

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

---

**FACULTAD DE QUIMICA**

**AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE MICROORGANISMOS  
QUE UTILIZAN COMO FUENTE DE CARBONO PRODUCTOS  
DE OXIDACION DEL POLIETILENO**

205

**FERNANDO      ANTONIO      GONZALEZ      FARIAS**

**QUIMICO      FARMACEUTICO      BIOLOGO**

**MEXICO, D. F.**

**1976**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

CLAS Tesis

AÑO 1976

ECHA

FOLIO

208



QUÍMICA

Jurado asignado originalmente según el tema:

Presidente, Prof.		NATALIA SAUCEDO OLAVARRIETA
Vocal	"	ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN
Secretario	"	JORGE SOTO SORIA
1 <sup>er</sup> Suplente	"	LILIA VIERNA DE GARCIA
2 <sup>o</sup> Suplente	"	ROSA MARIA RAMIREZ

Sitio donde se desarrolló el tema: DEPARTAMENTO DE -  
MICROBIOLOGIA, FACULTAD DE QUIMICA. UNAM.

Sustentante: FERNANDO ANTONIO GONZALEZ FARIAS

Asesor: ALFREDO ECHEGARAY ALEMAN



A CHIQUIS Y A TONÓ POR TODO, GRACIAS.

A PAZ Y A ANITA CON CARÍO

A LA MEMORIA DE TERE Y SALVADOR

**A LUCIA Y CARLOS**

**A MIS AMIGOS Y COMPAÑEROS**

Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE  
UNA U OTRA FORMA COOPERARON PARA -  
LA REALIZACION DE ESTE TRABAJO. MI  
MAS PROFUNDO AGRADECIMIENTO.

## INDICE

	página
INTRODUCCION.....	1
MATERIAL Y METODOS.....	9
RESULTADOS.....	28
DISCUSION.....	56
RESUMEN.....	60
BIBLIOGRAFIA.....	62

## INTRODUCCION

El descubrimiento de que los plásticos podían ser atacados por microorganismos bajo condiciones ambientales de altas temperaturas y humedad, dió lugar al desarrollo de muchos programas de investigación en diversos laboratorios y universidades, pero la información reportada tendía a ser confusa ya que no se hacía distinción alguna de si el material susceptible al ataque biológico eran los polímeros en si o bien los plastificantes.

Posteriormente se encontró que los microorganismos que se desarrollaban sobre la superficie de los plásticos, utilizaban a estos como soporte y a los plastificantes como fuente nutritiva.-- Así tenemos que Hueck afirma que: "La matriz del polímero como tal no es atacada por los microorganismos. Los plastificantes, aditivos, antioxidantes, etc., pueden ser atacados, así como impurezas y residuos del proceso de obtención del plástico que hayan quedado embebidos en la matriz, pero el polímero en sí es invulnerable al ataque biológico y permanece intacto" (2).

Se ha observado que el crecimiento de los microorganismos sobre los plásticos les causa un daño mecánico. A este daño se le denominó "biodeterioración", la cual fué definida en 1959 como: "Cualquier cambio indeseable en las propiedades de un material, debido

a los procesos vitales de los organismos" (1).

La biodeterioración de los plásticos puede ser causada por un sin número de organismos, y esta puede clasificarse según los procesos que la causan en:

- 1) Mecánicos.
- 2) De enterramiento.
- 3) Químicos.

La biodeterioración por procesos mecánicos es llevada a cabo en general, por roedores e insectos, los cuales causan grandes daños al utilizar sus mandíbulas sobre tuberías, cañerías, cubiertas aislantes de conductores eléctricos, etc.

En los procesos de enterramiento se puede considerar que la biodeterioración es similar a la de procesos mecánicos, con la diferencia que se efectúa por el crecimiento de microorganismos sobre la superficie de los plásticos que se encuentran situados subterráneamente.

Con respecto a la biodeterioración por procesos químicos tenemos que esta puede deberse a procesos de asimilación y/o a procesos de desasimilación. En los procesos de asimilación se tiene que los constituyentes del plástico sirven como fuente de nutrientes para los organismos. En los procesos de desasimilación, el organismo no utiliza al plástico como fuente nutritiva, pero lo daña químicamente por medio de sustancias de excreción

del mismo.

Los procesos químicos de biodeterioración son considerados - por Eggins y Mills, como procesos de "biodegradación". A esta - la definen como: "La degradación y/o la conversión por los microorganismos, de materiales de desecho en materiales inócuos- o bien en materiales útiles para ellos" (1).

Una de las características de los plásticos que favorece la- resistencia a la biodegradación, es el carácter hidrofóbico -- que poseen. Debido a esta propiedad no puede existir contacto- entre el plástico y los microorganismos que son hidrófilos.

La anterior desde luego no es la única razón por la cual los plásticos se mantienen invulnerables al ataque de los microorganismos, se ha sugerido que existe un impedimento estérico, el cual es posiblemente el factor más importante en la resisten- cia de los plásticos a la biodegradación (2). Se ha dicho tam- bién, que las cadenas lineales son menos resistentes a la bio- degradación que las cadenas ramificadas, asimismo los políme- ros que presenten grupos hidrófilos, tales como grupos -OH, --- -COOH, -CHO, -NH<sub>2</sub>, etc., serán mas susceptibles al ataque microbia no.

Existen algunos polímeros artificiales, los cuales debido a - su estructura química, son susceptibles a la biodegradación. En- tre ellos tenemos al nitrato de celulosa, a resinas de melanin



formaldehído y al acetato de polivinilo. Pero a excepción de éstos los demás polímeros artificiales son no biodegradables (1).

Esta resistencia al ataque biológico, es la que ha hecho que los plásticos sean usados ampliamente en objetos que se encuentran a la intemperie, sujetos al ataque de un sinnúmero de organismos; es así que se utilizan en implementos para la agricultura, la ganadería, la pesca, en cables submarinos y subterráneos, en cañerías, etc., sin sufrir daños considerables.

Como ya se mencionó el polímero no sufre biodegradación por parte de los microorganismos, pero los plastificantes, que son en general moléculas orgánicas de bajo peso molecular, si son biodegradados. Entre los plastificantes más usados se encuentran el tri-n-butyl citrato, el dioctil sebacato, el ácido oleico, el benzil benzoato, el triacetato de glicerol, el dioctil ftalato, el polietilén glicol 200 y el ácido ricinoléico.

Al eliminarse el plastificante de la matriz del plástico por acción de los microorganismos, cambian las propiedades físicas del polímero, lo que causa problemas de diversa índole entre los cuales se pueden mencionar los siguientes: pérdida de las propiedades aislantes de las cubiertas de conductores eléctricos (debido a las características hidrófilas de los productos de desecho de los microorganismos), cambios en la resistencia a presiones y tensiones, cambios en la flexibilidad, etc., lo que

ocasiona que los objetos sujetos a estos cambios no funcionen correctamente.

A la fecha se han desarrollado una serie de técnicas (3,4,5),- por medio de las cuales es posible medir el grado de biodeterioración o de biodegradación que haya sufrido un plástico o un -- plastificante, cuando estos hayan sido expuestos a la acción de los microorganismos.

Existen reportes en la literatura disponible, sobre microorga-- nismos que son capaces de desarrollarse sobre plásticos que posean plastificantes, o bien en medios de cultivo cuya única fuente de carbono sea precisamente a algún plastificante. Entre los microorganismos que se desarrollan sobre plásticos tenemos a los siguientes: Aspergillus niger, Aspergillus flavus, Aspergillus versicolor, Penicillium funiculosum, Pullularia pullulans, Aspergi---llus amstelodami, Sterigmatocystis nigra, Penicillium cyclopium, - Paelomyces varioti, Trichoderma sp., Chaetomium globosum, Myrothecium verrucaria, Fusarium sp., Talaromyces emersonii, Memnoniella-echinata, Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas effusa y Bacillus -laterosporus (4,5,6,8). Con respecto a los microorganismos que -- se desarrollan en medios de cultivo, cuya fuente de carbono es -- algún plastificante, cabe destacar a Talaromyces emersonii, el -- cual se desarrolló, con mayor o menor intensidad, en todos los medios de cultivo que contenían a alguno de los plastificantes --

mencionados anteriormente (6).

Hasta ahora la mayoría de los estudios que se han realizado - sobre la biodeterioración y biodegradación de plásticos y plastificantes, han ido orientados hacia la protección de estos materiales en contra del ataque de los organismos. Es por esto -- que se han desarrollado una serie de investigaciones con el -- fin de obtener biocidas mas potentes, que posean un espectro de actividad más amplio y que sean compatibles con otros aditivos que presenten los plásticos.

Sin embargo existen algunos trabajos, en los cuales se considera a los plásticos como contaminantes, dada la característica - de no biodegradación que poseen, y se busca la posibilidad de - degradarlos (3,7,10).

En la literatura disponible se considera que, hasta la fecha, - los plásticos no han causado problemas graves de contaminación, pero debido al uso tan amplio que se les da a algunos de ellos (p.ej. los utilizados en envolturas, que son desechados despues de un breve uso) y a la propiedad de no biodegradación que poseen, se han ido acumulando causando problemas en lagos, lagunas costeras, pequeñas áreas del océano, en los drenajes de las ciudades y en los depósitos y plantas industrializadoras de basura.

En el medio acuático han causado problemas de anoxia, pues -- debido a su flotabilidad sobre la superficie de las aguas, impiden el paso de la luz y por ende la fotosíntesis. Impiden -- también el intercambio gaseoso entre el medio acuático y la atmósfera, lo que ayuda a mantener estas condiciones de anoxia, ocasionando la muerte de muchos organismos acuáticos, modificando así las condiciones ecológicas del lugar.

En los drenajes de las grandes ciudades han favorecido el es tancamiento de las aguas negras, pues al ser insolubles y no biodegradables, se forman aglomerados de estos polímeros ocurriendo obstrucciones en las cañerías.

En los depósitos y plantas industrializadoras de basura la mayoría de los plásticos no son recirculables como es el caso de los metales y el vidrio, y tampoco los pueden utilizar para la obtención de compostas, puesto que los polímeros son no biodegradables.

Dado el hecho de que son contaminantes no biodegradables, se ha sugerido (9) someterlos a un tratamiento químico previo y posteriormente utilizar los productos obtenidos a partir de ellos como fuente de carbono para la formación de compostas, para la obtención de biomasa y/o productos de fermentación.

La eliminación de estos contaminantes se hace, en algunos lugares, por medio de la incineración. Este método no es recomen-

dable pues causa una contaminación atmosférica (1,2), la cual se considera más grave que la contaminación que pueden causar los plásticos como tales.

Existen algunos trabajos en los que se utilizan radiaciones de luz ultravioleta para la degradación de los plásticos (12). En este campo se está experimentando con la variación de las condiciones de temperatura, presión, concentración de oxígeno, etc., en las cuales se lleva a cabo la irradiación. Esto es con el fin de obtener productos que sean utilizables por los microorganismos.

Considerando que el método a seguir para la eliminación de estos contaminantes no biodegradables, es el tratamiento químico, en el presente trabajo se llevó a cabo la oxidación de un plástico muy utilizado actualmente, el polietileno. Los productos de oxidación de dicho plástico fueron utilizados como fuente de carbono en medios de cultivo. Estos medios de cultivo fueron utilizados para el aislamiento de varios microorganismos que pueden emplear los productos de oxidación del polietileno para su desarrollo; así a partir de materiales de desecho nos es posible obtener una biomasa y/o productos de fermentación útiles al hombre.

## MATERIAL Y METODOS

## METODO DE OXIDACION DEL POLIETILENO:

Se pesan dos gramos de polietileno comercial (en este trabajo se utilizaron bolsas desechables de polietileno marca Bol-Rol) los que se reflujan con 40 ml. de una solución acuosa de  $\text{HNO}_3$  al 85.7 % v/v durante 24 horas. Se obtiene una mezcla de productos de oxidación, la cual se deja enfriar para proceder posteriormente a la obtención de dichos productos (10).

Esta reportado en la literatura que los productos de oxidación obtenidos por este método son ácidos dicarboxílicos saturados, de cadena lineal, conteniendo de seis a doce átomos de carbono, lo que corresponde a un peso molecular promedio de 250 (7,10).

## METODOS DE OBTENCION DE LOS PRODUCTOS DE OXIDACION DEL POLIETILENO:

Método # 1.-Se coloca en un embudo de separación la mezcla de  $\text{HNO}_3$  y productos de oxidación del polietileno, y se le agrega un volumen igual de éter etílico. Se procede a hacer la extracción separando las dos fases, éterea y acuosa.

La fase etérea se coloca en un aparato de destilación y se elimina el  $\text{HNO}_3$  que contenga, así como el éter. En el fondo del

matraz de destilación queda una pasta oleosa de color blanquecino, la cual se colecta y a la que se le adiciona una solución acuosa de KOH 2 N, hasta alcanzar un pH de 7.

La adición de la potasa es con el fin de obtener las sales de potasio de los ácidos dicarboxílicos, las cuales son solubles en agua. Además se ha observado que los microorganismos se desarrollan mejor en medios de cultivo con las sales, que en medios de cultivo que contengan los ácidos (10).

Método # 2.-La fase acuosa obtenida en el método anterior, se coloca en un aparato de destilación y se elimina de ella el  $\text{HNO}_3$  y el agua. Se obtiene también una pasta oleosa en el fondo del matraz, la cual se recupera de la misma forma que en el Método # 1.

Método # 3.-La mezcla de  $\text{HNO}_3$  y productos de oxidación del polietileno se adiciona de una solución acuosa de KOH 2 N, hasta alcanzar un pH de 7. En este método no se elimina el  $\text{HNO}_3$  (10).

Método # 4.-La mezcla de  $\text{HNO}_3$  y de ácidos dicarboxílicos se coloca en un aparato de destilación y se elimina de esta el  $\text{HNO}_3$ . La pasta que queda en el fondo del matraz de destilación se recupera de la misma forma que en los métodos 1 y 2.

MÉTODOS DE AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS QUE UTILIZAN COMO ---  
FUENTE DE CARBONO PRODUCTOS DE OXIDACION DEL POLIETILENO:

## MEDIOS DE CULTIVO:

## MEDIO M9-ET

$\text{NH}_4\text{Cl}$ ..... 1.0 g.

$\text{KH}_2\text{PO}_4$ ..... 3.0 "

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ..... 6.0 "

$\text{NaCl}$ ....., 0.5 "

Solución de las sales de potasio de

los productos de oxidación del poli

etileno obtenida por el Método # 1... 50 ml.

Agua destilada c.b.p..... 1000 "

Esterilizar en autoclave a 15 psi. y  $121^\circ\text{C}$  durante 15 minutos.

Esterilizar aparte una solución acuosa de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  al 25 % y-

adicionar un mililitro de esta por cada litro de medio. La solu-

ción de productos de oxidación del polietileno se esteriliza por separado y se adiciona posteriormente al medio.

## MEDIO M9-AQ

Este medio difiere del anterior en que la solución de las sales de potasio de los productos de oxidación del polietileno, es la - obtenida por el Método # 2.

## MEDIO M9-SIN

Este medio es similar a los dos anteriores, con la diferencia de



que se adiciona la solución de sales de potasio de los productos de oxidación del polietileno, obtenida en el Método # 3.

Para obtener medios sólidos de cada uno de los medios antes mencionados, se agregan 20.0 g. de Bacto-agar (DIFCO) por litro de medio.

#### MÉTODOS DE AISLAMIENTO:

El aislamiento de microorganismos que utilizan como fuente de carbono los productos de oxidación del polietileno, se hizo a partir de cuatro fuentes distintas, que son las siguientes: compostas de basura, lodos marinos, aire y cepas conocidas.

1) Compostas.- Se procedió a hacer el aislamiento a partir de -- compostas de tres meses de fermentación, obtenidas en el Centro de Industrialización de Basura de San Juan de Aragón, México D. F.

Para ello se hicieron diluciones de una muestra de composta -- de la forma siguiente: se tomó una muestra de 10 g. de la com-- posta y se introdujo en un matraz conteniendo 90 ml. de agua -- destilada y estéril, se agitó vigorosamente y se dejaron sedi-- mentar las partículas gruesas. De esta suspensión se tomaron 10 ml. los cuales se introdujeron en otro matraz que contenía 90-- ml. de agua estéril, se agitó nuevamente y se volvió a tomar -- otra alícuota de 10 ml., la que se llevó a otro matraz conte---

niendo 90 ml. de agua estéril. Así sucesivamente se llegó hasta una dilución de  $1 \times 10^{-6}$ .

De las diluciones de  $10^{-4}$ ,  $10^{-5}$  y  $10^{-6}$  se tomaron alícuotas de 0.1 ml., las cuales se sembraron en placa cada una sobre cada uno de los medios sólidos M9-ET, M9-AQ y M9-SIN. Todas las cajas se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ .

2) Bacterias marinas.-Estas se obtuvieron con un nucleador, a una profundidad de 328 m. frente a las costas de Acapulco, Guerrero.

El método de diluciones, la siembra de las cajas y la incubación se efectuaron del mismo modo que en el caso anterior.

3) Aire.-Varias cajas de Petri con los medios sólidos M9-ET, M9-AQ y M9-SIN, se dejaron abiertas durante 24 horas en el laboratorio donde se desarrolló este trabajo. Pasado ese lapso se taparon e incubaron a  $30^{\circ}\text{C}$ .

4) Cepas conocidas.-En cajas de Petri con los medios sólidos M9-ET, M9-AQ y M9-SIN, se procedió a sembrar una cepa de Pseudomonas effusa, aislada y clasificada en este laboratorio, que es capaz de degradar fibras de Rayón Viscosa (8); y una cepa de un Actinomicet aislado de una composta obtenida de desperdicios de café. Se incubaron a  $37^{\circ}\text{C}$ .

MÉTODOS PARA DETERMINAR LA CONCENTRACION OPTIMA DE LOS PRODUCTOS DE OXIDACION DEL POLIETILENO A LA CUAL CRECEN DISTINTOS MI-

#### CROORGANISMOS AISLADOS EN LOS MEDIOS M9-ET, M9-AQ Y M9-SIN:

En los medios M9-ET, M9-AQ y M9-SIN se aislaron bacterias, hongos y actinomicetos. De cada uno de estos grupos de microorganismos, se seleccionó la cepa que se desarrollaba mejor en dichos medios y se procedió a determinar la concentración óptima de productos de oxidación del polietileno para su desarrollo.

Entre las bacterias se seleccionó a la cepa B-12 y para cada uno de los medios de cultivo se determinó la concentración óptima de productos de oxidación del polietileno en la forma siguiente: En cada uno de los medios M9-ET, M9-AQ y M9-SIN las concentraciones de productos de oxidación del polietileno utilizadas fueron las siguientes: 1, 3, 5, 7, 9, 15, 30 y 50 % v/v. De cada uno de los medios, con las distintas concentraciones, se tomaron 250 ml. los que se colocaron en matraces Erlenmeyer estériles y se procedió a su inoculación.

Cada matraz se inoculó respectivamente, con 0.1 ml. de un cultivo de B-12 de seis días de crecimiento, de los medios M9-ET, M9-AQ y M9-SIN según el caso. Se incubaron los matraces en cultivo estacionario a 37°C, por un período de 20 días.

Diariamente durante ese tiempo, se extrajeron de cada matraz 5 ml. del cultivo, los cuales se colocaban en tubos de Klett-Summerson con el fin de determinar la turbiedad a través del tiempo, de cada uno de los cultivos, después de la lectura, se desecha

ban las alícuotas tomadas. Cada cultivo tenía su blanco correspondiente, que era el medio de cultivo con las distintas concentraciones de productos de oxidación del polietileno, pero sin estar inoculados.

Para leer la turbiedad de las muestras se utilizó un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62.

De los hongos se seleccionó a la cepa H-1, a la cual se le determinó la concentración óptima de productos de oxidación del polietileno en la cual se desarrollaba mejor, de la siguiente forma:

Los matraces con los distintos medios, M9-ET, M9-AQ y M9-SIN, y las distintas concentraciones de productos de oxidación del polietileno, fueron preparados de la misma forma que en el caso anterior.

Se procedió a hacer una suspensión de esporas, en 10 ml. de medio, del cultivo de H-1, de cada uno de los distintos medios, con 15 días de crecimiento. De cada una de las suspensiones de esporas se tomaron alícuotas de 0.1 ml., con las que se inocularon respectivamente, los distintos medios con las distintas concentraciones de productos de oxidación del polietileno, según el caso. Se incubaron todos los matraces con agitación a 30°C.

Al cabo de 20 días de incubación se procedió a obtener la biomasa de cada uno de los medios de cultivo. Esta biomasa obtenida

determinó cuál era la concentración óptima de productos de oxidación del polietileno, en la cual se desarrollaba mejor la cepa H-1. La biomasa fué obtenida por filtración en Millipore y el peso seco de la misma fué obtenido colocando las muestras en una estufa a 80°C, hasta lograr un peso constante.

De los Actinomicetos se utilizó la cepa C-1, que fué la única aislada. La preparación de los distintos medios con las distintas concentraciones de productos de oxidación del polietileno, se efectuó del mismo modo que en los casos anteriores.

Se tomaron alícuotas de 0.1 ml. de cultivos de 6 días de crecimiento de cada uno de los distintos medios, M9-ET, M9-AQ y M9-SIN, con las que se hizo la inoculación, según el caso, de los distintos medios con las distintas concentraciones.

Se incubó en cultivo estacionario a 37°C durante 20 días. Después de este lapso se procedió a coleccionar la biomasa por filtración en Millipore. El peso seco se obtuvo colocando las muestras en una estufa a 80°C, hasta tener un peso constante de ellas.

#### CURVAS DE CRECIMIENTO:

Para la cepa B-12 se siguió la técnica siguiente:

1) Inocular 250 ml. del medio de cultivo deseado con 0.1 ml de un cultivo de la cepa B-12, el cual ha sido desarrollado en el

mismo medio de cultivo y tiene 6 días de crecimiento.

2) A períodos de tiempo establecidos se extraen 5 ml. del cultivo, los cuales se colocan en tubos de Klett-Summerson y se procede a leer la turbiedad que presentan los cultivos en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62. Se utiliza como blanco el medio de cultivo sin inóculo.

3) Para determinar la concentración de organismos viables en el cultivo, a través del tiempo, se toman alícuotas de 0.1 ml. del cultivo a lapsos establecidos. Estas alícuotas se diluyen y de cada dilución (que puede llegar hasta  $10^{-9}$  si el cultivo está muy turbio) se toman 0.1 ml., los que se siembran en cajas de Petri conteniendo medios de cultivo ricos. Se incuban en condiciones óptimas de temperatura y se cuentan las colonias que se desarrollaron; suponiendo que cada colonia proviene de un microorganismo, la concentración estará dada por la fórmula siguiente:

$$\text{número de microorganismos/ml. de cultivo} = \frac{\text{número de colonias}}{\text{dilución} \times \text{alícuota}}$$

Para las cepas H-1 y C-1 debido a que presentan un crecimiento filamentososo, se siguió la técnica siguiente:

1) Inocular diez matraces conteniendo 250 ml. del medio de cultivo deseado, con una alícuota de 0.1 ml. de una suspensión de esporas en 10 ml. del medio, de un cultivo de 15 días de crecimiento, en el caso de la cepa H-1; para cepa C-1 de un cultivo de 6 días de crecimiento.

- 2) Incubar en las condiciones óptimas para cada cepa.
- 3) A determinados lapsos ir obteniendo la biomasa de cada uno de los matraces. La biomasa se obtiene por filtración en Millipore y el peso seco de la misma colocando las muestras en una estufa a  $80^{\circ}\text{C}$ , hasta obtener un peso constante.

En estos dos casos se obtienen curvas cuyas coordenadas son biomasa vs. tiempo.

#### METODO PARA LA DETERMINACION DE CARBONO:

Para la determinación de carbono total se utilizó un Analizador de Carbono Orgánico Total, Beckman Modelo 915, con un Analizador - Infrarrojo, Beckman Modelo 865 y un Graficador Beckman 10" integrados, pertenecientes al laboratorio de Química Marina del Centro de Ciencias del Mar y Limnología.

Del analizador se utilizó el canal para carbono total, con temperatura constante de  $950^{\circ}\text{C}$ , utilizando  $\text{O}_2$  como acarreador con un flujo constante de 145 cc./min. El analizador de infrarrojo fué utilizado en el rango de sensibilidad número 2. La velocidad del papel en el graficador fué de 0.1 pulgadas/min.

CURVA PATRON: Se prepararon soluciones patrón con diftalato de sodio y agua destilada libre de  $\text{CO}_2$ . Estas soluciones patrón contenían 10, 25, 50, 100, 125 y 150 partes por millón (ppm) de carbono.-

Se inyectaron en el analizador de carbono 40  $\mu$ l. de cada una de estas soluciones y se hizo una curva patrón teniendo como coordenadas unidades del graficador vs. ppm de carbono.

De las muestras analizadas se hicieron diluciones con agua libre de  $\text{CO}_2$ , con el fin de que los valores obtenidos cayeran dentro de la curva patrón y no se extrapolara. En algunos casos no se hicieron diluciones, sino que se disminuía el volumen de la inyección al analizador.

METODO PARA DETERMINAR LA UTILIZACION DEL CARBONO, DE LOS PRODUCTOS DE OXIDACION DEL POLIETILENO, POR LOS MICROORGANISMOS:

Se hicieron cultivos de B-12 y H-1 en los que se determinó la utilización de los productos de oxidación del polietileno, como fuente de carbono.

CEPA B-12:

A 100 ml. del medio M9-ET a una concentración de 5 % v/v, se les inoculó con 0.1 ml. de un cultivo de 6 días de crecimiento en el mismo medio. Se incubó a 37°C en cultivo estacionario.

CEPA H-1:

A 100 ml. del medio M9-ET a una concentración de 30 % v/v, se les inoculó con 0.1 ml. de una suspensión de esporas, en 10 ml. de medio, de un cultivo con 15 días de desarrollo. Se incubó a 30°C con agitación.



En ambos casos se procedió a tomar alícuotas de 5 ml. de los -  
cultivos cada 24 horas. Las alícuotas eran filtradas en Millipore,  
el filtrado era recuperado y a este se le determinaba la can-  
tidad de carbono que poseía, en el Analizador de Carbono Orgáni-  
co Total.

METODO PARA LA DETERMINACION DE NITROGENO TOTAL, MICROKJEDAHN (A.  
O.A.C., TIETZ):

REACTIVOS:

- $H_2SO_4$  conc.

- $CuSO_4$

- $H_2O_2$  al 30 %

-Solución acuosa de NaOH 2 N

-Reactivo de Nessler

- $(NH_4)_2SO_4$

-Agua destilada

PROCEDIMIENTO:

Se pesan 40 mg. de la muestra y se colocan en un tubo de diges-  
tión, se añaden unas gotas de  $H_2SO_4$  conc. y se calienta suavemen-  
te hasta eliminar toda la humedad de la muestra.

Añadir 3 ml. de  $H_2SO_4$  conc. y unos cristales de  $CuSO_4$  y con --

precaución 5 gotas de  $H_2O_2$  al 30 %, se calienta 24 horas hasta - que el contenido del tubo sea transparente y no salgan humos -- blancos.

Se deja enfriar a temperatura ambiente, se afora a 100 ml. De esta solución se toma 1.0 ml. al que se le agregan 4.0 ml. de agua destilada, 3.0 ml. de la solución acuosa de NaOH 2 N y 2.0 ml. de reactivo de Nessler. Dejar reposar 10 minutos y medir el color en un fotocolorímetro, empleando un filtro con una longitud de onda de 440 nm. (filtro azul).

#### CURVA PATRON DE NITROGENO:

Se prepara una solución patrón de sulfato de amonio que contenga 0.01 mg. de N/ml. De esta se hacen diluciones, p.ej. tomando - 0.1, 0.2, 0.4, 0.8 ml. de ella y completando el volumen a 5 ml. -- con agua destilada. En cada caso se sigue la técnica para estas soluciones como la descrita para la muestra problema.

Cálculos:

$$\% N \text{ (en peso de la muestra)} = \frac{N' \times 100}{40 \text{ mg.} \times \text{dilución}}$$

'concentración referida a la curva patrón.

"dilución de la muestra de biomasa.

#### MEDIOS DE CONSERVACION E IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS:

## MEDIOS DE CONSERVACION:

## MEDIO M9-G

$\text{NH}_4\text{Cl}$ .....	1.0 g.
$\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....	3.0 "
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....	6.0 "
$\text{NaCl}$ .....	0.5 "
Dextrosa (solución al 20 %)	10 ml.
Agua destilada c.b.p.	1000 "

Esterilizar en autoclave a una presión de 15 psi. y a una temperatura de  $121^\circ\text{C}$ , durante 15 minutos.

La solución de dextrosa se esteriliza aparte y después se le agrega al medio. Se prepara una solución de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$  al 25 %, la que también se esteriliza aparte y de la cual se adiciona 1-ml. por cada litro de medio.

## MEDIO M9-GET

Este medio contiene las mismas sales que el medio anterior, pero se diferencia en la fuente de carbono. Esta se varió dependiendo de la cepa (B-12 o H-1) que se iba a sembrar.

## CEPA B-12:

Dextrosa (solución al 20 %)

Solución de productos de oxidación del polietileno, obtenida en el Método # 1

da en el Método # 1..... 25 "

## CEPA H-1:

Dextrosa (solución al 20 %)... 5 ml.  
 Solución de productos de oxidación  
 del polietileno, obtenida en el Mé-  
 todo # 1..... 300 "

## MEDIO M9-GAQ

Este medio es similar a los dos anteriores, pero varía también la fuente de carbono. Este medio se utilizó para el desarrollo de la cepa C-1, y su fuente de carbono esta compuesta de la forma siguiente:

Dextrosa (solución al 20 %)... 5 ml.  
 Solución de productos de oxidación  
 del polietileno, obtenida en el Mé-  
 todo # 2..... 125 "

## GELOSIA TRIPTICA SOYA (BACTO):

Bacto triptosa (digerido pancreático de caseína U.S.P).... 15 g.  
 Bacto soytone (peptona de frijol soya)..... 5 "  
 NaCl..... 5 "  
 Bacto Agar (DIFCO)..... 15 "

Rehidratar a razón de 40 g./1000 ml., con agua destilada. Esteri-  
 lizar a 121°C y 15 psi durante 15 minutos. El pH final es de 7.3.

## MEDIOS DE IDENTIFICACION (13):

## AGAR DE HIERRO DE KLIGER

Peptona (Polipeptona).....	20.000 g.
Lactosa.....	10.000 "
Dextrosa.....	1.000 "
NaCl.....	5.000 "
Citrato de amonio férrico.....	0.500 "
Tiosulfato de sodio.....	0.500 "
Agar.....	15.000 "
Rojo de fenol.....	0.025 "
Agua destilada.....	1000 ml.

Se esteriliza en autoclave a 121<sup>0</sup>C y 15 psi, durante 15 minutos. El pH final es de 7.4.

## MEDIO SIM

Peptona (Trypticase).....	20.0 g.
Peptona (Thiotone).....	6.1 "
Sulfato de hierro y amonio.....	0.2 "
Tiosulfato de sodio.....	0.2 "
Agar.....	3.5 "
Agua destilada.....	1000 ml.

Se esteriliza en autoclave a 121<sup>0</sup>C y 15 psi, durante 15 minutos. El pH final es de 7.3.

## GELOSA SACAROSA-UREA-ROJO DE FENOL

Peptona (Tripticasa).....	10.000 g.
Sacarosa.....	10.000 "
Urea.....	10.000 "
Cloruro de sodio.....	5.000 "
Agar.....	15.000 "
Rojo de fenol.....	0.018 "
Agua destilada.....	1000 ml.

Esterilizar aparte por filtración en Millipore la urea, en un volumen conocido de agua. Los demás componentes disolverlos en un volumen de agua que complete los 1000 ml. Esterilizar en autoclave a  $121^{\circ}\text{C}$  y 15 psi, durante 15 minutos. Dejar enfriar y -- adicionar la solución estéril de urea.

## CALDO ROJO DE METILO-VOGUES PROSKAUER

Peptona (Polipeptona).....	7.0 g.
Dextrosa.....	5.0 "
Fosfato de potasio.....	5.0 "
Agua destilada c.b.p.....	1000 ml.

## USOS:

1) Reacción de Vogues-Proskauer. -- Se preparan 960 ml. de una solución acuosa de KOH al 10 %, y se le agrega una solución de 1-g. de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  disuelto en 40 ml. de solución concentrada -- de  $\text{NH}_4\text{OH}$ . A 5 ml. del cultivo se le agregan 5 ml. de este álca-

li, que contiene sulfato cúprico y amonio. La aparición de un color rojo de eosina en 20 minutos, indica la presencia de acetilmetil-carbinol.

2) Reacción del Rojo de Metilo.- A 5 ml. de un cultivo microbiano de 5 días, se le agregan 5 gotas de la solución del indicador de rojo de metilo. En una reacción positiva se debe tener un color-rojo bien definido, en tanto que el amarillo constituye la negativa.

La solución del indicador de rojo de metilo se prepara de la forma siguiente: Disolver 0.1 g. de rojo de metilo en 300 ml. de alcohol al 95 % y diluir a 500 ml. con agua destilada.

#### METODO PARA LA TINCIÓN DE GRAM (17)

- 1) Fijar el frotis al calor.
- 2) Cubrir el frotis con cristal violeta durante un minuto.
- 3) Lavar con agua.
- 4) Cubrir con Lugol durante 1 minuto. La solución de Lugol se prepara disolviendo 1 g. de iodo y 2 g. de ioduro de potasio en 300 ml. de agua destilada.
- 5) Lavar con agua.
- 6) Decolorar por 30 segundos con una solución de acetona (30 ml.) y alcohol (70 ml.).
- 7) Lavar con agua.

8) Cubrir durante 10 a 20 segundos con safranina (solución al 2.5 % en alcohol del 95 %).

9) Lavar con agua y dejar secar.



## RESULTADOS

Se identificaron a los microorganismos que se desarrollaron en medios de cultivo, cuya fuente de carbono fueron los productos de oxidación del polietileno. De los microorganismos aislados se escogieron tres cepas: B-12, H-1 y C-1; con estas se trabajó tratando de determinar las condiciones óptimas de temperatura y concentración de productos de oxidación del polietileno, para su desarrollo. La determinación de las condiciones óptimas de cultivo se hizo con el fin de obtener la mayor cantidad de biomasa posible, a partir de cada una de las cepas seleccionadas.

Para determinar la temperatura óptima para el desarrollo de los microorganismos, se trabajó solamente, por razones de laboratorio, con dos temperaturas 30 y 37°C.

Para determinar la concentración óptima de los productos de oxidación del polietileno, se hizo primero la determinación de la concentración de carbono total de las soluciones de productos de oxidación del polietileno, obtenidas por los distintos métodos. Después se procedió a agregar distintas cantidades de estas soluciones a los medios de cultivo, obteniéndose así medios de cultivo con diversas concentraciones de carbono.

Estos medios se inocularon con las cepas escogidas y se desarrollaron curvas de crecimiento de cada una de ellas. Al cabo de un período de tiempo se obtuvo la biomasa de cada uno de los cultivos, determinando a que concentración de productos de oxidación del polietileno, se obtenía la mayor cantidad de ésta.

La biomasa de cada una de las cepas, obtenida en condiciones óptimas, se comparó con la obtenida en el medio M9-G, el cual tiene como fuente de carbono a la glucosa.

A la biomasa obtenida de cada una de las cepas, se le determinó la cantidad de nitrógeno que poseía. Conociendo la cantidad de nitrógeno que poseían las distintas muestras se determinó la cantidad de proteína de las mismas, utilizando el factor de 6.25, que nos relaciona la proteína con la cantidad de nitrógeno ( $\text{proteína/N} = 6.25$ ).

Se hicieron también medios mixtos, con glucosa y productos de oxidación del polietileno, con el fin de obtener un mejor desarrollo de los microorganismos.

#### AISLAMIENTO E IDENTIFICACION DE LOS MICROORGANISMOS:

A partir de las distintas fuentes de origen se aislaron las siguientes cepas:

1) De compostas: B-1, B-2, B-3, B-4, B-5 y B-6.

2) De lodos marinos: B-9 y B-12.

3) Del aire: H-1, H-2, H-3 y H-4.

4) De cepas conocidas: Pseudomonas effusa y el Actinomiceto.

#### BACTERIAS:

La identificación de las cepas bacterianas se llevó a cabo - mediante tinciones de Gram, observaciones microscópicas e inoculaciones para pruebas bioquímicas, en los siguientes medios de cultivo: Agar de Hierro de Kligler, Medio SIM, Agar Sacarosa--Urea-Rojo de Fenol y Caldo Rojo de Metilo-Vogues Proskauer.

Los resultados de estas pruebas bioquímicas y de observación (Tabla # 1), fueron consultados en la literatura (13,15,16,17) y se concluyó que las cepas aisladas correspondían a los siguientes microorganismos:

Cepa B-1) Escherichia freundii.

" B-2) Enterobacter sp.

" B-3) Salmonella sp.

" B-4) Proteus morganii.

" B-5) Proteus vulgaris.

" B-6) Grupo Providencia.

" B-9) Escherichia coli.

" B-12) Corynebacterium sp.

#### HONGOS:

TABLA # 1

	GRAM	MOVI- LIDAD	FERMENTACION DE			PRODUCCION DE		UREASA	VP	RM
			GLUCOSA	SACAROSA	LACTOSA	INDOL	H <sub>2</sub> S			
B-1	-	+	A-G	<u>+</u>	+	-	-	-	-	+
B-2	-	+	A-G	+	+	-	-	-	+	-
B-3	-	+	A-G	-	-	-	+	-	-	+
B-4	-	+	A-(G)	-	-	+	-	+	-	+
B-5	-	+	A-(G)	+	-	+	+	+	-	+
B-6	-	+	A-(G)	<u>+</u>	-	+	-	<u>+</u>	-	+
B-9	-	+	A-G	+	+	+	-	-	-	+
B-12	+	-	A	-	-	-	-	-	-	-

A-Producción de ácido.

G-Producción de gas.

(G)-Producción tardía de gas.

VP-Reacción de Voges-Proskauer.

RM-Reacción del Rojo de Metilo

Los hongos aislados se identificaron por la observación microscópica de la morfología de sus estructuras reproductivas, y con la ayuda de claves. Las distintas cepas aisladas corresponden a los siguientes microorganismos:

H-1) Penicillium sp.

H-2) Cladosporium sp.

H-3) Aspergillus sp.

H-4) Epicoccum sp.

Se estudió la morfología de estos hongos (18, 19, 20, 21) y se utilizó para su identificación la siguiente clave (18):

A<sub>2</sub>-Micelio no cenocítico, septos frecuentes; normalmente presenta conidias, con excepción de pocos géneros (HONGOS IMPERFECTOS).

B<sub>1</sub>-Conidias y conidióforos no producidos en picnidios o ascórvulos (MONILIALES).

C<sub>2</sub>-Conidia no espiralada.

D<sub>1</sub>-Conidias y conidióforos hialinos o brillantemente coloreados; los conidióforos no se encuentran unidos en esporodoquia o sinemata (Moniliaceae).

E<sub>1</sub>-Conidias formadas por una célula; globosa o cilíndrica pequeña.

F<sub>2</sub>-Conidióforos presentes, algunas veces pequeños.

G<sub>2</sub>-El conidióforo y sus ramas muy distintos de las conidias.

H<sub>2</sub>-Conidióforos generalmente ramificados, simples - en algunos casos; si se presentan filídios están en grupos.

I<sub>2</sub>-Conidia catenada.

J<sub>2</sub>-Conidia basipetal sobre los filídios, tiene su origen en el ápice engrosado del conidióforo.....Aspergillus (H-3).

J<sub>3</sub>-Conidia basipetal; el ápice de los conidióforos no se encuentra engrosado.

K<sub>1</sub>-Conidia soportando una porción compacta del conidióforo; forma similar a una brocha.....Penicillium (H-1).

D<sub>2</sub>-Conidióforos y/o conidias con un pigmento oscuro; los conidióforos no se encuentran unidos en esporodoquia o sinemata (Dematiaceae).

E<sub>2</sub>-Conidia típica de dos células (presentan frecuentemente esporas de una o tres células).

F<sub>1</sub>-Conidias en cadenas acropétalas.

G<sub>3</sub>-Conidióforos solos o agrupados; conidia de color oscuro, variable en tamaño y forma, septos no oscuros.....Cladosporium (H-2).

D<sub>3</sub>-Conidióforos unidos en esporodoquia o sinemata.

E<sub>1</sub>-Conidias producidas en la esporodoquia (Tubercularia-  
ceae).

F<sub>3</sub>-Conidias formadas por más de dos células, hialina u-  
oscura.

G<sub>3</sub>-Conidia oscura.

H<sub>3</sub>-Conidia no ramificada ni lobulada.

I<sub>1</sub>-Conidia globosa con septos oblicuos.....  
.....Epicoccum (H-4).

#### ACTINOMICETOS:

Se aisló únicamente un Actinomiceto, al cual se le denominó co-  
mo cepa C-1. No se logró la identificación de este organismo.

#### PRODUCTOS DE LA OXIDACION DEL POLIETILENO:

Por falta de reactivos no se pudo determinar cuales son los --  
compuestos que resultan de la oxidación del polietileno, pero se  
encuentra reportado en la literatura a mi disposición, que estos  
compuestos son ácidos dicarboxílicos saturados, de cadena lineal  
conteniendo de 6 a 12 átomos de carbono (10). Entre los ácidos -  
dicarboxílicos obtenidos se tiene a los siguientes: Adípico, Pimé-  
lico, Subérico, Azeálico y Sebásico.

Las reacciones de oxidación del polietileno que se obtuvieron-  
por el método usado en este trabajo, no han sido determinadas.

En este trabajo se trató de desarrollar otro método, para la oxidación del polietileno, que fuera mas eficiente. Consistió en colocar la muestra de polietileno en una mezcla oxidante formada por  $H_2SO_4$ ,  $HNO_3$  y agua (1:6:1), a la que se le agregaron unos cristales de  $CuSO_4$  como catalizador. Se reflujo y al cabo de 6 horas se obtuvo una degradación parcial del polietileno, logrando disolver parcialmente con potasa la pasta oleosa que se obtuvo en el fondo del matraz de reflujo después de eliminar por destilación la mezcla oxidante. Por falta de tiempo no se siguió experimentando con este método, pero considero que alrededor de 10 horas la degradación del polietileno será total; esto nos reduce el tiempo de reflujo a la mitad mas o menos, lo que implica un ahorro de energía considerable.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION DE CARBONO EN LAS SOLUCIONES DE PRODUCTOS DE OXIDACION DEL POLIETILENO, OBTENIDAS POR LOS DISTINTOS METODOS:

La determinación de la concentración de carbono se hizo en un Analizador de Carbono Orgánico con un Analizador de Infrarrojo y un Graficador integrados.

Se hizo una curva patrón inyectando al aparato 40  $\mu$ l. de soluciones patrón conteniendo 10, 25, 50, 100, 125 y 150 ppm de carbono; se obtuvieron unos picos en el graficador, que se encuentran



representados en la Gráfica # 1. Se observa en dicha gráfica - que existe una variación muy pequeña en los picos obtenidos, - al inyectar al aparato varias veces la misma muestra de cada una de las soluciones patrón. El aparato puede ser considerado como de alta precisión.

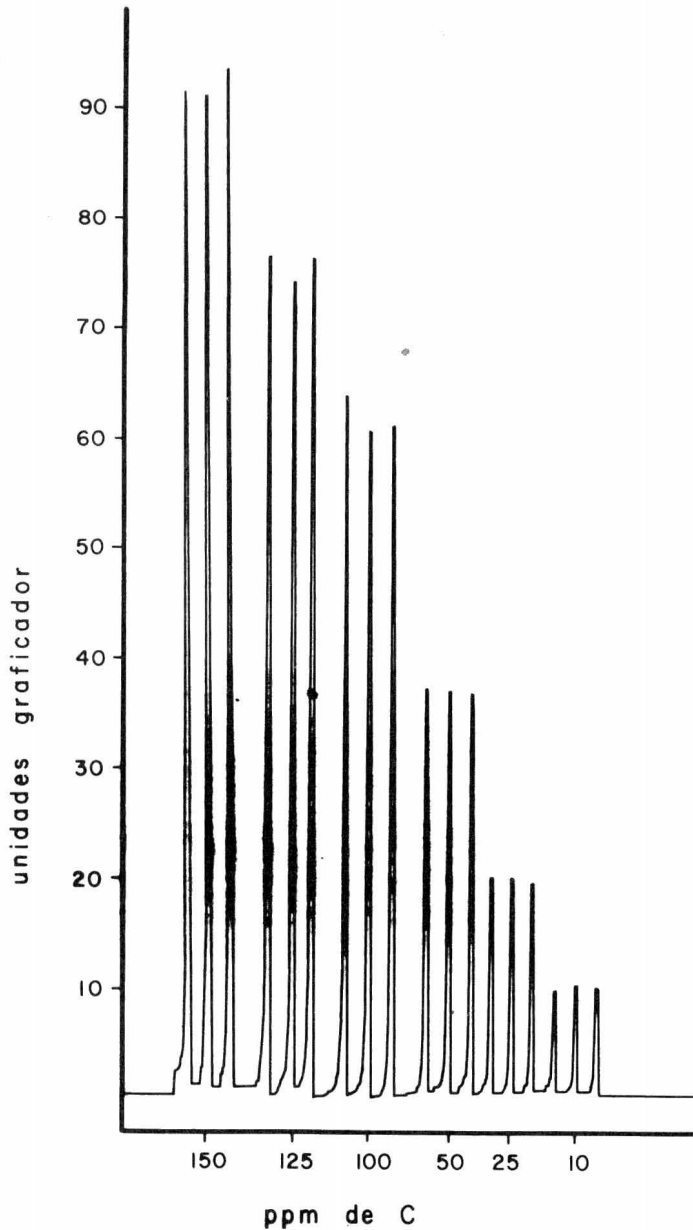
A partir de los valores obtenidos en la Gráfica # 1, se trazó la curva patrón (Gráfica # 2), que nos relaciona las unidades del graficador con las ppm de carbono existentes en las soluciones patrón.

Se procedió a analizar las soluciones de productos de oxidación del polietileno. A estas se les diluyó 1:100 con agua destilada libre de  $\text{CO}_2$  y se tomaron distintas alícuotas (10, 20 y 40  $\mu\text{l}$ .) que se inyectaron en el aparato procurando que los valores obtenidos cayeran dentro de la curva patrón, para evitar así errores por extrapolación. Las alícuotas tomadas en cada caso se indican en la Gráfica # 3, en la que se observan los picos que se obtuvieron al inyectar las alícuotas de las soluciones de productos de oxidación del polietileno al aparato.

Los valores obtenidos de la concentración de carbono en las soluciones de productos de oxidación del polietileno, referidos a la curva patrón, son, según el método de obtención, los siguientes:

**Método # 1.** - Por este método se obtuvo un rango de valores de 27.0 a 31.2 g. de C/l.

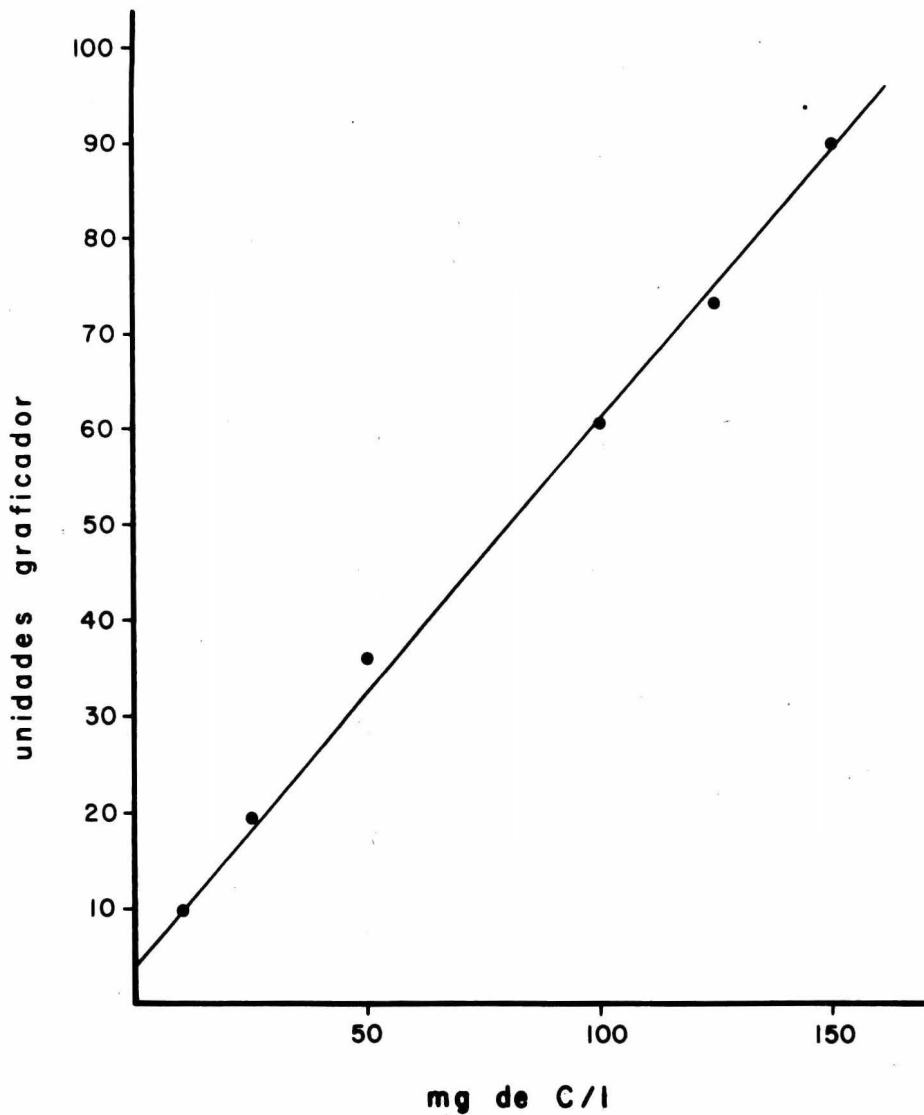
# GRAFICA I



Gráfica # 1.-Relación entre unidades del graficador y ppm. de carbono. La inyección de la muestra al aparato fué de 40  $\mu$ l.

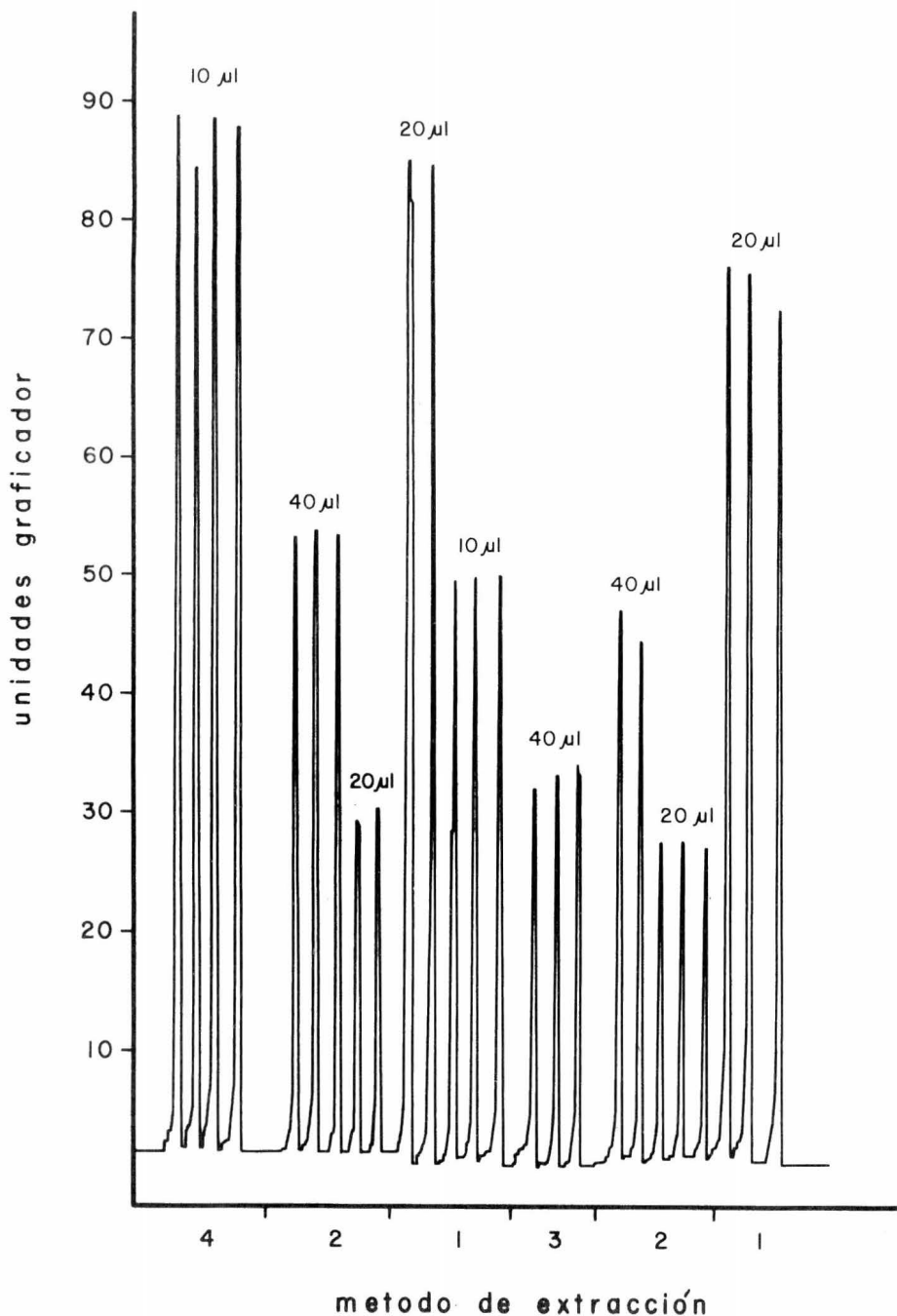
Se utilizó el canal de Carbono Total del Analizador de Carbono (Beckman modelo 915), con temperatura constante de 950 °C, - O<sub>2</sub> como acarreador con un flujo constante de 145 cc./min. El Analizador de Infrarrojo (Beckman modelo 865), se utilizó en - rango de sensibilidad # 2. El Graficador (Beckman 10") tenía - una velocidad del papel de 0.1 pulgadas/min.

## GRAFICA 2



Gráfica # 2.-Curva Patrón de Carbono, desarrollada con los valores obtenidos en la Gráfica # 1.

### GRAFICA 3



Gráfica # 3.-Unidades del graficador, que dan las distintas soluciones de productos de oxidación del polietileno, según el método de obtención. Las alícuotas de cada una de las soluciones inyectadas al aparato se indican sobre los picos.

Método # 2.-En este método se obtuvo un rango de valores de -- 7.8 a 8.2 g. de C/l.

Método # 3.-En este caso se obtuvo un rango de 5.1 a 5.3 g. de C/l.

Método # 4.-Por este método se obtuvo solamente un valor para todas las muestras inyectadas al aparato.El valor obtenido fué de 57.2 g. de C/l.

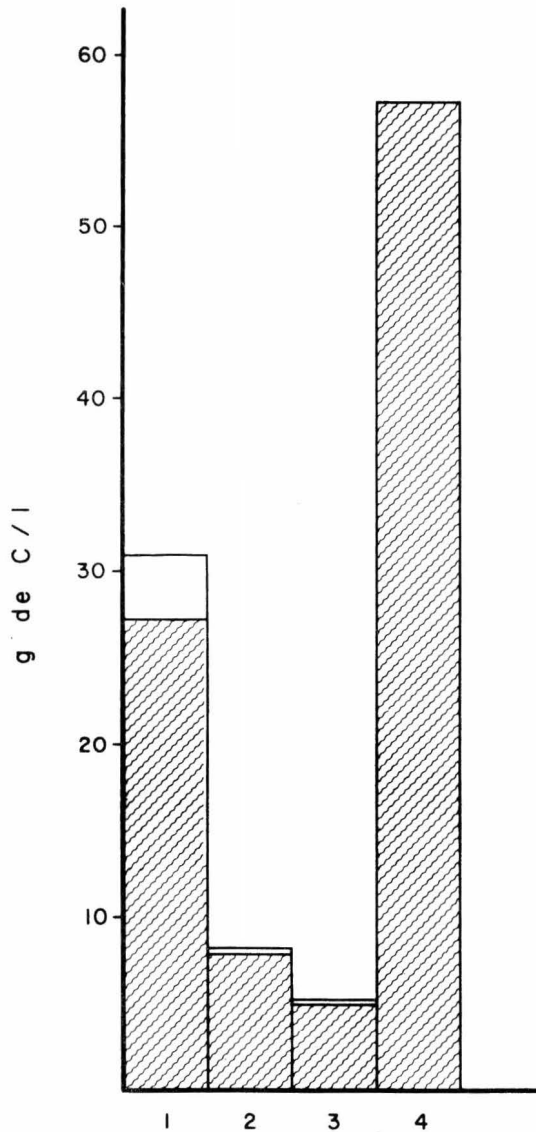
En la Gráfica # 4 se puede observar claramente que la concentración de carbono obtenida por el método # 4, es considerablemente mayor que la obtenida por cualquiera de los otros métodos.Considero que el Método # 4 es el mas conveniente para la obtención de los productos de oxidación del polietileno, pues - ademas de obtenerse una alta concentración, no se trabaja con - solventes y se recupera por destilación parte del ácido nítrico, el cual puede ser reusado para la oxidación de otras muestras de polietileno.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE PRODUCTOS DE OXIDACION DEL POLIETILENO, PARA EL DESARROLLO DE LAS CEPAS B-12, H-1 Y C-1.

CEPA B-12:

En un principio, cuando se aisló la cepa B-12, no se conocía la

GRAFICA 4



**metodo de extracción**

Gráfica # 4.-Concentración de Carbono obtenida en las soluciones de productos de oxidación del polietileno, según los distintos métodos de extracción. La determinación de la concentración de carbono de las soluciones, se hizo en el Analizador de Carbono Total (Beckman modelo 915).

Los valores obtenidos en el analizador fueron referidos a la Curva Patrón de Carbono (Gráfica # 2), en donde se obtuvieron los valores expresados en esta gráfica.

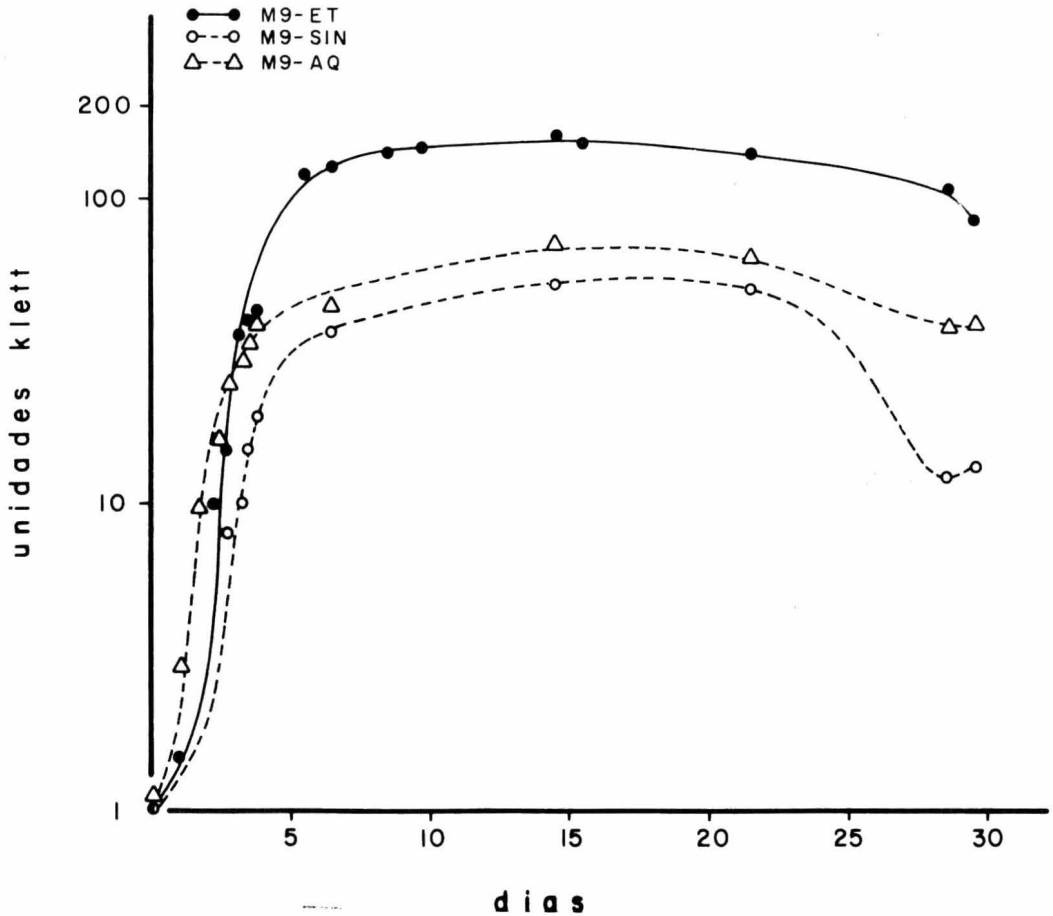
concentración de productos de oxidación del polietileno, que debían llevar los medios de cultivo. Se prepararon entonces dos medios de cultivo con dos concentraciones extremas de productos de oxidación del polietileno; las concentraciones para cada uno de los medios, M9-ET, M9-AQ y M9-SIN, fueron del 5 y del 50 % (v/v).

Se procedió a hacer las curvas de crecimiento en los distintos medios de cultivo, obteniéndose las curvas que se observan en la Gráfica # 5, con una concentración de los productos de oxidación del polietileno del 5 % (v/v). En la Gráfica # 6 se observan las curvas de crecimiento en las cuales los medios de cultivo tienen una concentración del 50 % (v/v) de los productos de oxidación del polietileno.

En la Gráfica # 5 se observa que las curvas prácticamente no presentan fase de latencia, en cambio presentan una fase logarítmica o exponencial de crecimiento, bastante prolongada de 6 a 7 días. En cambio en la Gráfica # 6 se tiene una inhibición del crecimiento bacteriano sobre todo para los medios M9-AQ y M9-SIN; para el medio M9-ET se observa que hay un pequeño desarrollo, pero desde luego sin compararse con el obtenido a una concentración menor de productos de oxidación del polietileno.

Como control se sembró la cepa, B-12, en el medio M9 sin fuente de carbono, no obteniéndose crecimiento alguno.

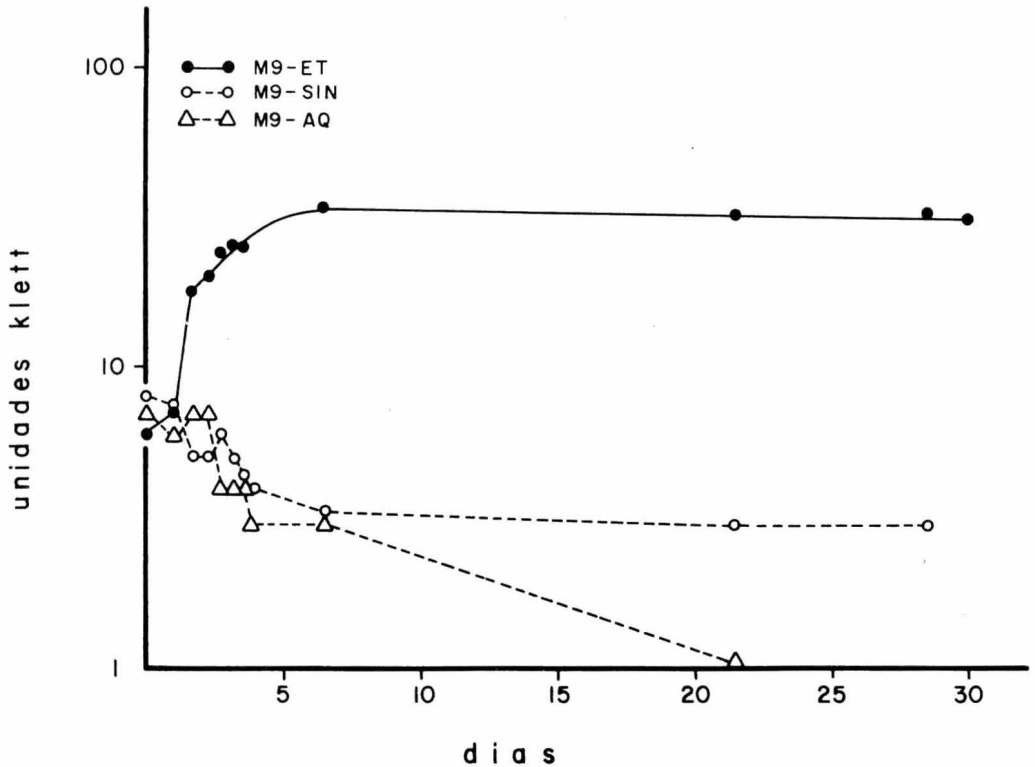
## GRAFICA 5



Gráfica # 5.-Curvas de Crecimiento de la cepa B-12 en los medios de cultivo M9-ET, M9-AQ y M9-SIN, con concentraciones del 5 % v/v- de las soluciones de productos de oxidación del polietileno. Se incubaron todos los cultivos a 37 °C sin agitación. Las lecturas de turbidez se hicieron en en nefelómetro Klett -Summeron con filtro rojo # 62.



## GRAFICA 6



Gráfica # 6.-Curvas de Crecimiento de la cepa B-12 en los medios de cultivo M9-ET, M9-AQ y M9-SIN, con concentraciones del 50 % v/v de las soluciones de productos de oxidación del polietileno. Se incubaron todos los cultivos a 37 °C sin agitación. Las lecturas de turbidez se hicieron en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62.

Posteriormente se prepararon los diferentes medios de cultivo con distintas concentraciones de los productos de oxidación -- del polietileno, obteniéndose las siguientes concentraciones de carbono en cada uno de los medios:

Concentración de productos- de oxidación del polietile- no.	Concentración de carbono- (g./l.).
---	---------------------------------------

M9-ET:

3 % v/v	0.81
5 % "	1.35
7 % "	1.89
9 % "	2.43
10 % "	2.70
20 % "	5.40
30 % "	8.10

M9-AQ:

3 % "	0.234
5 % "	0.390
9 % "	0.546
10 % "	0.780
30 % "	2.340
50 % "	3.900

Concentración de productos-  
de oxidación del polietile-  
no.

Concentración de carbono  
(g./l.).

M9--SIN:

3 % v/v	0.156
5 % "	0.260
7 % "	0.364
10 % "	0.520
20 % "	1.040
30 % "	1.560
50 % "	2.600

En cada uno de estos medios se desarrolló la cepa B-12, lo que dió una serie de curvas de crecimiento que se observan en las Gráficas números 7, 8, 9, 10, 11, 12 y 13.

La Gráfica # 7 corresponde al desarrollo del microorganismo - en el medio M9-ET a una concentración de 5 % v/v, como se puede observar la fase de latencia casi no existe, y en cambio la fase logarítmica es aproximadamente de 7 días.

La Gráfica # 8 presenta el desarrollo del microorganismo en - el medio de cultivo M9-ET a una concentración de 3 % v/v, y la curva es similar a la obtenida en el caso anterior.

En la Gráfica # 9 se observa que a las concentraciones de 7,9, 10,20 y 30 % v/v en el medio M9-ET, se inhibe casi totalmente el desarrollo de la cepa B-12.

La Gráfica # 10 nos muestra que en el medio M9-AQ con una concentración de los productos de oxidación del polietileno del 30 % v/v, se obtiene un gran desarrollo del microorganismo. En esta curva de crecimiento se observa una fase de latencia muy larga, aproximadamente de 11 días, después una fase de crecimiento que duró alrededor de 4 días, para pasar posteriormente a la fase estacionaria alcanzado como ya se dijo un gran desarrollo.

Tenemos que a excepción del medio M9-AQ a una concentración del 50 % v/v de productos de oxidación del polietileno, en el cual se observa una curva de crecimiento que representa un desarrollo pobre del microorganismo, en los demás medios M9-AQ, se observa un buen desarrollo del microorganismo (Gráfica # 11).

En la Gráfica # 12 tenemos que creció la cepa en el medio M9-SIN, con concentraciones del 3,5 y 7 % v/v, para las concentraciones de 5 y 7 % se observa una fase de latencia de 5 días a partir de la cual se tiene una fase de crecimiento aproximadamente de 6 días. La curva de crecimiento obtenida del desarrollo del microorganismo en el medio con concentración del 3 %, es muy irregular, posiblemente sea por fallas en las lecturas.

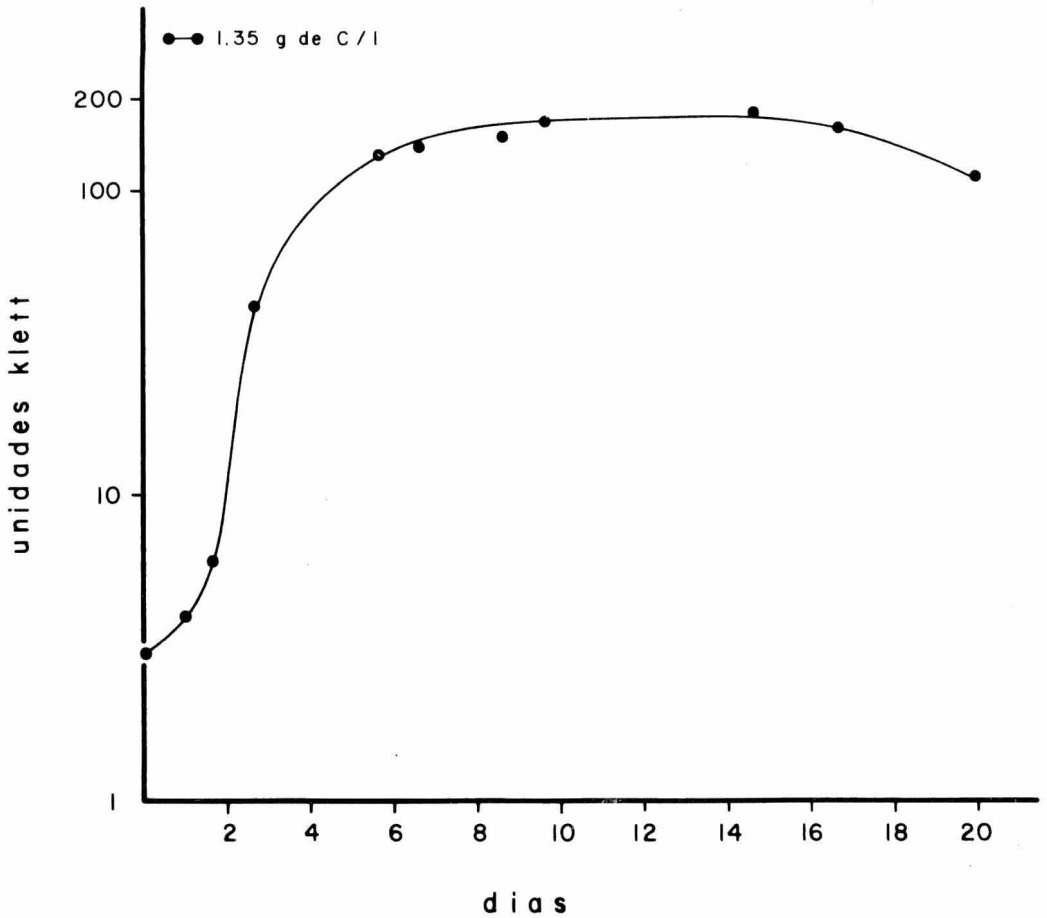
La Gráfica # 13 nos muestra el crecimiento de la cepa B-12 en el medio M9-SIN, con concentraciones del 10,20 y 30 % v/v. Se ---

observa claramente que a estas concentraciones el desarrollo del microorganismo se vió inhibido, sobre todo a la concentración del 30 %. Esta inhibición en el crecimiento se debe probablemente a la gran cantidad de nitrato de potasio que posee la solución de productos de oxidación del polietileno que se obtuvo en el Método # 3 (recuerdese que por este método no se eliminó el  $\text{HNO}_3$  de la solución de productos de oxidación del polietileno).

Teniendo en cuenta que el mayor crecimiento de la cepa B-12 se obtenía en el medio M9-ET al 5 % v/v, lo que corresponde a una concentración de carbono de 1.35 g. de C/l., se procedió a desarrollar una curva de crecimiento en la cual se obtuvo a intervalos conocidos, la concentración de microorganismos en el medio de cultivo. Se observa en la Gráfica # 14 que las pendientes de las curvas de concentración de microorganismos y de turbiedad, son similares; alcanzándose un valor máximo en ambas a los cuatro días de incubación. La fase de muerte comienza alrededor de los seis días, pero se hace realmente notoria al onceavo día del cultivo.

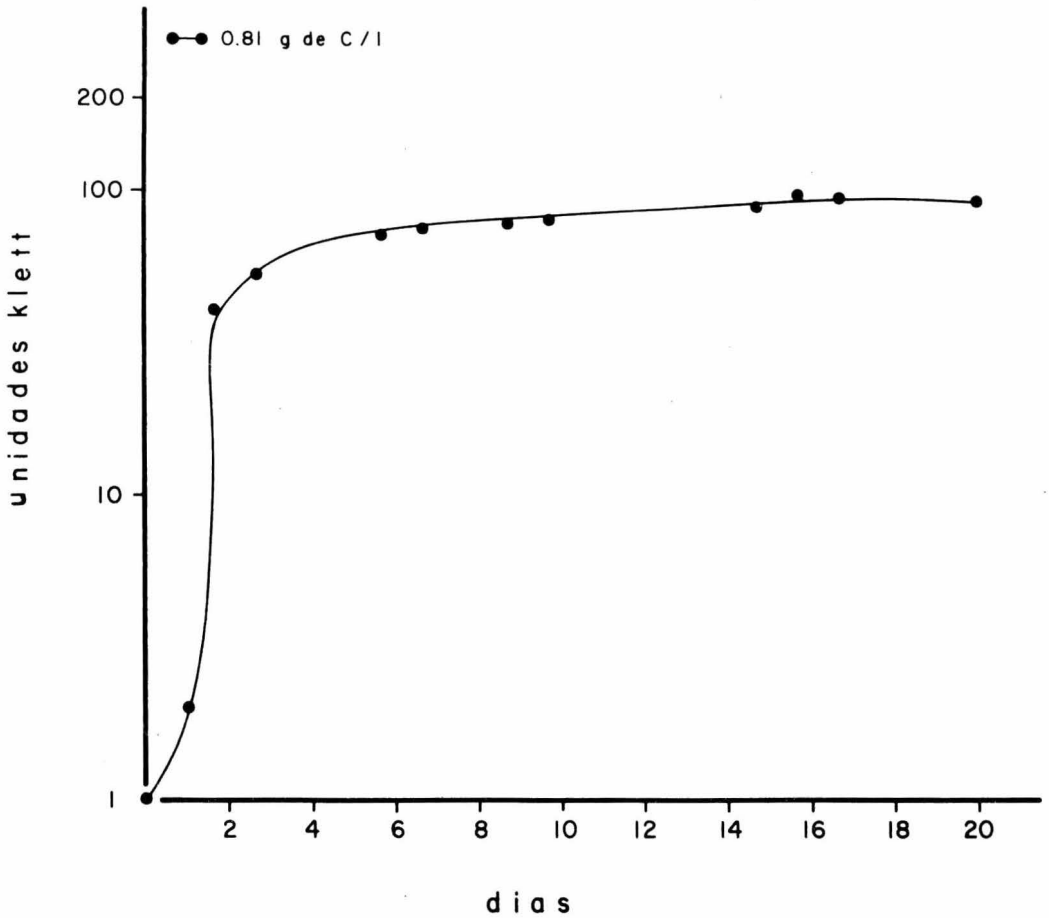
Al obtenerse gran concentración de microorganismos en el medio M9-ET 5 % v/v, se pensó en hacer una curva de crecimiento en el medio M9-G, para tener un punto de referencia, y comprobar si se obtenía un buen rendimiento de biomasa en dicho medio.

## GRAFICA 7



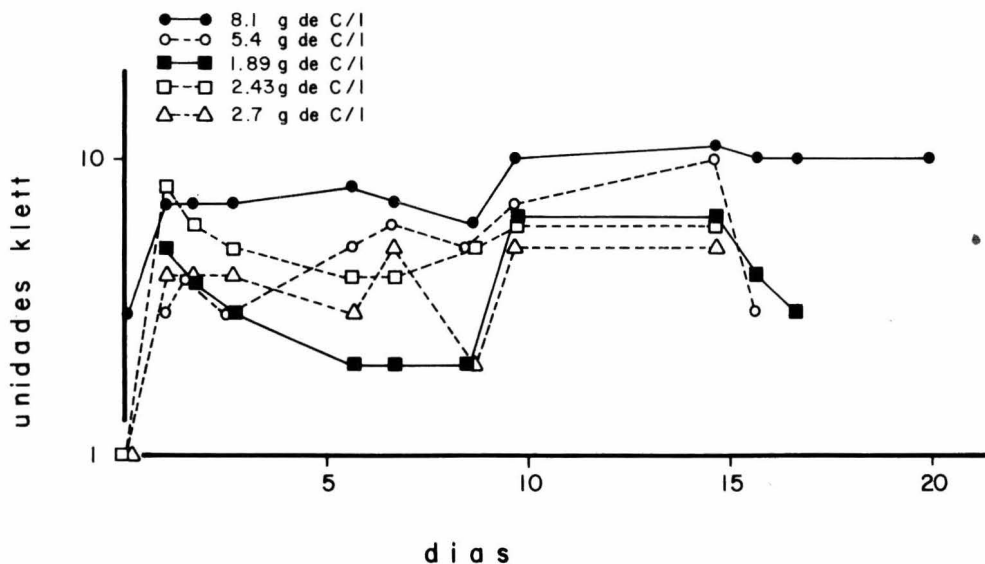
Gráfica # 7.-Curva de Crecimiento de la cepa B-12 en el medio de cultivo M9-ET con una concentración del 5 % v/v de productos de oxidación del polietileno, lo que corresponde a una concentración de carbono en el medio de 1.35 g. de C/l. Se incubó en cultivo estacionario a 37°C. Las lecturas de turbiedad se efectuaron en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 68.

## GRAFICA 8



Gráfica # 8.-Curva de Crecimiento de la cepa B-12 en el medio de cultivo M9-ET con una concentración del 3 % v/v de productos de oxidación del polietileno, lo que corresponde a una concentración de carbono en el medio de 0.81 g. de C/l. Se incubó en cultivo estacionario a 37°C. Las lecturas de turbiedad se efectuaron en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62.

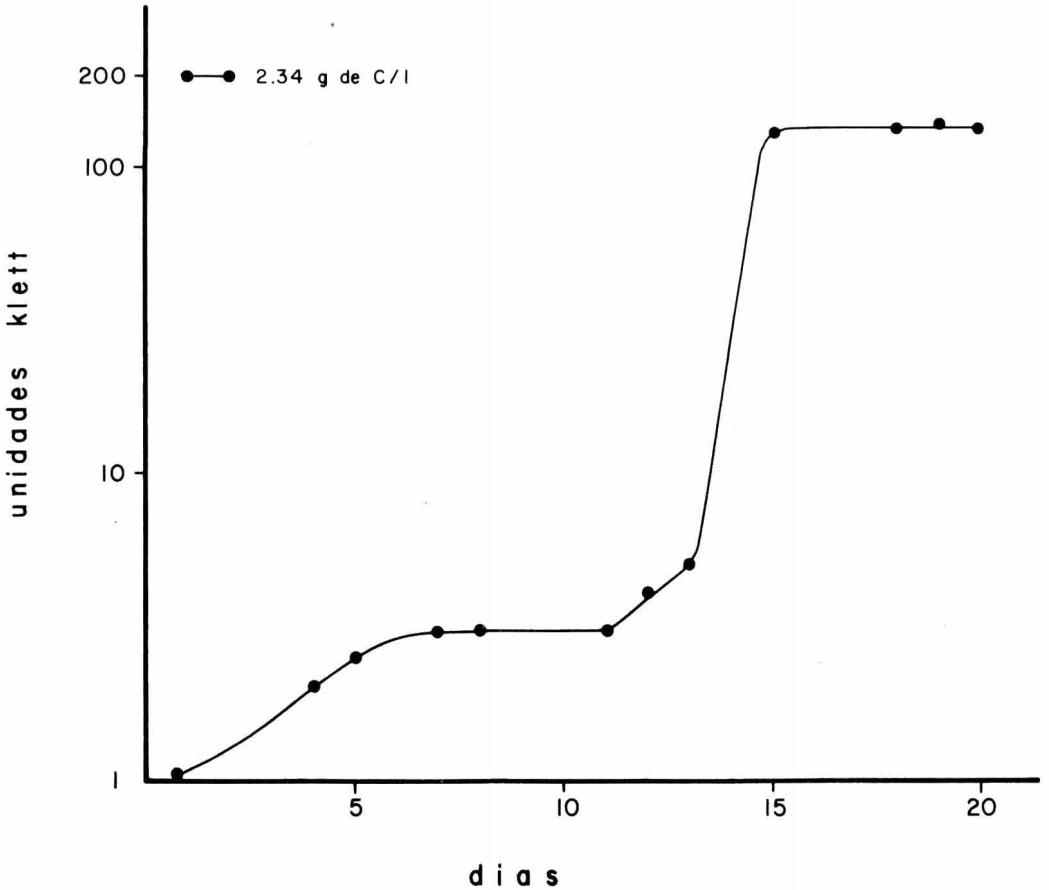
## GRAFICA 9



Gráfica # 9.—Curvas de Crecimiento de la Cepa B-12 en el medio M9-BT con concentraciones de productos de oxidación del polietileno del 7,9,10,20 y 30 % v/v. Estas concentraciones de productos de oxidación del polietileno, corresponden a una concentración de carbono en el medio de: 1.89, 2.43, 2.70, 5.40 y 8.10 g. de C/l. respectivamente. La incubación fué a 37°C en cultivo estacionario. Las lecturas de turbiedad se efectuaron en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62.

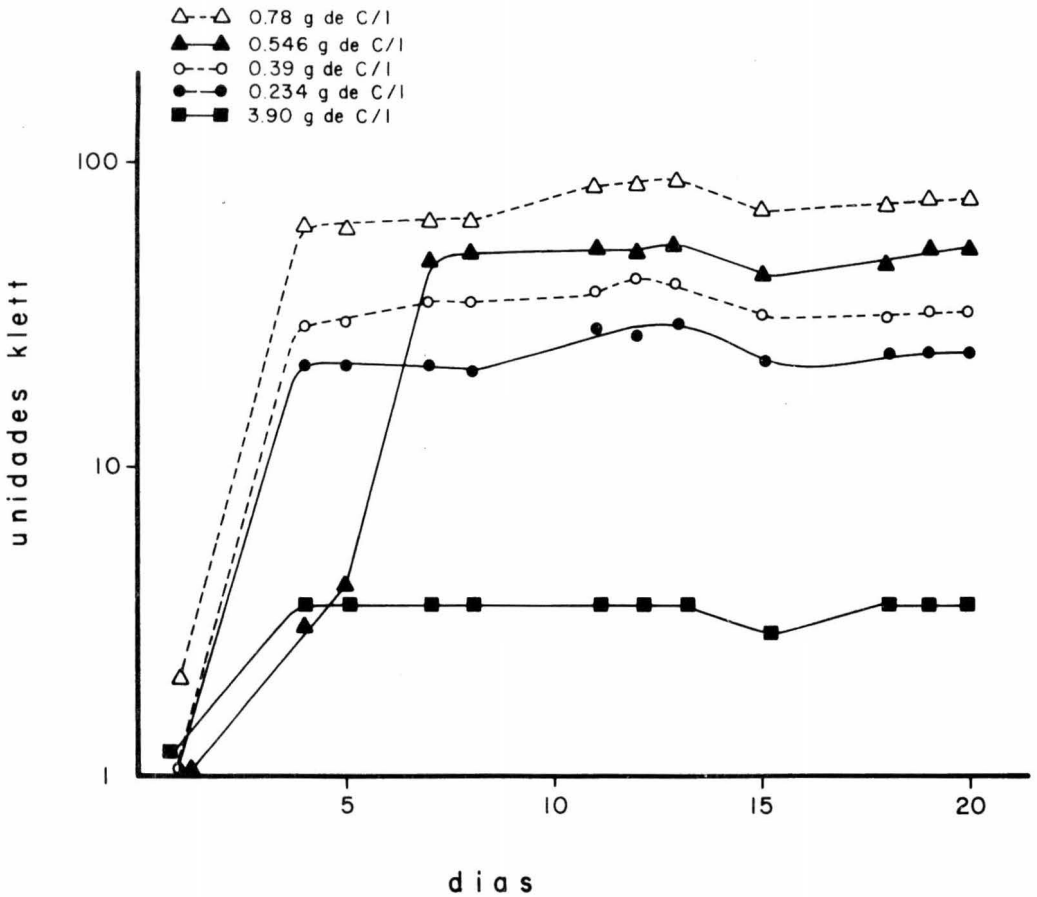


# GRAFICA 10



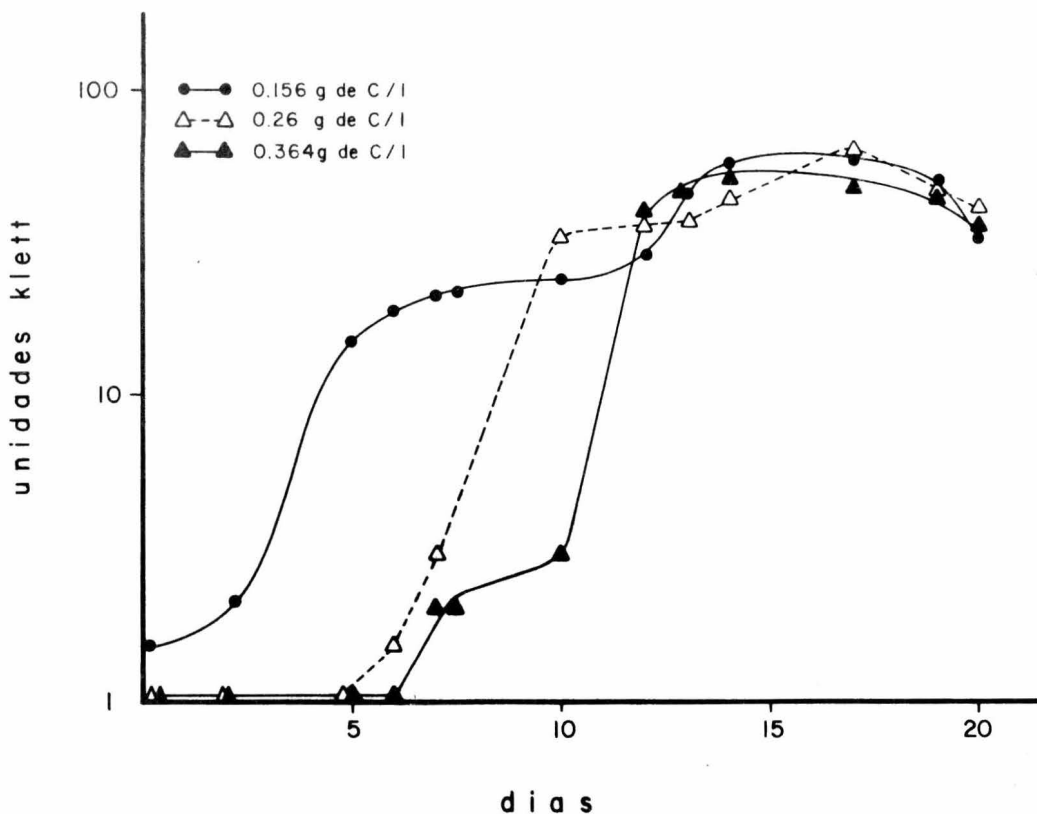
Gráfica # 10.-Curva de Crecimiento de la cepa B-1, en el medio de cultivo M9-AQ con una concentración de productos de oxidación del polietileno del 30 % v/v, lo que corresponde a una concentración de carbono en el medio de 2.34 g de C/l. Se incubó a 37 °C - en cultivo estacionario. Las lecturas de turbidez se efectuaron - en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62.

## GRAFICA II



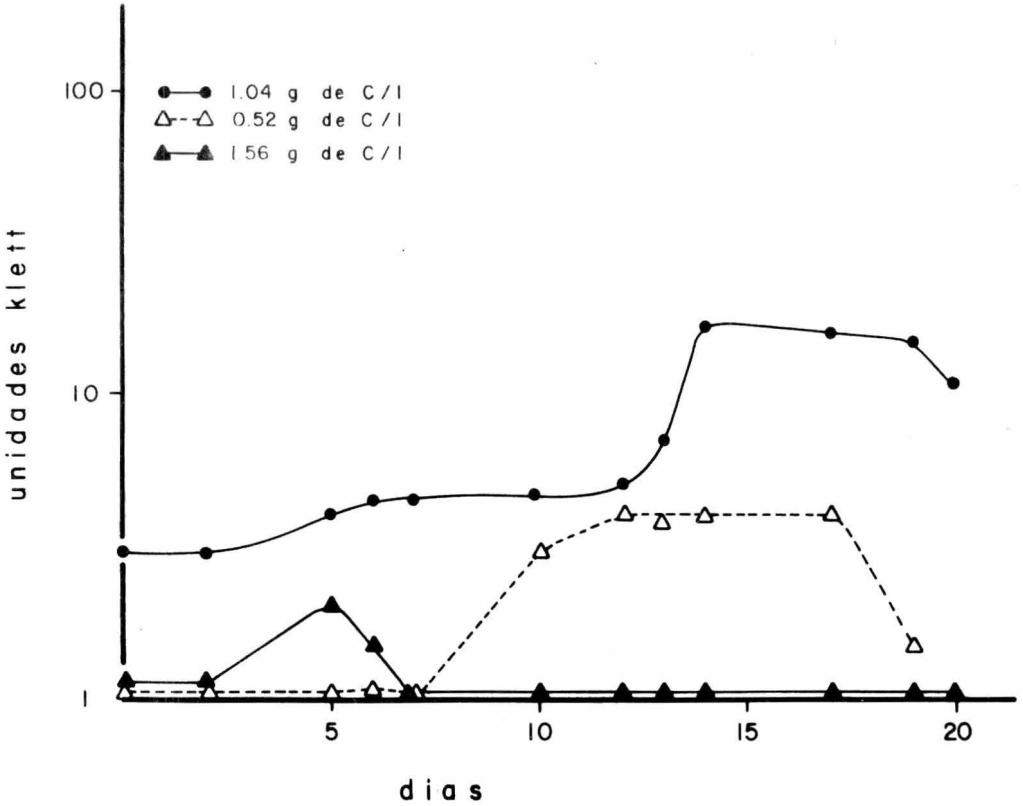
Gráfica # 11.-Curvas de Crecimiento de la cepa B-12 en el medio de cultivo M<sup>9</sup>-A<sub>0</sub> con concentraciones de productos de oxidación del polietileno del 3,5,7,10 y 50 % v/v ; lo que corresponde a concentraciones de carbono en el medio de 0.234,0.390,0.546,0.78 y 3.90 g. de C/l. respectivamente. Se incubó a 37 °C en cultivo estacionario. Las lecturas de turbidez se efectuaron en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62.

GRAFICA 12



Gráfica # 12.-Curvas de Crecimiento de la cepa B-12 en el medio de cultivo M<sup>9</sup>-SIN con concentraciones de productos de oxidación del polietileno del 3,5 y 7 % v/v, correspondiendo a una concentración de carbono en el medio de 0.156, 0.260 y 0.364 g. de C/l. respectivamente. Se incubó a 37 °C en cultivo estacionario. Las lecturas de turbidez se efectuaron en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62.

### GRAFICA 13



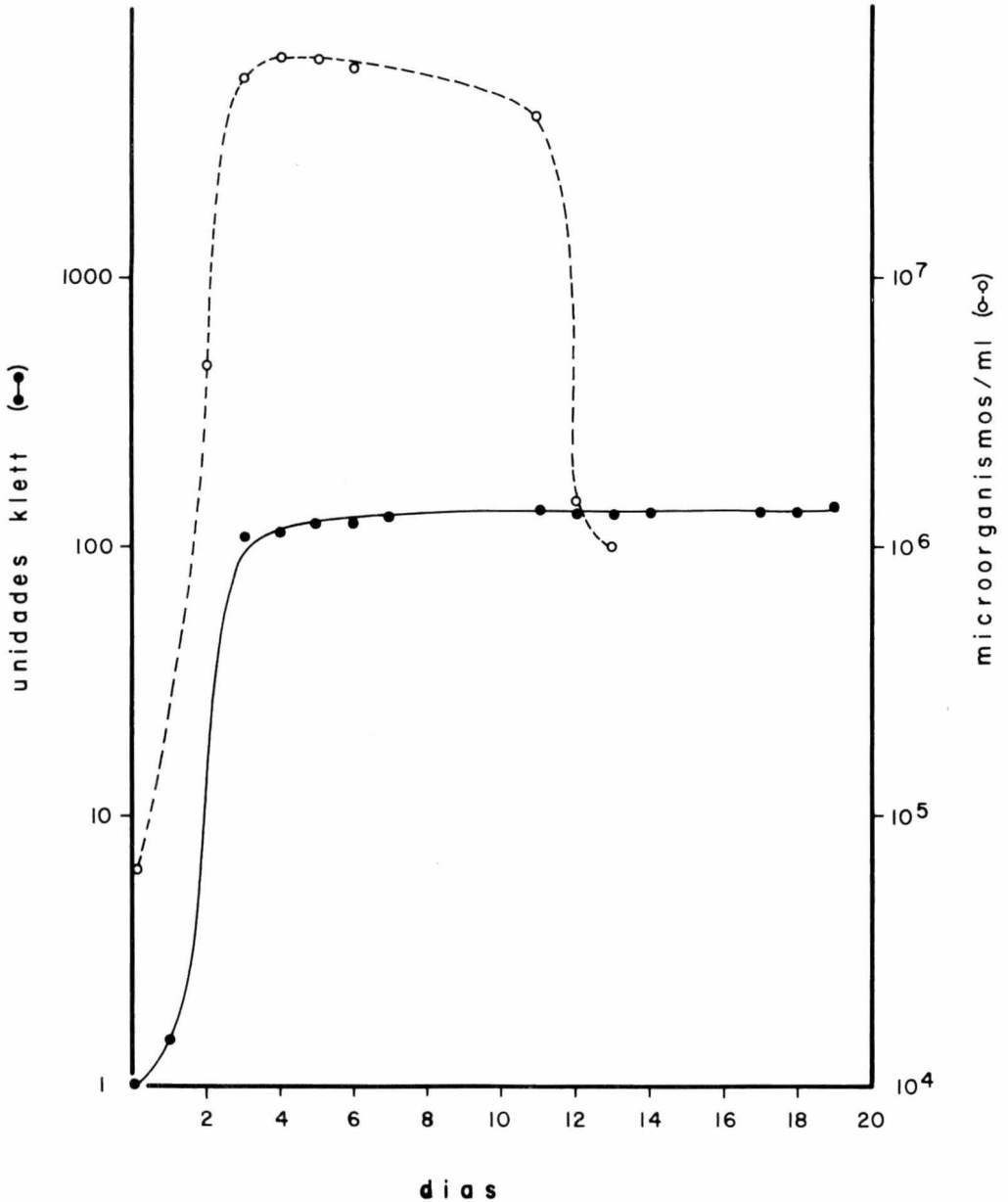
Gráfica # 13.-Curvas de Crecimiento de la cepa B-12 en el medio de cultivo M9-SIN con concentraciones de productos de oxidación de polietileno de 10, 20 y 30 % v/v, lo que corresponde a una concentración de carbono en el medio de: 0.52, 1.04 y 1.56 g. de C/l. respectivamente. Se incubó a 37°C en cultivo estacionario. - Las lecturas de turbiedad se efectuaron en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62.

La Gráfica # 15 nos muestra que las curvas de turbiedad y de -- concentración de microorganismos, alcanzan su valor máximo alrede -- dor de las 140 horas de incubación. Se observa además que la fase de muerte empieza a notarse francamente alrededor de las 220 ho -- ras. En sí estas dos curvas son similares a las obtenidas en la -- Gráfica # 14, pero con la diferencia de que se llega al máximo -- crecimiento y a la fase de muerte en un período menor. La concen -- tración de microorganismos obtenida en cada uno de los medios, es prácticamente igual; en el medio M9-ET a una concentración del 5- % v/v de productos de oxidación del polietileno, se obtuvo una -- concentración de  $6.4 \times 10^7$  microorganismos/ml., y en el medio M9- G se obtuvo una concentración de  $9.3 \times 10^7$  microorganismos/ml.

Cabe decir que la concentración de carbono en el medio M9-G es -- de 0.80 g. de C/l., y en cambio en el medio M9-ET es de 1.35 g. -- de C/l. La concentración de carbono en el medio M9-ET es 1.6 ve -- ces mayor que en el medio M9-G. Considerando que se obtuvo la mis -- ma concentración de microorganismos en ambos medios y que la glu -- cosa de medio M9-G fué utilizada por los microorganismos con -- una eficiencia del 100 %, puede decirse que el aprovechamiento de -- los productos de oxidación del polietileno por los microorganis -- mos es de un 50 %.

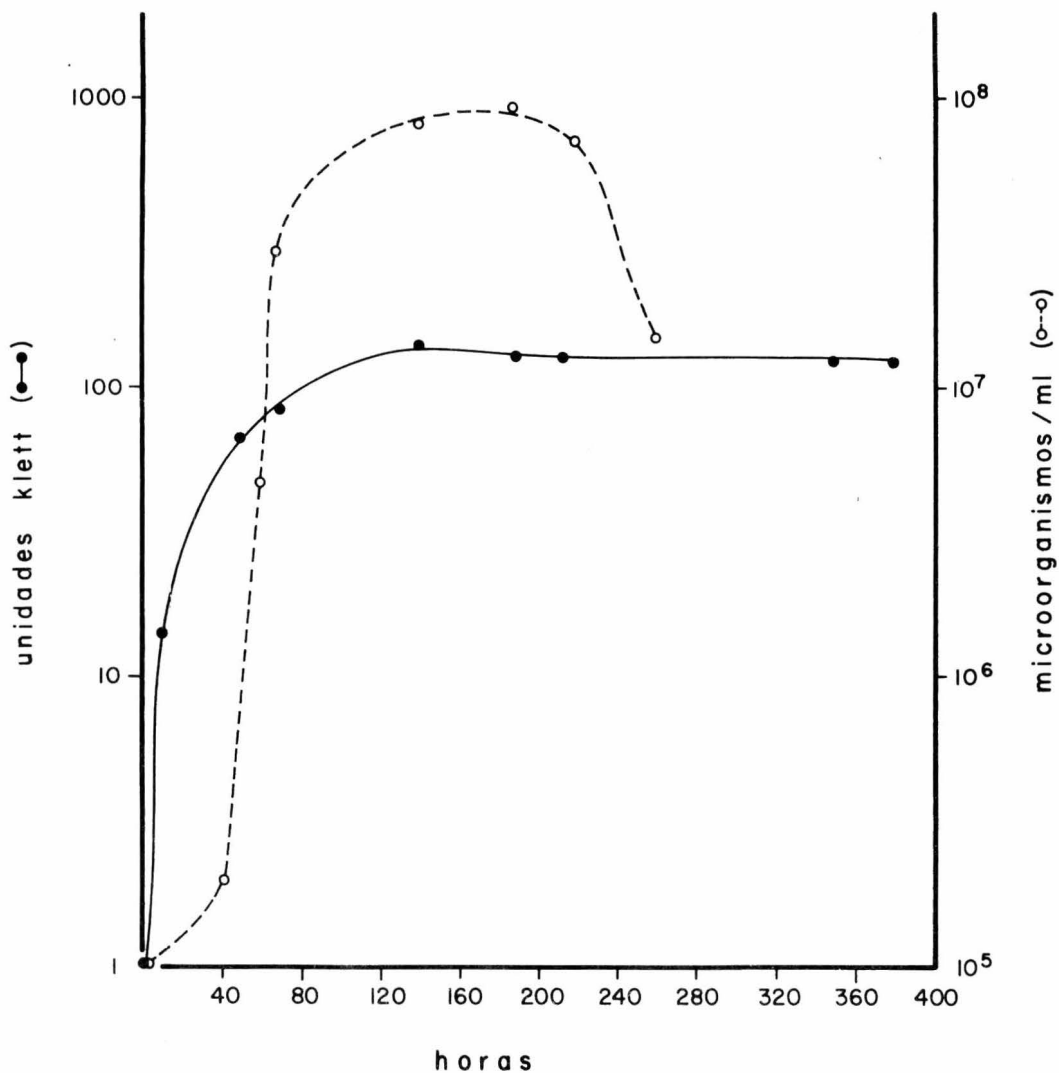
Ya habiendo determinado la concentración óptima de productos --

# GRAFICA 14



Gráfica # 14.-Curvas de Crecimiento y Supervivencia de la cepa - B-12 en el medio de cultivo M9-ET a una concentración de 5 % -- v/v de productos de oxidación del polietileno. Se incubó a 37°C - en cultivo estacionario. Las lecturas de turbiedad se efectuaron - en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62. La concen - tración de microorganismos en el medio se determinó por el méto - do de dilución y la siembra en placas (ver texto).

GRAFICA 15



Gráfica # 15.-Curvas de Crecimiento y Supervivencia de la cepa B-12 en el medio de cultivo M9-G. Se incubó a 37°C en cultivo estacionario. Las lecturas de turbiedad se efectuaron en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro rojo # 62. La concentración de microorganismos en el medio de cultivo se determinó por el método de dilución y siembra en placas.

de oxidación del polietileno para cada uno de los medios, se -- procedió a incubar la cepa B-12 a dos temperaturas distintas, 30 y 37°C. La concentración de los medios fué: M9-ET con una concentración de productos de oxidación del polietileno del 5 % v/v; M9-AQ con una concentración del 30 % v/v y el M9-SIN con una concentración del 5 % v/v. Los resultados se observan con claridad en la Gráfica # 16.

Cabe mencionar que todos los cultivos de B-12 se realizaron en condiciones estacionarias, puesto que en cultivo agitado a 37°C en el medio M9-ET 5 % v/v no se obtuvo desarrollo alguno.

Habiendo determinado las condiciones óptimas para el desarrollo del microorganismo, se procedió a determinar la cantidad de nitrógeno que poseía la biomasa obtenida. Para esto fué necesario hacer una curva patrón de nitrógeno (Nessler), con soluciones patrón que contenían las siguientes concentraciones de nitrógeno, las que correspondieron asimismo a las siguientes lecturas del nefelómetro en Unidades Klett:

Concentración de nitrógeno en mg. de N/ml. x 10 <sup>-4</sup> .	Unidades Klett.
--	-----------------

2

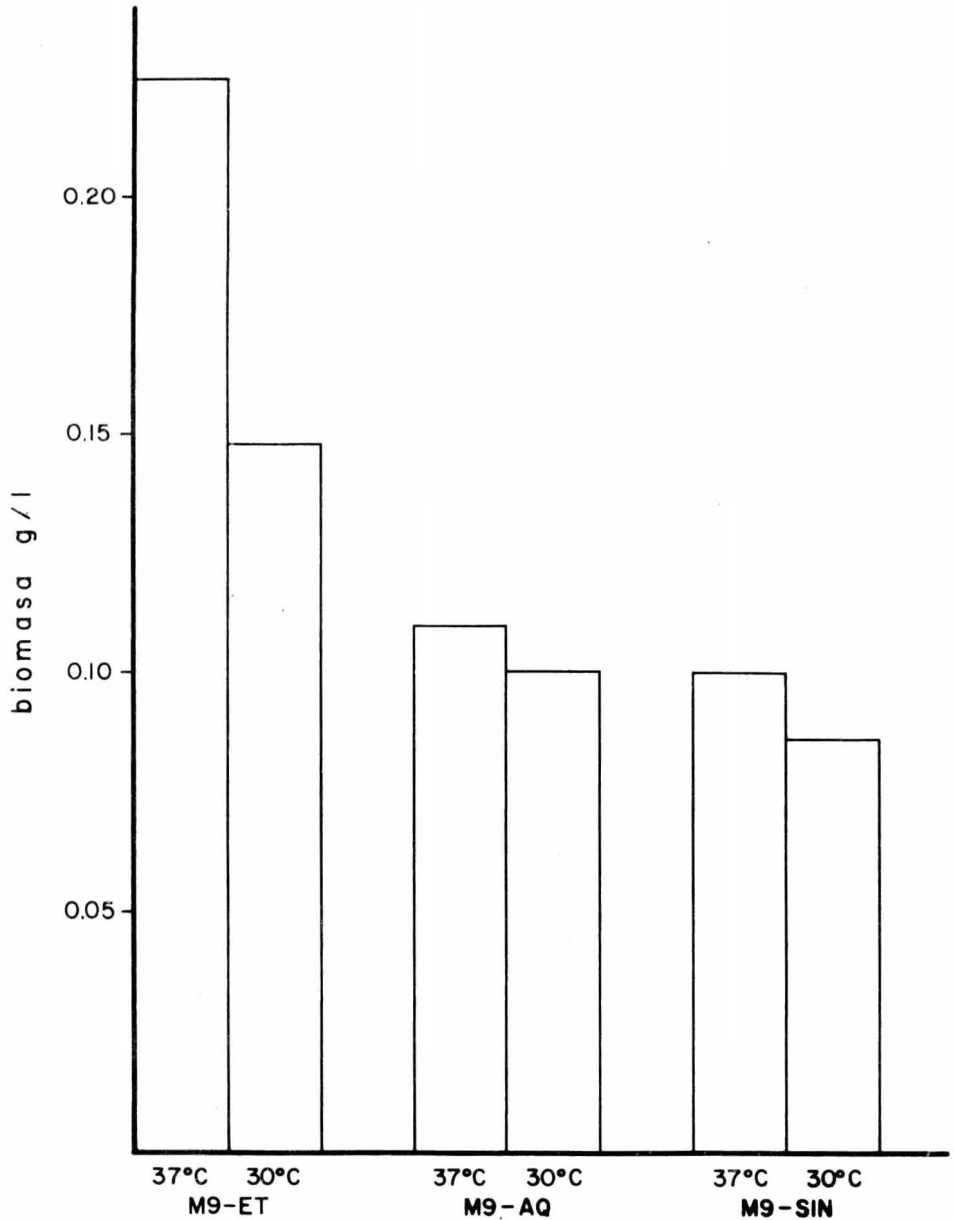
14

6

40



## GRAFICA 16



Gráfica # 16.-Concentración de biomasa obtenida en los distintos medios de cultivo a 30 y 37 °C. La concentración de productos de oxidación en los distintos medios fué: M9-ET 5 % v/v, M9-AQ 30 % v/v y M9-SIN 5 % v/v. El cultivo fué estacionario. La biomasa se obtuvo por filtración en Millipore y el peso seco -- colocandó esta en una estufa a 80 °C hasta tener un peso constante.

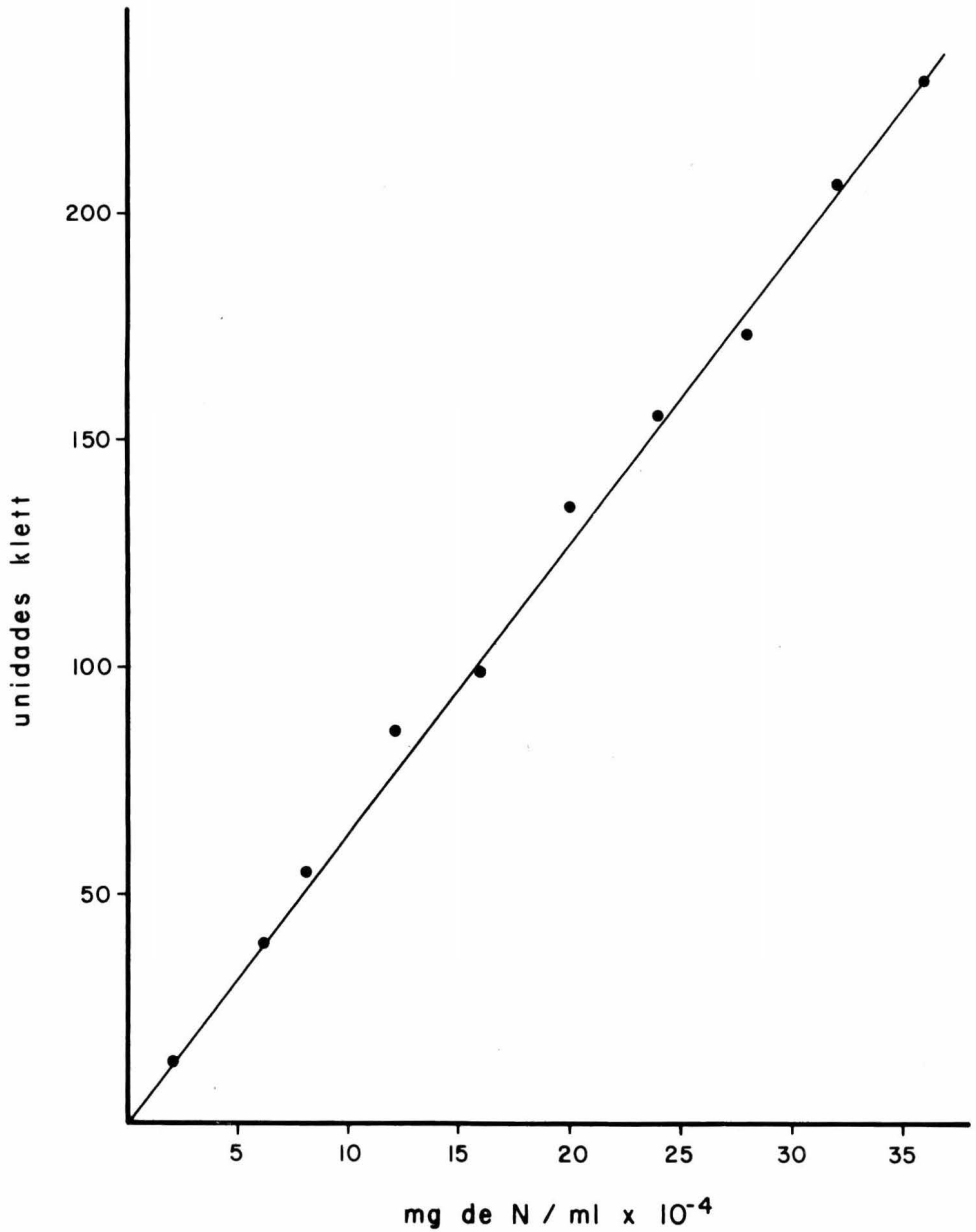
Concentración de nitrógeno en mg. de N/ml. x 10 <sup>-4</sup> .	Unidades Klett.
8	55
12	86
16	100
20	135
24	155
28	173
32	206
36	230

Para las lecturas se utilizó un nefelómetro Klett-Summerson con filtro azul.

Construida la curva patrón, Gráfica # 17, se procedió a determinar la cantidad de nitrógeno que poseía la cepa B-12.

Se corrió un control del medio de cultivo para observar si éste influía en las lecturas, tomándose una alícuota de 5 ml. -- del mismo y tratándolo del mismo modo que la muestra. Este control dio una lectura correspondiente a 4 unidades Klett, que referidas a la curva patrón corresponden a 0.8 mg. de N/ml. x 10<sup>-4</sup>. La muestra de biomasa, 40 mg. (peso seco), se trató según la técnica ya mencionada en el capítulo de Material y Métodos, obteniéndose una lectura de la misma correspondiente a 174 uni

# GRAFICA 17



Gráfica # 17.-Curva Patrón de Nitrógeno. Se preparó con soluciones patrón de sulfato de amonio. Las lecturas se efectuaron en un nefelómetro Klett-Summerson con filtro azul ( $\lambda = 440 \text{ nm.}$ ).

dades Klett, las que referidas a la curva patrón corresponden a 27 mg. de N/ml.  $\times 10^{-4}$ . A este valor hay que restarle el valor que se obtiene del control, 0.8 mg. de N/ml.  $\times 10^{-4}$ , lo que nos da un valor de 26.2 mg. de N/ml.  $\times 10^{-4}$ .

Tomando en cuenta que la muestra fué diluída hasta  $10^{-3}$ , tenemos que 40 mg. de biomasa (peso seco) corresponden a 26.2 mg. de N  $\times 10^{-4}/10^{-3}$ , que es igual a 2.62 mg. de N.

O sea que la biomasa de la cepa B-12 posee un 6.55 % en peso de nitrógeno.

Utilizando el factor para conversión de nitrógeno en proteína (22), tenemos que: 6.55 % de N  $\times 6.25 = 40.93$  % Proteína. O sea que la cepa B-12 posee un 40.93 % en peso de proteína, lo que es un valor bastante alto de la misma, y esto nos hace pensar que podría utilizarse como fuente nutritiva o como complemento alimenticio.

#### CEPA H-1:

De los hongos aislados se observó cual se desarrollaba mejor en medios de cultivo con productos de oxidación del polietileno. Se sembraron las cuatro cepas H-1, H-2, H-3 y H-4 en el medio M9-ET 9 % v/v, y se incubaron a 30 y 37°C con agitación. La cantidad de biomasa obtenida para cada uno de los cultivos se observa en la Gráfica # 18. Es claro que la mayor cantidad de bio

masa se obtuvo del cultivo de la cepa H-1, a 30°C. La influencia de la temperatura sobre el desarrollo de esta cepa es clara; la biomasa obtenida a 37°C disminuyó en un 34.9 % con respecto a la obtenida a 30°C.

Con respecto a la cepa H-2 se observa una gran influencia de la temperatura. A 37°C se obtiene una buena cantidad de biomasa, la cual disminuye en un 98.6 % en el cultivo a 30°C.

En las cepas H-3 y H-4 no se aprecia la influencia notable de la temperatura sobre su desarrollo.

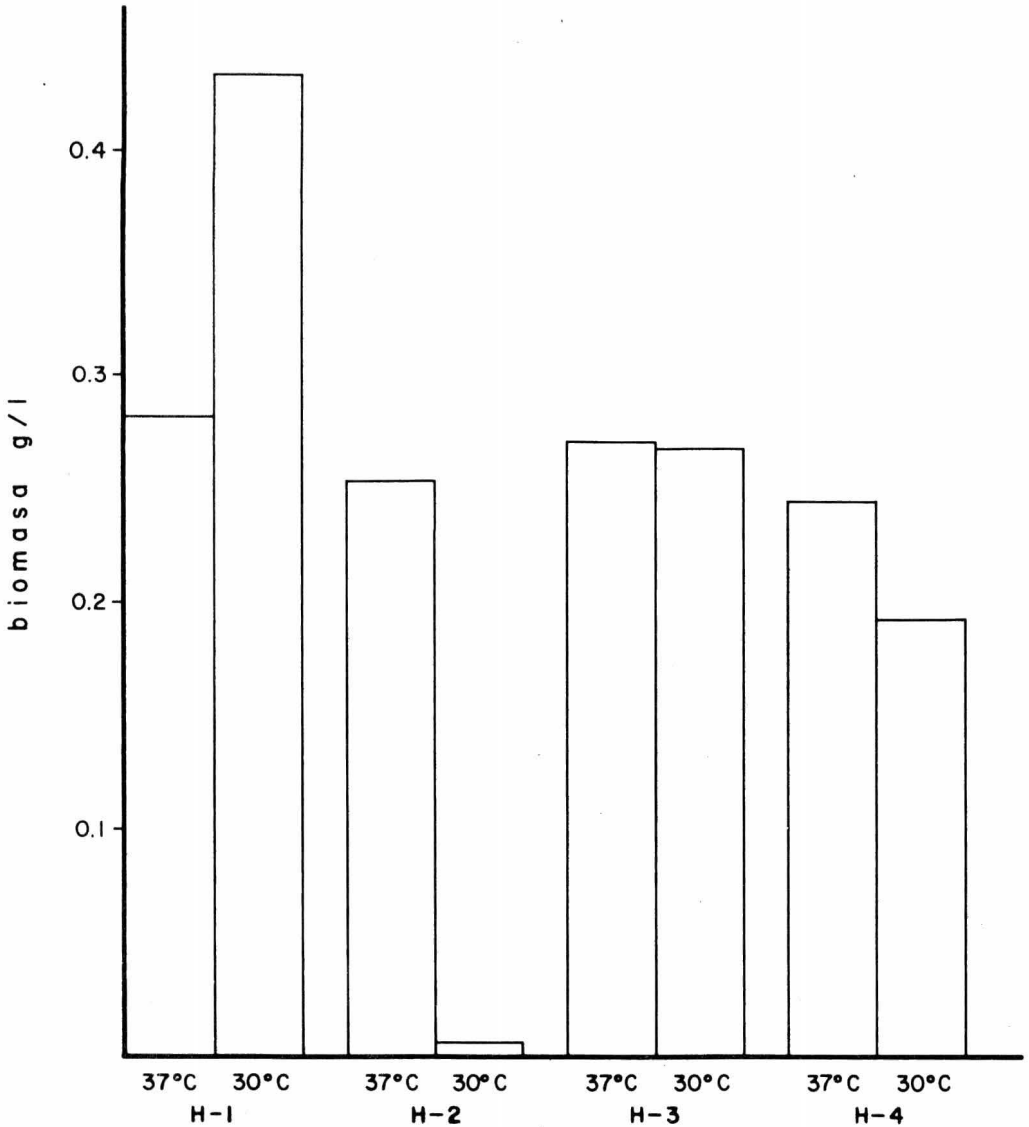
Se prepararon distintas concentraciones de los productos de oxidación del polietileno, en los distintos medios de cultivo, con el fin de determinar la concentración óptima de estos productos, en la cual se desarrolla mejor la cepa H-1. Las concentraciones usadas en los distintos medios fueron las siguientes:

Concentración de productos- de oxidación del polietile-	Concentración de Carbono (g./l.).
--	--------------------------------------

no.

M9-ET:	3 % v/v	0.81
	5 % "	1.35
	7 % "	1.89
	9 % "	2.43
	15 % "	4.05

## GRAFICA 18



Gráfica # 18.-Concentración de biomasa obtenida de las distintas cepas aisladas, H-1, H-2, H-3 y H-4, en el medio M9-ET 9 % v/v. Se incubó a dos temperaturas 30 y 37 °C con agitación. La biomasa se obtuvo por filtración en Millipore y el peso seco de esta se obtuvo colocando la muestra en una estufa a 80 °C, hasta alcanzar un peso constante.

Concentración de productos-  
de oxidación del polietile-  
no.

Concentración de Carbono  
(g./l.).

30 % (v/v)	8.10
50 % "	13.50

M9-AQ:

3 % "	0.234
5 % "	0.390
7 % "	0.546
9 % "	0.702
15 % "	1.170
30 % "	2.340
50 % "	3.900

M9-SIN:

3 % "	0.156
5 % "	0.260
7 % "	0.364
9 % "	0.468
15 % "	0.780
30 % "	1.560
50 % "	2.600

En la Gráfica # 19 se puede observar que la mayor cantidad de -  
biomasa de la cepa H-1, se obtiene con una concentración de carbo

no de 8.10 g./l., lo que corresponde a una concentración de productos de oxidación del polietileno obtenidos en el Método # 1, del 30 % (v/v). Se observa así mismo que al aumentar la concentración de estos productos, el desarrollo del microorganismo así como la biomasa se ven disminuídas.

En la Gráfica # 20 se observa que el máximo desarrollo del microorganismo en el medio M9-AQ, es a una concentración de productos de oxidación del polietileno del 30 % (v/v), lo que corresponde a una concentración de carbono de 2.34 g./l.

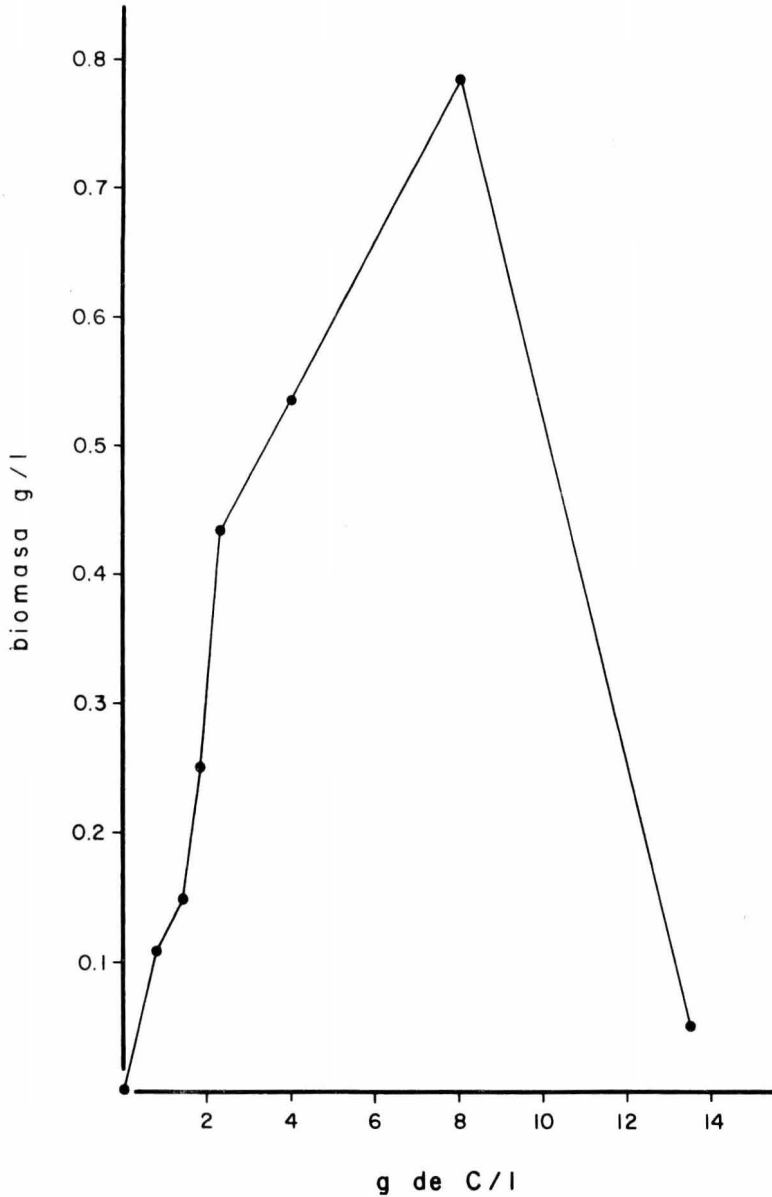
El desarrollo máximo obtenido en el medio M9-SIN, fué a una concentración de productos de oxidación del polietileno del 30 % (v/v), correspondiendo a una concentración de carbono de 1.560 g./l. El valor máximo de biomasa obtenida en este medio se observa en la Gráfica # 21, y este no difiere mucho del valor de biomasa obtenido en los medios de cultivo con concentraciones del 15 y 50 % (v/v).

Determinada la concentración óptima de productos de oxidación del polietileno, para cada uno de los medios, se procedió a hacer curvas de crecimiento de la cepa H-1, en los distintos medios.

Las curvas de crecimiento se hicieron determinando la biomasa de un cultivo, a intervalos de tiempo conocidos, como se explica en el capítulo anterior.

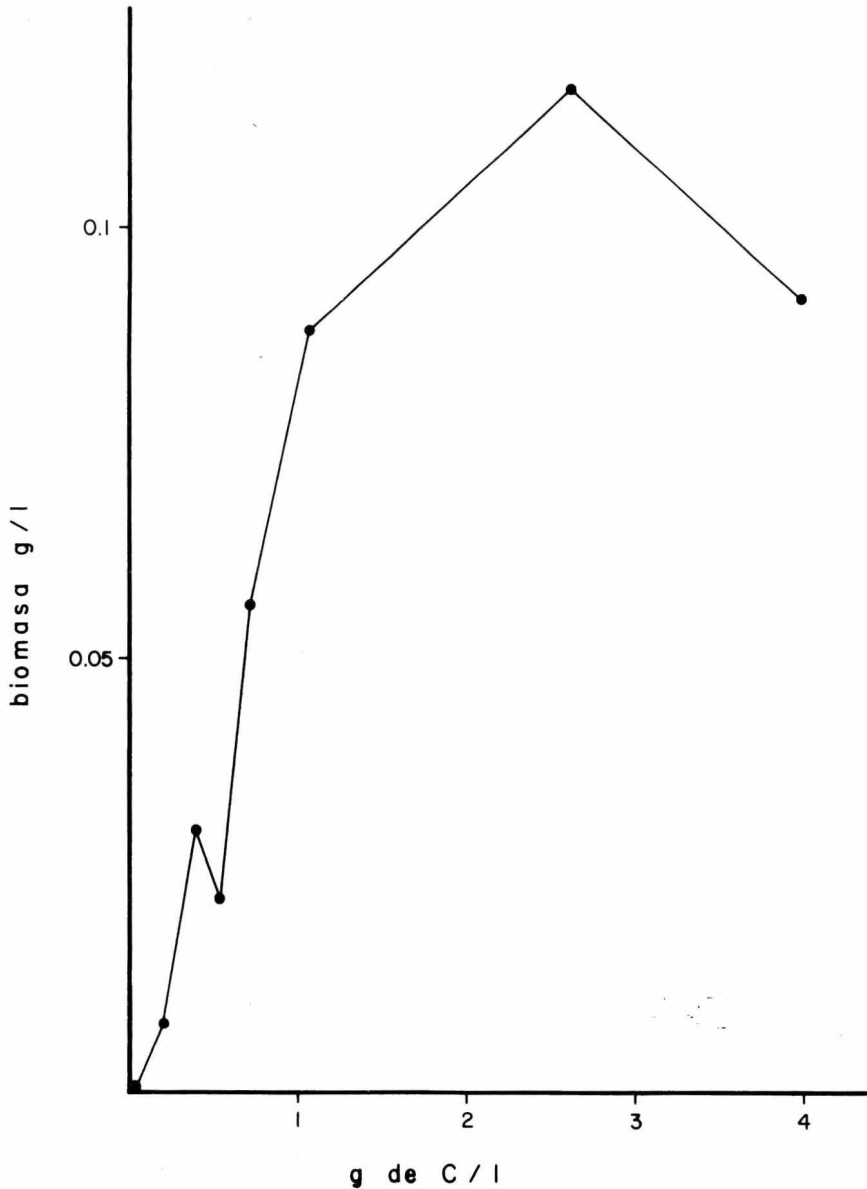


GRAFICA 19



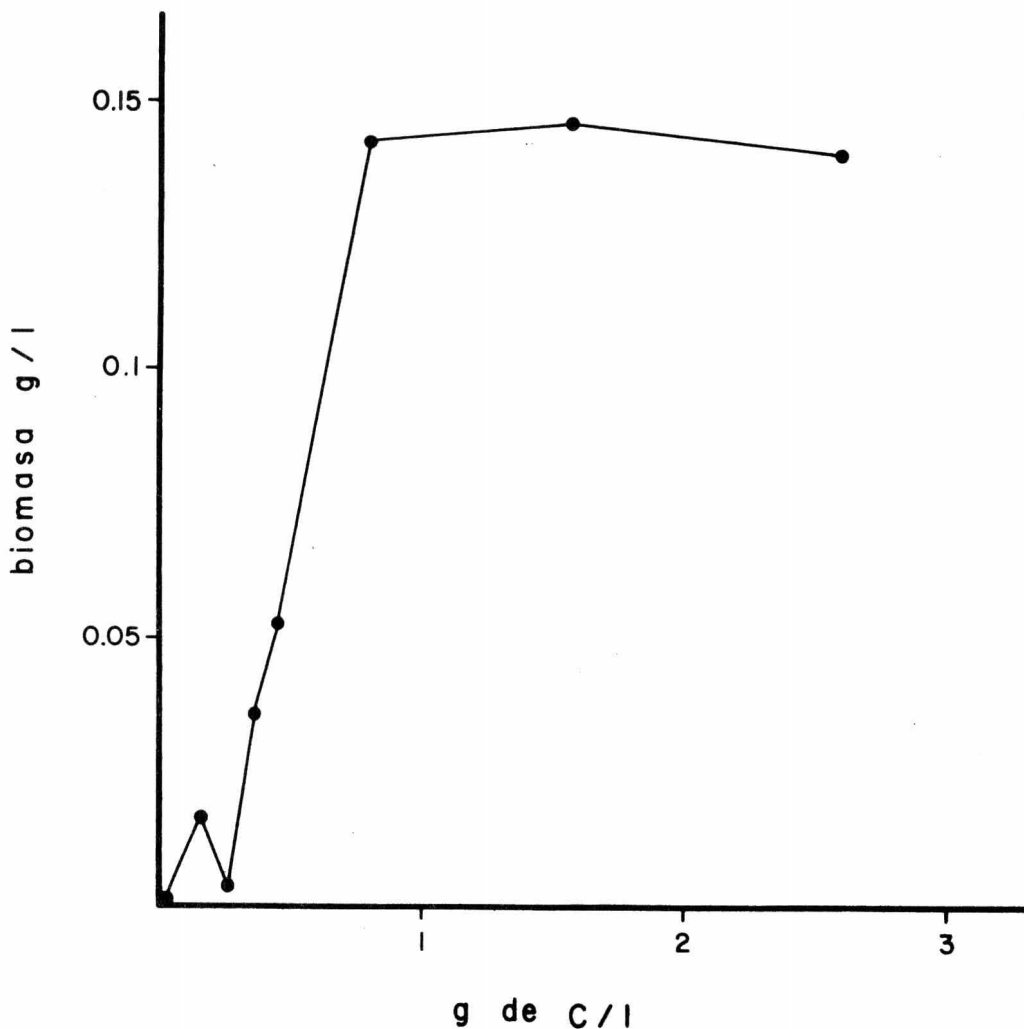
Gráfica # 19.-Concentración de biomasa obtenida del cultivo de la cepa H-1 en el medio de cultivo M9-ET, con distintas concentraciones de productos de oxidación del polietileno: 3, 5, 7, 9, 15, 30 y 50 % v/v. Lo que corresponde a una concentración de carbono en el medio de 0.81, 1.35, 1.89, 2.43, 4.05, 8.10 y 13.50 g. de C/l. respectivamente. La biomasa se recuperó por filtración en Millipore y su peso seco colocándola en una estufa a 80 °C hasta obtener un peso constante.

## GRAFICA 20



Gráfica # 20.-Concentración de biomasa obtenida del cultivo de la cepa H-1 en el medio M9-A<sub>2</sub> con distintas concentraciones de productos de oxidación del polietileno: 3, 5, 7, 9, 15, 30 y 50 % - v/v. Lo que corresponde a una concentración de carbono en el medio de 0.234, 0.390, 0.546, 0.702, 1.170, 2.340 y 3.900 g. de C/l. respectivamente. La biomasa se recuperó por filtración en Millipore y su peso seco colocándola en una estufa a 80 °C hasta obtener un peso constante.

## GRAFICA 21



Gráfica # 21.-Concentración de biomasa obtenida del cultivo de la cepa H-1 en el medio M9-SIN con distintas concentraciones de productos de oxidación del polietileno: 3, 5, 7, 9, 15, 30 y 50 % v/v. Lo que corresponde a una concentración de carbono en el medio de 0.156, 0.260, 0.364, 0.468, 0.780, 1.560 y 2.600 g de C/l. respectivamente. La biomasa se recuperó por filtración en Millipore- y su peso seco colocandola en una estufa a 80 °C hasta tener un peso constante.

En la Gráfica # 22 se observa la curva de crecimiento de la cepa H-1, en el medio M9-ET 30 % v/v. En ella se observa una fase de latencia corta, aproximadamente tres días, pero presenta una fase de crecimiento bastante larga de doce días aproximadamente.

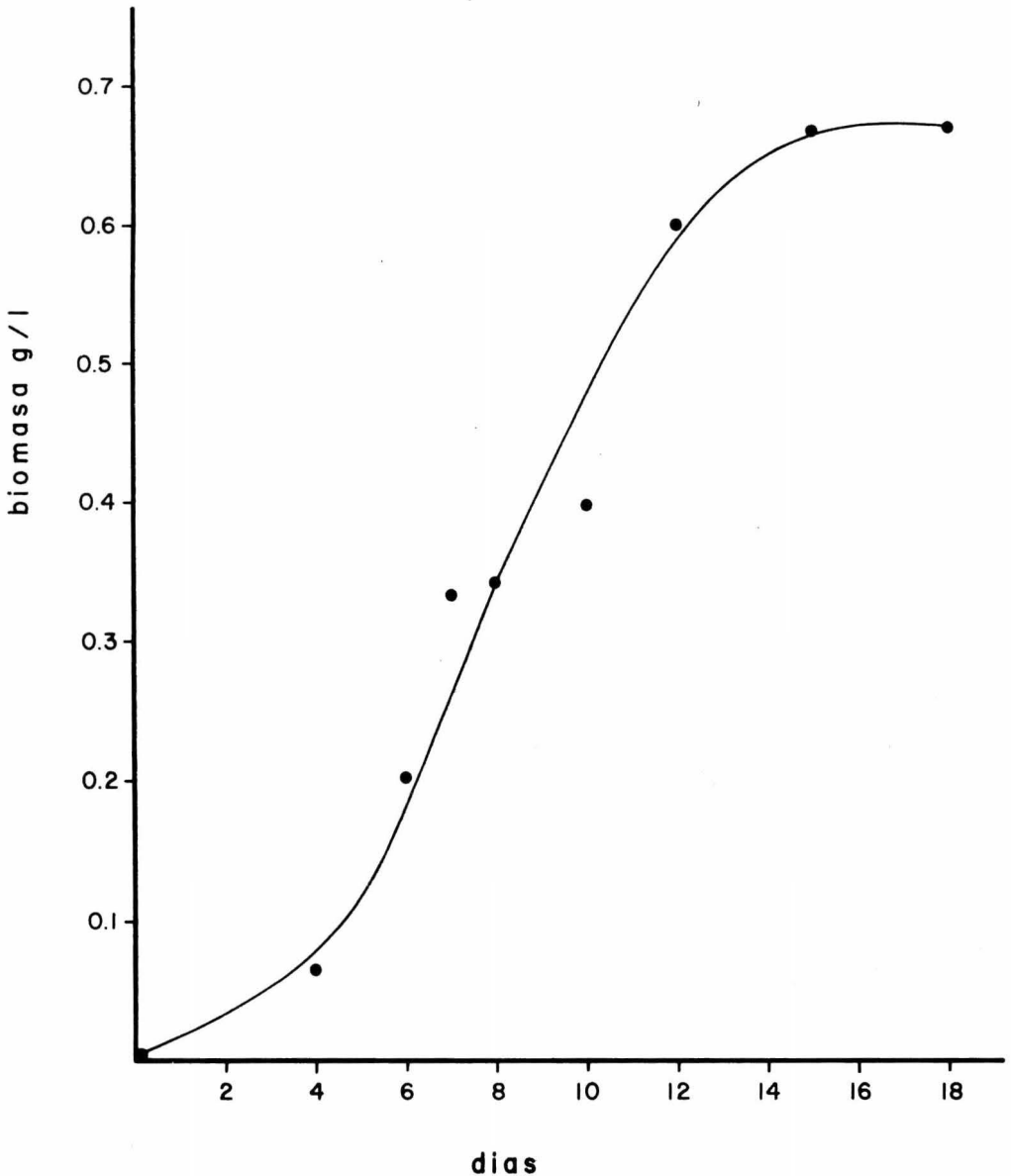
Al sembrar la cepa en el medio M9-AQ con una concentración de 30 % v/v, se obtuvo la curva de crecimiento que se observa en la Gráfica # 23. Esta curva no presenta fase de latencia y la fase de crecimiento es de diez días aproximadamente.

En el medio M9-SIN a una concentración de 22.5 % v/v, se obtuvo la curva de crecimiento que se observa en la Gráfica # 24, en la cual podemos ver que no existe fase de latencia y que aparece una fase de crecimiento de 16 días aproximadamente.

Para el desarrollo de las curvas de crecimiento mencionadas anteriormente, se contó con un control para cada una de ellas. Este consistió en inocular al microorganismo en el medio M9, sin fuente de carbono alguna; en todos los casos no se obtuvo desarrollo del microorganismo.

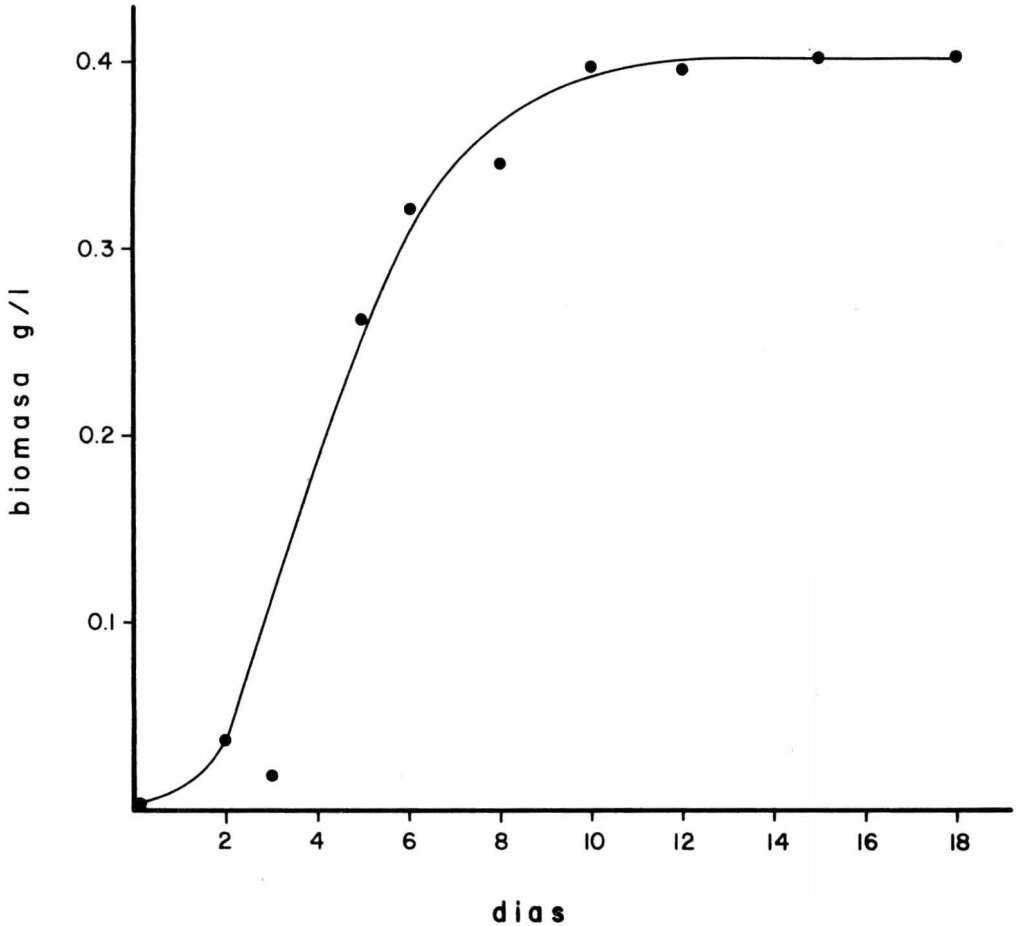
Habiendo determinado cuál era la concentración óptima de productos de oxidación del polietileno en cada uno de los distintos medios de cultivo, se procedió a observar el efecto de la temperatura sobre la cepa H-1. Los resultados se observan en la Gráfica # 25, en ella se ve claramente que la mayor cantidad de biomasa se

## GRAFICA 22



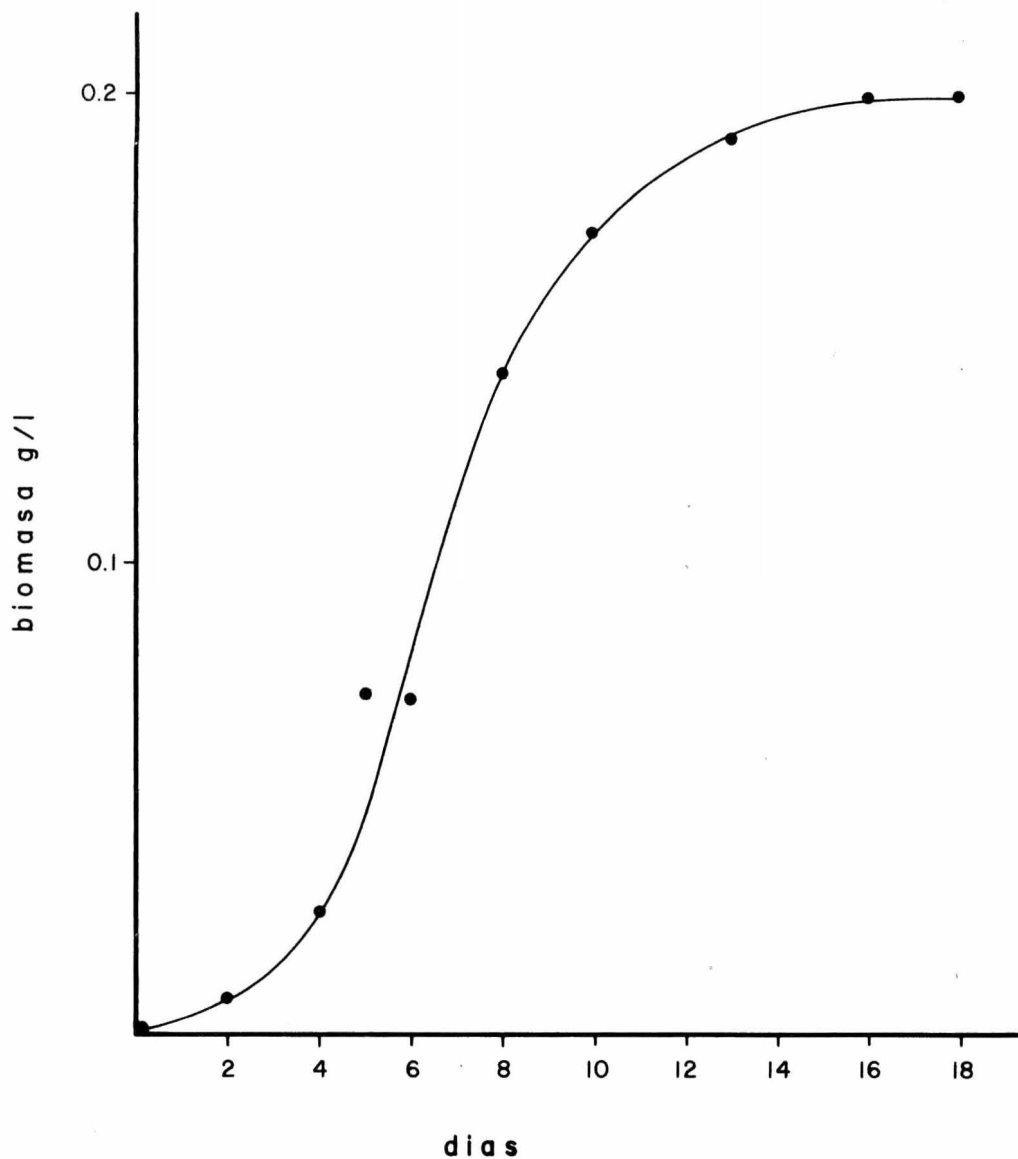
Gráfica # 22.-Curva de crecimiento de la cepa H-1 en el medio de cultivo M9-ET 30 % v/v. La incubación fué a 30 °C y con agitación. La biomasa se obtuvo por filtración en Millipore, el peso seco se obtuvo colocando la muestra en una estufa a 80 °C- hasta tener un peso constante.

GRAFICA 23



Gráfica # 23.-Curva de crecimiento de la cepa H-1 en el medio de cultivo M9-AQ 30 % v/v. Se incubó a 30 °C con agitación. La biomasa se obtuvo por filtración Millipore, el peso seco se obtuvo colocando la muestra en una estufa a 80 °C hasta tener un peso constante.

## GRAFICA 24



Gráfica # 24.-Curva de crecimiento de la cepa H-1 en el medio de cultivo M9-SIN 22.5 % v/v. Se incubó a 30 °C con agitación. La biomasa se obtuvo por filtración en Millipore, el peso seco se obtuvo colocando la muestra en una estufa a 80 °C hasta tener un peso constante.

obtiene a la temperatura de  $30^{\circ}\text{C}$ , y en el medio M9-ET a una concentración de 30 % v/v. Al aumentar la temperatura la biomasa obtenida en este medio se vio disminuida en un 57 %.

En el medio M9-AQ con una concentración de 30 % v/v, se obtiene mayor cantidad de biomasa a  $30^{\circ}\text{C}$  que a  $37^{\circ}\text{C}$ . La disminución sufrida por el aumento de temperatura, corresponde al 60 %.

En el medio M9-SIN con una concentración de 22.5 % v/v, no existe variación en la cantidad de biomasa obtenida, la influencia de la temperatura fue nula.

#### Determinación del Nitrógeno Total de la Cepa H-1:

Se pesaron 40 mg. de biomasa (peso seco), los cuales fueron tratados según la técnica ya descrita y dieron una lectura de 185 unidades Klett, que corresponden según la curva patrón (Gráfica # 17), a 29 mg. de N/ml.  $\times 10^{-4}$ . A este valor hay que restarle el valor que se obtuvo de control, o sea 0.8 mg. de N/ml.  $\times 10^{-4}$ . Lo cual nos da un valor de 28.2 mg. de N/ml.  $\times 10^{-4}$ .

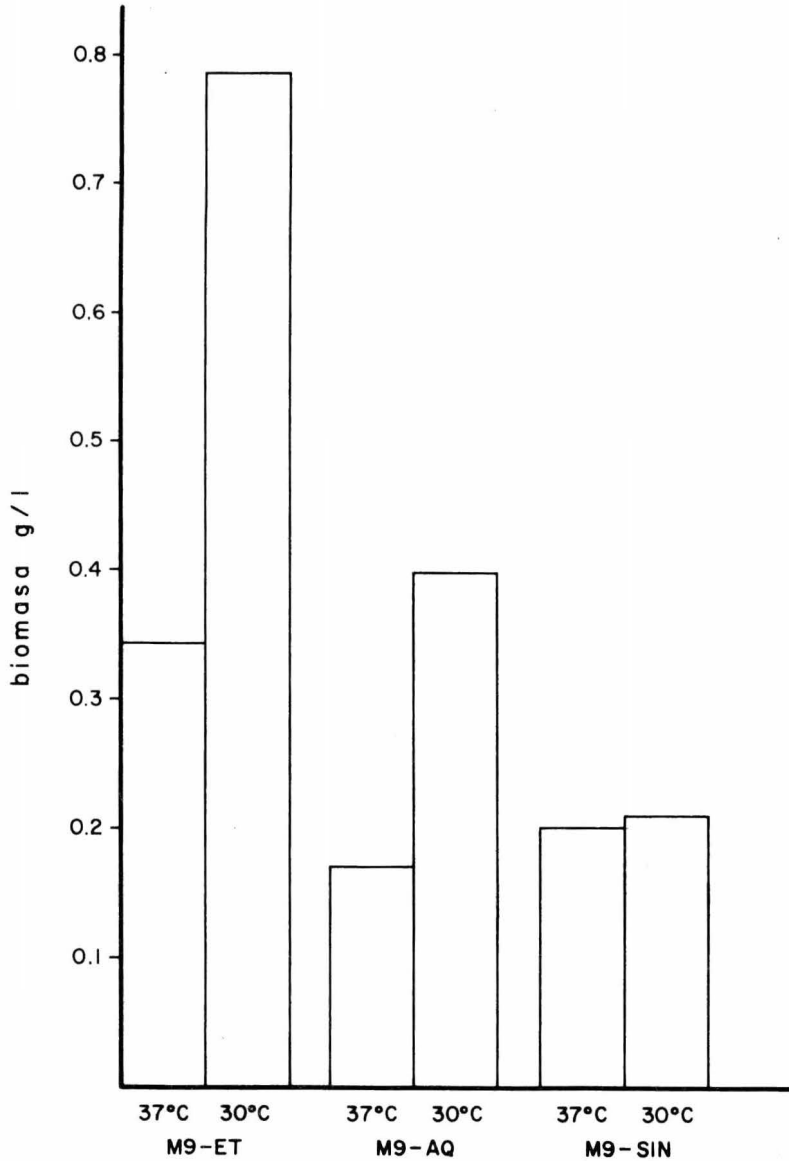
Teniendo que la muestra fue diluida hasta  $10^{-3}$ , tenemos que 40 mg. de biomasa corresponden a 28.2 mg. de N  $\times 10^{-4}/10^{-3}$ , lo que nos da un valor de 2.82 mg. de N.

O sea que la biomasa de la cepa H-1 posee un 7.05 % en peso de nitrógeno.

Utilizando el valor de conversión de nitrógeno en proteína tenemos que 7.05 % de N  $\times 6.25 = 44.06$  % de Proteína. Este valor -



## GRAFICA 25



Gráfica # 25.-Concentración de biomasa de la cepa H-1 obtenida en los distintos medios de cultivo, M9-ET, M9-AQ y M9-SIN, a 30 y 37 °C. Los productos de oxidación del polietileno en cada uno de los medios fueron: M9-ET 30 % v/v, M9-AQ 30 % v/v y M9-SIN -- 22.5 % v/v. Se incubó a las temperaturas mencionadas en cultivo con agitación. La biomasa se obtuvo por filtración en Millipore y su peso seco colocándola en una estufa a 80 °C hasta obtener un peso constante.

es bastante alto y se podría pensar en utilizar esta cepa como fuente proteica, con la ventaja sobre la cepa B-12, que los hongos son mas fáciles de recuperar, que poseen menor cantidad de ácidos nucleicos y sobre todo que no poseen una pared celular con lipopolisacáridos tóxicos.

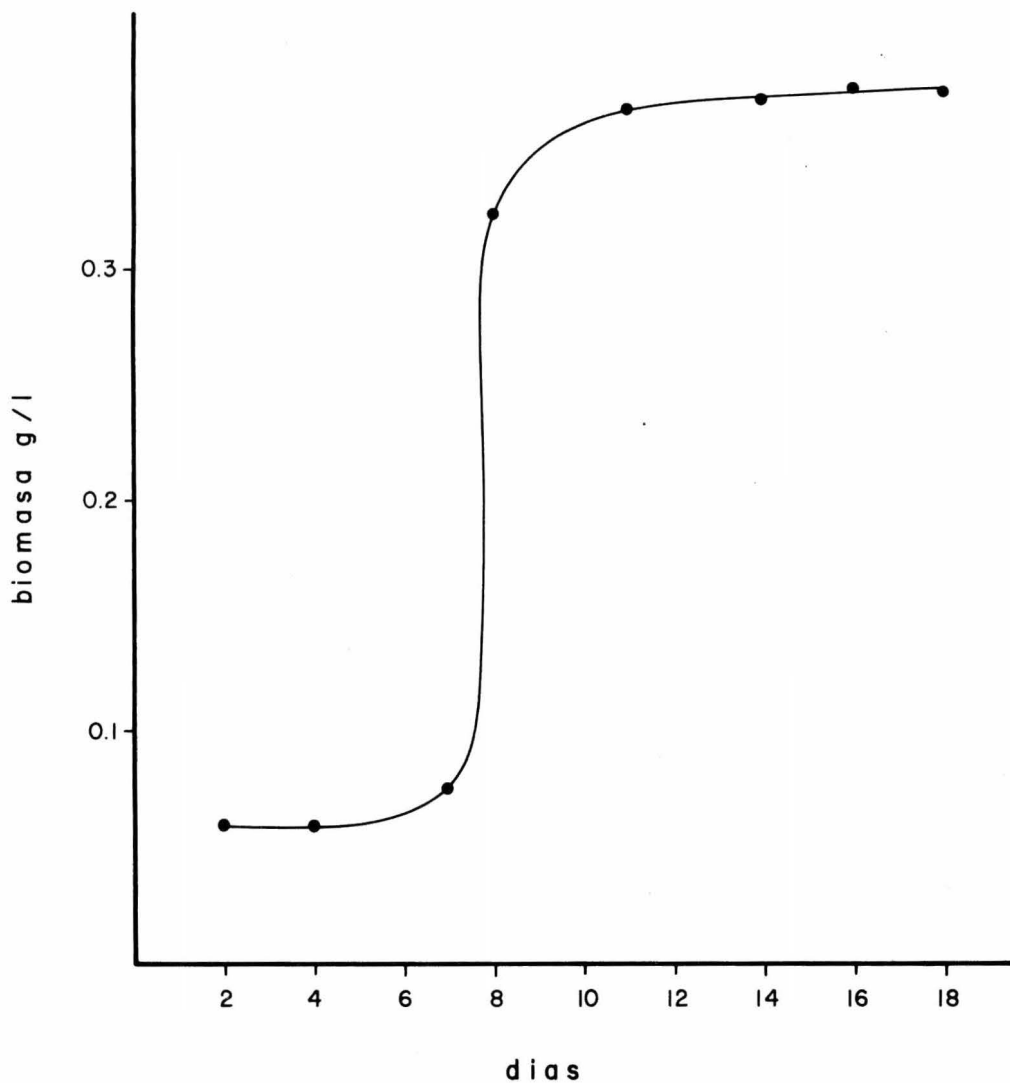
#### CEPA C-1:

Con esta cepa se determinó también la concentración de productos de oxidación del polietileno, en la cual se desarrollaba me jor, encontrándose que el mayor desarrollo se obtenía en el medio M9-A0 a una concentración del 25 % v/v. Se hizo una curva de crecimiento de dicha cepa (Gráfica # 26), observándose una fase de latencia de 5 días aproximadamente y una fase de creci miento corta de 4 días.

En estas determinaciones se sembró al microorganismo en el me dio M9 sin fuente de carbono, como control, y en este caso se ob tuvo crecimiento del mismo.

Se hizo la determinación de nitrógeno total en 40 mg. de bio-masa, los cua es siguiendo la técnica ya mencionada, dieron una lectura de 79 unidades Klett, correspondiendo a 12.5 mg. de --- N/ml.  $\times 10^{-4}$ . A este valor se le resto el valor del control 0.8 mg. de N/ml.  $\times 10^{-4}$ , quedándonos un valor de 11.7 mg. de N/ml.  $\times 10^{-4}$ . Dividiendo entre la dilución a la que fue llevada la ---

## GRAFICA 26



Gráfica # 26.-Curva de Crecimiento de la cepa C-1 en el medio de cultivo M9-AQ con una concentración de productos de oxidación del polietileno del 25 % v/v. Se incubó a 37 °C en cultivo estacionario. La biomasa se recuperó por filtración en Milipore, el peso seco se obtuvo colocando la muestra en una estufa a 80 °C hasta obtener un peso constante.

muestra de biomasa, tenemos que 40 mg. de la misma poseen 1.17 mg. de nitrógeno. Este valor corresponde a un 2.92 % en peso - de nitrógeno.

Utilizando el factor de conversión de nitrógeno en proteína, tenemos que  $2.92 \% \text{ de N} \times 6.25 = 18.25 \% \text{ en peso de Proteína}$ .

Este valor es desde luego menor que los obtenidos para la cepa B-12 y para la cepa H-1.

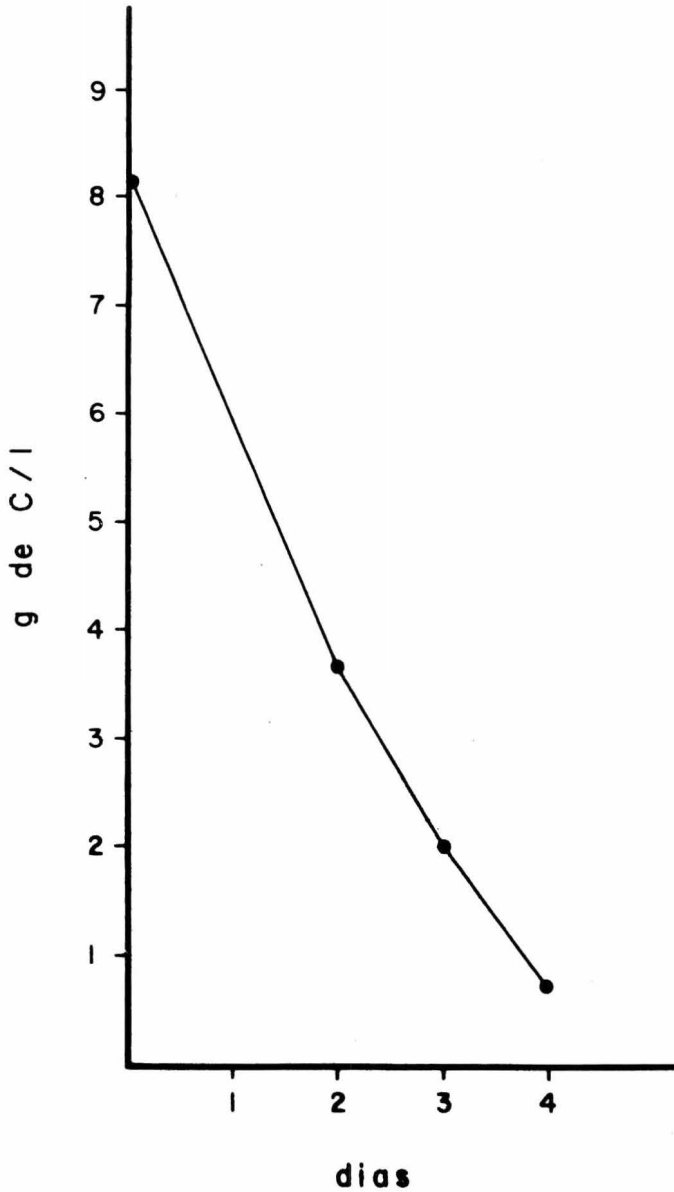
#### UTILIZACION DE PRODUCTOS DE OXIDACION DEL POLIETILENO POR LOS MICROORGANISMOS:

Como se mencionó en el principio de este capítulo, se determi  
nó la utilización de los productos de oxidación del polietileno por los microorganismos. Así tenemos que un cultivo de la -  
cepa H-1 fué desarrollado en el medio M9-ET a una concentra--  
ción del 30 % v/v, a 30°C y con agitación. De este cultivo de -  
tomaron muestras de 5 ml. cada 24 horas, observándose que en -  
un período de 4 días era asimilado el 90.8 % del carbono exis  
tente en el medio de cultivo (Gráfica # 27).

La cepa B-12 al cabo de 4 días de cultivo en el medio M9-ET-  
a una concentración del 5 % v/v, a 37°C, se utilizó el 63 % del  
carbono presente en el medio de cultivo (Gráfica # 28).

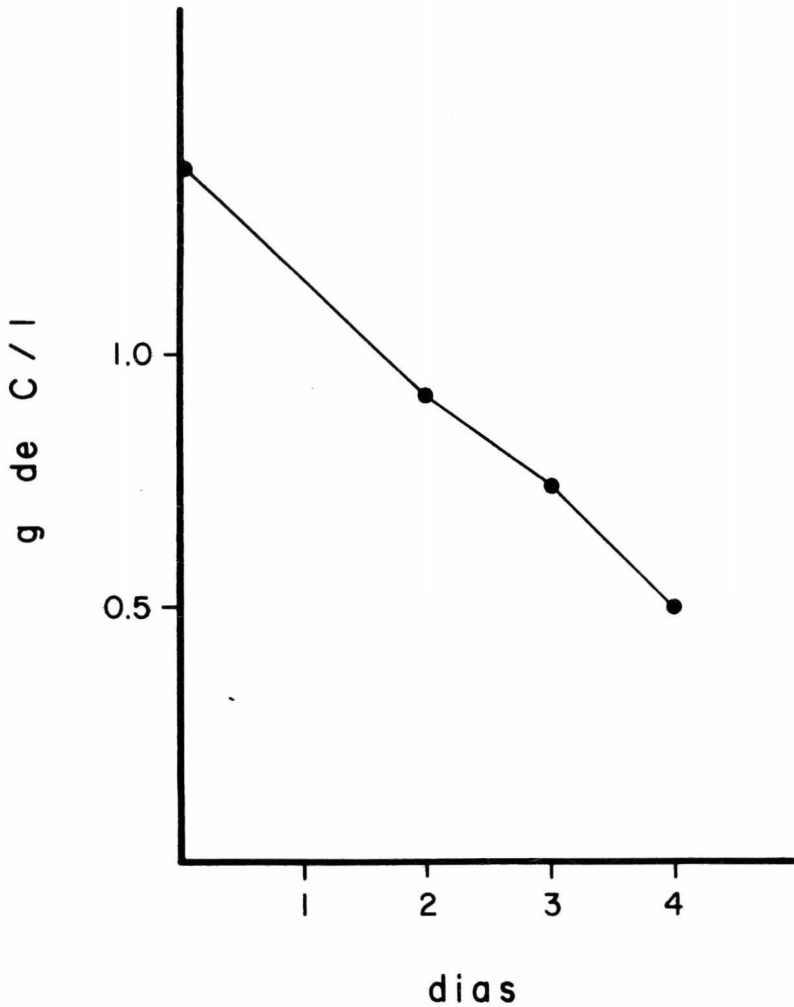
Para la cepa C-1 no se llevó a cabo esta prueba, pues dicha -  
cepa además de que se desarrolla en medios de cultivo sin la-

## GRAFICA 27



Gráfica # 27.-Utilización de los productos de oxidación del polietileno del medio M9-ET 30 % v/v, por la cepa H-1. Se incubó a 30 °C en cultivo agitado. La determinación del carbono se hizo en el Analizador de Carbono Total (Beckman modelo 915).

## GRAFICA 28



Gráfica # 28.-Utilización de los productos de oxidación del polietileno del medio M9-ET 5 % v/v, por la cepa B-12. Se incubó a 37 °C en cultivo estacionario. La determinación del carbono se hizo en el Analizador de Carbono Total (Beckman modelo 15).

adición de fuente de carbono, parece ser que excreta aminoácidos al medio de cultivo. Los valores que se obtendrían, considero que serían muy variables y sujetos a otros parámetros que no sería desde luego la concentración de carbono en el medio de cultivo.

#### MEDIOS MIXTOS:

Se hicieron medios de cultivo mixtos, M9-GET y M9-GAQ, los que se inocularon con las distintas cepas y se incubaron en las condiciones óptimas para cada caso. Los resultados obtenidos en estos cultivos se observan en la Gráfica # 29.

Para la cepa B-12 se obtuvo una mayor biomasa en M9-G que en M9-ET o que en M9-GET, siendo estas dos últimas el 30 y 45 % respectivamente, de la biomasa obtenida en el medio con glucosa.

Para la cepa H-1 se obtuvo mayor concentración de biomasa en el medio M9-GET, supuestamente debido a que las esporas con que fue inoculado el medio germinaron en su totalidad, aprovechando después el carbono proporcionado por los productos de oxidación del polietileno. En dicho medio se tiene una concentración 11 veces mayor de carbono que en el medio M9-G, pero 1.8 veces menos que en el medio M9-ET; es por esto que supongo que lo que influyó en la obtención de la mayor cantidad de biomasa en el medio M9-GET, fue la germinación de las esporas con la glucosa del medio.

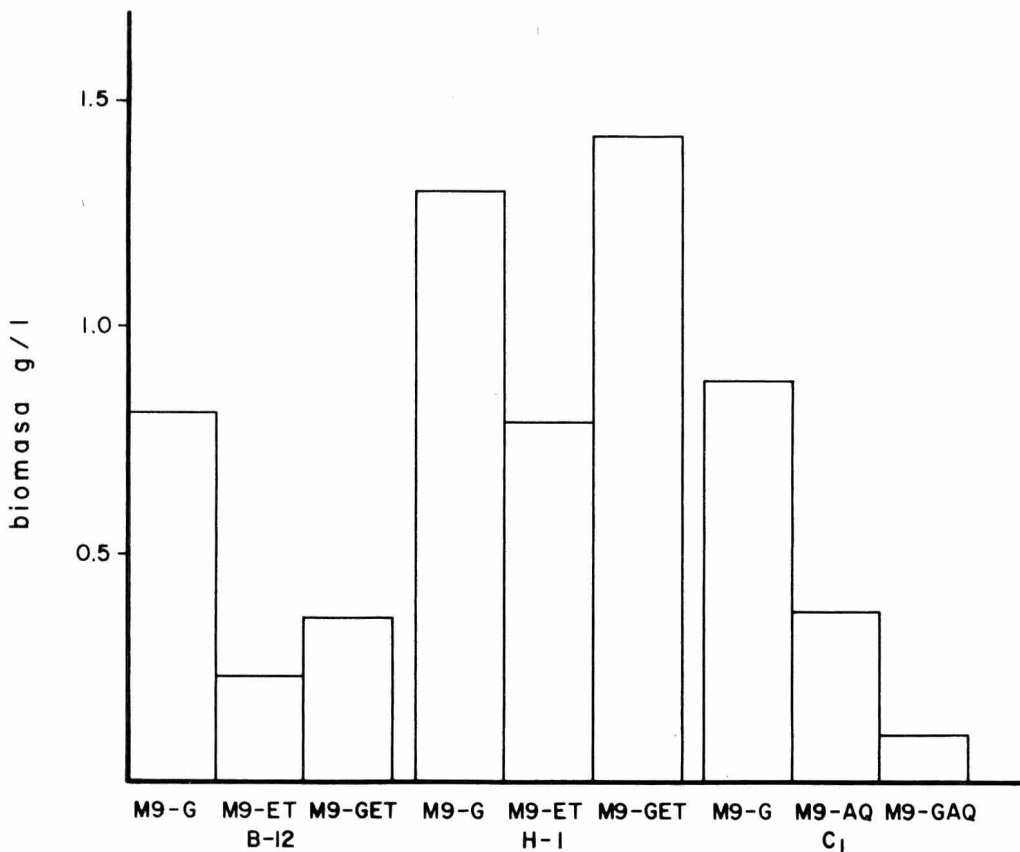
La biomasa obtenida en los medios M9-G y M9-ET corresponde al-

91.5 y 55 % respectivamente, de la biomasa obtenida en el medio M9-GET.

Para la cepa C-1 se obtuvo la menor biomasa en el medio M9-GA), que en el medio M9-AO; se podría pensar en una inhibición por la glucosa, pero no lo considero así puesto que en el medio M9-G se obtuvo muy buen desarrollo. Este fenómeno no se -- realmente a lo que se deba.



GRAFICA 29



Gráfica # 29.-Concentración de biomasa de las cepas B-12, H-1 y C-1 en distintos medios de cultivo. Para la cepa B-12 se obtuvo la biomasa en los medios M9-G, M9-ET 5 % v/v y M9-GET; para la cepa H-1 en los medios M9-G, M9-ET 30 % v/v y M9-GET; y para la cepa C-1 en M9-G, M9-AQ 22.5 % v/v y M9-GAQ. Los cultivos de las cepas B-12 y C-1 se incubaron a 37 °C sin agitación, y el cultivo de la cepa H-1 se incubó a 30 °C con agitación. La biomasa se obtuvo por filtración en Millipore y el peso seco de ésta se colocó en una estufa a 80 °C hasta tener un peso constante.

## DISCUSION

El método utilizado para la oxidación del polietileno y para los fines de este trabajo, es bueno pero poco eficiente. Existe reportado un método en la literatura, en el cual se oxida al polietileno con ozono y con iones metálicos como catalizadores (11). Tratando de obtener un método más eficiente, se pensó en desarrollar un método combinando, el utilizado en este trabajo y el catalizado por iones metálicos. Con este fin se empleó una mezcla oxidante de  $\text{HNO}_3$ ,  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{H}_2\text{O}$  y unos cristales de  $\text{CuSO}_4$ .

Los problemas que puede presentar este método es que los iones metálicos quedan en la solución, la cual al adicionarse al medio de cultivo puede presentar fenómenos de toxicidad hacia los microorganismos. Para evitar esto se tendrían que efectuar estudios sobre la toxicidad de estos en los microorganismos aislados.

También es posible la eliminación de los iones metálicos de la mezcla de oxidación, pero esto implica más trabajo y gastos.

Con respecto a la oxidación del polietileno la investigación se puede orientar hacia el desarrollo de procesos de oxidación más baratos, más eficientes y además que los productos de oxidación sean más asimilables por los microorganismos.

Existe un trabajo de investigación sobre los efectos de la luz ultravioleta en los ácidos dicarboxílicos (24), a partir de los

cuales despues de la irradiación se obtienen ácidos del ciclo de Krebs. Este es probablemente uno de los caminos a seguir en la investigación sobre degradación de los plásticos.

Considerando que los productos de oxidación del polietileno son ácidos dicarboxílicos, se puede pensar que los microorganismos utilizan a estos en la  $\beta$ -oxidación (Figura # 1), para la obtención de energía quedando los ácidos incorporados en el ciclo de Krebs.

De todos los métodos desarrollados para la obtención de los productos de oxidación del polietileno, uno de ellos, el número 3 se encuentra reportado en la literatura (10), los demás no. Es claro que utilizando el método de obtención número 4 se logra una concentración mayor de carbono, así como también la recuperación del  $\text{HNO}_3$ , el cual puede ser reutilizado para la oxidación de más polietileno.

Considero que para obtener productos de oxidación del polietileno, a nivel de planta piloto, el método a seguir es el número 4, ya que son pocas las manipulaciones que hay que efectuar, además de que no se trabaja con disolventes, lo que es siempre peligroso.

De acuerdo con los resultados obtenidos, es evidente que los productos de oxidación del polietileno obtenidos por el método número 1, son mejor asimilados por los microorganismos, que-

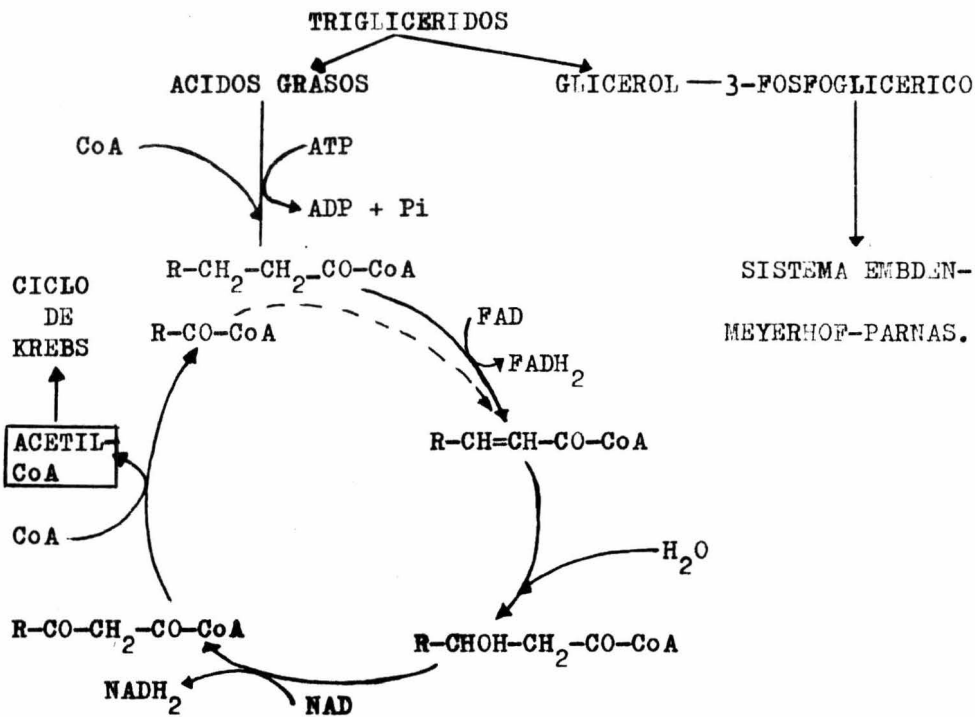


Figura # 1.-Sistema cíclico para la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos de cadena larga, según Rose (23).

los obtenidos por los métodos 2 y 3, puesto que aunque la concentración de carbono es mayor en el medio M9-ET (concentración óptima para cada cepa), que en los medios M9-AQ y M9-SIN, al aumentar la concentración de estos dos últimos el desarrollo de los microorganismos se inhibe. Esto nos hace pensar que existe un producto de oxidación del polietileno, el cual no es soluble en éter, que inhibe el desarrollo de los microorganismos.

Con respecto a la parte microbiológica, se deben buscar y aislar cepas de microorganismos capaces de utilizar con mayor eficiencia los productos de oxidación del polietileno, para obtener productos de biosíntesis o bien biomasa.

Se debe también experimentar el cambio en la composición química de los medios de cultivo, adicionando vitaminas u otros factores de crecimiento, para que esto nos permita obtener mayor cantidad de biomasa.

Quizás he hecho mucho hincapié en la obtención de biomasa, pero desde luego es tanto o más importante la obtención de productos de fermentación. Con las cepas de Aspergillus y Penicillium aisladas, es probable que se puedan obtener a partir de ellas productos tales como: ácidos gálico, cítrico, glucónico, fumarico, oxálico; enzimas amilolíticas, pectinolíticas, lipolíticas, catalasa y glucosa oxidasa; antibióticos como la aspergilina y penicilina; factores de crecimiento como son la biotina, tiamina

y riboflavina;etc.

Se debe experimentar también adicionando a los medios de cultivo factores que aumenten la producción de las sustancias antes mencionadas, así como seleccionar cepas mutantes, sobreproductoras de algún producto de fermentación que nos interese.

## RESUMEN

Poliétileno comercial fue oxidado con  $\text{HNO}_3$ , por reflujo durante 24 horas, y los productos de oxidación se recuperaron por cuatro métodos distintos. Se determinó la concentración de carbono orgánico de cada una de las soluciones obtenidas por dichos métodos.

Se hicieron medios de cultivo cuya fuente de carbono fueron — los productos de oxidación del polietileno, y en ellos se aislaron los siguientes microorganismos:

Cepa B-1) Escherichia freundii.

" B-2) Enterobacter sp.

" B-3) Salmonella sp.

" B-4) Proteus morgani.

" B-5) Proteus vulgaris.

" B-6) Grupo Providencia.

" B-9) Escherichia coli.

" B-12) Corynebacterium sp.

" H-1) Penicillium sp.

" H-2) Cladosporium sp.

" H-3) Aspergillus sp.

" H-4) Epicoccum sp.

" C-1) Actinomiceto.

A las cepas B-12, H-1 y C-1 se les determinaron las condiciones

óptimas para su crecimiento y a la biomasa obtenida de cada una de estas cepas se le determinó la cantidad de nitrógeno. Por medio de este valor se calculó el porcentaje de proteína que poseían; la cepa H-1 fué la que presentó mayor porcentaje de proteína con respecto al peso seco.

Las cepas B-12, H-1 y C-1 fueron sembradas en medios de cultivo mixtos (fuente de carbono compuesta por glucosa y productos de oxidación del polietileno), obteniéndose en el caso de la cepa H-1, mayor biomasa en dicho medio que en el medio con glucosa.



## BIBLIOGRAFIA

- 1)Eggins, H. O.W. & Mills, J. 1971. In Microbial Aspects of Pollution. Ed. by Sykes, B. & Skinner, A. London. Academic Press. pp 267-279.
- 2)Staudinger, J. J.P. 1970. Disposal of plastics waste and litter. Society of Chemical Industry. Monograph No. 35.
- 3)Hazeu, W. & Waterman, H.A. 1965. Evaluation of the microbial degradation of plastics by the vibrating reed method. Central Laboratorium Communication. 229: 7.
- 4)Hitz, H.R. & Zinkernagel, R. 1967. Test tube methods for evaluation of biodegradation of plasticised P.V.C. by Pseudomonas aeruginosa. Int. Biodetn. Bull. 3:21.
- 5)Hazeu, W. 1967. Results of the first interlaboratory tests on plastics. Int. Biodetn. Bull. 3:15.
- 6)Mills, J., Barnes, T.J. & Eggins, H.O.W. 1971. Talaromyces emersonii-A possible biodeteriogen. Int. Biodetn. Bull. 7:105-108.
- 7)Mills, J. & Eggins, H.O.W. 1970. Growth of thermophilic fungi on oxidation products of polyethylene. Int. Biodetn. Bull. 6:13-17.
- 8)Gómez Cruz, G. 1973. Contribución al conocimiento de la degradación microbiana de materiales plásticos. Tesis Profesional. -- Facultad de Ciencias. UNAM. México.

- 9) Odum, E. 1971. Ecología. Ed. Interamericana. México.
- 10) Brown, B.S., Mills, J. & Hulse, J.M. 1974. Nature. 250:161-163.
- 11) Alter, H. 1960. Metal-catalyzed oxidation of polyethylene. --  
Ind. Engng. Chem. 52:121-124.
- 12) Rabek, J.F. & Ranby, B. 1975. Photodegradation, photo-oxidation and photostabilization of polymers. John Wiley & Sons. N.Y.
- 13) Rohde, P.A. et. al. 1974. Manual de procedimientos de laboratorio y de productos BBL. Editores Asociados, S.A. México.
- 14) Association of Official Analytical Chemists (A.O.A.C.). 1970. 42.014, 42.016, 45.012, 45.018. Ed. William Horwitz. Washington.
- 15) Davis, B.D., Dulbecco, R., Eisen, H.N., Ginsberg, H.S. y Wood, W.B. - 1972. Tratado de microbiología. Salvat Editores, S.A. Barcelona.
- 16) Bryan, A.H., Bryan, C.A. & Bryan, C.G. 1962. Bacteriology. Barnes & Noble, Inc. New York.
- 17) Jawetz, E., Melnick, J.L. y Adelberg, E.A. 1970. Manual de microbiología médica. El Manual Moderno, S.A. México.
- 18) Barnett, H.L. 1955. Illustrated genera of Imperfect Fungi. --- Burgess Pub. Co. U.S.A.
- 19) Raper, K.B. & Thom, C. 1949. A manual of the Penicillia. The -- Williams & Wilkins Co. Baltimore.
- 20) Raper, K.B. & Fennel, D.I. 1965. The genus Aspergillus. The --- Williams & Wilkins Co. Baltimore.

- 21)Alexopoulos,C.J. 1968. Introductory mycology. Wiley & Sons, Inc. New York.
- 22)Tietz,N. 1972. Química clínica moderna.Ed. Interamericana.- México.
- 23)Rose,A.H. 1969. Microbiología química. Ed. Alhambra. Madrid.
- 24)Negrón-Mendoza,A. & Ponnampertuma,C. 1975. Effects of gamma-radiation on some biologically important carboxylic acids - in aqueous solutions. 1<sup>er</sup> Congreso de Química del Continente de América del Norte. México.