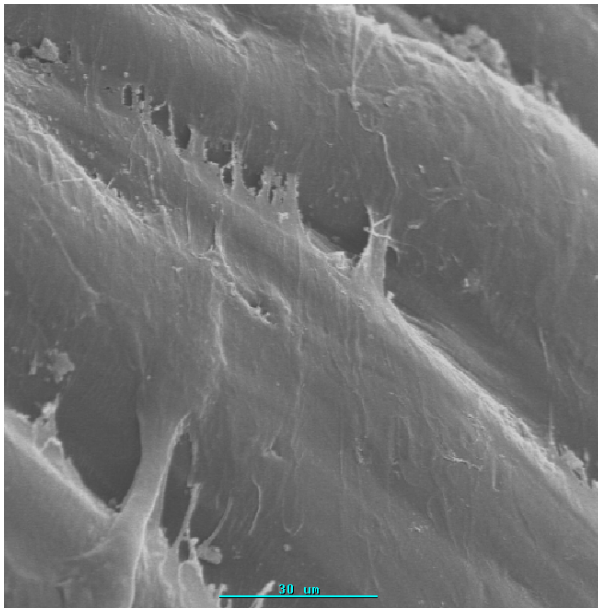
En estas muestras se observan los principales cambios físicos generados en el PEBD, ocasionados por el ataque de los consorcios microbianos, bajo las dos condiciones de pH, comparando con el PEBD que no fue atacado por los microorganismos. En las siguientes imágenes (Figura 13 a 17) se aprecia el ataque de los consorcios al PEBD a diferentes aumentos; además, es posible notar las diferencias del ataque de los hongos y levaduras, con respecto al producido por los consorcios donde predominaron las bacterias.

#### Observación de muestras a un aumento de 800x.

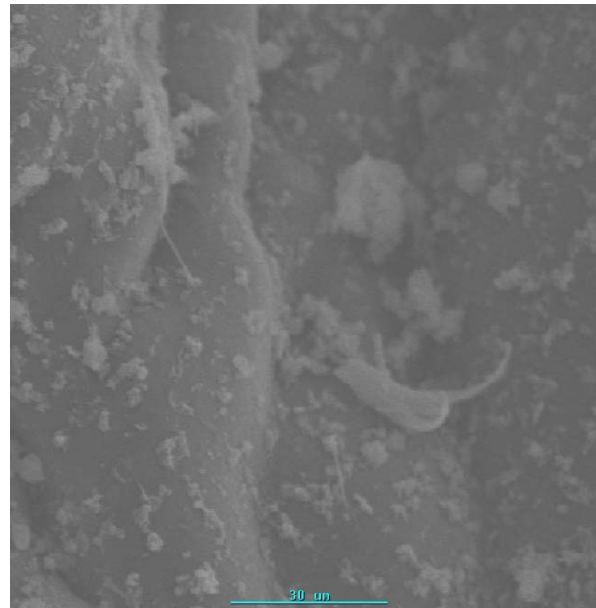
Comparando las observaciones en las tres muestras, se aprecia que la estructura de la muestra  $P_1$  “Control” está entera, es decir, no presenta ningún ataque, lo que se esperaba, debido a que esta muestra no fue sometida al contacto con los consorcios microbianos. En contraste, en la muestra  $A_3$  se observan los consorcios formando la biopelícula y surcos sobre el PEBD, como resultado de la degradación generada por los microorganismos.

En la muestra  $B_1$  se observa un desgaste o erosión de la superficie del PEBD, lo que podría ser una “huella específica” de biodegradación por el tipo diferente de ataque, a la que se presenta en la muestra  $A_3$ ; sin embargo, es importante destacar que en ambas muestras, existe una degradación causada por los consorcios microbianos.

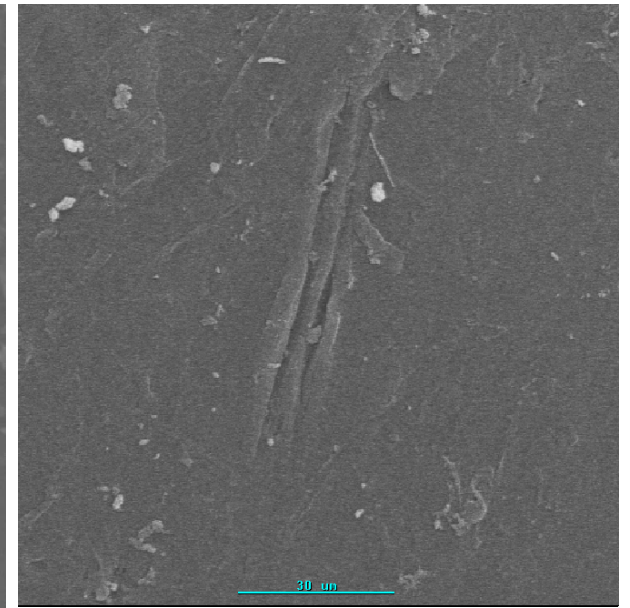
Figura 13. Fotomicrográficas en muestras con un aumento de 800x.



(a) Muestra P<sub>1</sub> sin incubación de microorganismos



(b) Muestra A<sub>3</sub> incubación a pH 5



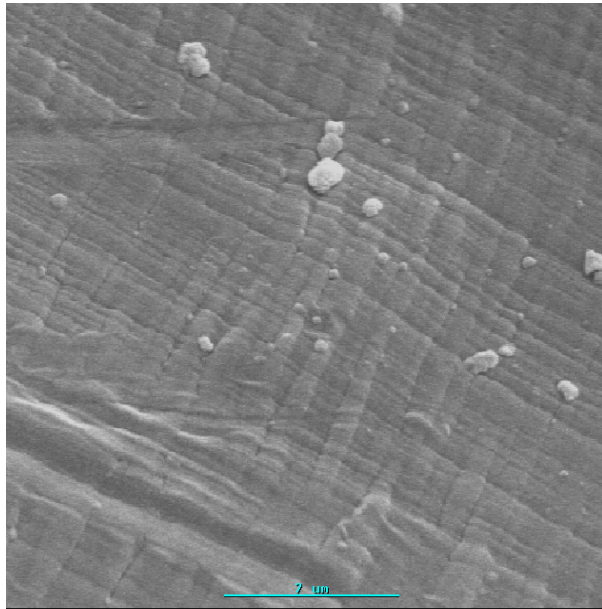
(c) Muestra B<sub>1</sub> incubación a pH 7

### Observación de muestras a un aumento de 3700x

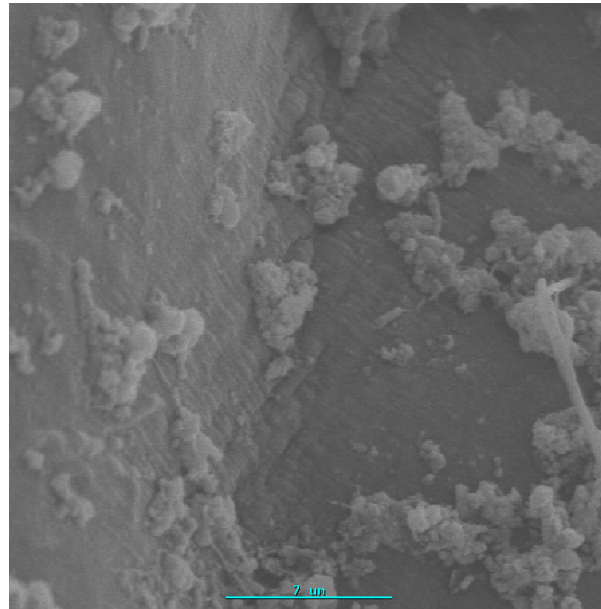
En la muestra  $P_1$  se puede distinguir la estructura del PEBD; claramente se ve el entrecruzamiento de las fibras que lo componen, además de pequeñas rebabas del mismo material, formadas por el proceso de producción del mismo. Mientras que en la muestra  $A_3$ , se aprecia a los microorganismos adheridos formando la biopelícula sobre el PEBD, así como las huellas del ataque que, a este aumento, son más evidentes como son las grietas y surcos. Resulta interesante el hecho de que no se observa el entrecruzamiento de las fibras del PEBD, como si los sitios estructurales fueran los más vulnerables al ataque microbiano y que por ello ya no están presentes.

Por otra parte, en la muestra  $B_1$  se observa lo que se había detectado como erosión, debido al ataque microbiano. A este aumento, aparece una especie de descamación en la superficie del PEBD, es decir, el desprendimiento de pequeñas laminillas o “escamas” así como una serie de grietas. Sin embargo, aunque podemos inferir que estos cambios o deterioro, que ocurre en la superficie del PEBD, son producidos por la actividad microbiana, no se han detectado microorganismos directamente involucrados o inmersos en lo que hemos llamado “huellas del ataque microbiano” que, en este caso, corresponderían a la erosión o descamación y agrietamiento de la superficie del PEBD.

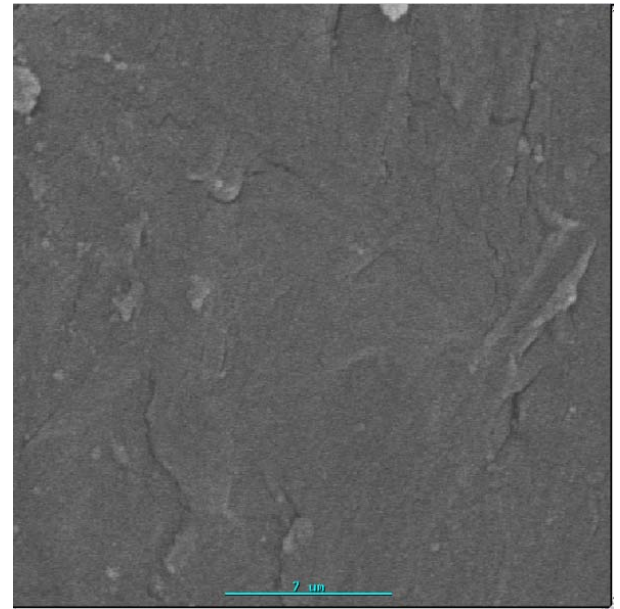
Figura 14. Fotomicrografías en muestras con un aumento de 3700x.



(a) Muestra P<sub>1</sub> sin incubación de microorganismos



(b) Muestra A<sub>3</sub> incubación a pH 5



(c) Muestra B<sub>1</sub> incubación a pH 7

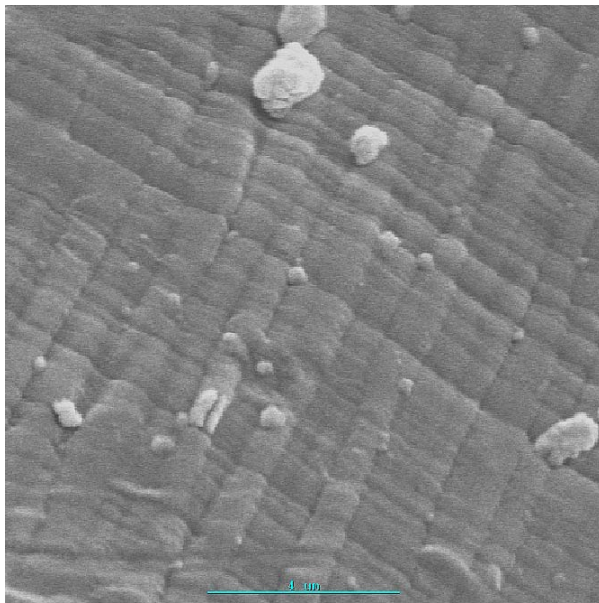
### Observación de muestras a un aumento de 7500x

En la muestra A<sub>3</sub>, se observa el consorcio biodegradador adherido al PEBD y en la muestra B<sub>1</sub> aparece el agrietamiento de la superficie, donde se puede apreciar a los microorganismos causantes de este deterioro y, por otra parte, no se observa el entrecruzamiento de las fibras del PEBD, aunque sí se aprecian las “huellas del ataque”.

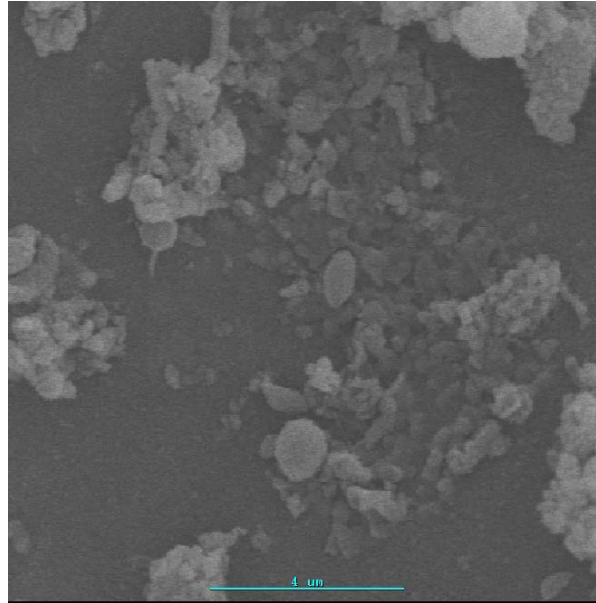
En la muestra “control” P<sub>1</sub>, no hay evidencias o indicios de la degradación del material; la estructura del PEBD aparece inalterada. A diferencia de las otras dos muestras, donde se desarrolló la “biopelícula” por los consorcios microbianos, donde la degradación es evidente.



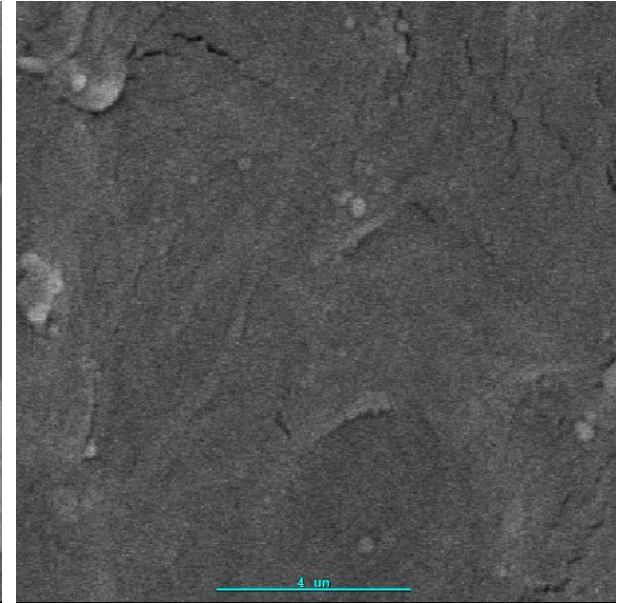
Figura 15. Fotomicrografías en muestras con un aumento de 7500x.



(a) Muestra P<sub>1</sub> sin incubación de microorganismos



(b) Muestra A<sub>3</sub> incubación a pH 5



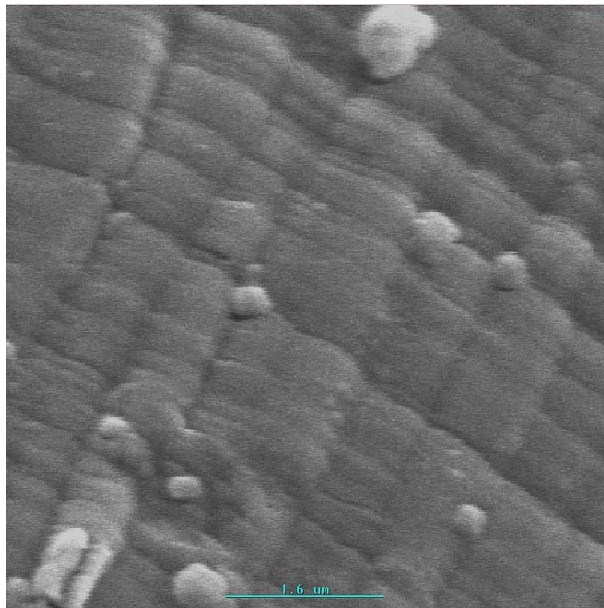
(c) Muestra B1 incubación a pH 7

Observación de muestras a un aumento de 15000x

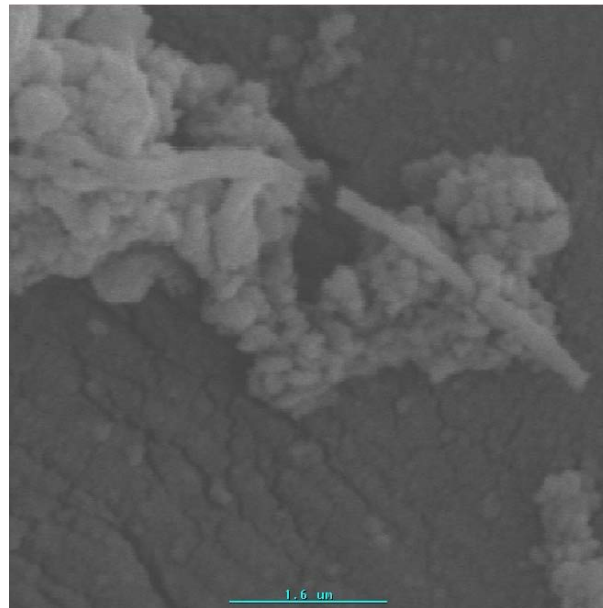
En la muestra A<sub>3</sub> se aprecia la superficie del PEBD agrietada, debido al ataque de los microorganismos; además, no se detectan rastros del entrecruzamiento de las fibras del PEBD. Por otra parte, se observa a los microorganismos, adheridos a la superficie del mismo.

En muestra B<sub>1</sub>, son más evidentes y numerosas grietas y el deterioro causado por el ataque de los microorganismos.

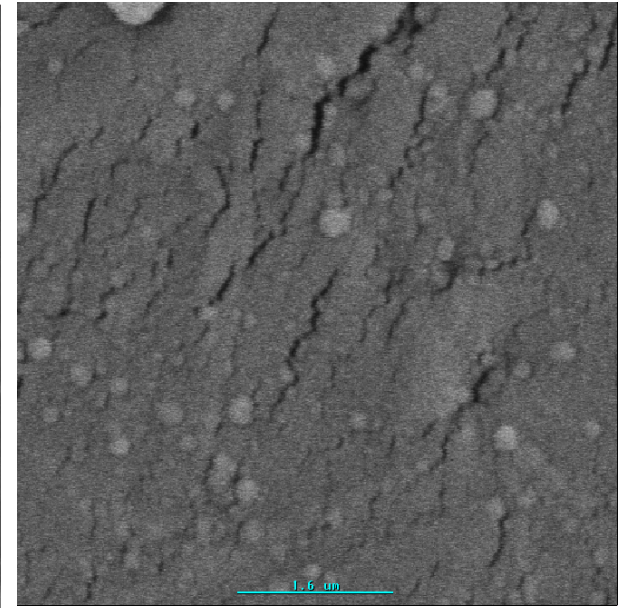
Figura 16. Fotomicrografías en muestras con un aumento de 15000x.



(a) Muestra P<sub>1</sub> sin incubación de microorganismos



(b) Muestra A<sub>3</sub> incubación a pH 5



(c) Muestra B1 incubación a pH 7

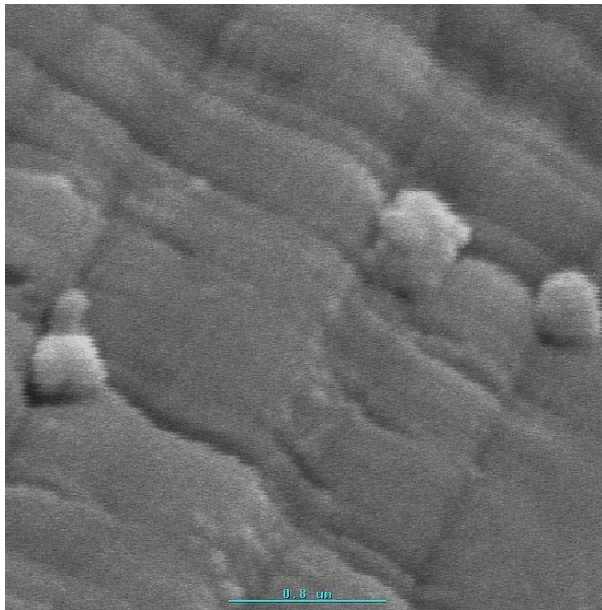
Observación de muestras a un aumento de 30000x

En la muestra “control” P<sub>1</sub>, carente de microorganismos, no hay indicios del ataque en la estructura del PEBD. Se observa entera, sin cambio físico lo que ya se esperaba.

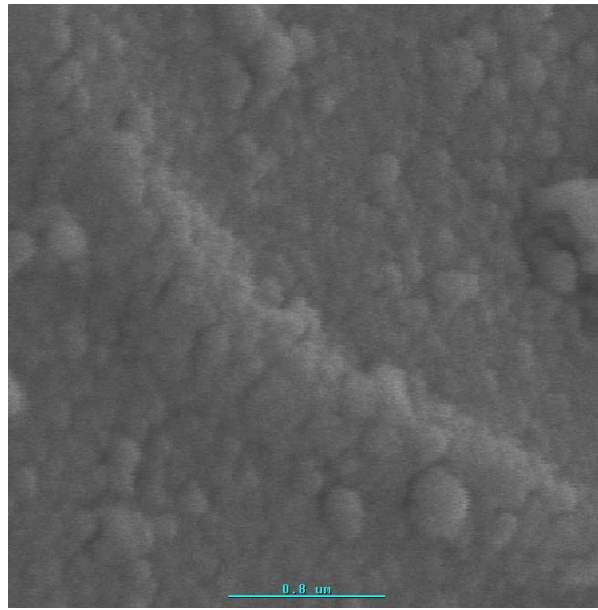
Sin embargo, en la muestra A<sub>3</sub>, se puede observar que “el tapate” formado por la biopelícula, cubre totalmente la superficie del PEBD.

Finalmente, en la muestra B<sub>1</sub>, la huella del ataque por los microorganismos es muy notoria, apreciándose los cambios físicos causados por los consorcios, en la superficie del PEBD. Además, se detectan las grietas y la “descamación” del material, consideradas en este estudio como “huellas del ataque microbiano o del proceso de biodegradación”.

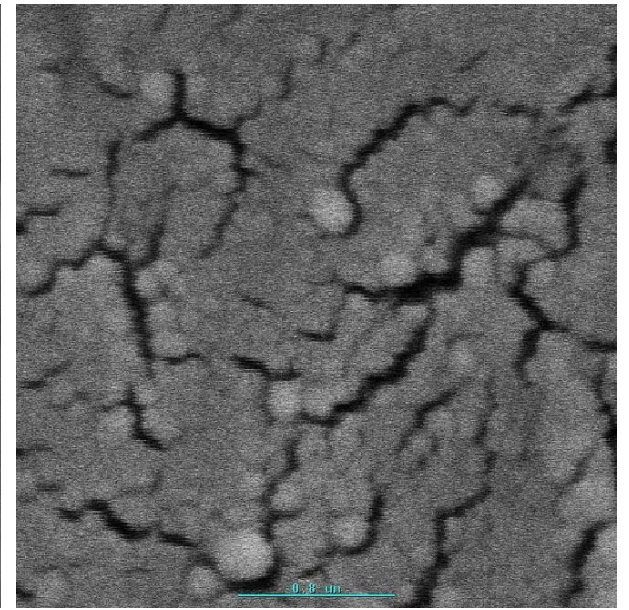
Figura 17. Fotomicrografías en muestras con un aumento de 30000x.



(a) Muestra P<sub>1</sub> sin incubación de microorganismos



(b) Muestra A<sub>3</sub> incubación a pH 5



(c) Muestra B<sub>1</sub> incubación a pH 7



## Aislamientos de microorganismos del consorcio microbiano

En la Cuadro 5, se enlistan los microorganismos aislados de la biopelícula desarrollada en PEBD. Para llevar a cabo el aislamiento, se utilizaron los medios de cultivo y las condiciones nutrimentales, con variaciones en el pH y las fuentes de carbono que se indican en la metodología del presente estudio. Los microorganismos corresponden a: bacterias (*Pseudomonas* sp.), hongos filamentosos (*Aspergillus fluvus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Gliocladium virens* y *Penicillium* sp.) y levaduras (*Rhodotorula* sp., *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*).

Cuadro 5. Identificación de las cepas aisladas del consorcio (biopelícula)

Bacterias	Hongos	Levaduras
<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Aspergillus fluvus</i> <i>Aspergillus fumigatus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Cladosporium</i> sp. <i>Gliocladium virens</i> <i>Penicillium</i> sp.	<i>Rhodotorula</i> sp. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> <i>Schizosaccharomyces pombe</i>
	<small>Watanabe (2002)</small>	<small>(Pitt &amp; Hotcking 1997)</small>

## Clasificación taxonómica de las especies aisladas

Cuadro 6. Clasificación taxonómica del género *Pseudomonas*

Reino	Bacteria
División	<i>Proteobacteria</i>
Clase	<i>Gammaproteobacteria</i>
Orden	<i>Pasteurellales</i> - <i>Pseudomonadales</i>
Familia	<i>Pasteurellaceae</i> - <i>Pseudomonadaceae</i>
Género	<i>Pseudomonas</i>

Cuadro 7. Clasificación de hongos filamentosos identificados

Reino	Fungí			
División	<i>Ascomycota</i>			
Clase	<i>Deuteromycetes</i>			
Orden	<i>Moniliales</i>			
Familia	<i>Moniliaceae</i>		<i>Demaciacea</i>	
Género	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aspergillus</i>	<i>Gliocladium</i>	<i>Cladosporium</i> sp.
Especie	<i>A. fluvus</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. niger</i>		<i>G. virens</i>	

Cuadro 8. Clasificación de levaduras identificadas

Reino	Fungí		
División	<i>Basidiomycota</i>	<i>Ascomycota</i>	
Clase	<i>Urediomycetes</i>	<i>Saccharomycetes</i>	<i>Schizosaccharomycetes</i>
Orden	<i>Sporidiales</i>	<i>Saccharomycetales</i>	<i>Schizosaccharomycetales</i>
Familia	<i>Sporidiabolaceae</i>	<i>Saccharomycetaceae</i>	<i>Schizosaccharomycetaceae</i>
Género	<i>Rhodotorula</i>	<i>Saccharomyces</i>	<i>Schizosaccharomyces</i>
Especie		<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>

## DISCUSIÓN

Entre los consorcios microbianos observados en los residuos de polietileno de baja densidad (PEBD), recolectados en los distintos sitios del “Bordo Poniente”, se encontraron microorganismos capaces de biodegradar este tipo de polietileno, debido a que hay evidencias del desarrollo de un sistema enzimático, convertido en una adaptación, que les permite utilizar a este polímero como fuente de carbono (Méndez *et al.*, 2007; Whitekettle, 1991).

En este sentido, se ha encontrado que microorganismos de origen común, pero particularmente del suelo, son capaces de adaptarse para metabolizar distintos tipos de sustratos, debido a su variado potencial enzimático (Méndez *et al.*, 2008). La degradación del polietileno por los consorcios microbianos, se dará por la peculiar actividad de estos microorganismos para producir las enzimas específicas que les da la eficiencia para biodegradar estos materiales (Ishigaki *et al.*, 2000).

Desde la etapa inicial de este trabajo, fue posible observar que la biopelícula desarrollada sobre fragmentos de (PEBD), estaba formada por un consorcio microbiano. Este hecho fue considerado importante, ya que este material, teóricamente, no es adecuado para la formación de una biopelícula; es decir que, por sus características, los microorganismos no podrían adherirse de una manera adecuada, en comparación con otros materiales más porosos como el tezontle, que es un material que tiene características apropiadas, como ser un soporte para la formación de biopelículas (Ojeda *et al.*, 2001).

En la parte experimental para demostrar la degradación se observó que, después de incubar a los microorganismos en medios de cultivo ajustados a dos diferentes concentraciones de iones hidrógeno (pH), se observó que las perlas de polietileno adicionadas como única fuente de carbono, empezaron a cambiar de color, disminuyendo su brillo original. Además, después de 15 días de incubación, se observó una capa tenue de un color marrón en torno a las perlas de polietileno la que, con el paso del tiempo, se oscureció más. Este hecho nos indicó que las perlas de polietileno, sí fueron propicias para la adherencia de los microorganismos y que los cambios ocurridos, fueron un indicio de que los consorcios microbianos, atacaron el material para utilizarlo como fuente de carbono (Albertsson *et al.*, 1988; Ojeda *et al.*, 2001).

La formación de biopelícula en la superficie del polietileno de baja densidad, desarrollada a partir del contacto con el suelo, ha sido un hallazgo cuya aplicación potencial puede ser importante, en términos de la cantidad de



ciertos residuos plásticos cuyo reciclaje industrial no es viable y que por tanto, podrían ser biodegradados. Al respecto, Albertsson *et al.*, 1988., indican que la biopelícula puede degradar a los polímeros hasta en un 8% en contacto con el suelo. Por lo tanto, los resultados del presente trabajo confirman que los consorcios desarrollados a partir del suelo fueron eficientes, alcanzándose un 8.3% de biodegradación del polietileno bajo condiciones estáticas, a temperatura ambiente promedio de 22°C, lo que significa una eficiencia superior de casi el doble (173%) de lo publicado por Uribe *et al.*, (2010), ya que estos autores mencionan 5.6% de biodegradación. En este sentido, el mayor porcentaje de biodegradación obtenido, puede deberse a que el polietileno, al estar en contacto con el suelo, permitirá más adherencia así como un desarrollo microbiano (consorcios), con mayor biodiversidad de microorganismos (Otake *et al.*, 1995).

Se ha indicado en la literatura que, para lograr una biodegradación significativa del polietileno de baja densidad, se le debe dar un pre-tratamiento al polímero, para tener las condiciones óptimas que permitan el proceso (Limón, 2001; Villa *et al.*, 2008 y Zheng *et al.*, 2005). El pre-tratamiento, generalmente consiste en una serie de cambios o modificaciones físicas y químicas en los polímeros, que permiten que los consorcios microbianos actúen y procedan a la biodegradación. Sin embargo, se han encontrado estudios donde se indica que no son necesarios los pre-tratamientos, como sucede en los suelos de manglar, en los que se ha detectado la biodegradación de polietileno, debido a las condiciones abióticas muy particulares de este ecosistema, entre estas se detectan humedad, temperatura, etc., que estimulan la proliferación de los microorganismos y la colonización de los materiales plásticos, adaptándose a tomar el polímero como una fuente de carbono (Kathiresan, 2003). Al respecto, los resultados logrados en el presente trabajo indican que los consorcios estudiados, fueron capaces de biodegradar el polietileno sin requerir ningún tratamiento previo, demostrándose que la biodegradación se puede dar sin pre-tratamiento, lo que significa reducción de costos y mayor factibilidad.

Durante la presente investigación, las observaciones con el equipo de microscopía electrónica de barrido, permitieron detectar que las muestras de PEBD donde se desarrollaron los consorcios microbianos (B1 y A3, correspondientes a pH 7 y a pH 5, respectivamente), presentan una alteración física atribuible al ataque microbiano, que se aprecia a manera de agrietamientos y defoliación, en comparación con la apariencia inalterada de la muestra, blanco o testigo (P1), carente de microorganismos. De una manera visual, estas

imágenes indican nuevamente que no fue necesario someter el material plástico a ningún tipo de pre-tratamiento, para poder generar el proceso de biodegradación, como algunos autores mencionan (Méndez *et al.*, 2007; Uribe *et al.*, 2010).

En la presente investigación, la pérdida de peso debido a la acción de los consorcios fue positiva y utilizada para evaluar cuantitativamente la biodegradación del polímero en ambas condiciones de pH 5 y 7. Sin embargo, mientras que en las muestras con pH 7 (donde predominaron los consorcios de bacterias), se obtuvo un promedio de 5.8% de pérdida de peso, en las muestras incubadas a pH 5 (destacando los consorcios de hongos, tanto filamentosos como levaduriformes), se detectó 8.3% lo que significa que los hongos, degradaron en mayor grado al polietileno. Estos resultados son contradictorios con lo publicado por Uribe *et al.*, (2010), ya que estos autores encontraron que las bacterias son capaces de degradar el polietileno en mayor proporción que los hongos; no obstante, los resultados del presente trabajo coinciden con autores como Kathiresan, (2003), que encontró que los hongos son más eficientes para biodegradar este polímero.

Por otra parte, en los cultivos con residuos de polietileno sometidos a una constante agitación, la biodegradación del polímero alcanzó un promedio de 18.1%, aproximadamente 10 veces mayor, a la obtenida en los cultivos en reposo. Esto hecho indica que los microorganismos responsables, son organismos eróbios y/o microaerófilos, debido a que su crecimiento se estimuló con la aeración generada por la agitación, demostrándose, además, que el crecimiento de los consorcios es directamente proporcional al proceso de biodegradación.

Asimismo, en los cultivos desarrollados en medio líquido en reposo, donde se probaron los tres diferentes sustratos (PEBD, papel y madera), resultó que la biopelícula se formó en mayor grado, sobre el sustrato próximo al nivel superior del medio de cultivo, es decir, la parte que está en contacto con el aire. Esto corrobora lo detectado en los cultivos sometidos a la agitación constante que, al promoverse la aeración, se estimula a los consorcios, indicando que se trata de microorganismos aerobios y/o microaerófilos.

Por otra parte, el grosor del polietileno es un factor que puede modificar la velocidad de la degradación, ya que se ha comprobado que entre más delgado es, mucho más rápido se degradará (Kathiresan, 2003). En los cultivos realizados, se utilizó como una única fuente de carbono, el polietileno de baja densidad (PEBD); sin embargo, en el primer cultivo, se empleó, además del

PEBD como fuente de carbono, un porcentaje pequeño (0,02%) de extracto de levadura en el medio de cultivo. La incorporación de este nutrimento se llevó a cabo debido a que, anteriormente, fue probado por otros autores con muy buenos resultados en el cultivo (Méndez *et al.*, 2007; Uribe *et al.*, 2010). El extracto de levadura estimula el desarrollo de los consorcios, así como su adaptación para la colonización del polímero generando la biopelícula. Esta estrategia, aplicada solamente en los cultivos iniciales, permitió recuperar los consorcios microbianos, generándose una mayor biomasa necesaria para ser utilizada posteriormente, como inóculo de los siguientes cultivos en los que se determinaría la capacidad para biodegradar el PEBD, donde este polímero fue la única fuente de carbono para los consorcios.

En cultivos simultáneos, llevados a cabo con el propósito de tener un conocimiento más amplio acerca de las capacidades de los consorcios, en lo referente a la utilización de otras fuentes de carbono, se encontró que los consorcios son capaces de biodegradar, además del polietileno, materiales celulósicos como el papel y madera, este último, además, con un alto contenido de lignina. Los resultados obtenidos son congruentes con lo detectado por otros autores (Silva, 2009 y Lee *et al.*, 1990). Al respecto, se establece en la literatura y se corroboró con los resultados del presente trabajo, que los microorganismos degradan diferentes materiales de acuerdo a la complejidad de su estructura y que de ello depende el tiempo en que se lleve a cabo el proceso que conduzca a su degradación. En el caso del polietileno, su degradación fue mucho más lenta que en los otros dos materiales utilizados, debido a su complejidad estructural.

Es importante señalar que en las muestras PEBD incubadas B1 y A3 (correspondientes a pH 7 y pH 5, respectivamente), observadas con el microscopio electrónico de barrido, se notaron diferencias en el ataque; es decir; mientras que en la muestra A3 se aprecia que el consorcio ataca agrietando al polietileno, en la B1 se observa cómo el consorcio defolia al material. Estas apreciaciones, no han sido descritas en trabajos similares previos. Respecto al ataque microbiano, algunos autores han solamente observado el crecimiento y penetración de hifas, en la superficie del material con pre-tratamiento (Limón, 2001); sin embargo, los resultados del presente trabajo corresponden al polímero sin pre-tratamiento. Al comparar las muestras de PEBD incubadas, con los consorcios con el control P1 sin microorganismos, se puede observar cómo la estructura del polietileno del control, no presenta ninguna alteración.

Los géneros de microorganismos identificados en los consorcios cultivados en el presente trabajo, corresponden casi totalmente a los mencionados en trabajos previos, relacionados con biodegradación y

biodeterioro de plásticos. De los microorganismos identificados, presentes de manera regular en todos los ensayos, se tienen los siguientes: la bacteria *Pseudomona sp*; especies de este género se consideran en la literatura capaces de ejercer actividad degradativa, sobre polímeros como el poliuretano (Howard 2002); en el cloruro de polivinilo, como el polietilen-glicol (Obradors y Aguilar, 1991) y en el polietileno de baja densidad (Uribe *et al.*, 2010). Entre los hongos filamentosos o mohos, se identificó el género *Penicillium sp*; en algunas especies de este hongo, se describe actividad sobre el polietileno con pre-tratamiento, (Limón, 2001 y Zheng *et al.*, 2005), pero también se identifica como capaz de degradar al polietileno sin pre-tratamiento, (Méndez *et al.*, 2007, Uribe *et al.*, 2010); *Aspergillus* con las especies *flavus*, *fumigatus* y *niger*, son mencionados como formadores de biopelícula y biodegradadores del polietileno de baja densidad (Limón, 2001, Méndez *et al.*, 2007), así como del poliuretano en el caso del *Aspergillus niger* (Hincapié y Ramírez, 2008). Aunque el género *Cladosporium sp.* se ha detectado como formador de biopelícula, no se ha descrito como degradador de polímeros (Méndez *et al.*, 2007). Por lo que respecta a *Gliocladium virens*, detectado en los consorcios estudiados, se ha mencionado como degradador de polietileno de baja densidad con pre-tratamiento (Limón, 2001) y, también, se ha encontrado formando parte de la biopelícula formada en los polímeros en proceso de degradación (Méndez *et al.*, 2008). Finalmente, en el presente estudio, se encontraron tres hongos levaduriformes formando parte de los consorcios: *Rhodotorula sp.*, identificado por tener actividad sobre polímeros como el polietileno (Uribe *et al.*, 2010); *Saccharomyces cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*, encontrados también en los consorcios estudiados en este trabajo, pero que no son mencionados en la literatura como degradadores de polímeros, como el PEBD.

Otro de los puntos importantes observados, es que el crecimiento de estos consorcios es muy lento, razón por la que las técnicas para lograr el aislamiento y el cultivo de estos microorganismos, deben de contemplar: (1) el ensayo con diferentes medios específicos y (2) tomar en consideración distintos niveles de pH y temperatura de incubación, entre otras variables experimentales. Es posible que, en la búsqueda de dichas variables para el cultivo de estos microorganismos, esté la respuesta que permita, a futuro, considerar viable el empleo de estos microorganismos para biodegradar polímeros, como el polietileno de baja densidad, de manera rápida y compatible con la conservación del ambiente. Además, reducir el volumen de residuos urbanos, que se conducen a los sitios de la disposición final (Méndez *et al.*, 2007; Villa *et al.*, 2008; Kathiresan, 2003).

## CONCLUSIONES

1. Los consorcios microbianos aislados de fragmentos de polietileno (PEBD) de baja densidad, enterrados en el sitio de disposición final "Bordo Poniente" de la Ciudad de México, presentaron biopelícula en este polímero con capacidad biodegradadora.

2. Se corroboró que los consorcios estudiados utilizan el PEBD como fuente de carbono, cuando en el medio de cultivo se encuentra como única fuente de este elemento.

3. La actividad biodegradadora se determinó cualitativamente, a través de las observaciones con microscopía electrónica de barrido, comparando con los cultivos testigo, carentes de microorganismos y observándose la alteración física de la superficie del polímero, producida en la biopelícula. Cuantitativamente, la biodegradación se estimó con base en la pérdida de peso del polímero, lo que significa que el consorcio utilizó al polietileno, como soporte y fuente de carbono.

4. Los cultivos bajo condiciones de reposo y agitación, permitieron caracterizar a los microorganismos del consorcio, en aeróbios y/o microaerofílicos.

5. Se detectó que en los cultivos bajo condiciones de agitación constante, se logran los mayores niveles de biodegradación del polietileno hasta de un 19.32% en 60 días, lo que indica que los microorganismos del consorcio más activos en el proceso son aerobios.

6. Los consorcios fueron capaces de biodegradar, además del polietileno, materiales celulósicos como el papel y ricos en lignina como la madera.

7. Se comprobó que los microorganismos degradan diferentes materiales orgánicos y que, de acuerdo a su naturaleza, dependerá el tiempo en el que el material sea degradado, habiéndose comprobado que el polietileno, es el sustrato que requiere más tiempo para su degradación.

8. Finalmente, el porcentaje de PEBD biodegradado, bajo condiciones de cultivo en agitación constante, corresponde al más alto hasta ahora mencionado en la literatura, bajo las mismas condiciones experimentales.

## REFERENCIAS

- Albertsson, A.C. y Karlsson, S. 1988. *The three stages in degradation of polymers-polyethylene as a model substance*. Journal of Applied Polymer Science. 35: 1289-1 302.
- Brenner K, You L, Arnold F. (2008). *Engineering microbial consortia: A new frontier in synthetic biology*. Trends Biotechnol 26: 483–9.
- Betancourth M., Botero J., Rivera S., 2004,. *Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo*, Colombia Médica Vol. 35 N° 3 Corporación Editora Médica Del Valle, Colombia.
- Billmeyer Wallace, 1971, *Textbook of polymer science*, Wiley-interscience, New York, 598 pp.
- Bilurbina L. y Liesa F., 1990, *Materiales no metálicos resistentes a la corrosión*. Marcombo, Barcelona, España. 147pp.
- Brown Theodore L, Bursten Bruce, Burdge Julia, 2004, *Química: la ciencia central*, Novena edición, Person Educación.1152pp.
- Burd D., *Plastic Not Fantastic*: <http://wwsef.uwaterloo.ca/archives/2008/08BurdReport.pdf> (consultado, marzo 2010)
- Cain, R.B., 1992. *Microbial degradation of synthetic polymers*, Microbial Control of Pollution. Cambridge University Press. Cambridge, 293-338.
- Campos D.K. 2007. *Determinación de la porosidad de un lecho de partículas con biopelícula en fluidización inversa en dos fase (sólido-líquido)*, IPN. Escuela Superior de Ingeniería Química e Industrias Extractiva. México D.F. 97 pp.
- DUMAC, 2005, *Programa de conservación y manejo para las aves playeras en el Lago de Texcoco Estado de México*, Ducks Unlimited de México, A. C. 10-24 pp.
- Google maps <http://maps.google.com.mx> (consultado, abril 2013)
- Hincapié G., Ramírez M., 2008. *Biodegradación de poliuretano residual empleando aspergillus niger*, Investigaciones Aplicadas, Medellín Colombia.
- Howard G.T. 2002. *Biodegradation of polyurethane*, Review. International Biodeterioration & Biodegradation 49: 245 – 252.
- INEGI. Cartografía urbana: <http://www.inegi.org.mx>(consultado, enero 2011)
- Ishigaki T., W. Sugano, M. Ike, et al. 2000. *Enzymatic degradation of cellulose acetate plastic by novel degrading bacterium Bacillus sp. S2055*. Journal of Bioscience and Bioengineering 90(4): 400-405.
- Kathiresan K. 2003. *De polietileno y de degradación de plásticos microbios del suelo de manglares*. Centro de Estudios Avanzados en Biología Marina de la Universidad Annamalai, Parangipettai. India.
- Keenan C. y Wood J., 1976. *Química general universitaria*. México. 951pp
- Klemchuk, P., 1990. *Degradable Plastics: A critical Review*. Journal Degradation and Stability. 27: 183-202



- Lee B., A.L. Pometto III, A. Fratzke, et al. 1990. *Biodegradation of degradable plastic polyethylene by Phanerochaete and Streptomyces species*. Applied And Environmental Microbiology 57: 678-685.
- Limón Margarita, 2001. *Biodegradación de polietileno de baja densidad por hongos filamentosos*. UAM Iztapalapa, México, D. F..134 pp
- Maier Martha, 2008. *Polímeros*, Departamento de Química Orgánica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA). 20pp
- Mangiarotti A., Caretta G., Nelli, E. y Pioletti, E. 1994. *Biodeterioro de materiales plásticos por Microhongos*, Boletín Micológico. Vol. 9 (1-2): 39-47
- Márquez L., Nevárez V., Dávila A., Rivera B. Y González O., 2008. *Efecto de la formación de biopelículas en la resistencia de bacterias aisladas de especímenes clínicos*, Synthesis, Facultad De Ciencias Químicas/Universidad Autónoma De Chihuahua, México.
- Méndez C., Vergaray G., Béjar V. y Cárdenas K., 2007. *Aislamiento caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno*, Rev. Perú. Biol. Número Especial 13(3): 203 – 205
- Navia D. Villada H. y Mosquera S., 2010. *Las biopelículas en la industria de alimentos*, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad del Cauca, Colombia, vol. 8 no. 2, 119-128.
- Obradors N. y Aguilar J.,1991. Efficient Biodegradation of High- Molecular-Weight Polyethylene Glycols by Pure Cultures of Pseudomonas stutzeri. Applied And Environmental Microbiology 57 (8): 2383-2388
- Ochoa, D. y Montoya, A., 2010. *Consortios microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias*. Revista de la Facultad de Ciencias Económicas de la Universidad Militar Nueva Granada. Colombia.
- Ojeda R., Buitron G., 2001. *Selección del medio soporte para un reactor sbr anaerobio/aerobio*. Instituto de Ingeniería. UNAM, CU. México.
- Otake, Y., Kobayashi. T., Assabe, H. y Murakami, N. (1995). *Biodegradation of lowdensity polyethylene, polystyrene, polyvinyl chloride and urea formaldehyde resin buried under soil for over 32 years*. Journal of Applied Polymer Science, 56: 1789-1 796.
- Pitt JI, Hocking AD. 1997. *Food and Food Spoilage*. 2º ed. Blackie Academic & Professional, London.
- RHRAP (red hemisférica de reservas para aves playeras): <http://www.whsrn.org/es/perfil-de-sitio/lago-texcoco> (consultado, enero 2011)
- Sáenz De Juano V., 2006. *Contribución al estudio de la degradación ambiental de poliolefinas fotoestabilizadas*, Universidad Politécnica De Valencia, España.
- Santillana: <http://www.santillana.cl/EduMedia/QUIM4.pdf> (consultado, julio 2010)
- Secretaria de Obras y Servicios: <http://www.obras.df.gob.mx> (consultado, agosto 2010)

SERMARNAT. *Programa Metropolitano de gestión de Residuos Sólidos. ¿Sabías qué?, dentro de la página oficial de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales:*

<http://www.semarnat.gob.mx/slp/mexicolimpio/mexicolimpio.shtml>(consultado, agosto 2011).

SERMARNAT. *Generación de residuos sólidos urbanos:*

[http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/resumen\\_2009/07\\_residuos/cap7\\_1.html](http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/resumen_2009/07_residuos/cap7_1.html)  
(consultado. agosto 2012).

Silva K. 2009. *Biodegradação de polietileno tereftalato (PET) por fungos ligninolíticos* Departamento de Ciência de Alimentos (DCA). Brasil.

Uribe D., Giraldo D., Gutiérrez S.y Merino F., 2010. *Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú.* Facultad de Ciencias Biológicas UNMSM. Lima, Perú.

Valdez I. y Poggi H., 2006. *Cuadernillo de Tecnología No. 1, Producción de hidrogeno: una opción biotecnológica*, Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, México. 67 pp.

Villa C., Rivera J., Capilla V., Gardé J. 2008, *Degradación biológica de polímeros mediante la selección y producción de potenciales cultivos iniciadores.* II Congreso Iberoamericano sobre Seguridad Alimentaria V Congreso Español de Ingeniería de Alimentos, Barcelona.

Watanabe T., 2002. *Pictorial Atlas of Soil and Seed Fungi: Morphologies of Cultured Fungi and Key to Species*, Second Edition, Taylor & Francis Group, 512 pp.

Whitekettle W K.1991. *Effect of Surface-active chemicals on microbial adhesion.* Journal of Indian Microbiology. 7:105-116

Zheng Y., Yanful E. y Bassi A., 2005. *A review of plastic waste biodegradation*, Critical Reviews in Biotechnology, 25:243-2500.



## ANEXO I

## Formulario

## Composición de medio MSM

MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,5 g	NH <sub>4</sub> Cl	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,5 g	CaCl <sub>2</sub>	0,002 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .12H <sub>2</sub> O	2,52 g	MnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,007 g
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,001 g	ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,007 g
Agua destilada	1L		

## Composición de medios selectivos para levaduras:

Medio Malta glucosa			
Agua destilada	1L	Extracto de malta	20g
Peptona	1g	Glucosa	20g
Agar	20g		

Malta-50%glucosa			
Agua destilada	1L	Extracto de malta	20g
Extracto de levadura	2.5g	Agar	20g
Glucosa	500g		

Malta acético	
Acido acético glaciado	5ml
Medio malta estéril	1L

Medio de cultivo selectivo para el aislamiento de *Pseudomonas*.

Agar	13.6	Peptona de gelatina	20.0
Cetrimida	0.3	Cloruro de magnesio	1.4
Sulfato de potasio	10.0	Agua destilada 1L	pH 7.2 ± 0.2

En todos los casos, la esterilización de los medios de cultivo se llevó a cabo en el autoclave a 15 libras de presión (1.5 atmósferas) equivalente a 120°C, durante 15 minutos.