

00524
42



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**AISLAMIENTO Y SELECCION DE HONGOS
FILAMENTOSOS PROVENIENTES DE SUELO, QUE
ATACAN PLASTICOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

VERONICA DOMINGUEZ VALDEZ



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



MEXICO, D. F.

2003

A



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.

PAGINACION DISCONTINUA

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Víctor Manuel Luna Pabello
Vocal	Prof. Marco Antonio Ortiz Jiménez
Secretario	Prof. Luciano Hernández Gómez
1^{er} Suplente	Profa. María del Carmen Urzúa Hernández
2^{do} Suplente	Profa. Rosalba Esquivel Cote

Colección de Cultivos Microbianos de Interés Biomédico del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.

Nombre completo y firma del Asesor del Tema:

Prof. Marco Antonio Ortiz Jiménez



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'MAOJ', written over a horizontal line.

Nombre completo y firma del sustentante:

Verónica Domínguez Valdez



A handwritten signature in black ink, appearing to be 'V. Domínguez', written over a horizontal line.

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial al E. en B. Marco Antonio Ortiz J., por abrirme las puertas de su laboratorio, por toda la ayuda otorgada para la realización del trabajo experimental, por sus aportaciones, observaciones y orientación.

Al Dr. Víctor Manuel Luna Pabello, por su apoyo, observaciones y orientación.

A la Biol. Yolanda Hornelas O. del Departamento de Servicios Académicos del Instituto de Ciencias del Mar y Limnología, por su valiosa colaboración y su paciencia en lo que se refiere a las observaciones con microscopio electrónico de barrido y toma de fotografías presentadas en este trabajo.

A Jesi, por su colaboración desinteresada y buen humor, a Maribel por su cooperación tan oportuna, y muy especialmente a la Biol. Laura Escalante Dávila gracias por su colaboración y soporte técnico.

A todas aquellas personas que de alguna manera u otra intervinieron en el buen desempeño de este trabajo.

Dedico esta tesis:

A mis padres:

Claudia y Encarnación, a quienes debo lo que soy y por quienes soy lo que he querido ser, por tener la dicha de compartir con ustedes los momentos más importantes de mi vida, gracias por creer en mí, por impulsarme a concluir esta meta y por el amor que siempre me han entregado. ¡LOS AMO!

A mis hermanos:

Paola y Omar, por compartir conmigo además de la sangre sus vidas. A ti hermana por enseñarme el significado de la valentía y la esperanza, a ti hermano por contagiarme tu alegría en tiempos difíciles; a ambos por ser parte de mí y por aceptarme como soy. ¡LOS QUIERO MUCHÍSIMO!

A alguien muy especial:

Por compartir conmigo ilusiones y sueños que cada momento se van realizando, por creer en mí sin condiciones y porque juntos fabricamos un mundo especial para los dos... ¡TE QUIERO Y TE ADMIRO!

ÍNDICE GENERAL

Resumen	1
1. Introducción	2
2. Objetivos	7
2.1 Objetivo general	7
2.2 Objetivos particulares	7
3. Marco teórico	8
3.1 Generalidades de polímeros	8
3.1.1 Problema mundial	8
3.1.2 Problema nacional	11
3.1.3 Desechos sólidos y los plásticos	12
3.1.4 Naturaleza de los plásticos	14
3.1.5 Tipos de plástico y como reconocerlos	16
3.1.5.1 PET (Polietileno Tereftalato)	17
3.1.5.2 PEAD (Polietileno de Alta Densidad)	17
3.1.5.3 PVC (Cloruro de Polivinilo)	18
3.1.5.4 PEBD (Polietileno de Baja Densidad)	19
3.1.5.5 PP (Polipropileno)	20
3.1.5.6 PS (Poliestireno)	20
3.1.5.7 Otros plásticos	21
3.1.6 Aditivos	22
3.2 Generalidades sobre biodegradación	25
3.2.1 Definición y tipos de degradación	25
3.2.1.1 Degradación térmica	27
3.2.1.2 Degradación mecánica	27
3.2.1.3 Degradación fotoquímica	28
3.2.1.4 Degradación química	28
3.2.1.5 Degradación biológica	28
3.2.2 Degradación biológica	29
3.2.2.1 Conceptos	29
3.2.2.2 Modos de degradación biológica	31
3.2.2.2.1 Degradación enzimática	31

3.2.2.2	Degradación microbiana	33
3.2.2.3	Efectos en la estructura polimérica	35
3.2.2.4	Procesos degradativos	36
3.2.3	Biodegradación de plásticos	37
3.2.3.1	Polímeros biodegradables	40
3.2.3.1.1	Poli- β -hidroxialcanoatos (PHA)	41
3.2.3.1.2	ϵ -Policaprolactona (PCL)	43
3.2.3.1.3	Otros plásticos biodegradables	44
3.2.4	Microscopía electrónica	45
4.	Material es y métodos	47
4.1	Aislamiento, purificación y selección de hongos filamentosos	47
4.2	Mantenimiento de las cepas	48
4.3	Prueba en tubo	48
4.4	Identificación de la cepa seleccionada (MV-75)	49
4.5	Prueba a nivel matraz	49
4.5.1	Inóculo	49
4.5.2	Desarrollo de la fermentación	50
4.5.3	Determinación de azúcares reductores	50
4.5.4	Determinación de pH	51
4.5.5	Cuantificación de crecimiento	51
4.6	Prueba a nivel fermentador de 1000 mL	52
4.6.1	Características del fermentador	52
4.6.2	Condiciones de la fermentación	52
4.6.3	Desarrollo de la fermentación	52
4.6.3.1	Determinación de la cantidad de O ₂ disuelto	53
4.6.4	Determinación de la actividad esterasa	53
4.7	Observaciones con microscopio electrónico de barrido	53
5.	Discusión y análisis de resultados	55
5.1	Prueba en tubo	56
5.2	Prueba a nivel matraz de PVC y PCL impuros y puros	60
5.2.1	Fermentación en matraces de 250 mL	61
5.2.1.1	Determinación de azúcares reductores	62
5.2.1.2	Determinación de pH	64

5.2.2	Fermentación en matraces de 500 mL	66
5.2.2.1	Determinación de azúcares reductores	66
5.2.2.2	Determinación de pH	68
5.2.2.3	Cuantificación de crecimiento [Proteína final]	69
5.3	Prueba a nivel fermentador de 1000 mL con PVC y PCL puros	71
5.3.1	Determinación de azúcares reductores	71
5.3.2	Determinación de pH	72
5.3.3	Determinación de la actividad esterasa	72
5.3.4	Cinética de crecimiento	73
5.3.5	Determinación de la cantidad de O ₂ disuelto	75
5.4	Observaciones con microscopio electrónico de barrido	77
6.	Conclusiones	82
7.	ANEXO I: Simbología y abreviaturas	84
8.	ANEXO II: Medios y plásticos utilizados	86
9.	ANEXO III: Prueba en tubo	88
10.	ANEXO IV: Fermentación en matraces de 500 mL	99
11.	ANEXO V: Prueba a nivel fermentador de 1000 mL	103
12.	Bibliografía	106
13.	Glosario	113

RESUMEN

En este trabajo se probó y estableció una metodología para el aislamiento y selección de hongos filamentosos con capacidad de ataque sobre plásticos, provenientes de muestras de suelo de distintos vertederos a cielo abierto (localizados en Tlaxcala, Morelos, Hidalgo y en el Estado de México) y de orillas de canales del D. F. (Canal Nacional y canal de Caltongo), 577 cepas fueron aisladas en un medio mínimo cuya fuente de carbono fue una mezcla de los plásticos catalogados como 1, 2, 3, 6 y 7, de las cuales la cepa MV-75 (clasificada como *Aspergillus* sp.) fue seleccionada por mostrar mayor ataque y una fuerte adherencia sobre todos los sustratos plásticos en la prueba en tubo. Los estudios posteriores con *Aspergillus* sp. (MV-75) a nivel matraz con PVC y PCL tanto grado reactivo como industrial a diferentes concentraciones en medio Czapek modificado (glucosa 1%), mostraron un buen rendimiento de biomasa en PVC Gr 1% ($Y_b/x = 0.73\%$) y en PCL Gr 3% ($Y_b/x = 2.04\%$), dónde las condiciones de crecimiento utilizadas fueron: temperatura 30° C, pH 4.5 y agitación 140 rpm.

En el escalamiento a nivel fermentador de 1 L (medio Czapek con PVC Gr 1% o PCL Gr 3%) la cepa MV-75, mostró un patrón similar al observado en el estudio a nivel matraz tanto en el consumo de azúcares reductores, como en la cinética de pH. Por otro lado se pudo verificar durante la fermentación el efecto de hidrólisis sobre los plásticos PCL y PVC, tanto en el consumo de oxígeno medido como por la actividad esterasa determinada a lo largo de los 18 días de fermentación. Además, este efecto y/o daño fue corroborado con las observaciones hechas sobre los materiales plásticos con el Microscopio electrónico de barrido.

1. Introducción

Durante las últimas décadas el incremento tecnológico ha seguido en forma paralela al desarrollo de la industria petroquímica, de esta forma la producción elevada de derivados del petróleo, así como los diferentes grupos de polímeros sintéticos han contribuido en su mayor parte, a la comodidad de la vida en beneficio de la sociedad humana; sería difícil imaginarnos la vida moderna sin la presencia de dichos polímeros tales como fibras sintéticas, elastómeros y plásticos. Estos últimos poseen una infinidad de propiedades como son: la alta resistencia al deterioro por ácidos y álcalis, por efectos de la luz y la humedad, su fácil pigmentación, su fácil moldeo, bajo costo, etc., que en suma superan a cualquier otro material incluyendo al vidrio, metal y madera, materiales que se consideraban insustituibles y que ahora han sido reemplazados por estos polímeros hasta en un 60%. Por esta razón fue considerado el material ideal por la industria química; es obvio entonces que la producción mundial de estos polímeros se duplique aproximadamente cada cinco años. En México la producción de estos materiales presenta un crecimiento parecido o más acelerado al ritmo de producción mundial, así los plásticos de mayor consumo y producción en nuestro país son: Polietileno de alta y baja densidad, Cloruro de polivinilo (PVC) y Acetato de polivinilo (PVA).^{41, 42}

No obstante, estos materiales son potencialmente desventajosos para el desarrollo normal de muchas de las formas de vida, incluso del hombre, pues sus propiedades los hacen resistentes a la deterioración y biodegradación por los microorganismos, lo que hace que se acumulen en las afueras de las ciudades dando un mal aspecto (contaminación visual), en tierras de cultivo ocasionan problemas de laboreo y en drenajes produce taponamientos. La acumulación progresiva de estos problemas pueden originar cambios microecológicos y por ende ocasionar variación en la microflora del suelo e indirectamente alteraciones en plantas superiores. Estos efectos pueden ser producidos por los polímeros totales pero la formulación de un plástico no solamente contiene a éste, sino también plastificantes, pigmentos y estabilizadores térmicos, los plastificantes se agregan hasta en un 50% p/p en el plástico, este producto es esencial para resinas como el PVC y el PVA dado que les confiere la propiedad de plasticidad y moldeo, los plastificantes usados comúnmente son los esteres de ftalato.¹²

Actualmente se trata de hacer que los plásticos sean más resistentes al ataque por bacterias y hongos agregando a la formulación biocidas,¹⁸ y al mismo tiempo en países como E.U., Rusia e Inglaterra se está tomando en cuenta el problema de la acumulación de los residuos sólidos plásticos y tratan de enfocarlo de varias formas para darle una solución, pero sin tener que prescindir de los materiales plásticos. En resumen las posibles soluciones contempladas serían:

1. Incineración y pirólisis de los materiales plásticos
2. Obtención de plásticos que sean biodegradables
3. La biodegradación de los plásticos ya existentes.

En cuanto a la posibilidad de biodegradar los plásticos ya existentes se han realizado estudios que se han enfocado a la probabilidad de aislar cepas capaces de utilizar los polímeros mencionados como fuente nutritiva y determinar algunas características para su biodegradación, por ejemplo, el efecto del peso molecular de las polímeros, condiciones de humedad, efectos de la sustancias de desecho.

Las técnicas para medir la biodegradación de los polímeros y el desarrollo de microorganismos sobre el plástico o sobre alguno de sus constituyentes son muy variadas dependiendo de sus características. La prueba de pérdida de peso es muy usada como medida de biodegradación, Fields realizó esta prueba modificada en caja Petri.⁴¹ Aunque bien nuevos conceptos indican que esta prueba sólo demostraría una deterioración, es por eso que muchos autores deben relacionar esto con la presencia de enzimas (normalmente esterases) u otros parámetros que nos indiquen un metabolismo de estos plásticos o sus componentes. Sharpe relaciona este fenómeno con la actividad metabólica del microorganismo midiendo el amonio liberado por éstos y con cuenta viable de microorganismos.^{41,52} Otras técnicas utilizan microdensímetros ó fotomicroscopía para observar alteraciones de los plásticos probados. Cavett correlaciona la pérdida de peso de la película de plástico con la respiración endógena (midiendo C^{14} marcado) y oxígeno consumido metabólicamente.⁷¹ Filip es uno de los investigadores que ha llegado más lejos, usó la espectrometría infrarroja para determinar los productos intermediarios de la degradación del polímero.^{41,71}

Los efectos que pueden producir los microorganismos sobre las propiedades fisicoquímicas del plástico son variadas y es necesario considerar si los compuestos no son totalmente degradados.

La degradación del plástico o el plastificante produce pérdida de las propiedades originales del polímero, como son su aspecto, flexibilidad, resistencia a la ruptura, elongación, resistencia eléctrica, etc.⁶⁵

La degradabilidad de los plásticos en suelos tropicales es un fenómeno conocido, desde fines de la segunda guerra mundial. En este sistema tan heterogéneo, los plásticos son atacados por infinidad de factores, tanto físicos como químicos y biológicos, donde cualquiera de estos puede ocasionar su degradación y la suma de ellos acelera este proceso disminuyéndose así el tiempo medio de vida del plástico.

No obstante, estos estudios son muy complejos debido principalmente al control de los parámetros y la explicación lógica de los resultados, pero no se puede negar la importancia de estos estudios, más si se piensa en el plástico biodegradable.

Ong y Staton realizaron una prueba en suelo de jardín en Malaya, durante un período de sesenta días, donde se observó una notable degradación por acción combinada de insectos, hongos y bacterias.⁴¹ Griffin demostró que el polietileno de baja densidad si es susceptible de ser degradado sólo que en suelos abonados durante un período de doce semanas.⁷¹ Dolezel introdujo esta misma prueba como

un parámetro de los estudios de degradación de plásticos, dónde incluye la determinación de ciertas características fisicoquímicas del suelo como la relación de C/N, esto con el fin de interpretar los resultados de la prueba y establecer una posible correlación de la participación de los microorganismos.⁴¹

Cabe señalar que la mayor parte de los estudios realizados en la biodegradación de plásticos se han realizado directamente en suelo o de cierta forma en fermentaciones de tipo sólido. Sin restarle importancia a este punto, existen actualmente pocos estudios con cultivos monoaxénicos, en sistemas con un control más adecuado del proceso, como lo son los reactores por lote, donde se pueden entender, mejorar y optimizar los procesos en una forma mucho más precisa. Sin embargo, un factor limitante para este tipo de estudios es el poseer cepas con una verdadera capacidad de ataque sobre los plásticos.

2. Objetivos

2.1 Objetivo general:

- ◇ Aislamiento, selección e identificación de hongos filamentosos con alta capacidad de hidrólisis de materiales plásticos.

2.2 Objetivos particulares:

- ◇ Aislar y seleccionar una cepa que muestre capacidad cualitativa de hidrólisis sobre los plásticos: PET, PEAD, PVC, PS y PCL grado industrial.
- ◇ Identificar la cepa seleccionada a nivel de género.
- ◇ Determinar sobre que materiales plásticos tiene mayor actividad la cepa seleccionada.
- ◇ Determinar las condiciones o parámetros de crecimiento adecuados a nivel matraz y evaluar la actividad de la cepa seleccionada sobre PVC y PCL grado industria y grado reactivo.
- ◇ Establecer las condiciones de crecimiento adecuadas a nivel fermentador y evaluar la actividad de la cepa seleccionada sobre PVC y PCL grado reactivo.

3. Marco Teórico

3.1 Generalidades de Polímeros

3.1.1 Problema Mundial

En la época actual resulta difícil imaginar que alguno de los sectores de la vida diaria, pudiera prescindir de los plásticos. Sólo basta con observar alrededor y analizar cuántos objetos son de plástico para visualizar la importancia económica que estos materiales tienen. Dicha importancia se refleja en los índices de crecimiento que, mantenidos a lo largo de algunos años desde principios del siglo pasado, superan casi todas las demás actividades industriales y grupos materiales. En 1990 la producción mundial de plásticos alcanzó los 100 millones de toneladas y para el año 2000 alcanzó los 180 millones de toneladas^{31, 35, 61}

De las aproximadamente 110 millones de toneladas que se fabricaron en 1995 en el mundo, los principales países productores y consumidores fueron Estados Unidos, Japón y Alemania, situados a una gran distancia de los demás, haciéndose patente la gran diferencia con los países poco desarrollados, como Colombia, Hungría y Turquía. En la tabla 3.1 se muestra la producción y el consumo mundial de plásticos en 1995 (en miles de Tn), según datos de la ANAIP.^{39, 40, 62}

Tabla 3.1 Producción y consumo mundial de plásticos en 1995
En miles de Tn. (n.d. = no determinado)

PAÍS	PRODUCCIÓN	CONSUMO
Alemania	11 100	9 780
Austria	1 011	1 270
Bélgica	n. d.	n. d.
Canadá	3 177	2 505
Colombia	n. d.	453
España	2 594	2 724
EE.UU.	35 701	33 916
Finlandia	450	405
Francia	5 100	4 040
Reino Unido	2 665	3 987
Holanda	n. d.	1 250
Hungría	742	396
Israel	411	561
Italia	3 480	5 140
Japón	14 027	11 308
Nueva Zelanda	0	180
Polonia	715	973
Rumania	393	227
Sudáfrica	700	820
Turquía	254	n. d.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El consumo de plásticos se encuentra por debajo del consumo del hierro y acero, pero debe considerarse que estos metales tienen una densidad entre seis y siete veces mayor a la de los plásticos, por ello, la producción de plásticos es mayor a la del acero.

El incremento en el consumo de los plásticos lo comprobamos al observar que en 1974 se consumieron 11 kilogramos por individuo, y para 1990 el consumo mundial fue de 34.5 kilogramos *per capita*.⁶³ En los Estados Unidos, la producción

de plásticos excede las 50 millones de toneladas por año, y se acumulan en el ambiente cada año aproximadamente 25 millones de toneladas.^{21, 62, 63}

Debido a que el uso de estos materiales ha venido a facilitar y hacer más cómoda la vida de la humanidad por sus propiedades y su relación costo-beneficio; actualmente se producen en gran cantidad para satisfacer su demanda, por tal motivo la producción de plásticos ya esta abarcando mercados como el del vidrio, papel y metales. Sin embargo, en los últimos años se ha presentado un problema serio ya que el periodo de vida útil tan corto de los objetos fabricados con plásticos y su uso indiscriminado ha provocado que una gran cantidad de estos materiales lleguen a parar a los basureros.

En la tabla 3.2 se muestra el tiempo estimado de vida media de algunos productos plásticos.⁶³

Tabla 3.2 Vida media de productos plásticos

PRODUCTO	VIDA ESTIMADA EN AÑOS
Empaque	<1
Películas fotográficas	<1
Utensilios para alimentos	<1
Construcción	2
Calzado	2
Ropa	4
Utensilios caseros	5
Juguetes	5
Artículos deportivos	7
Artículos para automóvil	10
Discos	10
Equipaje	10
Muebles	10
Cables	15
Máquinas para negocios	15
Equipo eléctrico	15

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

3.1.2 Problema Nacional

El basurero es como una pequeña ciudad con caminos y montañas de plásticos, aluminio, vidrio, papeles, juguetes rotos y viejos, comida podrida y animales muertos. Alrededor de este , las aceras también están llenas de basura, el olor es insoportable... las bolsas con desperdicios vuelan ayudadas por el viento y se pegan a las paredes de las casas y a las rejas de los campos de football... las moscas chocan con las caras de los transeúntes, la mayoría de los cuáles ni se inmutan y hasta se sientan a platicar en una banca, teniendo por paisaje el tiradero de Chimalhuacán, en el bordo de Xochiaca.

El bordo de Xochiaca, recibe de dos mil a tres mil toneladas diarias de basura proveniente de los municipios de Neza y Chimalhuacán. El bordo se encuentra justo detrás del aeropuerto internacional de la ciudad de México, sobre la avenida taxímetros que después convierte su nombre al de Xochiaca^{51, 69}

A nivel nacional se generan aproximadamente 88 mil 686 toneladas diarias de residuos sólidos municipales, de los cuáles aproximadamente el 80 % termina en tiraderos a cielo abierto.^{43, 64} Se calcula que cada mexicano genera un promedio de casi 1 kilo de basura diaria y en los últimos años pasó de ser densa y casi completamente orgánica a ser voluminosa y parcialmente no biodegradable.

En la actualidad, en la ciudad de México se generan al día 12 000 toneladas de desechos sólidos (que acumuladas en tres meses, podrían llenar el Estadio Azteca), de los cuáles los plásticos representan cerca del 20% del volumen total, y aproximadamente el 12% en peso. De ese volumen, 8 000 toneladas van a parar a dos rellenos sanitarios, uno de los cuales está en el límite de su capacidad y el resto pasa a un sistema de tratamiento, en el que se aprovecha sólo entre el 13 y 14% de los desechos sólidos.^{10, 51, 64}

3.1.3 Desechos sólidos y los plásticos

En época reciente se ha dado gran importancia a la acumulación de desechos sólidos en el ambiente, los que representan un problema de disposición final, ya que las superficies destinadas a rellenos sanitarios se encuentran cada vez más limitadas, además de contribuir a la contaminación ambiental. Dentro de los desechos sólidos se ha puesto gran atención a los materiales plásticos, debido a que su producción ha alcanzado enormes proporciones, a su difícil o nula biodegradación y su permanencia durante décadas en basureros y rellenos sanitarios.⁷⁰

Los principales polímeros presentes en los plásticos son: polietileno, polipropileno, poliestireno y cloruro de polivinilo; estos cuatro polímeros constituyen aproximadamente el 85% de los materiales plásticos que se encuentran en los residuos urbanos.^{55, 70}

Día a día, se observa un incremento en la generación de desechos, ya sean gaseosos, sólidos o líquidos, esto conduce a un incremento en la contaminación de los suelos, proceso que es irreversible y además tiene la desventaja de facilitar la introducción de tóxicos en la cadena alimenticia. El manejo de los desechos sólidos se resume a un ciclo que comienza con su generación, acumulación temporal, recolección, transferencia y termina con su acumulación. Es a partir de esta acumulación cuando comienzan los verdaderos problemas ecológicos, ya que los basureros se convierten en focos permanentes de contaminación. Existen varias formas de acumulación, una de ellas es la de los tiraderos a cielo abierto, zonas dónde simplemente se acumulan los desechos sin recibir ningún tipo de tratamiento. Otro medio de apilación final es el enterramiento controlado, que consiste en disponer la basura en alguna área relativamente pequeña, dentro de algún sitio elegido para este fin, extenderla y comprimirla y cuando alcanza una altura de dos metros, se cubre con tierra traída de alguna obra de excavación.^{17, 18, 58, 60}

Los basureros causan problemas ambientales que afectan el suelo, el agua y el aire; la capa vegetal originaria de la zona desaparece, hay una erosión del suelo, contamina a la atmósfera con materiales inertes y microorganismos ^{10, 20, 55} Con el tiempo, alguna parte de los desechos sólidos se irá descomponiendo y dará lugar a nuevos componentes químicos que provocarán la contaminación del medio, esto hace que el suelo pierda muchas de sus propiedades originales, como su friabilidad, textura, porosidad, permeabilidad, intercambio catiónico, concentración de macro y micro-nutrientes.^{27, 55, 61}

Entre los polímeros de uso más frecuente, únicamente el polietileno es biodegradable si su peso molecular es inferior a 500 g/mol. Esto significa que la mayoría de los plásticos permanecen en el lugar en dónde han sido colocados o enterrados, lo cual es una ventaja, ya que no engendran sustancias que contaminan las capas freáticas del subsuelo.^{65, 68} Sin embargo, esta misma propiedad tiene su contrapartida, puesto que estos materiales se acumulan indefinidamente en los ecosistemas ocupando cada vez más espacio.

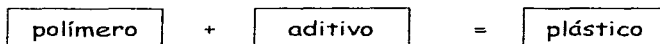
Actualmente la eliminación de residuos se efectúa, en vertederos públicos o privados; es preciso resaltar que el número de terrenos disponibles disminuye debido a la acumulación de residuos y las áreas nuevas que deben acondicionarse resultan cada vez más onerosas. Por esta razón, se hace necesaria la búsqueda de vías alternativas nuevas, como la reducción de volumen, el reciclaje-reutilización, la degradación, la incineración y otros procesos termoquímicos.^{42, 43, 60}

3.1.4 Naturaleza de los plásticos

En conjunto, los materiales conocidos como *plásticos* poseen características estructurales comunes que les confieren propiedades definidas, esto ha dado lugar a la denominación genérica anterior.^{35, 56}

La característica común a todos ellos es que poseen naturaleza de *polímero*. Un polímero como indica su denominación es un *poli - mero*, es decir, una sustancia formada por muchas (poli) unidades iguales (meros).²³ Cuando a este material se le incorporan ciertas sustancias denominadas aditivos, para modificar

sus propiedades, facilitar su transformación y mejorar su resistencia, al producto obtenido se denomina *plástico*. Por tanto podemos decir que un plástico es un polímero acondicionado con aditivos.^{36, 59}



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

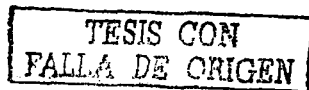
Los plásticos son materiales orgánicos macromoleculares, producidos por la transformación de sustancias naturales de origen vegetal y, principalmente por síntesis directa a partir de sustancias derivadas del petróleo (etileno, propileno, estireno).

El uso de plásticos sintéticos se ha extendido ampliamente en el mercado, debido a sus propiedades, como son: peso ligero, hidrofobicidad, estabilidad química, resistencia especial a químicos corrosivos y al deterioro biológico; además no son tóxicos y resultan versátiles en estructura. Dentro de los plásticos sintéticos existen tres familias que ocupan tres cuartas partes del mercado: las poliolefinas, polímeros derivados de hidrocarburos con doble ligadura, como el etileno, propileno e isobutileno, que en su forma oligomérica son ceras o grasas biodegradables (polietileno, polipropileno), los polímeros vinílicos (cloruro de polivinilo) y los productos estirénicos (poliestireno). De estas tres familias, las poliolefinas constituyen la más importante, debido a que los plásticos más utilizados comercialmente se encuentran dentro de este grupo.^{52, 66, 68}

La identificación de plásticos, por tipo de polímero, puede hacerse visualmente y resulta de gran utilidad el código internacional SPI (Society of

Plastics Industry, Inc.), que permite identificar cada tipo de plástico con un número y/o sus siglas respectivas (Pearson, 1993), a saber: "1 PET" polietilentereftalato, "2 PEAD" polietileno de alta densidad, "3 PVC" policloruro de vinilo, "4 PEBD" polietileno de baja densidad, "5 PP" polipropileno, "6 PS" poliestireno, y "7 OTROS" para las demás resinas.

3.1.5 Tipos de plástico y cómo reconocerlos



Características, usos y aplicaciones:

Los plásticos son materiales que permiten infinidad de usos y aplicaciones: **PLÁSTICO** es el nombre genérico, ya que existen diferentes tipos de materiales plásticos y cada día se descubren nuevas aplicaciones.^{12, 18} Es difícil encontrar una industria que no utilice algún tipo de plástico en sus productos, así como en la construcción, agricultura, medicina, informática, la industria automotriz, la industria de los alimentos y tantas como puedan entrar en la imaginación.

Con el fin de favorecer el conocimiento de los distintos materiales plásticos, especialmente en el momento de su clasificación, la Sociedad de Industrias Plásticas de los Estados Unidos (SPI) ha difundido un código de identificación de uso corriente a nivel internacional.⁸

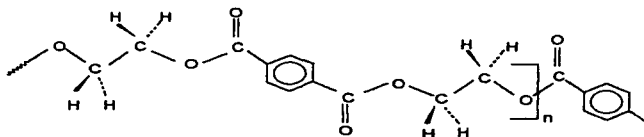
El sistema identifica solamente a seis materiales plásticos que son los más difundidos y con ellos se fabrican casi todos los productos que el público conoce.

3.1.5.1 PET (Polietileno Tereftalato)

CARACTERÍSTICAS:

Se produce a partir del ácido tereftálico y etilenglicol, por policondensación; existiendo dos tipos: grado textil y grado botella. Para el grado botella se le debe post-condensar, existiendo diversos colores para estos usos.²³

Estructura molecular:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

USOS Y APLICACIONES:

Algunos usos y aplicaciones del PET son: envases de gaseosas, aceites y agua minera; frascos para mayonesa y salsa; fibras textiles, cintas de video y audio; películas radiográficas y muchas más.^{8, 12}

VENTAJAS Y BENEFICIOS:

Barrera a los gases - transparente - irrompible - liviano - no tóxico.²³

3.1.5.2 PEAD (Polietileno de Alta Densidad)

CARACTERÍSTICAS:

El polietileno de alta densidad es un termoplástico fabricado a partir del etileno, elaborado a partir del etano, un componente del gas natural.²³

Estructura Molecular:



USOS Y APLICACIONES:

Envases para detergentes, lavandina, aceites para automotor, lácteos, cajones, baldes, tambores, caños para agua potable, gas, telefonía, minería y uso sanitario - bolsas para supermercados - bazar y menaje y muchas más.^{8, 12}

VENTAJAS Y BENEFICIOS:

Resistente a las bajas temperaturas - irrompible - impermeable - no tóxico.²³

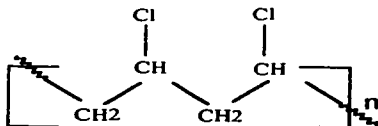
3.1.5.3 PVC (Cloruro de Polivinilo)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CARACTERÍSTICAS:

El PVC se produce a partir de dos materias primas naturales, gas 43% y sal común 57%. Para su procesado es necesario fabricar compuestos con aditivos especiales, que permitan obtener productos de variadas propiedades para un gran número de aplicaciones. Se obtienen productos rígidos o totalmente flexibles.²³

Estructura molecular:



USOS Y APLICACIONES:

Envases para agua mineral - aceites - jugos - mayonesas; perfiles para marcos de puertas y ventanas; caños para desagües domiciliarios y de redes; mangueras, blisters, catéteres, bolsas para sangre y muchas más.^{B.12}

VENTAJAS Y BENEFICIOS:

Ignífugo - resistente a la intemperie - no tóxico - impermeable - irrompible.²³

3.1.5.4 PEBD (Polietileno de Baja Densidad)

CARACTERÍSTICAS:

Se produce a partir de gas natural y se procesa de diferentes formas, es de gran versatilidad y solo o en conjunto con otros materiales se utiliza en gran variedad de envases y en múltiples aplicaciones.²³

USOS Y APLICACIONES:

Bolsas de todo tipo - películas para el agro - envasamiento automático de alimentos - bolsas para sueros - tubos y pomos para la industria de cosméticos, medicamentos y otras - tuberías para riego^{B.12}

VENTAJAS Y BENEFICIOS:

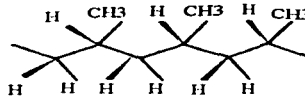
No tóxico - flexible - liviano - impermeable - económico - transparente.²³

3.1.5.5 PP (Polipropileno)

CARACTERÍSTICAS:

El polipropileno (PP) es un termoplástico que se obtiene por polimerización del propileno. Los copolímeros se forman agregando etileno durante el proceso. El PP es un plástico rígido, de alta cristalinidad y elevado punto de fusión, excelente resistencia química y dentro de los productos plásticos es el de más baja densidad.²³

Estructura molecular:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

USOS Y APLICACIONES:

Películas/film para diferentes envases, cigarrillos, chicles, golosinas - jeringas desechables - tapas en general - fibras para tapicería - alfombras - cajas de baterías - paragolpes - autopartes y caños para agua caliente entre otras.^{8, 12}

VENTAJAS Y BENEFICIOS:

Resistente a la temperatura - barrera a los aromas - no tóxico - irrompible.²³

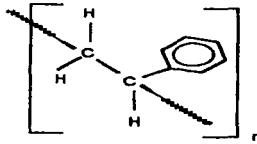
3.1.5.6 PS (Poliestireno)

CARACTERÍSTICAS:

PS Cristal: Es un polímero de estireno: siendo este último un monómero

derivado del petróleo; el poliestireno cristal es cristalino y de alto brillo. PS Alto Impacto: Es un polímero de estireno; monómero con oclusiones de polibutadieno que le confiere alta resistencia al impacto.²³

Estructura molecular:



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

USOS Y APLICACIONES:

Botes para lácteos, helados y dulces, bandejas de supermercados y roscaría, heladeras, contrapuestas y anaqueles, máquinas de afeitar desechables, platos, cubiertos, juguetes, cassettes, aislantes, etc.^{8,12}

VENTAJAS Y BENEFICIOS:

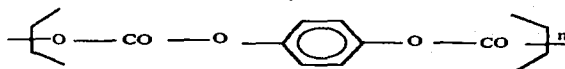
Ignífugo - no tóxico - transparente - irrompible y de fácil limpieza²³

3.1.5.7 Otros Plásticos

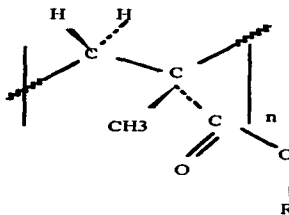
CARACTERÍSTICAS:

En este rubro se incluyen una enorme variedad de plásticos tales como: Policarbonatos (PC); Poliamidas (PA); Poliuretanos (PU); Acrílicos (PMMA) y varios más, ya que se puede desarrollar un tipo de plástico para cada aplicación específica²³

Estructura molecular:



Policarbonato



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Polimetacrilato de metilo (PMMA)

USOS Y APLICACIONES:

Autopartes, carcasas de computación, teléfonos: celulares y electrodomésticos en general, piezas para ingeniería aeroespacial, muebles, accesorios náuticos y deportivos, carteles y publicidad, y un sinnúmero de aplicaciones más.^{8, 12}

3.1.6 Aditivos

Con frecuencia se utilizan los aditivos químicos para conseguir una propiedad determinada. Por ejemplo, los **antioxidantes** protegen al polímero de degradaciones químicas causadas por el oxígeno o el ozono. De una forma parecida, los **estabilizadores** lo protegen de la intemperie, es decir, lo protegen

del calor y la luz. Los **plastificantes** producen un polímero más flexible; los **lubricantes** reducen la fricción: los lubricantes internos reducen la viscosidad del polímero fundido y los lubricantes externos impiden la adherencia y retardan la gelificación y los **pigmentos** colorean los plásticos, proveen opacidad y la protección contra los rayos UV. También se utilizan algunas **sustancias ignífugas** y **antiestáticas** como aditivos.^{18, 23, 36, 59}

Muchos plásticos se fabrican en forma de material compuesto, lo que implica la adición de algún material de refuerzo a la matriz de la resina plástica (normalmente fibras de vidrio o de carbono). Los materiales compuestos tienen la resistencia y la estabilidad de los metales, pero por lo general son más ligeros. Las espumas plásticas, compuestas de plástico y gas, proporcionan una masa de gran tamaño pero muy ligera.

Fundamentalmente, en su transformación y utilización ninguna materia plástica puede ser utilizada sin aditivos; así por ejemplo: el PVC tampoco puede emplearse en estado puro, y cabe mencionar que el PVC utiliza proporcionalmente más aditivos que otras materias plásticas, la razón radica en su gran polivalencia, que permite usarlo en multitud de aplicaciones: rígidas o flexibles, transparentes u opacas, compactas o espumadas. La incorporación de los aditivos permite transformar la resina en un producto acabado. Entre los aditivos utilizados en el PVC específicamente hay que destacar por su importancia: los estabilizantes, los lubricantes internos y externos, los plastificantes, los modificadores de impacto, las cargas y los pigmentos. Los estabilizantes y los lubricantes son indispensables

en la fabricación de PVC., el resto de los aditivos intervienen en función de las propiedades deseadas.

En general los aditivos de los materiales plásticos utilizados en aplicaciones alimentarias cumplen la legislación vigente, tanto española como europea (Resolución del 4 noviembre de 1982, Real Decreto 2207/94 del 16 de noviembre, Real Decreto 1042/97 del 27 de junio, y Directivas 82/711/CE, 90/128/CE, y 96/11/CE). Además las autoridades sanitarias de todo el mundo han autorizado su uso en aplicaciones médicas (Farmacopea Europea, 2a ed., fascículo 13, apartado VL. Consejo de Europa). El plastificante más utilizado para estas aplicaciones es el DEHP (ftalato de dietilhexilo). Los ensayos realizados por diversos laboratorios demuestran que no presenta riesgo alguno para la salud humana (informes de BUA, BGA, ECETOC y COT, entre otros).⁵⁶

3.2 Generalidades de Biodegradación

3.2.1 Definición y tipos de degradación

La degradación o envejecimiento de polímeros, se refiere a los cambios que sufren estos materiales en sus propiedades, al interaccionar con el medio ambiente.³

La degradación, es un fenómeno que afecta el funcionamiento de los materiales plásticos en la vida cotidiana. Los efectos de la degradación se perciben desde el reactor utilizado para sintetizar el polímero, en el extrusor donde es procesado y durante su vida de servicio según su función; después en su deterioro cuando es reciclado o se descarga en el medio ambiente.^{19, 65} Un conocimiento amplio de los fenómenos de degradación de los polímeros permite encontrar alternativas para mejorar el funcionamiento del producto en algunos casos y en otros elaborar estabilizadores más eficientes, así como desarrollar productos con degradación controlada, para preservar el medio ambiente. La degradación es una espada de dos filos, tiene aspectos tanto dañinos como benéficos. Si no se verifica puede causar estragos en el comportamiento de los polímeros y sin un control puede ser un peligro en la seguridad. Sin embargo, si es utilizada apropiadamente puede emplearse para producir nuevos y mejores materiales.^{19, 21, 25}

Con respecto a los materiales compuestos por macromoléculas sintéticas, el termino degradación, se usa para denotar cambios en las propiedades físicas ocasionados por reacciones químicas que involucran la escisión de la estructura de la macromolécula; en los polímeros lineales, estas reacciones químicas conducen a una reducción en el peso molecular, es decir una disminución en la longitud de la cadena,⁶⁸ como se muestra en la Fig. 3.1.



Fig. 3..1. Escisión en la cadena principal

Cuando se consideran polímeros biodegradables, la definición de degradación se extiende para incluir cambios en las propiedades físicas, ocasionados no solamente por reacciones químicas sino también por fenómenos físicos que involucran una avería en las estructuras más ordenadas.²¹ En ambos casos el término degradación de polímero involucra un deterioro en el comportamiento de los materiales poliméricos y una pérdida de propiedades.

Un plástico degradable, es un polímero diseñado para experimentar un cambio significativo en su estructura química bajo condiciones ambientales específicas, resultando en la pérdida de alguna propiedad que puede cambiar y puede ser medida por alguna prueba estándar apropiada, para evaluar su aplicación en un periodo de tiempo dado que determina su clasificación.^{52.70}

La degradación de los polímeros se inicia por reacciones que rompen las cadenas moleculares,⁶⁸ los tipos de degradación de los polímeros son:

- ♥ Térmica
- ♥ Mecánica
- ♥ Química
- ♥ Biológica
- ♥ y por Radiación Química

3.2.1.1 Degradación Térmica

Se presenta cuando el polímero es expuesto a elevadas temperaturas, originando cambios químicos en la estructura del material, las impurezas o aditivos que contiene reaccionan con la matriz del mismo polímero en presencia de calor.^{1,4}

3.2.1.2 Degradación mecánica

Se lleva a cabo por los efectos macroscópicos que producen los esfuerzos de cizalla; éstos generan calor de fricción, iniciando el rompimiento de cadenas. La degradación mecánica se lleva a cabo con la velocidad del husillo.^{4,12}

3.2.1.3 Degradación fotoquímica

La irradiación con luz ultravioleta o visible al polímero, origina cambios físicos y químicos debido a que se propician reacciones fotoquímicas. Para que se lleve a cabo la fotodegradación es importante la absorción de los rayos UV por los cromóforos; con los rayos UV se inicia a longitudes de onda de 400 nm.^{1, 4, 42}

3.2.1.4 Degradación química

Se refiere estrictamente a los cambios que se producen cuando el polímero tiene contacto con ácidos, bases, solventes y gases reactivos.^{1, 4}

3.2.1.5 Degradación biológica

Se basa en el ataque de microorganismos al polímero el cual se efectúa por un proceso químico, donde el carbono del polímero sirve como fuente de energía a los microorganismos. Existe una gran variedad de enzimas que son capaces de reaccionar con materiales sintéticos y naturales, sin embargo, los materiales poliméricos de mayor uso son prácticamente inertes al ataque de microorganismos, con excepción del PVC flexible, por lo que es necesaria la adición de aditivos para promover la degradación, como el almidón, por ejemplo.^{3, 19, 65}

3.2.2 Degradación Biológica

3.2.2.1 Conceptos

La biodegradación o degradación biológica, está estrechamente relacionada con la degradación química, solo que la primera involucra un ataque microbiano en vez de un ataque por agentes químicos. Los microorganismos producen una gran variedad de enzimas las cuales son capaces de reaccionar con polímeros naturales y algunos sintéticos.³ El ataque de las enzimas al polímero es un proceso, el cual es inducido por los microorganismos para la obtención de nutrientes, ya que el polímero le sirve como fuente de carbono.¹⁹ Este ataque ocurre en un amplio intervalo de temperaturas, siendo las temperaturas óptimas inferiores a 70° C.⁷

La biodegradación de los compuestos se puede llevar a cabo a través de microorganismos. Si los grupos funcionales de los compuestos no se modifican mucho en el medio en el que son depositados, entonces es posible para las enzimas catalizar reacciones específicas en ellos. Estas atracciones existentes de una enzima hacia su nuevo sustrato es llamado biodegradación fortuita.³⁵

Si los microorganismos, los cuales llevan a cabo esta degradación fortuita pueden usar la energía liberada y pueden usar al carbono de las cadenas para crecer, la degradación continuará como un proceso natural.³⁵

Si los microorganismos no pueden extraer energía y reducir la fuerza de las reacciones, estos solo podrán efectuar la degradación del compuesto a través del

uso adicional de carbono y de energía tomada del medio ambiente. La biodegradación de un sustrato no desarrollado, en presencia de un sustrato desarrollado o en otro compuesto biodegradable llamado co-sustrato se ha denominado cometabolismo. El término inicial de cooxidación fue establecido para aquellas reacciones que no son de oxidación pero que se llevan a cabo de esta forma, es decir en presencia de un sustrato diferente al que se utiliza para que se lleve a cabo la reacción, la presencia o ausencia de dicho sustrato durante la reacción no es necesaria.^{7, 15}

Los sustratos endógenos pueden hacerse cargo de suministrar la energía necesaria. Por ejemplo en una reacción catalizada por una enzima se efectúa una transformación, donde, una reacción inicial no metabólica tiene lugar en los compuestos, si el paso inicial ocurre por una enzima relativamente no específica, esto puede dar lugar a la acumulación de productos que pudieran llegar a ser tóxicos.⁴⁴

La degradación del producto puede ser continuada a través de una segunda especie, hasta que finalmente resulte en un producto completamente utilizable como fuente de energía. Por lo que se puede decir que el proceso de biodegradación se lleva a cabo con mayor probabilidad si intervienen diferentes tipos de microorganismos dentro de una comunidad.⁴³

Bajas velocidades de síntesis de algunas enzimas pueden ofrecer nuevas oportunidades para la degradación. La biodegradación análoga en el medio

ambiente puede ser inducida por las enzimas de los microorganismos capaces de degradar a los contaminantes orgánicos en el medio ambiente.^{3, 44}

Desafortunadamente para los defensores del medio ambiente, los polímeros hechos por el hombre son teóricamente biodegradables pero esencialmente inertes. Se ha encontrado que la degradación microbiana parece ser más efectiva en polímeros de bajo peso molecular, mientras que las matrices de las macromoléculas se ven apenas afectadas.⁴⁵

Los productos naturales que son particularmente susceptibles al ataque biológico son:

Plásticos Industriales - hidrolizables por bacterias y hongos.

Goma Natural - parcialmente consumible por microorganismos del suelo.

Almidón - degradado fácilmente por bacterias y hongos.

Celulosa - atacada por agentes biológicos, mediante hidrólisis enzimática.

3.2.2.2 Modos de Degradación Biológica

Recientemente se han buscado alternativas para poder mejorar la degradación de tipo biológica a través de nuevos métodos, los cuáles se trataran a continuación, mencionando los mecanismos más empleados o utilizados.

3.2.2.2.1 Degradación Enzimática:

Las enzimas están involucradas principalmente en el mecanismo químico de la degradación de polímeros (tabla 3.3), específicamente en la descomposición de

éstos. Algunas especies han desarrollado la capacidad de sintetizar enzimas que pueden descomponer polímeros naturales en sus sistemas digestivos, estos procesos de degradación han llegado a ser altamente específicos y no operan hacia sustratos de diferente naturaleza química.⁴⁵

La degradación enzimática ocurre por medio de un proceso catalítico, la conformación molecular es muy importante para la especificidad de la enzima, y esta enzima puede inactivarse muy rápidamente como una respuesta a las variaciones del pH, la temperatura o el solvente.

Algunas enzimas requieren que otras enzimas, las co-enzimas, estén presentes para potenciar su actividad, en algunos casos forman asociaciones complejas en donde las co-enzimas actúan como un donante o aceptor para un grupo específico.⁵³

Tabla 3.3 Enzimas capaces de romper la cadena principal de los polímeros naturales

TIPO	ENZIMAS	POLÍMERO	ACTIVIDAD
Carbohidrasas	Amilasa	Amilosa	Bacteria, Malta, Páncreas
	Fosforilasa	Amilosa,	Bacteria, Levadura, Plantas,
	Celulasa	Amilopectina	Bacteria, Hongos
	Lisozima	Celulosa Polisacáridos En la pared celular	Secreciones del cuerpo Clara de huevo
Proteasas	Pepsina	Proteínas	Mucosa gástrica
	Tripsina	Proteínas	Páncreas
	Carboxipeptidasa	Proteínas	Bacteria, Páncreas
Esterasas	Ribonucleasas	Ácido ribonucleico (RNA)	Bacteria, Plantas, Bazo, Páncreas
	Desoxirribonucleasas	Desoxirribonucleico	Bacteria,
	Fosfodiesterasas	Ácido (DNA) Ácido nucleico (DNA, RNA)	Páncreas Veneno de serpientes Mucosa intestinal Células de leucemia Bazo

En polímeros sintéticos, las enzimas tienden a atacar solo los extremos de la cadena, el proceso es bastante lento. Frecuentemente, las enzimas se designan de acuerdo a su mecanismo de acción, por ejemplo las hidrolíticas, son enzimas que catalizan por hidrólisis los enlaces éster-, éter-, o amida (peptidos).^{71, 72}

3.2.2.2 Degradación Microbiana

Los microorganismos, tales como los hongos y las bacterias, degradan polímeros al ingerir los átomos de carbono que conforman el esqueleto del polímero (Tabla 3.4). Esto se puede llevar a cabo en un ambiente aeróbico o anaeróbico. Sin embargo debido a la hidrofobicidad de muchos plásticos, las condiciones óptimas de crecimiento -agua y luz- se encuentran rara vez y los microorganismos comúnmente atacan solo superficialmente.^{13, 65}

Tabla 3.4 Microorganismos típicos empleados para las pruebas de biodegradabilidad.

Hongos	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Chaetomium globosum</i> , <i>Penicillium funiculosum</i> , <i>Pullularia pollulans</i>
Bacterias	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Corynebacterias</i> .
Actinomycetes	<i>Streptomycetaceae</i>

En el campo de la degradación microbiana la biotecnología se enfoca principalmente al proceso de degradación de residuos, para que sean inertes al ambiente, aunque estos no puedan ser aprovechados en procesos posteriores. Se han realizado esfuerzos en desarrollar procesos de degradación en medios

acuosos, por que los residuos producidos (materiales sólidos y gaseosos) son incompatibles con el medio acuoso. Debido a que la degradación es impedida por la cantidad y calidad de los residuos liberados, se requiere de el enriquecimiento del medio a través de la adición de una población de microorganismos que descompongan los residuos.^{9, 16}

Algunos microorganismos son termofilicos, es decir, ellos proliferan a temperaturas altas (40° - 70° C) con un aumento óptimo del crecimiento a 50° - 55° C ó aún más alto entre 50° y 70° C. Cabe mencionar que este tipo de temperaturas altas predominan en pilas de composteo. Además, este grupo de microorganismos termofilicos juegan un papel importante en la descomposición del material plástico en bioreactores. En la tabla 3.5 se muestra una lista de microorganismos que proliferan a temperaturas superiores a los 60° C.¹³

Tabla 3.5 Microorganismos termofilicos, aerobios que existen en el suelo y que proliferan o multiplican a temperaturas superiores a los 60° C.

GÉNERO	ESPECIES	CRECIMIENTO ÓPTIMO EN LA TEMPERATURA (° C)
<i>Bacillus</i>	<i>calidolactis</i>	60 - 65
	<i>pepo</i>	60
	<i>therminalis</i>	60 - 65
	<i>thermodiastaticus</i>	65
	<i>tostus</i>	60 - 70
<i>Actinomyces</i> (<i>Streptomyces</i>)	<i>nondiastaticus</i>	65
	<i>spinosporus</i>	60 - 65
	<i>thermodiastaticus</i>	65
	<i>thermofuscus</i>	60
	<i>thermophilus</i>	60
Hongos: <i>Thermoascus</i> <i>Thermoidium</i>	<i>aurantiacus</i>	60
	<i>sulfureum</i>	60

3.2.2.3 Efectos en la Estructura Polimérica

Las macromoléculas naturales como la celulosa o las proteínas, son generalmente degradadas por los sistemas biológicos por medio de hidrólisis seguida de oxidación. Por ello no es sorprendente el hecho de que la mayoría de los polímeros biodegradables contengan enlaces hidrolizables entre las cadenas poliméricas, como las amidas, los ésteres, las ureas y los uretanos.^{3, 19, 23}

Debido a que la mayoría de las reacciones catalizadas por las enzimas ocurren en medios acuosos, el efecto del carácter hidrofílico - hidrofóbico de los polímeros sintéticos afecta considerablemente la biodegradabilidad. Un polímero que contiene tantos segmentos hidrofóbicos como hidrofílicos, es más biodegradable que aquellos polímeros que contienen solamente estructuras ó hidrofóbicas ó hidrofílicas.¹⁹

Con el objeto de aumentar la biodegradabilidad de un polímero sintético por acción de catálisis enzimática, la cadena polimérica deberá de ser lo suficientemente flexible para poder embonar con el sitio activo de la enzima. Esto explica por que los poliésteres alifáticos que son muy flexibles, son fácilmente degradados en sistemas biológicos, mientras que el poli(tereftalato de etileno), que es muy rígido, es generalmente considerado bio-inerte.³⁵

Una de las principales diferencias entre las proteínas y los polímeros sintéticos, consiste en que las proteínas no presentan unidades repetitivas

equivalentes a lo largo de la cadena polipeptídica. Es muy probable que esta propiedad contribuya a la facilidad de biodegradación de las proteínas. Los polímeros sintéticos, por otro lado, generalmente presentan unidades repetitivas cortas y esta regularidad favorece a los grupos hidrolizables para que sean inaccesibles para las enzimas. Podemos esperar que los polímeros sintéticos que presentan unidades repetitivas muy grandes, sean susceptibles a ser biodegradables.^{52, 56}

3.2.2.4 Procesos Degradativos

Los procesos biodegradativos están sujetos a la inhibición por una variedad de agentes y la interacción de estos con las enzimas microbianas. Aditivos, impurezas y aun productos intermedios de la biodegradación, pueden retardar o prevenir este proceso degradativo.⁷⁰

Dado que la degradación puede ser iniciada en la superficie, el estado de subdivisión del plástico es un factor importante. La naturaleza semicristalina de los plásticos, tiende a limitar la accesibilidad a las regiones amorfas, donde la degradación es más efectiva. Los polímeros naturales son los más susceptibles a biodegradarse que los polímeros sintéticos, porque estructuralmente son diferentes a los sintéticos y más accesibles a las enzimas microbianas.⁷¹

En general, los polímeros sintéticos que pueden biodegradarse, son aquellos que contienen en su cadena molecular principal, especies químicas específicas que

promueven la biodegradación. Los poliésteres alifáticos y poliuretanos que son biodegradables, contienen en su estructura molecular grupos éster. Otros materiales sintéticos como el polivinilacetato, las poliamidas, las resinas fenol-formaldehídicas, las resinas melamina-formaldehídicas, son medianamente biodegradables; mientras que los polímeros naturales modificados, tales como el rayón, acetato de celulosa, nitrato de celulosa y celulosa de hidroxipropilo, son más biodegradables.^{39, 66}

3.2.3 Biodegradación de Plásticos

La degradación se define como cualquier cambio físico o químico en un material, causado por factores ambientales (luz, calor, humedad, entre otros), condiciones químicas (oxidación, hidrólisis) o actividad biológica, que llevan dicho material hasta su completa desintegración.^{3, 52}

La biodegradación se considera como una degradación por organismos vivos e implica cualquier cambio en la estructura química de un sustrato, llevado a cabo por la actividad de agentes biológicos. Para la completa biodegradación de un material plástico se ha mostrado que su deterioro fisicoquímico previo incrementa el área superficial susceptible a degradación, de manera que las enzimas extracelulares producidas por microorganismos atacan los segmentos poliméricos de estructuras menos complejas y finalmente los intermediarios resultantes de bajo peso molecular son mineralizados o incorporados a la biomasa microbiana.^{65, 68}

La biodegradabilidad de un material radica en su estructura molecular; la cadena polimérica debe ser flexible y tener una estereoconfiguración que le permita acoplarse dentro del sitio activo de las enzimas degradativas provenientes de ciertos microorganismos. En la naturaleza, los polímeros se degradan preferencialmente por reacciones hidrolíticas, y la presencia de enlaces éster, éter o amido facilitan la degradación por vía biológica. La biodegradación está también influenciada por una serie de parámetros del entorno, tales como:

a) Las características fisicoquímicas del ecosistema:

- Temperatura
- pH
- Potencial Redox
- Contenido de agua
- Contenido de oxígeno
- Suministro de nutrientes
- Presencia de inhibidores

b) Las características microbiológicas del ecosistema:

- Diversidad microbiana
- Distribución espacial de microorganismos
- Habilidad de adaptación
- Densidad de población
- Actividad microbiana

c) Las propiedades originales del material:

- **Composición del polímero**
- **Peso molecular**
- **Distribución del peso molecular**
- **Cristalinidad**
- **Temperatura de transición vítrea**
- **Porosidad**
- **Hidrofobicidad**
- **Configuración estérica**
- **Tipo de enlace entre monómeros**

d) Procesamiento del material:

- **Tipo de proceso o manufactura**
- **Características de superficie**
- **Espesor o grosor del material**
- **Presencia de aditivos**
- **Rellenos**
- **Número de capas**

Que son factores que influyen en el rango de biodegradación de los plásticos.^{19,53, 65,}

Existen tres requisitos principales que deben cumplirse para que ocurra una completa biodegradación de materiales poliméricos del tipo de las poliolefinas ^{39, 64, 68,}

1. Primero, el polímero debe ser convertido en productos metabolizables por medio de reacciones no biológicas;
2. El medio en el que el polímero es expuesto debe facilitar las reacciones de ruptura de la molécula y no inactivar el sistema de degradación, y
3. Un alto porcentaje de los productos finales de estas reacciones debe de tener un tamaño de molécula (menor de 32 átomos de carbono) que lo haga susceptible al ataque microbiano.

3.2.3.1 Polímeros biodegradables

Los plásticos desarrollados a lo largo de los pasados 50 años se han caracterizado por ser inertes y resistentes al ataque microbiano. Sin embargo, en los últimos catorce años se ha puesto un enorme interés en el desarrollo de nuevos plásticos biodegradables, para lo cual, se les han introducido grupos carbonilo (CO), éster o amido, o bien agentes prooxidantes (metales de transición y lípidos) en la molécula polimérica para inducir su hidrólisis o su oxidación y así facilitar su biodegradación. Otra alternativa ha sido la incorporación de polímeros naturales (biopolímeros) de fácil asimilación (almidón) en el polímero sintético recalcitrante (difícilmente biodegradable, como el polietileno y el poliestireno), de tal manera, que estos plásticos, en los que la resistencia al ataque microbiano se ha reducido por la incorporación de moléculas difieran entre sí en el alcance de degradación, aplicaciones y costos.^{2, 11, 25, 63}

Los polímeros modificados por la incorporación de moléculas pueden entonces ser degradados a través de diferentes mecanismos, como la degradación química, la fotodegradación y la biodegradación. Sin embargo, este

tipo de polímeros no se consideran realmente biodegradables, ya que solo se desintegran debido a que el compuesto biopolimérico (almidón) se degrada y deja la fracción polimérica sintética sin cambios, en una forma fragmentada. A pesar de esto, muchos de los polímeros con más recalcitrancia biológica, como el polietileno (PE), pueden ser significativamente degradables por la acción de esta clase de tratamientos.²

Además de los plásticos con moléculas o grupos incorporados principalmente en una matriz de polietileno (PE), se han desarrollado una serie de plásticos degradables, como los poli- β -hidroxialcanoatos (PHA), las policaprolactonas (PCL) y las poliláctidas (PLA), entre otros. A la par con el desarrollo de los plásticos también se han encontrado microorganismos capaces de crecer a partir de oligómeros de algunos de ellos.^{3, 6, 42, 46}

3.2.3.1.1 Poli- β -hidroxialcanoatos (PHA)

Los Poli- β -hidroxialcanoatos (PHA), poliésteres sintetizados como material de reserva por algunas bacterias, son termoplásticos y tienen una temperatura de fusión cercana a los 180° C.³⁹ El tipo y la cantidad de poliéster producido es dependiente de la cepa bacteriana, la fuente de carbono y las condiciones de cultivo empleadas. Las propiedades físicas y la biodegradabilidad de los poliésteres microbianos pueden regularse, mezclándolos con otros polímeros sintéticos o naturales, y de esta manera la molécula de los PHA puede alterarse para diversificar sus usos. El poli- β -hidroxibutirato (PHB), compuesto

por cadenas de ácido 3-hidroxiбутанóico, es uno de los PHA mejor conocidos y más estudiados hasta ahora.⁶

En 1988 la compañía británica ICI (Imperial Chemical Industries) desarrolló un proceso fermentativo controlado para producir copoliésteres ópticamente activos de 3-hidroxiбутirato y 3-hidroxi valerato (3HB-co-3HV) (Biopol), a partir de ácido propiónico y glucosa, producido por *Alcaligenes eutrophus*. La mayor parte del PHB que esta compañía fabrica es utilizado para empaques, y productos agrícolas y de higiene personal. Recientemente, la compañía alemana Wella ha empleado botellas para shampoo, hechas con Biopol y como resultado reporta un incremento en sus ventas.^{19, 36, 70}

Algunos ejemplos de posibles aplicaciones médicas del PHB se dan en la fabricación de medicamentos de liberación controlada y suturas quirúrgicas. Sin embargo, los usos potenciales de estos poliésteres depende de su biocompatibilidad y de su lenta reabsorción en ambientes biológicos (in vivo).⁶

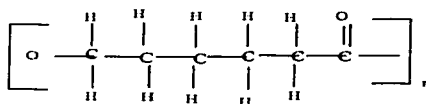
Por otra parte, entre las desventajas que presenta este plástico es el costo, ya que un contenedor hecho con PHB resulta siete veces más caro que otro de PE. Otro problema que representa el PHB y algunos plásticos biodegradables es que, por acción microbiana, éstos pueden romperse en pequeños fragmentos que en ocasiones resultan tóxicos. Sin embargo, la compañía ICI sugiere que el PHB puede ser reutilizado y reciclado junto con otros plásticos. Es posible también producir sintéticamente PHB de alto peso molecular y copolímeros con PHV a partir de β -butirolactona racémica y β -valerolactona,

respectivamente. Estos poliésteres sintéticos resultan menos susceptibles a la degradación enzimática que el poliéster producido por vía bacteriana.^{25, 30, 52}

3.2.3.1.2 ϵ -Policaprolactona (PCL)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Estructura molecular:



Otro poliéster alifático que ha llamado la atención debido a su biodegradabilidad es la ϵ -Policaprolactona (PCL). Se trata de un termoplástico cristalino sintético, con propiedades físicas similares a las del PE, que puede ser fabricado en un amplio rango de pesos moleculares por medio de la polimerización del monómero de caprolactona, un éster de la lactona. La PCL difiere del PE en que resulta parcialmente degradable después de dos meses de permanecer enterrada en el suelo, y al cabo de un año se observa su desintegración completa. Se ha reportado una cepa de *Penicillium* que es capaz de degradar casi completamente una PCL de Mn de 25 000 en 15 días, en donde Mn se define como el peso molecular promedio, que es la relación entre el peso total de todas las moléculas de una muestra polimérica y el número total de moles presentes.^{52, 67, 68}

La PCL es utilizada en el campo de la biomedicina, en la que se le ha empleado como matriz para medicamentos de liberación controlada. En el área agrícola se utiliza mezclada con alcanodiolos y poliésteres ácidos alcanodicarboxílicos en la

fabricación de contenedores para plántulas. También puede emplearse en la fabricación de frascos y contenedores de otros tipos.⁷¹

3.2.3.1.3 Otros polímeros biodegradables

El polivinil alcohol (PVA) es un polímero soluble en agua, con aplicaciones como agente adelgazante para emulsiones y suspensiones, y como película para empaques en los que se desea su solubilidad en agua. Por tratamiento químico, la estructura final del polímero puede llegar a hacerse insoluble. El PVA es una molécula fácilmente degradada por microorganismos.^{65, 71}

Existen polímeros con un grupo éster en su cadena principal, que son sensibles al ataque por esterasas inespecíficas o por mecanismos hidrolíticos, los polihidroxiácidos. El poliácido láctico (PLA) y el poliácido glicólico (PGA) junto con sus copolímeros son los polihidroxiácidos más sencillos. El PGA y PGA-co-PLA han sido utilizados para la fabricación de suturas degradables y adsorbibles. A la par con el desarrollo de estos plásticos se han encontrado hongos filamentosos capaces de crecer a partir de oligómeros de ambos polímeros; sin embargo, una desventaja del uso comercial del PLA es que su proceso de polimerización resulta muy costoso para aplicaciones en artículos y empaques desechables.^{18, 67}

Otro polímero biodegradable con posibles aplicaciones a futuro es la celulosa, que consta de una larga cadena formada por una sola unidad repetida, la glucosa, en la naturaleza se encuentra en estado cristalino y cuya biodegradación depende de su estructura y composición química, así como de la presencia de cubiertas. Algunos materiales plásticos derivados de la celulosa incluyen sus

ésteres y películas cubiertas con materiales como nitrocelulosa o cloruro de polivinilo, para conferirles propiedades hidrofóbicas y así hacerlos más resistentes al ataque microbiano.^{18, 71}

3.2.4 Microscopia electrónica

La potencia amplificadora de un microscopio óptico está limitada por la longitud de onda de la luz visible. El microscopio electrónico utiliza electrones para iluminar un objeto. Dado que los electrones tienen una longitud de onda mucho menor que la de la luz pueden mostrar estructuras mucho más pequeñas. La longitud de onda más corta de la luz visible es de alrededor de 4.000 ángstroms (1 ángstrom es 1×10^{-10} metros). La longitud de onda de los electrones que se utilizan en los microscopios electrónicos es de alrededor de 0,5 ángstroms.^{28, 47}

Hay dos tipos básicos de microscopios electrónicos: el microscopio electrónico de transmisión (Transmission Electron Microscope, TEM) y el microscopio electrónico de barrido (Scanning Electron Microscope, SEM). Un TEM dirige el haz de electrones hacia el objeto que se desea aumentar. Una parte de los electrones rebotan y otros son absorbidos por el objeto y algunos más lo atraviesan formando una imagen aumentada del espécimen. Para utilizar un TEM debe cortarse la muestra en capas finas, no mayores de un par de miles de ángstroms. Se coloca una placa fotográfica o una pantalla fluorescente detrás del objeto para registrar la imagen aumentada. Los microscopios electrónicos de transmisión pueden aumentar un objeto hasta un millón de veces.^{22, 28, 37}

Un microscopio electrónico de barrido crea una imagen ampliada de la superficie de un objeto. No es necesario cortar el objeto en capas para

observarlo con un SEM, sino que puede colocarse en el microscopio con muy pocos preparativos. El SEM explora la superficie de la imagen punto por punto, al contrario que el TEM, que examina una gran parte de la muestra cada vez. Su funcionamiento se basa en recorrer la muestra con un haz muy concentrado de electrones, de forma parecida al barrido de un haz de electrones por la pantalla de una televisión. Los electrones del haz pueden dispersarse de la muestra o provocar la aparición de electrones secundarios. Los electrones perdidos y los secundarios son recogidos y contados por un dispositivo electrónico situado a los lados del espécimen. Cada punto leído de la muestra corresponde a un píxel en un monitor de televisión. Cuanto mayor sea el número de electrones contados por el dispositivo, mayor será el brillo del píxel en la pantalla. A medida que el haz de electrones barre la muestra, se presenta toda la imagen de la misma en el monitor. Los microscopios electrónicos de barrido pueden ampliar los objetos 100.000 veces o más. Este tipo de microscopio es muy útil porque, al contrario que los TEM o los microscopios ópticos, produce imágenes tridimensionales realistas de la superficie del objeto.^{22, 38}

El bombardeo de electrones sobre la muestra produce varias formas simultáneas de radiación, entre ellas, la emisión de electrones secundarios. La detección de esa señal en un gran número de puntos sobre el área barrida, previa transformación electrónica, genera la imagen que se visualiza en una pantalla de TV o es fotografiada mediante una cámara adosada al equipo. La excelente resolución (4nm) y la gran profundidad de foco (del orden de 2 micrones) permiten la aplicación del SEM a disciplinas del ámbito geológico-metalúrgico, biotecnología y ciencia de los materiales.^{28, 38}

4. Materiales y Métodos

4.1 Aislamiento, Purificación y Selección de hongos filamentosos

Los hongos filamentosos se aislaron de muestras de suelo recolectadas en vertederos a cielo abierto localizados en Tlaxcala, Morelos, Hidalgo y en el Estado de México, y en orillas de canales (Canal Nacional y de Caltongo), cabe señalar que estas muestras de suelo se tomaron a una profundidad no mayor de 10 cm. Estas fueron colocadas en bolsas de polipropileno estériles para su transportación hasta el laboratorio. De cada muestra de suelo se inoculó 1 g en un matraz Erlenmeyer de 125 mL con 50 mL de medio líquido A, conteniendo una mezcla de plásticos identificados con los números 1, 2, 3, 6 y 7 (0.5% de cada uno). Los matraces se incubaron a temperatura de 30° C, a 140 r.p.m., durante un periodo de tiempo de 20 días.

De cada uno de los matraces se tomó una alícuota de 0.3 mL que se colocó y se extendió en la superficie del medio B. Las cajas de Petri con este medio se dejaron reposar por 10 minutos para favorecer la absorción de la suspensión del suelo. Las cajas se incubaron a 30° C durante 15 días; al final de este tiempo se revisaron para seleccionar las colonias que crecieron.

De las placas anteriores se transfirieron las UFC con asa micológica a cajas de Petri con medio de PDA. Después de 48 h a 30° C se transfirieron las cepas a

tubos con agar inclinado de Papa-Dextrosa, estos se incubaron el mismo tiempo y a la misma temperatura.

La preselección de las cepas se realizó en tubos de 16 x 150 mm con medio líquido C los cuales contenían una tira de los plásticos de prueba 1, 2 ,3, 6 o 7. Estos se dejaron incubar a 30° C a 140 r.p.m. durante 40 días.

4.2 Mantenimiento de las cepas

Los hongos filamentosos seleccionados se mantuvieron en refrigeración a 4° C en tubos de agar inclinado de Papa-Dextrosa. Asimismo las cepas que al final del estudio presentaron una mayor actividad sobre los plásticos, se sometieron a un proceso de liofilización para su conservación a largo plazo^{24,30}

4.3 Prueba en tubo

En esta prueba se utilizó el medio D, suplementado con una fuente adicional de carbono, con el objeto de inducir el crecimiento de las cepas seleccionadas. Las fuentes de carbono adicionales fueron: glucosa, almidón, lactosa, maltosa y sacarosa; al mismo tiempo también se variaron los valores de pH del medio de cultivo, estos fueron: 4.0, 5.0 y 6.0. La fermentación se realizó en tubos para cada uno de los polímeros, se inocularon con asa micológica, se incubaron por 20 días a 30° C y 140 rpm. Los materiales plásticos grado industrial para esta prueba fueron: PET, HDPE, PVC, PS y PCL.

4.4 Identificación de la cepa seleccionada (MV-75)

*** Examen macroscópico:**

Se Inoculó con asa micológica la cepa seleccionada marcada como MV-75 en agar -Harina de Maíz con el objeto de observar la morfología de las colonias, el tipo de crecimiento, color de la colonia y pigmentación del medio.^{15, 29, 57}

*** Examen microscópico:**

Se aplicó la técnica de microcultivo para la identificación microscópica de las estructuras sexuales y asexuales del hongo filamentoso MV-75.^{13, 14, 27}

4.5 Prueba a nivel Matraz

4.5.1 Inóculo

Se sembró por picadura el hongo filamentoso MV-75 en un matraz Erlenmeyer de 125 mL conteniendo 50 mL de PDA sólido. Se creció por 5 días a temperatura de 30 ° C. Se colectaron las esporas con una solución salina 0.85 % suplementada con tween 80 (0.02%) y se contaron las esporas en una cámara de Neubauer, la concentración final fue de 1×10^8 esporas por mL. Esta suspensión fue utilizada como solución stock, para inocular cada experimento realizado, de tal forma que por cada 100 mL de medio de fermentación se inoculó 1 mL.

4.5.2 Desarrollo de la Fermentación:

Se utilizaron matraces Erlenmayer de 250 mL y 500 mL con 100 mL y 200 mL respectivamente de medio Czapek líquido modificado con 1% de Glucosa, a pH de 4.5, al medio anterior se le adicionaron diferentes concentraciones de PVC y PCL:

- a. PVC grado industrial a concentraciones de 2, 4 y 6%.
- b. PVC grado reactivo a concentraciones de 1, 2 y 3%
- c. PCL grado industrial a concentraciones de 2, 4 y 6%
- d. PCL grado reactivo a concentraciones de 1, 2 y 3%

Las fermentaciones se realizaron a una temperatura de 30° C, con agitación constante de 140 r.p.m y por un periodo de tiempo de 15 días; se tomaron muestras de 5 mL cada tres días durante el tiempo de incubación. A las muestras se les determinó:

- o Azúcares reductores
- o pH
- o y cuantificación de proteína

4.5.3 Determinación de Azúcares Reductores:

Se utilizó la técnica del Ácido Dinitrosalicílico para la determinación de azúcares reductores de Lorenz Miller.³²

Tal como esta técnica indica se obtuvo una curva de calibración de glucosa, que en este caso se preparó en un rango de 50 hasta 9000 µg de Glucosa/mL.

4.5.4 Determinación de pH

Se midió el pH de cada una de las muestras utilizando un potenciómetro marca Orion modelo 420A.

4.5.5 Cuantificación de crecimiento

Esta determinación se realizó utilizando un método indirecto, cuantificando la proteína en la muestra final de la fermentación, de la siguiente forma:

Rompimiento celular:

Se tomó una muestra de 5 mL de la fermentación y se centrifugó a 5000 rpm, el pellet se resuspendió en 5 mL de TCA 5%, se mantuvo a 20° C durante 12-24 h, y posteriormente se tomó un mL de la muestra en un tubo Ependorff, las células se rompieron con sonicador [*Soniprep 150*] a una longitud de onda de 18 durante 3-5 min. Enseguida se centrifugó a 13 500 r.p.m. durante 5 minutos, se decantó y el pellet se resuspendió en NaOH 0.4 N.

Determinación de Proteínas:

Para la determinación de proteína las muestras se compararon con una curva patrón de una solución standard de BSA (albúmina sérica bovina) conteniendo 500 $\mu\text{g/mL}$, en un rango de 0 a 100 $\mu\text{g/mL}$. Las determinaciones se realizaron utilizando la técnica de Lowry.³⁴ El producto de la reacción se midió en un espectrofotómetro [*Espectronic 21*] a una absorbancia de 595 nm.

4.6 Prueba a nivel Fermentador de 1000 mL

4.6.1 Características del Fermentador

Jarra de cristal (Applikon ,Shedam-Holland) con capacidad de 1000 mL de volumen de trabajo, tapa de acero inoxidable con puertos y adaptador para motor con conexión directa al impulsor con doble propela tipo paleta. Sistema completo autoclaveable. Doble puerto de temperatura para recirculación interna de fluido, conectados a un reciclador de agua con control de temperatura (Jubalo DC 77960). Sistema de control de aire a través de un rotámetro de plástico para 1 vvm.

4.6.2 Condiciones de fermentación

Se establecieron las siguientes: Temperatura 30°C, aireación 1 vvm y agitación 280 r.p.m. por un periodo de 18 días, durante este tiempo se tomaron muestras de 10 ml cada 48h.

4.6.3 Desarrollo de la fermentación

Se llevo a cabo en 1000 ml de medio Czapek liquido modificado con 1% de glucosa, a pH 4.5. Al medio anterior se le agregó: 1 % PVC Gr o 3% PCL Gr.

La inoculación, la determinación de azúcares reductores, proteína y la medición del pH se realizaron de la misma forma y con las diferentes técnicas o métodos antes mencionados, en el estudio a nivel matraz.

4.6.3.1 Determinación de la cantidad de O₂ disuelto

Se realizó con un electrodo galvánico conectado a un monitor New Brunswick Scientific, modelo 150.

4.6.4 Determinación de la actividad de esterasa

Esta actividad se midió titulando el sobrenadante de cada una de las alícuotas con NaOH 0.0496 N hasta ajustar el pH a 7.6 , lo cuál se observó con el cambio de color que presenta el azul de bromotimol a este pH. La actividad esterasa se reportó como los mL de NaOH 0.0496 N gastados para ajustar el pH a 7.6 de acuerdo a la técnica reportada por Miranda Romero Luis A.⁴¹

4.7 Observaciones al microscopio electrónico de barrido

Se realizaron observaciones con el microscopio electrónico de barrido de los materiales plásticos: PET, PS, PVC y PCL grado industrial después de 15 días de exposición con la cepa MV-75. De la misma forma se realizaron observaciones PCL y PVC grado reactivo posterior a la hidrólisis efectuada por la cepa MV-75.

En todos los casos las observaciones se realizaron en las muestras de los materiales plásticos afectados, después de ser secados al aire libre por un periodo de 24 horas. Las muestras una vez secas se observaron en primer lugar con microscopio simple para retirar un poco de crecimiento de la superficie de los materiales con ayuda de una aguja de disección y luego se procesaron de la siguiente manera: las muestras se trataron con baño de plata y después con baño de oro para posteriormente ser analizadas por microscopía electrónica, obteniendo finalmente las fotografías que mostraran el efecto de la hidrólisis en los materiales utilizados.

5. Discusión y Análisis de Resultados

El aislamiento de las cepas de hongos filamentosos provenientes de muestras de suelos específico para iniciar este estudio resultó adecuado. El número de cepas aisladas fue de 577, cabe hacer notar que el 45% de ellas se aislaron de muestras provenientes de un basurero localizado en Tlaxcala, estas cepas crecieron en un medio mínimo sólido cuya fuente de carbono fue una mezcla de plásticos identificados con los números 1, 2, 3, 6 y 7 (0.5% de cada uno) sin mostrar hidrólisis después de 15 días de incubación.

De acuerdo a lo anterior se logró una selección preliminar de 28 cepas en medio mínimo líquido conteniendo una tira de los plásticos antes mencionados, después de un periodo de incubación de 40 días, esta selección se basó principalmente en la observación de mayor crecimiento y de hidrólisis parcial o total sobre los plásticos, (Datos no mostrados).

En base a los resultados preliminares obtenidos se seleccionaron ocho cepas y se probaron por separado, estas fueron marcadas como MV-75, MV-116, OD-211, CG-313, CG-221, CG-423, TB-124 y TB-251; se crecieron a diferentes valores de pH y se utilizaron como inductores del crecimiento glucosa, almidón, maltosa, lactosa y sacarosa en una concentración de 1%; en esta prueba

se analizó comparativamente el crecimiento y la hidrólisis que mostraron las cepas sobre los plásticos en estudio (Anexo III), de acuerdo a estos resultados se observó que la cepa MV-75 fue la que mostró mayor capacidad de ataque.

5.1 Prueba en tubo

Los resultados obtenidos con la cepa MV-75 en la prueba en tubo fueron:

En la tabla 5.1.1 se muestra el crecimiento y el ataque obtenido con la cepa MV-75, aislada de suelo, utilizando el medio de cultivo líquido D, y además de los inductores de crecimiento PET grado industrial. (I Crecimiento del hongo en el medio, II Ataque (hidrólisis), * poco, ** moderado, *** mucho y // //// sin hidrólisis y sin crecimiento).

Tabla 5.1.1 Fuente de carbono: PET + I. C. 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Inductor de Crecimiento	pH _i	Observaciones						pH _f
		A	B	C	D	E	F	
Glucosa	4.0	*					***	6.18
	5.0	*					***	7.36
	6.0			***	*	*		8.26
Almidón	4.0			*			**	7.2
	5.0			*			**	6.9
	6.0	*		*			**	7.5
Maltosa	4.0		***				***	6.2
	5.0	*		**		*		8.4
	6.0		*	**		*		7.0
Lactosa	4.0		***				***	7.0
	5.0		**				**	7.1
	6.0		**				**	7.4
Sacarosa	4.0		**				**	5.0
	5.0		**				**	4.6
	6.0		**				**	5.5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la tabla 5.1.2 se muestra el crecimiento y el ataque obtenido con la cepas MV-75, aislada de suelo, utilizando el medio de cultivo líquido D, y además de los inductores de crecimiento HDPE grado industrial. (I Crecimiento del hongo en el medio, II Ataque (hidrólisis), * poco, ** moderado, *** mucho y ///// sin hidrólisis y sin crecimiento).

Tabla 5.1.2 Fuente de carbono: HDPE + I. C. 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Inductor de Crecimiento	pH _i	Observaciones						pH _f
		A	B	C	D	E	F	
Glucosa	4.0		***	*		**		5.1
	5.0		***	**		**		4.8
	6.0		***	*		**		6.0
Almidón	4.0		**			**		6.8
	5.0		**			*		6.8
	6.0		***	*		***		6.7
Maltosa	4.0		***	*		**		5.2
	5.0		***	*		**		4.8
	6.0		**	*		*		5.2
Lactosa	4.0		**	*		*		7.3
	5.0		**	*		**		7.5
	6.0		**	*		*		7.4
Sacarosa	4.0		***	*		**		6.8
	5.0		***	*		**		6.6
	6.0		***	*		**		6.0

En la tabla 5.1.3 se muestra el crecimiento y el ataque obtenido con la cepas MV-75, aislada de suelo, utilizando el medio de cultivo líquido D, y además de los inductores de crecimiento PS grado industrial. (I Crecimiento del hongo en el medio, II Ataque (hidrólisis), * poco, ** moderado, *** mucho y ///// sin hidrólisis y sin crecimiento).

Tabla 5.1.3 Fuente de carbono: PS + I. C. 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Inductor de Crecimiento	pH _i	Observaciones						pH _f
		A	B	C	D	E	F	
Glucosa	4.0		**				***	3.8
	5.0		**				*	5.5
	6.0		**				**	4.6
Almidón	4.0		**	**		**		7.2
	5.0		***				**	7.1
	6.0		***				***	7.4
Maltosa	4.0	*	**			**		6.5
	5.0	*		*	*			6.6
	6.0	*	**			**		6.1
Lactosa	4.0	//////	//////		//////	//////		4.5
	5.0	//////	//////		//////	//////		5.5
	6.0		***	*	**			6.1
Sacarosa	4.0		***	*			***	4.9
	5.0		***				***	4.4
	6.0	*	***				***	4.8

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En la tabla 5.1.4 se muestra el crecimiento y el ataque obtenido con la cepas MV-75, aislada de suelo, utilizando el medio de cultivo líquido D, y además de los inductores de crecimiento PVC grado industrial. (I Crecimiento del hongo en el medio, II Ataque (hidrólisis), * poco, ** moderado, *** mucho y ///// sin hidrólisis y sin crecimiento).

Tabla 5.1.4 Fuente de carbono: PVC + I. C. 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Inductor de Crecimiento	pH _i	Observaciones						pH _r
		A	I B	C	D	II E	F	
Glucosa	4.0		***	**			***	6.9
	5.0		***	**			***	7.1
	6.0		**	**			**	7.5
Almidón	4.0		**					6.9
	5.0		***			**	***	7.2
	6.0		**			*		7.3
Maltosa	4.0		**			**		6.4
	5.0		***			**		6.7
	6.0		***	**			***	7.0
Lactosa	4.0		*			*		7.3
	5.0		**			*		7.1
	6.0		*		*			7.2
Sacarosa	4.0		***				***	6.6
	5.0		**			**		7.4
	6.0		**			**		7.0

En la tabla 5.1.5 se muestra el crecimiento y el ataque obtenido con la cepas MV-75, aislada de suelo, utilizando el medio de cultivo líquido D, y además de los inductores de crecimiento PCL grado industrial. (I Crecimiento del hongo en el medio, II Ataque (hidrólisis), * poco, ** moderado, *** mucho y ///// sin hidrólisis y sin crecimiento).

Tabla 5.1.5 Fuente de carbono: PCL + I. C. 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Inductor de Crecimiento	pH _i	Observaciones						pH _r
		A	I B	C	D	II E	F	
Glucosa	4.0		**				**	4.8
	5.0		**				**	7.1
	6.0		**				**	6.5
Almidón	4.0		***			*		6.7
	5.0		***			*		7.4
	6.0		***			*		6.4
Maltosa	4.0		**				*	7.4
	5.0		**				*	4.9
	6.0		**				***	6.8
Lactosa	4.0		**			**		7.4
	5.0		*			**		7.2
	6.0		*			**		7.2
Sacarosa	4.0		**			/////		4.9
	5.0		**			**		6.5
	6.0		**			**		6.5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Como se observa La cepa MV-75 mostró una actividad muy marcada y un crecimiento abundante sobre el PET en presencia de glucosa, maltosa y lactosa sobre todo a pH de 4.0 pero esta hidrólisis se vio disminuida conforme aumentaron los valores de pH (tabla 5.1.1); cuando el plástico fue HDPE la cepa en general creció abundantemente presentando gran actividad (5.1.2); con PS la cepa MV-75 creció en glucosa y en almidón pero el crecimiento y la hidrólisis disminuyeron en presencia de maltosa, sacarosa y lactosa (tabla 5.1.3); sobre PVC mostró buen crecimiento con actividad muy marcada sobre todo en glucosa a pH de 4.0 y 5.0 (tabla 5.1.4); en PCL la cepa creció moderadamente sobre glucosa mostrando hidrólisis a los tres pH, creció un poco más en presencia de almidón pero la actividad disminuyó y no creció en forma significativa en presencia de maltosa, lactosa y sacarosa (tabla 5.1.5).

Se puede observar comparativamente en las tablas del Anexo III que el comportamiento de las cepas fue diferente de acuerdo al plástico, el inductor de crecimiento y el pH de prueba. Así por ejemplo: la cepa OD-211 se desarrolla abundantemente en los tres valores de pH y con glucosa, pero no ataca al PET (Tabla 9.1.1.a), PS (Tabla 9.1.3.a) y PCL (Tabla 9.1.5.a); mientras que bajo las mismas condiciones presenta poca y moderada hidrólisis sobre PVC (Tabla 9.1.4.a) y HDPE (Tabla 9.1.5.a) respectivamente.. Cuando el inductor de crecimiento es almidón la cepa OD-211 crece abundantemente a los tres valores de pH pero a pH 4.0 no utiliza al PET (Tabla 9.1.1.b), hidroliza en forma moderada al HDPE (Tabla 9.1.2.b) y al PVC (Tabla 9.1.4.b), y poco al PS (9.1.3.b) y a la PCL (Tabla 9.1.5.b) en los tres valores de pH de prueba. En presencia de maltosa la cepa OD-211 crece moderadamente en los tres valores de pH pero no hidroliza al PET (Tabla 9.1.1.c),

presenta poca actividad con poco crecimiento en los tres pHs sobre HDPE (Tabla 9.1.2.c) y PVC (Tabla 9.1.4.c), y sobre PS (datos no mostrados) crece solo a pH 4.0 pero no muestra actividad, y sobre PCL (datos no mostrados) no muestra hidrólisis aunque crece moderadamente a los tres pHs. Al probar lactosa, crece poco a los tres valores de pH pero no presenta actividad sobre PET (Tabla 9.1.1.d); en HDPE (Tabla 9.1.2.d) y PCV (Tabla 9.1.4.d) crece abundantemente y presenta poca actividad, en PS (Tabla 9.1.3.d) sólo crece abundantemente a pH 4.0 pero no muestra hidrólisis, en PCL (datos no mostrados) crece poco a los tres pH y no la hidroliza. Finalmente al probar con sacarosa, crece en forma moderada a los tres pHs pero solo muestra poca actividad sobre PET (Tabla 9.1.1.e) a pH 6.0, en HDPE (Tabla 9.1.2.e) crece moderadamente y presenta poca hidrólisis a los tres pH, en cambio no hay actividad en PS (datos no mostrados) y PCL (datos no mostrados), y sobre PVC (Tabla 9.1.4.e) muestra poco crecimiento y poca hidrólisis.

5.2 Prueba a nivel de Matraz de PVC y PCL impuros y puros (Utilizando la cepa MV-75)

De acuerdo a los resultados presentados en las tablas (Anexo III) de la prueba en tubo, se seleccionó a la cepa MV-75 (proveniente del canal de Caltongo en Xochimilco) para efectuar los siguientes estudios; que se realizaron a nivel de matraz, ya que esta fue la única cepa que mostró crecimiento de moderado a abundante y una actividad creciente en los tres valores de pH de prueba, sobre todos los plásticos en estudio, en presencia de los cinco inductores del crecimiento.

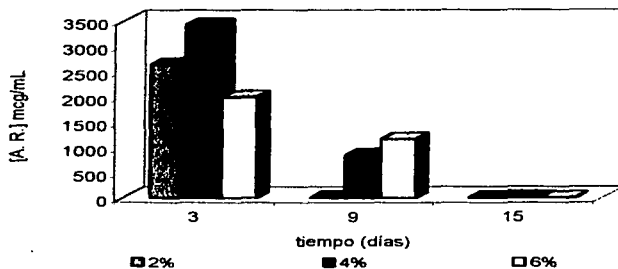
Debido a que el crecimiento de la cepa MV-75 fue adecuado a la temperatura de 30°C, esta misma temperatura se utilizó en todos los experimentos que se efectuaron. Cabe señalar que esta prueba, dio la pauta para fijar el pH de la fermentación y el inductor de crecimiento que se utilizó en la prueba a nivel de matraz. Se utilizó glucosa a una concentración del 1% en el medio, ajustado a pH 4.5, y en esta prueba se realizaron las comparaciones de biodegradabilidad de PVC y PCL en estado tanto puro como impuro a diferentes concentraciones, de esta manera se estudiaron los reactivos impuros en concentraciones de 2, 4 y 6% y los reactivos puros en concentraciones de 1, 2 y 3%; cabe agregar que en esta prueba la condición de agitación no pudo ser concluyente.

5.2.1 Fermentación en matraces de 250 mL

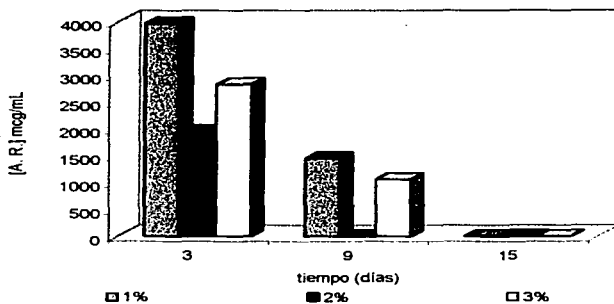
En la prueba a nivel de matraz de 250 mL/100 mL de medio se observó que en el control de glucosa la cepa MV-75 consumió todos los azúcares reductores antes de los 15 días de incubación (Grafica 5.2.1.1.e) mientras que, en el caso de los sustratos impuros cuando se utiliza PVC al 2 % y PCL al 4 y 6% los azúcares reductores se consumen antes de los 9 días de incubación (Gráficas 5.2.1.1.a y 5.2.1.1.c), y en el caso de los sustratos puros (grado reactivo), PVC al 2% y PCL al 1 y 3% los azúcares reductores se consumen también antes de los 9 días (Gráficas 5.2.1.1.b y 5.2.1.1.d); además se observó tanto en el control de glucosa como en el medio con los sustratos puros e impuros un aumento en el pH, éste aumento fue más significativo en el medio que contenía los sustratos dónde se consumieron más rápido los azúcares reductores (Gráficas 5.2.1.2.a - 5.2.1.2.e).

La agitación a 140 r.p.m. resultó adecuada para el desarrollo del hongo en este nivel; de tal forma que ésta situación nos condujo a mantener estos parámetros en los experimentos siguientes a nivel matraz.

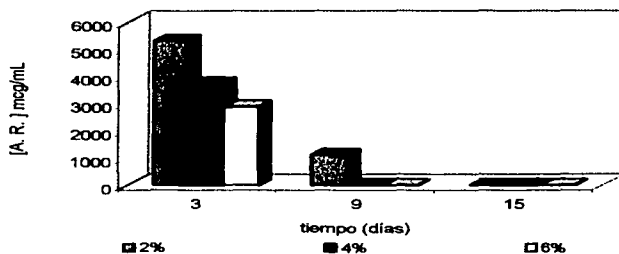
5.2.1.1 Determinación de Azúcares Reductores:



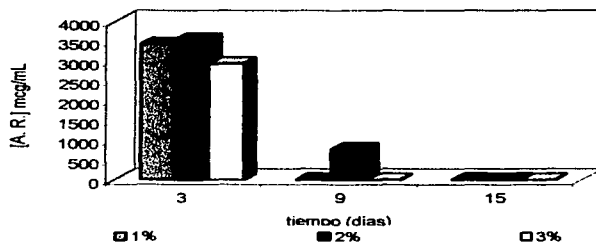
Gráfica 5.2.1.1.a Determinación del consumo de A. R. en el medio Czapek modificado con 1% de glucosa, conteniendo PVC grado industrial en concentraciones de: 2, 4 y 6%.



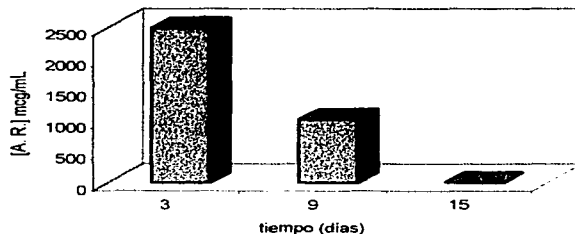
Gráfica 5.2.1.1.b Determinación del consumo de A. R. en el medio Czapek modificado con 1% de glucosa, conteniendo PVC grado reactivo en concentraciones de 1, 2 y 3%.



Gráfica 5.2.1.1.c Determinación del consumo de A. R. en el medio Czapek modificado, conteniendo PCL grado industrial en concentraciones de 2, 4 y 6%



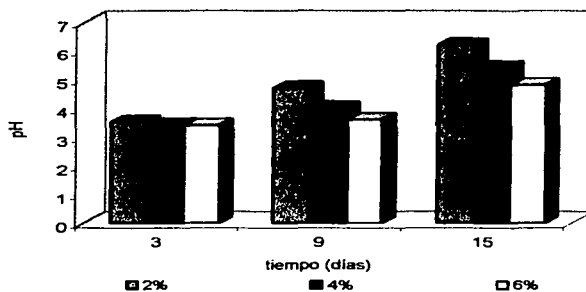
Gráfica 5.2.1.1.d Determinación del consumo de A. R. en el medio Czapek modificado, conteniendo PCL grado reactivo en concentraciones de 1, 2 y 3%.



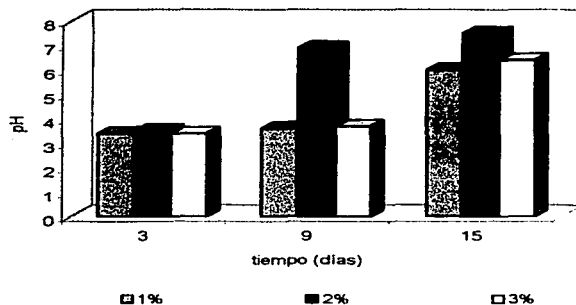
Gráfica 5.2.1.1.e Determinación del consumo de A. R. en el medio Czapek con 1% de glucosa y sin material plástico

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

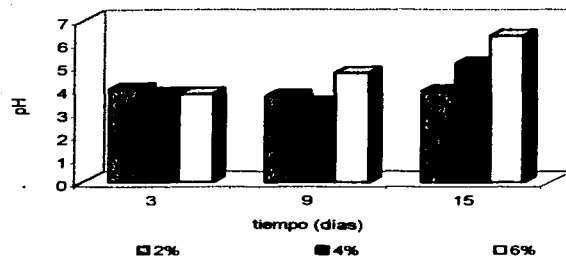
5.2.1.2 Determinación de pH



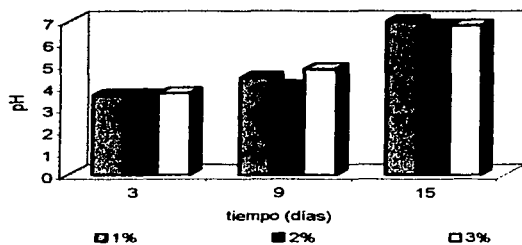
Gráfica 5.2.1.2.a Variación del pH en el medio Czapek modificado conteniendo PVC grado industrial en concentraciones de 2, 4 y 6%.



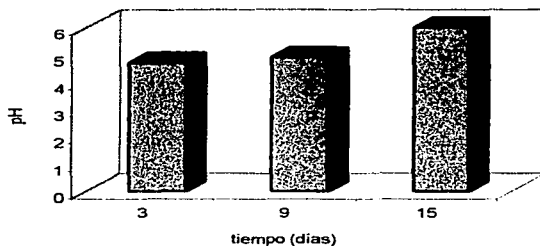
Gráfica 5.2.1.2.b Variación del pH en el medio Czapek modificado conteniendo PVC grado reactivo en concentraciones de 1, 2 y 3%.



Gráfica 5.2.1.2.c Variación del pH en el medio Czapek modificado conteniendo PCL grado industrial en concentraciones de 2, 4 y 6%.



Gráfica 5.2.1.2.d Variación del pH en el medio Czapek modificado conteniendo PCL grado reactivo en concentraciones de 1, 2 y 3%.

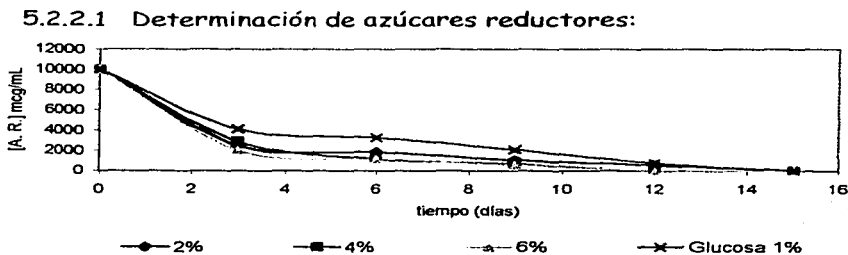


Gráfica 5.2.1.2.e Variación del pH en el medio Czapek modificado con 1% de Glucosa y sin material plástico.

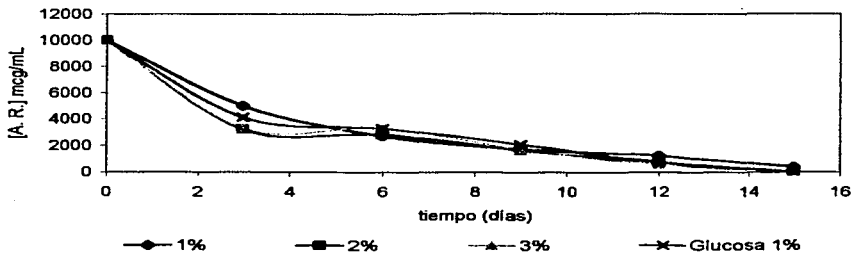
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.2.2 Fermentación en matraces de 500 mL

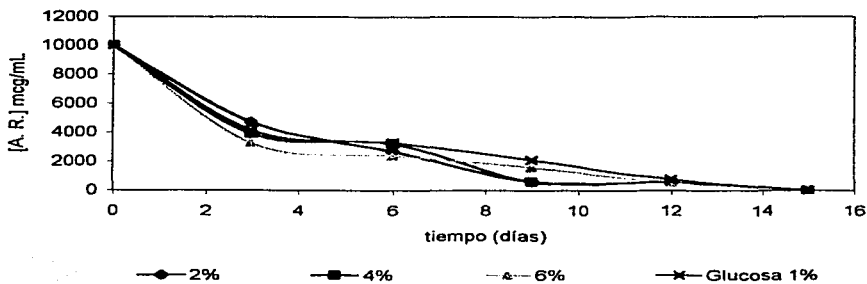
En los matraces de 500 mL/200 mL de medio se repitieron las mismas condiciones que en los matraces de 250 mL, aquí el estudio se complementó con el rendimiento de biomasa. El incremento en el volumen de fermentación, se efectuó con el objeto de fijar mas apropiadamente algunas condiciones y/o parámetros para el escalamiento a nivel de fermentador. Aquí, como en los matraces de 250 mL/100 mL de medio, se observó una disminución de azúcares reductores, los cuales se consumieron totalmente a los 15 días de crecimiento, resultados muy similares a los observados en el volumen menor de medio, dónde el consumo fue de 100%. Así en el caso de los sustratos impuros cuando se utiliza PVC al 4 y 6% y PCL al 2 y 4% los azúcares reductores se consumen casi totalmente antes de los 12 días (Gráficas 5.2.2.1.a y 5.2.2.1.c), y en el caso de los sustratos puros, PVC al 1% y PCL al 1, 2 y 3% la glucosa no se ha consumido totalmente a los 15 días de incubación (Gráficas 5.2.2.1.b y 5.2.2.1.d), por otro lado el pH en general tendió a bajar tanto en el control de glucosa como en el medio con los sustratos puros e impuros, aunque ésta bajada fue ligeramente más marcada en el medio que contenía los sustratos de PVC impuro y puro con respecto al control (Gráficas 5.2.2.2.a- 5.2.2.2.d).



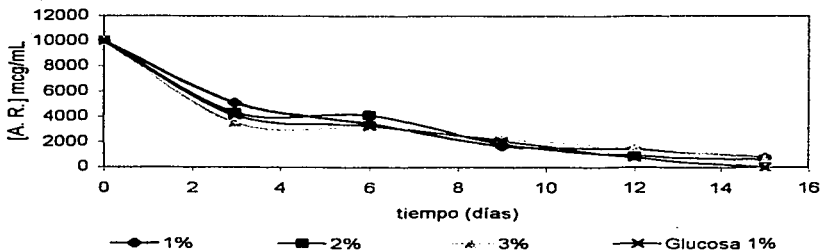
Gráfica 5.2.2.1.a Comparación del consumo de A. R. en el medio Czapek modificado conteniendo PVC grado industrial en concentraciones de 2, 4 y 6%, utilizando la cepa MV-75.



Gráfica 5.2.2.1.b Consumo de A. R. en el medio Czapek modificado conteniendo PVC grado reactivo en concentraciones de 1, 2 y 5%.



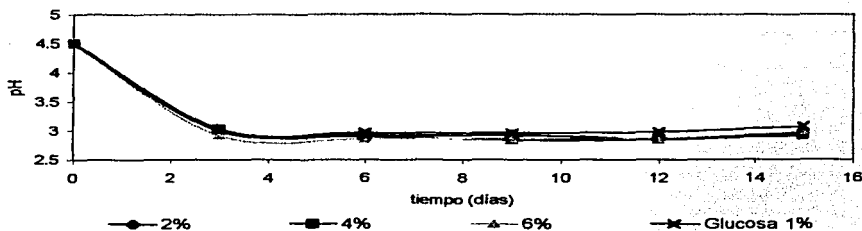
Gráfica 5.2.2.1.c Consumo de A. R. en el medio Czapek modificado conteniendo PCL grado industrial en concentraciones de 2, 4 y 6%.



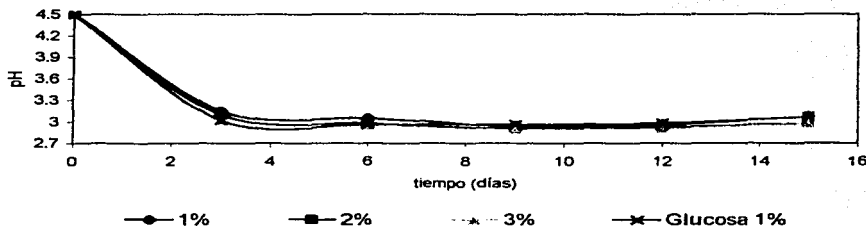
Gráfica 5.2.2.1.d Consumo de A. R. en el medio Czapek modificado conteniendo PCL grado reactivo en concentraciones de 1, 2 y 5%.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

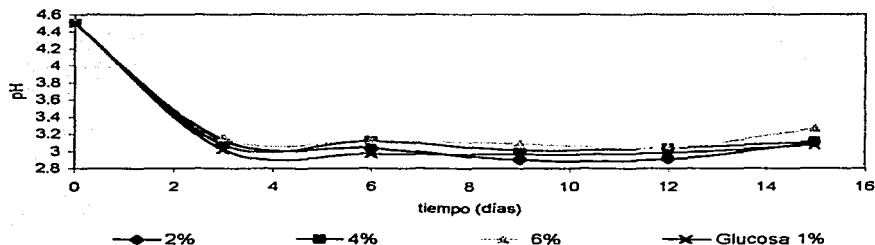
5.2.2.2 Determinación de pH



Gráfica 5.2.2.2.a Variación del pH en el medio Czapek modificado a diferentes concentraciones de PVC grado industrial (2, 4 y 6%).

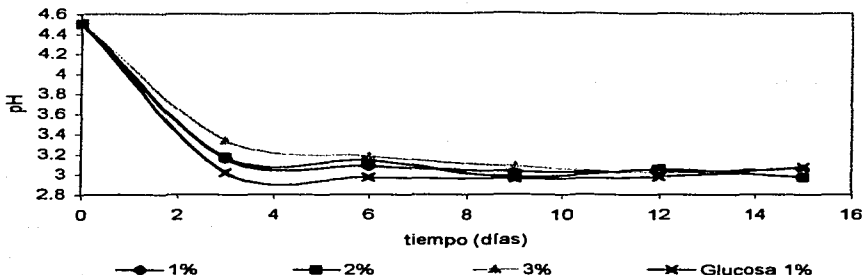


Gráfica 5.2.2.2.b Variación del pH en el medio Czapek modificado a diferentes concentraciones de PVC grado reactivo (1, 2 y 3%).



Gráfica 5.2.2.2.c Variación del pH en el medio Czapek modificado a diferentes concentraciones de PCL grado industrial (2, 4 y 6%).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

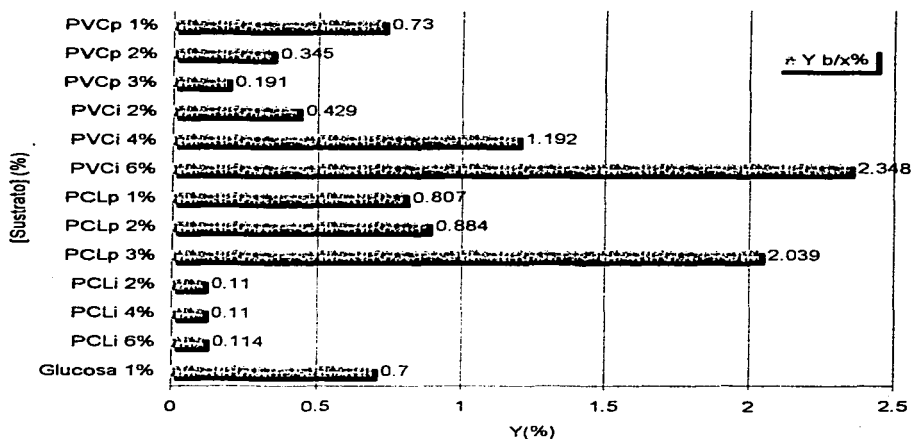


Gráfica 5.2.2.2.d Variación del pH en el medio Czapek modificado a diferentes concentraciones de PCL grado reactivo (1, 2 y 3%).

5.2.2.3 Cuantificación del Crecimiento [Proteína final]

Respecto a la determinación de la concentración de proteína fúngica se cuantificó a los 15 días de incubación, esto se realizó con el propósito de calcular el rendimiento de biomasa en forma indirecta, ya que no se pudo hacer con un método directo (peso seco) debido a que en el medio hay sustrato plástico que causa interferencias. Se observó un fenómeno interesante porque al utilizar PVC impuro el mayor rendimiento se obtuvo en la concentración de 6% mientras que al utilizar el sustrato puro el mayor rendimiento se observó en la concentración de 1%; por otro lado al utilizar PCL impura no hubo variación significativa de acuerdo a la concentración del sustrato y al utilizar PCL pura el mayor rendimiento se obtuvo en la concentración de 3%. De acuerdo a los resultados anteriores (Gráfica 5.2.2.3.1) suponemos que al utilizar PVC impuro el rendimiento es mayor conforme aumenta la concentración debido a que este sustrato contiene aditivos que quizás favorecen el crecimiento del microorganismo, y sin embargo, al utilizar

PVC puro el mayor rendimiento se da a menor concentración debido a que posiblemente el cloro de la molécula sea tóxica para el microorganismo, así mismo, al utilizar PCL impura el rendimiento es muy bajo sin importar la concentración, esto pudiera deberse a que los aditivos de este sustrato no son accesibles para el hongo y esto limita el crecimiento, cuando este sustrato se encuentra puro el rendimiento aumenta conforme aumenta la concentración y esto se debe a que es una molécula sencilla hidrolizable por el microorganismo.



Gráfica 5.2.2.5.1 Comparación de la producción de biomasa en el medio Czapek modificado, utilizando PVC y PCL grado industrial y grado reactivo a diferentes concentraciones y a los 15 días de fermentación.

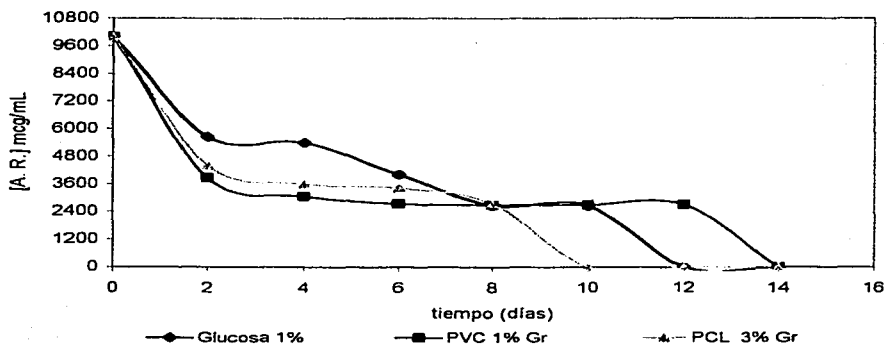
Estos datos indicaron la concentración de los sustratos puros a utilizar en la última prueba de este trabajo a nivel de fermentador de 1000 mL, así en esta

TESTS CON
FALLA DE ORIGEN

prueba se pudo determinar que el PVC puro en concentración de 1% y que la PCL en concentración de 3% serían las concentraciones adecuadas a utilizar. Es importante hacer notar que para el cálculo de Y_b/x se tomó en consideración exclusivamente el consumo de glucosa. Cabe mencionar que las condiciones de la fermentación fueron las mismas que en la prueba de menor volumen, es decir: pH 4.5, temperatura de 30° C a 140 r.p.m. y Glucosa como inductor de crecimiento al 1% en el medio de fermentación.

5.3 Prueba a nivel Fermentador de 1000 mL con PVC y PCL puros (Utilizando la cepa MV-75)

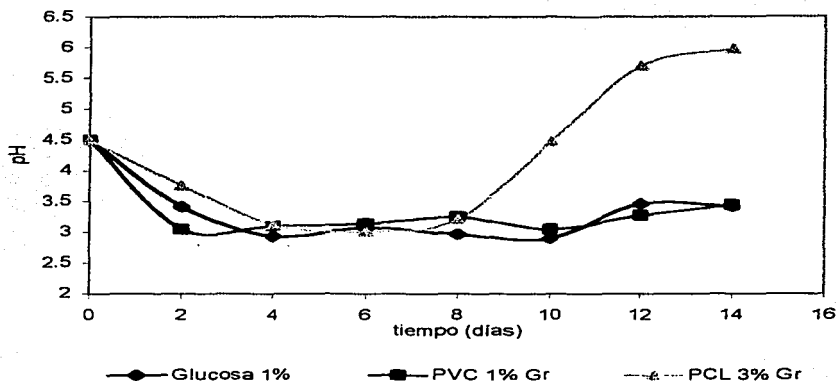
5.3.1 Determinación de Azúcares Reductores



Gráfica 5.3.1.1. Consumo de A. R. en el matraz con glucosa y en el medio con diferente plástico grado reactivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3.2 Determinación de pH

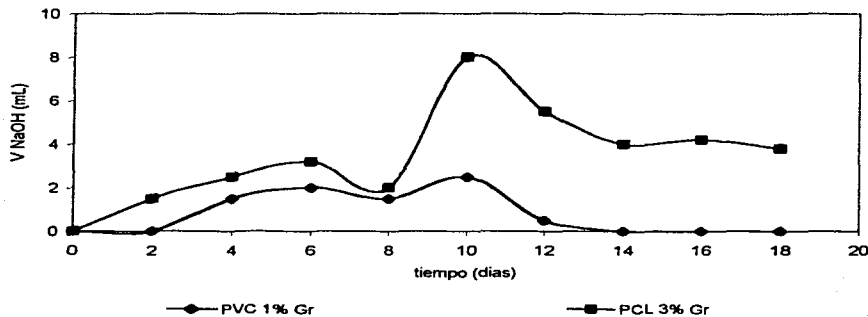


Gráfica 5.5.2.1. Comparación de las cinéticas de pH en el medio de fermentación y adicionado de PVC 1% y PCL 3% grado reactivo.

5.3.3 Determinación de la Actividad Hidrolítica: Esterasa

En esta prueba también se midió la actividad de esterasa y se observó una mayor actividad en el caso de la PCL a los 10 días de la fermentación (Gráfica 5.3.3.1); así a mayor volumen gastado es mayor la actividad esterasa esto se explica al considerar que la actividad esterasa se midió indirectamente como la liberación de ácido orgánico que proviene de la hidrólisis de la molécula de policaprolactona. En el PVC la actividad de esterasa es más o menos constante y

comparando esta cinética con la de crecimiento (Gráfica 5.3.4.1) se puede observar que ésta se encuentra parcialmente asociada al crecimiento.

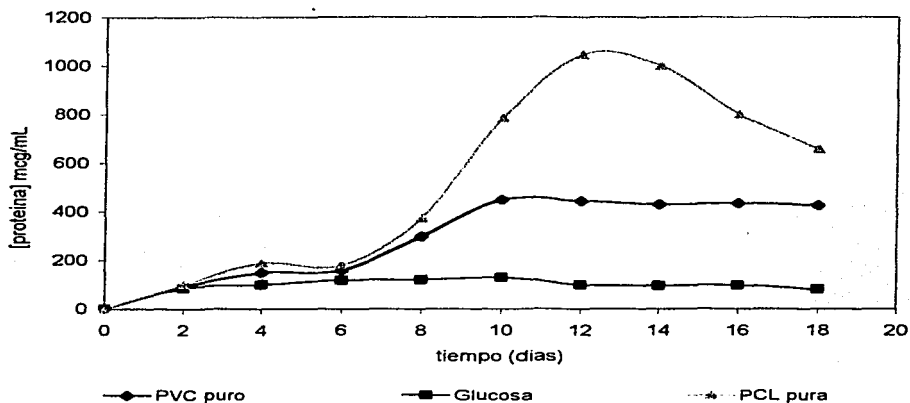


Gráfica 5.3.3.1. Comparación de la variación de la actividad de esterasa en los medios de fermentación de PVC 1% y PCL 3% grado reactivo.

5.3.4 Cinética de Crecimiento

Cabe señalar que en la cinética de crecimiento (Gráfica 5.3.4.1) se llega a observar un comportamiento diáuxico muy claro, ya que entre el tercer y sexto día se mantiene una meseta para las tres condiciones, la cual dura aproximadamente cuatro días, manifestándose un crecimiento logarítmico solo en PVC puro y PCL pura al sexto día. Para PCL pura el crecimiento fue sustancialmente mayor en comparación del PVC puro, llegando a tener a los 12 días una diferencia de crecimiento de hasta 600 μ g/mL de proteína. Sin embargo, después de este tiempo la cepa no mantiene una fase estacionaria prolongada, más bien empieza a declinar, en una forma bastante abrupta. Cuestión que sin

lugar a dudas es un desbalance celular que da lugar a la lisis del hongo filamentoso.



Gráfica 5.3.4.1. Comparación de la cinética de crecimiento de la cepa MV-75 en el medio de fermentación utilizando PVC 1% y PCL 5% grado reactivo.

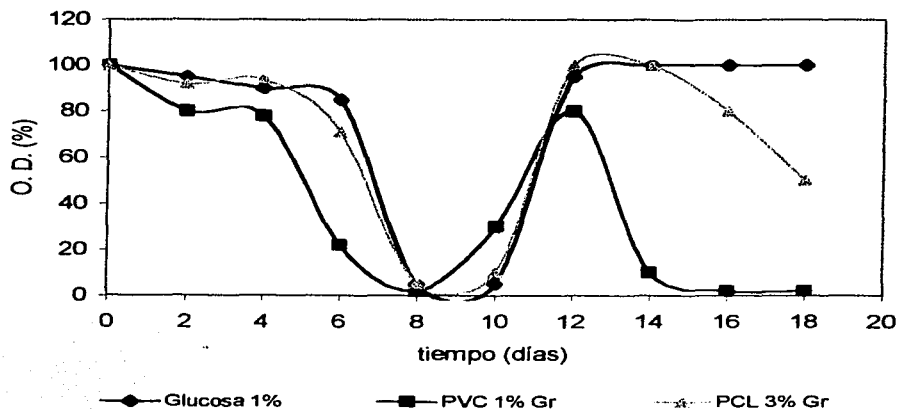
Por lo anterior, la liberación de los componentes celulares de la cepa MV-75 al medio, causa seguramente que el pH del medio se afecte y lo que podemos tener aquí es un efecto potenciador en la medición indirecta de la actividad esterasa, ya que como se menciono anteriormente con PCL pura la actividad esterasa resultó ser muy alta. Aunque no hay que perder de vista que solo con PCL se obtuvo un crecimiento sobresaliente sobre el sustrato.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3.5 Determinación de la cantidad de O₂ disuelto (OD)

Finalmente en la prueba a nivel de fermentador de 1000 mL se midió la cantidad de oxígeno disuelto en % (Gráfica 5.3.5.1), aquí observamos la confirmación de lo que observamos en las cinéticas de crecimiento (Gráfica 5.3.4.1), ya que el consumo de oxígeno es una medida más directa del metabolismo del microorganismo, lo cual nos da una idea más clara de la asimilación de los azúcares reductores y de los plásticos en estado puro. Podemos aquí considerar que el consumo de oxígeno es directamente proporcional a la degradación, donde se nota que la cepa MV-75 degrada en primer lugar los azúcares reductores como era de esperarse, aunque los degrada más rápidamente en presencia de PVC puro en comparación de PCL en presencia de la cual los degrada más lentamente. Cuando los azúcares reductores se han consumido totalmente se observa un aumento en la cantidad de oxígeno disuelto, así este vuelve a disminuir en el momento en que el microorganismo utiliza los sustratos plásticos en estado puro, tal disminución se hace más notoria en el caso del PVC. En el caso del control de glucosa la cantidad de oxígeno disuelto una vez que aumenta hasta 100 % no vuelve a disminuir por lo que en la cinética de crecimiento se observa solo una meseta, pero al utilizar PVC la cantidad de oxígeno disuelto aumenta sólo hasta 80% a los 12 días de incubación y disminuye hasta 2% a los 18 días de incubación mientras que en la cinética de crecimiento se observa una segunda fase logarítmica al sexto día; por otra parte al utilizar PCL la cantidad de oxígeno disuelto aumenta hasta 100% a los 14 días de incubación y disminuye solo hasta

50% a los 18 días de incubación observándose una segunda fase log al mismo tiempo que en el PVC.



Gráfica 5.5.5.1. Comparación de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de fermentación utilizando PVC 1% y PCL 3% grado reactivo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.4 Observaciones con Microscopio Electrónico de Barrido

Las observaciones con microscopio electrónico de barrido revelaron que efectivamente los materiales plásticos PVC y PCL grado reactivo sufrieron un deterioro en la superficie, haciendo notar que en el caso del PVC se observa un daño físico en la estructura del material aparentemente provocado a nivel de hifa y en el caso de PCL el daño parecer ser ocasionado de la misma forma.

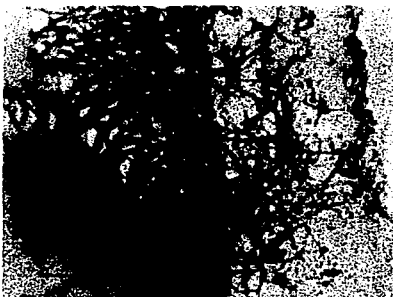


Material: PET impuro

Observación panorámica de un esporangio. Se observa también abundante crecimiento sobre la superficie del plástico aunque sin daño visible.

220 X

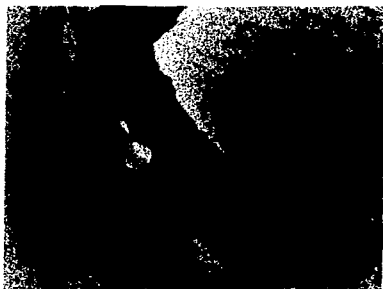
TESIS CON
FALLA DE COPIA



Material: PS impuro

Observación de la hidrólisis del material ocasionada por las enzimas producidas por el hongo desde la orilla hacia el centro.

180 X



Material: PS impuro

Acercamiento del daño provocado por hidrólisis que se presenta en la superficie de este plástico.

5200 X

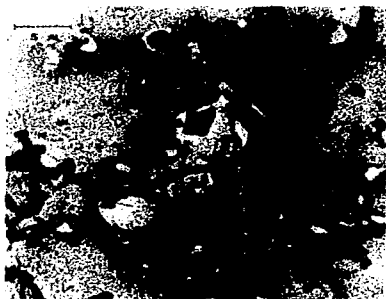
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Material: PS impuro

Imagen de un hueco completo provocado por hidrólisis con esterzas del hongo y situado en la orilla del polímero.

720 X



Material: PVC impuro

Observación de la superficie del plástico después de 15 días del ataque del hongo. Se observan las hifas, algunas esporas del hongo y hacia el centro de la imagen un daño muy marcado.

1300 X



Material: PCV impuro

Observación de la superficie del plástico con una visión clara del daño provocado por las esterizas del hongo sobre el material.

1000 X

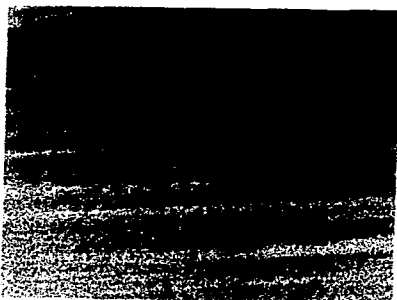


Material: PCV impuro

Observación de la superficie del plástico con crecimiento y con daño.

400 X

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Material: PCL impura

Observación de la superficie de policaprolactona pura y sin crecimiento del hongo. (Blanco)

1000 X



Material: PCL impura

Observación del plástico con crecimiento fúngico, donde se puede apreciar el efecto del crecimiento de las hifas sobre el material y el daño en el mismo.

1000 X



Material: PVC puro

Observación de PVC puro y sin crecimiento (Blanco).

440 X

TESIS CON
FALLA DE CUBEN



Material: PVC puro

Se observa crecimiento sobre las partículas de PVC puro, donde éste se ve envuelto y presenta daño.

600 X



Material: PCL pura

Observación de la superficie de PCL pura sin crecimiento.
(Blanco)

100 X



Material: PCL pura

Observación de la superficie de PCL pura con crecimiento
del hongo, se puede ver el crecimiento de una hifa que
origina daño a sus alrededores.

1600 X

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Material: PCL pura

Observación de la superficie de PCL pura donde se
observa un daño evidente/ocasionado por el hongo

1600 X

6. Conclusiones

- ✓ De 577 cepas se seleccionaron 28, que mostraron mayor crecimiento y/o mayor actividad sobre los plásticos de prueba (PET, PEAD, PVC, PS y PCL en estado impuro) en medio mínimo líquido sin inductor de crecimiento.
- ✓ De las ocho cepas elegidas que se probaron en tubo con medio mínimo líquido con inductor, se puede concluir que la cepa marcada como MV-75 provenientes de Xochimilco, fue la cepa que mostró mayor capacidad de hidrólisis sobre los materiales plásticos.
- ✓ Las observaciones con MEB revelaron un notable deterioro de la superficie de los plásticos PVC, PS y PCL en estado impuro.
- ✓ Atendiendo a las características macro y microscópicas de la cepa MV-75 se logró identificar como *Aspergillus* sp.
- ✓ De los resultados obtenidos en la prueba en tubo se determinó que el pH a utilizar en la siguiente etapa (a nivel matraz) sería de 4.5 y que el inductor de crecimiento más adecuado sería glucosa, así también se concluyó que la temperatura de 30° C fue la adecuada para el desarrollo de *Aspergillus* sp. MV-75.

- ✓ De los resultados obtenidos en la prueba a nivel matraz, dónde se probaron PVC y PCL en estado tanto puro como impuro, se puede concluir que en forma general los Azúcares Reductores se consumen más rápidamente en presencia de los plásticos que en el matraz con glucosa.
- ✓ En la prueba a nivel matraz se obtuvo un buen rendimiento de biomasa en PVC Gi 1% ($Y_b/x = 0.73\%$) y en PCL Gi 3% ($Y_b/x = 2.03\%$), dónde las condiciones de crecimiento fueron: Temperatura 30 °C, pH 4.5, agitación 140 rpm.
- ✓ De los resultados a nivel fermentador (Temperatura 30 °C, 1 VVM, pH 4.5 del medio Czapek 1% glucosa), dónde se probaron PVC y PCL puros se comprobó que estos materiales son utilizados por el hongo filamentoso una vez que ha consumido casi o totalmente los Azúcares Reductores, se originó una segunda fase log y paralelamente se observó un claro incremento en el consumo de oxígeno de la cepa MV-75..
- ✓ Tanto en PVC como PCL se observó actividad esterasa, sólo que en el caso de PCL dónde la actividad es muy alta, no resulta clara debido a que en el crecimiento se produce evidentemente una lisis celular.
- ✓ Las observaciones con MEB de PVC y PCL en estado puro revelaron una deterioración de la superficie de estos materiales.

7. ANEXO I: Simbología y Abreviaturas

*	Poco
**	Moderado
***	Mucho
////////////////	Sin hidrólisis y sin crecimiento
PET	Polietilentereftalato
PEAD	Polietileno de alta densidad
PVC	Cloruro de polivinilo
PCL	Policaprolactona
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PEBD	Polietileno de baja densidad
PVC Gr ð PVCp	Cloruro de polivinilo grado reactivo = puro
PVC Gi ð PVCi	Cloruro de polivinilo grado industrial = impuro
PCL Gr ð PCLp	Policaprolactona grado reactivo = pura
PCL Gi ð PCLi	Policaprolactona grado industrial = impura
Yb/x %	Rendimiento biomasa/sustrato (%)
µg/mL	Microgramo/militro
[Glucosa]	Concentración de glucosa

OD (%)	Cantidad de oxígeno disuelto en %
° C	Grado centígrado
N	Normalidad
Abs	Absorbancia
μL	Microlitro
min	minuto
g	gramo
MEB	Microscopio Electrónico de barrido
rpm.	No. de revoluciones por minuto
A. R.	Azúcares Reductores
[A. R.]	Concentración de azúcares reductores
n. d.	No determinado
pHs	Distintos valores de pH
VVM	Volumen de aire por volumen de medio en un minuto
Pellets	Conglomerados celulares

8. ANEXO II: Medios y plásticos utilizados:

1. El medio de cultivo utilizado en las pruebas para este estudio fue el recomendado por la ASTM,⁵ cuya composición química es la siguiente:

K_2HPO_4	0.7 g
KH_2PO_4	0.7 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.7 g
NH_4NO_3	1.0 g
$NaCl$	0.005 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002 g
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.002 g
$MnSO_4 \cdot H_2O$	0.001 g
H_2O destilada	1000 mL

* "J. T. Baker Analysed" reactivos

Las modificaciones que se hicieron al medio durante el trabajo fueron las siguientes:

1. Medio líquido A:

Se le agregó una mezcla de los plásticos 1, 2, 5, 6 y 7 en un porcentaje de 2.5% y se homogenizó con agitación por 15 minutos.

2. Medio sólido B:

Se agregó agar (Difco) al 1.5% (15.0 g) más una mezcla de los plásticos 1, 2, 5, 6 y 7 en un porcentaje de 2.5%.

3. Medio líquido C:

El medio líquido con la composición señalada y se adicionó en los tubos con una tira de 1.5 cm x 6 cm de los plásticos 1, 2, 5, 6, o 7.

4. Medio líquido D:

Es el medio indicado en el punto anterior y fue adicionado con glucosa, almidón, lactosa, maltosa o sacarosa en un porcentaje de 1%. (Todas las fuentes de carbono fueron "J. T. Baker Analyzed" reactivos)

El medio mineral se esterilizó en autoclave a 15 libras de presión durante 15 minutos y la mezcla de los plásticos se agregó al medio enfriado previamente a 40-45° C.

- II. El medio utilizado para el mantenimiento de las cepas fue: agar papa-dextrosa (Bioxon).
- III. El medio utilizado en la identificación de la cepa MV-75 fue Agar harina de maíz.⁵⁰ Se mezclaron 50 g de harina de maíz en 800 mL de agua destilada, se dejó en refrigerador toda la noche, se calentó a 60° C por una hora, se aforó a 1 L. Se adicionaron 7:5 g de agar (Difco) y se calentó para disolver.
- IV. El medio de fermentación utilizado para las pruebas a nivel matraz y a nivel de fermentador fue: Medio Czapek líquido modificado (con 1% de Glucosa):

$C_6H_{12}O_6$ *	10.0 g
$NaNO_3$ *	5.0 g
K_2HPO_4 *	1.0 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ *	0.5 g
$NaCl$ *	0.5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$ *	0.01 g
H_2O destilada	1000 mL

* "J. T. Baker Analyzed" reactivos

Los plásticos grado reactivo utilizados fueron de origen comercial (Fluka Chemica, S. A.):

Policaprolactona: Me -10 000 (PCL Gr).

Cloruro de Polivinilo de bajo peso molecular: Me - 48 000 (PVC Gr).

Los plásticos grado industrial utilizados fueron:

1. Poliétertereftalato (PET) grado envase.
2. Poliétereno de Alta Densidad (PEAD) grado envase.
3. Cloruro de Polivinilo (PVC) grado envase.
4. Poliéstereno (PS) grado envase.
5. Policaprolactona (PCL) grado fibra.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Nota: "1 PET", "2 PEAD", "3 PVC", "4 PS" y "5 PCL" de acuerdo al código Internacional SPI (Society of Plastics Industry).

9. ANEXO III: Prueba en Tubo

En estas tablas se maneja tanto el crecimiento de los hongos filamentosos en el medio (I) como el ataque de los mismos sobre el plástico (II); así en estas tablas se pueden observar los resultados cualitativos obtenidos en esta prueba.

Observaciones: Prueba en tubo

pHi:	pH inicial
pHf:	pH final

I. Crecimiento del hongo en el medio:

A:	En pellets.
B:	Sin pellets.
C:	En la superficie.

II. Hidrólisis del hongo sobre el plástico:

D:	Exclusivamente en los extremos.
E:	Exclusivamente en una parte de la superficie.
F:	En todo el plástico.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.1.1 Plástico de prueba: PET (Policetilentereftalato)

En las tablas (9.1.1.a - 9.1.1.e) se muestra el crecimiento y el ataque obtenidos con las cepas MV-75, MV-116, OD-211, CG-313, CG-221, CG-423, TB-124 y TB-251, aisladas de suelo, utilizando el medio de cultivo líquido D, y además del inductor de crecimiento PET grado industrial. (I Crecimiento del hongo en el medio, II Ataque (hidrólisis), * poco, ** moderado, *** mucho y ///// sin hidrólisis y sin crecimiento).

Tabla 9.1.1.a Fuente de carbono: PET + Glucosa 1% (20 días de incubación a 50° C y 140 rpm).

Cepa	pH	Observaciones						pH
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0	*					***	6.18
	5.0	*					***	7.36
	6.0			***	*	*	***	8.26
MV-116	4.0	*					***	8.15
	5.0	*		*			***	8.19
	6.0	*					***	8.50
OD-211	4.0		***		//////	//////	//////	5.05
	5.0		***		//////	//////	//////	8.32
	6.0		***		//////	//////	//////	8.43
CG-313	4.0	*					***	8.40
	5.0	*					***	8.50
	6.0	*		*			***	8.71
CG-221	4.0	*	*					4.82
	5.0	*					**	4.20
	6.0	*					**	4.37
CG-423	4.0		***		//////	//////	//////	8.91
	5.0		***		//////	//////	//////	9.05
	6.0		***	*	//////	//////	//////	9.10
TB-124	4.0		***		**			4.81
	5.0		***		*			6.85
	6.0		***	**	*			6.47
TB-251	4.0		***	*	//////	//////	//////	3.76
	5.0		***		//////	//////	//////	3.80
	6.0		***		//////	//////	//////	5.72

Tabla 9.1.1.b Fuente de carbono: PET + Almidón 1% (20 días de incubación a 50° C y 140 rpm).

Cepa	pH	Observaciones						pH
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0			*			**	7.2
	5.0			*			**	6.9
	6.0	*		*			**	7.5
MV-116	4.0	*			**			8.2
	5.0	*		*	*			7.7
	6.0			*			***	8.6
OD-211	4.0		***		//////	//////	//////	8.0
	5.0	*	***		//////	//////	//////	8.0
	6.0	*	***		**			8.9
CG-313	4.0		***		//////	//////	//////	8.2
	5.0		***		//////	//////	//////	8.6
	6.0	*	***	*	//////	//////	**	8.8
CG-221	4.0			**	*			3.4
	5.0			**	*			4.7
	6.0			***	*	**		3.7
CG-423	4.0	*		*				9.1
	5.0	*		*		**		8.9
	6.0		***		//////	//////	//////	8.7
TB-124	4.0		*	*	*			4.6
	5.0		**	*	*			5.1
	6.0		**	*	*			5.8
TB-251	4.0		*	*	*			7.4
	5.0		*	*	*			7.4
	6.0		*	*	*	//////	//////	7.1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9.1.1.c Fuente de carbono: PET + Maltosa 1% (20 días de incubación a 50° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0							6.2
	5.0	.	**	**		.	**	8.4
	6.0			**		.		7.0
MV-116	4.0		**		**			5.9
	5.0		.		.			5.8
	6.0		**	**		**		7.4
OD-211	4.0		**			////	////	7.4
	5.0		**			////	////	7.4
	6.0		**			////	////	7.9
CG-313	4.0		**			////	////	5.2
	5.0		**			////	////	5.9
	6.0		**			////	////	5.7
CG-221	4.0	.		**		.		4.1
	5.0	.		**		.		3.3
	6.0			**		.		4.0
CG-423	4.0		.			////	////	4.5
	5.0					////	////	8.5
	6.0	////	////			////	////	7.2
TB-124	4.0		**			.		6.6
	5.0		.			.		6.7
	6.0		.			.		6.7
TB-251	4.0	////	////			////	////	6.4
	5.0	////	////			////	////	5.5
	6.0		.			////	////	7.2

Tabla 9.1.1.d Fuente de carbono: PET + Lactosa 1% (20 días de incubación a 50° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		**					7.0
	5.0		**				**	7.1
	6.0		**				**	7.4
MV-116	4.0		**			////		6.9
	5.0		**			////	**	6.9
	6.0		**			////	**	7.0
OD-211	4.0		.			////	////	7.1
	5.0		.			////	////	7.3
	6.0		.			////	////	7.4
CG-313	4.0		**			.		6.8
	5.0	.	**			.		6.8
	6.0	.	**			.		6.8
CG-221	4.0	.	.			**		6.9
	5.0		.		.	**		6.5
	6.0	.	.	**		**		7.0
CG-423	4.0		**	**		////	////	7.5
	5.0		**			////	////	7.0
	6.0		.			////	////	7.2
TB-124	4.0		**			**		7.0
	5.0		**			**		6.8
	6.0		**		.	**		6.8
TB-251	4.0		**			.		6.8
	5.0		**			.		6.7
	6.0		**			.		6.9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9.1.1.e Fuente de carbono: PET + Sacarosa 1% (20 días de incubación a 50° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		**				**	5.0
	5.0		**				**	4.6
	6.0		**				**	5.5
MV-116	4.0	*	**				***	4.5
	5.0	*	**				**	4.7
	6.0		**				**	4.4
OD-211	4.0		**			////	////	6.7
	5.0		**			////	////	7.2
	6.0	*	**		*	////	////	7.1
CG-313	4.0		**		**			6.9
	5.0		*		*			5.8
	6.0		**		*			5.9
CG-221	4.0	**				**		4.6
	5.0	**		**		**		4.5
	6.0	**						4.3
CG-423	4.0		**			////	////	7.1
	5.0		**			////	////	7.6
	6.0		**			////	////	7.6
TB-124	4.0	*	**				**	6.4
	5.0	*	**				**	5.6
	6.0		**				***	5.4
TB-251	4.0		**			**		4.9
	5.0		**			**		5.3
	6.0		**			**		6.4

9.1.2 Plástico de prueba: HDPE (Polietileno de alta densidad)

En las tablas (9.1.2.a - 9.1.2.e) se muestra el crecimiento y el ataque obtenidos con las cepas MV-75, MV-116, OD-211, CG-313, CG-221, CG-423, TB-124 y TB-251, aisladas de suelo, utilizando el medio de cultivo líquido D, y además del inductor de crecimiento HDPE grado industrial. (I Crecimiento del hongo en el medio, II Ataque (hidrólisis), * poco, ** moderado y *** mucho).

Tabla 9.1.2.a Fuente de carbono: HDPE+ Glucosa 1% (20 días de incubación a 50° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0	***	*					5.1
	5.0	***	**			**		4.8
	6.0	***	*			**		6.0
MV-116	4.0	**	**			**		6.0
	5.0	**	**			*		4.4
	6.0	***	**			**		5.6
OD-211	4.0		**			**		7.3
	5.0		**		*	**		7.8
	6.0		**		*	**		7.3
CG-313	4.0		*	*		**		6.3
	5.0		**	*		*		5.2
	6.0		**	*		**		7.0
CG-221	4.0	*	*	*		*		5.0
	5.0	*	**	*	*	**		4.6
	6.0		**	*		**		5.6
CG-423	4.0		**	*	*	*		7.5
	5.0		**	*	*	*		7.7
	6.0		**	*	*	*		7.7
TB-124	4.0	**	*	*		**		4.5
	5.0	**	*	*		**		4.7
	6.0	**	*	*		**		5.8
TB-251	4.0	**	*	*	*	*		6.0
	5.0	**	*	*	*	*		5.2
	6.0	**	*	*	*	**		6.3

Tabla 9.1.2.b Fuente de carbono: HDPE + almidón 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0	**	**	.	.	**	.	6.8
	5.0	***	.	.	.	***	.	6.8
	6.0	6.7
MV-116	4.0	**	**	.	.	**	.	6.1
	5.0	**	**	.	.	*	.	6.1
	6.0	**	*	.	.	**	.	7.1
OD-211	4.0	**	*	.	.	**	.	7.9
	5.0	**	*	.	.	**	.	7.5
	6.0	**	*	.	.	**	.	7.6
CG-313	4.0	**	*	7.7
	5.0	**	*	6.9
	6.0	**	*	.	.	*	.	8.3
CG-221	4.0	**	*	.	.	**	.	4.3
	5.0	**	*	.	.	**	.	3.9
	6.0	**	*	.	.	**	.	4.1
CG-423	4.0	.	.	.	////	////	////	7.7
	5.0	.	.	.	////	////	////	7.1
	6.0	**	*	4.1
TB-124	4.0	**	*	.	.	**	.	6.7
	5.0	**	*	.	.	**	.	7.0
	6.0	**	*	.	.	**	.	6.9
TB-251	4.0	**	*	.	.	**	.	6.6
	5.0	**	*	.	.	**	.	6.7
	6.0	**	*	.	.	**	.	6.6

Tabla 9.1.2.c Fuente de carbono: HDPE + Maltosa 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0	.	***	.	.	**	.	5.2
	5.0	.	***	.	.	**	.	4.8
	6.0	.	**	.	.	*	.	5.2
MV-116	4.0	.	**	**	.	**	.	5.8
	5.0	.	**	**	.	***	.	5.7
	6.0	.	**	**	.	**	.	5.7
OD-211	4.0	.	*	7.0
	5.0	.	*	7.5
	6.0	.	*	7.1
CG-313	4.0	5.1
	5.0	.	**	**	.	**	.	5.6
	6.0	.	**	**	.	**	.	6.4
CG-221	4.0	4.7
	5.0	4.4
	6.0	5.9
CG-423	4.0	.	*	.	////	////	////	7.6
	5.0	.	*	.	////	////	////	8.0
	6.0	.	*	.	////	////	////	8.0
TB-124	4.0	.	*	**	.	**	.	6.7
	5.0	.	*	**	.	**	.	6.6
	6.0	.	*	**	.	**	.	6.6
TB-251	4.0	.	*	.	////	////	////	5.1
	5.0	.	*	.	////	////	////	6.6
	6.0	.	**	**	.	**	.	5.8

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9.1.2.d Fuente de carbono: HDPE + Lactosa 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		*	*		*		7.3
	5.0		**	*		**		7.5
	6.0		**	*		*		7.4
MV-116	4.0		**	*		*		7.1
	5.0		**	*		*		7.4
	6.0		**	*		*		7.3
OD-211	4.0		***	*		*		7.3
	5.0		***	*		*		7.3
	6.0		***	*		*		7.5
CG-313	4.0		***	*		*		7.2
	5.0		***	*		*		7.3
	6.0		***	*		*		7.1
CG-221	4.0	*			////////////////////			6.7
	5.0	*			////////////////////			7.2
	6.0	*			////////////////////			7.1
CG-423	4.0		***	*		*		7.0
	5.0		***	*		*		7.1
	6.0		***	*		*		7.3
TB-124	4.0		**	*		*		7.1
	5.0		**	*		*		6.9
	6.0		**	*		*		7.0
TB-251	4.0		**	*		*		6.8
	5.0		**	*		*		6.8
	6.0		**	*		*		6.9

Tabla 9.1.2.e Fuente de carbono: HDPE + Sacarosa 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		**	*		*		6.8
	5.0		***	*		**		6.6
	6.0		***	*		**		6.0
MV-116	4.0		***	**		***		5.4
	5.0		**	*		**		5.3
	6.0		**	*		**		5.3
OD-211	4.0		**	*		*		7.4
	5.0		**	*		*		7.8
	6.0		**	*		*		7.7
CG-313	4.0		*			*		5.0
	5.0		**	*		**		4.8
	6.0		**	*		**		6.2
CG-221	4.0	**			*		**	5.6
	5.0		*		*		*	3.9
	6.0		*	*	*		*	4.9
CG-423	4.0		*		////////////////////			8.5
	5.0		*		////////////////////			7.8
	6.0		*		////////////////////			7.5
TB-124	4.0		*	*	////////////////////			4.5
	5.0		*	*	////////////////////			5.0
	6.0		*	*	////////////////////			5.0
TB-251	4.0		*	*		**		4.8
	5.0		*	*		**		4.7
	6.0		*	*		**		4.9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.1.3 Plástico de prueba: PS (Poliestireno)

En las tablas (9.1.3.a - 9.1.3.b) se muestra el crecimiento y el ataque obtenidos con las cepas MV-75, MV-116, OD-211, CG-313, CG-221, CG-423, TB-124 y TB-251, aisladas de suelo, utilizando el medio de cultivo líquido D, y además del inductor de crecimiento PS grado industrial. (I Crecimiento del hongo en el medio, II Ataque (hidrólisis), * poco, ** moderado y *** mucho).

Tabla 9.1.3.a Fuente de carbono: PS + Glucosa 1% (20 días de incubación a 30° C. y 140 rpm)

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		**				***	3.8
	5.0		**				*	5.5
	6.0		**				**	4.6
MV-116	4.0	*	**			*		5.0
	5.0	**	**			*		4.4
	6.0	**	**			*		4.9
OD-211	4.0		***			////		6.7
	5.0		***			////		7.0
	6.0		***			////		7.6
CG-313	4.0	*	***	*		**		6.0
	5.0	*	**	*		**		5.0
	6.0	*	**	**		**		5.1
CG-221	4.0	*	**		*			5.3
	5.0	*	**		*			5.4
	6.0	*	**		*			4.1
CG-423	4.0		***			////		7.7
	5.0		***			////		7.6
	6.0		***			////		6.8
TB-124	4.0		***	**		**		5.0
	5.0		***	**		**		5.0
	6.0		***	**		**		4.9
TB-251	4.0		**	*	*			4.7
	5.0		*	*	*			5.3
	6.0		**	*	*			4.9

Tabla 9.1.3.b Fuente de carbono: PS + almidón 1% (20 días de incubación a 30° C. y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		**	**		**		7.2
	5.0		***				**	7.1
	6.0		***				***	7.4
MV-116	4.0	**		*	*			5.6
	5.0	**		*	*			6.1
	6.0	**		*	*			5.6
OD-211	4.0		**	*	*			7.3
	5.0		**	*	*			7.4
	6.0		**	*	*			6.6
CG-313	4.0		**	*	*			6.5
	5.0		**	*	*			6.1
	6.0		***			////		4.8
CG-221	4.0		***			////		4.3
	5.0		**	**		**		4.9
	6.0		**	*		*		4.2
CG-423	4.0		**	*	*			7.2
	5.0		**	*	**			7.4
	6.0		**	*	*	////		6.7
TB-124	4.0		**	*	*			6.1
	5.0		**	**	*	**		6.1
	6.0		**	**	*	**		5.8
TB-251	4.0		*	*	*			5.6
	5.0		*	*	*	////		5.8
	6.0		*	*	*	////		5.9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

9.1.4 Plástico de prueba: PVC (Policloruro de vinilo)

En las tablas (9.1.4.a - 9.1.4.e) se muestra el crecimiento y el ataque obtenidos con las cepas MV-75, MV-116, OD-211, CG-313, CG-221, CG-423, TB-124 y TB-251, aisladas de suelo, utilizando el medio de cultivo líquido D, y además del inductor de crecimiento PVC grado industrial. (I Crecimiento del hongo en el medio, II Ataque (hidrólisis), * poco, ** moderado y *** mucho).

Tabla 9.1.4.a Fuente de carbono: PVC + Glucosa 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		***	**			***	6.9
	5.0		***	**			***	7.1
	6.0		**	**			**	7.5
MV-116	4.0		***	.			**	6.9
	5.0		***	.			**	8.4
	6.0		***	**			***	8.5
OD-211	4.0		**			.		7.5
	5.0		**			.		7.7
	6.0		**			.		7.1
CG-313	4.0		**	**		**		8.7
	5.0		**	**		**		8.8
	6.0		**	**		**		8.3
CG-221	4.0		***	.		**		4.9
	5.0		**	.		.		4.0
	6.0		**	.		.		4.6
CG-423	4.0		**	**		.		8.0
	5.0		**	**		**		9.0
	6.0		**	**		**		8.5
TB-124	4.0		.	**	**	.		6.4
	5.0		.	**	**	.		4.8
	6.0		.	**	**	.		6.9
TB-251	4.0		**	**		**		4.4
	5.0		**	**		**		4.2
	6.0		.	**	**	**		4.6

Tabla 9.1.4.b Fuente de carbono: PVC + Almidón 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		**					6.9
	5.0		***					7.2
	6.0		**					7.3
MV-116	4.0		**			**		6.8
	5.0		**			**		8.2
	6.0		**			**		8.2
OD-211	4.0		**	**		**		7.7
	5.0		**	**		**		8.7
	6.0		**	**		**		7.7
CG-313	4.0		**	**		**		8.0
	5.0		**	**		**		8.8
	6.0		**	**		**		8.5
CG-221	4.0		**			.		2.7
	5.0		**			.		2.9
	6.0		**			**		4.6
CG-423	4.0		**			.		8.1
	5.0		**			.		5.1
	6.0		**			.		8.4
TB-124	4.0		**			.		6.4
	5.0		**			.		7.5
	6.0		**			.		7.5
TB-251	4.0		**			.		4.4
	5.0		**			.		7.1
	6.0		**			.		7.4

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9.1.4.c Fuente de carbono: PVC + Maltosa 1% (19 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		**			**		6.4
	5.0		***			**		6.7
	6.0		***	**			***	7.0
MV-116	4.0		**			*		6.9
	5.0		**			*		7.4
	6.0		***			***		7.7
OD-211	4.0		*			*		7.3
	5.0		*			*		6.7
	6.0		*			*		7.5
CG-313	4.0		*			*		7.0
	5.0		*			*		7.4
	6.0		*			*		7.8
CG-221	4.0		**			*		6.2
	5.0		**			*		5.4
	6.0		**			*		4.3
CG-423	4.0		**			*		9.3
	5.0		**			*		8.4
	6.0		**			*		8.2
TB-124	4.0		*			*		7.0
	5.0		*			*		7.1
	6.0		**			**		7.2
TB-251	4.0		**			**		7.0
	5.0		**			**		7.0
	6.0		**			**		6.9

Tabla 9.1.4.d Fuente de carbono: PVC + Lactosa 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		*			*		7.3
	5.0		**			*		7.1
	6.0		**			*		7.2
MV-116	4.0		**			**		7.1
	5.0		**			***		7.3
	6.0		*			**		7.3
OD-211	4.0		**			*		7.3
	5.0		**			*		7.6
	6.0		**			*		7.4
CG-313	4.0		***			***		7.2
	5.0		***			**		7.1
	6.0		***			**		7.3
CG-221	4.0		**			**		7.1
	5.0		**			**		6.9
	6.0		**			**		7.1
CG-423	4.0		////////////////			////////////////		5.9
	5.0		**			**		7.2
	6.0		**			**		7.6
TB-124	4.0		**			**		7.0
	5.0		**			**		7.0
	6.0		**			**		7.1
TB-251	4.0		////////////////			////////////////		5.9
	5.0		////////////////			////////////////		6.1
	6.0		**			***		6.9

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 9.1.4.e Fuente de carbono: PVC + Sacarosa 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		***				***	6.6
	5.0		**			**		7.4
	6.0		**			**		7.0
MV-116	4.0		**			**		7.7
	5.0		**			**		7.6
	6.0		**			*		7.3
OD-211	4.0		*			*		8.2
	5.0		*			*		7.4
	6.0		*			*		8.3
CG-313	4.0		*			**		7.3
	5.0		*			**		6.4
	6.0		*			**		7.1
CG-221	4.0		***			***		5.7
	5.0		***			***		4.0
	6.0		***			***		3.9
CG-423	4.0		**			**		9.3
	5.0		**			**		8.3
	6.0		**			**		8.7
TB-124	4.0		**			**		5.6
	5.0		**			*		6.0
	6.0		**			*		6.0
TB-251	4.0		**			***		4.3
	5.0		**			***		5.0
	6.0		**			***		4.8

9.1.5 Plástico de prueba: PCL (Policaprolactona)

En las tablas (9.1.5.a - 9.1.5.e) se muestra el crecimiento y el ataque obtenidos con las cepas MV-75, MV-116, OD-211, CG-313, CG-221, CG-423, TB-124 y TB-251, aisladas de suelo, utilizando el medio de cultivo líquido D, y además del inductor de crecimiento PCL grado industrial. (I Crecimiento del hongo en el medio, II Ataque (hidrólisis), * poco, ** moderado y *** mucho).

Tabla 9.1.5.a Fuente de carbono: PCL + Glucosa 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		I			II			
		A	B	C	D	E	F	
MV-75	4.0		**				**	4.8
	5.0		**				**	7.1
	6.0		**				**	6.5
MV-116	4.0		**				**	7.3
	5.0		**				**	5.0
	6.0		**				**	6.4
OD-211	4.0		**					7.9
	5.0		**					7.9
	6.0		**					7.8
CG-313	4.0		**					6.9
	5.0		**				**	7.1
	6.0		**				**	7.4
CG-221	4.0	***						4.5
	5.0		***				***	4.2
	6.0		**				**	4.3
CG-423	4.0		**					8.5
	5.0		**					7.9
	6.0		**					9.1
TB-124	4.0		**					4.8
	5.0		**					4.8
	6.0		**					5.2
TB-251	4.0		**				*	4.3
	5.0		**				*	4.6
	6.0		**				*	4.8

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 9.1.5.b Fuente de carbono: PCL + Almidón 1% (20 días de incubación a 30° C y 140 rpm).

Cepa	pHi	Observaciones						pHf
		A	I		D	II		
MV-75	4.0		***			*		6.7
	5.0		***			*		7.4
	6.0		***			*		6.4
MV-116	4.0		***			*		6.7
	5.0		**			*		6.1
	6.0		***			*		5.2
OD-211	4.0		**		*	*		7.4
	5.0		**		*	*		8.2
	6.0		**		*	*		7.7
CG-313	4.0		**		*	*		8.9
	5.0		**		*	*		8.4
	6.0		**		*	*		8.4
CG-221	4.0		**		*	*		3.1
	5.0		**		*	*		3.3
	6.0		**		*	*		3.2
CG-423	4.0		**		*	*		8.9
	5.0		**		*	*		9.1
	6.0		**		*	*		6.7
TB-124	4.0		**		*	*		5.2
	5.0		**		*	*		7.5
	6.0		**		*	*		6.0
TB-251	4.0		**		*	*		5.2
	5.0		**		*	*		7.1
	6.0		**		*	*		5.6

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

10. ANEXO IV: Fermentación en matraces de 500 ml

10.2.2.1 Determinación de azúcares reductores:

Tabla 10.2.2.1.a Consumo de A. R. en el medio Czapek modificado conteniendo PVC grado industrial en concentraciones de 2, 4 y 6%.

Tiempo (días)	PVC Gi (A. R.) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)			Glucosa 1%
	2%	4%	6%	
0	10 000	10 000	10 000	10000
3	2 488.89	2 882.31	2 046.29	4111.75
6	1 849.58	1 161.10	1 161.10	3275.73
9	1 062.74	669.32	620.14	2095.47
12	570.97	0.0	0.0	767.68
15	0.0	0.0	0.0	0.0

Tabla 10.2.2.1.b Consumo de A. R. en el medio Czapek modificado conteniendo PVC grado reactivo en concentraciones de 1, 2 y 3%.

Tiempo (días)	PVC Gr (A. R.) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	1%	2%	3%
0	10000	10000	10000
3	4996.94	3226.55	3324.91
6	2734.78	2833.13	3324.91
9	1751.23	1652.87	1751.23
12	1259.45	767.68	570.97
15	374.26	0.0	0.0

Tabla 10.2.2.1.c Consumo de A. R. en el medio Czapek modificado conteniendo PCL grado industrial en concentraciones de 2, 4 y 6%.

Tiempo (días)	PCL Gi (A. R.) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		
	2%	4%	6%
0	10000	10000	10000
3	4701.88	3915.04	3275.73
6	2685.60	3226.55	2390.53
9	620.14	620.14	1603.69
12	570.97	570.97	570.97
15	0.0	0.0	0.0

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

Tabla 10.2.2.1.d Consumo de A. R. en el medio Czapek modificado conteniendo PCL grado reactivo en concentraciones de 1, 2 y 3%.

Tiempo (días)	PCL Gr (A. R.) (µg/ml)		
	1%	2%	3%
0	10000	10000	10000
3	5095.30	4308.45	3521.61
6	3423.26	4111.75	3128.20
9	1702.05	1849.58	2243.00
12	1456.16	915.21	1554.51
15	767.68	620.14	669.32

10.2.2.2 Medición de pH:

Tabla 10.2.2.2.a Variación del pH en el medio Czapek modificado a diferentes concentraciones de PVC grado industrial (2, 4 y 6%).

Tiempo (días)	PVC GI (pH)			
	2%	4%	6%	Glucosa 1%
0	4.50	4.50	4.50	4.50
3	3.01	3.03	2.93	3.02
6	2.92	2.91	2.86	2.97
9	2.93	2.84	2.87	2.96
12	2.86	2.85	2.87	2.98
15	2.95	2.92	2.98	3.07

Tabla 10.2.2.2.b Variación del pH en el medio Czapek modificado a diferentes concentraciones de PVC grado reactivo (1, 2 y 5%).

Tiempo (días)	PVC Gr (pH)		
	1%	2%	3%
0	4.50	4.50	4.50
3	3.15	3.10	3.02
6	3.05	2.98	2.94
9	2.94	2.91	2.90
12	2.96	2.93	2.91
15	3.07	2.98	2.98

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 10.2.2.2.c Variación del pH en el medio Czapek modificado a diferentes concentraciones de PCL grado industrial (2, 4 y 6%)

PCL Gi (pH)			
Tiempo (días)	2%	4%	6%
0	4.50	4.50	4.50
3	3.13	3.08	3.16
6	3.04	3.12	3.13
9	2.90	3.01	3.09
12	2.91	3.04	3.04
15	3.10	3.11	3.27

Tabla 10.2.2.2.d Variación del pH en el medio Czapek modificado a diferentes concentraciones de PCL grado reactivo (1, 2 y 3%)

PCL Gr (pH)			
Tiempo (días)	1%	2%	3%
0	4.50	4.50	4.50
3	3.16	3.17	3.34
6	3.08	3.14	3.18
9	3.03	2.97	3.08
12	3.03	3.05	3.02
15	3.05	2.97	3.05

10.2.2.5 Cuantificación del C: crecimiento (Proteína final)

Tabla 10.2.2.5.a Determinación del rendimiento de biomasa en el medio Czapek modificado a concentraciones 2, 4 y 6% de PVC grado industrial a los 15 días de fermentación.

Plástico Gi	[Proteína] µg/mL	(Yb/x) %
PVC 2%	43.92	0.429
PVC 4%	119.25	1.192
PVC 6%	234.75	2.348

Tabla 10.2.2.5.b Determinación del rendimiento de biomasa en el medio Czapek modificado a concentraciones de 1, 2 y 3% de PVC grado reactivo a los 15 días de fermentación.

Plástico Gr	[Proteína] µg/mL	(Yb/x) %
PVC 1%	73.05	0.730
PVC 2%	34.52	0.345
PVC 3%	19.12	0.191

Tabla 10.2.2.5.c Determinación del rendimiento de biomasa en el medio Czapek modificado a diferentes concentraciones de PCL grado industrial a los 15 días de fermentación.

Plástico Gi	[Proteína] $\mu\text{g/mL}$	(Yb/x) %
PCL 2%	11.0	0.110
PCL 4%	11.0	0.110
PCL 6%	11.42	0.114

Tabla 10.2.2.5.d Determinación del rendimiento de biomasa en el medio Czapek modificado a diferentes concentraciones de PCL grado reactivo a los 15 días de fermentación.

Plástico Gr	[Proteína] $\mu\text{g/mL}$	(Yb/x) %
PCL 1%	80.72	0.807
PCL 2%	88.42	0.884
PCL 3%	203.95	2.039

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11. ANEXO V: Prueba a nivel Fermentador de 1000 mL

Con PVC y PCL puros utilizando la cepa MV-75

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

11.3.1 Determinación de Azúcares Reductores

Tabla 11.5.1.1. Consumo de A. R. en el matraz con glucosa y en el medio de fermentación con diferente plástico grado reactivo.

Tiempo (días)	[A. R.] $\mu\text{g/mL}$		
	Glucosa	PVC Gr 1%	PCL Gr 3%
0	10000	10000	10000
2	5654.34	3860.90	4406.81
4	5406.97	3056.94	3613.52
6	4015.50	2747.72	3427.99
8	2654.96	2685.88	2747.72
10	2654.96	2685.88	0.0
12	0.0	2685.88	0.0
14	0.0	0.0	0.0

11.3.2 Determinación de pH

Tabla 11.5.2.1 Variación del pH en el medio de fermentación y adición de PVC 1% y PCL 3% grado reactivo.

Tiempo(días)	Glucosa 1%	PVC Gr 1%	PCL Gr 3%
0	4.50	4.50	4.50
2	3.42	3.05	3.76
4	2.93	3.10	3.13
6	3.07	3.14	3.01
8	2.97	3.25	3.22
10	2.9	3.05	4.48
12	3.46	3.27	5.71
14	3.42	3.44	5.98

11.3.3 Determinación de la Actividad Hidrolítica Esterasa:

Tabla 11.3.3.1. Variación de la actividad de Esterasa en el medio de fermentación utilizando PVC y PCL grado reactivo.

Tiempo (días)	NaOH 0.0496 N (mL)		
	Glucosa 1%	PVC 1% Gr	PCL 3% Gr
2	3.0	1.0	4.5
4	1.5	3.0	4.0
6	1.0	3.0	4.2
8	2.5	4.0	4.5
10	2.0	4.5	10.0
12	2.0	2.5	7.5
14	1.5	1.5	5.5

11.3.4. Cinética de Crecimiento:

Tabla 11.3.4.1. Cinética de crecimiento de la cepa MV-75 en el medio de fermentación utilizando PVC 1% y PCL 3% grado reactivo.

Tiempo (días)	[Proteína] µg/mL		
	Glucosa 1%	PVC 1% Gr	PCL 3% Gr
0	0	0	0
2	85	90	100
4	100	150	190
6	118	160	180
8	120	300	375
10	130	450	786
12	100	445	1045
14	96	430	1000
16	98	435	800
18	80	425	659

11.3.5 Determinación de la cantidad de O_2 disuelto (OD)

Tabla 11.3.5.1. Medición de la cantidad de oxígeno disuelto en el medio de fermentación utilizando PVC 1% y PCL 3%.

Tiempo (días)	Oxígeno disuelto (%)		
	Glucosa 1%	PVC 1% Gr	PCL 3% Gr
0	100	100	100
2	95	80	92
4	90	78	94
6	85	22	72
8	5	2	5
10	5	30	10
12	95	80	100
14	100	10	100
16	100	2	80
18	100	2	50

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

12. Bibliografía

1. **Actuaciones en Infraestructuras para la gestión de residuos sólidos urbanos. 1996.** Ministerio del medio ambiente. España.
2. **ALBERTSSON, A.C.; Barenstedt, y S. Karlsson. 1994,** Degradation of Enhanced Environmentally Degradable Polyethylene in Biological Aqueous Media: Mechanisms During the First Stages. *Journal of Applied Polymer Science*, 51, pp. 1097-1105.
3. **ALEXANDER, M. 1999.** Biodegradation and Biorremediation. 2a ed. San Diego. USA.
4. **ANDREWS, G. D., Subramanian, P. M. 1992.** Emerging Technologies in Plastics Recycling. American Chemical Society. Washington. USA.
5. **ASTM, Designation: G 21 - 1990.** Standard Practice for Determining Resistance of Synthetic Polymeric Materials to Fungi, pp. 1-4.
6. **BRANDL, H.; R. Bachofen; J. Mayer, y E. Wintermantel. 1995,** Degradation and Applications of Polyhydroxyalkanoates. *Canadian Journal of Microbiology* (Suppl. 1), 41, pp. 143-153.
7. **BRANT, W. D., Long, P. E. 1989.** "Microbiología Ambiental". Acribia S.A. Zaragoza, España.
8. **BRAUN, D. 1990.** "Métodos sencillos de Identificación de Plásticos". 2ª ed. Barcelona, España.
9. **BU'LOCK, J., Kristiansen, B. 1991.** Biotecnología Básica. Acribia, S. A. Zaragoza, España.

10. **CANTU, M. P. C. 1992** Contaminación ambiental. Diana. México
11. **CAPPUCINO, T. G. and Sherman, N. 1996.** Microbiology: A Laboratory Manual. 4a ed. The Benjamin-Cummings Publishing Co., Redwood City, CA. USA.
12. **CARL, S. M. 1962.** Introducción a la Química Orgánica de las macromoléculas de Síntesis. Reverté S. A. España.
13. **CARLILE, M. J., Watkinson, S. C., 2001.** The Fungi. Academic Press, 2ª ed. USA, pp. 54-57.
14. **CASTILLO, T. J. 1987.** Micología General. Limusa. México
15. **CONSTANTINE, J. A. 1977.** Introducción a la Micología. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Argentina.
16. **CRUEGER, W., Crueger, A. 1990.** Biotechnology: A Textbook of Industrial Microbiology. 2a ed. Sinauer Associates, Inc. USA.
17. **DORFMANN, R. 1977.** Técnicas de Higiene Urbana: Recogida y Tratamiento de basuras; Limpieza de las vías públicas. Madrid, España.
18. **DRIVOR, Walter E. 1991.** Química y Tecnología de los Plásticos. Compañía editorial continental S. A. de C. V. México.
19. **EMSLEY, J. 1991,** Degradable Plastics, *New Scientist*, 50, pp. 1-4
20. **FLORES, J. 1995.** La contaminación y sus efectos en la salud y el ambiente. Centro de Ecología y Desarrollo. México.
21. **GOMEZ, A. M. R. 1998.** Los plásticos y el tratamiento de sus residuos. Universidad Nacional de Educación a Distancia. Madrid, España.
22. **GONZALEZ, R., Pareja, R., Ballesteros, C. 1991.** Microscopia electrónica. EUDEMA S. A. Madrid. España

23. **HAMANN, K. 1965.** Los plásticos y la Química macromolecular. McGraw-Hill. Barcelona, España.
24. **HECKLEY, R. J. 1978.** Preservation of Microorganisms. *Adv. Appl. Microbiol.*, 24, pp. 1 - 53.
25. **HORI, Y.; Y. Takahashi; A. Yamaguchi, y T. Hagiwara. 1995,** Chemical Síntesis of Novel Biodegradable Polyesters. *Canadian Journal of Microbiology* (Suppl. 1), 41, pp. 282-288.
26. **HUGH, H. B. 1965.** Elementos de conservación del suelo. Fondo de cultura económica. México.
27. **ISAAC, S. and Jennings, D. 1995.** Microbial Culture. BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford. UK.
28. **KESSEL, R. G., Shih, C. X. 1976.** La microscopia electrónica de barrido en biología. Dossat S. A. Madrid, España.
29. **KONEMAN, E. W. 1979.** Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. J. B. Lippincott company. USA.
30. **LAPAGE, S. P., Shelton, J. E., Mitchell, T. G. and MacKenzie, A. R. 1970.** Culture Collections and the Preservation of Bacteria. *Methods in Microbiology*. Eds. J. R. Norris and D. W. Ribbons; Vol 3A PP. 135-228, Academic Press, London. UK.
31. **LESUR, L. 1984.** Manual de Manejo de la Basura (una guía paso a paso). Trillas. México
32. **LORENZ, M. G. 1959.** Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. *Analytical Chemistry*. Vol. 31, No. 3, pp. 426-428.
33. **LOUGEE, E. F. 1943.** Plastics from farm and forest. Plastics Institute. New York. USA.

34. **LOWRY, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J. 1951, Protein Measurement with the Folin Phenol Reagent., *J. Biol. Chem.*, 193, pp. 265-275.**
35. **LUCENA, A. 1986. Los Residuos Sólidos. Editorial Acento. Zaragoza, España.**
36. **MEDDEVER, Wayne J. 1989. Additives: modified starch-based biodegradable plastics. *Plas. Eng.* 45(7), pp. 31-34**
37. **MEEK, G. A. 1976. Practical Electron Microscopy for Biologists. 2a ed. John Wiley and Sans. UK.**
38. **MERCER, E. H., Birdeck, M. S. C. 1966. "Electron Microscopy": a handbook for biologists. 2a ed. Blackwell; Scientific Publications Oxford. UK.**
39. **MILLS, N.J. 1993. Plastics: microstructure, properties and applications. 2a ed. Halsted. New York. USA.**
40. **MINK, W. 1991. El plástico en la industria: Tratado práctico. Zaragoza, España.**
41. **MIRANDA, R. L. A. 1980. Degradación de plastificantes por microorganismos del suelo y agua. IPN. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. México.**
42. **MORTON-JONES, D. H. 1993. Procesamiento de Plásticos. Limusa. México.**
43. **MUJICA, A. V. 1996. Contaminación ambiental: causas y control. UNAM, Unidad Azcapozalco. México.**
44. **MUÑIZ, H. E., Velasco. S. T. 2000. Biología. McGraw-Hill. México.**

45. NICKLIN, J., Graeme-Cook, Paget, T. and Killington, R. **1999**. Notes in Microbiology. BIOS Scientific Publishers Limited. Oxford. UK.
46. NUÑES, Ma. J., Lema, J., Sanromán, A. y López, E. Octubre **1989**. Fermentación directa de pentosas por levadura. *Ingeniería Química*. Pp. 329-335.
47. NUNN, R. E. **1976**. Microscopia electrónica: Guías de laboratorio. El manual moderno S.A.. México.
48. OLDSHUE, J. Y. **1966**. Fermentation mixing scale-up techniques. *Biotechnology and Bioengineering* 8, pp. 3-24.
49. OLDSHUE, J. Y. **1980**. Some scale-up considerations for fermentation tanks.. *Proceedings International Fermentation Symposium*. Ontario, Canada.
50. ORTIZ, J. M. A. **1988**. Catálogo de Microorganismos. Editado por la UNAM. México, pág. 5.
51. ORTIZ, M. F. **1991**. Contaminación en la Ciudad de México. Milenio. México.
52. PALMISANO, A., y C. Pettigrew. **1992**, Biodegradability of Plastics, *BioScience*, 42 (9), pp. 680-685
53. PELCZAR, M. J. **1982**. Microbiología. 4ª ed. McGraw-Hill. México.
54. PENN, C. **1991**. Handling Laboratory Microorganisms. Open University Press, Milton Keynes. USA.
55. PUENTE, S., Legorreta, J. **1988**. Medio Ambiente y Calidad de vida. Editores Plaza y Valdés. México.
56. RAMOS, C. M. A., De Maria Ruiz, M. R. **1988**. Ingeniería de los materiales plásticos. Díaz de Santos S. A. Madrid. España.

57. RAPER, K. B. and Fennell, D. L. **1965**. *The Genus Aspergillus*. Williams & Wilkins, Baltimore. USA.
58. RIVERO, S. O. **1984**. Los residuos peligrosos. Programa Universitario del Medio Ambiente. UNAM, México.
59. SÁNCHEZ, L. S. **1992**. Aditivos para Material Plástico: Antioxidantes y estabilizadores UV. Limusa. México
60. SAURIN, A. **1970**. Composición, Recogida y Tratamiento de las Basuras. Editores técnicos asociados S.A. España.
61. SEOANEZ, C. M. **1992**. Contaminación del suelo: Estudio, Tratamiento y Gestión. Mundi Prensa. Madrid. España.
62. SEVERINI, P. **1990**. La gestión de la basura en las grandes ciudades. España.
63. TCHOBANOGLOUS, G., Theison, H. **1994**. Gestión Integral de Residuos Sólidos. Vol. II. McGraw-Hill. España.
64. TENA, G. **1995**. La basura, recurso desperdiciado. *Ciencia y Desarrollo*, marzo/abril, vol. XXI, núm. 121.
65. TOKIWA, Yutaka. **1990**. Biodegradable plastics. *Bio. Ind.* 7(1), pp. 32-39.
66. TOKIWA, Yutaka. **1990**. Biodegradable plastics. *Purasuchikkusu Eji.* 36(2), pp. 164-172.
67. TORTORA, J. G.. **1993**. "Introducción a la Microbiología". Acribia S.A. Zaragoza, España.
68. URIBE, V. M. **1980**. Los polímeros: Síntesis y caracterización. Limusa. México

69. **VIZCAÍNO, M. F. 1975.** La contaminación en México. Fondo de Cultura Económica. México.
70. **VOLKE, Sepúlveda. T. L. 1998.** Los plásticos en la actualidad y su efecto en el entorno. *Ciencia y Desarrollo*. 139, pp. 54-61
71. **YABANNAVAR, A. V., y R. Bartha. 1994,** Methods For Assessment of Biodegradability of Plastic Films in Soil. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), pp. 3608-3614.
72. **ZINSSER. 1994.** "Microbiología". 20ª ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

13. Glosario

ACUERDO VOLUNTARIO: El acuerdo formal celebrado entre las autoridades públicas competentes del Estado miembro y los sectores económicos correspondientes, que ha de estar abierto a todas las partes que deseen cumplir las condiciones del acuerdo con vistas a conseguir los objetivos de la directiva 94/62/CE.

AGENTES ECONÓMICOS: En relación con los envases, los proveedores de materiales de envases, los fabricantes de envases, las empresas transformadoras y envasadoras, los importadores, los comerciantes y los distribuidores, las administraciones públicas y los organismos públicos.

ALMACENAJE: Operación de depósito temporal de los residuos, previa a las operaciones de reciclaje, tratamiento o disposición del rechazo.

BIOMETANIZACIÓN: El tratamiento aeróbico de los residuos biodegradables que produce metano y residuos orgánicos estabilizados.

BGA: Agencia Federal de la Salud (Alemania)

BUA: Agencia Federal del Medio Ambiente (Alemania)

CENTRO DE TRANSFERENCIA DE RUINAS Y TRASTOS VIEJOS: El centro de recepción y almacenaje, selectivos, de residuos municipales que no son objeto de recogida domiciliaria.

COMERCIALIZACIÓN: Operación de venta o transferencia de subproductos y materias o sustancias recuperadas para reincorporarlas al proceso productivo.

COMPOSTAJE: El tratamiento aeróbico de las partes orgánicas de los residuos, que produce residuos orgánicos estabilizados.

COT: Comité de Toxicología de Productos Químicos, Alimenticios y Medio Ambiente.

ECETOC: Centro de Ecología y Toxicología de la Industria Química Europea.

ECOBALANCE: Comparaciones sobre los efectos producidos por el uso de diferentes envases, los datos que se investigan son: El consumo de energía, la contaminación atmosférica y del agua y la cantidad de residuos que produce un envase determinado. Se estudia todo el ciclo de vida del envase en cuestión, desde la obtención y la elaboración de las materias primas auxiliares hasta la evacuación del material.

ELIMINACIÓN: Sacar, separar, descartar un residuo del circuito de utilización. Los residuos se han de eliminar sin poner en peligro la salud humana y sin utilizar procedimientos o métodos que puedan causar perjuicios al medioambiente. Ver Disposición del Rechazo

ENVASE: Todo producto fabricado con cualquier material de cualquier naturaleza que se utiliza para contener, proteger, manipular, distribuir y presentar mercaderías, desde materias primas hasta artículos acabados, y desde el fabricante hasta el consumidor. Se consideran también envases todos los artículos rechazables utilizados con esta misma finalidad.

Los envases incluyen:

Envase de venta: todo envase diseñado para constituir en el punto de venta una unidad de venta destinada al consumidor o usuario final.

Envase colectivo: todo envase diseñado para constituir en el punto de venta una agrupación de unidades de venta, tanto si será vendido como tal al usuario o consumidor final, como si se utiliza únicamente como medio para reaprovisionar los estantes en el punto de venta; puede separarse del producto sin afectar a las características del mismo.

Envase de transporte: Todo envase diseñado para facilitar la manipulación y el transporte de varias unidades de venta o de varios envases colectivos con objeto de evitar su manipulación física y los daños inherentes a su transporte. El envase de transporte no alcanza hasta los contenedores navales, viarios, ferroviarios ni aéreos.

GESTIÓN: La recogida, el transporte, el almacenaje, la valorización, la disposición del rechazo y la comercialización de los residuos, incluida la vigilancia de estas operaciones y la vigilancia de los lugares de descarga después de su clausura o cierre. No se considera gestión de residuos la operación de reciclaje en origen de los residuos que se reincorporen al proceso productivo que los ha generado.

P.E.: Polietileno (C₂H₄)_n. Un alto polímero de etileno;. Blanco sólido. Termoplástico no tóxico. Dependiendo de su densidad y estructura, tenemos tres clases diferentes: Alta densidad (HDPE), baja densidad (LDPE) y lineal de baja densidad (LLPE). Los dos primeros son los más utilizados. Sus usos son amplios: productos moldeados de gran variedad y aplicación película para envolver; cañería de plástico; revestimiento de papeles; envases;

bolsas para residuos, etc. En los residuos urbanos actuales la mayor cantidad es el HDPE para botellas de agua, leche, lejía, etc.

P.E.T.: Polietileno Tereftalato, es un poliéster que procede de la polimerización de condensación de ácido tereftálico con etilenglicol. Esta reacción es reversible y se puede despolimerizar por hidrólisis. Funde a 265 °C. Tiene buena resistencia eléctrica y poca absorción de humedad. Su uso principal ha sido como fibra textil mezclada con algodón o lana. Su utilización para la fabricación de envases es muy reciente.

PLASTICO GRADO INDUSTRIAL: Material plástico comercial, es decir, material plástico tratado con aditivos que le confieren características específicas de moldeabilidad, cristalinidad, etc.

PLASTICO GRADO REACTIVO: Material plástico virgen o puro, es decir, material plástico que no ha sido sometido a tratamiento con aditivos.

P.P.: Polipropileno (C₃H₅), es un polímero termoplástico cristalino sintético. Se obtiene por polimerización del propileno con un catalizador estereoespecífico. Sólido blanco translúcido por ejemplo 0.90 y punto de fusión 170 ° C.

PREVENCIÓN: La reducción de la cantidad y la nocividad para el medioambiente de los materiales y sustancias utilizados en los envases y sus residuos. Los envases y residuos de envases el proceso de producción, en la comercialización, distribución, la utilización y la eliminación. En particular, mediante el desarrollo de productos y técnicas no contaminantes.

P.V.C.: Cloruro de polivinilo (-H₂CCHCl-)_x. Polímero termoplástico sintético. Propiedades: polvo blanco o gránulos incoloros, inodoro, insípido no tóxico combustible, pero autoextinguible. Resistente al tiempo y la humedad. Usos: Envases para productos de higiene, cosméticos, productos químicos de uso doméstico y alimentos; cañerías y conducciones de todo tipo, canales de recogida de aguas, aislamiento eléctrico, protección de cables y alambres, etc. El uso del P.V.C. para envases de alimentos está permitido, pero el alto nivel de polución atmosférica producida por el ácido clorhídrico después al incinerar estos envases, ha comportado la prohibición por dicha finalidad en algunos países occidentales (por ejemplo Suiza).

RECHAZO: Residuos o fracciones no valorizables.

RECICLAJE: Las operaciones de recuperación de subproductos de los residuos. Cuando

consiste en operaciones de compostaje o biometanización recibirá la denominación de "Reciclaje orgánico".

RECOGIDA: Operación consistente en recoger, clasificar y/o agrupar residuos para transportarlos.

RECUPERACIÓN DE ENERGÍA: El uso de residuos para generar energía mediante incineración directa, con o sin otras aportaciones energéticas pero con recuperación de calor.

RESIDUO: Cualquier sustancia u objeto del que su poseedor se desprenda o tenga la intención o la obligación de desprenderse.

RESIDUO DE ENVASE: Todo envase o material de envase que se ajuste a la definición de Residuo, excepto los residuos de producción.

RESIDUOS MUNICIPALES: Los residuos domésticos y también los residuos de comercios y de oficinas y servicios y de otros residuos que, por su naturaleza o composición, pueden asimilarse a los residuos domésticos.

REUTILIZACIÓN: Toda operación en la que el envase concebido y diseñado para realizar un mínimo de circuitos o rotaciones a lo largo de su ciclo de vida, sea llenado o reutilizado con la misma finalidad con la que fue diseñado estos tipos de envases se consideraran residuos de envases cuando ya no se utilicen.

SUBPRODUCTOS: Los residuos que se pueden utilizar directamente como materias primas de otras producciones o como sustituto de productos comerciales y que son recuperables sin necesidad de someterlos a operaciones de tratamiento.

TRATAMIENTO: Operación o conjunto de operaciones de cambio de características físicas, químicas o biológicas de un residuo para reducir o neutralizar las sustancias peligrosas que contiene, recuperar materias o sustancias valorizables, facilitar su uso como fuente de energía o favorecer la disposición del rechazo.

TRANSPORTE: Operación de traslado de los residuos desde el lugar de recogida hasta las plantas de reciclaje, tratamiento o disposición del rechazo.

VERTEDERO DE RESIDUOS: Instalación de disposición del rechazo de los residuos que se utiliza para el depósito controlado de éste en la superficie o bajo tierra.