



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**EVALUACIÓN DE LA COMPOSTABILIDAD DE
POLIETILENO Y POLIPROPILENO BAJO
CONDICIONES CONTROLADAS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIOLOGA

P R E S E N T A:

RAQUEL GABRIELA LUNA VARELA



**DIRECTOR DE TESIS:
DR. VICTOR MANUEL LUNA PABELLO
2009**



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno Apellido paterno Apellido materno Nombre(s) Teléfono Universidad: Facultad: Carrera: Número de cuenta	1. Datos del alumno Luna Varela Raquel Gabriela 57885364 Universidad Nacional Autonoma de Mexico Facultad de Ciencias Biología 404074948
2. Datos del tutor Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	2. Datos del tutor Dr. Victor Manuel Luna Pabello
3. Datos del sinodal 1 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	3. Datos del sinodal 1 Dra. María Isabel Saad Villegas
4. Datos del sinodal 2 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	4. Datos del sinodal 2 Quim. En A. Luz del Carmen Sierra Gómez Pedroso
5. Datos del sinodal 3 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	5. Datos del sinodal 3 Dr. Victor Manuel Luna Pabello
6. Datos del sinodal 4 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	6. Datos del sinodal 4 Dr. Saúl Gómez Manzo
7. Datos del sinodal 5 Grado Nombre(s) Apellido paterno Apellido materno	7. Datos del sinodal 5 M. en C. Luciano Hernández Gómez

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por darme la oportunidad de pertenecer a ella, que por medio de varios profesores aprendí la belleza de la ciencia. También agradezco al Dr. Victor Manuel Luna Pabello por haberme permitido trabajar en el Laboratorio de Microbiología Experimental y la asesoría de la tesis, así como al M. en C. Luciano Hernández por la asesoría técnica. Pero un especial agradecimiento a el M. en C. B. Ernesto, por haberme ensañado las técnicas posibles para realizar este, así como su amistad; y a Naye por haberme permitido ser su amiga la cual hizo más agradable estos años de realización de la tesis.

Gracias a todos mis compañeros de laboratorio, Toño, Paty, Benjamín, Lyenet, Jacob, Pavel, la maestra Tsuzuki; de alguna u otra forma enriquecieron o contribuyeron en la parte experimental o escrita.

A mi hermanita Xochitl por estar ahí en todo momento, a mis padres porque siempre han creído en mi, a mis amigos que siempre esperaron pacientemente en el laboratorio, a Saul por su asesoría y más...

A mis sinodales por haber tenido el tiempo para revisar y mejorar mi trabajo.

Dedicatorias

A Laura y Antonio, mis padres, mis amigos y mis ángeles, que día a día están conmigo, que durante toda la vida se han preocupado por mi desarrollo y bienestar... por su amor ... por su paciencia... son los mejores, gracias por todo ... los amo.

A Xochitl, mi amiga de toda la vida con la cual he compartido momentos muy buenos y pero a veces también difíciles pero que a pesar de todo me ha tenido paciencia, sobre todo en las largas esperas en los laboratorios... que aunque es ya toda una señorita es mi hermanita bebe, gracias por todo y sabes que te adoro.

A mi hermano Ernesto, que es un ejemplo de fortaleza y que siempre me ha apoyado, eres muy importante.

A mi hermano Oswaldo por ser un compañero en momentos difíciles, lucha por lo que deseas y no te detengas.

A mi tía Silvia, por ser una buena compañía, un ejemplo a seguir, por que siempre se ha preocupado por toda su familia y en su corazón esta cada uno de sus sobrina(o)s.

A mis abuelitas Josefina y Raquel, que siempre estuvieron a mi lado y me cuidaron.

A mis amigas y amigos que he compartido momentos gratos durante mi vida, en la primaria Tania y Queta, de la secundaria Diana, Natalia, Karla; Moy, J. P., Poncho, de la inolvidable Voca 9; Alejandro, Laura, Nataly, Burrito, Daniel, Armando. Y de la carrera Jorge, Judith, Majo, Miguel, Oscar, Saul, Fernando, Vic ... y del labo Yoyo, Toño, Neto.

A mis compañeros de laboratorio por estar durante este proceso, Nayeli, Ernesto, Toño, Paty, Benjas, Lyenet, Jacob, Pavel.

A la banda del Museo de la Luz y demás...

A todos los que han formado parte de mi vida.

A Dios por darme la oportunidad de terminar esto... y seguir mi camino...

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. OBJETIVOS	5
II.1 Objetivo General	5
II.2 Objetivos particulares	5
II. 3 Hipótesis	5
II. 4 Estrategia general de trabajo	6
II. 5 Justificación	8
III. MARCO DE REFERENCIA	9
III. 1 Materiales plásticos	9
III. 1.1 Polietileno.....	10
III. 1.2 Polipropileno	11
III. 2 Pruebas de biodegradabilidad	11
III. 3 Requerimientos para un proceso de composteo óptimo	13
A) Carbón:Nitrógeno (C:N)	13
B) pH	14
C) Estado físico (tamaño de partícula)	14
D) Humedad	15
E) Aireación.....	15
F) Temperatura	16
G) Microbiología del sistema	17
III. 6 Degradación de plásticos	20
Fotodegradación	21
Degradación térmica.....	22
Biodegradación.....	22
Métodos de evolución de degradación	23
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	25
IV. 1 Materiales y equipo	25
IV. 2 Método	26
IV.2.1 Elaboración de composta	26
IV.2.2 Evaluación fisicoquímica de la composta y materiales plásticos.....	28
IV.2.3 Evaluación de la biodegradación aerobia de plástico.....	29
IV.2.4 Desintegración del plástico	31
IV.2.5 Prueba de seguridad acuática y terrestre	31
IV.2.6 Determinación de crecimiento microbiano en el proceso	32
IV.2.7 Caracterización enzimática del proceso	32

V. RESULTADOS.....	34
Resultados de la medición de CO₂.....	34
VII. 6 Resultados de la prueba de seguridad acuática y terrestre.....	35
VII.7 Crecimiento microbiano	36
VII. 8 Resultados de la medición de la actividad enzimática en la prueba de biodegradabilidad aerobia para plásticos.....	40
VI. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	44
VI. 1 Caracterización fisicoquímica de composta y materiales plásticos.....	44
VI. 2 Compostabilidad del polipropileno y polietileno.....	46
VI. 2.1 Prueba de biodegradabilidad del polipropileno y polietileno.....	47
VI.2.2 Evaluación de la desintegración. Descripción cualitativa del material	51
VI.2.3 Seguridad acuática y terrestre.....	54
VI. 3 Crecimiento microbiano	59
VI. 4 Seguimiento de pH.....	66
VI. 5 Determinación de actividad enzimática.....	68
VII CONCLUSIONES	79
VIII BIBLIOGRAFÍA	81
IX ANEXOS	84
IX. 1 ASTM D5338. Método Estándar de prueba para determinar la biodegradación aerobia de materiales plásticos bajo condiciones controladas de compostaje	84
IX.1.1 Determinación de CO ₂	84
IX.1.2 Biodegradación.....	84
IX.2 Análisis fisicoquímicos.....	85
IX.2.1 Determinación de sólidos totales, a 105°C (APHA 2540 D)	85
IX.2.2 Determinación de sólidos volátiles, a 550°C (APHA 2540 E)	85
IX.2.3 Determinación del pH (ASTM D3987 y D1293).....	85
IX.3 Análisis microbiológicos	86
IX.3.1 Medios de cultivo	86
IX.3.2 Cuenta en placa	89
IX.3.3 Frotis bacteriano	91
IX.3.4 Tinción de Gram.....	92
IX. 4 Pruebas de toxicidad	93
IX.4.1 Prueba de toxicidad acuática.....	93
IX.4.2 Prueba de toxicidad terrestre	93
IX.4.3 Datos de especies probadas	94
X GLOSARIO	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estrategia general de trabajo	7
Figura 2. Curva normal de temperatura, en un proceso de composteo. (tomada de infojardín, 2009).....	17
Figura 3 A) Invernadero del Laboratorio de Microbiología experimental y B) pila de compostaje	27
Figura 4. Columna de PVC (Proceso de maduración).....	28
Figura 5.A) El propileno cortado en trozos de 2 cm x 1 cm y b) El polietileno, no obtuvo ningún tratamiento, se encontraba en granos.	29
Figura 6. Cámara de compostaje	30
Figura 7. Escala de tonalidades para establecer la AE.....	33
Figura 8. A) Composta antes de madurar, B) Composta después de madurar, C) Restos de composta tamizada en el proceso y D) Composta utilizada en el proceso.....	45
Figura 9 Método para la evaluación de la compostabilidad de materiales plásticos.	47
Figura 10. Gráfica de producción de CO ₂ en la prueba de biodegradabilidad de los materiales evaluados.	48
Figura 11. Grafica de producción acumulativa de CO ₂ para A) blanco, B) celulosa, C) polipropileno y D) polietileno.....	49
Figura 12. Trozo de polipropileno, A) Con tratamiento y sin tratamiento, B) Poliproleno al microscopio 100X sin tratamiento y C) Polipropileno al microscopio al 100X con tratamiento.....	53
Figura 13 Polietileno visto al microscopio estereoscópico sin y con tratamiento.....	53
Figura 14.Gráfica de germinación de semillas de <i>S. lycopersicum</i> en diferentes concentraciones (5, 10, 25,50 100%), para blanco, celulosa, polipropileno y polietileno.	54
Figura 15. Gráfica de germinación de semillas de <i>L. sativa</i> en diferentes concentraciones de extracto de composta diluido con agua (5, 10, 25,50 100%), para blanco, celulosa, polipropileno y polietileno.....	55
Figura 16. Gráfica de germinación de semillas de <i>T. patrense</i> en diferentes concentraciones (5, 10, 25,50 100%), para blanco, celulosa, polipropileno y polietileno.	57
Figura 17. Gráfica de sobrevivencia de semillas de lechuga, jitomate, trébol y cebolla al final de la prueba de seguridad terrestre.....	59
Figura 18. Curva crecimiento microbiano blanco	60
Figura 19. Curva crecimiento microbiano celulosa.....	61

Figura 20. Curva de crecimiento con polipropileno	62
Figura 21. Curva de crecimiento con polietileno	64
Figura 22. Gráficas de porcentaje de la AE por grupo de enzimas, evaluados durante la prueba de biodegradabilidad para plásticos. A)Blanco, B) Celulosa, C) Polipropileno, D) Polietileno	66
Figura 23. Curva de pH del blanco, celulosa, polipropileno y polietileno.	68
Figura 24. Actividad enzimático blanco	70
Figura 25 Actividad enzimático celulosa.....	71
Figura 26. Actividad enzimática polipropileno	72
Figura 27. Actividad enzimática polietileno	73
Figura 28. Gráficas de porcentaje de la AE por grupo de enzimas, evaluados durante la prueba de biodegradabilidad para plásticos. A)Blanco, B) Celulosa, C) Polipropileno, D) Polietileno	75
Figura 29. Microfotografías de la película de polipropileno después del proceso de compostaje A)Rosario de cocos, B) Cocos y bacilos, C) Daño físico y D) Fisuras.....	76
Figura 30. Película de poliuretano A) No inoculada y B) Inoculada con <i>Alycicliphillus</i> BQ8	77
Figura 31. Microfotografías de la película de polietileno después del proceso de compostaje A)Grano de polietileno a 1 mm, B) Superficie a 100 u C) Corte frontal y D)Superficie a 10 u.....	78
Figura 32. Cuenta en placa de bacterias	90
Figura 33.Curva crecimiento microbiano blanco en UFC/mL.....	36
Figura 34.Curva crecimiento microbiano celulosa en UFC/mL.....	37
Figura 35.Curva crecimiento microbiano polipropileno en UFC/mL	38
Figura 36. Curva crecimiento polietileno blanco en UFC/mL	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de fuentes de energía y de carbono para los microorganismos (Coynes, 2000).	19
Tabla 2. Parámetros de caracterización fisicoquímica.	26
Tabla 3. Parámetros fisicoquímicos del inóculo de acuerdo a ASTM D 5338.	26
Tabla 4. Enzimas presentes en galerías APY ZYM Biomeriux.....	33
Tabla 5. Parámetros fisicoquímicos de inóculo, composta madura, polietileno y polipropileno.....	44
Tabla 6. Resultados de la prueba de biodegradabilidad (mg de CO ₂)	34
Tabla 7. Resultados del promedio del número de semillas germinadas de <i>S. lycopersicum</i> (jitomate) para la prueba de toxicidad acuática	35
Tabla 8. Resultados del promedio del número de semillas germinadas de <i>L. sativa</i> (lechuga) para la prueba de toxicidad acuática	35
Tabla 9. Resultados del promedio del número de semillas germinadas de <i>T. patense</i> (trébol) para la prueba de toxicidad acuática	35
Tabla 10. Resultados del número de semillas germinadas de jitomate, lechuga, trébol y cebolla, para la prueba de toxicidad terrestre.	35
Tabla 11. Resultados de grupos bacterianos en el blanco, en UFC/mL para cada día monitoreado.....	36
Tabla 12. Resultados de grupos bacterianos en la composta con celulosa (control positivo), en UFC/mL para cada día monitoreado.....	37
Tabla 13. Resultados de grupos bacterianos en la composta con polipropileno, en UFC/mL para cada día monitoreado.	38
Tabla 14. Resultados de grupos bacterianos en composta con polietileno, en UFC/mL para cada día monitoreado.	39
Tabla 15. Resultados de la AE para el blanco durante la prueba de biodegradabilidad.....	40
Tabla 16. Resultados de la AE para celulosa durante la prueba de biodegradabilidad.....	41
Tabla 17. Resultados de la AE para el polipropileno durante la prueba de biodegradabilidad	42

Tabla 18. Resultados de la AE para el polietileno durante la prueba de biodegradabilidad.....	43
--	-----------

RESUMEN

Los plásticos son materiales conformados por polímeros compuestos de átomos de carbono unidos entre sí, formando largas cadenas, con otros elementos como el hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, cloro, azufre, silicio y fósforo. Actualmente los plásticos representan *una* de las industrias más productivas, ya que esta es proveedora para otros sectores como el de alimentos, eléctrico y de la construcción, a los que provee de empaques, envases, producción de componentes, entre otros. Es una industria con un crecimiento presente y futuro. Sin embargo, una de las características propias de los plásticos es que son materiales difíciles de degradar, lo que ocasiona problemas de contaminación. El presente trabajo, se enfoca en la evaluación del proceso de composteo de los plásticos polietileno y propileno, a partir del procedimiento ASTM D6400 (*Standard Specification for Compostable Plastics*), siguiendo lo indicado en la ASTM D 5338 (*Standard Test Method for determining aerobic biodegradation of Plastic Materials Under Controlled Composting Conditions*) y OECD 208 (*Guideline for Testing of Chemicals: Seedling Emergent and Seedling Growth Test*). Asimismo, se evaluó el crecimiento de los diferentes grupos metabólicos microbianos y la actividad enzimática prevaeciente a lo largo de los experimentos realizados.

Los resultados indican que tanto el polietileno, como el polipropileno presentaron un porcentaje de desintegración menor al 10%, con una producción de CO₂ menor al 60% de la muestra, lo que implica que de acuerdo a ASTM D 5338 deben ser catalogados como materiales no biodegradables. Las pruebas de toxicidad acuática y terrestre, mostraron un índice de germinación superior al 50%, lo que indica que el producto del proceso de biodegradabilidad al que fueron sometidos ambos materiales, no presenta efectos adversos al crecimiento vegetal.

Es importante señalar que para el caso del polipropileno se observó por microscopia electrónica de barrido existe adhesión microbiana y daño físico a este material, lo cual constituye un indicio de su biodegradación.

Respecto a los resultados relacionados con la predominancia de grupos metabólicos cultivables en la composta que contenía polipropileno, los porcentajes relativos fueron: lipolíticos (45.66%), amilolíticos (20.28%), celulolíticos (16.09%), sacarolíticos (15.82%) y proteolíticos (2.14%) respectivamente. Sin embargo, la mayor producción de CO₂ se observó en el grupo metabólico predominante que fue el de los sacarolíticos con un 72% y lipolíticos con un 18.2%; teniendo ambos grupos una disminución drástica al final de la prueba.

Para la composta que contenía polietileno, los porcentajes relativos de los grupos metabólicos fueron: amilolíticos (68.28%), sacarolíticos (16.56%), celulolíticos (11.51%), proteolíticos (3.53%), lipolíticos (0.12%). Sin embargo, la mayor producción de CO₂ se observó que el grupo metabólico predominante fue el de celulolíticos con 73.3% y sacarolíticos con 20.7% en esta etapa de la prueba de biodegradación.

Para la actividad enzimática que se desarrolla en la composta conteniendo polipropileno, se encontraron los porcentajes relativos de actividad enzimática en el siguiente orden: fosfatasa (35%), lipasa (29%), proteasa (28%) y carbohidratasa (14%). Para la composta que contenía polietileno, se encontró los porcentajes relativos de actividad enzimática en el siguiente orden: lipasa (29%), proteasa (28%), fosfatasa (26%) y carbohidratasa (17%). En ambos casos, la mayor producción de CO₂, observada, coincidió con la mayor actividad de las lipasas.

I. Introducción

Los plásticos son macromoléculas formadas por polímeros, los cuales son grandes agrupaciones de monómeros adicionadas por polimerización. Los plásticos presentan características únicas como color y ligereza; así como resistencia a la degradación ambiental y biológica. Han sido utilizados en envases, envolturas, bolsas, en la industria automotriz, muebles, pinturas, losetas vinílicas, en el sector agrícola y médico.

Una vez que los plásticos han cumplido su vida útil, son desechados y pasan a formar parte del conjunto de residuos sólidos. En la época actual, los residuos de cualquier tipo, forman parte de un factor importante de la pérdida de la calidad ambiental. Sin embargo, la generación de residuos sólidos esta directamente relacionada con el grado de desarrollo y bienestar. El consumismo y la existencia de productos que no pueden ser degradados rápidamente han ocasionado un incremento de estos.

Los plásticos son productos inalterables, con una larga vida, para lo cual fueron diseñados. No obstante, posteriormente representan un problema para la sociedad. Por esta razón se están buscando métodos para degradar dichos plásticos y uno de ellos es la biodegradación por medio de microorganismos. En este trabajo, se plantea el composteo como un método para la degradación de estos plásticos; valiéndose para ello de la biota microbiana

El composteo se define como la degradación de materia orgánica para convertirla en composta (García y Guzmán, 2001). La composta es el producto del proceso aerobio llevado a cabo por los microorganismos, por el cual se descompone la materia orgánica convirtiéndose en un producto estable que provee al suelo calidad y fertilidad (Rink et al., 1992; Borken et al., 2002). En la actualidad se están buscando maneras en la cual reducir la materia

orgánica, y el composteo es una de las opciones. Sin embargo, la mayoría de la basura está compuesta tanto de materia orgánica e inorgánica, dentro de la cual figuran los plásticos, esto es debido a la falta de separación; para lo cual las empresas están pensando en este problema que comienzan a diseñar plásticos biodegradables o composteables, ya que estos se utilizan como materiales de empaque para comida y medicamentos siendo los principales contaminantes que dificultan la separación y reciclaje de materia (Kale et al., 2007). Para que un plástico salga al mercado necesita de una serie de requerimientos que debe cumplir, lo cual se le hacen diferentes pruebas, dentro de las cuales figuran las de biodegradabilidad.

En México, el polipropileno y polietileno son dos de los plásticos más utilizados; ocupando el 47% de la producción de plásticos. Estos son utilizados principalmente en embalaje, envases flexibles, bolsas y empaques.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo General

Evaluar y caracterizar la compostabilidad del polipropileno y polietileno, así como los cambios en diferentes grupos metabólicos y actividades enzimáticas extracelulares durante la prueba de biodegradabilidad de polipropileno y polietileno.

II.2 Objetivos particulares

- ❖ Determinar si el polipropileno y polietileno presentan desintegración.
- ❖ Determinar si los productos de reacción presentan toxicidad acuática y terrestre.
- ❖ Caracterizar por grupos metabólicos y actividad enzimática el proceso de biodegradación.
- ❖ Determinar el perfil de las actividades enzimáticas extracelulares durante la prueba.
- ❖ Establecer la relación entre la dinámica de los grupos metabólicos con la actividad enzimática.

II. 3 Hipótesis

El propileno y polietileno, al ser expuestos a condiciones de compostaje controladas estarán interactuando con biota microbiana, la cual será participe de la biodegradación. Presentará desintegración y no presentarán toxicidad acuática y terrestre.

En la biodegradación de los plásticos, la producción de CO₂ estará relacionada con la dinámica de grupos metabólicos, y la actividad enzimática.

II. 4 Estrategia general de trabajo

a) Caracterización de la composta y materiales:

Para la composta se evaluaron los parámetros fisicoquímicos de pH, sólidos totales (ST), sólidos volátiles (SV), humedad. En la caracterización microbiológica se observaron los grupos metabólico y las principales enzimas. Para los plásticos sólo se medirán los parámetros fisicoquímicos de ST, SV, y humedad.

b) Evaluación de la compostabilidad

Para evaluar si el polipropileno y el polietileno son plásticos compostables, se realizaron tres pruebas, evaluación de la desintegración, la biodegradabilidad de los plásticos y la toxicidad acuática y terrestre de los mismos.

Para la prueba de biodegradación de los plásticos, se monitoreo el CO₂ por método titulométrico, tres veces por semana. Al final de la prueba de biodegradabilidad se hizo la determinación de la desintegración de la muestra. Después se hizo una prueba de seguridad acuática y terrestre. La prueba de toxicidad acuática consiste en hacer una extracción por filtración de la composta ,a el sobrenadante se le hicieron 5 diluciones (5,10,25,50 100%), para pruebas de germinación de *Solanum lycopersicum* (jitomate), *Trifolium patrense* (trébol) y *Lactuca sativa* (lechuga) durante siete días. En la prueba de seguridad terrestre se evaluó la sobrevivencia, colocando las semillas de *L: sativa*, *S. lycopersicum* y *Allium cepa* (cebolla) en la composta, dejándolas germinar y crecer por un tiempo de 23 días.

c) Crecimiento microbiano y actividad enzimática

Para hacer el seguimiento del crecimiento de microorganismos, se escogieron principales grupos metabólicos posibles a encontrar en el proceso de compostabilidad de plásticos, utilizando medios selectivos para amilolíticos, sacarolíticos, lipolíticos, proteolíticos, y celulolíticos, con esto se hizo el seguimiento del crecimiento cada 7 días con el fin de determinar los cambios en los grupos en las condiciones ya mencionadas por el método de cuenta en

placa, así mismo se estará monitoreando la presencia de enzimas por medio de galerías API ZYM™.

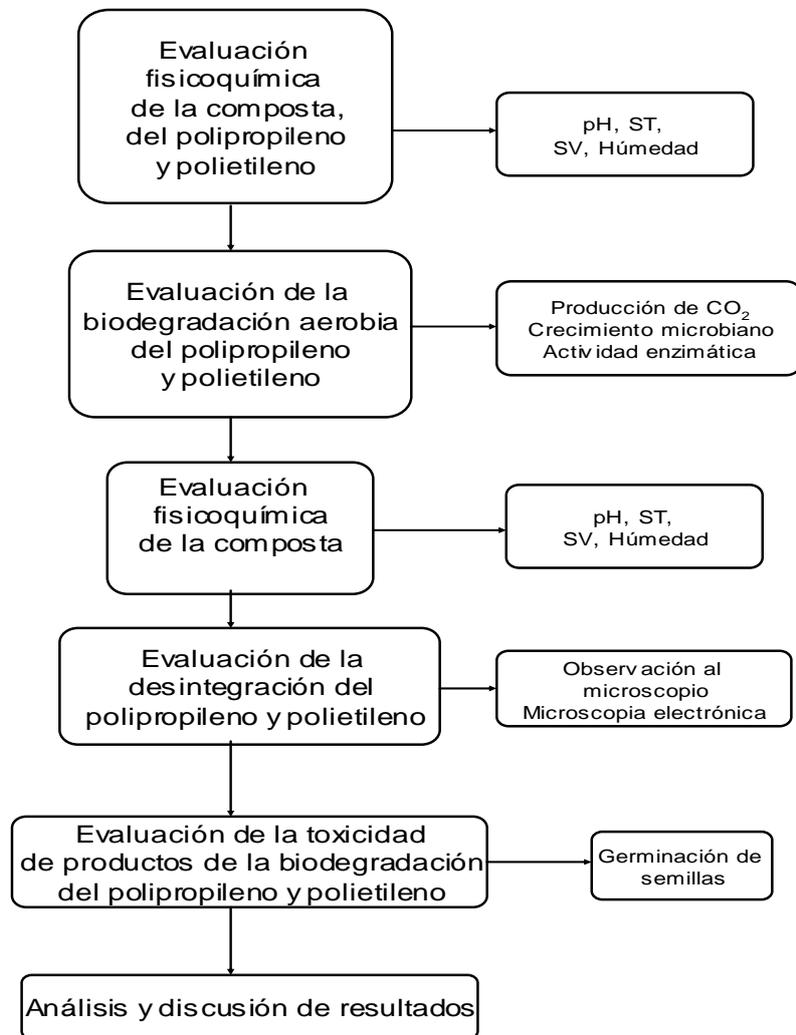


Figura 1. Estrategia general de trabajo

II. 5 Justificación

Aproximadamente 140 millones de toneladas de plásticos son producidas en todo el mundo cada año. Estos polímeros son extremadamente estables y no se incorporan en los ciclos de degradación de la biosfera (Shimao, 2001). La contaminación ambiental por plásticos, aunada a la falta de educación de separación de residuos sólidos, ha generado un difícil manejo de los residuos sólidos, ya que mientras los plásticos no pueden ser reciclados, la materia orgánica no puede ser utilizada para la elaboración de composta ya que pierde calidad.

Teniendo presente este problema se ha buscado diseñar plásticos que sean compostables, es decir, que puedan ser manejados con residuos orgánicos ya que la microbiota presente ayudará a la degradación, desintegración del plástico y que al final del proceso la composta pueda ser utilizada en la agricultura o jardinería, cumpliendo con las normas de seguridad acuática y terrestre.

Sin embargo, estos plásticos aún están en estudio, y lamentablemente en México aún no hay normas que involucren la determinación de plásticos compostables o biodegradables. Es por esto que en este trabajo se planteó, evaluó y determinó la compostabilidad de dos plásticos, el polietileno y el polipropileno, basado en los procedimientos ASTM D 5338 y ASTM D 6400, así mismo se complementó este trabajo con un monitoreo de la dinámica de las poblaciones microbianas clasificándolas por grupos metabólicos y actividad enzimática.

III. MARCO DE REFERENCIA

III. 1 Materiales plásticos

La característica común de todos los plásticos, es que están compuestos de polímeros. Un polímero es una sustancia formada por muchas unidades iguales. Los polímeros están formados por la unión repetitiva de unidades pequeñas de agrupaciones atómicas denominadas monómeros, formando moléculas de gran tamaño denominadas macromoléculas.

Los plásticos usados son fabricados de materiales orgánicos e inorgánicos formados por átomos de carbono unidos entre sí, formando largas cadenas, con otros elementos como el hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, cloro, azufre, silicio y fósforo (Gómez y Gil, 1997). La materia prima para fabricarlos se extrae del petróleo y gas natural.

Existen dos grandes grupos de plásticos; los termoplásticos y los termoestables. Los termoplásticos, son plásticos que nos sufren cambios en su estructura química durante el calentamiento, pueden fundirse y moldearse varias veces. Son flexibles y resistentes. Dentro de este grupo se encuentran el polietileno, el polipropileno, el poliestireno, el policloruro de vinilo (PVC). Los plásticos termoestables, son aquellos que sufren un cambio químico a el calor, algunos pueden ser duros pero frágiles y otros blandos y flexibles (Meneses et al., 2001).

En México, los plásticos son clasificados de acuerdo a su importancia comercial y su aplicación en el mercado:

- a) Comodities o comerciales: son los más utilizados ya que reúnen buenas características y bajo costo, dentro de estos plásticos se encuentran las poleofinas, poliestireno y el policloruro de vinilo.
- b) Termofijos: son plásticos con un consumo moderado, requeridos para el diseño de productos por su forma, color ya apariencia, encontrándose en este grupo el poliuretano y el silicón.

- c) Técnicos o de ingeniería: son aquellos que se utilizan para una función determinada, entre los cuales se encuentran las poliamidas, poliacetales y policarbonatos (Martínez, 2007).

Este estudio está enfocado a dos plásticos comerciales: el polietileno y el polipropileno; ambos son oleofinas, con largas cadenas de etileno (Harper, 1992).

III. 1.1 Polietileno

El polietileno es un polímero lineal de gran regularidad estructural, formado por unidades de etileno que puede presentar alguna ramificación corta como consecuencia de sus reacciones secundarias del propio mecanismo de polimerización (Figura 2). Este plástico es sintetizado a partir de la oleofina, etileno. El polietileno de alta densidad presenta un alto grado de cristalinidad y una densidad mayor a 0.95 g/cm^3 . Es prácticamente insoluble en cualquier disolvente, muy estable al calor y a los agentes químicos. No presenta ningún tipo de toxicidad durante su manipulación ni durante su uso, por lo que se usa en el envasado de alimentos. El peso molecular se encuentra entre 30 000 y 50 000 Da. Lo cual le confiere propiedades como una alta resistencia a la abrasión, mayor resistencia al impacto, buena resistencia a la corrosión y a la radiación (Díaz, 2007). El polietileno es comúnmente utilizado en bolsas de plástico, botellas de agua, películas para empacar alimentos, juguetes, pipas de irrigación (Vona et al., 1965)

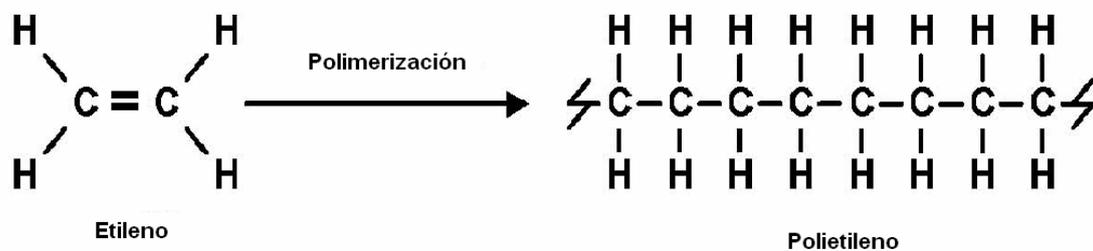


Figura 1 Estructura del etileno y polietileno.

III. 1.2 Polipropileno

El polipropileno es el polímero obtenido a partir de la oleofinas de propileno (Figura 3), cuya característica es ser asimétrica dando lugar a estructuras espaciales diferentes. Existen diferentes tipos de propileno, dentro de ellos se encuentra el polipropileno isotáctico. Este presenta una regularidad estructural de este polímero le confiere un alto grado de cristalinidad. Comparado con el polietileno presenta un mayor punto de fusión y menor densidad. Así mismo, presenta una buena combinación entre sus propiedades mecánicas y térmicas que le permite ser utilizado tanto en el moldeo por inyección como en fabricación de películas y fibras. Este es uno de los termoplásticos con mayor consumo a nivel mundial (Gómez y Gil, 1997).

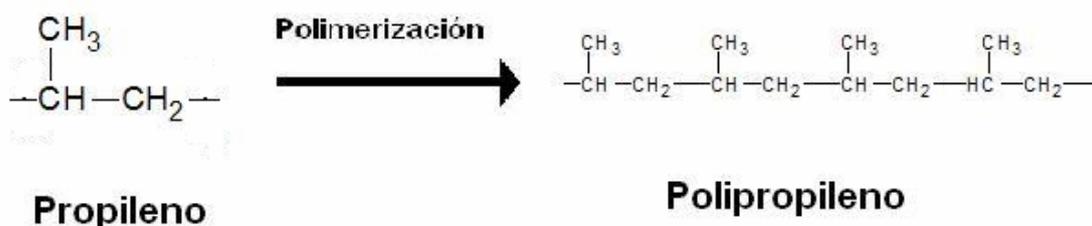


Figura 2. Estructura de propileno y polipropileno

III. 2 Pruebas de biodegradabilidad

Ante la producción desmesurada de diferentes productos químicos industriales, entre ellas los plásticos, en la sociedad moderna ha probado ser un elemento esencial para el desarrollo de las actividades productivas y el logro de las metas sociales y económicas, sin embargo, es preciso promover procesos de manejo y eliminación ambientalmente adecuados. Así como contar con la información científico-técnica sobre las propiedades y efectos de los productos químicos, para establecer reglamentos y mecanismos que prevengan, reduzcan o controlen su manejo. Ante las experiencias de desastres químicos, y los problemas detectados en los diferentes aspectos que involucra la gestión de los productos químicos, se ha llegado a la conclusión que la manera más

apropiada para reducir sus riesgos, es el empleo del enfoque del ciclo de vida integral.

En la actualidad los países más industrializados del mundo, como los de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OCDE), han establecido programas para la evaluación sistemática y, en su caso, reglamentación y control de los productos químicos industriales. Es por esto que se han diseñado pruebas de biodegradabilidad, para saber cuales son los compuestos degradables, en cuanto tiempo y que efectos produce (INE, 2007).

La biodegradación es definida como el proceso de degradación microbiana de sustancias orgánicas complejas en sustancias más sencillas (Cardinale et al., 2008). Existen dos clasificaciones generales de biodegradación, la primera de ellas es la que presenta alteraciones estructurales del compuesto pero no proporciona información sobre el destino final de la sustancia y la degradación completa o mineralización, siendo la transformación total de una sustancia a CO_2 , CH_4 , y biomasa (OECD, 1992). Ante el problema de que existen sustancias donde no se podía evaluar completamente la biodegradabilidad, el programa de evaluación sistemática de productos químicos de la OECD estableció tres tipos de biodegradabilidad: la biodegradabilidad inmediata, la cual sirve como prueba inicial y se aproxima a condiciones microbianas encontradas en el ambiente; biodegradabilidad inherente , es una prueba que se lleva a cabo con altas concentraciones de nutrientes y biomasa, teniendo una mayor probabilidad de predecir el potencial que tienen una sustancia de ser biodegradable y biodegradabilidad de simulación o confirmatorios, esta prueba tiene una probabilidad mayor de predecir si una sustancia es biodegradable o no (Vázquez y Beltrán,2004).

El principio de todos los ensayos que existen para determinar la biodegradabilidad de una sustancia consiste en exponer a dicha sustancia a una población de microorganismos ambientalmente representativa, y medir su desaparición como resultado de la actividad de los microorganismos. Para lograr esto, la prueba debe incluir: 1) inóculo del microorganismo, 2) Sustancia

a prueba y una forma de detectar su desaparición y 3) determinación de un tiempo (Vázquez y Beltrán, 2004).

La American Society for Testing and Materials (ASTM) y la Internacional Standard Organization (ISO), han desarrollado procedimientos para evaluar la biodegradación de plásticos encontrándose vigentes en Estados Unidos de America. La ASTM D5338 es una norma que propone un método para la evaluación de la biodegradabilidad aerobia de materiales plásticos bajo condiciones controladas de composteo, siendo este utilizado como el inóculo de microorganismos.

El composteo aerobio es la descomposición de sustratos orgánicos en la presencia de oxígeno. Los principales productos del metabolismo son CO₂, agua, y calor; mientras que los principales productos de un proceso de composteo anaeróbico son, metano, CO₂ y numerosas moléculas de bajo peso molecular tales como ácidos orgánicos y alcoholes.

El objetivo del proceso de composteo ha sido convertir desechos orgánicos en proceso de putrefacción en una forma estable que destruyen organismos patógenos para el humano, también es capaz de destruir enfermedades de plantas, semillas maleza, insectos y huevos de insectos (Martín, 1998).

III. 3 Requerimientos para un proceso de composteo óptimo

Para llevar a acabo un proceso de composteo es importante tomar en cuenta factores fisicoquímicos y microbiológicos como:

A) Carbón:Nitrógeno (C:N)

El carbono y el nitrógeno son los dos constituyentes básicos de la materia orgánica. Se considera que para obtener una composta de calidad es importante que exista una relación equilibrada entre ambos elementos. Una relación de C:N de 25 a 35 se considera la adecuada, pero variara en función

de la materia con la cual fue elaborada la composta. Si la relación de C:N es muy alta, disminuye la actividad biológica; y si la relación C:N es muy baja no afecta el proceso de compostaje, ya que el nitrógeno puede ser perdido en forma de amoníaco. Los materiales orgánicos ricos en carbono y pobres en nitrógeno son la paja, las hojas secas, las ramas, la turba. Los pobres en carbono y ricos en nitrógeno son las plántulas y las heces animales (Martín, 1998).

B) pH

Los principales fluidos biológicos se encuentran balanceados en las concentraciones de cationes y aniones cercanos a su neutralidad; es decir en pH 7, siendo el más ideal para el suelo como para la composta. A pH mayores de 7, el medio contiene una mayor concentración de iones que en los microorganismos, causa osmosis, provocando una pérdida de agua de sus fluidos vitales. El exceso de iones OH⁻ causa la pérdida de iones amonio y provocan la hidroxilación de elementos como el Cu y Zn, propiciando su precipitación como una mezcla de carbonatos en el otro extremo.

Si se presta atención cuidadosa a la mezcla de los materiales, como al contenido de humedad y a la aireación, no hay necesidad de influir sobre el pH del proceso (Martín, 1998) .

C) Estado físico (tamaño de partícula)

En el proceso de composteo se encuentran involucrados procesos enzimáticos, microbiológicos y de aireación. Sin embargo, el tamaño de la partícula del material utilizado es importante determinar sus dimensiones, ya que el área superficial dependerá de la facilidad en que la microbiota, enzimas y sustancias interactúen con el medio. En el caso de la disponibilidad del oxígeno, si el tamaño de partícula es demasiado pequeño no hay una disponibilidad amplia en toda la pila de compostaje, provocando espacios anaerobios. En el proceso de composteo se recomienda una diversidad de tamaños no mayores a 5 cm.

Idealmente, como en un suelo, tanto microporos como macroporos son necesarios entre las partículas para que el agua pueda ser retenida y utilizada por los microorganismos, mientras el exceso de agua, produce que el CO₂ y el aire necesario pueda ser movido fácilmente a la superficie (Martín, 1998).

D) Humedad

El principal sitio de actividad de microorganismos en compostas es en una delgada capa de agua sobre la superficie de las partículas. El agua es esencial para disolver y transportar los nutrientes y sustancias que los microorganismos pueden absorber solo en forma de solución. Organismos móviles y enzimas libres se mueven a través del medio acuosa. Sin embargo, para una actividad aerobia, los espacios intersticiales, o poros entre partículas deben ser ocupados con agua y aire (Martín, 1998).

E) Aireación

Un suministro adecuado de aire a todas las partes de una pila de composta es esencial para el suministro de oxígeno a los microorganismos y para eliminar el CO₂ producido. El oxígeno es necesario para que los microorganismos puedan descomponer eficazmente la materia orgánica. Debe ser suficiente para mantener la actividad microbiana sin que en ningún momento aparezcan condiciones anaeróbicas, que retarden el proceso y que disminuyan la calidad por la presencia de distintos tipos de microorganismos que provoquen la acidez y putrefacción (Dalzell et al., 1991). Un buen progreso del proceso requiere de la aportación de aire y del mantenimiento de una porosidad adecuada en la masa. Para conseguir un rápido compostaje es necesario un buen aporte de oxígeno. La base principal del proceso de composta es una buena aireación, el tipo de material, la textura, la humedad, o la manera y frecuencia de volteo. El volteo, sirve para homogenizar la mezcla y su temperatura.

F) Temperatura

Se consideran óptimas las temperaturas en un intervalo de 35° y 55°C para conseguir la eliminación de patógenos y parásitos. A temperaturas muy altas, muchos de los microorganismos mueren y otros no interactúan por estar como esporas. Cuando se junta el material orgánico para el compostaje, parte de la energía liberada por la descomposición del material se desprende como calor y esto origina un aumento de la temperatura. En la Figura 4 se muestra la curva normal de temperatura- tiempo en el proceso de compostaje. Esta indica que el proceso pasa a través de etapas del calentamiento gradual, temperatura máxima, enfriamiento y maduración. Al comienzo del procedimiento, el material se encuentra a temperatura ambiente. En la primera etapa se presenta un calentamiento gradual que esta dado por los microorganismos presentes, los cuales se multiplican rápidamente en el material y la temperatura se eleva. Durante este periodo se descomponen todos los compuestos tales como azúcares, almidones y grasas. Cuando la temperatura alcanza 60°C, la actividad de los hongos cesa, y la descomposición es llevada a cabo por actinomicetos y bacterias. La velocidad de descomposición se modera, y se alcanza el máximo de la temperatura. Cuando el material en compostaje ha pasado a través del máximo de temperatura, la pila alcanza la estabilidad en que se han descompuesto los materiales fácilmente alterables y se ha satisfecho la mayor parte del alto nivel de demanda de oxígeno. Cuando llega a temperaturas por debajo de los 60°C los hongos se extienden y atacan compuestos como hemicelulosas y celulosa, descomponiéndolos en compuestos azucarados más sencillos que son más disponibles para otros microorganismos. Los actinomicetos también ayudan en este proceso. Al final del periodo de enfriamiento desaparece la mayoría del suministro de nutrientes y comienza la competencia entre los microorganismos. Al bajar de 40°C los mesófilos reinician su actividad y el pH del medio desciende ligeramente. En el proceso de maduración que requiere meses a temperatura ambiente, durante las cuales se producen reacciones secundarias de condensación y polimerización del humus (Dalzell et al., 1991).

Fases de un proceso de compostaje aerobio

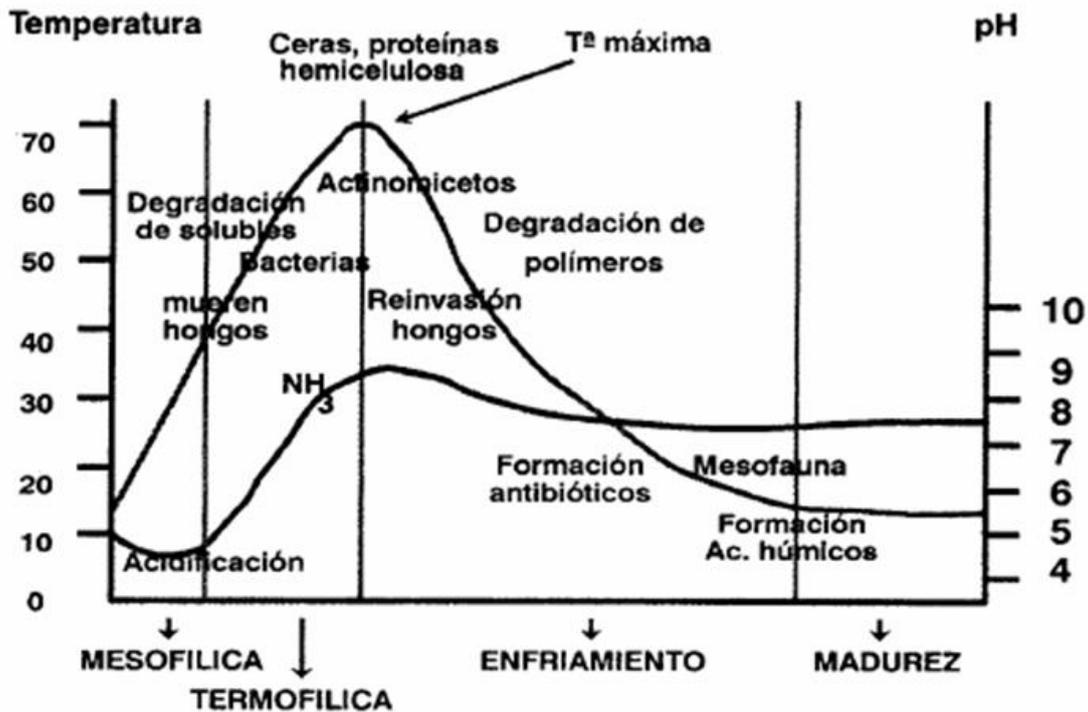


Figura 3. Curva normal de temperatura, en un proceso de composteo. (tomada de infojardín, 2009).

G) Microbiología del sistema

Diversidad microbiana durante la fase de maduración

El grado de maduración de una composta afecta críticamente su utilización en la agricultura; ya que la composta inmadura induce una gran actividad microbiana en el suelo para que después de un tiempo se incorpore, causando deficiencia de oxígeno y una gran variedad de problemas de toxicidad a las raíces de las plantas. La madurez de la composta varía considerablemente en

función del sistema y el manejo de la composta. La estabilidad biológica y química de los productos finales puede ser difícil de definir con un solo método analítico tanto químico como biológico. Los beneficios de aplicación de la composta en la agricultura y el control de enfermedades en plantas ya han sido reportados (Gaitan, 2006).

Un factor decisivo en la maduración de la composta son las poblaciones microbianas que envuelven los ciclos de los nutrientes (C,N,S,P). Sin embargo, la composición de la composta es importante para predecir su impacto potencial sobre el suelo, fertilidad y otros parámetros biológicos. En la etapa de maduración hay alta actividad de degradación de polímeros complejos naturales (ej. Lignina, hemicelulosa, celulosa). Durante la fase de enfriamiento, las poblaciones bacterianas disminuyen de 1 a 2 unidades logarítmicas en comparación con el número presente en la etapa termofílica (10/8-10/11), pero la diversidad taxonómica y metabólica aumenta marcadamente.

Las bacterias representan el 80% de total de células contadas. La mayoría de la población involucrada en el ciclo del carbono son las bacterias proteolíticas, amonificantes, amilolíticas, celulolíticas aerobias, desnitrificantes, sulfato reductoras, y sulfoxidasas.

Durante la etapa de maduración la composta tiene un gran número y diversidad de bacterias mesofílicas. Esta diversidad juega un papel muy importante en la estabilización de la composta. Lo cual sugiere que una aplicación de una composta madura provee una buena calidad química y microbiológica (Massiani y Domeizel, 1994).

Crecimiento microbiano

Los microorganismos necesitan ciertos requerimientos básicos para su supervivencia: 1) un ambiente favorable, con un pH adecuado, una temperatura apropiada y condiciones redox propicias, 2) agua; 3) nutrientes minerales; 4) fuentes de energía (Coyne, 2000).

Fuentes de energía

Es posible caracterizar a los microorganismos por sus fuentes de energía y de carbono. En la siguiente tabla podemos ver las dos principales fuentes de energía y sus divisiones.

Tabla 1. Clasificación de fuentes de energía y de carbono para los microorganismos (Coyne, 2000).

Fuente de energía	Fuente de carbono	
Química	Orgánica	Quimiheterótrofos
	Inorgánica	Quimiautótrofos
Luz	Orgánica	Fotoheterótrofos
	Inorgánica	Foto autótrofos

Metabolismo microbiano

Es importante realizar una clasificación basada en sus requerimientos de oxígeno (O₂) para su crecimiento. Esto resulta muy importante para la determinación del metabolismo; ya que también permite establecer cuando y donde son activos los microorganismos. De acuerdo al consumo de oxígeno los microorganismos están clasificados en:

- a) Aerobios obligados (requerimientos absolutos de oxígeno)
- b) Anaerobios obligados (sin requerimiento de oxígeno, ya que este resulta tóxico)
- c) Microaerófilos (con requerimientos bajos de oxígeno)
- d) Anaerobios facultativos (el oxígeno es el aceptor de electrones preferido, pero existen otras alternativas) (Madigan et al., 2006).

Actividad enzimática

Durante el composteo, el material comienza a transformarse a través de una variedad de procesos bioquímicos en los cuales las enzimas juegan un papel importante (Tiquia, 2002). El entendimiento de la actividad biológica es fundamental para manejar racionalmente y con calidad los procesos bioquímicos que ocurren durante el compostaje. La valoración de actividad biológica se puede realizar mediante la evaluación de las actividades que ocurren en este proceso (Quintero et al., 2005). La caracterización y cuantificación de la actividad enzimática durante el composteo pueden proporcionar información de la dinámica del proceso de composteo reflejada en la descomposición de la materia orgánica y la madurez de la composta. En el caso particular de las enzimas extracelulares fueron estudiadas, ya que una de las funciones de estas es que son excretadas al medio para descomponer polímeros grandes en subunidades más manejables para su adsorción (Coyne, 2000).

III. 6 Degradación de plásticos

Algunos cambios físicos y químicos en plásticos son el resultado de factores ambientales, como la luz, el calor, condiciones químicas y actividad biológica; induciendo cambios en las propiedades en los plásticos por reacciones químicas, físicas o biológicas; provocando ruptura de enlaces y subsecuentes transformaciones químicas se han clasificado como degradación de plásticos. La degradación es reflejada en las propiedades mecánicas, ópticas y eléctricas; cambios de coloración, delaminación, erosión o fase de separación. La degradación puede ser de tres tipos: fotodegradación; termodegradación o biodegradación.

Tabla 2. Rutas de degradación de varios polímeros.

Factores (Requerimientos/ Actividad)	Fotodegradación	Termo- oxidativa Degradación	Biodegradación
Agentes activo	Luz UV o Alta energía de radiación	Calor y oxígeno	Agentes microbianos
Requerimientos De calor	No requerida	Altas temperaturas	No requerida
Taza de degradación	Al inicio es baja, pero la propagación es rápida.	Rápida	Moderada
Otras consideraciones	Amigable con el ambiente si un alta energía no es utilizada	Ambientalmente no aceptable	Amigable con el ambiente
Aceptación	Aceptable pero costoso	No aceptable	Barato y muy aceptable.

Fotodegradación

La sensibilidad de los polímeros a la fotodegradación esta relacionada con la capacidad de absorber parte de la radiación solar, que incluye la radiación UV-A (315-400 nm) y UV-B (295-315 nm) responsable directo de la fotodegradación (fotólisis, inicia una fotooxidación). La parte visible de la luz solar (400-760 nm) acelera la degradación por calor, la radiación infrarroja (760-2500 nm) acelera la oxidación térmica. Muchos plásticos tienden a absorber una alta energía de luz UV, ocasionando que los electrones tengan una alta reactividad, causando oxidación.

Degradación térmica

La degradación térmica es el deterioro molecular de plásticos como resultado del sobrecalentamiento. A altas temperaturas los enlaces pueden empezarse a romper, provocando cambios de las propiedades ópticas y físicas de los plásticos.

Biodegradación

La biodegradación es el proceso por el que las sustancias son transformadas por microorganismos. Los microorganismos como las bacterias y los hongos están involucrados en la degradación de plásticos sintéticos como naturales. Los factores que influyen sobre la biodegradación son características del polímero, tipo de organismo y el tipo del pretratamiento. Las características del polímero como tacticidad, cristalinidad, peso molecular, tipo de grupos funcionales y substitutos presentes en su estructura como aditivos, juegan un papel importante en este tipo de degradación (Artham y Doble, 2008).

Generalmente, un incremento en el peso molecular resulta en una disminución de la biodegradabilidad. En contraste, los monómeros, dímeros y oligómeros de polímeros de unidades repetidas son más fáciles de degradar y de ser mineralizados. Si los plásticos presentan un alto peso molecular disminuye su solubilidad inhibiendo un ataque microbiano, ya que las bacterias asimilan los sustratos a través de la membrana celular y pueda ser degradado por enzimas; las cuales están divididas en dos categorías involucradas en la degradación de polímeros: depolimerasas extracelulares e intracelulares. Durante la degradación las enzimas extracelulares rompen los polímeros en moléculas más pequeñas, que pueden pasar a través de la membrana y ser utilizadas como fuente de carbono y oxígeno (Figura 5) (Shah et al., 2008).

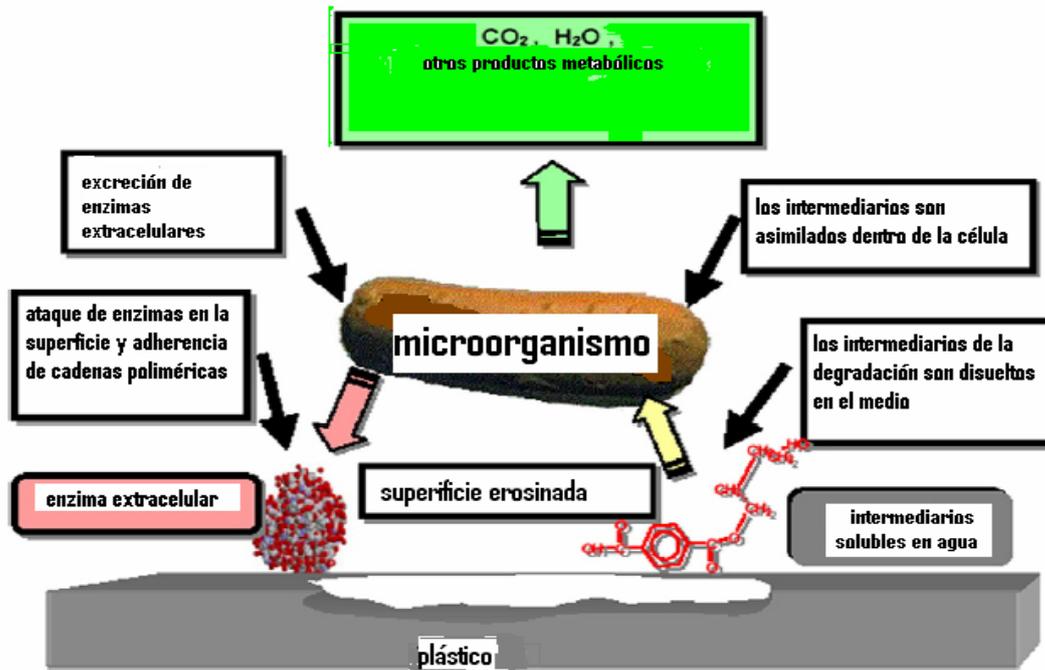


Figura 4. Mecanismo general de biodegradación de plásticos.

Métodos de evolución de degradación

Existen diferentes maneras de evaluar la biodegradación de plásticos algunos de los métodos más utilizados se mencionan a continuación:

a) Observación visual: La observación de cambios visibles en plásticos puede ser utilizada en todas las pruebas de evaluación. La formación halos o rupturas, de fragmentación, cambios de color o formación de biopelículas en la superficie describe un proceso de degradación. Aunque estos cambios no reportan un proceso de biodegradación por metabolismo, pero se puede argumentar que es un inicio de ataque microbiano. Para una mayor obtención de información se utilizan técnicas de observación de microscopía electrónica de barrido o microscopía de fuerza atómica.

b) Pérdida de peso: determinación de residuos.

La pérdida de masa en películas es aplicada como método de evaluación degradación (para pruebas de simulación), aunque no se obtiene una información directa de la biodegradación. El decremento de residuos puede

ser determinado por una adecuada separación y determinación de la estructura de los residuos e intermediarios de bajo peso molecular.

C) Cambios en las propiedades: Así como la observación visual, es un método que no provee directamente información sobre el metabolismo. Sin embargo, cambios en las propiedades son usados como indicadores de degradación.

d) Evolución de CO_2 / O_2 : Bajo condiciones aeróbicas, los microorganismos usan el oxígeno para oxidar el carbón y formar dióxido de carbono, como el principal producto final del metabolismo. El consumo de oxígeno o la producción de dióxido de carbono son buenos indicadores de la degradación de polímeros y son los métodos más utilizados en laboratorios.

e) Formación de halos. Este consiste en preparar agar con el polímero encontrándose disperso, el cual es inoculado con microorganismos, después de la incubación, se forma un halo alrededor de la colonia indicando que estos microorganismos son capaces de despolimerizar el polímero.

Otras técnicas que pueden utilizarse son por resonancia magnética nuclear, difracción de rayos X, espectroscopia por infrarrojo (Shah et al., 2008).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

IV. 1 Materiales y equipo

La composta utilizada para la prueba de biodegradabilidad fue proporcionada del centro de compostaje de la UNAM, siendo esta compuesta de residuos urbanos.

El material el cual se puso a prueba fueron hojas de polipropileno y gránulos de polietileno.

Los experimentos se realizaron en cubas de compostaje, con un grueso de 6 mm de acrílico de 22.5 cm x 20.0 cm x 17.5 cm, contando cada una con dos difusores, bombas de aire y mangueras de plástico de 10 y 6 mm.

Material de laboratorio: matraces Erlen Meyer de 250, 500 y 1000 mL, buretas, cajas petri de vidrio, triángulo de vidrio, micropipetas de 200 μ L, 1000 μ L y 5000 μ L, puntas de plástico, capsulas de vidrio, moscas magnéticas, parrilla.

Galerías APY ZYM Biomeriux™.

Equipo

Horno, con una temperatura de 105°C

Mufla, con una temperatura de 550°C.

Incubadora de 28° a 35°C.

Balanzas analíticas.

Cámara fotográfica.

IV. 2 Método

IV.2.1 Elaboración de composta

a) Caracterización del inóculo

El inóculo se obtuvo de la Planta de compostaje de la UNAM elaborada con materia vegetal de cedro, liquidambar, y desechos urbanos de Ciudad Universitaria.

Al inóculo se le hizo una caracterización fisicoquímica de cuatro parámetros: sólidos totales, sólidos volátiles, pH y CO₂ de acuerdo a la normatividad como se muestra en la tabla 3 (Ver Anexo VII.2). Para empezar la prueba de biodegradabilidad se necesitó que la composta se encontrará en condiciones adecuadas de estos parámetros como se muestra en la tabla 4 para obtener resultados óptimos,

Tabla 1. Parámetros de caracterización fisicoquímica.

Parámetro	Técnica	Referencia
Sólidos Totales	Desecación a 105°C	APHA 2540 D
Sólidos Volátiles	Combustión a 550°C	APHA 2540 E
pH	Método electroquímico	ASTM D3987 y D1293
CO ₂	Método colorimétrico	ASTM D5338

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos del inóculo de acuerdo a ASTM D 5338.

Parámetro	
Sólidos Totales	50-55%
Humedad	< 70%
pH	7-8.2
Tamaño de partícula	< 10 mm

La caracterización microbiológica y enzimática se hizo por medio de crecimiento de bacterias en medios selectivos (Ver ANEXO VII.3) , para bacterias amilolíticas, sacarolíticas, lipolíticas, proteolíticas, y celulolíticas,

cada siete días por duplicado,. Para la caracterización enzimática se procedió a utilizar las galerías API ZYM™ .

b) Obtención y procesamiento de materia orgánica.

La composta se elaboró con restos de cocina, utilizando materia vegetal como cáscaras de naranja, plátano, piña, sandía, melón, tomate, en su mayoría. Todos los restos se picaron.

c) Elaboración de pila de compostaje.

Se colocó una capa de 1 cm composta (inóculo) por 4 cm de residuos, alternándolos, al final la pila quedó cubierta de composta como se observa en la figura 6B. Se removió una vez por semana y se mojó con agua de la llave. Llevándose a cabo el proceso por 3 meses. Esta composta se elaboró en el invernadero (Fig. 6A) del laboratorio de microbiología experimental, a una temperatura de 45 ° C.

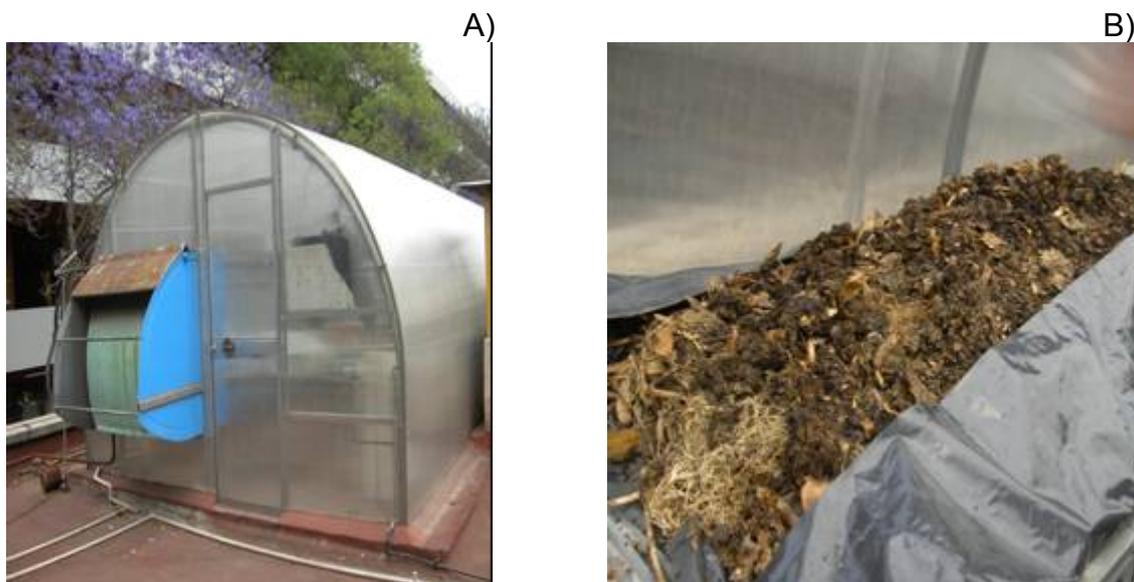


Figura 1. A) Invernadero del Laboratorio de Microbiología Experimental y B) pila de compostaje

d) Maduración de composta.

Ya pasados los 3 meses, la composta se sometió a un proceso de maduración en columnas de PVC, con aireación constante en un periodo de un mes. Figura 7



Figura 2. Columna de PVC (Proceso de maduración)

IV.2.2 Evaluación fisicoquímica de la composta y materiales plásticos

Al final del proceso de maduración, la composta presentó un tamaño de partícula no mayor a 10 mm, por lo cual se tamizó en un tamiz de malla de 5 mm de abertura, se volvió a evaluar los parámetros fisicoquímicos de la composta y por los procedimientos ya mencionados anteriormente.

Evaluación fisicoquímica de materiales plásticos

1. Acondicionamiento de la muestra

Para la evaluación de los parámetros fisicoquímicos de las muestras se procedió en el caso del polipropileno a cortar las hojas y en el polietileno no tendrá ningún tratamiento.

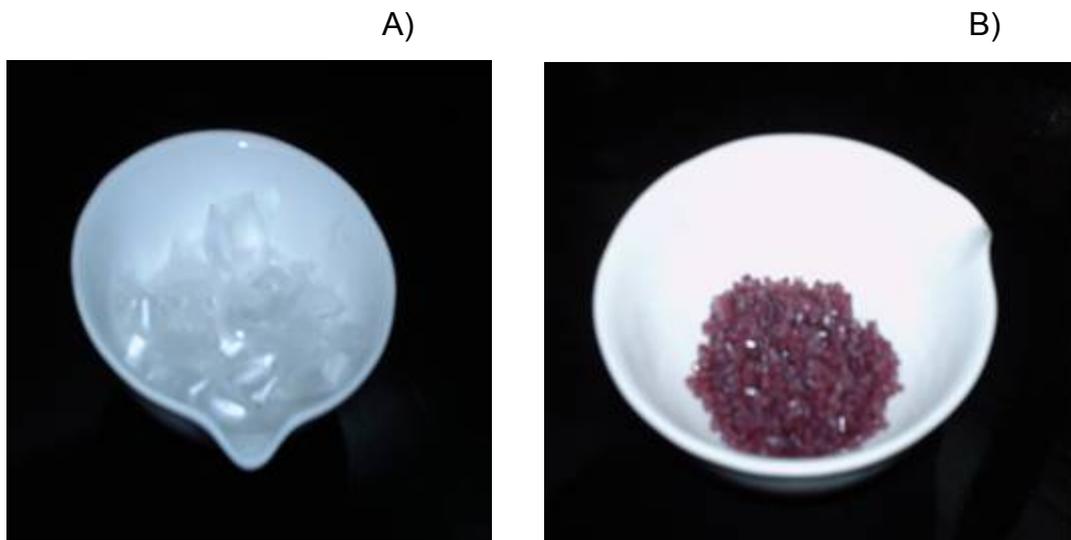


Figura 3.A) El propileno cortado en trozos de 2 cm x 1 cm y b) El polietileno, no obtuvo ningún tratamiento, se encontraba en granos.

2. Determinación de Sólidos Totales y Volátiles.

Para la determinación tanto de sólidos totales como volátiles, se procedió de la misma manera que en la composta, solo que se utilizaron 4 g de muestra.

IV.2.3 Evaluación de la biodegradación aerobia de plástico

Una vez que se caracterizaron el polipropileno, polietileno y la composta. Las cajas de acrílico (unidad experimental) se acondicionaron para iniciar la evaluación de la siguiente manera: Se adicionó 1200 g de composta, cuidando que cubrieran no más de las $\frac{3}{4}$ partes de la caja. Al hacer la prueba por duplicado se corrió:

- 1) Blanco: estuvo compuesto solo la composta con las condiciones adecuadas.
- 2) Control positivo: se encontró constituido por la composta con un material de referencia, en esta prueba se utilizó celulosa.

3) Material a evaluar (polipropileno): se acondicionó el polipropileno en trozos pequeños, los cuales se adicionaron a la composta incorporándolos homogéneamente.

4) Material a evaluar II (polietileno): los gránulos de polietileno se adicionaron a la composta contenida en las cajas, y se mezcló homogéneamente.

Cada caja estuvo conectado a una trampa de CO₂ donde estuvo contenido una solución de Ba(OH)₂ con una concentración de 0.024 N, a su vez tuvo una entrada de aire para humidificar la composta. Las condiciones a las cuales se llevaron a cabo las pruebas de biodegradabilidad fueron: temperatura de 30°C, humedad del 55%, pH entre 7 y 8.2 (de acuerdo a ASTM D5338) La lectura se realizó cada 48 horas. Una vez que transcurrieron los 45 días, se hace un análisis integral de la evolución del CO₂. El reactor se muestra en la Figura 9.



Figura 4. Cámara de compostaje

IV.2.4 Desintegración del plástico

Uno de los parámetros que definen la compostabilidad de un plástico está dado por la desintegración de este, después del proceso el plástico no debió ser fácil de distinguir, para ello se procedió sacar a la toma de composta de las cajas y hacer observaciones.

Visualización macroscópica y microscópica del plástico

Al final del proceso, se hicieron observaciones al microscopio. Para el propileno se realizó una tinción de Gram, tanto para el plástico que estuvo en composta como para el que no se llevo a cabo ningún tratamiento, y así se observo en el microscopio óptico.

Para los granos de polietileno, sólo se hicieron observaciones en microcopio estereoscópico.

De acuerdo a los resultados obtenidos los materiales se mandaron a hacer microscopia electrónica de barrido, para observar si hubo daño en el plástico.

IV.2.5 Prueba de seguridad acuática y terrestre

Para evaluar la toxicidad de la composta, se procedió a realizar la prueba de seguridad acuática y terrestre de acuerdo a ASTM D-6400 y OECD 208.

En la prueba de seguridad acuática se utilizaron semillas de lechuga, trébol y jitomate, en la cual se extrajo el sobrenadante de la composta y se realizaron cinco diluciones (5,10, 25, 50 100%), con tres replicas, en las cuales en cada caja petri se colocaron 10 semillas sobre papel filtro y se

adicionó 5 mL de la solución y se pusieron a germinar las semillas por 7 días a 28°C en oscuridad.

En el caso de la prueba de seguridad terrestre, se utilizaron semillas de lechuga, cebolla, jitomate y trébol, las cuales se colocaron en germinadores con la composta, con dos replicas, y al cabo de 23 días se evaluó el porcentaje de sobrevivencia.

IV.2.6 Determinación de crecimiento microbiano en el proceso

Para determinar los cambios en los grupos metabólicos, se procedió a hacer un seguimiento del crecimiento cada 7 días por medio de cuenta en placa por duplicado, se hicieron diluciones seriales de las cuales se utilizaron para inocular placas de agar con el medio selectivo, dejándolas crecer un tiempo de 48 h a una temperatura de 28°C, los medios selectivos que se escogieron fueron para 5 grupos metabólicos representativos; amilolíticos, sacarolíticos, proteolíticos, lipolíticos y celulíticos (ver Anexo VII.3), en los cuales se observaron los cambios de predominancia de metabolismo durante la prueba de biodegradabilidad.

IV.2.7 Caracterización enzimática del proceso

La diversidad de enzimas presentes fue monitoreada por medio de galerías API ZYM™ Biomeriux. Estas galerías están compuestas por 20 microcápsulas que contienen sustratos cromogénicos de 19 enzimas diferentes (Tabla 5) y un control (una microcápsula que no contiene ningún sustrato). Las galerías se humedecieron con agua destilada. De la composta se extrajo el sobrenadante, se tomó una alícuota de 130 µL y fue agregada en cada uno de las 20 microcápsulas. Las galerías se incubaron a 37°C durante 4 h. Después de la incubación, se agregaron 30 µL de reactivo (ZYM A y ZYM B) a todas las microcápsulas. Después de 10 minutos, se observaron los resultados asignándoles un valor de acuerdo al

colorante obtenido, tomando la siguiente escala; que va del 1 al 5. Para este estudio, se reportaron reacciones de baja intensidad con el valor de 1, reacciones de moderada intensidad de 2 a 3 y reacciones de alta intensidad de 4 a 5 (Tiquia, 2002).

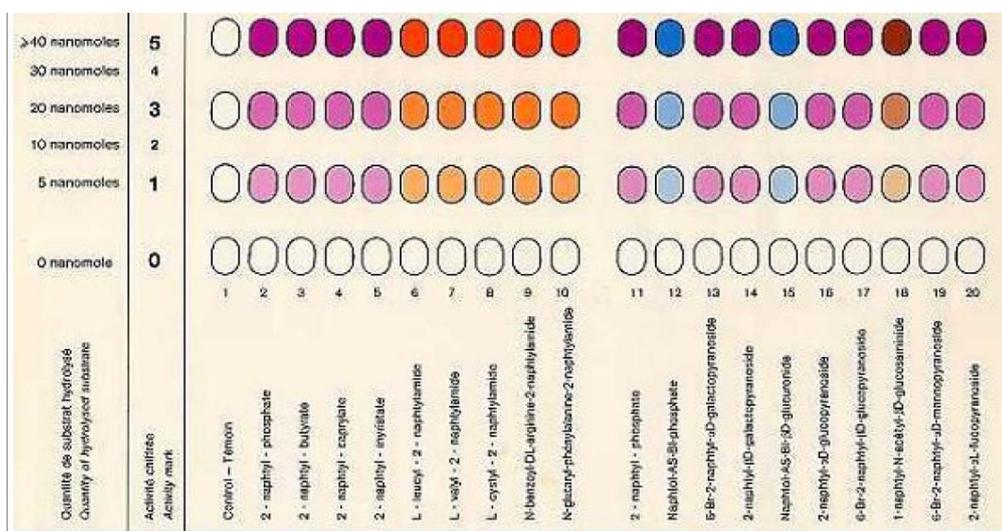


Figura 5. Escala de tonalidades para establecer la AE.

Tabla 3. Enzimas presentes en galerías APY ZYM Biomeriux.

Grupo	Enzima
Fosfatasas	Fosfatasa alcalina Fosfatasa ácida Nafthol-AS-B1-fosfohidrolasa
Lipasas	Estearasa (C4) Esterasa Lipasa (C8) Lipasa (C14)
Proteasas	Leucina arimiladasa Valina arimiladasa Cistina arimiladasa Tripsina α - quimiotripsina
Carbohidratasas	α -galactosidasa β -galactosidasa β -glucoronidasa α -glucosidasa β -glucosidasa N-acetil- β -glucosaminidasa α -manosidasa α -fucosidasa

V. RESULTADOS

V.1 Resultados de la medición de CO₂

En las siguientes tablas se muestran los valores obtenidos de la prueba de biodegradabilidad, toxicidad acuática y terrestre, así como los valores del crecimiento microbiano y actividad enzimática.

Tabla 1. Resultados de la prueba de biodegradabilidad (mg de CO₂)

Tiempo (Días)	Blanco	Celulosa	Polipropileno	Polietileno
0	163.83 ± 0.00	151.34 ± 0.00	148 ± 1.23	136.51 ± 1.23
2	154.33 ± 0.73	188.84 ± 0.73	157.49 ± 1.23	158.67 ± 1.23
4	197.07 ± 1.23	241.07 ± 1.23	200.23 ± 1.23	210.91 ± 1.23
11	197.07 ± 0.73	379.56 ± 1.23	238.22 ± 0.73	201.41 ± 0.73
13	292.04 ± 0.00	403.53 ± 0.00	323.69 ± 0.73	324.87 ± 0.73
16	326.86 ± 1.23	436.84 ± 0.00	355.35 ± 0.73	334.37 ± 0.00
20	319.34 ± 0.00	479.82 ± 0.00	328.84 ± 0.00	298.36 ± 0.73
23	345.06 ± 0.73	502.53 ± 0.73	354.56 ± 0.00	286.09 ± 0.73
25	413.92 ± 0.73	532.97 ± 0.73	423.41 ± 0.00	316.96 ± 0.00
28	473.34 ± 0.00	542.48 ± 0.73	448.65 ± 0.73	466.16 ± 0.00
30	471.31 ± 0.00	538.29 ± 0.00	445.01 ± 0.73	463.6 ± 0.00
32	467.26 ± 0.00	528.8 ± 0.00	440.79 ± 0.73	476.28 ± 0.00
35	445.61 ± 0.00	509.28 ± 0.00	412.66 ± 0.76	458.83 ± 0.00
37	381.65 ± 1.23	472.05 ± 0.73	359.82 ± 1.23	380.98 ± 0.73
39	306.96 ± 0.00	419.61 ± 0.73	255.42 ± 1.23	297.10 ± 1.23
42	220.35 ± 0.0	357.38 ± 0.00	223.66 ± 1.23	186.98 ± 1.23
45	151.54 ± 0.00	302.36 ± 0.00	187.59 ± 1.23	99.82 ± 1.23

V. 2 Resultados de la prueba de seguridad acuática y terrestre.

Tabla 2. Resultados del promedio del número de semillas germinadas de *S. lycopersicum* (jitomate) para la prueba de toxicidad acuática

Condición	Solución (%)	1	5	10	25	50	100
Blanco		9.33 ± 0.58	10.00 ± 0.00	9.66 ± 0.58	8.66 ± 0.58	9.66 ± 0.58	9.66 ± 0.58
Celulosa		9.33 ± 1.15	9.33 ± 0.58	9.33 ± 0.15	10.00 ± 0.00	9.66 ± 0.58	8.66 ± 1.15
Polipropileno		6.55 ± 0.58	8.11 ± 0.58	9.66 ± 0.58	9.00 ± 1.00	9.66 ± 0.58	9.66 ± 0.58
Polietileno		10.00 ± 0.58	9.66 ± 1.15	9.33 ± 1.00	9.00 ± 0.58	9.33 ± 0.58	9.00 ± 1.00

Germinadas en agua con un porcentaje de 96.6% de germinación a los 7 días.

Tabla 3. Resultados del promedio del número de semillas germinadas de *L. sativa* (lechuga) para la prueba de toxicidad acuática

Condición	Solución (%)	1	5	10	25	50	100
Blanco		9.33 ± 0.58	8.66 ± 1.15	9.00 ± 1.00	8.66 ± 1.53	8.33 ± 0.58	8.33 ± 0.58
Celulosa		8.66 ± 1.15	9.00 ± 1.00	8.66 ± 0.58	8.33 ± 1.15	9.33 ± 0.58	8.33 ± 1.53
Polipropileno		8.66 ± 0.58	9.00 ± 1.00	9.00 ± 1.00	7.33 ± 0.58	9.66 ± 0.58	8.33 ± 0.58
Polietileno		9.66 ± 0.58	9.33 ± 0.58	9.33 ± 0.58	8.33 ± 0.58	8.66 ± 0.58	8.33 ± 0.58

Germinadas en agua con un porcentaje de 100% de germinación a los 5 días.

Tabla 4. Resultados del promedio del número de semillas germinadas de *T. patrense* (trébol) para la prueba de toxicidad acuática

Condición	Solución (%)	1	5	10	25	50	100
Blanco		6.66 ± 2.08	5.33 ± 1.53	7.66 ± 1.53	6.33 ± 1.53	9.00 ± 1.15	8.33 ± 1.53
Celulosa		8.33 ± 2.08	6.66 ± 0.58	7.33 ± 2.08	8.33 ± 0.58	6.66 ± 0.58	6.33 ± 1.53
Polipropileno		7.66 ± 0.58	8.33 ± 1.54	7.66 ± 1.54	7.33 ± 1.54	9.33 ± 1.54	7.33 ± 0.58
Polietileno		8.33 ± 0.58	8.00 ± 1.00	8.00 ± 1.00	7.66 ± 0.58	7.33 ± 0.58	8.33 ± 0.58

Germinadas en agua con un porcentaje de 76.6% de germinación a los 7 días.

Tabla 5. Resultados del número de semillas germinadas de jitomate, lechuga, trébol y cebolla, para la prueba de toxicidad terrestre.

		Semillas evaluadas		
Condición	Jitomate	Lechuga	Trébol	Cebolla
Blanco	6.5 ± 1.41	7.5 ± 0.70	6.0 ± 1.41	5.5 ± 0.70
Celulosa	6.5 ± 0.70	7.5 ± 0.70	5.0 ± 0.00	6.5 ± 0.70
Polipropileno	7.0 ± 0.00	7.0 ± 1.41	4.0 ± 1.41	6.5 ± 1.41
Polietileno	7.5 ± 0.70	7.5 ± 0.70	4.0 ± 1.41	7.5 ± 0.70

V.3 Crecimiento microbiano

Tabla 6. Resultados de grupos bacterianos en el blanco, en UFC/mL para cada día monitoreado.

Blanco	Amilolíticos	sacarolíticos	Lipolíticos	Proteolíticos	Celulolíticos
0	1.32×10^7	8.00×10^5	1.90×10^3	6.60×10^5	1.12×10^7
7	6.20×10^6	5.95×10^5	9.00×10^3	2.65×10^5	3.15×10^6
14	8.75×10^6	1.75×10^6	2.20×10^4	5.35×10^5	7.00×10^5
21	1.49×10^6	6.80×10^5	1.00×10^5	4.95×10^4	1.85×10^3
28	1.75×10^3	2.35×10^6	1.12×10^6	1.50×10^3	2.00×10^4
35	5.65×10^5	7.20×10^4	1.50×10^3	2.65×10^3	1.75×10^3
45	1.16×10^6	5.40×10^4	4.95×10^2	2.00×10^3	4.50×10^2

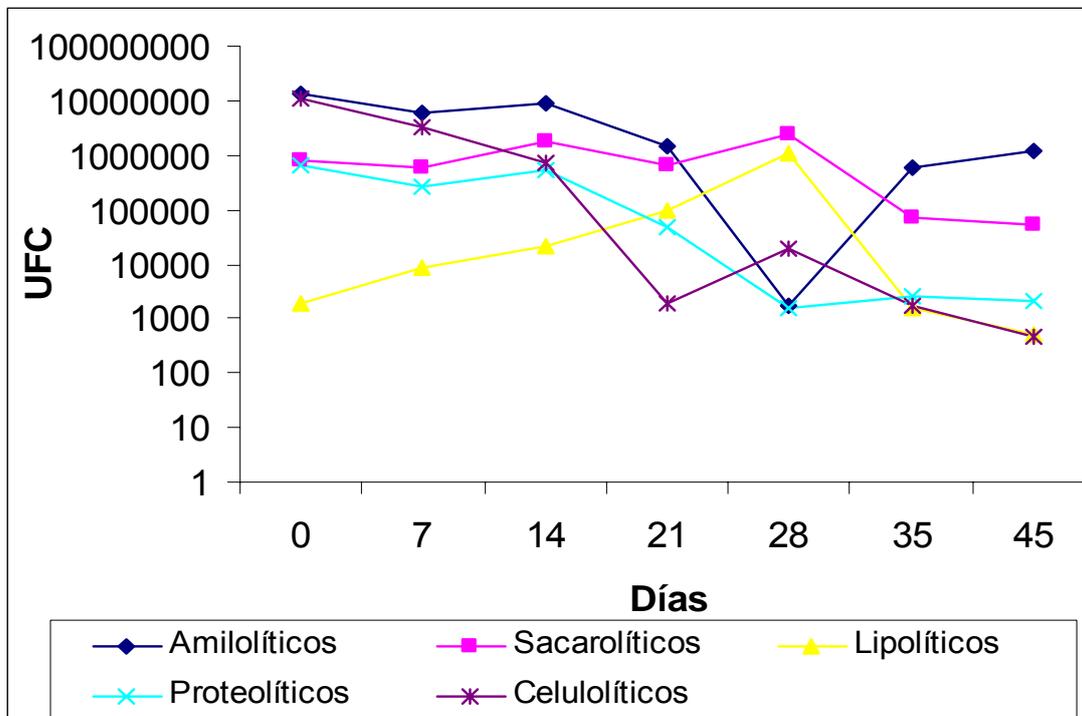


Figura 1. Curva crecimiento microbiano blanco en UFC/mL

Tabla 7. Resultados de grupos bacterianos en la composta con celulosa (control positivo), en UFC/mL para cada día monitoreado.

Celulosa	Amilolíticos	Sacarolíticos	Lipolíticos	Proteolíticos	Celulolíticos
0	8.25×10^6	6.35×10^6	4.30×10^3	1.18×10^6	4.35×10^6
7	2.90×10^6	4.00×10^6	9.50×10^3	4.85×10^5	1.75×10^6
14	1.20×10^6	3.60×10^4	5300×10^6	3.35×10^6	4.70×10^5
21	1.35×10^7	3.45×10^6	5.50×10^5	1.75×10^5	1.35×10^5
28	1.50×10^4	3.80×10^4	1.90×10^4	1.50×10^4	5.00×10^4
35	3.85×10^6	7.85×10^4	3.35×10^3	2.85×10^3	1.50×10^3
45	7.10×10^6	3.00×10^4	1.50×10^3	1.65×10^3	3.00×10^2

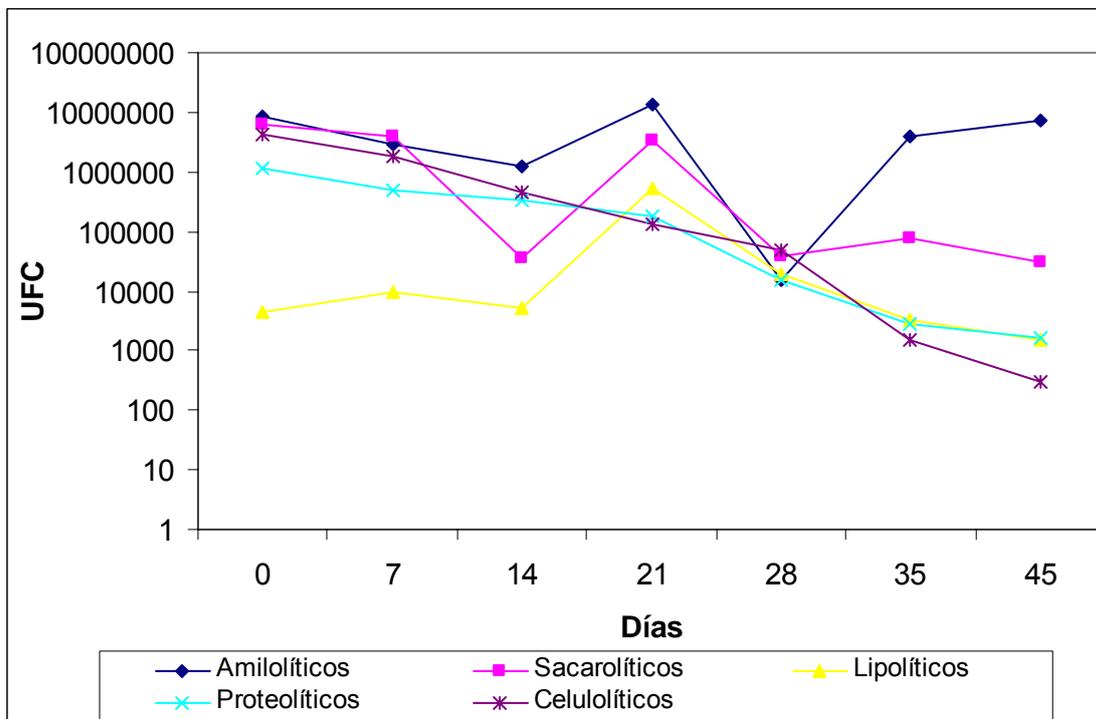


Figura 2. Curva crecimiento microbiano celulosa en UFC/mL

Tabla 8. Resultados de grupos bacterianos en la composta con polipropileno, en UFC/mL para cada día monitoreado.

Polipropileno	Amilolíticos	Sacarolíticos	Lipolíticos	Proteolíticos	Celulolíticos
0	3.35×10^5	1.36×10^5	8.40×10^3	1.49×10^6	9.85×10^4
7	9.90×10^5	2.15×10^5	2.50×10^4	8.85×10^4	3.80×10^5
14	2.80×10^6	7.35×10^5	2.80×10^6	5.05×10^5	4.20×10^6
21	1.35×10^6	4.20×10^6	1.40×10^7	1.14×10^5	1.25×10^6
28	5.70×10^3	1.70×10^5	1.39×10^4	4.30×10^4	3.40×10^3
35	1.10×10^6	3.60×10^5	3.85×10^4	1.25×10^4	1.65×10^3
45	9.00×10^5	2.00×10^4	2.00×10^3	1.05×10^4	1.38×10^3

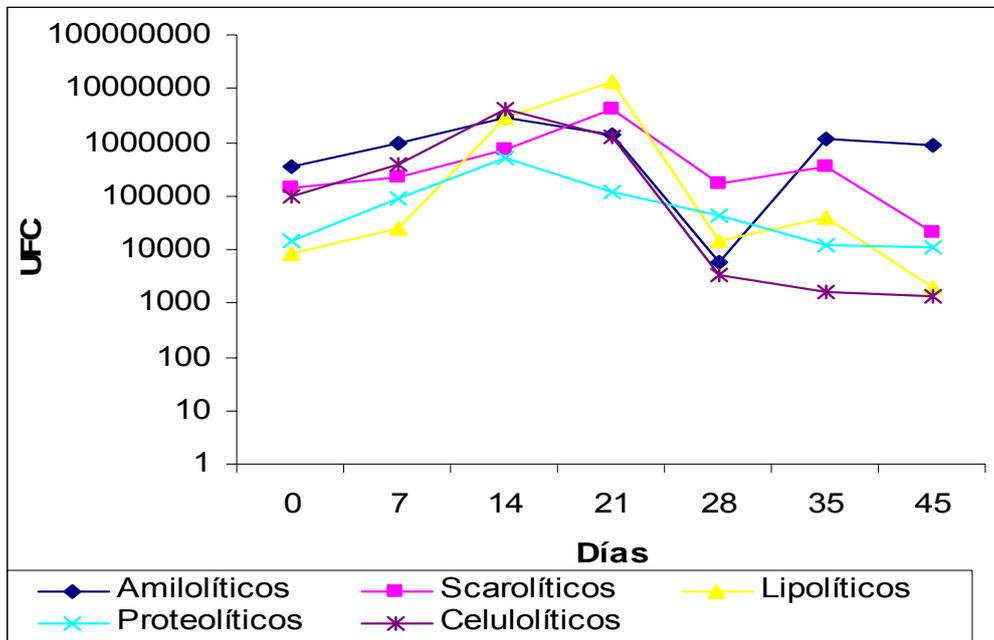


Figura 3. Curva crecimiento microbiano polipropileno en UFC/mL

Tabla 9. Resultados de grupos bacterianos en composta con polietileno, en UFC/mL para cada día monitoreado.

	Amilolíticos	Sacarolíticos	Lipolíticos	Proteolíticos	Celulolíticos
0	1.33×10^7	3.90×10^6	3.00×10^3	1.33×10^5	2.25×10^6
7	5.15×10^6	2.20×10^6	4.35×10^3	4.70×10^5	1.80×10^6
14	1.07×10^7	1.20×10^6	8.65×10^3	9.45×10^5	9.50×10^5
21	1.50×10^6	4.00×10^4	1.55×10^4	1.00×10^5	1.50×10^5
28	1.55×10^3	8.50×10^4	7.15×10^3	1.55×10^4	3.00×10^5
35	9.05×10^5	1.00×10^5	1.55×10^4	7.00×10^2	1.65×10^3
45	9.00×10^5	3.25×10^5	1.80×10^3	8.25×10^3	1.50×10^3

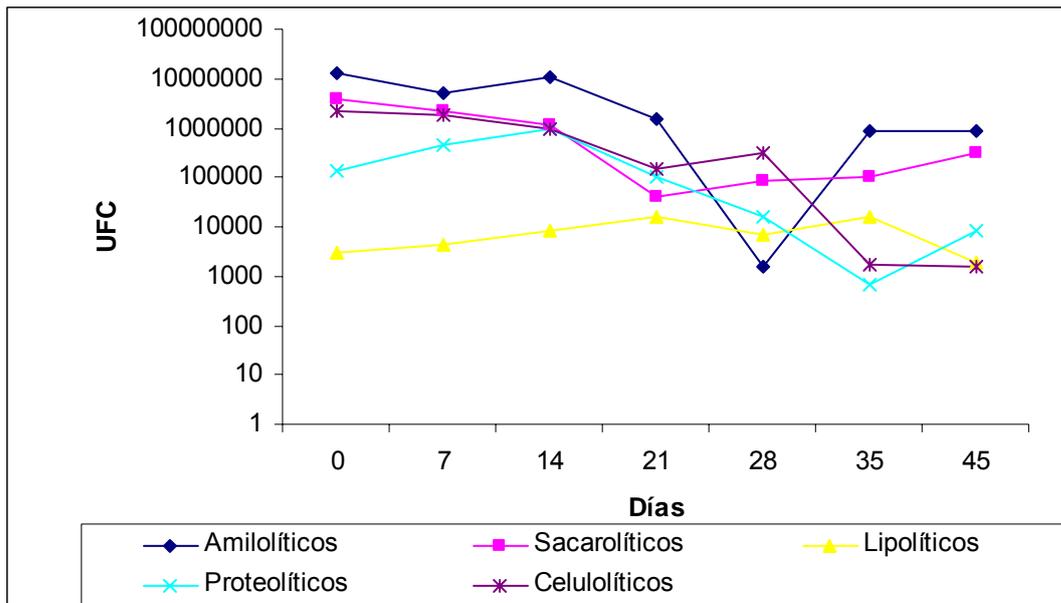


Figura 4. Curva crecimiento polietileno en UFC/mL

V. 4 Resultados de la medición de la actividad enzimática en la prueba de biodegradabilidad aerobia para plásticos.

Tabla 10. Resultados de la AE para el blanco durante la prueba de biodegradabilidad.

Grupo de enzimas	Enzimas evaluadas	0	9	18	27	36	45	AE Total
	Fosfatasa alcalina	5	5	5	5	5	5	25
Fosfatasas	Fosfatasa ácida	5	4	5	3	1	5	18
	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	5	4	5	5	3	5	22
	Estereasa (C4)	3	3	1	5	5	3	17
Lipasas	Estereasa Lipasa (C8)	3	3	3	5	4	5	20
	Lipasa (C14)	2	1	4	1	1	4	11
	Leucina arilamidasa	2	2	3	3	3	3	14
	Valina arilamidasa	1	1	1	3	3	1	9
Proteasas	Cistina arilamidasa	1	1	1	4	1	0	7
	Tripsina	2	3	5	1	1	1	11
	α -quimiotripsina	3	3	1	1	0.5	1	6.5
	α -galactosidasa	0	0	1	1	0.5	1	3.5
	β -galactosidasa	1	1	1	1	1	0	4
	β -glucuronidasa	0	0	0	0	0	0	0
Carbohidratasas	α -glucosidasa	1	1	3	1	0.5	0	5.5
	β -glucosidasa	3	3	3	2	0.5	0	8.5
	N-acetil- β -glucosaminidasa	5	5	3	1	2	3	14
	α -mannosidasa	1	1	1	1	0.5	0	3.5
	α -fucosidasa	3	3	1	1	0.5	3	8.5

Tabla 11. Resultados de la AE para celulosa durante la prueba de biodegradabilidad

					Días			AE Total
Grupo de enzimas	Enzimas evaluadas	0	9	18	27	36	45	
	Fosfatasa alcalina	5	5	5	4	5	5	29
Fosfatasas	Fosfatasa ácida	5	5	3	1	5	3	22
	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	5	5	5	5	4	5	29
	Estereasa (C4)	3	3	3	4	3	4	20
	Estereasa Lipasa (C8)	4	4	5	5	5	5	28
	Lipasa (C14)	3	3	3	4	3	3	19
	Leucina arilamidasa	5	5	4	5	3	3	25
	Valina arilamidasa	3	3	3	5	2	3	19
Proteasas	Cistina arilamidasa	3	3	3	3	1	1	14
	Tripsina	3	3	1	1	1	1	10
	α -quimiotripsina	3	3	1	1	1	1	10
	α -galactosidasa	3	3	3	1	0.5	0	10.5
	β -galactosidasa	0.5	1	3	1	0.5	0	6
	β -glucuronidasa	0	0	0	0	0	0	0
Carbohidratasas	α -glucosidasa	0	0	1	3	0.5	0	4.5
	β -glucosidasa	0	0	5	2	0.5	0	7.5
	N-acetil- β -glucosaminidasa	3	4	1	3	3	0	14
	α -mannosidasa	1	1	1	1	0.5	0	4.5
	α -fucosidasa	1	1	1	0	0.5	0	3.5

Tabla 12. Resultados de la AE para el polipropileno durante la prueba de biodegradabilidad

					Días			AE Total
Grupo de enzimas	Enzimas evaluadas	0	9	18	27	36	45	
	Fosfatasa alcalina	5	5	5	0	5	4	19
Fosfatasas	Fosfatasa ácida	3	5	3	0	5	3	16
	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	3	4	5	4	5	3	21
	Estereasa (C4)	1	3	3	2	4	4.5	16.5
Lipasas	Estereasa Lipasa (C8)	0	3	5	4	5	5	22
	Lipasa (C14)	3	1	1	3	1.5	4	11.5
	Leucina arilamidasa	2.5	0	3	3	5	4	15
	Valina arilamidasa	0.5	3	2	2	3	3	13
Proteasas	Cistina arilamidasa	1	3	2	5	2	5	17
	Tripsina	5	1	2	2	1	1	7
	α -quimiotripsina	5	1	2	2	1	1	7
	α -galactosidasa	1	1	3	1	1	1	7
	β -galactosidasa	1	1	3	1	1	1	7
	β -glucuronidasa	0	0	0	0	0	0	0
	α -glucosidasa	1	1	1	1	1	2	6
	β -glucosidasa	3	3	3	2	2	2	12
	N-acetil- β -glucosaminidasa	1	1	5	1	1	4	12
Carbohidratasas	α -mannosidasa	3	3	1	1	1	1	7
	α -fucosidasa	3	3	1	1	1	1	7

Tabla 13. Resultados de la AE para el polietileno durante la prueba de biodegradabilidad

Grupo de enzimas	Enzimas evaluadas	Días						AE Total
		0	9	18	27	36	45	
Fosfatasas	Fosfatasa alcalina	0.5	1	5	1	2	2	11.5
	Fosfatasa ácida	3	3	5	0	3	4	18
	Naftol-AS-BI-fosfohidrolasa	0	0	5	5	4	4	18
Lipasas	Estereasa (C4)	3	3	3	3	3	3	18
	Estereasa Lipasa (C8)	2	3	5	5	4	4	23
	Lipasa (C14)	3	3	3	1	1	3	14
Proteasas	Leucina arilamidasa	3	3	5	2	3	3	19
	Valina arilamidasa	3	3	4	4	3	2	19
	Cistina arilamidasa	3	3	3	5	2	2	18
	Tripsina	3	3	3	1	2	1	13
	α -quimiotripsina	4.5	4	3	1	2	1	15.5
Carbohidratasas	α -galactosidasa	1	1	3	1	1	0	7
	β -galactosidasa	4	3	1	1	1	0	10
	β -glucuronidasa	0	0	0	0	0	0	0
	α -glucosidasa	2	3	4	1	0	0	10
	β -glucosidasa	3	3	3	5	1	0	15
	N-acetil- β -glucosaminidasa	3	3	3	1	1	0	11
	α -mannosidasa	3	3	3	1	0	0	10
	α -fucosidasa	3	3	3	2	0	0	11

VI. ANÁLISIS Y DISCUSIÓN DE RESULTADOS

VI. 1 Caracterización fisicoquímica de composta y materiales plásticos

Los resultados de los parámetros fisicoquímicos del inóculo, de la composta madura, y los plásticos evaluados (polietileno y polipropileno) se muestran en la tabla 19. Como se puede observar en dicha tabla, al término del proceso de compostaje, los valores obtenidos no se encontraron dentro de los óptimos de acuerdo a la ASTM D5338; por lo cual se procedió a madurarla en columnas de PVC, para que quedara en condiciones requeridas por el procedimiento como se muestra en la tabla 3.

Para el caso de los plásticos que fueron evaluados se observó que en ambos casos se presentó un porcentaje de 100% de sólidos totales; por lo cual no presenta humedad. Para el caso del polipropileno; del total de sólidos el 100% son sólidos volátiles y para el polietileno contiene 99% de sólidos volátiles.

Tabla 1. Parámetros fisicoquímicos de inóculo, composta madura, polietileno y polipropileno.

Parámetro	Composta (Inóculo)	Composta madura	Polipropileno	Polietileno
Tamaño	<10 mm	>10 mm	> 2 cm	0.5 mm
% SV	21	20	100	99
% ST	46	45	100	100
% Cenizas	25	25	0	0
% Humedad	54	55	0	0
pH	7.36	7.36	ND	ND

Parámetro medidos, para tener un óptimo proceso de compostaje de acuerdo a el procedimiento ASTM D5338.

ND= No Determinado

También se observó que durante el proceso de compostaje el tamaño de partícula va modificándose, la diferencia esta al final del proceso y después de

madurarla, ya que va siendo más pequeña como se puede observar en la figura 15 A y B respectivamente. Gracias a la actividad de los microorganismos, responsables de la descomposición de la materia orgánica producen una mezcla estable y homogénea (Rynk et al., 1992; Borken et al., 2002), que se utiliza como parámetro para indicar madurez (Tiquia, 2005).

Aunque el tamaño va disminuyendo con el paso del tiempo, se procedió a tamizarla debido a que se observó que había partículas mayores a los 10 mm como las de la figura 15C, lo cual podrían modificar el proceso de aireación durante la prueba para obtener una composta con los parámetros fisicoquímicos adecuados, así como el tamaño de partícula como se muestra en la figura 15 D.

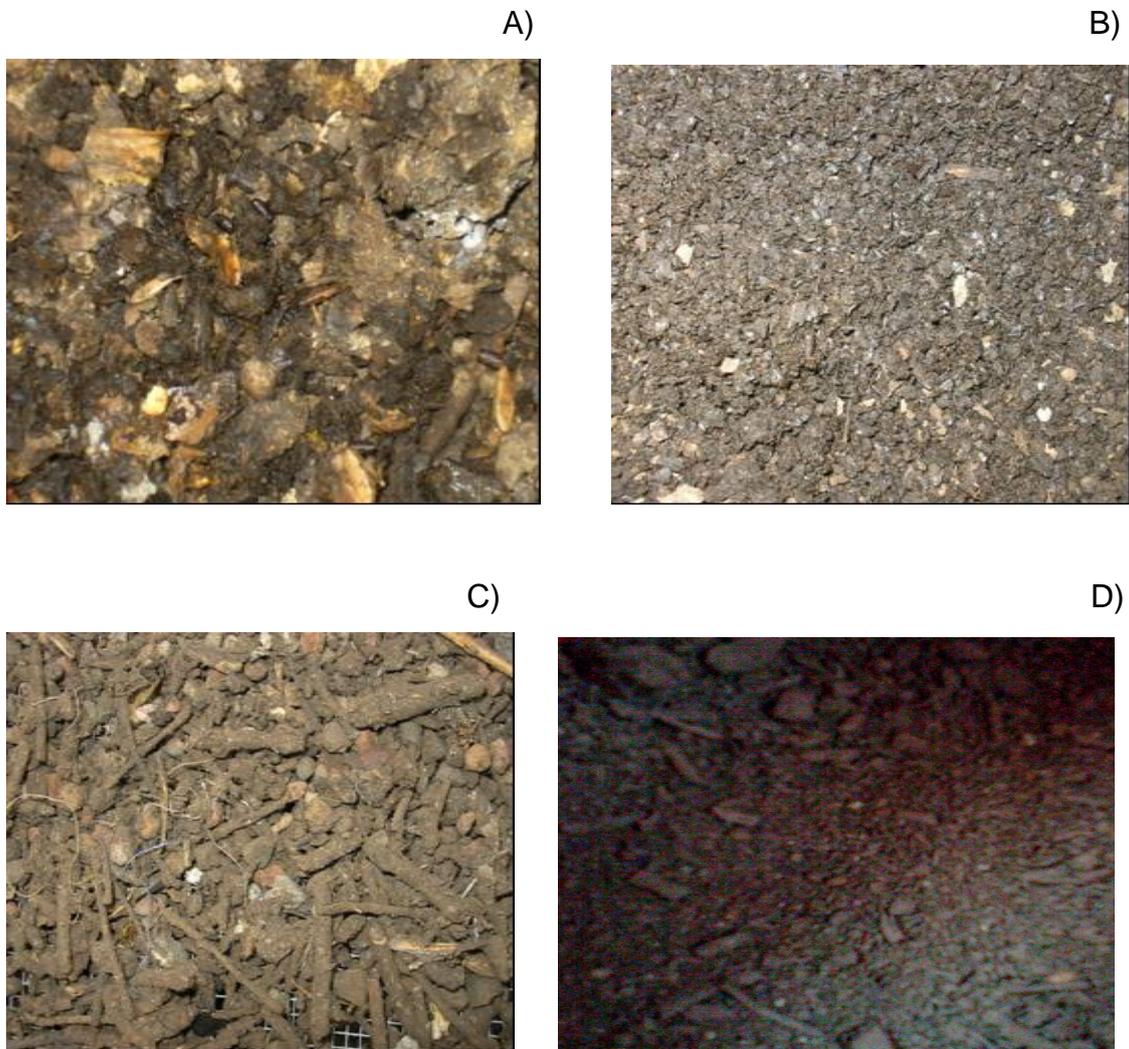


Figura 1. A) Composta antes de madurar, B) Composta después de madurar, C) Restos de composta tamizada en el proceso y D) Composta utilizada en el proceso.

La composta al final de la prueba de biodegradabilidad, presentó cambios en los parámetros fisicoquímicos como se puede apreciar en la tabla 20, donde se comparan los valores fisicoquímicos finales con respecto a los valores iniciales (tabla 19). Dentro de los parámetros de sólidos volátiles (SV) se puede observar que hubo una disminución, indicando que parte de la materia orgánica ha sido transformada a dióxido de carbono (CO₂) y la presencia de una disminución para el blanco indican que los plásticos no presentan un efecto negativo en el proceso de composteo (Sarasa, 2008). En los sólidos totales se observó un aumento, aunque parte de la materia orgánica se transformó y volatilizó; dentro del proceso de transformación de la materia orgánica, esta se pudo haber convertido en otros compuestos o aumento de biomasa; lo cual corresponde con lo observado en el aumento de los valores de cenizas. El contenido de humedad presentó una disminución, que de acuerdo a lo reportado este puede caer del 20 al 56% al final del proceso (Ghorpade et al., 2001).

Tabla 2. Parámetros fisicoquímicos de las compostas al final de la prueba de biodegradabilidad.

Parámetro	Blanco	Celulosa	Polipropileno	Polietileno
% SV	16	19	32	34
% ST	56	65	44	47
% Cenizas	40	56	12	13
% Humedad	44	35	56	53
pH	7.8	7.75	7.87	7.92

VI. 2 Compostabilidad del polipropileno y polietileno.

Para que un plástico pueda considerarse compostable debe de presentar tres parámetros desintegración, biodegradación y pasar la prueba de seguridad acuática y terrestre, como se muestra en la figura 16.

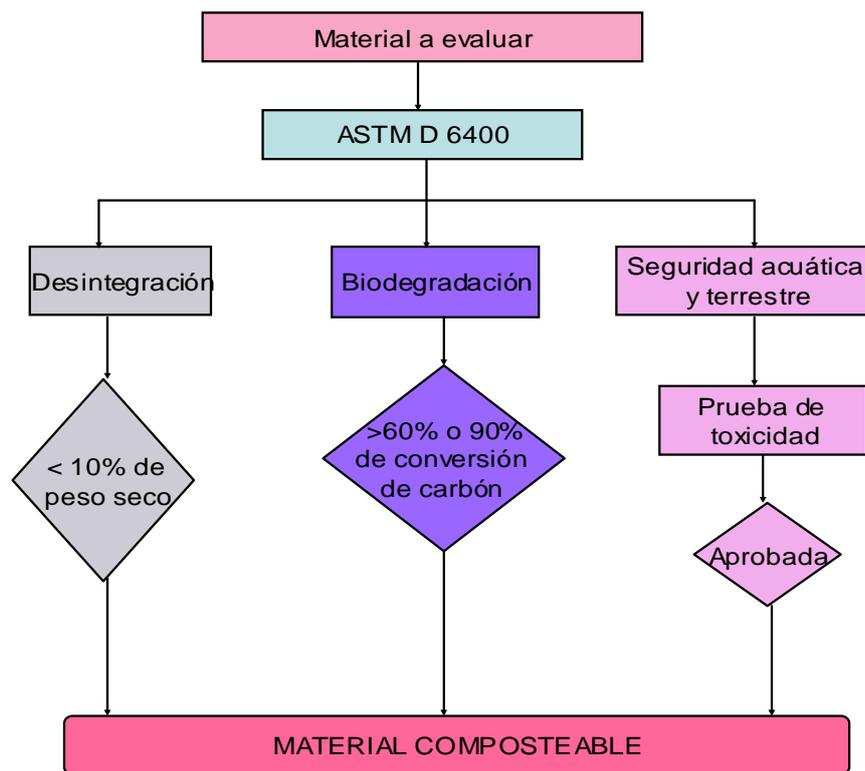


Figura 2. Método para la evaluación de la compostabilidad de materiales plásticos.

VI. 2.1 Prueba de biodegradabilidad del polipropileno y polietileno.

Uno de los parámetros para determinar si un plástico es biodegradable es por medio de la medición de los productos finales; de acuerdo al procedimiento internacional de regulación de evaluación de biodegradabilidad aerobia de plásticos ASTM D 5338 se determinó la producción de bióxido de carbono (CO₂) por un periodo de 45 días. Como se puede observar en la figura 17, la producción de bióxido de carbono (CO₂) se fue incrementando conforme fue pasando el día de la composta; lo cual nos indica que la materia orgánica estaba siendo degradada. Entre el día 25 y 35, se observan que hay una mayor producción de bióxido de carbono y los grupos de microbianos con mayor presencia para ese momento son los grupos microbianos sacarolíticos y lipolíticos en el blanco (figura 19), celulolíticos en la composta con celulosa (figura 20), sacarolíticos y proteolíticos en la composta con polipropileno (figura

21); y celulolíticos en el polietileno (figura 22). También se observa que después del día 35 la producción de CO₂ fue disminuyendo el día 45.

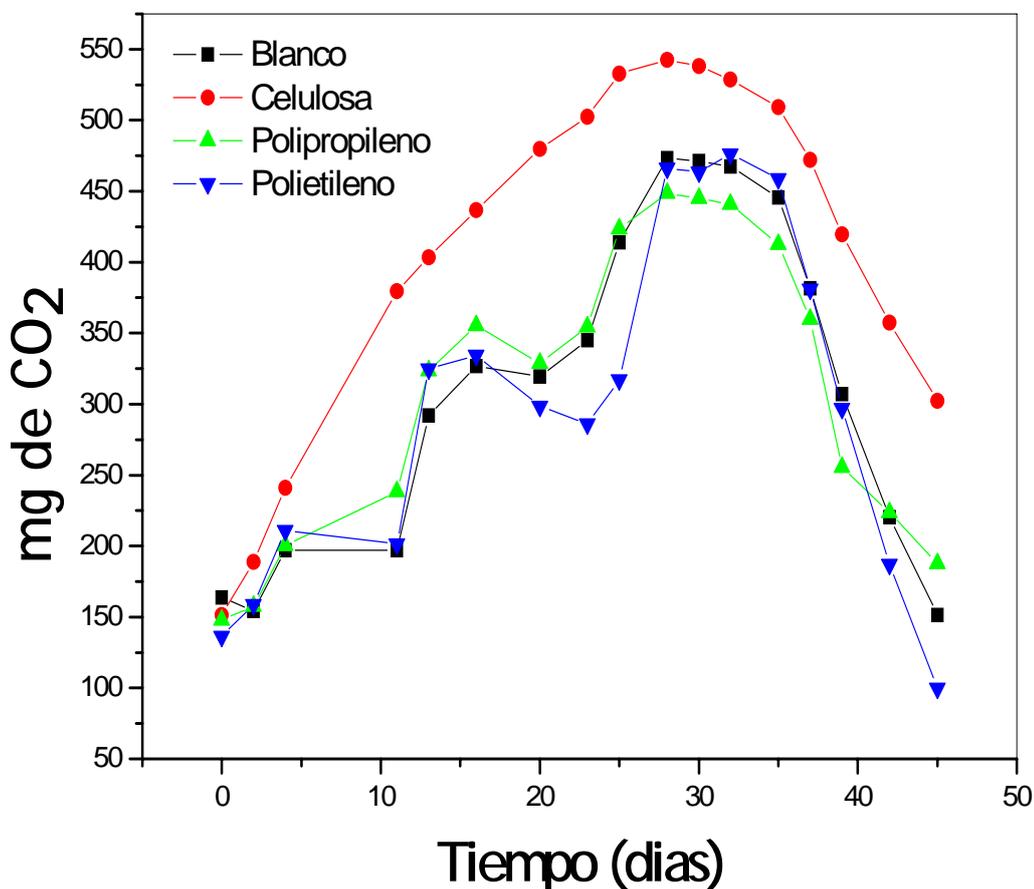


Figura 3. Producción de CO₂ en la prueba de biodegradabilidad de los materiales evaluados.

Respecto a la producción acumulativa de CO₂ tanto para el blanco, celulosa, polipropileno y polietileno es presentado en la figura 18, el área bajo la curva refleja la producción total de dióxido de carbono, donde se observa que para el polipropileno (figura 18 C) al inicio presenta una producción de 148 mg de CO₂, y para el día 28 presenta el valor más alto siendo de 448.65 mg de CO₂, y al final llega a una producción de 187.59; en el caso de la duración de la fase con mayor producción de CO₂ dura 10 días. Para el polietileno (figura 18 C) al inicio presenta una producción de 136.51 mg de CO₂, y para el día 32 presenta el valor más alto siendo de 466.16 mg de CO₂, y al final llega a una producción

de 99.82; la fase con mayor producción de CO_2 dura 8 días, también se puede observar que la producción de CO_2 en general es como la del blanco, aunque entre el día 20 y 23 presenta una ligera disminución, que va a ser reflejada en la producción total de CO_2 . Comparado con la composta con celulosa, en la figura 14 B, se puede observa que la producción de CO_2 en general es constante tanto en el momento en que va aumentando, llega el momento con mayor producción durando 12 días, hasta el decaimiento de este. Estas variaciones en las fases de mayor producción de CO_2 pueden estar asociadas a la actividad microbiana, por la interacción del material que presenta una composición química diferente (Tiquia, 2002).

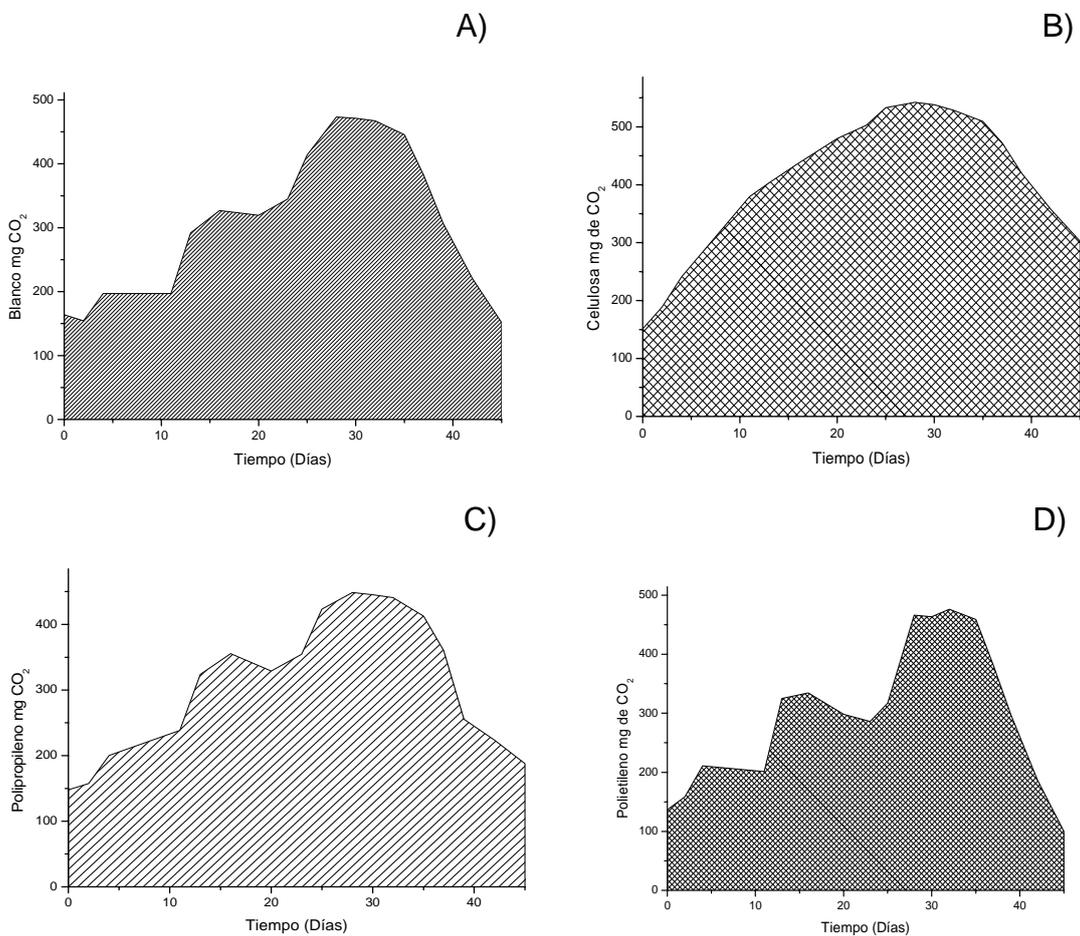


Figura 4. Producción acumulativa de CO_2 para A) blanco, B) composta con celulosa, C) composta con polipropileno y D) composta con polietileno.

Para obtener el porcentaje de biodegradabilidad de las muestras, es necesario saber la producción total de CO₂, durante toda la prueba. Para el blanco se obtuvieron 13.96 g de CO₂, la composta con celulosa 18.68 g de CO₂, la composta con polipropileno tuvo una producción de 14.04 g de CO₂ y la composta con polietileno presentó una producción de 13.48 g CO₂.

De acuerdo a los resultados encontrados para el polipropileno se obtuvo una degradación de 0.428%; de acuerdo a la ASTM D5338; dicho valor obtenido no cumple con lo mínimo para ser considerado como un material biodegradable; y el polietileno no presenta degradación.

Si analizamos las condiciones a las cuales se llevó el proceso de compostaje de acuerdo a lo reportado por Kale y colaboradores (2007) para que se pueda obtener una buena tasa de biodegradabilidad se han considerado los siguientes factores esenciales como son: las condiciones de exposición que están dadas por una adecuada humedad ya que de esto dependerá un adecuado crecimiento de microorganismos, actividad microbiana, así como la disponibilidad de sitios de ataque para los microorganismos. Para este estudio, se mantuvo una humedad de 50- 55% que corresponde a lo especificado en el procedimiento ASTM D5338; y si se observan los valores de crecimiento microbiano que se encuentran entre 10⁴ y 10⁵, están en total concordancia con los valores de buena actividad microbiana (Vaz Moreira et al., 2007); en base a esto podemos decir que la humedad no fue un obstáculo para poder presentarse una mayor tasa de degradabilidad.

Otro de los factores es la temperatura, ya que si la temperatura aumenta la actividad microbiana aumenta, por lo cual se tuvo cuidado de que no aumentara la temperatura demasiado porque se puede detener el proceso; el parámetro de la temperatura fue una variable que fue controlada manteniéndose en 30°C; ya que se considero que permaneciendo la composta en una fase mesofílica se presentaría una mayor abundancia y diversidad de microorganismos como lo reportan Massiani y Domeizel (1994) lo cual podría tener una mayor acción sobre el plástico.

En cuanto a la disponibilidad de oxígeno que permite una oxidación enzimática, se consideró que hubo una buena aireación, como se puede observar en los resultados de actividad enzimática, donde los valores en promedio son de entre 3 y 5, lo cual es una buena actividad enzimática de acuerdo a lo reportado por Tiquia (2002).

Se considera que el problema con la biodegradabilidad de los plásticos está dado por su composición, se ha reportado que para una biodegradabilidad de un polímero se debe considerar la flexibilidad, la cual está dada por la composición de moléculas y enlaces que permitirán la accesibilidad del agua a la molécula para ser degradada: Otro factor a considerar en la biodegradabilidad es el peso molecular, puesto que a menor peso es más fácil que una molécula pueda ser tomada por los microorganismos y convertirla en metabolitos. Así mismo, se ha reportado que polímeros de vinil, como el polietileno, polipropileno y policloruro de vinilo, con uniones de un solo carbono, normalmente no son susceptibles a hidrólisis o biodegradación (Kale et al., 2007).

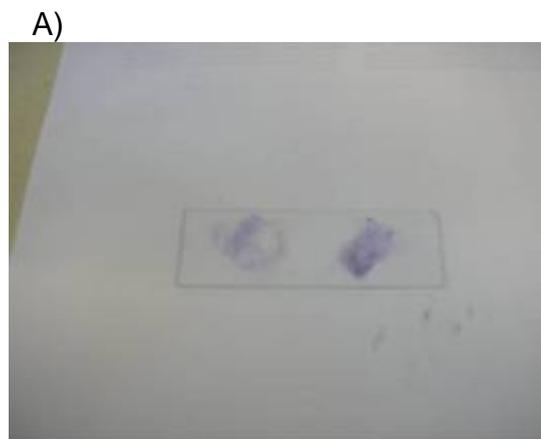
Aunque el propileno isotáctico se reportó que presenta biodegradación en un tiempo de cinco meses por un consorcio microbiano (Cacciari et al., 1993) y para el polietileno se encontró que puede ser degradado por microorganismos que degradan lignina como *Phanerochaete chrysosporium* (Shimao, 2001).

VI.2.2 Evaluación de la desintegración. Descripción cualitativa del material

Durante el proceso de composteo no se observó cambios de coloración en la composta, crecimiento de hongos que indicaran visualmente un mal proceso de composteo.

Desintegración: Después de haber terminado el proceso de composteo, se decidió separar el plástico, en el cual se observa que no hubo cambio significativo en su apariencia visual lo que indica que el plástico propileno y polietileno no sufrieron un proceso de desintegración y que de acuerdo a el procedimiento ASTM D 6400, para que un material pueda considerarse que se desintegró, debe no ser visible en la composta.

El material retirado de la composta fue analizado al microscopio por medio de una tinción de Gram (+/-), en la cual se observaron presencia de bacterias como se presenta en la figura 19C. Para corroborar que las bacterias no estaban presentes en el plástico antes del tratamiento, se realizó la tinción a un trozo de polipropileno que no estuvo expuesto a la composta y se observó que el plástico repelía los colorantes y al observarlo al microscopio no hay presencia de microorganismos como se muestra en la figura 19 B. Lo cual es indicio de una adhesión celular. En la figura 19 se observa los plásticos después de la tinción de Gram, en la figura 19 B) visto al microscopio sin tratamiento y la figura 19 C) con tratamiento observando la presencia de bacterias.



B)



C)

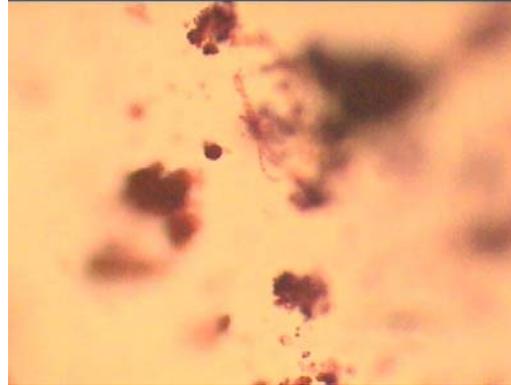


Figura 5. Trozo de polipropileno, A) Con tratamiento y sin tratamiento, B) Polipropileno al microscopio 100X sin tratamiento y C) Polipropileno al microscopio al 100X con tratamiento.

Para el caso del polietileno, se observó un cambio en la coloración en el momento de observar el granulo de polietileno con y sin tratamiento al microscopio estereoscópico. En la figura 20 se puede observar este cambio, el gránulo de polietileno en la parte izquierda es el que no tiene tratamiento y el derecho es el que tiene tratamiento. Siendo esto posible por la interacción del plástico con la composta y los ligeros cambios de pH, que pudieron haber afectado la coloración.

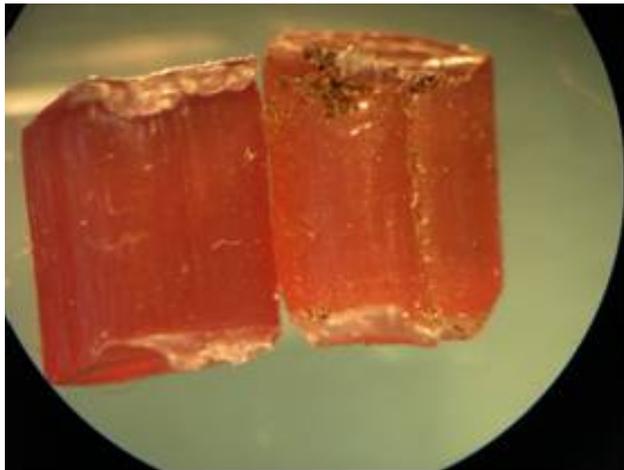


Figura 6. Polietileno visto al microscopio estereoscópico sin y con tratamiento.

VI.2.3 Seguridad acuática y terrestre

VI.2.3.1 Prueba de toxicidad acuática

Otro parámetro a evaluar es la toxicidad de la composta al final del proceso que de acuerdo al procedimiento ASTM D 6400, no debe de presentar toxicidad para ser considerado material composteable. Con la finalidad de evaluar el efecto tóxico se evaluó la germinación de diferentes semillas. Se realizaron las diluciones correspondientes (1, 5, 25, 50 y 100%) de la suspensión elaborada con composta, germinando las semillas. Para determinar la concentración letal media (CL50), se elaboraron gráficas con las diferentes concentraciones y el porcentaje de germinación de semillas.

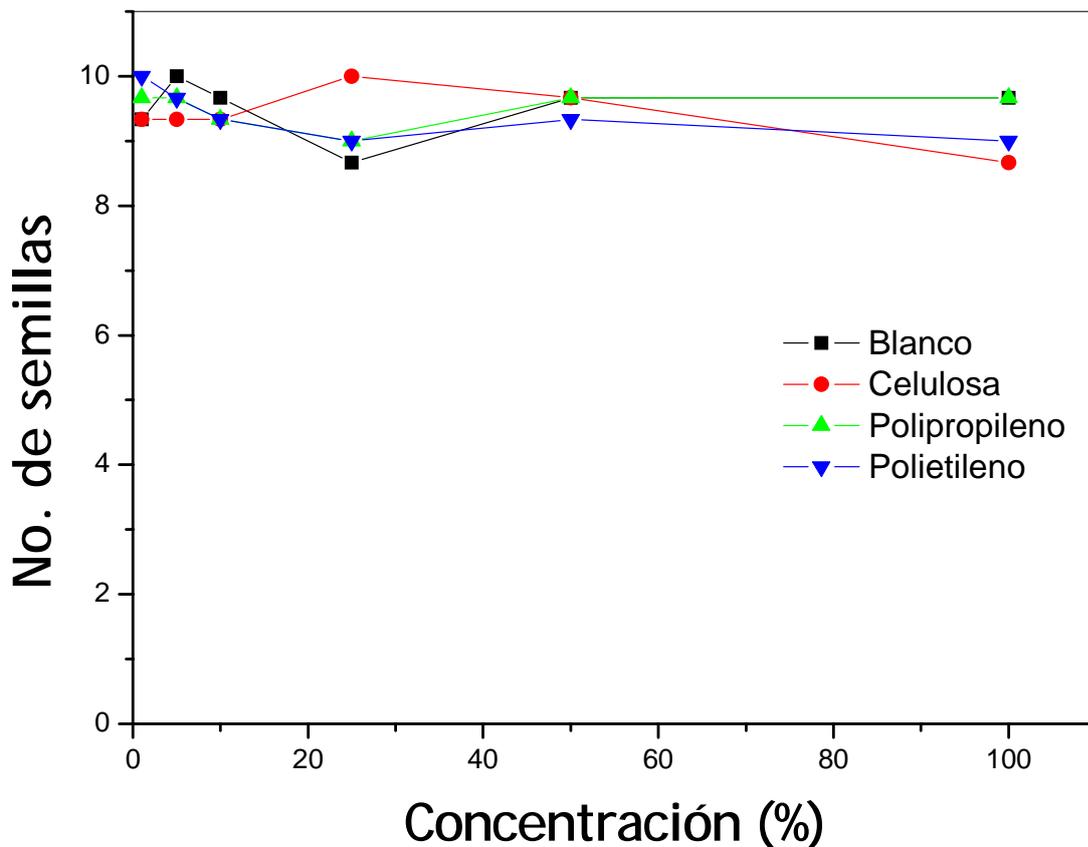


Figura 7. Germinación de semillas de *S. lycopersicum* en diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50, 100%), para blanco, celulosa, polipropileno y polietileno.

La prueba de seguridad acuática de la composta con semillas de *S. lycopersicum* (jitomate), se presenta en la figura 22; donde se observa que a una concentración del 1% el promedio porcentual de germinación se encuentra en 96.66. En la concentración al 5% el promedio porcentual de germinación fue de 96.66; respecto a la concentración del 10% el promedio porcentual de germinación fue de 93.33 y en la concentración al 25% el promedio porcentual de germinación fue de 90; de acuerdo a estos datos se puede observar que hay un ligero decaimiento de la germinación a una concentración del 50%, donde el promedio porcentual de germinación fue de 93.33 y para el 100% se obtuvo 90 . En general se puede decir que la germinación no varía, y que presenta un índice de germinación mayor al 90%, que de acuerdo a OECD 208, no presenta una concentración letal media; es decir no es tóxico para las semillas de *S. lycopersicum*.

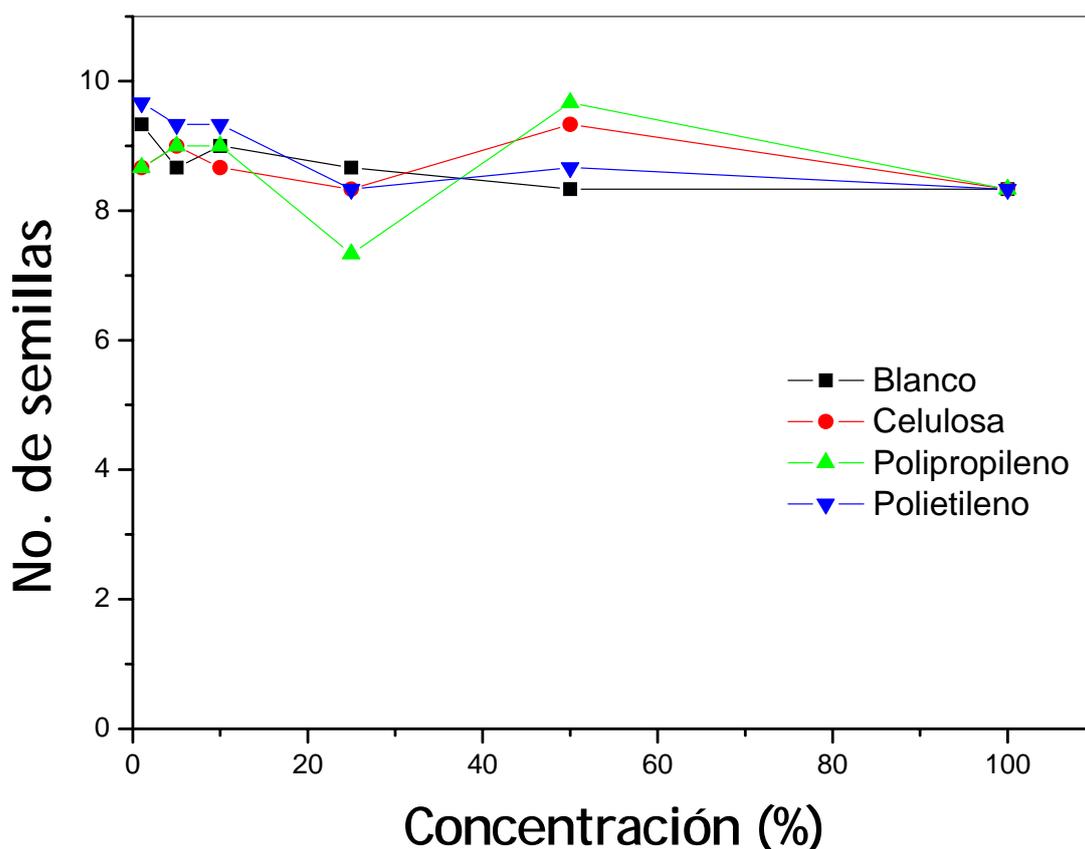


Figura 8. Germinación de semillas de *L. sativa* en diferentes concentraciones de extracto de composta diluido con agua (5, 10, 25,50 100%), para blanco, celulosa, polipropileno y polietileno.

La prueba de seguridad acuática para semillas de *L. sativa* (lechuga) tanto para el blanco, celulosa, propileno y polietileno es presentado en la figura 23; donde se observa que a una concentración del 1% el promedio de la germinación se encuentra en 90; la concentración al 5% y 10% el promedio de germinación para ambos casos fue de 90; respecto a la concentración del 25% el promedio porcentual de germinación fue de 81.6. Como se observa en esta gráfica, el propileno presentó el menor porcentaje de germinación con un valor del 73.33% a una concentración del 50% con respecto al promedio porcentual de germinación que fue de 90 y para el 100% se obtuvo 83.33%. Como se observa en la figura 18, la germinación de las semillas de *L. sativa* presentó cambios a las diferentes concentraciones; observándose un descenso en la germinación de semillas conforme aumentaba la concentración del sobrenadante; aunque no se puede decir que presenta una toxicidad debido a que ha sido reportado como material no tóxico (Propilven, 2009), ni presenta reacción ante el agua, suelo o aire; y que de acuerdo a OECD 208, tampoco presenta una concentración letal media, ya que el índice de germinación está por arriba del 50%.

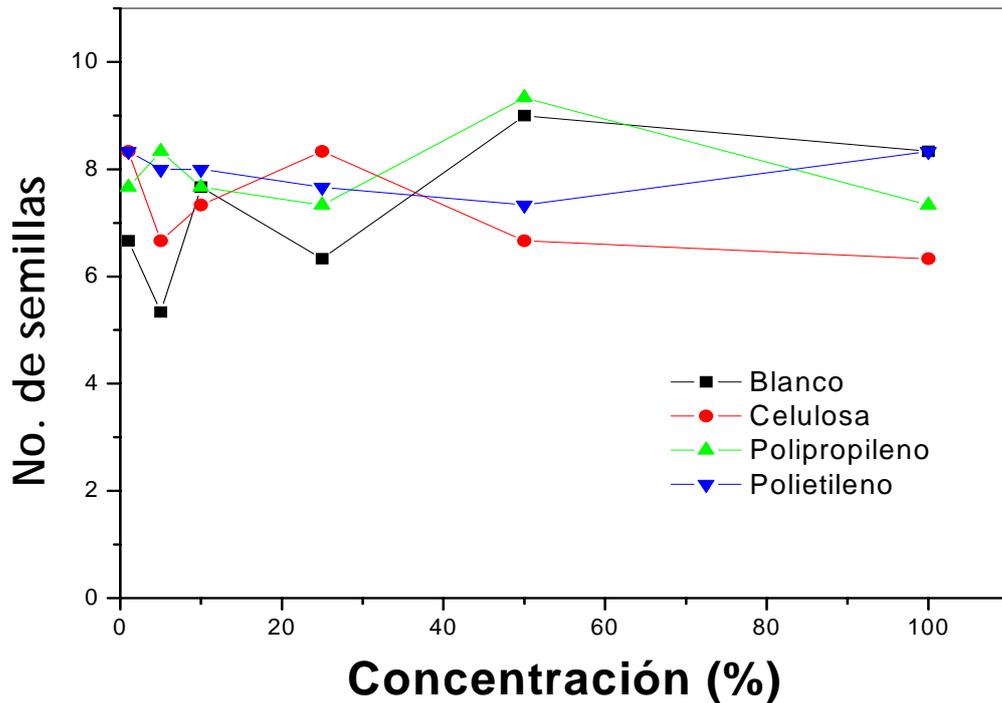


Figura 9. Germinación de semillas de *T. pratense* en diferentes concentraciones (5, 10, 25, 50 100%), para blanco, celulosa, polipropileno y polietileno.

Respecto a la prueba de seguridad acuática para semillas de *T. pratense*, se observa en la figura 24 que para la concentración al 1% el promedio de germinación esta alrededor del 77.50 ; para la concentración al 5% el promedio de germinación fue de 70.83 ; para la concentración al 10% el promedio de germinación fue de 76.66 ; así mismo para la concentración al 25% el promedio porcentual de germinación fue de 74.16; para la concentración al 50% el promedio porcentual de germinación fue de 80.83 y para el 100% se obtuvo 75.83. La germinación de semillas para el *T. pratense* se encuentra por arriba del 50%, lo cual nos indica de que no hay una toxicidad ni para el polipropileno ni para el polietileno, aunque en la gráfica se muestran variaciones el cual puede ser atribuido probablemente a que el lote de semillas pudo haber tenido mucho tiempo en almacenamiento; además de que no se utilizó semilla certificada de *T. pratense*. De manera general el porcentaje de germinación se mantuvo entre el 70 y el 80% de germinación.

VI.2.3.2 Prueba de toxicidad terrestre

El objetivo de la prueba de toxicidad terrestre, es determinar si existe un efecto tóxico después de la germinación de semillas, evaluando la sobrevivencia por un periodo de 23 días posterior a la germinación. En la figura 24 al final de la prueba para el blanco; las plántulas de *S. lycopersicum* presentaron un 81.25% de sobrevivencia, para *L. sativa* 93.75%, para el *T. pratense* 75% y *A. cepa* 68.75% ; para las cuatro especies se presentó una sobrevivencia mayor al 50%; por lo que de acuerdo a Massiana y Domeizel, 1994; no presenta toxicidad y es una composta que llegó a su madurez ya que conforme el proceso de composteo avanza las sustancias tóxicas disminuyen hasta eliminarlas. Para la composta con celulosa; las plántulas de *S. lycopersicum* presentaron un 81.25% de sobrevivencia, para *L. sativa* 93.75%, para el *T. pratense* 62.5% y para *A. cepa* 81.25%., las cuatro especies se presentó una sobrevivencia mayor al 50% . En la composta con polipropileno, las plántulas de *S. lycopersicum* presentaron un 87.5% de sobrevivencia, para *L. sativa* 87.5%, para el *T. pratense* 50% y para *A. cepa* 81.25%. Y en la composta con polietileno se observó, que para las plántulas de *S. lycopersicum* presentaron un 93.75% de sobrevivencia, para *L. sativa* 93.75%, para el *T. pratense* 50% y para *A. cepa* 93.75%. Para el caso del polipropileno y polietileno, todas las especies a excepción de *T. pratense* presentaron un porcentaje mayor al 50% de sobrevivencia., esto puede ser debido a que las semillas presentan un bajo índice de germinación por no utilizar semilla certificada, pero si se toma el porcentaje del blanco o celulosa como referencia, el porcentaje de sobrevivencia correspondería a un 66.66% con respecto al blanco o un 80% con respecto a el control positivo (composta crecida con celulosa).

Con esto se puede concluir que no hay un efecto tóxico, y los resultados de las compostas con plásticos comparadas con el blanco, no presentan un aumento en la sobrevivencia lo cual indica que en ambos casos no hay aportaciones de nutrientes ni modificaciones en la sobrevivencia por parte de los plásticos.

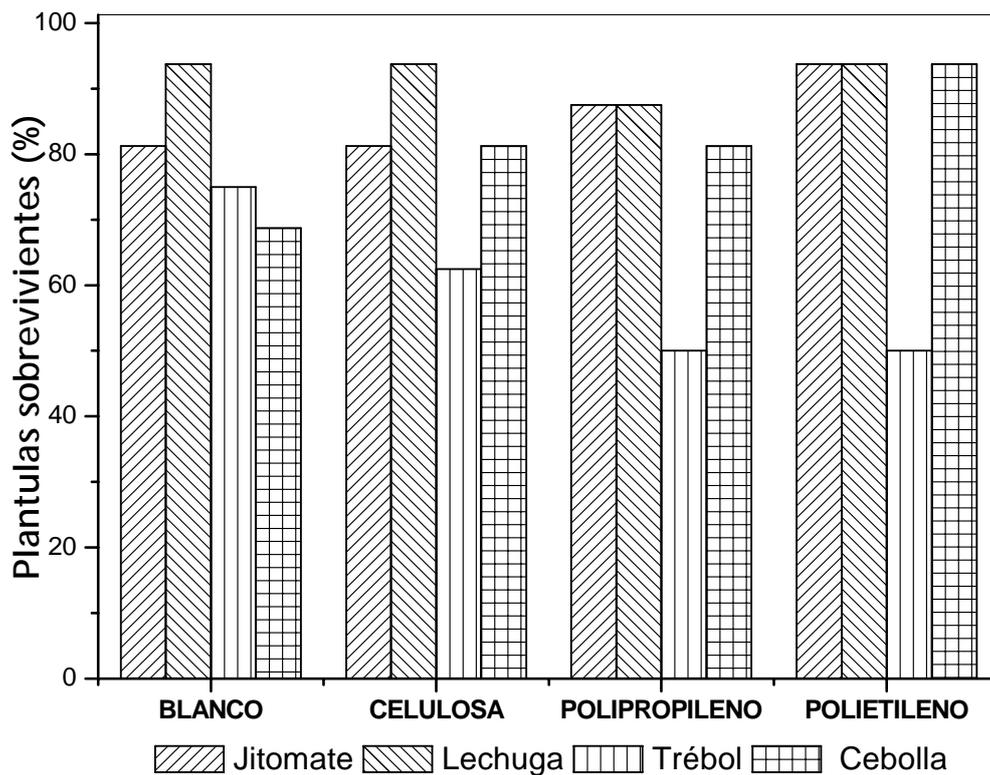


Figura 10. Supervivencia de plántulas de lechuga, jitomate, trébol y cebolla al final de la prueba de seguridad terrestre.

VI. 3 Crecimiento microbiano

Durante la prueba de biodegradabilidad se describió el desarrollo del crecimiento de bacterias presentes en la composta. La composta que fue utilizada como blanco, se pueden observar tres momentos. A) Al inicio de la prueba se observó existencia de una los predominancia de los grupos metabólicos de la siguiente manera amilolíticos (51.13%), celolíticos (43.22%), sacarolíticos (3.08%), proteolíticos (2.54%) y lipolíticos (0.007%), manteniéndose en ese orden de predominancia aunque con cambios de porcentajes menores durante los primeros 20 días (Figura 25). B) A la mitad de la prueba se observó que la producción de CO₂ mostraba un incremento, como por ejemplo se observó que para el día 28 presentó cambios en la proporción de los grupos metabólicos, siendo los grupos más abundante el de los sacarolíticos con un porcentaje del 67.27% y para lipolíticos un porcentaje del 32.06%; el grupo de amilolíticos descendió drásticamente de pasar del 74.4%

para el día 14 hasta el 0.05%. C) Para el final de la prueba se observa que hubo una recuperación del grupo metabólico de amilolíticos con un porcentaje del 95.32% y los demás grupos metabólicos su población disminuyó; siendo sus porcentajes para sacarolíticos (4.43%), proteolíticos (0.16%), lipolíticos (0.04%) y celulolíticos (0.036%), recuperando el orden de predominancia como al inicio de la prueba (Figura 25).

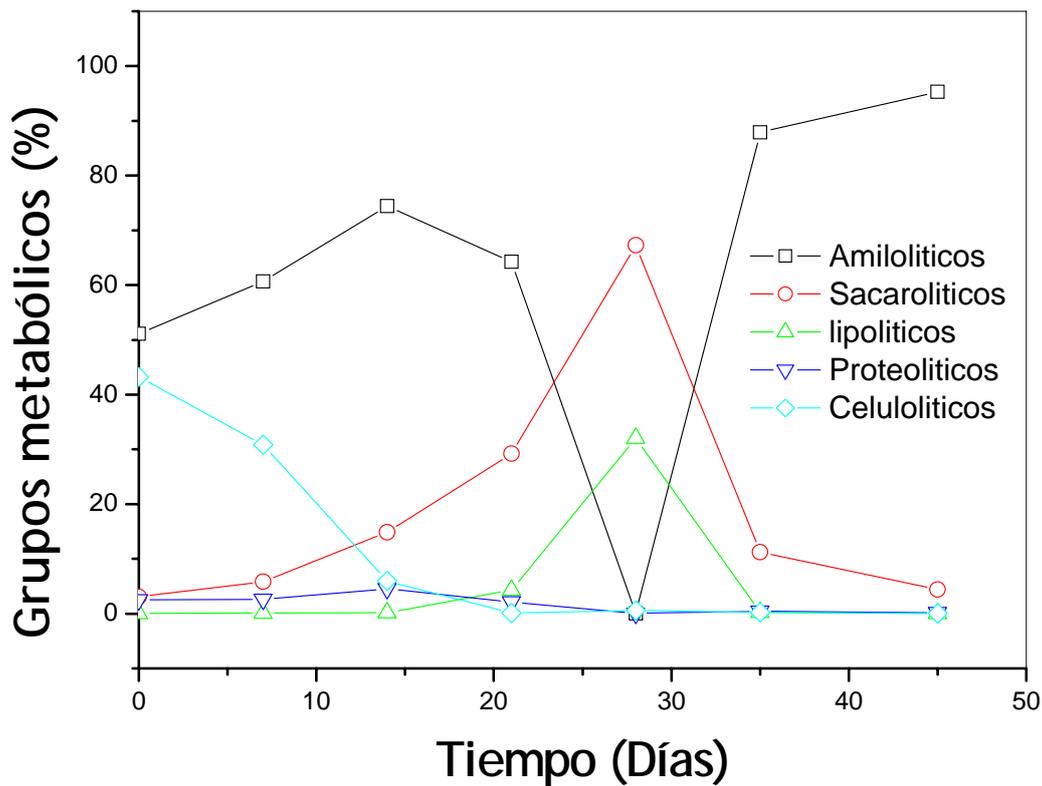


Figura 11. Curva crecimiento microbiano de composta blanco

La composta control positivo (con celulosa); como se puede observar en la figura 26. Al inicio de la prueba; la predominancia de los grupos bacterianos con sus porcentajes respectivos fueron: amilolíticos (40.98%), sacarolíticos (31.54%), celulolíticos (21.61%), proteolíticos (5.83%)y lipolíticos (0.02%) respectivamente; cumpliendo con este orden aunque cambiando ligeramente los porcentajes durante los primeros 20 días. A la mitad de la prueba el crecimiento de las poblaciones fueron cambiando, siendo los amilolíticos el grupo que presentó una mayor población para el día 21 con un porcentaje de

75.8% y teniendo una caída en su población para el día 28; el cual corresponde a lo observado que fue el día con mayor producción de CO₂ y presentando una predominancia de los grupos metabólicos en el siguiente orden celulolíticos (36.49%), sacarolíticos(27.73%), lipolíticos (13.86%), proteolíticos y amilolíticos con un porcentaje de 10.94% respectivamente. Al final de la prueba, cuando la producción de CO₂ empieza a disminuir el grupo de amilolíticos aumenta presentando un porcentaje de 99.53% y el resto de los grupos metabólicos sacarolíticos descienden con un porcentaje de 0.42%, proteolíticos 0.02%, lipolíticos 0.02% y celulolíticos con un 0.004%.

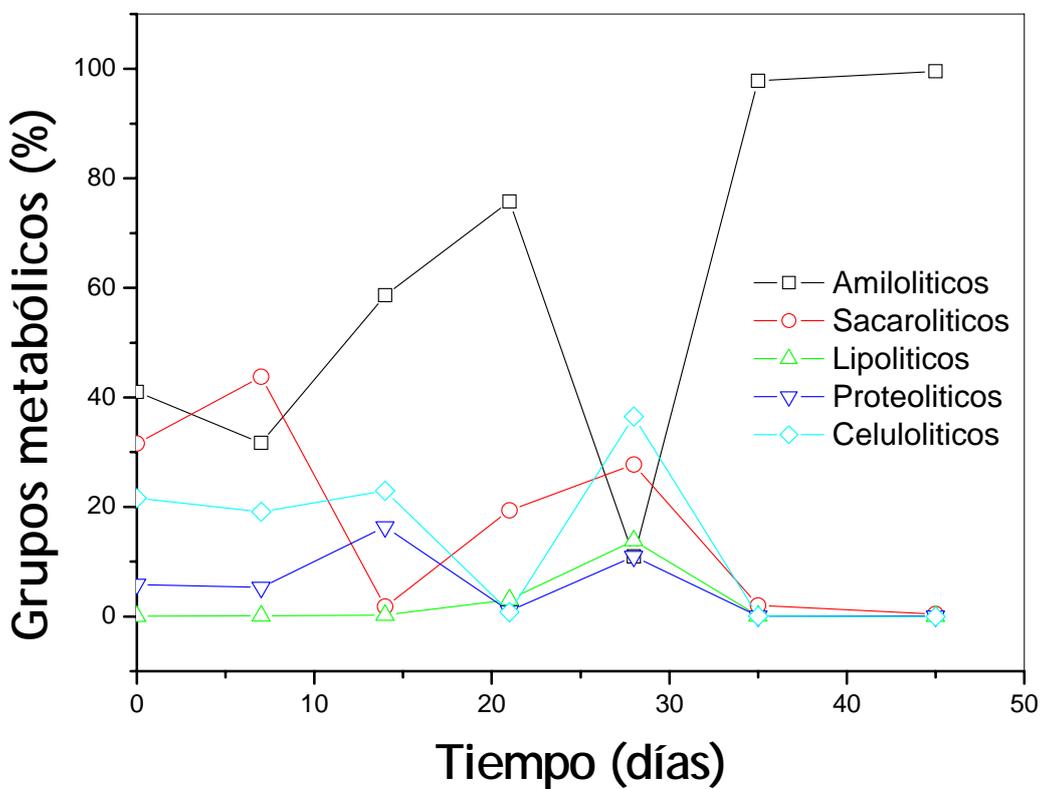


Figura 12. Curva crecimiento microbiano de composta con celulosa

A la composta que se le adicionó polipropileno se observó que al inicio de la prueba el orden de abundancia es el siguiente con sus respectivos porcentajes: amilolíticos con 56.51%, sacarolíticos con 22.94 %, celulolíticos con 16.61%, proteolíticos con 2.5% y lipolíticos con 1.41 %. Durante el

desarrollo de la prueba las poblaciones fueron cambiando; por ejemplo para el día 21 se observa que hubieron cambios en el orden de abundancia de los grupos, siendo el más abundante el de los lipolíticos con un 66.86% del total de la población bacteriana, lo cual corresponde a un aumento en la producción de CO₂ según la figura 19. Para el día 28 el grupo con mayor predominancia fue el de los sacarolíticos los cuales ocuparon el 72.03% de la población para ese punto, que corresponde a la mayor producción de CO₂; observándose una disminución notable del grupo metabólico de los lipolíticos que presentaron un valor del 5.88%. Al final de la prueba, la mayor abundancia de microorganismos estuvo dada por los amilolíticos con un valor del 96.37; para el resto, grupos metabólicos las abundancia fueron las siguientes; sacarolíticos con un 2.14%, proteolíticos con 1.12%, lipolíticos con 0.21% y celulolíticos con 0.15%; los cuales presentaron el mismo orden de abundancia para el final de la prueba que para el blanco.

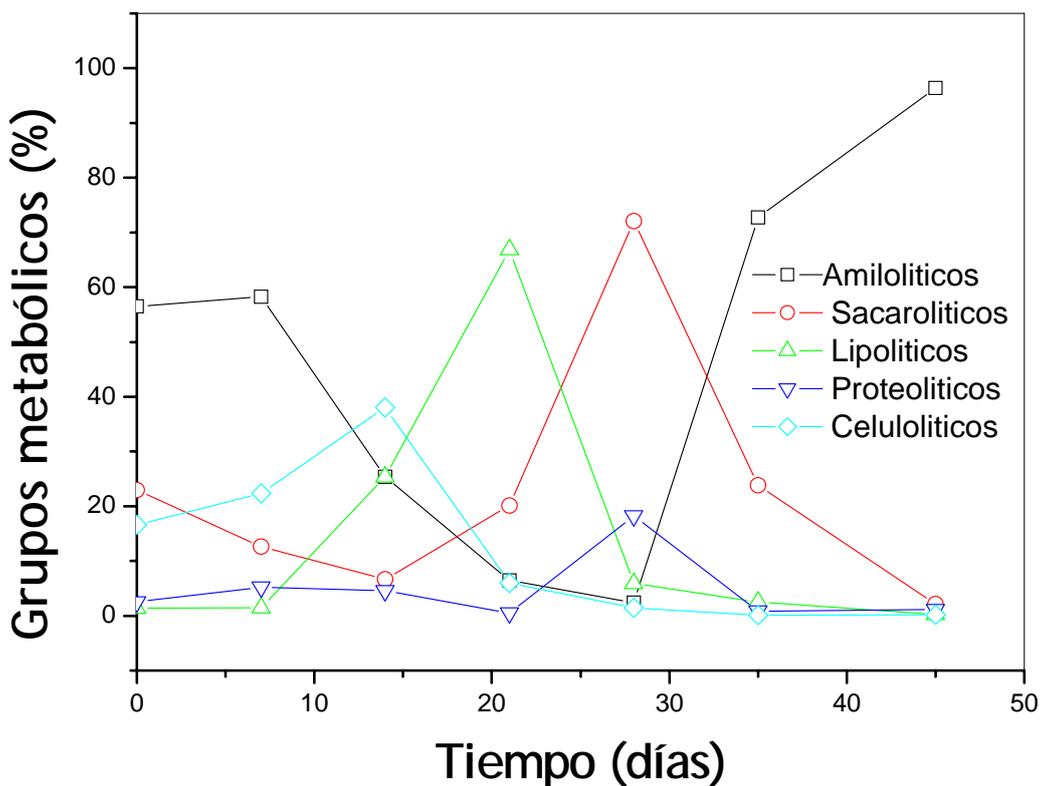


Figura 13. Curva de crecimiento de composta con polipropileno

El comportamiento observado para los grupos metabólicos en la composta con polietileno es presentado en la figura 28. Como se puede observar en dicha figura, las compostas tomadas como blanco y celulosa como controles positivos, presenta tres notables momentos en el desarrollo de las poblaciones bacterianas; de acuerdo a la producción de dióxido de carbono (CO_2) las cuales son explicadas a continuación: A) Al inicio del periodo de composteo se observa la siguiente abundancia: amilolíticos (67.82%), sacarolíticos (19.96%), celulolíticos (11.57%), proteolíticos (0.68%) y lipolíticos (0.02%) respectivamente hasta el día 20, posteriormente entre los días 20 y 28 se mostraron cambios en la proporciones predominantes de los grupos metabólicos de bacterias. B) En el día con mayor producción de CO_2 se encuentran con mayor abundancia los celulolíticos con un 73.31% y sacarolíticos con un 20.77%. C) Al final de la prueba se observa que la población de amilolíticos vuelve a ser la más abundante con un porcentaje de 72.78% y el resto fue de sacarolíticos con un 26.28%, proteolíticos con un 0.67%, celulolíticos con un 0.12% y lipolíticos con un 0.14%.

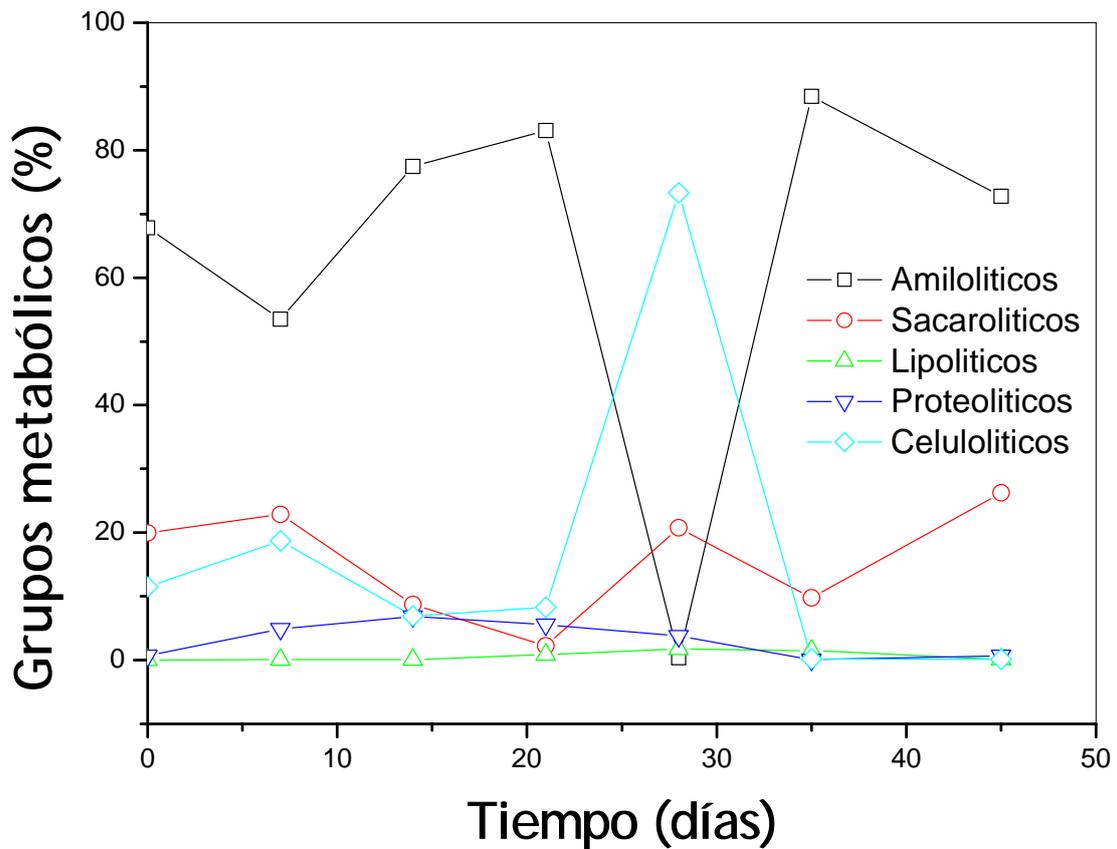


Figura 14. Curva de crecimiento de composta con polietileno

Otros estudios muestran que la microbiota en la composta es bastante compleja y que el uso de métodos de cultivos pueden revelar diferentes miembros de esta (Vaz Moreira et al., 2007). De acuerdo a Massiani y Domeizel ,1994; el 80% de las células cultivables son bacterias, por lo cual se utilizó como biota a monitorear.

Estudios realizados por Vaz-Moreira de poblaciones bacterianas en compostas caseras se ha observado altos valores de UFC de entre 10^5 y 10^6 , de acuerdo a esto los valores obtenidos en nuestras compostas oscilan entre los 10^4 y 10^5 UFC/mL, lo cual podemos decir que tuvimos una gran abundancia de bacterias en la compostas.

Los cambios observados de los grupos metabólicos durante la prueba de biodegradabilidad, se encuentran relacionados con la producción de CO₂, y de manera general como se muestra en la figura 29 el grupo de los amilolíticos es el abundante, como lo reporta Massiani y Domeizel ,1994; y para este caso puede estar sucediendo, que como no existe un aporte adicional de nutrimentos durante la prueba de biodegradabilidad, esto se convierte en un factor limitante. Es posible suponer que presenta un crecimiento endógeno, donde los microorganismos se ven forzados a metabolizar su propio protoplasma sin que exista un reemplazo alguno, porque la concentración de nutrientes es mínima, esto ocasiona la disminución neta de la biomasa. Durante esta fase es frecuente el fenómeno de lisis celular, donde los microorganismo se disgregan y los nutrientes contenidos en la célula pueden difundirse para suministrar nutrientes a las células sobrevivientes, es decir, que para que existe una abundancia de amilolíticos se van a alimentar de las células muertas de los demás grupos metabólicos; presentando un crecimiento conocido como crítico (Metcalf y Eddy, 1991). .

Para el momento de mayor producción de CO₂ en el caso de la composta con celulosa, el mayor grupo fue de celulolíticos como se puede ver en la figura 25, ya que es el grupo que degrada esta y de manera general durante toda la prueba es el tercer grupo más importante en orden de abundancia. Para la composta con polipropileno se observó que presenta dos momentos de producción altos de CO₂ , para el día 21 el mayor grupo estaba dado para los lipolíticos y el grupo de los sacarolíticos el más abundante de acuerdo a la figura 20, así mismo; de manera general el grupo más abundante durante toda la prueba fue el de los lipolíticos con 46% como se observa en la figura 22.

Para la composta adicionada con polietileno, se observó que el grupo más abundante fue el de los celulolíticos en el momento de mayor producción de CO₂, y de manera general aunque el grupo más abundante fue el de los amilolíticos con 44%, el de los celulolíticos presento un 35%, por lo que se puede pensar que hay una relación con microorganismos que degradan lignina como lo menciona Shimao, 2001.

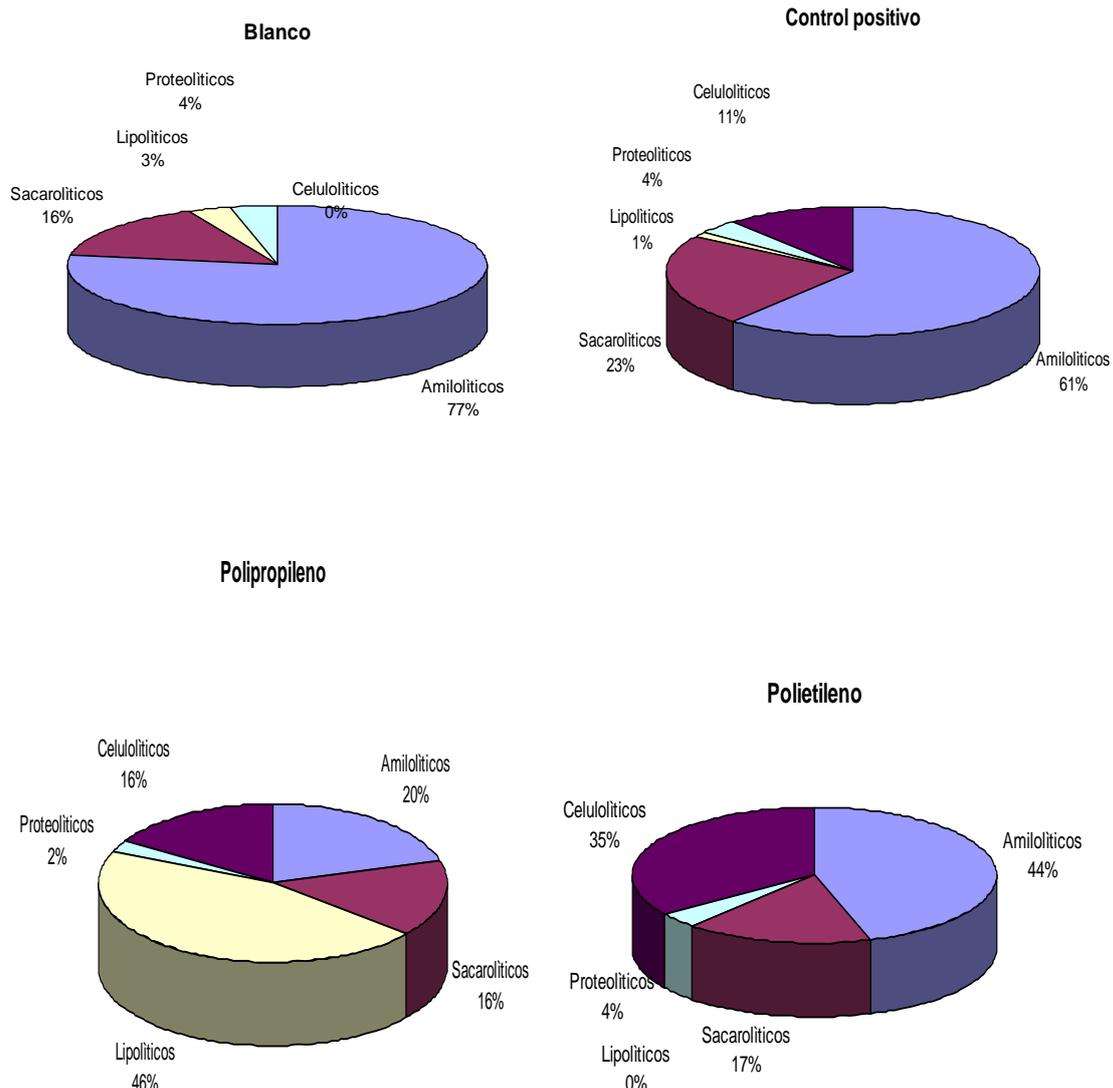


Figura 15. Porcentaje de la AE por grupo de enzimas, evaluados durante la prueba de biodegradabilidad para plásticos. A) Blanco, B) Composta con celulosa, C) composta con polipropileno, D) composta con polietileno

VI. 4 Seguimiento de pH

Dentro de los factores que puede afectar la biodegradabilidad de un material se encuentra el pH, es por esto que se decidió monitorearlo durante toda la prueba para asegurarse del control de esta variable, además es ampliamente reconocido que el valor de la acidez o alcalinidad permite monitorear variaciones en el medio causadas por las reacciones químicas que se verifican durante la actividad biológica del inóculo sobre el sustrato (Guillen Jiménez et al., 2000). Asimismo, también fue importante monitorear este parámetro debido

a que las enzimas tienen un pH óptimo o un intervalo en el cual su actividad es máxima; a valores superiores o inferiores de pH la actividad enzimática disminuye (Lenhinger et al., 1993), lo cual puede afectar la biodegradabilidad del material.

Como se muestra en la figura 30, durante el desarrollo de toda la prueba el pH va cambiando; se puede observar que al inicio de la prueba la composta se encuentra con un pH de 7.36, en el séptimo día el pH empezó a aumentar a 7.6, con excepción de la composta que contenía celulosa que se observa que el pH se mantuvo sin cambio hasta el día 28. Posteriormente al día 28 se observa que el pH empieza a aumentar llegando a un valor máximo para el día 36 de 8.12 ; que es cuando se observa una mayor producción de dióxido de carbono (CO_2) de acuerdo a la figura 10 y 11 ; un incremento de pH es asociado a la liberación de amonio y otros compuestos básicos de la mezcla (Sarasa, 2008). Al final de la prueba empezó a disminuir hasta llegar a un pH de 7.8 , siendo posible porque se presentó una mineralización de la materia orgánica que es responsable del decremento del pH (Sarasa, 2008), y comparadas con biodegradabilidad de fenoles y dietilenglicol al final de la prueba se reportó un pH neutro (Zganjnar y Zagora, 1999). De manera general la figura 23 muestra que el pH se mantuvo entre 7 y 8.2, lo cual nos indica un proceso de compostaje aerobio. Dado que no se produjeron compuestos de degradación anaerobia como los ácidos orgánicos que pudieran acidificar la composta.

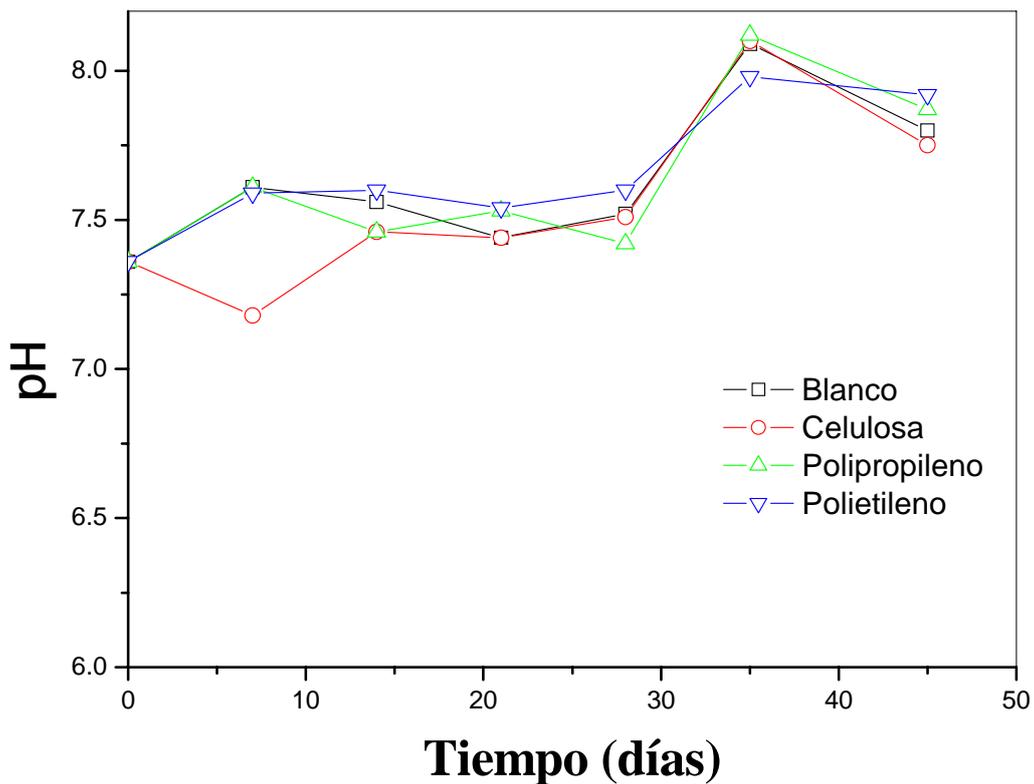


Figura 16. Curva de pH del blanco, composta con celulosa, composta con polipropileno y composta con polietileno.

VI. 5 Determinación de actividad enzimática

La caracterización y cuantificación de la actividad enzimática durante el composteo debe de reflejar la dinámica del proceso de composteo en términos de transformación de la materia orgánica. En este caso se piensa que las enzimas que catalizan la degradación de sustancias poliméricas, son extracelulares ya que los polímeros no pueden ser transportados a través de la membrana celular (Tiquia, 2002; Vaz Moreira, 2007). Asimismo, la biodegradación de contaminantes orgánicos esta facilitada por las enzimas que se activan durante las funciones normales de los microorganismo como por ejemplo la asimilación del carbono (Albert et al., 1995).

El nivel de actividad enzimática para la composta blanco es presentado en la figura 31. Como se observa en esta figura la mayor actividad que se determinó fue la de fosfatasas, que presentó un perfil de actividad entre 4.33 y 5 unidades. Si comparamos nuestro resultado obtenido a lo reportado por Tiquia (2002); se observa que la actividad de fosfatasas presenta un nivel de actividad enzimático alto; para el día 28 donde se obtiene el valor más alto de 473.34 mg de CO_2 y la disminución de grupo amilolíticos para este momento del 74.42% al 0.05% . Las lipasas son las siguientes enzimas con mayor actividad, presentando perfiles de entre 2.6 y 3.3 unidades el cual es un valor de actividad enzimática media (Tiquia, 2002). También se observa que se presentaron cambios con un ascenso de manera general durante el desarrollo de la prueba; La actividad para el día 28 presento un valor de 3.66, el cual corresponde con la mayor producción de CO_2 . Para las proteasas, el perfil de actividad enzimática se encuentra entre 1 y 2 unidades, siendo este valor casi moderado, y para el día 28 llegó a un máximo nivel de 2.4 unidades y después de este periodo empieza a descender su actividad; cabe hacer mención que los grupos metabólicos con mayor porcentaje para este punto están los sacarolíticos y lipolíticos. Para las carbohidratasas, se observó un nivel bajo de actividad, que va descendiendo durante el desarrollo de la prueba, como lo hace el grupo metabólico de celulolíticos

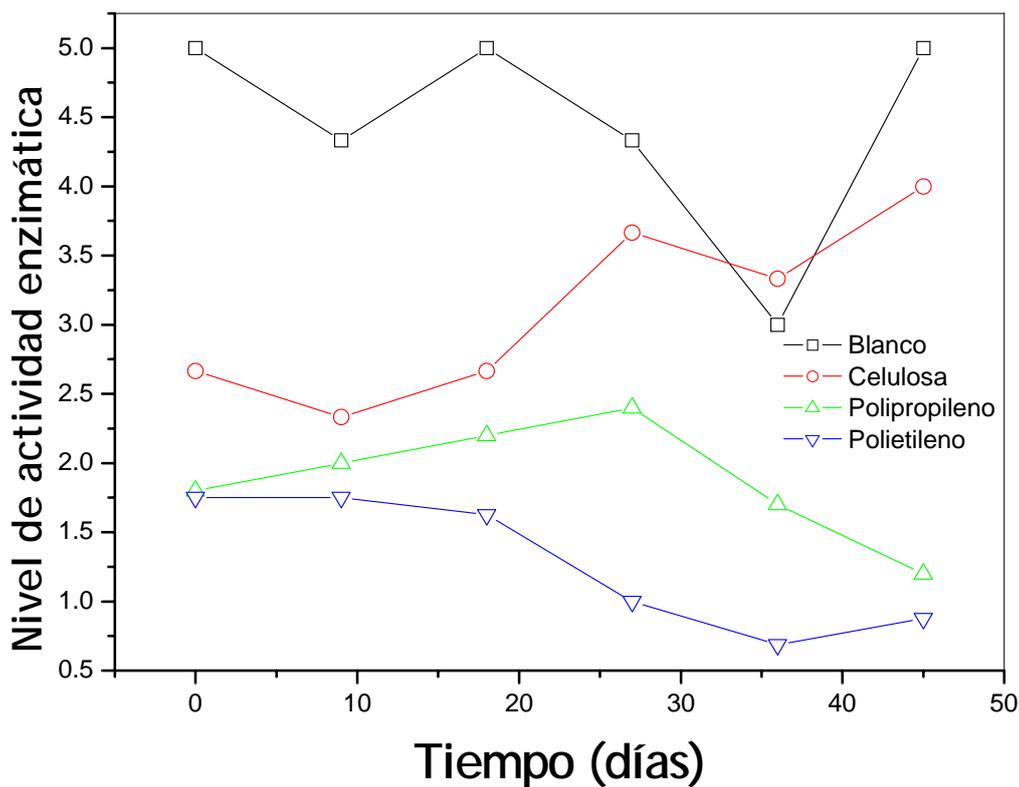


Figura 17. Actividad enzimático composta blanco

La actividad enzimática en la composta con celulosa, se encontró que la mayor actividad está dada para las fosfatasas con valores entre 4 y 5 unidades; siendo una alta actividad (Tiquia, 2002). Al igual que en el blanco esta composta con celulosa presenta una disminución de actividad en el día 28, en el cual se reportó el valor de 542.48 mg de CO₂, volviendo a un alto nivel después del descenso de la producción de CO₂ (Figura 32). La actividad enzimática de lipasas presentó un nivel de actividad media, y para el día 28 se observó su mayor nivel de actividad. La actividad de las proteasas se encuentra en un nivel medio, pero conforme va pasando la prueba va descendiendo el nivel de actividad. Para las carbohidratasas se observa el mismo comportamiento, aunque su nivel de actividad en general es bajo.

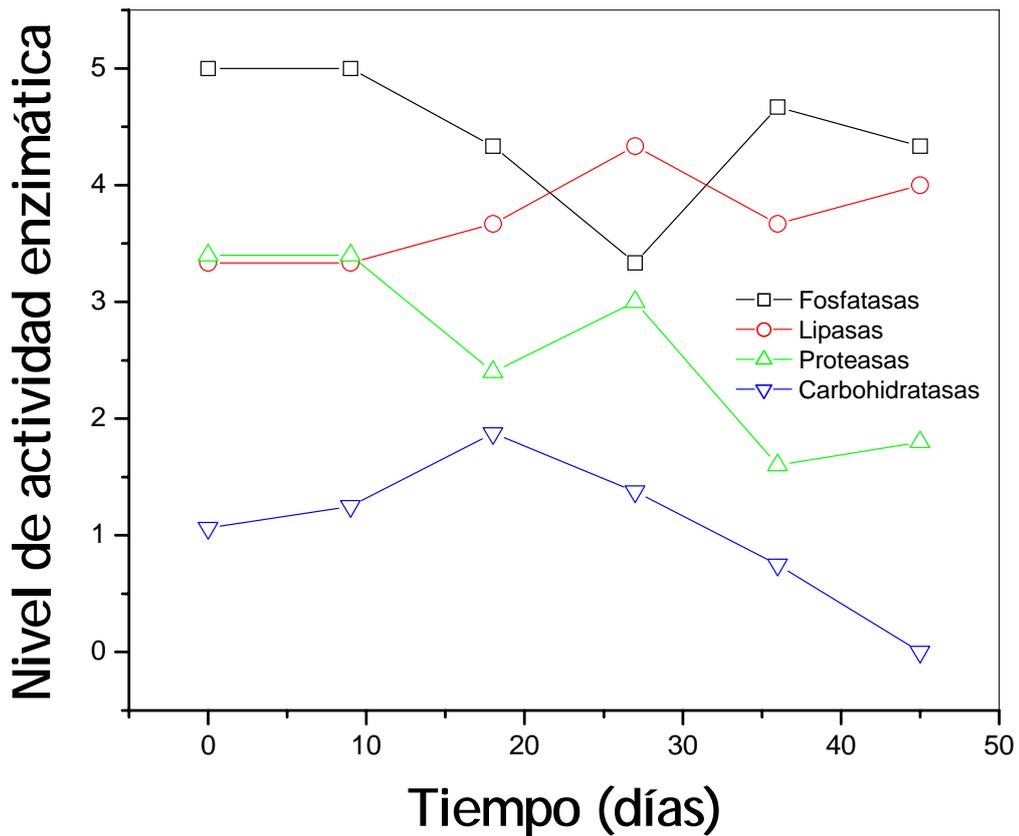


Figura 18 Actividad enzimático composta con celulosa

El nivel de actividad enzimática para la composta con polipropileno se observa al igual que el blanco que la mayor actividad enzimática corresponde a las de las fosfatasas (Figura 33); presentando el menor nivel de actividad para el día 27 cuando se reporta el nivel más alto de CO_2 de 448.65 mg. Las lipasas presenta un nivel bajo de actividad al inicio de la prueba y conforme se va desarrollando la prueba se observa que la actividad de las lipasas va en aumento hasta llegar a una alta actividad con 4 unidades. Las proteasas se mantienen en niveles moderados; el nivel más alto para esta actividad fue encontrado en el día 27, lo cual coincide en este día con la presencia del grupo de los sacarolíticos el cual es el grupo más abundante en este punto. La actividad enzimática de los carbohidratos se mantienen en un nivel bajo.

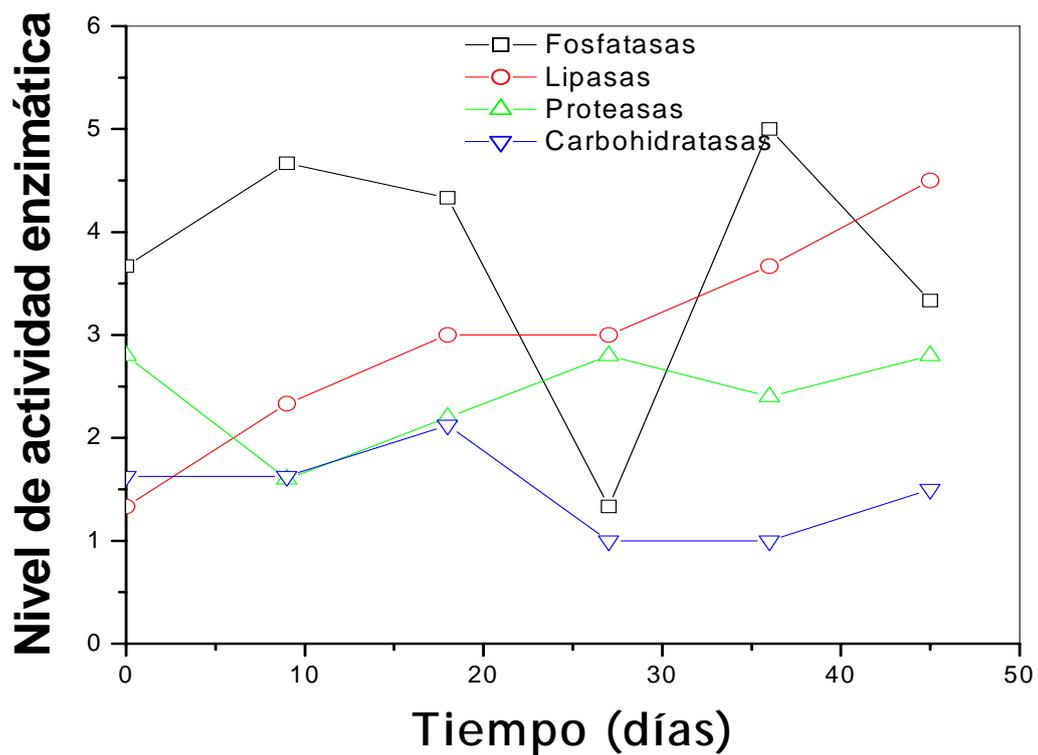


Figura 19. Actividad enzimática de composta con polipropileno

Respecto a la composta con polietileno se observó que las lipasas y las proteasas presentan niveles moderados de actividad, aunque las lipasas fueron el grupo con mayor actividad con valores entre 2.6 y 3.3; para el grupo de fosfatasas se observó una menor actividad (Figura 34). En general se pudo observar un nivel alto de actividad enzimática, el cual está dado por una alta concentración de microorganismos como fue reportado previamente por Tiquia (2002) y Vaz Moreira y colaboradores (2007).

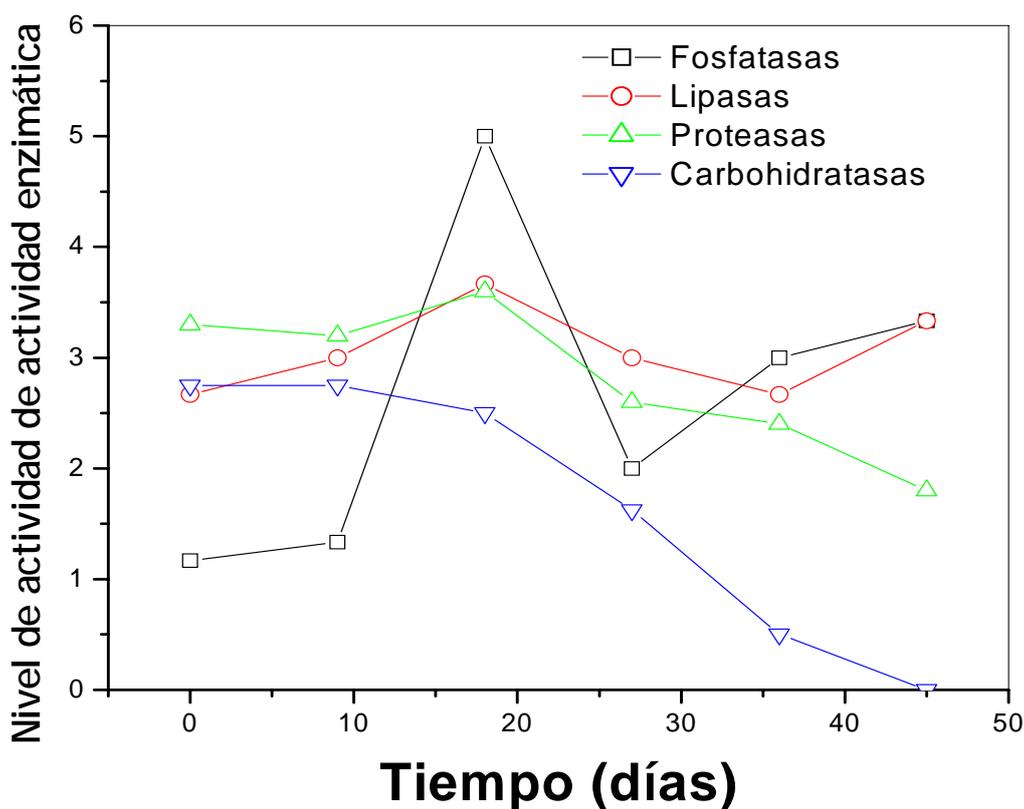


Figura 20. Actividad enzimática de composta con polietileno

En general se pudo observar un nivel alto de actividad enzimática y si presenta un alta actividad, es por que hay un alta concentración de microorganismos como lo reporta Tiquia, (2002) y Vaz Moreira et al., (2007).

Las diferencias en las enzimas segregadas pueden atribuirse a la composiciones químicas de las materias primas de las compostas (Tiquia, 2002); para este caso, la composta fue la misma y las diferencias que se presentaron se atribuyen a los componentes que se pusieron a prueba como fueron el polipropileno y polietileno. Ya que como se puede observar en la figura 27, la mayor actividad para el polietileno esta dada por las lipasas. En el composteo, la materia orgánica soluble al inicio es asimilada por microorganismos (Rynk et al., 1992). Una vez que la materia orgánica soluble es agotada, los microorganismos producen enzimas hidrolíticas que

despolimerizan grandes componentes (como lignina, celulosa y hemicelulosa) a pequeños fragmentos que son solubles en agua (Tiquia, 2002)

De acuerdo a Ocegüera et al. (2007), se ha reportado que en la degradación de polímeros como el poliuretano las enzimas participantes que se encuentran son las proteasas, ureasas, estereasas y lipasas. Para el polipropileno se encuentran dentro de los niveles más altos de actividad enzimática las fosfatasas y lipasas.

En general si se observa la figura 35, el nivel de actividad enzimática en toda la prueba de biodegradabilidad, las fosfatasas son las enzimas que tienen mayor actividad en el blanco, control positivo y polipropileno; dicha actividad está relacionada a que estas son utilizadas en la obtención de fosfato inorgánico a través de fósforo orgánico, que son esenciales para la nutrición de los microorganismos; sin embargo en el caso de polietileno el mayor porcentaje corresponde a las lipasas y en segundo lugar las fosfatasas. Las lipasas son el segundo grupo de enzimas con mayor porcentaje, lo cual se puede explicar que estas son capaces de degradar lípidos con una liberación de ácidos grasos, que siendo en el caso de las compostas estos son una fuente de almacenamiento primario de grasas de plantas y animales, y cuando las condiciones son aeróbicas, los ácidos grasos entran a la beta oxidación, donde son fragmentados en dos carbonos con un producto final de CO_2 y H_2O , la acetil-coA produce este tipo de degradación a ATP. para el caso de los plásticos las lipasas monitoreadas en esta prueba, degradan cadenas de 4, 8 y 14 carbonos, los plásticos son polímeros de alto peso molecular, por lo que inicialmente la estereasa podría degradar solo una parte de la molécula y conforme fuera degradado quedarían las partes más recalcitrantes de la molécula, por la estereasa lipasa y la lipasa, podrían degradar el resto de la molécula (Ambriz , 2001 b).

Las proteasas ocupan el tercer lugar de manera general dentro de la actividad total de la composta; estas enzimas están involucradas en la degradación de proteínas, y en la degradación de amonio el cual es importante ya sea para la disponibilidad de nitrógeno así como para la regulación de pH.

Las carbohidratasas fueron las enzimas que presentaron nivel de actividad bajo, esto se debe probablemente a que el pH de las compostas oscilaban sus valores entre 7.36 y 8.1 y de acuerdo a lo reportado por Tiquia, 2002; este grupo de enzimas trabajan en un valor de pH de 5.4; lo cual a este pH las carbohidratasas se mantienen inactivas.

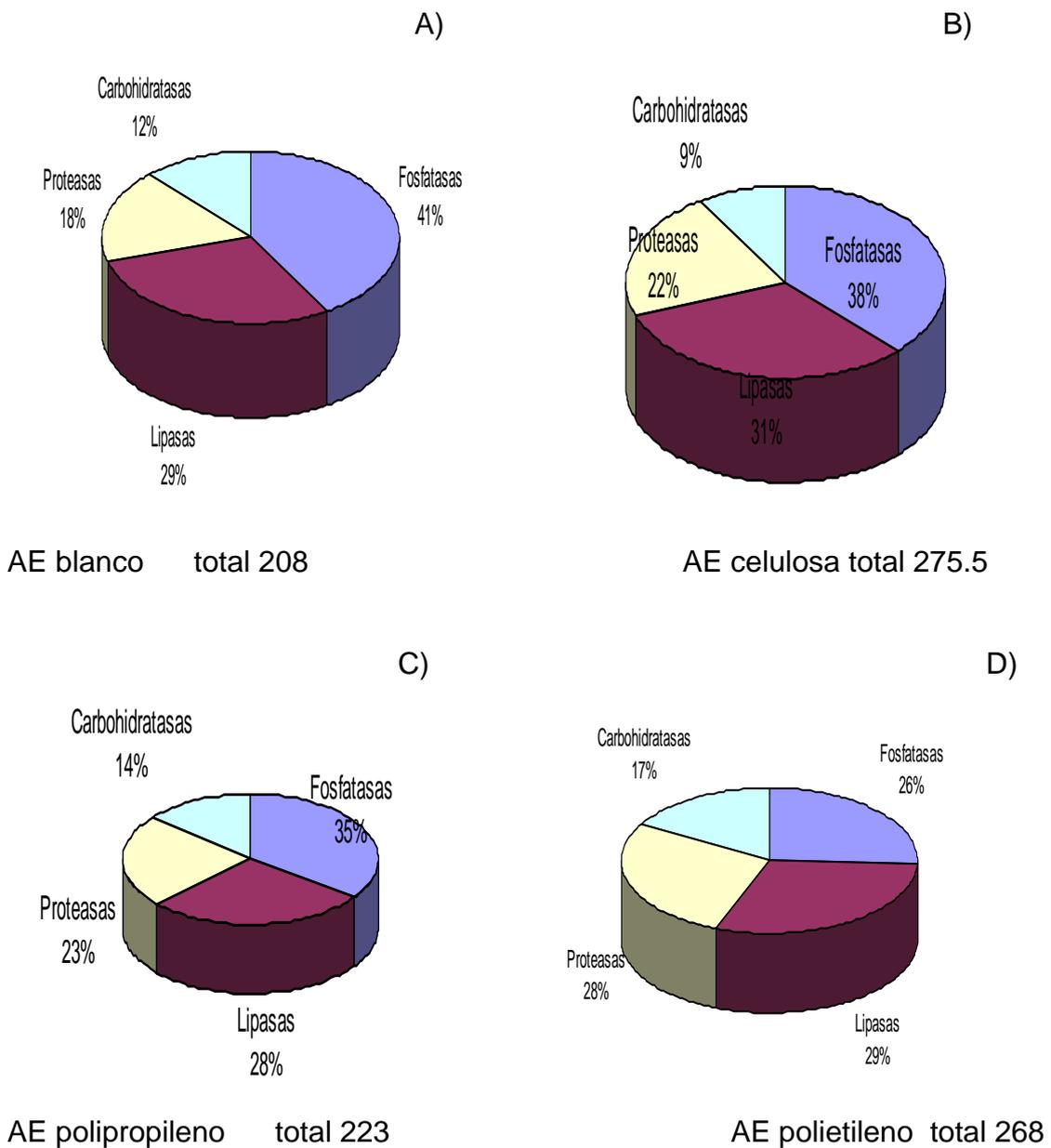


Figura 21. Porcentaje de la AE por grupo de enzimas, evaluados durante la prueba de biodegradabilidad para plásticos. A) Blanco, B) Celulosa, C) Polipropileno, D) Polietileno

VI. 6 Microscopia

Después de haber realizado la tinción al plástico de polipropileno que estuvo presente durante todo el proceso de la composta y haber observado la presencia de bacterias las muestras fueron procesadas y se observaron al microscopio electrónico de barrido; donde se encontró la presencia de diferentes formas de bacterias como racimos y cadenas de cocos (Fig. 36A) y bacilos (Fig. 36 B). También se encontró un daño físico en los trozos de polipropileno, fisuras que se pueden observar en las figuras 36 C y D respectivamente.

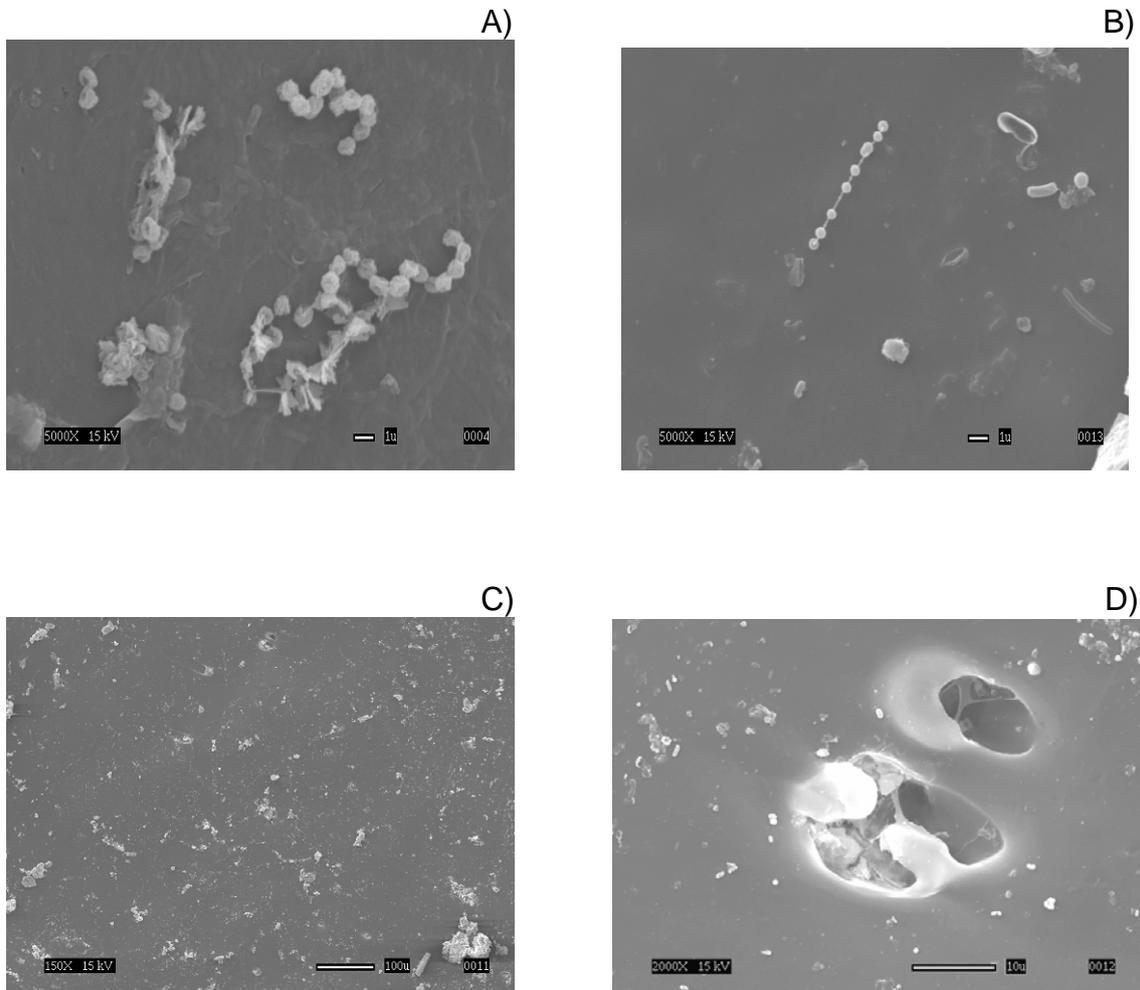


Figura 22. Microfotografías de la película de polipropileno después del proceso de compostaje A)Rosario de cocos, B) Cocos y bacilos, C) Daño físico y D) Fisuras

Para el material hecho a base de polipropileno no se obtuvieron en la bibliografía adecuadas fotografías por microscopía electrónica; para lo cual se procedió a realizar una comparación con películas de poliuretano que habían sido expuestas a un cultivo con bacteria llamada *Alycicliphillus*; en donde se observa la presencia de daño en la superficie por medio de diferentes agujeros como se presenta en la figura 37 B comparado con la muestra blanco (Figura 37A) (Ocegüera et al., 2007). Este efecto puede ser atribuido a la microbiota presente en la composta o la generación de gases (amonio y CO₂), que producen altas estructuras porosas.

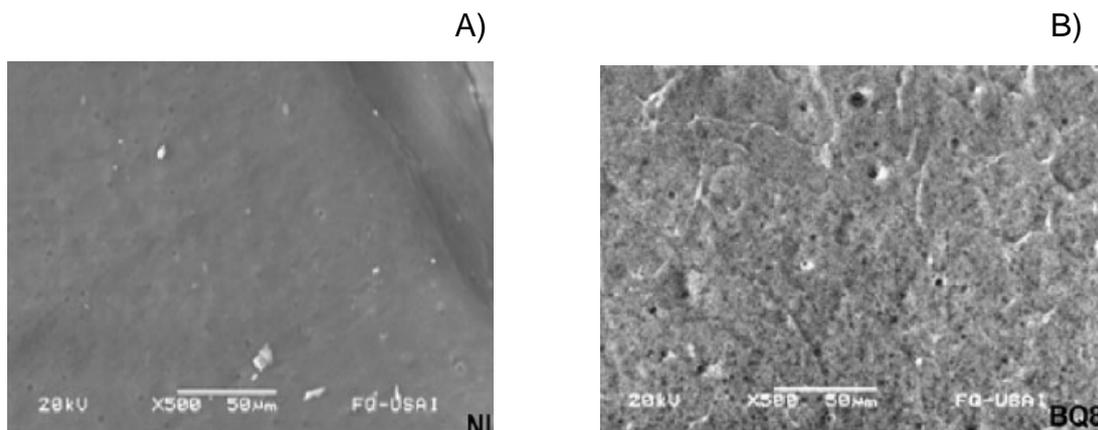


Figura 23. Película de poliuretano A) No inoculada y B) Inoculada con *Alycicliphillus* BQ8

En el caso de las fotografías al microscopio de barrido de polietileno podemos observar en la figura 38 diferentes vistas de los gránulos de polietileno, en 34 A y C vistas en la superficie donde no se observa daño físicos, lo que se llega a observar es partículas de la composta, en B se muestra un corte frontal y en D se hace un acercamiento mayor y se observa que no hay adhesión microbiana y solo se observa las partículas de composta.

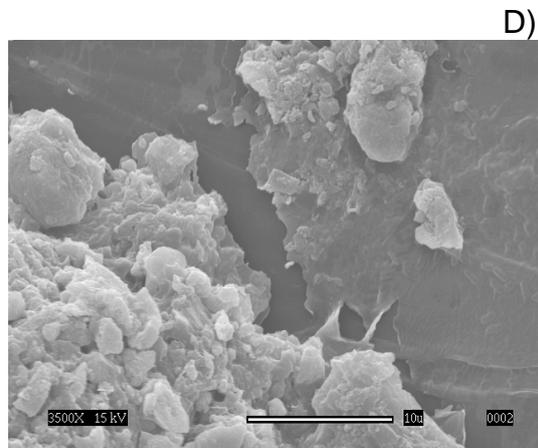
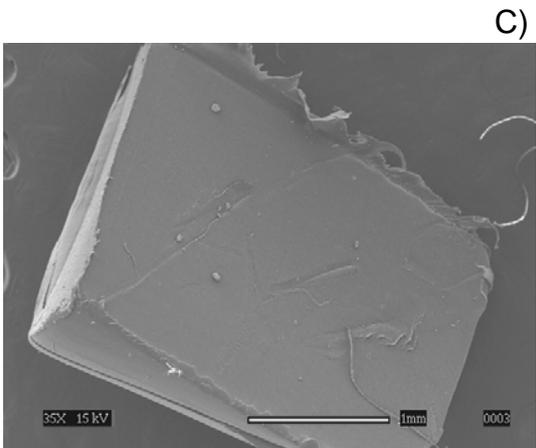
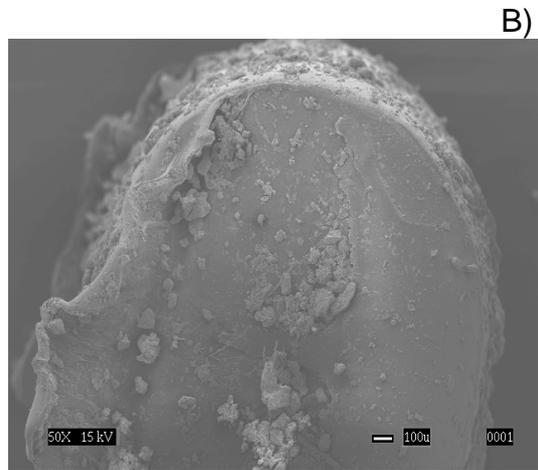
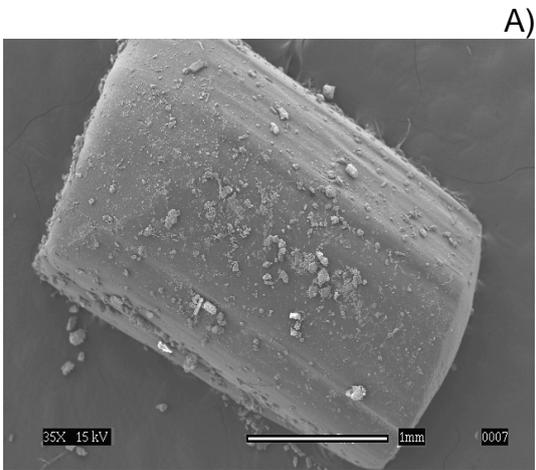


Figura 24. Microfotografías de la película de polietileno después del proceso de compostaje A)Grano de polietileno a 1 mm, B) Superficie a 100 u C) Corte frontal y D)Superficie a 10 u.

VII CONCLUSIONES

La prueba de biodegradabilidad fue válida ya que para el control positivo (Composta con celulosa) se obtuvo un porcentaje mayor del 70%.

El polipropileno y polietileno no son materiales compostables, ya que no se obtuvo una desintegración, un porcentaje de biodegradabilidad mayor al 60%. Las pruebas de seguridad acuática y terrestre mostraron ser materiales no tóxicos.

En los materiales evaluados a pesar de que no pueden ser considerados biodegradables, se observó indicios de adhesión microbiana para el caso de las películas de polipropileno, que se observaron en la tinción de Gram y en la microscopia de barrido realizada. Para los gránulos de polietileno, no se observó una adhesión microbiana, aunque hubo un cambio en la coloración de estos, sin embargo, al hacerles microscopia de barrido, se observó que no había daño físico.

Para el polipropileno el grupo de bacterias con mayor porcentaje en total fueron las lipolíticas (45.66%), siendo predominante en los momentos de alta producción de CO₂, aunque no en el punto más alto. Sin embargo la actividad enzimática se observa que conforme se va desarrollando la prueba va aumentando. Lo que lleva a concluir que el grupo de lipolíticos se mantuvo metabolitamente activo segregando enzimas que pudieran llevar a cabo un proceso de degradación, dado que intervienen en la degradación de lípidos con una liberación de ácidos grasos que en condiciones aeróbicas, los ácidos grasos entran a la beta oxidación, donde son fragmentados a dos carbonos y convertidos en CO₂ y H₂O.

Para el polietileno el grupo de bacterias con mayor porcentaje en total amilolíticos (68.28%), aunque en el momento de mayor producción de CO₂ estuvo dominado por el grupo de los celulolíticos, aunque no se presentó

degradación de acuerdo a lo encontrado en la bibliografía existen hongos como *Phanerochaete chrysosporium* que degradan polietileno, y que son caracterizados como degradadores de lignina. La mayor actividad enzimática fue dada por las lipasas, que aunque no se presentó degradación, posiblemente hubo una inducción de actividad.

Un método para poder inducir degradación para estos plásticos podría ser un tratamiento con luz UV o un tratamiento térmico antes de comenzar el proceso de composteo, ya que estos métodos podrían aumentar la biodisponibilidad.

VIII BIBLIOGRAFÍA

AETOX (2008) Glosario de términos toxicológicos IUPAC [en línea] <http://www.uv.es/aetoxweb/info/glosater/glosater.bc.html> [citado el 15/06/09]

Albert L. A., López S. M. y Flores J. (1995) Diccionario de la contaminación. Centro de Ecología y Desarrollo. México, 85 pp.

Ambriz K. T. (1998) Estudio y aplicación de la prueba de biodegradabilidad aerobia rápida OECD 301 A. *Tesis de Licenciatura* Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 206 pp.

Ambriz K. T. (2001) Estudio fisicoquímico y microbiológico de la biodegradabilidad aerobia rápida de inhibidores de hidratación de arcillas empleados en la formulación de fluidos de perforación *Tesis de Licenciatura* Facultad de Química, UNAM, México, D.F., 189 pp.

APHA (1998) Standard Methods for the Examination of Water and Waster Analysis. American Public Health Association . 20th edition. AWWA and WPF, Washigton D.C. E.E. U.U.A.

Artham T. y Doble M. (2008) Biodegradation of aliphatic and aromatic polycarbonates; *Macro Biosci* 8 (1):14-24

ASTM D883-00 "Standard Terminology to Plastics", ASTM, West Conshohocken, PA 2000.

ASTM D1239-99 "Standard Test Methods for pH of Water", ASTM, West Conshohocken, PA 1999.

ASTM D3987 "Standard Test Method for Shake Extraction of Solid Waste with Water" , ASTM, West Conshohocken, PA 1992.

ASTM D5209 "Standard Test Method for Determining the Aerobic Biodegradation of plastic Materials in the Presence of Municipal Sewage Sludge", ASTM, West Conshohocken, PA 1992.

ASTM D5247 "Standard test Method for Determining the Aerobic Biodegradability of Degradable Plastics by specific Microorganisms" , ASTM, West Conshohocken, PA 1992

ASTM D5338 "Standard Test Method for Determining Aerobic Biodegradation of Plastic Materials under Controlled Composting Conditions", ASTM, West Conshohocken, PA 1999.

Cacciari I., Quatrini P., Zirletta G., Mincione E., Vinviguerria V., Lupattelli P. y Sermani G. (1993) Isotactic polypropylene biodegradation by a microbial

community: physicochemical characterization of metabolites produced. J Appl Microbiol 59(11) 3695-3700 .

Camacho,A., Giles M., Ortegón A., Palao M., Serrano B. y Velásquez O. (2009) Técnicas para el Análisis Microbiológico de Alimentos. 2ª ed- Facultad de Química. UNAM. México.

Cortinas C. (2007) Regulación y gestión de productos químicos en México enmarcados en el contexto internacional Publicación del INE. [en línea]
<http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/33/introdu.html#top>, [citado el 11/05/2009]

Coyne M. (2000) Microbiología del Suelo: un enfoque exploratorio. 1ª ed.España 415 pp.

Dalzell H. W., Biddlestone A. J., Gray K. R. y Thurairajan K. (1991) Manejo del suelo. Producción y uso del composte en ambientes tropicales y subtropicales. Boletín de suelos de la FAO No. 56, Roma. 178 pp.

Diaz L. F., Savage G. M., Eggerth L. L. y Golueke C. G. (1993) Composting and recycling Municipal Solid Waste, USA 1993.

Díaz. L. (2007) El reciclado del polietileno en el contexto del desarrollo sustentable. *Tesis de Licenciatura* (Ingeniero Químico). Facultad de estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, D.F 133 pp .

Díaz R., Gamazo c., López-Goñi I.(2005), Manual práctico de microbiología, Masson,3ª ed. Barcelona, España 227 pp.

Gaitan Z. N. (2006) Evaluación ecotoxicológica de composta producida con residuos vegetales de humedales artificiales y lodos primarios a escala de laboratorio, Tesis de Maestría, México, D.F 135 pp.

Gomez A., Gil T. (1998) Los plásticos y el tratamiento de sus residuos Universidad Nacional de Educación a distancia, España 348 pp

Kale G., Kijchavengkul T., Auras R., Rubino M., Selke y Singh S., (2007) Compostability of bioplastic packaging materials: an overview. *Macromol. Biosci.*, 7, 255-277.

Harper C.A. (1992) Handbook of Plastics, elastomers and composites. Mac Graw Hill, 2º Ed., N.Y.;1805pp.

Haug R. T. (1993) The practical handbook of compost engineering Boca Raton, 1ª Ed. 717 pp.

Infojardín (2007) Fases de un proceso de compostaje aerobio [en línea] imagenes.infojardin.com/.../viu1195994933f.JPG [citado el 11/05/2009]

Madigan M., Martinko J. y Parker J. (2006) *Biología de los Microorganismos*. Pearson Prentice Hall, 10° Ed. España, 1096 pp.

Martin A.M. (1998) *Bioconversion of Waste to Industrial*, 2 edición, Departamento de Bioquímica, Universidad de Newfoundland, Canada.556 pp.

Martínez F.P. (2007) *Importancia y perspectiva de la industria del plástico en México. Tesis de Licenciatura* (Licenciado en Economía). Facultad de Economía, UNAM, México, D.F, 62 pp.

Massiani C. y Domeizel M., (1994) *Quality of Composts: Organic Matter Stabilization and Trace Metal Contamination. The Science of Composting V.I.* 185pp.

Meneses L., Tinelli M. y Díaz S. (2001) *Generalidades sobres polímeros y plásticos, usos y tipos* [en línea]. www.geocities.com/.../plastic1, [citado el 11/05/2009]

Quintero L. R.; Ferrera-Cerrato R. y Etchevers J. D., (2005) *Manual para la medición de actividades enzimáticas en compost y vermicompost*, México, 51 pp.

Shah A., Hasan F., Hammed A., Ahmed S. (2008) *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*. *Biotec Adv* 26: 246-265.

Tiquia S.M. (2002) *Evolution of extracellular enzyme activities during manure composting*. *J Appl Microbiol* , 92, 764-775

Sarasa J., Gracia J. y Javierre C. (2008) *Study of biodesintegration of a bioplastic material waste*. *Bioresour. Technol.* 1-5

Shimao M. (2001) *Biodegradation of plastics.. Current Opinion in Biotechnology* 2001, 12:242-247.

Vaz-Moreira I., Silva M., Manaia M. y Nunes O., (2007) *Diversity of Bacterial Isolates from Commercial and Homemade Composts*. *Microb Ecol*

Vazquez R. y Beltrán H. (2004) *Pruebas normalizadas para la evaluación de la biodegradabilidad de sustancias químicas. Una revisión*. *INCI 29* (10) Venezuela.

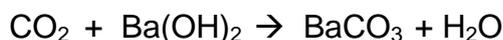
Vona I.A., Costanza J.R., Roberts WJ (1965) *Manufacture of plastics*, vol. 1 New York:Wiley 141-142.

IX ANEXOS

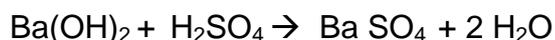
IX. 1 ASTM D5338. Método Estándar de prueba para determinar la biodegradación aerobia de materiales plásticos bajo condiciones controladas de compostaje

IX.1.1 Determinación de CO₂

Para determinar la cantidad de CO₂, en un matraz colocar 50 ml de Ba(OH)₂ a la salida de la cámara de compostaje y dejar burbujear durante 30 minutos, de esta manera al reaccionar el CO₂ con la solución de Ba(OH)₂ se forma BaCO₃ siendo visible en forma de un precipitado blanco.



Lo que no reacciona de Ba(OH)₂ ,titular con H₂SO₄ utilizando como indicador fenoftaleína.



Conociendo el volumen de H₂SO₄ utilizado para neutralizar el Ba(OH)₂ que no reaccionó, se obtuvo el valor final de equivalentes de Ba(OH)₂ . conociendo el número de equivalentes iniciales y los finales se obtuvo el número de equivalentes de CO₂.

No. Eq CO₂ = No. Eq. Ba(OH)₂ iniciales - Ba(OH)₂ finales.

El número de equivalentes se convierte a moles, de esta manera determinamos los gramos de CO₂. Esto se hizo para las muestras, el control y el blanco.

IX.1.2 Biodegradación

Para determinar el porcentaje de biodegradación.

% biodegradación= (g de C_{muestra} - g de C_{blanco}) / g de C_{control})x 100.

El valor de referencia que se tomo fue el de la celulosa, tomándolo como 100%. Lo cual la celulosa debió presentar al menos un 70% de biodegradación para que esta referencia se pudiera considerar como valida (ASTM D5338).

IX.2 Análisis fisicoquímicos

IX.2.1 Determinación de sólidos totales, a 105°C (APHA 2540 D)

- I. Secar los crisoles en la mufla 550°C por una hora.
- II. Dejar enfriar los crisoles en el desecador.
- III. Pesar los crisoles.
- IV. Colocar la muestra, siendo esta conocida (composta 20g, muestra 4 g)
- V. Dejar por una hora en el horno a 105°C.
- VI. Enfriar los crisoles con muestra en desecador.
- VII. Pesar los crisoles.
- VIII. Obtener la diferencia de pesos.

IX.2.2 Determinación de sólidos volátiles, a 550°C (APHA 2540 E)

- I. Después de haber pesado las muestras obtenidas de la determinación de sólidos totales, colocar en la mufla a 550°C por dos horas o hasta observar cenizas blancas.
- II. Enfriar los crisoles en desecador.
- III. Pesar los crisoles.

IX.2.3 Determinación del pH (ASTM D3987 y D1293)

- I. Determinar los sólidos totales de la muestra.
- II. Pesar aproximadamente 20 g de la muestra.
- III. Agregar 20 veces en mL el peso de la muestra.
- IV. Agitar por 24 horas a una temperatura ambiente.
- V. Filtrar con papel filtro.
- VI. Medir el pH de la solución con potenciómetro

IX.3 Análisis microbiológicos

IX.3.1 Medios de cultivo

Amilolíticos

Los reactivos se pesan y se mezclan en 500 mL de agua destilada en un matraz de 2 L, se ajusta el pH a 7 y se afora con una probeta de 1000 mL a un volumen de 1 L. Se esteriliza por 15 minutos, a 121°C. Se deja enfriar y se vacían en cajas Petri de 15 mL.

Agar almidón (Bacterias amilolíticas)

	g/L
Agar bacteriológico	15.0
Almidón	3.0
Extracto de levadura	5.0
Peptona de carne	5.0
K ₂ HPO ₄	5.0

Celulolíticos

Los reactivos se pesan y se mezclan en 500 mL de agua destilada en un matraz de 2 L, se ajusta el pH a 7 y se afora con una probeta de 1000 mL a un volumen de 1 L. Se esteriliza por 15 minutos, a 121°C. Se deja enfriar y se vacían en cajas Petri de 15 mL.

Agar celulosa

	g/L
Agar bacteriológico	15.0
Celulosa microcristalina	10.0

Lipolíticos

Los reactivos se pesan y se mezclan en 500 mL de agua destilada en un matraz de 2 L , se ajusta el pH a 7 y se afora con una probeta de 1000 mL a un volumen de 1 L. Se esteriliza por 15 minutos, a 121°C. Se deja enfriar y se vacian en cajas Petri de 15 mL.

Agar (Bacterias lipolíticas)

	g/L
Agar bacteriológico	16.0
CaCl	0.1
NaCl	5.0
Peptona	10.0
Polisorbato 80	10 ml

Proteolíticos

En un matraz Erlenmeyer de 500 mL, disolver leche en 250 mL y en un matraz Erlenmeyer de 1 000 mL, disolver la dextrosa y el agar en 750 mL. Ajustar el pH a 7. Esterilizar durante 15 minutos.

Agar de leche descremada

	g/L
Agar bacteriológico	15.0
Dextrosa	10.0
Leche descremada	15.0

Sacarolíticos

Agar mínimo (Bacterias Sacarolíticas)

	g/L
K_2HPO_4 dibasico	7.0
$KHPO_4$ monobasico	2.0
Sulfato de amonio	1.0
Citrato de sodio	0.5
Sacarosa	10
Agar bacteriológico	15

Para la preparación de este medio, se preparan 3 soluciones. La primera solución se prepara con el fosfato dibásico y monobásico, sulfato de amonio y citrato de sodio en 300 mL de agua destilada en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. La segunda solución se prepara disolviendo la sacarosa en 350 mL en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. La tercera solución se disuelve el agar en 350 mL en un matraz Erlenmeyer de 500 mL. Se esteriliza a 121°C por 15 minutos. Se prepara vitamina B1 (tiamina) al 2% y sulfato de magnesio al 10%, se filtra para esterilizar y se vacía en tubos ependorf de un mL. Por cada litro se agrega 1 mL de vitamina B1 y 1 mL de sulfato de magnesio, se mezclan las tres soluciones y se vacía de 15 a 20 mL por caja Petri.

IX.3.2 Cuenta en placa

La técnica se basa en contar las “unidades formadoras de colonias” o UFC presentes en un gramo o mililitro de muestra. Se considera que cada colonia que desarrolla en el medio de cultivo de elección después de un cierto tiempo de incubación a la temperatura adecuada, proviene de un microorganismo o de un agregado de ellos, de la muestra bajo estudio; ese microorganismo o microorganismos son capaces de formar la colonia, es decir una UFC. Para que las colonias puedan contarse de manera confiable, se hacen las diluciones decimales necesarias de la muestra, antes de ponerla en el medio de cultivo;

En este método de cuenta de crecimiento microbiano es necesaria la preparación de una solución isotónica, para hacer una serie de diluciones del cual se va a tomar a las bacterias y se van a crecer en cajas Petri con medios de cultivo preparados previamente.

Solución Isotónica

Posteriormente a la toma de muestra y como parte del análisis, se hace una dilución primaria cuya finalidad es lograr obtener una muestra representativa del alimento, esto es, tanto en el aspecto cualitativo (diferentes tipos de bacterias) como en el cuantitativo, y así lograr una distribución lo más uniforme posible, de los microorganismos contenidos en la muestra destinada al análisis. Con este fin, se utiliza un diluyente que favorezca la recuperación de los microorganismos presentes, para ponerlos de manifiesto cuando se cultiven; para lograrlo, el diluyente debe tener la osmolaridad y el pH favorables para iniciar la recuperación y actividad de las células microbianas presentes, así como para favorecer aquellas que se buscan entre una población mixta (Camacho et. al., 2009).

En un matraz ErlenMeyer se prepara la solución con agua destilada adicionando NaCl a una concentración de 0.8%. En tubos de ensaye se adicionan 9 mL de la solución y se tapan con una algodón para esterilizarlos en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Preparación de diluciones

1. Marcar los tubos que contienen la solución isotónica con la dilución correspondiente y colocarlos en una gradilla.
2. La suspensión de composta preparada es agitada vigorosamente.
3. Introducir la micropipeta a la suspensión de composta y tomar 1 mL, transferirlo a un tubo con 9 mL de solución isotónica.
4. Tapar el tubo y agitar.
5. Con una nueva punta estéril tomar 1 mL y en otro tubo volver a transferirlo a un tubo con 9 mL de solución isotónica.
6. Tapar y agitar.
7. Para cada dilución se repiten los pasos 4 y 5, como se muestra en la figura.

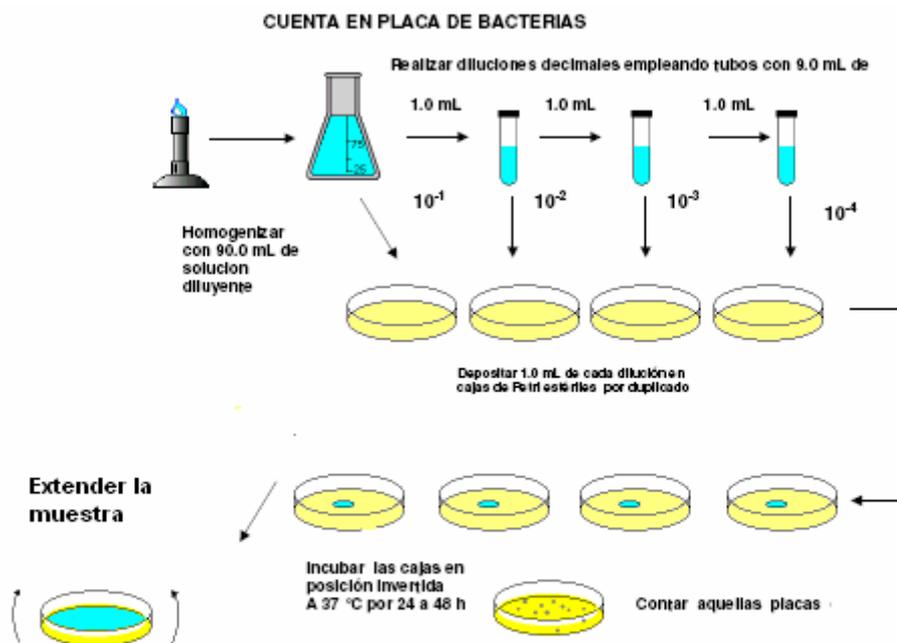


Figura 1. Cuenta en placa de bacterias

Extensión superficial en placa

1. Marcar las bases de las cajas, con los siguientes datos: medio, No. de muestra, dilución y fecha.
2. Distribuir las cajas en la mesa de trabajo estéril para un mejor manejo.
3. Se agita el tubo con la dilución y se toma 1 mL colocándolo en la caja con medio.
4. Para distribuir de manera homogénea, extender el inóculo utilizando una varilla de vidrio estéril (en forma de escuadra o "L") haciendo movimientos giratorios de manera perpendicular al medio de cultivo, hasta lograr la completa incorporación del inóculo en el medio; cuidar que el inóculo se absorba antes de incubar (se recomienda un tiempo de espera aproximado de 10 minutos) (Camacho et al., 2009).
5. Incubar las cajas de forma invertida y durante 48 horas a $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
6. Después de transcurrido el tiempo, contar las colonias. Las cajas viables son aquellas que contienen entre 30 y 300 colonias.
7. Calcular el número de bacterias por mL de muestra:

$$UFC \text{ mL}^{-1} = \text{no. colonias} \times 10 \times \text{recíproco de la dilución.}$$

IX.3.3 Frotis bacteriano

La preparación de un frotis es importante para la observación de bacterias, ya que estas al no poseer coloración es necesario emplear tinciones para observar su tamaño y morfología al microscopio, quedando adheridas al portaobjetos.

Realización de un frotis bacteriano.

- I. Colocar una gota de agua en el portaobjetos.
- II. El asa microbiológica es flameada en el mechero, y una vez enfriada se toma la muestra, extendiéndola en la gota.

- III. Dejar secar la gota de agua con muestra.
- IV. Una vez seca, pasar tres veces el portaobjetos por la flama.

Ya que se han hecho un frotis puede hacerse una tinción.

IX.3.4 Tinción de Gram.

El objetivo de esta tinción es distinguir bacterias Gram positivas de Gram. negativas. Y su principio es teñir la pared de las bacterias, en esta tinción se utiliza cuatro soluciones, el cristal violeta el cual es un colorante básico que al hacer contacto con la célula cargada negativamente se colorea, un solución mordiente la cual fija la tinción y aumenta la afinidad con el colorante Ambriz 1998 , esta solución suele ser sales metálicas, ácidos o bases, y la empleada es el lugol; la otra solución es un agente decolorante, siendo este un disolvente orgánico el cual se utiliza el alcohol cetona; y un colorante de contraste, con un pH básico diferente del primero el cual es la safranina.

Los pasos para hacer una Tinción de Gram son los siguientes:

- I. Hacer un frotis bacteriano.
- II. Teñir con cristal violeta y dejar actuar por un minuto.
- III. Lavar con agua para quitar el exceso de colorante.
- IV. Colocar el lugol y dejar actuar por un minuto.
- V. Lavar con agua para quitar el exceso de lugol.
- VI. Decolorar con alcohol-cetona por 30 segundos.
- VII. Lavar con abundante agua.
- VIII. Teñir con safranina y dejar actuar por un minuto.
- IX. Lavar con agua para quitar el exceso de colorante.
- X. Dejar secar la preparación.

En esta tinción las bacterias Gram positivas se teñirán de azul, ya que el cristal violeta es atrapado en la pared, mientras que las Gram negativas se colorean

de rosa, ya que pierden el colorante azul pero retienen en rosa. Esta diferencia esta dada por la composición de la pared, las Gram negativas presentan una capa gruesa de peptidoglicano en la parte más externa mientras que las Gram positivas presentan una capa de peptidoglicano cubierta por una membrana externa.

IX. 4 Pruebas de toxicidad

IX.4.1 Prueba de toxicidad acuática.

Preparación del extracto

Tamizar la composta

Pesar 20 g de composta y agregar 180 mL de agua destilada

Dejar en agitación por 24 horas

Filtrar con papel Watman No. 1

Preparar el extracto a concentraciones de 100%, 50%, 25%, 10%, 5%

En cajas petri, colocar papel Watman no. 1

Colocar 10 semillas y distribuirlas en toda el área.

Adicionar 5 mL de la solución correspondiente y marcar.

Se ponen a germinar 3 cajas solo con agua, como control.

Incubar a 22°C por 5 días para lechuga y 7 días para trébol y jitomate.

Contar número de semillas germinadas.

IX.4.2 Prueba de toxicidad terrestre

- I. Obtener la composta de la cámara de compostaje
- II. En un germinador , llenar totalmente los pozos con la composta

- III. Hacer un agujero, no muy profundo en cada pozo
- IV. Colocar una semilla por cada pozo
- V. Dependiendo de la especie de semilla, esperar a que germinen y contar el número de semillas.
- VI. Esperar 23 días para determinar su sobrevivencia.

IX.4.3 Datos de especies probadas

Lechuga

- Variedad / especie: *Lactuca sativa*, Great Lakes 407
- Familia: Compositae
- Nombre común y científico, Lechuga
- Proveedor de la semilla: Westar Seeds Internacional Inc.
- Germinación: 85%
- No. Lote: 521 2333
- Año de la semilla: 4/2006
- Fecha del grado de germinación: 4/2006

Cebolla

- Variedad / especie: *Allium cepa*. L.
- Familia: Liliáceas
- Nombre común y científico: Cebolla Blanca
- Proveedor: Distribuidora Rancho Los Molinos
- Germinación: 80%
- No. Lote: 0940
- Año de la semilla: 5/2008
- Fecha del grado de germinación: 5/2008

Jitomate

- Variedad / especie: ACE VF 55

- Familia: *Solanaceae*
- Nombre común y científico, Jitomate, *Solanum lycopersicum*
- Proveedor de la semilla: Westar Seeds Internacional Inc.
- Germinación: 85%
- No. Lote: 434 4132
- Año de la semilla: 1/2005
- Fecha del grado de germinación: 1/2005

Trébol

- Familia: *Fabaceae*
- Nombre común y científico, Trébol, *Trifolium pratense*
- Proveedor de la semilla: Casa de semillas Xochimilco
- Germinación: 80%
- Año de la semilla: 11/2008

X GLOSARIO

Biodegradabilidad inherente: Capacidad, demostrable por ensayos apropiados, de que una sustancia puede ser metabolizada por seres vivos (AETOX, 2008).

Composteable: capacidad de descomposición biológica, teniendo que cumplir con los parámetros en que el plástico no debe de poder visualizarse,

Concentración letal media (CL50). Concentración, que se espera que mate al 50% de los organismos de una población bajo un conjunto de condiciones definidas (AETOX, 2008).

Control cero: un cultivo sin plástico (ASTM 5247, 1992).

Degradación: cambios en la estructura química, propiedades físicas o apariencia del plástico.

Enzima: son proteínas que actúan como catalizadores orgánicos, transformando sustancias orgánicas e inorgánicas sin experimentar cambios en sí.

Homopolímero: un polímero resultado de la polimerización de un único monomero (ASTM D 883, 1985).

Isotáctico: perteneciente a un tipo de estructura molecular que contiene secuencias de átomos asimétricos regularmente espaciados arreglado en cadenas.

Litótrofos: organismos que rompen enlaces inorgánicos.

Monómero: sustancias de bajo peso molecular que contienen moléculas capaces de reaccionar con moléculas para formar un polímero (ASTM D 883, 1983).

Organótrofos: organismos que rompen enlaces orgánicos.

pH: valor negativo del logaritmo de la concentración de iones hidrógeno (H^+) en una solución (Madigan et al., 2006).

Película: en plásticos, es un término opcional para denominar a una plástico con un grosor no mayor a 0.25 mm (ASTM D 883, 1985).

Plástico biodegradable: se considera que un plástico es biodegradable cuando la degradación es resultado de la acción natural de los microorganismos tales como bacterias, hongos o algas (ASTM D 6002, 1996).

Plástico composteable: un plástico que bajo degradación biológica durante el composteo produce CO_2 , agua, compuestos inorgánicos y biomasa, a una tasa consistente con otros materiales composteables. No presenta

residuos tóxicos y no puede visualizarse en la composta (ASTM D 883, 1996).

Plástico degradable: es un plástico diseñado para tener cambios en su estructura química bajo condiciones ambientales, presentando pérdida de algunas de sus propiedades (ASTM D883, 1991).

Plástico reciclado: plásticos compuestos de material utilizado o solo de material recolectado, o ambos, que puede ser o no sujeto a procesos adicionales para hacer productos, tales como plásticos reconstituidos o reprocesados (ASTM D 883, 1985).

Plástico residual: material plástico en el medio de cultivo después de la incubación (ASTM 5247, 1992).

Plástico virgen: material plástico en forma de bolitas, gránulos, laminar o líquido que no ha sido sujeto de proceso o uso (ASTM D 883, 1985).

Polímero: una sustancia que contiene moléculas caracterizadas por la repetición de uno o más tipos de unidades monoméricas (ASTM D 883, 1971).

Polimerización: es una reacción química en la cual los monómeros son enlazados a otros polímeros.