

91  
207



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ASLAMIENTO DE MICROORGANISMOS QUE INTERVIENEN  
EN LA BIODETERIORACION DE POLIETILENO MODIFICADO  
CON FECULA DE MAIZ

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO  
P R E S E N T A :  
VALERY PATRICIA MENDEZ ROCHA



MEXICO, D. F.

1 9 9 3

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional  
Autónoma de México

UNAM



## **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 está 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.

<b>INDICE</b>	<b>Página</b>
<b>I Introducción.</b>	<b>1</b>
<b>II Generalidades.</b>	<b>3</b>
<b>III Antecedentes.</b>	<b>6</b>
<b>IV Objetivos.</b>	<b>13</b>
<b>V Material y Métodos.</b>	
<b>V.I Material Utilizado.</b>	<b>14</b>
<b>V.II Aislamiento de Microorganismos.</b>	<b>16</b>
<b>V.III Comprobación de Biodeterioro.</b>	<b>19</b>
<b>V.IV Identificación de Microorganismos.</b>	<b>24</b>
<b>VI Resultados y Discusión.</b>	<b>26</b>
<b>VII Conclusiones.</b>	<b>51</b>
<b>Anexo I.</b>	<b>52</b>
<b>Anexo II.</b>	<b>53</b>
<b>Bibliografía.</b>	<b>54</b>

## **I INTRODUCCION.**

## **INTRODUCCION.**

Al paso de los años y con el desarrollo tecnológico efectuado por el hombre surgen problemas como la contaminación ambiental que se incrementa con el avance de la civilización.

La contaminación ambiental abarca varios aspectos tales como : contaminación auditiva (por grandes ruidos), contaminación del aire (por gases y polvos diversos), y también de los ríos, mares, capas freáticas y suelos, ocasionada por la acumulación e incremento de materiales de deshecho o basura de diferente naturaleza, siendo esta última forma de contaminación la que ha motivado este trabajo.

En la basura se encuentran innumerables productos de consumo diario, como son los plásticos, los que constituyen del 5 al 10% de la basura urbana, esto se debe a que en el desarrollo de la tecnología para el beneficio del hombre, muchas veces no se toma en cuenta al medio ambiente en que éste se desenvuelve, enfocándose únicamente a las ventajas de la vida cotidiana, tal es el caso de los plásticos, los que han tenido un gran auge y por ello se realizan múltiples investigaciones, desde la síntesis de diferentes plásticos con el fin de mejorar sus características y aumentar sus usos, así como amplios estudios de producción, sin embargo pocas son las investigaciones dedicadas a su eliminación después de ser usados.

El principal problema de estos plásticos, estriba en el hecho de que los materiales que los constituyen no se reincorporan al ciclo ecológico natural, pasando a ser contaminantes. Para afrontar esta problemática, existen dos tendencias, la primera es el hecho de formular plásticos cuyos componentes sean biodegradables, y una segunda tendencia es preparar plásticos reciclables.

En este trabajo se consideró la primera tendencia, y se realizó con el apoyo del Instituto de Investigaciones en Materiales, Departamento de Polímeros, de la UNAM, que ha desarrollado un polietileno adicionado con fécula de maíz, el cual fué utilizado como material de estudio para comprobar una posible biodegradación ó biodeterioración causada por microorganismos que actúen sobre éste.

Con tal fin en este trabajo se realizó el aislamiento e identificación de microorganismos que se desarrollan sobre éste plástico. Posteriormente para comprobar el posible biodeterioro o la posible biodegradación de los microorganismos aislados fueron inoculados sobre el material en cuestión, procediéndose a incubarlos en diferentes periodos de tiempo y a determinar el peso seco del material y su resistencia mecánica.

## **II GENERALIDADES.**

## GENERALIDADES.

### Conceptos de Biodegradación y Biodeterioración.

El concepto de "biodeterioración" durante muchos años se prestó a gran confusión, ya que no se tenían parámetros establecidos para definirlo. En la actualidad la controversia es menor, no porque se tengan los parámetros definidos, si no porque se introdujo el concepto de "biodegradación" y un parámetro que rige a éste.

Tomando en cuenta lo anterior, en este trabajo se entiende por :

**Biodegradación:** Es la transformación de una sustancia hasta llegar a sus elementos ó componentes primarios ocasionada por bacterias, hongos, insectos, roedores y otros animales.

**Biodeterioración:** Es la alteración de una sustancia o de sus componentes causada por bacterias, hongos, insectos, roedores y otros animales. Es decir, una fase anterior a la biodegradación.

### Concepto de Plástico.

Los plásticos son polímeros, que como materiales se aplican en forma de planchas, tubos, películas y numerosos objetos moldeados. Su estructura molecular es de dos tipos generales: moléculas largas, lineales o ramificadas y moléculas de red espacial. Dentro del primer tipo entran distintos polialquenos como polietileno, policloruro de vinilo, poliestireno, etc., estos polímeros se les llama también termoplásticos, en razón de su ablandamiento por calentamiento. En este trabajo solamente será considerado el polietileno.

El polietileno esta formado por numerosas unidades o monómeros de etileno, las que se polimerizan mediante la aplicación de presión o mediante el uso de catalizadores con radicales libres, catiónicos o aniónicos que aceleran la reacción en cadena.



Los tipos mas comunes de polietilenos son el de baja densidad (PEBD) y de alta densidad (PEAD) con una gama de grados cada una de ellos, el de baja densidad se produce mediante la aplicación de altas presiones solamente y el de alta densidad requiere además, el uso de un catalizador; este proceso se conoce como proceso Ziegler, aunque ya existen otras variantes. Ambos tipos se diferencian por sus propiedades físicas y químicas.

El peso molecular medio del PEBD es del orden de 10,000-40,000, mientras el PEAD es mucho mayor de 20,000-3,000,000(22).

Presentan una elevada resistencia a los productos químicos, a excepción de halógenos libres, ácidos oxidantes y bencenos clorados, siendo insolubles en el resto de los disolventes a temperaturas reducidas.

Poseen diferentes grados de susceptibilidad a la degradación ésta puede ocurrir por agentes químicos así como por procesos biológicos que determinan reacciones de oxidación o de hidrólisis. En el caso del polietileno es de interés conocer que los grados de degradación son diferentes según se trate de un polietileno de alta o de baja densidad, entendiéndose por grados de degradación la descomposición en la estructura del polímero (3).

Respecto a sus características físicas se tiene que a medida que aumenta la densidad, disminuye la resistencia al impacto, la transparencia y la resistencia al agrietamiento en medios agresivos. Entre márgenes similares de densidad, un aumento de peso molecular incrementa la resistencia a la corrosión, baja la tensión al impacto y al desgarre.

Las características mecánicas y térmicas de los plásticos, están en función de la distribución del peso molecular de las macromoléculas que lo constituyen, así como en la fluidez del material fundido.

Hay mezclas de polímeros que se incorporan a diferentes temperaturas dando lugar a las llamadas aleaciones. Existen también macromoléculas que contienen dos monómeros diferentes en su estructura, denominándose copolímeros. Tanto las aleaciones como los copolímeros tienen propiedades diferentes a los de sus componentes.

Normalmente a todos los plásticos se les añaden pequeñas cantidades de aditivos, que mejoran alguna característica del material base, y pigmentos que proporcionan otros colores comercialmente mas interesantes.

Así, por ejemplo en ciertos casos se adiciona negro de humo en aproximadamente un 2%, que filtra los rayos ultravioleta y evita la fotooxidación. También se añaden fenoles sustituidos y aminas aromáticas que reducen la oxidación causada por temperaturas elevadas.

Son usados agentes antiestáticos ya que durante las operaciones de transformación y mecanizado hay probabilidad que se hayan cargados eléctricamente.

Sus características técnicas pueden mejorarse con fibras reforzantes, que aumentan la rigidez y dureza, y disminuyen el coeficiente de dilatación térmica, entre otros efectos (13).

Los polietilenos pueden espumarse mediante la acción de ciertos agentes gasificantes, que producen estructuras celulares esto es burbujas uniformemente distribuidas en la masa del plástico. Este procedimiento se aplica en la producción de objetos prefabricados (paneles, láminas) de baja densidad.

La resistencia a la tensión es una prueba mecánica que se realiza a los plásticos para conocer su deformación, la tensión en el estado sólido es la magnitud de dimensiones fuerza/sección transversal capaz de producir una deformación elástica.

La curva de esfuerzo-deformación a la tracción se obtiene por la acción de carga sobre una muestra estándar, es decir mediante la aplicación suficientemente lenta de carga, para que todas las partes de la muestra estén en equilibrio en todo instante. La curva se obtiene en general, regulando la rapidez de la carga en la máquina de tracción.

### **III ANTECEDENTES.**

## ANTECEDENTES.

Muchos tipos de plásticos han sido estudiados con el fin de hacerlos biodegradables, ya sea modificando su estructura, añadiendo aditivos o exponiéndolos a diversas condiciones físicas.

Hay plásticos como el PVA (alcohol polivinílico), que han sido ampliamente estudiados, ya que se espera que conociendo los posibles mecanismos y enzimas que actúan en su degradación, las diferentes técnicas empleadas puedan ser de utilidad para el estudio de otros plásticos.

En relación al PVA, destacan los trabajos de Suzuki(29), donde el PVA fue expuesto a *Pseudomonas* aisladas del suelo, éstas bacterias secretan enzimas que actúan sobre el PVA, llegando así no solo a una biodegradación del plástico, si no también al estudio de los microorganismos pudiendo tener una aplicación industrial. Una fracción de la enzima fue separada a través de una columna cromatográfica de intercambio iónico y sus propiedades fueron examinadas, observándose la producción de peróxido de hidrógeno( $H_2O_2$ ), lo que indica que la enzima es una clase de oxidasa, los grupos encontrados son carboxil y metil-cetonas.

La preocupación por el incremento de residuos contaminantes de plástico ha originado estudios donde se establece que estos residuos son susceptibles a degradación por acción microbiana. Booth y Cooper(8), aislaron 63 cultivos bacterianos, posibles degradadores de PVA, donde 23 de ellos pertenecen a los géneros *Pseudomonas* sp., *Brevibacterium* sp., *Achromobacter* sp. y *Nocardia* sp., destacándose como más activas *Pseudomonas fluorescens* y *Achromobacter* sp., lo anterior permite suponer que deben existir otras especies así como géneros capaces de degradar otros plásticos.

En cuanto a la degradación de polímeros por bacterias, se sabe que el polímero poli-beta-hidroxibutarato es una importante reserva intracelular y se encuentra como gránulos intracelulares en microorganismos como *Rhodospirillum rubrum*.

Aunque el mecanismo de digestión del poli-beta-hidroxibutarato por enzimas es complejo, Delafield y Doudorof(10) aislan *Pseudomonas* las cuales son capaces de digerir el polímero purificado, obteniendo buenos resultados con *Pseudomonas testosteroni*, donde aislaron la enzima que degrada al poli-beta-hidroxibutarato.

Propusieron así que estudios semejantes deben realizarse con otros polímeros que van aumentando sus pesos moleculares, los cuales pueden estar constituidos por otras sustancias, como lo menciona Catwell(9), donde revisa la utilización de isoprenoides acíclicos por *Pseudomonas aeruginosa*, *P.fluorescens*, *P.mendocinas* así como *P.citronellolis*.

Entre los hongos estudiados como posibles degradadores de plásticos, se encuentra *Penicillium* sp. que ha sido puesto en termopolímeros utilizados como envases comerciales, las alteraciones de éstos envases se observan mediante técnicas de Centelleo de carbono 14 así como espectrofotometría de rayos infrarrojos(18).

Otros hongos corresponden a *Aspergillus niger*, *Trichoderma* sp. y *Cladosporium herbarum*(6) los que son capaces de atacar también a poliuretanos y polietilenos.

Albertsson y Ranby(2) utilizan el método de centelleo de carbono 14, ellos aseguraron que con éste método se puede seguir toda la degradación en diferentes periodos de tiempo y estudiar otros polietilenos en diversas condiciones. Esta afirmación deriva del estudio que realizaron, en el que emplearon un polietileno lineal adicionado con dotriocotane C<sub>32</sub>H<sub>66</sub>, el que en estudios previos se reporta como polímero biodegradable(1), demostrando que en este polietileno especial añadido con el aditivo y colocado en un medio nutritivo, crecen diferentes hongos destacándose *Fusarium redolens*, y otros hongos aislados del suelo como: *Aspergillus versicolor*, *Verticillium lecanii*, *Acremonium kiliense*, y otros cuya especie no se verificó, tal es el caso de *Phialomyces* sp., *Sporothrix* sp. entre otros.

Otra técnica sensible a la evaluación de una posible degradación corresponde a la técnica rápida descrita por Shuttleworth y Kenneth(28). estos investigadores utilizaron películas de termoplásticos, las cuales se inocularon con microorganismos y observaron directamente bajo el microscopio, haciendo una evaluación de los efectos en poco tiempo, ya que la experiencia demuestra que se necesitan largos periodos para que el mecanismo de biodegradación manifieste un cambio de las propiedades físicas del material.

La técnica puede ser utilizada en cualquier termoplástico ya sea polietileno, poliuretano o poliestireno. En el trabajo de éstos investigadores ellos comprueban la técnica con un poliuretano constituido por: Polietileno-butadieno-adipato, Polihexanodiol carbonato, Policaprolactonadiol, Poliester comercial y Polieter comercial, en este poliuretano inocularon el hongo Gliocladium roseum que produce esterases cuya actividad es inducida por la presencia de poli-caprolactona, causando el biodeterioro del poliuretano en un periodo de alrededor de 28 días. La observación microscópica del material mediante tinciones selectivas reveló la presencia de micelios.

Los resultados se pueden obtener en una semana teniendo patrones comerciales de los plásticos estudiados, técnica que puede ser usada con cualquier tipo de microorganismo.

Potts(24) y Haines y Alexander(12) con objeto de demostrar que la degradación se efectúa sobre el polietileno y no sobre el aditivo, y en la búsqueda del peso molecular ideal para que se lleve a cabo la biodegradación, compararon dos polietilenos de bajo peso molecular uno lineal y otro ramificado, observando que el lineal con peso molecular(PM) de 600 presentó menor crecimiento de hongos que el ramificado de PM400.

Potts propone la síntesis de polietilenos lineales de PM de 2600 a 9700, con una fracción de polietilenos ramificados de P.M. 1350 como vaselina, en esta mezcla al igual que en el polietileno ramificado de PM 400 observó el crecimiento de hongos. En polietilenos de PM mayores a 12800 lineales o

con ramificaciones se observa un escaso desarrollo fúngico. Lo que confirma que a mayor PM menor susceptibilidad de crecimiento microbiano.

La pirólisis del polietileno lineal de altas densidades, así como el polietileno de bajas densidades da lugar a mezclas de PM entre 1000 y 1900 los cuales favorecen el crecimiento de colonias de hongos(5).

Los resultados indicaron que los oligómeros de bajos pesos moleculares son utilizados como sustratos. Una investigación posterior para confirmar los estudios de Potts, indicó que polietilenos de alta densidad y de baja densidad en una mezcla de 1 a 6, con uso comercial, al ser expuestos a un grupo de hongos estudiados anteriormente, pierden el 13.7% de su peso en 30 semanas. Esta pérdida de peso puede ser explicada por el posible ataque al polietileno de bajo peso molecular y quizás a la formación de dobles cadenas de carbono que son aisladas.

Sin embargo, en futuros estudios se deberá mostrar cual es la fracción degradada del polietileno.

Una de las conclusiones es que polietilenos de altos pesos moleculares no son susceptibles a la biodegradación microbiana, no obstante éstos polietilenos mezclados con otros polietilenos de pesos moleculares mas bajos pueden ser degradados, y esta acción puede ser favorecida si se le añaden aditivos biodegradables.

Por otro lado Kumar(16) menciona que estando las cadenas de polietileno plegadas, como regularmente se encuentran en su parte final, son inaccesibles a la mayor parte de las enzimas microbianas, no obstante no descarta la posibilidad de que este desdoblamiento pueda llevarse a cabo por algunos hongos.

Hosoya(14) aisló bacterias capaces de crecer en polietilenos de PM de 500, sin embargo no menciona la influencia del PM en el crecimiento de microorganismos.

Iman y Gould(15), reportaron un amplio estudio realizado con polietileno que contiene pro-oxidantes y un 6% de almidón. En el utilizaron cepas de colección de *Streptomyces viridosporus* T74, *Streptomyces setonii* 75Vi2 y *Phanerochaete chrysosporium* ME446 las que tienen antecedentes probables biodegradadores de polietileno. La biodegradabilidad fue evaluada por pérdida de peso, cambios en el porcentaje de elongación y cambios en la distribución del PM del polietileno. Sus resultados indicaron que los plásticos polietilenos comerciales constituidos con pro-oxidantes y 6% de almidón pueden ser biodegradados y que la cepa mas activa corresponde a *Phanerochaete chrysosporium* ME446.

México no se ha quedado atrás en la investigación de plásticos biodegradables y biodeteriorables; en el Instituto Politécnico Nacional, se aborda el tema desde la perspectiva de los plastificantes usados en la preparación de diversos plásticos, buscando que dichos plastificantes sean hidrolizables, utilizando en sus investigaciones plastificantes tales como: ftalato de dibutilo y adipato de dioctilo(20).

En el aislamiento de microorganismos degradadores de plastificantes, se encuentra que el 50% son hongos y el microorganismo mas eficaz es *Rhodotorula* sp; con éstos resultados se lleva a cabo la biodegradación del cloruro de polivinilo adicionado con ftalato de dioctilo por *Rhodotorula* sp.(21), se estudia el efecto de la temperatura, la aereación y el pH, sobre la actividad hidrolítica de *Rhodotorula* sp. sobre el ftalato de dioctilo, comprobando mediante la pérdida de peso de la película plástica si existe una hidrólisis del plastificante.

Por otro lado, en el Instituto Mexicano del Petróleo se realizaron proyectos a cerca de formulaciones para la obtención de poliolefinas biodegradables(25), trabajaron sobre el desarrollo de compuestos que sean susceptibles a ser atacados por la acción de las enzimas de los microorganismos. Para lo cual se elaboraron películas biodegradables con resinas y aditivos como almidón y las expusieron a diferentes condiciones



que incluyen el ataque por hongos y bacterias tales como: Pseudomonas aeruginosa, Aspergillus niger, Penicillium foncluosum, Gliocadium virens y Chaetomium globosum, así como también al intemperismo natural y enterramiento, en estas condiciones se observa que las formulaciones de mayor cantidad de almidón son las que manifiestan mayor tendencia a la biodegradación siendo la concentración del aditivo mas adecuada de 5 al 10% en peso.

En el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM, Departamento de Polímeros, existen también importantes trabajos en la elaboración de películas plásticas de PEBD degradable, mediante la inclusión de cargas orgánicas donde se utiliza fécula de maíz en diversas concentraciones(27), así como aceite puro de maíz como lubricante, buscando con esto , la obtención de una película plástica que conserve las propiedades comerciales adecuadas y que sea biodeteriorable.

En el cuadro I se enlistan algunos microorganismos y los sustratos utilizados por ellos.

## Cuadro I.

<u>Pseudomonas sp</u>	PVA	29
<u>Brevibacterium sp</u>	PVA	8
<u>Nocardia sp</u>	PVA	8
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>	Isoprendoides Aciclas	9
<u>Aspergillus niger</u>	Poliuretano	6
<u>Fusarium redolens</u>	Dotricotane C <sub>33</sub> H <sub>66</sub>	2
<u>Gliocladium rosseum</u>	Poliuretano	28
<u>Streptomyces viridosporus T74</u>	Poliuretano	15

#### **IV OBJETIVOS DEL TRABAJO.**

Con base en los antecedentes indicados en este trabajo se estableció como:

#### **OBJETIVO GENERAL.**

**Comprobar la biodeterioración de un material plástico producido por el Instituto de Materiales de UNAM, Departamento de Polímeros.**

#### **OBJETIVOS PARTICULARES.**

- **Aislar microorganismos presentes en plásticos.**
- **Comprobar la acción biodeterioradora y caracterización de los microorganismos aislados.**

## **V MATERIAL Y METODOS.**

## **MATERIAL.**

Las muestras de polietileno fueron proporcionadas por el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM en donde elaboran películas de baja densidad a partir de los siguientes materiales:

- Polietileno en polvo, con un diámetro de partícula de 700 micras y una densidad de 0.92g/cm.

- Fécula de maíz Globe 3501 con humedad de 10.52 a 12.5%, con una viscosidad Scott seg. de 75 y pH mínimo de 4.5 y máximo 5.5 producida por la Cía. Arancia S.A. de C.V. Este material fue usado como carga orgánica.

Al polietileno en polvo le adicionan la fécula de maíz en diferentes proporciones que fluctúan entre 0 y 45%, mezclándolos por 10 minutos, durante este periodo agregan aceite de maíz en un porcentaje de 5%, adicionándolo gota a gota para evitar la aglomeración de los componentes y obtener una mezcla homogénea, que posteriormente se lleva a humedad constante poniéndola en estufa a 40°C durante 8 horas.

En la elaboración de las películas, la extrusión se llevó a cabo en tres diferentes velocidades del husillo 32, 64 y 100 Revoluciones Por Minuto(RPM), a una temperatura de 178°C a todo lo largo del barril de extrusión, obteniéndose películas de un espesor aproximado de 1mm.

En este trabajo se emplearon películas de polietileno con 0, 10, 15, 20,25, 30, 35, 40 y 45% de fécula de maíz y extruidos a 32, 64 y 100 RPM.



▲ AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.



▲ COMPROBACION DEL BIODETERIORO.



▲ IDENTIFICACION DE MICROORGANISMOS.

## **I. Aislamiento de Microorganismos.**

**Para encontrar posibles microorganismos que atacaran al material plástico en estudio, se recurrió a diferentes "fuentes":**

- **Material plástico con desarrollo microbiano en su superficie.**
- **Material plástico procedente de depósitos de basura.**
- **Material plástico enterrado en suelo orgánico.**

**En el primer caso se tomaron muestras directas del desarrollo observado en la superficie de los plásticos, éstas se inocularon en matraces de 300ml que contenían 100ml del medio Mineral 1, adicionándose como fuente de carbono pequeños cuadros de polietileno previamente desinfectado.**

**Al material plástico procedente de depósitos de basura, se le hicieron lavados con agua estéril y solución salina isotónica, con alícuotas de 5ml de estos lavados son inoculados como en el primer caso matraces con medio Mineral 1.**

**Para el aislamiento de microorganismos procedentes del suelo se enterraron muestras de polietileno en estudio, en macetas que contenían suelo rico en materia orgánica, estas se colocaron el invernadero a temperatura de 28°C manteniéndose húmedas. Al término de 150 días las muestras se sacaron y fueron lavadas 2 veces con agua estéril, para eliminar las partículas de suelo prosiguiendo con un lavado de agua estéril y 2 de solución salina isotónica, empleándose el líquido de los últimos 3 lavados para inocular matraces en las condiciones antes referidas.**

**Los matraces inoculados se incubaron a 28°C durante 45 días.**

**De los matraces en los que se observó cierto desarrollo, con objetivo de enriquecer la población microbiana se procedió a transferir 5ml del cultivo correspondiente a otro matraz que contenían el medio indicado, se incubó nuevamente a 28°C durante 30 días, después de los cuales se repitió el procedimiento.**



Al concluir el tiempo de incubación establecido, se seleccionaron los matraces que presentaron mayor desarrollo microbiano, procediéndose al aislamiento por el método de diluciones y siembra en placa vertida, para ello se usaron los siguientes medios de cultivo: agar nutritivo, agar nutritivo adicionado con Nistatin, agar PDA y agar Rosa de Bengala (Anexo 1) incubándose a 28°C por un periodo de 3 a 5 días, después de los cuales se observó el desarrollo de colonias separadas a partir de las que se inocularon tubos que contenían agar nutritivo y agar PDA inclinados, incubándose en las condiciones indicadas. Estos cultivos fueron conservados en refrigerador.

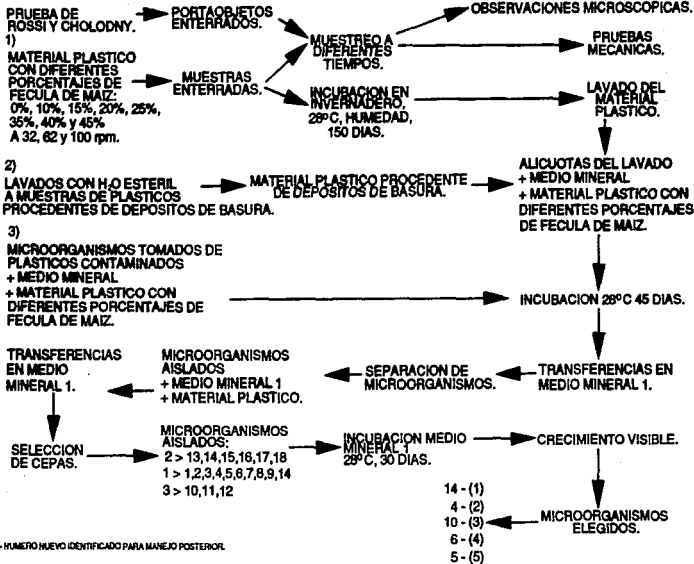
Con el fin de comprobar que los microorganismos aislados tenían la capacidad de utilizar el material en estudio como fuente de carbono, estos fueron sometidos nuevamente a condiciones nutricionales estrictas por lo que se inocularon en medio Mineral 2 con polietileno realizándose una nueva selección en la que se deshecharon aquellas cepas que dieron lugar a crecimiento escaso y se conservaron aquellas que originaron el mejor desarrollo.

Para determinar el biodeterioro del polietileno se utilizaron muestras enterradas en macetas que se conservaron en invernadero en las condiciones referidas y que se recuperaron después de 1,2,3,4,8 y 12 semanas.

Al mismo tiempo se dio seguimiento de la microflora presente en el suelo empleando el método de Rossy y Cholodny(26) que consiste en la observación microscópica de los microorganismos adheridos a portaobjetos, los cuales estuvieron enterrados en las macetas, obteniéndose en los mismos periodos de tiempo que las muestras de polietileno en estudio.

Las muestras de plástico se llevaron al Instituto de Investigaciones de Materiales de la UNAM, en donde se aplicaron las pruebas mecánicas de resistencia a la Tensión.

## **AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS.**



## II. Comprobación del Biodeterioro.

La comprobación del biodeterioro se puede efectuar en cultivos microbianos provistos de los elementos esenciales para el crecimiento de los microorganismos que atacan el material o mediante la adición de enzimas purificadas (18).

Para establecer el grado de degradación, es decir el biodeterioro del plástico, la ASTM (American Society for Testing and Materials) (4) indica las siguientes determinaciones:

Incremento de masa celular

Producción de CO<sub>2</sub>

Consumo de O<sub>2</sub>

Determinación química de diferentes productos de transformación

Cambios en el polímero

Pruebas físicas monitoreadas tales como:

Determinación del PM

Viscosidad

Tensión

Fuerza

Pérdida de peso

Morfología de enlaces.

En este trabajo para valorar la acción de los microorganismos aislados sobre el material en estudio se procedió a:

- Cultivar a los microorganismos aislados y seleccionados en presencia del polietileno.

- Determinar en el cultivo:

\* Incremento de desarrollo microbiano.

\* Contenido de nitrógeno proteico por el método de microKjeldhal modificado por Mitchell (19).

\* Pérdida de peso del material plástico (17).

Para ello se prepararon 156 matraces con medio de cultivo mineral, estos se dividieron en tres series a las que se agregó polietileno extruido a 32 RPM con diferentes porcentajes de fécula de maíz 0%, 10% y 15%.

Las muestras se obtuvieron a los 15, 20, 25 y 55 días, Cuadro II.

## Cuadro II

Número de Matraces Inoculados con los Diferentes Microorganismos Aislados.

Testigo	4	4	4
1	8	8	8
2	8	8	8
3	8	8	8
4	8	8	8
5	8	8	8
Mezcla	8	8	8

Poliétileno extruído a 32 RPM.

[1] - 0% de Fécula de Maíz en el poliétileno.

[2] - 10% de Fécula de Maíz en el poliétileno.

[3] - 15% de Fécula de Maíz en el poliétileno.

Temperatura de Incubación 28°C.

Con objeto de favorecer la superficie de contacto entre los microorganismos y el polietileno, este material fue fraccionado en cuadritos de 0.5 x 0.5 cm, colocándose 20 cuadritos en matraces de 500ml en donde se desinfectaron mediante tres lavados con hipoclorito de sodio y cuatro lavados con agua destilada estéril, el material plástico desinfectado y lavado se colocó en estufa a una temperatura de 39°C hasta que alcanzó un peso constante y en condiciones de asepsia, se agregó a cada matraz que contenía el medio de cultivo mineral 2. Posteriormente se inoculó con los diferentes microorganismos aislados.

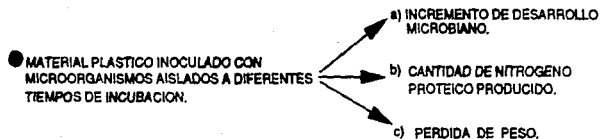
Simultáneamente se trabajó con 2 matraces de cada microorganismo y se agregó el material plástico sin fraccionar extruido a 32RPM, con 15% de fécula de maíz y aún cuando no se realizó el seguimiento total, estos fueron incubados durante 150 días después de los cuales se determinó únicamente el peso seco del material plástico.

El incremento del desarrollo microbiano se realizó mediante una relación comparativa con cada matraz.

Para la determinación del nitrógeno proteico se homogenizó el contenido de cada matraz en una agitadora durante 15 minutos y se tomaron 5ml de alícuota los que se digirieron, determinándose el contenido de nitrógeno por el método de microKjeldhal modificado por Mitchell (Anexo II).

Para determinar el peso seco del polietileno, la fracción líquida el cultivo se desechó; para eliminar el micelio adherido el material plástico se lavó 3 veces con hipoclorito de sodio y 3 veces más con una solución de Tween 80 al 20% y finalmente con agua destilada, y se llevó nuevamente a peso constante.

## **COMPROBACION DEL BIODETERIORO.**



## b) CUANTIFICACION DEL NITROGENO PROTEICO.

CONTENIDO DE LOS MATRACES  
CON DETERMINADO  
TIEMPO DE INCUBACION.

OBSERVACION MACROSCOPICA  
DEL CRECIMIENTO

HOMOGENIZACION DE LA SUSPENSION:  
15 MIN. EN AGITADORA A TEMPERATURA  
AMBIENTE.

CUANTIFICACION POR MEDIO DEL  
METODO DE MICRO-KJELDHAL MODIFICADO  
POR MITCHEL.

## c) PERDIDA DE PESO.

1) MATERIAL PLASTICO INICIAL  
CON 0%, 10%, y 18% DE  
FECULA DE MAIZ.

FRACCIONAMIENTO DEL  
MATERIAL 0.5 x 0.5 cm.

LAVADOS CON  
HIPOCLORITO Y  
AGUA ESTERIL.

LLEVAR A PESO  
CONSTANTE.

LAVADO DEL MATERIAL CON  
HIPOCLORITO, TWEEN,  
Y AGUA ESTERIL.

INCUBACION 28° C,  
15, 20, 25, 55 DIAS.

MATERIAL DE PESO CONOCIDO  
+ MEDIO MINERAL 1  
+ MICROORGANISMO.

LLEVAR A PESO CONSTANTE.

DETERMINACION DEL  
% DE PERDIDA DE PESO.

2) MATERIAL PLASTICO CON  
15% DE FECULA DE MAIZ  
SIN FRACCIONAR.

LAVADO CON HIPOCLORITO  
AGUA ESTERIL.

PESO CONSTANTE.

LAVADO DEL MATERIAL  
CON HIPOCLORITO  
TWEEN  
AGUA ESTERIL.

INCUBACION 28°C  
150 DIAS.

MATERIAL DE PESO CONOCIDO  
+ MEDIO MINERAL 1  
+ MICROORGANISMO.

LLEVAR A  
PESO CONSTANTE.

DETERMINACION DEL  
% DE PERDIDA DE PESO.



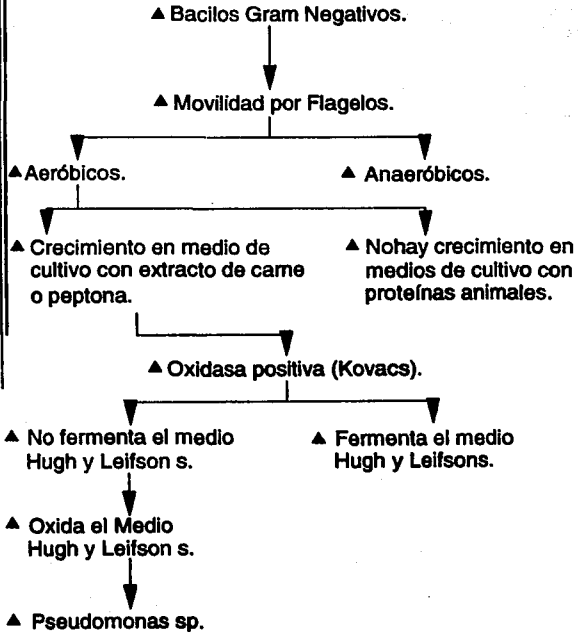
### **III. Identificación de Microorganismos.**

**Para la identificación de bacterias se determinaron sus características microscópicas, culturales y bioquímicas las cuales se indican en el cuadro III.**

**Para determinar el género de los hongos aislados se siguieron los parámetros utilizados en el Atlas de Micología de J.A. VON ARX, procediéndose a determinar:**

- **Presencia o ausencia de esporas móviles.**
- **Presencia o ausencia de micelio verdadero.**
- **Tipo de hifas (cenocítico o septado).**
- **Tipo de estructuras reproductivas.**
- **Formación de estructuras especiales.**

**CUADRO III.**



## **VI RESULTADOS Y DISCUSION.**

## RESULTADOS Y DISCUSION.

Se aislaron un total de 19 microorganismos, distribuidos de la siguiente manera:

		Y G O S
Material plástico con desarrollo microbiano en su superficie:	2	1
Material plástico procedente de depósitos de basura:	1	5
Material plástico enterrado en suelo orgánico:	4	6

De éstas "fuentes" utilizadas en el aislamiento de microorganismos, el suelo orgánico presentó el mayor número de microorganismos aislados, seguido por el material plástico procedente de depósitos de basura y por último el material plástico con desarrollo microbiano en su superficie; se observó que los hongos se encontraron en mayor número, doce hongos por solo siete bacterias, lo que dificultó el aislamiento de las bacterias y por ello se utilizaron medios con Nistatin, para inhibir el crecimiento tan abundante de hongos.

De éstos microorganismos se seleccionaron cinco mediante una evaluación comparativa del crecimiento, los cuales fueron inicialmente identificados por sus características macroscópicas y microscópicas, éstas son mostradas en el cuadro IV.

## Cuadro IV

Microorganismo	Características Macroscópicas	Características Microscópicas
1	Hongo blando algodónoso crecimiento lento.	Micelio septado.
2	Hongo verde claro con pigmentación naranja, crecimiento lento.	Micelio septado.
3	Hongo verde olivo de crecimiento rápido.	Micelio septado, ramificado con conidios ramificados en forma de brocha.
4	Bacteria de colonia blanca, bien delineada redonda de consistencia un poco cremosa.	Bacilos Gram -, sin formación de esporas o cápsula.
5	Hongo verde claro, terroso de crecimiento rápido.	Micelio septado.

El criterio utilizado para la elección de los microorganismos que se manejaron en este trabajo, consideró tanto el crecimiento en el medio de cultivo, como en el material plástico en condiciones estrictas de incubación. Cabe mencionar que por cuestiones prácticas, en la parte del aislamiento de microorganismos, solo se realizó la caracterización macroscópica y microscópica, sin intentar llegar a una identificación.

En la prueba realizada por el método Rossy y Cholodny se observó una flora mixta compuesta de bacilos G-, levaduras e hifas de hongo. Estas observaciones no tuvieron cambio de la primera a la cuarta semana, con todos los porcentajes de fécula de maíz utilizados. En la octava y decimosegunda semana, se observó un incremento considerable de micelio. Esta prueba no tuvo la relevancia que se esperaba, pues siempre se observó flora mixta, aunque en la semana octava y decimosegunda se observó en todos los casos un aumento considerable de micelio.

Los Resultados de las Pruebas Mecánicas de Resistencia a la Tensión, son mostrados de la gráfica 1 a la 7.

En relación a las pruebas mecánicas de resistencia a la tensión se observa que el material plástico de 32RPM, y 10% de fécula de maíz, presentó una sensible caída a la tensión, así como también las muestras de 15% de fécula de maíz, no obstante los valores mas bajos de resistencia a la tensión se dieron en las muestras con porcentajes mas elevados de fécula de maíz, ésta no tuvo relevancia, ya que las diferencia desde la muestra inicial, hasta la decimosegunda semana de incubación son mínimas.

La muestra de 32RPM, sin fécula de maíz, tuvo una pérdida mínima de resistencia a la tensión.

Con el material de 64RPM, el comportamiento del material con 10% y 15% de fécula de maíz es muy similar e incluso con el material de 20%, pero con la pérdida de resistencia a la tensión es mejor con las muestras de 32RPM. Con los porcentajes de fécula de maíz mas elevados el comportamiento de las muestras con 32 y 64RPM es muy similar. Las muestras con 100RPM, con casi todos los porcentajes de fécula de maíz utilizados, la resistencia a la tensión fué casi constante.

En el cuadro V se exponen los resultados del seguimiento del desarrollo microbiano en matraces que contienen diferentes tipos de polietileno, éstos indican que los microorganismos uno y dos son mas eficientes para utilizar el polietileno y que en las tres series dieron lugar a un mayor desarrollo, así mismo se observó que la presencia de fécula de maíz favorece el desarrollo de todas las cepas empleadas.

En la observación macroscópica del desarrollo de los microorganismos, es de interés conocer como se llevó a cabo el crecimiento de éstos, los microorganismos uno y dos presentaron un crecimiento abundante en el material plástico y el medio de cultivo se vió turbio, el microorganismo tres presentó poco desarrollo en el medio de cultivo y en el material plástico no se observó ningún tipo de desarrollo, los microorganismos cuatro y cinco crecen principalmente sobre el material, y el medio de cultivo no se vió con desarrollo micrbiano relevante, lo que nos puede indicar un ataque directo al material.

Los resultados de la determinación de nitrógeno se muestran de la gráfica 8 a la 12.

La acumulación de nitrógeno proteico a diferentes tiempos es un indicador del aumento de masa celular, y por ello del desarrollo de los microorganismos, demostrando así que los microorganismos son capaces de utilizar como fuente de carbono al material plástico.

El nitrógeno detectado en los microorganismos uno y dos es muy similar, aunque la cantidad de nitrógeno es mayor en el microorganismo dos con el material sin fécula de maíz, por lo que el crecimiento producido puede ser debido al ataque de éste sobre el polietileno. El microorganismo tres reporta las cantidades mas bajas de nitrógeno en comparación a los otros cuatro microorganismos, los microorganismos cuatro y cinco presentaron un desarrollo similar con todos los porcentajes de fécula de maíz manejados, sin embargo, un microorganismo es bacteria y el otro hongo.

En cuanto a la mezcla de microorganismos, el crecimiento aunque es poco, es ascendente en todos los casos donde se manejó 0% y 15% de fécula de maíz, en tanto que en el caso de 10% el crecimiento se mantiene estable, quizás este porcentaje no favoreció el desarrollo de esta mezcla.

La pérdida de peso del material se reporta en las gráficas 13 a la 16.

La pérdida de peso del material plástico inoculado con los diferentes microorganismos, en intervalos de tiempos de incubación, es considerada como un parámetro mas de la acción de los microorganismos sobre el material plástico, ya que se presume que a mayor tiempo de incubación mayor pérdida de peso del material por la acción de los microorganismos.

Con respecto a los resultados de pérdida de peso el microorganismo uno, con el material de 15% reportó mayor pérdida de peso después del tiempo de incubación, así también con el 10% de fécula de maíz presenta un pérdida de peso relevante, e incluso sin fécula de maíz existe pérdida de peso, no obstante en este renglón con 0% de fécula de maíz, el microorganismo dos tuvo un desarrollo sobresaliente, pues la pérdida de peso se ve claramente como va de manera ascendente, al igual que en los casos con 10% y 15%, aunque en estos dos casos siempre inferior al microorganismo uno.

El microorganismo tres tuvo un comportamiento casi estático ya que si existió crecimiento y pérdida de peso, pero esta fué mínima y casi constante durante todo el periodo de incubación, éste microorganismo es el que provoca menos pérdida de peso.

Los microorganismos cuatro y cinco van muy a la par en cuanto a pérdida de peso, las diferencias son mínimas, siendo el material inoculado con el microorganismo cuatro, el que perdió un poco mas de peso.

De la mezcla, se observó que hubo mayor pérdida de peso con el material de 15%, aunque la diferencia con el material de 10% fué mínima y la pérdida con el material sin fécula de maíz, fué nula.

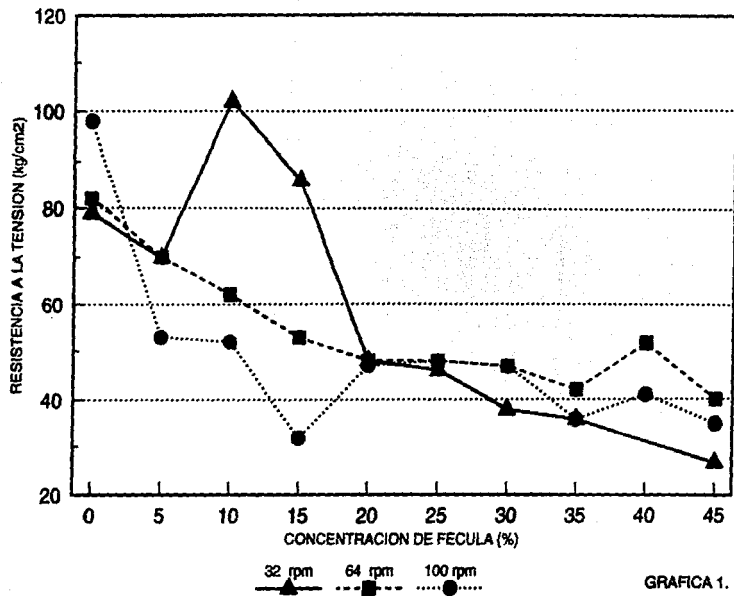
En el material sin fraccionar, existió en todos los casos pérdida de peso, siendo también en esta prueba con el material inoculado con el microorganismo uno, donde se observa mayor pérdida de peso. En el cuadro VI se muestran los resultados del material plástico sin fraccionar.

La identificación de los hongos seleccionados se expresa en los cuadros VII y VIII. El microorganismo uno, manejado inicialmente con el número catorce, fue aislado de dos fuentes diferentes, del suelo orgánico y del material plástico procedentes de depósitos de basura, y es identificado como *Sporothrix* sp., otros tres hongos aislados e identificados son *Mortirella* sp. *Trichoderma* sp. y *Penicillium* sp. los cuales actúan sobre el material plástico en estudio.

De acuerdo con el cuadro III la bacteria mas eficiente en este estudio, y la seleccionada es *Pseudomonas* sp.



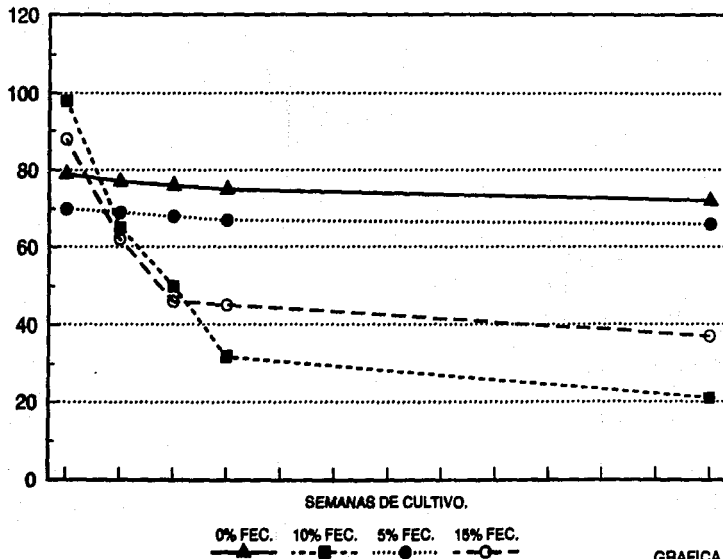
## POLIETILENO CON FECULA DE MAIZ.



GRAFICA 1.

# 32 RPM.

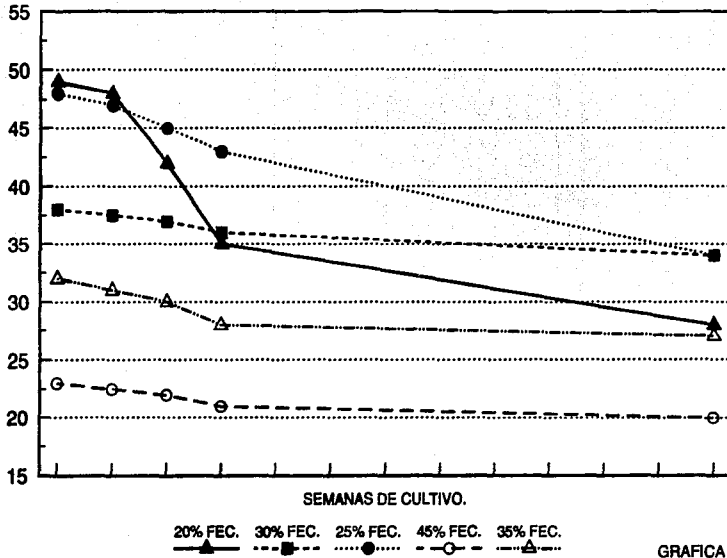
RESISTENCIA A LA TENSION. kg/cm<sup>2</sup>.



GRAFICA 2.

# 32 RPM.

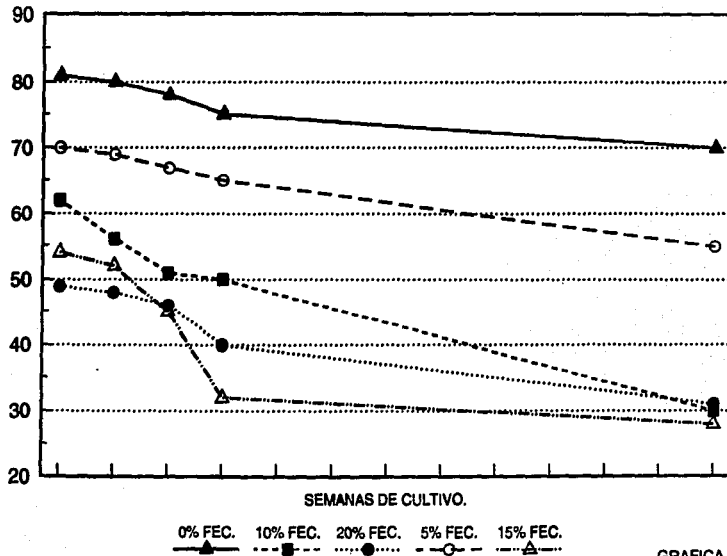
RESISTENCIA A LA TENSION. kg/cm<sup>2</sup>.



GRAFICA 3.

# 64 RPM.

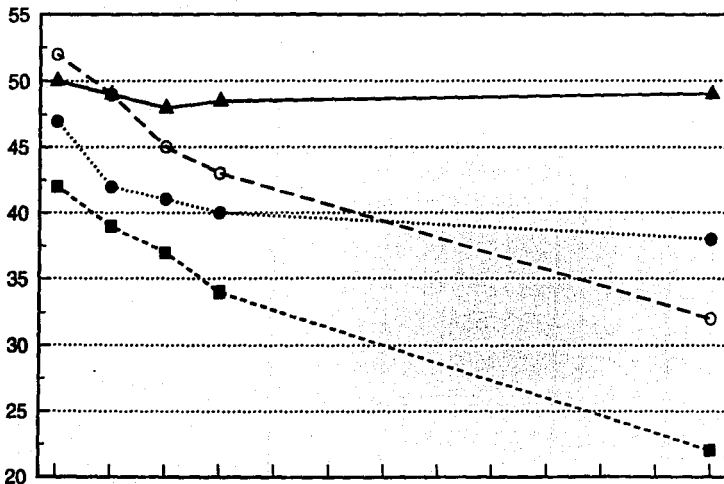
RESISTENCIA A LA TENSION. kg/cm<sup>2</sup>.



GRAFICA 4.

# 64 RPM.

RESISTENCIA A LA TENSION. kg/cm<sup>2</sup>.



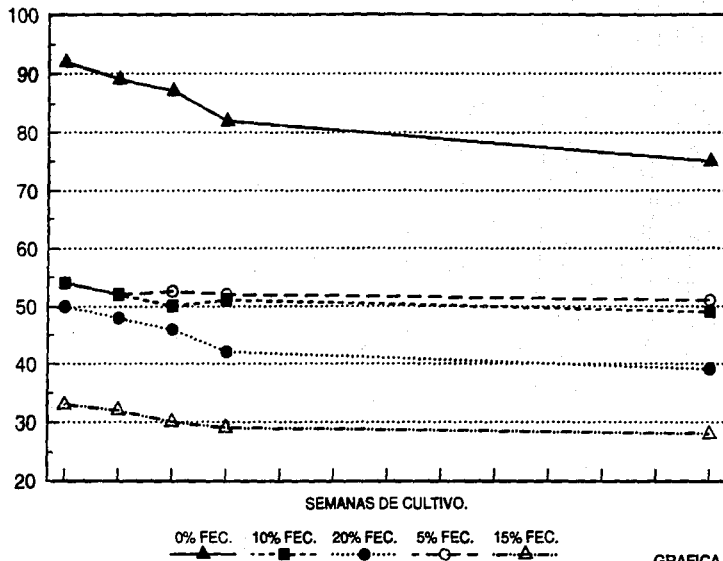
SEMANAS DE CULTIVO.

25% FEC. 35% FEC. 30% FEC. 40% FEC.

GRAFICA 5.

# 100 RPM.

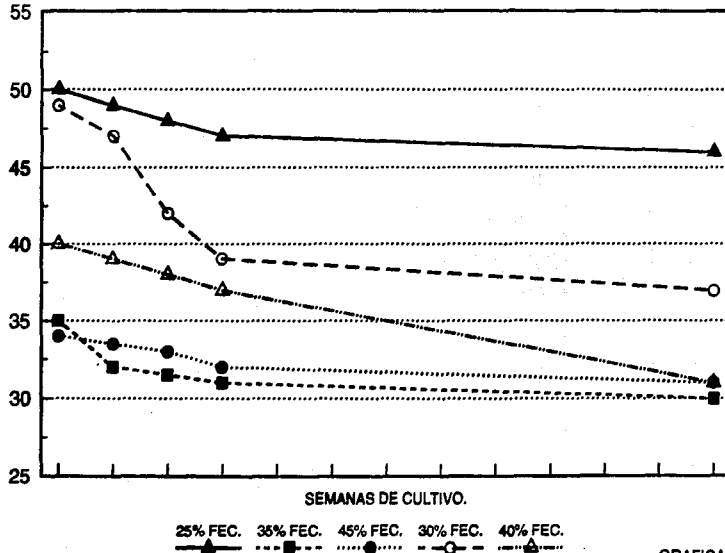
RESISTENCIA A LA TENSION. kg/cm<sup>2</sup>.



GRAFICA 6.

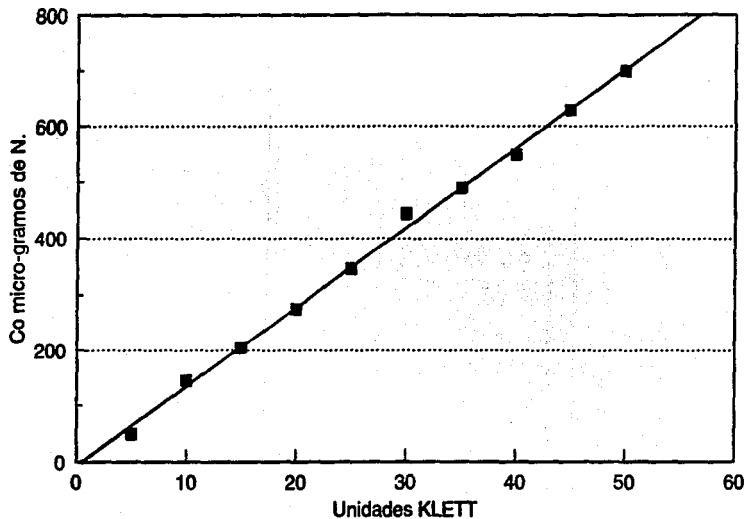
# 100 RPM.

RESISTENCIA A LA TENSION. kg/cm<sup>2</sup>.



GRAFICA 7.

**CURVA PATRON DE NITROGENO.**  
**METODO MICRO-KJELDHAL MOD. MITCHEL**  
**APARATO KLETT-SUMMERSON.**



Febrero 26, 1992.

GRAFICA 8.



**Cuadro V**  
**Evaluación Comparativa del Crecimiento Microbiano Obtenido.**

**Material Plástico con 0% de fécula de maíz**

	15	20	25	55	dfas
Testigo	-	-	-	-	
moo 1	++	++	++	++	
moo 2	+++	+++	+++	+++	
moo 3	+	+	+	+	
moo 4	+	+	+	+	
moo 5	-	-	-	+	
Mezcla I (1,2,3,4,5)	-	-	-	-	

**Material Plástico con 10% de fécula de maíz**

	15	20	25	55	dfas
Testigo	-	-	-	-	
moo 1	+++	+++	++++	++++	
moo 2	+++	+++	+++	++++	
moo 3	+	+	+	++	
moo 4	++	++	++	+++	
moo 5	++	++	++	+++	
Mezcla (1,2,3,4,5)	++	++	++	++	

**Material Plástico con 15% de fécula de**

	15	20	25	55	dfas
Testigo	-	-	-	-	
moo 1	++	++	+++	++++	
moo 2	++	++	+++	++++	
moo 3	+	+	++	++	
moo 4	++	++	+++	+++	
moo 5	++	++	+++	+++	
Mezcla I (1,2,3,4,5)	++	++	++	++	

- = ausencia de crecimiento

+ = poco desarrollo

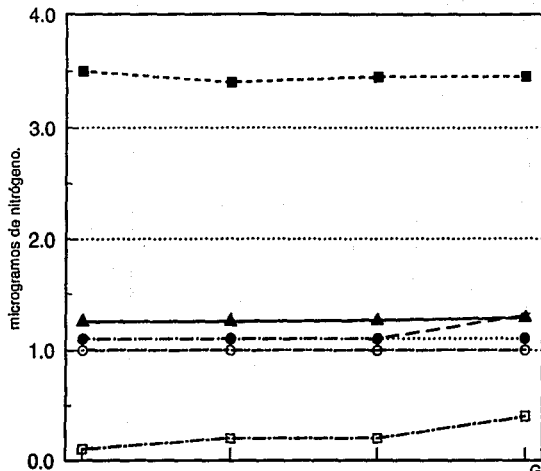
++ = desarrollo abundante en el medio de cultivo, turbidez.

+++ = desarrollo en el material (el medio de cultivo sin variaciones relevantes)

++++ = desarrollo en el material y en el medio de cultivo.

moo = microorganismo(1,2,3,4,5) ver Cuadro IV.

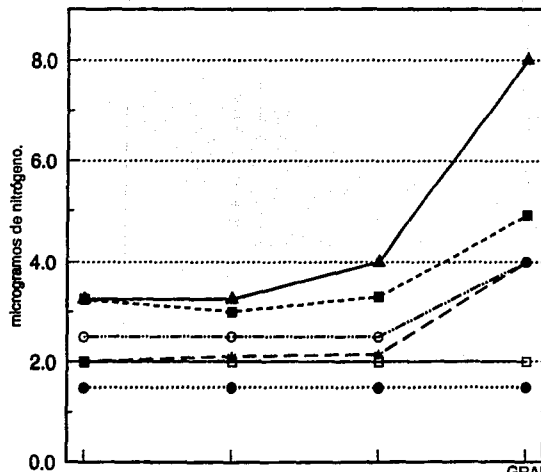
**GRAFICA DE microgramos DE NITROGENO. vs DIAS.  
MATERIAL CON 0% DE FECULA DE MAIZ.**



GRAFICA 9.

Grupo (Días)	15	20	25	35
microorganismo 1	1.25	1.25	1.26	1.28
microorganismo 2	3.50	3.40	3.45	3.45
microorganismo 3	1.1	1.1	1.1	1.1
microorganismo 4	1.1	1.1	1.1	1.3
microorganismo 5	1	1	1	1
mezcla de esp. 1,2,3,4,5	0.1	0.2	0.2	0.4

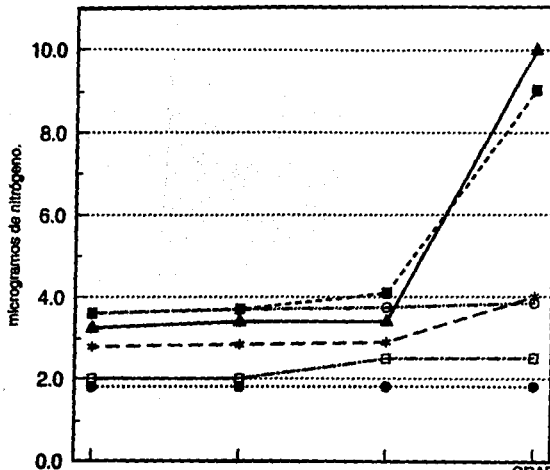
**GRAFICA DE microgramos DE NITROGENO vs DIAS.  
MATERIAL CON 10% DE FECULA DE MAIZ.**



GRAFICA 10.

tiempo (días)	15	20	25	35
microorganismo 1	3.25	3.25	4.00	8.00
microorganismo 2	3.25	3.00	3.30	4.90
microorganismo 3	1.5	1.5	1.5	1.5
microorganismo 4	2.00	2.10	2.15	4.00
microorganismo 5	2.5	2.5	2.5	4.0
muestra de mco. 1,2,3,4,5	2	2	2	2

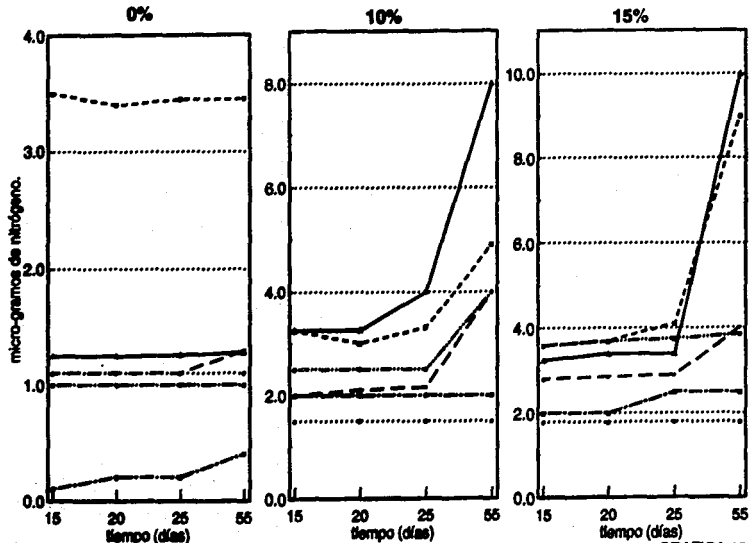
**GRAFICA DE microgramos DE NITROGENO vs DIAS.  
MATERIAL CON 15% DE FECULA DE MAIZ.**



GRAFICA 11.

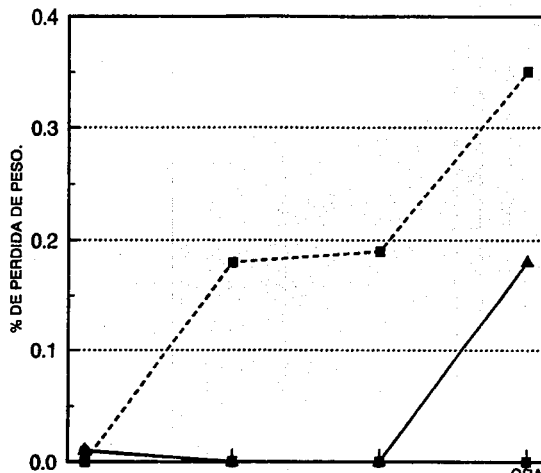
tiempo (días)	15	20	25	35
microgramos 1	3.25	3.40	3.40	10.00
microgramos 2	3.4	3.7	4.1	9.0
microgramos 3	1.8	1.8	1.8	1.8
microgramos 4	2.80	2.85	2.80	4.00
microgramos 5	2.0	2.0	2.5	2.5
cantidad de agua 1.2.3.4.5	2.0	2.0	2.5	2.5

**COMPARATIVO "microgramos Nitrógeno vs. tiempo"  
CON LOS DIFERENTES PORCENTAJES DE FECULA DE MAIZ UTILIZADOS.**



GRAFICA 12.

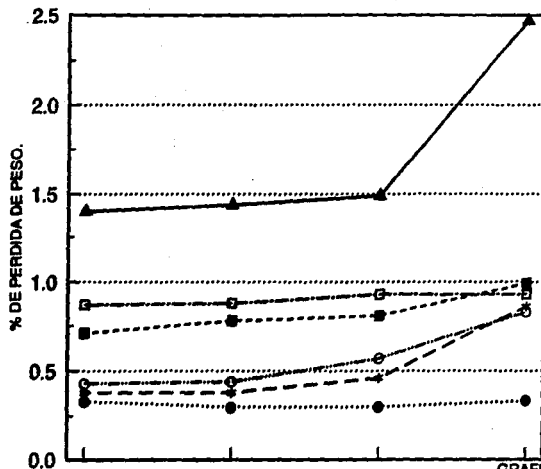
**GRAFICA DE PERDIDA DE % DE PESO vs DIAS.  
MATERIAL CON 0% DE FECULA DE MAIZ.**



GRAFICA 13.

Largo (dias)	15	20	25	35
microorganismo 1	0.01	0.00	0.00	0.18
microorganismo 2	0.00	0.18	0.19	0.35
microorganismo 3	0	0	0	0
microorganismo 4	0.01	0.00	0.00	0.00
microorganismo 5	0.01	0.00	0.00	0.00
residuo de am. 1,2,3,4,5	0	0	0	0

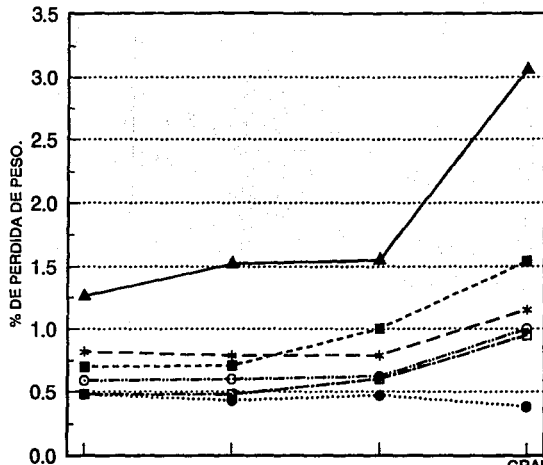
**GRAFICA DE PERDIDA DE % DE PESO vs DIAS.  
MATERIAL CON 10% DE FECULA DE MAIZ.**



GRAFICA 14.

Material (días)	15	20	25	35
Material 1	1.40	1.44	1.49	2.47
Material 2	0.71	0.78	0.81	0.99
Material 3	0.33	0.30	0.30	0.33
Material 4	0.38	0.38	0.46	0.86
Material 5	0.43	0.44	0.37	0.83
Material de pro. 1,2,3,4,5	0.87	0.88	0.95	0.93

**GRAFICA DE PERDIDA DE % DE PESO vs DIAS.  
MATERIAL CON 15% DE FECULA DE MAIZ.**

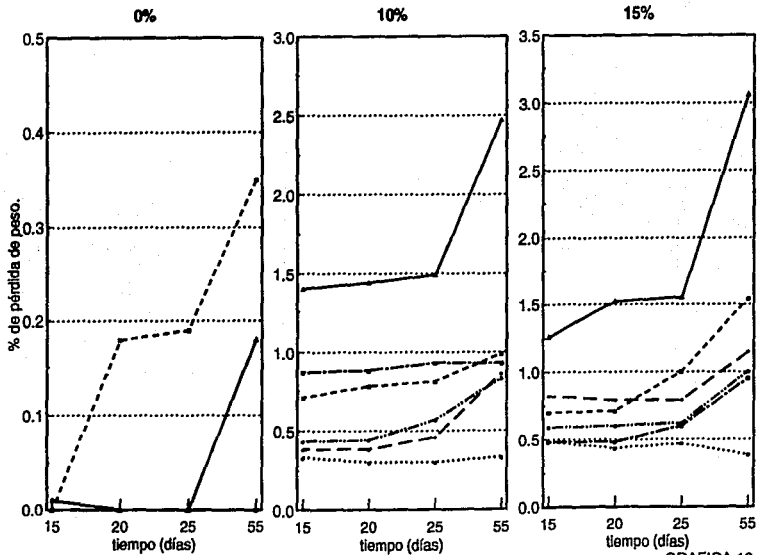


GRAFICA 15.

tiempo (dias)	15	20	25	35
micropeladano 1	1.26	1.52	1.55	3.06
micropeladano 2	0.70	0.71	1.00	1.54
micropeladano 3	0.48	0.43	0.47	0.38
micropeladano 4	0.82	0.79	0.79	1.15
micropeladano 5	0.59	0.60	0.61	1.00
mezcla de mo. 1,2,3,4,5	0.48	0.48	0.60	0.95



**COMPARATIVO "% de pérdida de peso vs tiempo"  
CON LOS DIFERENTES PORCENTAJES DE FECULA DE MAIZ UTILIZADOS.**



GRAFICA 16.

## Cuadro VI

Muestras Sin Fraccionar, con 15% de Fécula de Maíz.

	Peso Inicial	Peso Final	Peso Perdido
--	--------------	------------	--------------

1	0.94	0.85	6.87
2	0.90	0.83	5.07
3	0.92	0.88	1.64
4	0.90	0.85	2.85
5	0.93	0.89	1.64

- PI - Peso Inicial de la Muestra.  
PF - Peso Final de la Muestra.  
%PPM - % de Perdida de Peso de la Muestra.  
%PPT - % de Perdida de Peso del Testigo (2.7%).  
%PP - % de Peso Perdido.

$$\%PP = \%PPM - \%PPT$$

$$\%PPM = 100 - \frac{PF \times 100}{PI}$$

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## Cuadro VII

\*Características Macroscópicas de los Hongos Aislados, Desarrollados en PDA.

1. <i>Sporotrichum</i> sp	Filamentosa	Algodonosa laxo	Seca	Abundante radial	Blanco	No	Homogéneo
2. <i>Mortierella</i> sp	Filamentosa	Algodonosa compacto	Seca	Abundante radial	Verde olivo	Si, naranja	Homogéneo
3. <i>Penicillium</i> sp	Filamentosa	Terroso	Seca	Regular concéntrico	Verde grisáceo	No	Homogéneo
5. <i>Trichoderma</i> sp	Filamentosa	Algodonoso compacto	Seca	Abundante radial	Verde olivo	No	Homogéneo

## Cuadro VIII

\*Características Microscópicas de los Hongos Aislados, Desarrollados en PDA.

1. <i>Sporothrix</i> sp.	septadas	conidióforo	conidias
2. <i>Montirella</i> sp.	septadas	zoosporangio	zigosporas
3. <i>Penicillium</i> sp.	septadas	conidióforo	conidias
5. <i>Trichoderma</i> sp.	septadas	conidióforo	conidias

## **VII CONCLUSIONES.**

## CONCLUSIONES.

Se lograron aislar diecinueve microorganismos de tres diferentes procedencias, observándose un mayor número de hongos en comparación con bacterias, por lo cual existe una mayor probabilidad de que los hongos sean los encargados de causar la biodeterioración o inclusive una posible biodegradación a los materiales plásticos.

De éstos diecinueve microorganismos fueron seleccionados cinco los cuales son:

Sporothrix sp.

Mortirella sp.

Penicillium sp.

Pseudomonas sp.

Trichoderma sp.

De los polietilenos producidos por el Instituto de Investigaciones en Materiales de la UNAM el adicionado con 10% de fécula de maíz, extruido a 32RPM es el que presentó una mayor alteración a la exposición de los diferentes microorganismos seleccionados.

En cuanto a la pérdida de peso esta fué mínima, pero siempre de manera ascendente, por lo que a mayor tiempo de incubación, la pérdida de peso puede llegar a ser significativa.

De los cinco microorganismos seleccionados, el microorganismo identificado como Sporothrix sp. es el causante de un mayor biodeterioro al polietileno con los tres porcentajes de fécula de maíz utilizados en este trabajo.

## Anexo I.

### Medios de cultivo utilizados.

#### - Medio Mineral 1:

NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.0g
KCl	1.0g
MgSO <sub>4</sub>	1.0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000.0ml

#### - Medio Mineral 2:

KCl	1.0g
MgSO <sub>4</sub>	1.0g
H <sub>2</sub> O destilada	1000.0ml

#### - Agar Nutritivo con Nistatin.

Extracto de Carne	3g
Peptona	5g
Nistatin	510U
Agar	12g
H <sub>2</sub> O destilada	1000.0ml

#### - Papa Dextrosa Agar

Infusión de papas	4g
Dextrosa	20g
Agar	15g
H <sub>2</sub> O destilada	1000.0ml

#### - Agar Rosa de Bengala.

Glucosa	10g
Peptona	5g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1g
MgSO <sub>4</sub> 7 H <sub>2</sub> O	0.5g
Rosa de Bengala	1:30,000
Agar	12g
H <sub>2</sub> O destilada	1000.0ml

## Anexo II.

### Método de Micro-Kjeldhal modificado por Mitchell

#### Reactivos:

Solución A: 4.8g de NaOH en 1000ml de agua destilada.

Solución B: 5g de Fenol, 25mg de Nitroprusiato de sodio en 500ml de agua destilada.

Solución C: 2.5g de NaOH, 1.8g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 15.9g de  $\text{Na}_3\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 5ml de Cloro en 500ml de agua destilada.

Solución D: 1g de EDTA en 100ml de agua destilada.

Reactivo E: 2g  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  y 30g  $\text{K}_2\text{SO}_4$

Al concluir el tiempo de incubación, se transfieren 5ml de cultivo al matraz de micro-Kjeldhal con 1g del reactivo E y 1ml de ácido sulfúrico concentrado, para realizar la digestión.

El producto de la digestión se diluyó a un volumen de 50ml, de esta dilución se tomaron 2ml que se colocaron en un matraz aforado de 50ml de capacidad y se agrega: 1ml de solución D, 5ml de solución A, 10ml de solución B y 10ml de solución C, en este orden, para el desarrollo de color.

Se completó el volumen a 50 ml y se midió la densidad óptica después de una hora a 625nm.

Se incluyó matraz testigo.



## Bibliografía.

1. Albertsson A. C. (1976) Biodegradation of Synthetic Polymers II. A limited microbial conversion of  $^{14}\text{C}$  in polyethylene to  $^{14}\text{CO}_2$  by some soil fungi. *Journal of Applied Polymer Science. App. Polymer Symposium. 22, 3419-3433.*
2. Albertsson A. C. Ranby B. (1978) Biodegradation of Synthetic Polymers IV. The  $^{14}\text{CO}_2$  method applied to linear polyethylene containing a biodegradable additive. *Journal of App. Polymer Science. App. Polymer Symposium. 35, 431-437.*
3. Albertsson A. C. and Karlsson S. (1988) The Three Stages in Degradation of Polymers-Polyethylene as a Model Substance. *Journal of App. Polymer Science 35, 1289-1302.*
4. Annual Book of Standards, American Society for Testing and Materials, ASTM D 621-70 Philadelphia Pa., 1985, pp. 781-785.
5. Bailey W.J. Okamoto Y. O. and Nanta T. Proceedings of the 3rd. International Biodegradation Symposium. App. Science Publishers, N. Y. U.S.A. 1976, pp. 765-773.
6. Bartha Richard. *Microbial Ecology (Fundamentals and App.) 2a. Ed. The Benjamin Cummings Publishing C. INC. U.S.A. 1987 pp.403-416.*
7. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Ed. By N.R. Krieg And J. G. Holt. Baltimore, U.S.A., 1984, Vol.1, pp. 140-144*
8. Booth G.H. and Cooper A.W. (1968) Bacterial Degradation of Plasticized PVA. *Journal App. Bacteriology 31, 305-310.*
9. Catwell S., Lau P. and Watt D. (1978) Biodegradation of Acyclic Isoprenoides by *Pseudomonas* sp. *Journal of Bacteriology 135, 324-333.*
10. Delafield F., Doudorof M. and Col. (1965) Descomposition of Poli-beta-hidroxi butyrate by *Pseudomonas*. *Journal of Bacteriology 90, 1455-1465.*

11. Domsch Klaus Heinz. Fungi in Agricultural Soils. German S. Hidson Ed. London, England. 1972, Capitulo III.
12. Haines J.R. and Alexander M. (1975) Microbial Degradation of High Molecular Weight Alkanes. *App. Microbiology* 28, 1084-1085.
13. Heiman Mark F. Engineering of Plastics Material. John Wiley and Sons. N.Y. U.S.A. 1985, pp. 523-528.
14. Hosoya H. and Miyazaki N. (1978) Bacterial Degradation of Synthetic Polymers and Oligomers with Special Reference to the Case of Polyethyleneglycol. *Agricultural and Biological Chemistry* 42, 1545-1552.
15. Imam Syed and Gould M. (1990) Adhesion of an Amyolytic *Arthrobacter* sp. to Starch-Containing Plastic Films. *Applied and Environmental Microbiology* 56, 872-876.
16. Kumar G. and Kakapaagam V. (1983) Biodegradable Polymers Prospects Problems and Progress. *Journal of Macromolecular Science, Reviv of Macromolecular Chemistry and Physicis* Capitulo 22, 225-260.
17. Lee B., Pometto III A. and Fratzde A. (1991) Biodegradation of Degradable Plastic Polythylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* Species. *App. and Environmental Microbiology* 57, 678-685.
18. Mark Bikales. *Encyclopedia of Polymer Science and Engineering* John Wiley and Sons. U.S.A. 1990, pp. 220-223 y 230-273.
19. Mitchell H. L. (1972) Microdetermination of Nitrogen in Plant Tissues. *Journal of the AOAC*. 55, 1-4.
20. Miranda R. y Gutiérrez C. (1984). Aislamiento y Selección de Microorganismos que Hidrolizan Plásticos. *Latinoamerica Microbiology* 26, 217-222.

21. Miranda R. y Gutiérrez C. (1985) Biodegradación de Cloruro de Polivinilo (PVC) Adicionado de Plastificante, por *Rhodotorula* sp. *Latinoamerica Microbiology* 27, 231-236.
22. Morrison R. N. and Boyd Química Orgánica Fondo Educativo Interamericano, 2a. Edición, 1985, pp. 540-544.
23. O'Donnell Kerry L. *Zygomycetes in Culture*. Department of Botany. University Georgia, U.S.A. 1979, Capítulo II y III.
24. Potts J., Clendinning R. and Niegisch W. (1973) The Biodegradability of Synthetic Polymers. *Polymers and Ecological Problems*. Guillet, J.E. Eds. N.Y. U.S.A. 1973, pp.61-79.
25. Rivera E. Aguirre D. y Orfz R. Contribuciones a la Investigación de Procesos y Formulaciones para la Obtención de Poliofelinas Biodegradables. Instituto Mexicano del Petróleo. Mem. III Congreso Nacional de Polímeros. México D.F. (1986) Tomo II. pp. 1148-1152.
26. Rossi. G. Riccardo, S. et. al 1936. Direct microscopic and bacteriological examination of the soil. *Soil Science*. 42, 53.
27. Sanchez A. Padilla A. e Islas J. Desarrollo de PEBD Degradable Mediante la Inclusion de Cargas Orgánicas. Instituto de Investigaciones en Materiales Departamento de Polímeros. UNAM. Mem. III Congreso Nacional de Polímeros. México D.F. (1986) Tomo II. pp.1132-1138.
28. Shuttleworth W. and col. (1986) A rapid technique for evaluating the biodeterioration potencial of polyurethane elastomers. *App. Microbiology and Biotechnology* 23, 407-409.
29. Suzuki T. (1989) Degradation of Poly (Vinil Alcohol) by Microorganisms. *Journal of App. Polymer Science; App. Polymer Symposium* 35, 431-437.
30. Von Arx. J.A.. The Genera of Fungi Sporulating in Pure Culture. J. Cramer 1979 pp. 176-270.