



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

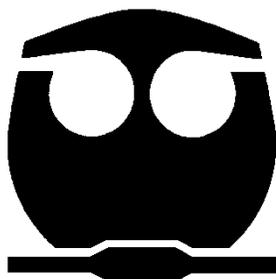
**“IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS PRESENTES EN COMPOSTA
DURANTE LA BIODEGRADACIÓN DE PELÍCULAS DE POLIETILENO CON
ADITIVOS PRO-OXIDANTES”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

MIRIAM FLORES GARCÍA



MÉXICO, D.F.

2015



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: María Del Socorro Alpizar Ramos

VOCAL: Profesor: Alejandro Camacho Cruz

SECRETARIO: Profesor: Isaura Yañez Noguez

1er. SUPLENTE: Profesor: Martha Giles Gómez

2° SUPLENTE: Profesor: Beatriz Ruiz Villafan

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: INSTITUTO DE INGENIERÍA,
LABORATORIO DE INGENIERÍA AMBIENTAL, UNAM.**

ASESOR DEL TEMA:

M. EN C. ISaura YAÑEZ NOGUEZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

DRA. MARÍA TERESA ORTA LEDESMA

SUSTENTANTE:

MIRIAM FLORES GARCÍA



ÍNDICE

MARCO TEÓRICO	11
PLÁSTICOS	11
INDUSTRIA DEL PLÁSTICO	12
POLIETILENO Y BOLSAS DE PLÁSTICO	16
DEGRADACIÓN DE PLÁSTICOS	18
Degradación foto-oxidativa	19
Degradación térmica.....	19
Degradación inducida por ozono	20
Degradación mecano-química	20
Degradación catalítica	21
Biodegradación.....	21
PANORAMA DE LOS PLASTICOS EN MÉXICO	22
COMPOSTAS	24
Sistemas de compostaje.....	28
METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS	33
Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).....	36
Fases de la PCR.....	37
Secuenciación	39
ANTECEDENTES	40
OBJETIVO GENERAL	45
OBJETIVOS PARTICULARES	45
METODOLOGÍA	46
RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS	57
AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS	57



CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS	57
AISLAMIENTO DE BACTERIAS.....	60
IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS	63
AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS	68
CONCLUSIONES	72
BIBLIOGRAFÍA	73



ABREVIATURAS

ABS	Acrilonitrilo Butadieno Estireno
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ANIPAC	Asociación Nacional de Industrias del Plástico A. C.
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
FTIR	Espectrometría Infrarroja con Transformada de Fourier
HPDE ó PEAD	Polietileno de Alta Densidad
INEGI	Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática
LDPE ó PEBD	Polietileno de baja densidad
LLDPE	Polietileno lineal de baja densidad
NCBI	Centro Nacional de Información sobre Biotecnología
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
PE	Polietileno
PET	Polietileno Tereftalato
pLDPE	Películas de polietileno de baja densidad
pLDPE+Co	Películas de polietileno de baja densidad adicionadas con estearato de Cobalto
pLDPE+Mn	Películas de polietileno de baja densidad adicionadas con estearato de Manganeso
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PUR	Poliuretano
PVC	Policloruro de Vinilo
RSU	Residuos Sólidos Urbanos
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
UFC/g	Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra
UV	Ultravioleta



INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Gráfica de la producción mundial de plásticos durante el año 2010, la producción total fue de 26 Millones de toneladas (Mt). Fuente: Grupo de Estudios de Mercado y de Estadística de PlasticsEurope (PEMRG).....	13
Figura 2: Gráfica de la demanda Europea de plásticos por tipo de resina en 2010. Fuente: Grupo de Estudios de Mercado y de Estadística de PlasticsEurope (PEMRG).....	14
Figura 3: A) Producción porcentual de los distintos tipos de resinas en México en el año 2010 de un total de 3, 812,555 toneladas fabricadas. B) Porcentaje de los distintos tipos de resinas utilizadas en México durante 2010. (ANIPAC 2011)	15
Figura 4: Fotografía tomada en Naucalpan de Juárez, ejemplo de la composición de la basura arrojada en una esquina de avenidas.....	17
Figura 5: Gráfico del volumen de residuos plásticos generados en México anualmente desde 1995 hasta 2012 (INEGI, 2014).	18
Figura 6: Gráfica que muestra la composición de los residuos sólidos urbanos en el año 2012 (INEGI, 2014).....	25
Figura 7: Compostaje en pila estática (Landín, 2010).....	29
Figura 8: Compostaje en hileras (Cooperband, 2002).....	30
Figura 9: Tipos de contenedores utilizados para compostaje (FAO, 2013).....	30
Figura 10: Lombriz rubellus utilizada en lombricomposta (Landín, 2010)	31
Figura 11: Fases de la PCR (modificada de McPherson, 2007).....	38
Figura 12: Arreglo de reactores utilizados para la biodegradación de películas de LDPE (pLDPE) elaboradas con dos diferentes aditivos pro-oxidantes.....	46
Figura 13: A) Perlas de polietileno mezcladas con aditivos pro-oxidantes. B) Horno marca Felisa en el cual se sometieron a termo-oxidación las películas elaboradas con aditivos pro-oxidantes.	47
Figura 14: Metodología empleada para el aislamiento e identificación de bacterias y hongos presentes en composta, durante un proceso de biodegradación de pLDPE elaboradas con aditivos pro-oxidantes: estearato de manganeso y estearato de cobalto.....	48
Figura 15: Frasco de vidrio, ejemplo de los utilizados como reactores.	49



Figura 16: Muestras de composta, antes de ser homogeneizadas con el agua de dilución. 50

Figura 17: Frascos de dilución con muestra de composta, previo a su homogeneización. Las letras L, M y N son algunas de las claves asignadas a las muestras tomadas de los reactores. 51

Figura 18: Kit utilizado para la extracción de ADN bacteriano..... 53

Figura 19: Fotografías del Termociclador empleado para la realización de la PCR 54

Figura 20: Cajas Petri con agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol, en las cuales se realizó la siembra directa de las muestras de composta..... 55

Figura 21: Imágenes de bacterias aisladas a partir de la composta madura que fue utilizada para el proceso de biodegradación de las pLDPE+Mn y pLDPE+Co. En estas imágenes podemos observar diferentes tipos de morfologías, podemos notar que en cada imagen, la cual corresponde a un aislamiento distinto, sólo se observa un tipo de morfología colonial, lo cual es indicativo de un cultivo puro.... 60

Figura 22: Imágenes de tinciones de Gram vistas al microscopio óptico con el objetivo de 100X, en los recuadros A, C, D, E y F se observan bacterias de tipo Gram positivas, mientras que en B se logran visualizar bacterias de tipo Gram negativas, en B y D se observan bacilos agrupados en cadenas. En la imagen F se logra observar la presencia de posibles esporas..... 61

Figura 23: Imágenes de tinciones de esporas, vistas al microscopio óptico con el objetivo de 100X, en las cuales podemos observar endosporas (A, B, C, D, E y F), células vegetativas (A, B, C, D, E y F) y algunas esporas libres (F). 62

Figura 24: Fotografía de uno de los geles elaborados, colocado en cámara de electroforesis, ya con muestras..... 64

Figura 25: Fotografía del equipo empleado para medir la concentración de ADN (NanoDrop 2000)..... 64

Figura 26: Gel de agarosa a partir del cual fueron purificados los productos de la PCR..... 65

Figura 27: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como β , sembrado en agar Sabouraud. B) Imagen de un hongo del



género *Aspergillus fumigatus* (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambos casos se observa desarrollo de colonia plana de aspecto aterciopelado de color verde con halo blanco. 68

Figura 28: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como β , visto al microscopio óptico con un aumento de 40X. B) Imagen microscópica de un hongo del género *Aspergillus fumigatus* (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambas imágenes se observan cabezas aspergilaes con microconidios redondos. 69

Figura 29: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como A3, visto al microscopio óptico con un aumento de 40X. B) Imagen microscópica de un hongo del género *Rhizopus sp.* (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambas imágenes se observa esporangio con esporangiosporas... 69

Figura 30: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como B2, visto al microscopio óptico con un aumento de 40X. B) Imagen microscópica de un hongo del género *Mucor sp.* (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambas imágenes se observa esporangio con endosporas redondas. ... 70

Figura 31: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como B3, sembrado en agar Sabouraud. B) Imagen de un hongo del género *Rhizopus sp.* (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambas imágenes se observa un crecimiento velloso-algodonoso, de color blanco con tonos grisáceos. 70

Figura 32: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como B3, visto al microscopio óptico con un aumento de 40X. B) Imagen microscópica de un hongo del género *Rhizopus sp.*(Observada con aumento de 10X) (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambas imágenes se observa esporangio con esporangiosporas..... 71



INTRODUCCIÓN

El polietileno de baja densidad (Low Density Polyethylene por sus siglas en inglés LDPE), es uno de los plásticos más utilizados para la fabricación de empaques. En la actualidad ante la problemática que se presenta por la contaminación con residuos plásticos, se han tratado de adoptar medidas para disminuir este problema ambiental, una de las principales ha sido el cambio del tipo de plástico utilizado para la producción de bolsas o de empaques empleados para diversos tipos de alimentos, los cuales ahora son elaborados con plástico “biodegradable”.

El plástico biodegradable es un material que puede ser generado a partir de la introducción de aditivos durante, el proceso de producción de los materiales (bolsas, empaques y películas), los cuales son capaces de acelerar la reacción de oxidación del plástico en cuestión.

Complementario al desarrollo y producción de plásticos oxo-degradables, se busca que una vez que se tengan este tipo de plásticos, estos se puedan someter a ciertos procesos en los cuales se logre su descomposición e incorporación al medio ambiente de manera benéfica, un proceso que podría ser el más indicado para este fin es la elaboración de compostas.

Uno de los componentes más abundantes a lo largo de un proceso de compostaje son los microorganismos presentes, estos varían con respecto a las condiciones y a la etapa en la cual se encuentre la composta y son los encargados de llevar a cabo el proceso de transformación de los componentes iniciales al producto final, que será la composta o también denominado humus. La composta constituye un ecosistema en el que diversas poblaciones microbianas constituidas por bacterias, hongos y actinomicetos, degradan secuencialmente la materia orgánica en presencia de oxígeno (Moreno J. y Moral R.; 2007).



En muestras de polietileno de baja densidad mezcladas con un material inerte, suelos forestales o composta madura (como fuente de cepas microbianas) y que se incubaron a temperatura ambiente, se dio un período muy rápido de biodegradación de 30 días de duración, al final fue registrada la producción de dióxido de carbono alcanzando una meseta que corresponde a aproximadamente el 4% de mineralización y se mantuvo en este valor (Koutny M., et. al.; 2006), lo anterior puede ser un indicio de la reducción de actividad microbiana.

Dada la problemática ambiental respecto a la elevada generación de residuos plásticos, la implementación de tecnologías para favorecer su biodegradación y con la finalidad de determinar posibles situaciones adversas al ambiente, en este trabajo se evaluó el efecto de los aditivos pro-oxidantes presentes en películas de polietileno sobre la comunidad microbiana de composta.



PLÁSTICOS

Los plásticos ocupan un lugar muy importante dentro de la vida cotidiana de los seres humanos, esto gracias a que se han convertido en una gran ayuda para diversas situaciones como el empaque, protección o almacenamiento de diversos productos o materiales.

Plásticos elaborados en base a petroquímicos tales como poliolefinas, poliésteres y poliamidas se han utilizado cada vez más como materiales de embalaje debido a su disponibilidad en grandes cantidades a bajo costo y las características funcionales favorables, tales como buena resistencia a la tracción y resistencia al desgarre, buenas propiedades de barrera a los compuestos de oxígeno y el aroma y capacidad de sellado térmico (Tharanathan, 2003). El polietileno (PE), el tereftalato de polietileno (PET) y el nailon son algunos ejemplos de poliolefinas, poliésteres y poliamidas respectivamente.

Podemos encontrar una gran variedad de materiales elaborados a partir de plásticos (juguetes, bolsas, cubetas, utensilios de cocina, etc.), o que contienen alguna o algunas partes de plástico (electrodomésticos, aparatos electrónicos, el cableado de instalaciones eléctricas, etc.).

A pesar de que se hable en general de plásticos, no todos son del mismo tipo, es decir, existen varias clases de plásticos los cuales poseen diversas características que los hacen diferentes entre sí, a pesar de ello, todos son considerados polímeros debido a que son generados a partir de la polimerización de una cantidad variable de monómeros ya sea del mismo o de diferente tipo (homopolímeros y copolímeros respectivamente).

Las propiedades que caracterizan a cada uno de los tipos de plásticos dependen en gran medida del tipo de monómeros, la longitud de las cadenas formadas y el acomodo de estas en el material final (Cristán et al.; 2003).



MARCO TEÓRICO



Dependiendo del comportamiento de los plásticos cuando son expuestos al calor, estos se pueden clasificar en dos grupos: termoplásticos y termoestables (Alauddin et al., 1995).

Los termoplásticos pueden ser sometidos al calor y al enfriarse y solidificar tomarán la forma que se les haya dado, además de esto pueden volverse a fundir o suavizarse cuando son sometidos nuevamente a calentamiento. Los plásticos termoestables pasan por una etapa inicial de ablandamiento, pero tienden a carbonizarse con un calentamiento continuo, razón por la cual estos no pueden ser moldeados para darles una nueva forma (Cristán et al.; 2003).

INDUSTRIA DEL PLÁSTICO

La industria del plástico es una de las más productivas en diversas regiones del mundo, esto debido a la gran demanda que existe de este tipo de materiales, ya que como se mencionó anteriormente están presentes en diversos productos que se utilizan en la vida cotidiana.

Un ejemplo de lo anterior es que según lo reportado en 2011 por la asociación empresarial europea PlasticsEurope, durante el periodo que va de 2009 a 2010, la producción mundial de plásticos aumentó de 15 millones de toneladas a 265 millones de toneladas, lo que confirmó la tendencia a largo plazo del crecimiento de la fabricación de plásticos de casi un 5% anual durante las dos últimas décadas.

Según datos obtenidos de PlasticsEurope, en el año 2010, Europa reportó una producción de 57 millones de toneladas, lo que representa un 21,5% de la producción mundial de plástico, mientras tanto China superó a Europa como primera región productora con un 23,5% y en ese mismo año para América latina sólo se marca un 5% del total de la producción mundial (Figura 1) lo que equivale aproximadamente a 13 millones de toneladas elaboradas por países latinoamericanos.



Figura 1: Gráfica de la producción mundial de plásticos durante el año 2010, la producción total fue de 26 Millones de toneladas (Mt). Fuente: Grupo de Estudios de Mercado y de Estadística de PlasticsEurope (PEMRG).

Dentro del mercado existen diferentes tipos de plásticos, de los cuales son tres los que tienen una mayor demanda en Europa, estos son: el polietileno [de baja densidad (LDPE), lineal de baja densidad (LLDPE) y de alta densidad (HDPE)], el polipropileno (PP) y el policloruro de vinilo (PVC), que representan respectivamente el 29%, 19% y 12% de la demanda total de plásticos en los países Europeos (PlasticsEurope, 2011).

Otros tipos de plástico con presencia dentro del mercado Europeo son: el poliestireno (PS) que puede encontrarse sólido o expandido, el poliuretano (PUR), el PET, el acrilonitrilo butadieno estireno (ABS) y las poliamidas (Figura 2) (PlasticsEurope, 2011).

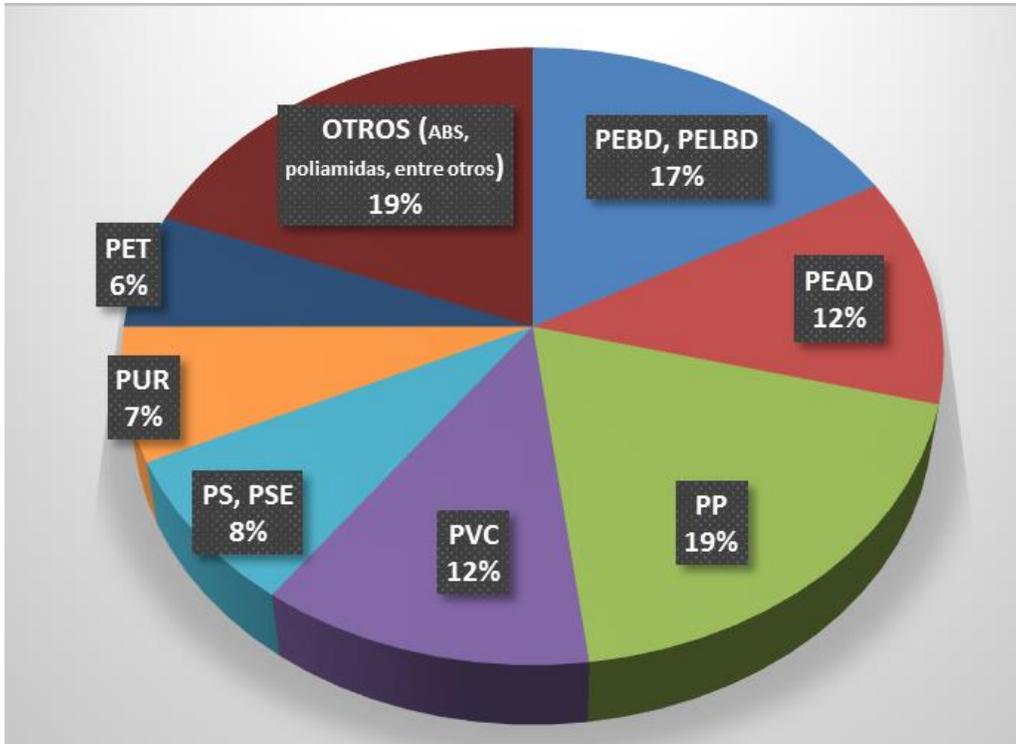


Figura 2: Gráfica de la demanda Europea de plásticos por tipo de resina en 2010. Fuente: Grupo de Estudios de Mercado y de Estadística de PlasticsEurope (PEMRG)

Durante el 2010 la producción de resinas plásticas en México fue de 3.8 millones de toneladas, dentro de estas las más producidas son el PET, el PVC, el PS, el LDPE (también conocido con sus siglas en español como PEBD) y en menor proporción el PP y HDPE (siglas en español PEAD), el desglose porcentual se puede observar en la Figura 3a.

La producción de plásticos en México resulta insuficiente para cubrir la demanda de los mismos en el país. Si hacemos un comparativo de las cantidades que son utilizadas en México de cada uno de los diferentes tipos de resina con los que son producidos, esto nos lleva a que la producción de la mayoría de ellas no es suficiente, lo cual implica su importación, como en el caso del PE (de baja y alta densidad) y del PP (Figura 3b).

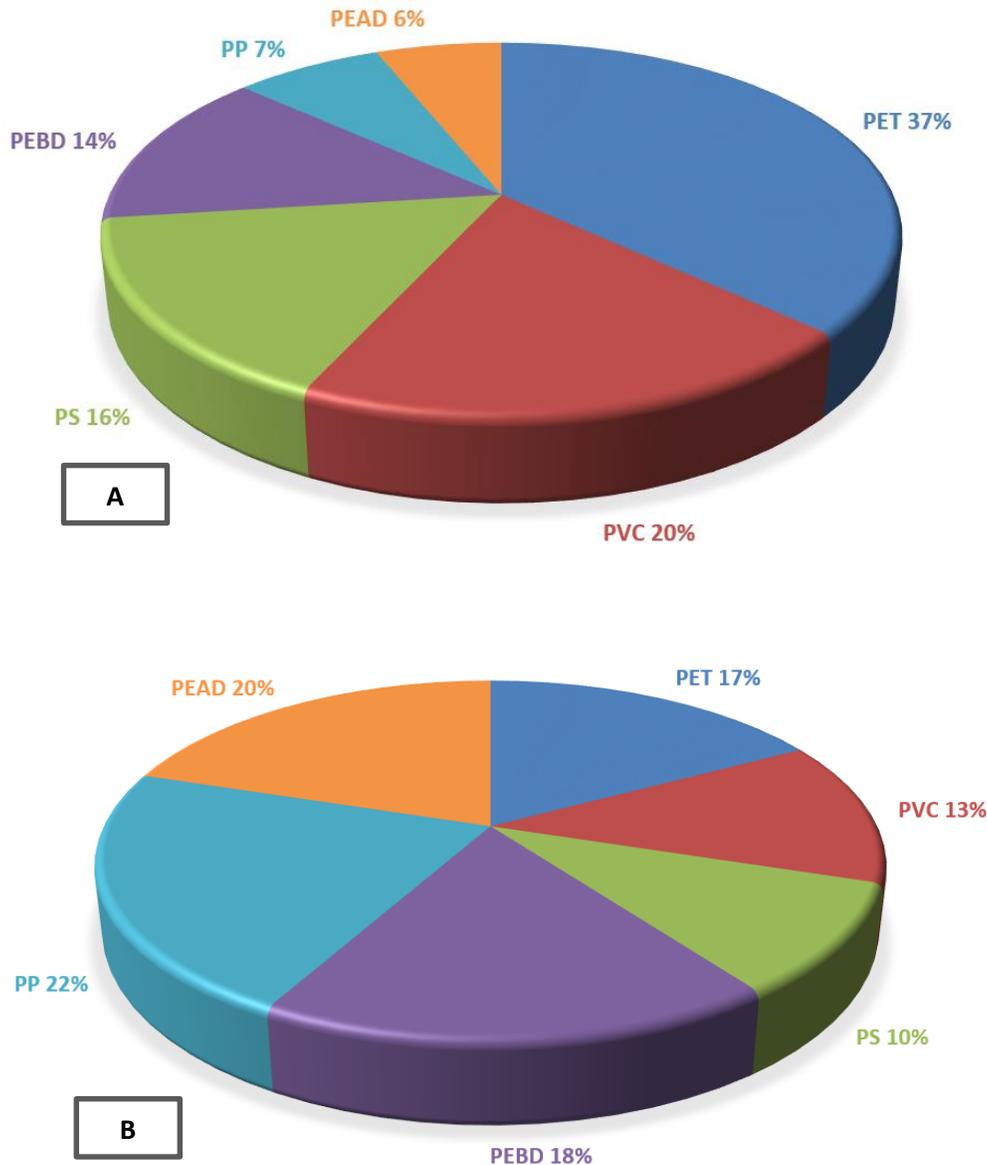


Figura 3: A) Producción porcentual de los distintos tipos de resinas en México en el año 2010 de un total de 3, 812,555 toneladas fabricadas. B) Porcentaje de los distintos tipos de resinas utilizadas en México durante 2010. (ANIPAC 2011)



POLIETILENO Y BOLSAS DE PLÁSTICO

De todos los tipos de plástico el más utilizado es el PE, el cual es elaborado a partir de la polimerización del monómero etileno (elaborado a partir del etano, que es uno de los componentes que se encuentran presentes en el gas natural), por lo tanto, el PE es considerado como un homopolímero (Billmeyer, 1978).

Debido a sus propiedades, el PE está clasificado como un termoplástico, este existe en varias formas, debido a las diferentes condiciones en las cuales es fabricado (presión y temperatura), entre estas se encuentran principalmente el HDPE y el LDPE. Dentro del LDPE se identifican dos formas principales, el LDPE en el cual se encuentran ramificaciones y el LLDPE, este último carece de ramificaciones en su estructura, y si las llega a poseer son pocas y muy cortas (Díaz, 2007).

El PE es un polímero muy utilizado en la industria, ya que es uno de los cinco insumos más empleados en la industria manufacturera, cerca de 35% de los productos de este sector se fabrican a partir de este polímero (Rosagel y Rodríguez.,2011), “El PE es el insumo más importante para la industria del plástico, pues cerca de 35% de los productos de este sector se fabrican a partir de este polímero, desde la bolsa tipo camiseta, hasta juguetes, tuberías, envases y tinacos”, mencionó Eduardo Martínez, presidente de la Asociación Nacional de Industrias del Plástico (ANIPAC) (Rodríguez y Rosagel, 2011).

Dentro del mercado del PE el tipo más utilizado es el LDPE, debido a que es utilizado principalmente para la elaboración de bolsas de plástico, las cuales se proporcionan en tiendas de autoservicio, mercados y tianguis. Estas bolsas en ocasiones son reutilizadas por los usuarios en otras actividades de la vida cotidiana, sin embargo a pesar de ser reutilizada finalmente llegarán a la basura.



MARCO TEÓRICO



El depósito final de estas bolsas puede ser variado, en el mejor de los casos son depositadas en botes de basura, recolectadas por camiones de basura y llevadas a rellenos sanitarios, pero frecuentemente son tiradas en las calles (Figura 4), donde si en principio pudieran ser recolectadas por los camiones, y tendrán el destino ya mencionado, por el contrario si no son acopiadas, muy probablemente llegaran a tapar las alcantarillas.



Figura 4: Fotografía tomada en Naucalpan de Juárez, ejemplo de la composición de la basura arrojada en una esquina de avenidas.

En el Distrito Federal, la contaminación por bolsas de plástico en las calles, es el principal problema en temporada de lluvias ya que tapan tuberías, cañerías y el drenaje, lo que genera severos encharcamientos e inundaciones (Informador.mx).

Cabe mencionar que de acuerdo a datos obtenidos del INEGI, la generación de residuos plásticos va incrementando año con año y se observa una tendencia de aumento aun mayor (Figura 5), lo cual es alarmante, puesto que con el incremento de residuos plásticos aumenta la probabilidad de la generación de problemas en el medio ambiente, como los señalados anteriormente.

Además del problema de la alta producción y el uso indiscriminado de las bolsas de plástico, otro importante problema radica en la mala cultura que se tienen acerca de su disposición final, dado que si se les recolectara para su reciclaje, y existieran las suficientes empresas dedicadas a este proceso, quizás el problema no tendría implicaciones nocivas para el medio ambiente y para los seres vivos que en el cohabitan.

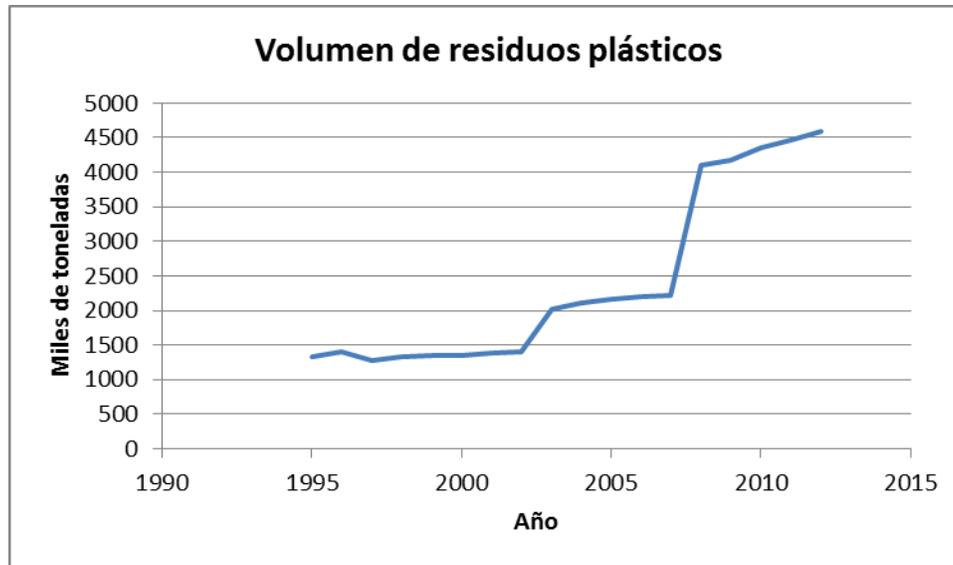


Figura 5: Gráfico del volumen de residuos plásticos generados en México anualmente desde 1995 hasta 2012 (INEGI, 2014).

DEGRADACIÓN DE PLÁSTICOS

Los plásticos al igual que diversos materiales como el cartón, el papel, la tela o la madera sufren procesos de degradación, aunque a diferencia de los procesos degradantes de estos últimos, los de los plásticos, se considera que son más lentos (Pérez, 2012).

Existen diferentes formas con las cuales se logra la degradación de los distintos tipos de plásticos. Dependiendo de la naturaleza de los agentes causantes de las degradaciones de polímeros, estas se han clasificado como: degradación foto-oxidativa, degradación térmica, degradación inducida por ozono, degradación mecano-química, degradación catalítica y biodegradación (Grassie *et al.*, 1985).

Los cambios en las propiedades del polímero debido a reacciones químicas, físicas o biológicas resultantes de escisiones de los enlaces y las transformaciones químicas posteriores se consideran como la degradación del polímero (Pospisil *et al.*, 1998).



Degradación foto-oxidativa

El proceso de degradación foto-oxidativa consiste en la descomposición del material por el efecto de la luz, que se considera como una de las principales fuentes de daño ejercida sobre sustratos poliméricos en condiciones ambientales normales. La mayoría de los polímeros sintéticos son susceptibles a la degradación iniciada por radiaciones UV y la luz visible. Habitualmente las radiaciones del UV cercano (290-400 nm) producidas por la luz del sol suelen determinar la vida útil de los polímeros en aplicaciones al aire libre (Ranby et al., 1989; Jensen et al., 2003; Sheldrick y Vogl, 2004).

La longitud de onda UV específica que puede generar el mayor daño para un plástico, depende en gran medida de los enlaces presentes en cada una de las estructuras de estos; por lo tanto, la degradación máxima se produce en longitudes de onda diferentes para los distintos tipos de plásticos. Por ejemplo, para el PE es aproximadamente de 300 nm y para el PP es de alrededor de 370 nm. Como resultado de este tipo de degradación se pueden obtener cambios en las propiedades físicas y ópticas del plástico (Singh y Sharma, 2008).

Degradación térmica

La degradación térmica al igual que la foto-degradación está clasificada como una degradación de tipo oxidativa, solo que, a diferencia de la degradación foto-oxidativa, como también se le conoce, las reacciones de degradación térmica se producen en toda la muestra de polímero y no sólo en la superficie (Tayler, 2004). La degradación térmica de los polímeros se produce a través de la degradación al azar de la cadena (reacción de despolimerización) iniciada por la temperatura y la luz ultravioleta (Teare et al., 2000).



La reacción de despolimerización en la degradación térmica no necesita ser iniciada en el extremo terminal de la macromolécula, ya que, las imperfecciones en la estructura de la cadena (fragmento iniciador, un peróxido o un enlace éter) forman un enlace débil desde donde se suele comenzar la despolimerización. Las poliolefinas son conocidas por ser sensibles a la oxidación térmica, debido a las impurezas generadas durante su fabricación a altas temperaturas (Khabbaz et al., 1999).

Degradación inducida por ozono

El ozono que se encuentra presente en la atmosfera suele causar la degradación de los polímeros en condiciones que pueden ser consideradas como normales, mientras que otros procesos de envejecimiento oxidativo son muy lentos y el polímero logra conservar sus propiedades durante un tiempo más prolongado (Cataldo, 1998; Cataldo et al., 2000). Se ha encontrado que con la exposición al ozono las características mecánicas de las películas de PE se ven deterioradas debido a la degradación de las macromoléculas presentes en la estructura de este.

Degradación mecano-química

Este tipo de degradación de polímeros implica el uso de tensión mecánica además del uso de irradiaciones ultrasónicas (Li et al., 2006). El desgaste de las cadenas moleculares bajo fuerza mecánica es a menudo favorecido por una reacción química, de ahí el nombre de degradación mecano-química, pues se conjuntan por una parte la fuerza mecánica y el uso de reacciones químicas. Por ejemplo, cuando se aplica una tensión excesiva, se logra la ruptura de la cadena molecular y se produce un par de radicales libres, que pueden participar en reacciones posteriores, en presencia de oxígeno se generan los radicales peroxi.



Degradación catalítica

El campo de la transformación catalítica de polímeros de desecho en hidrocarburos de mayor valor comercial es un campo en el cual se tiene un gran interés, sobre todo, para las industrias. El principal interés se ha dirigido hacia las poliolefinas (PE, PP, PS), que constituyen una parte importante de los residuos industriales y domésticos. La adición de un catalizador no sólo mejora la calidad de los productos obtenidos a partir de la pirólisis de residuos plásticos, sino que también permiten bajar la temperatura de descomposición (Marcilla et al., 2003).

Biodegradación

La biodegradación es una transformación bioquímica de compuestos llevada a cabo por microorganismos. Esta descomposición de compuestos orgánicos en condiciones aeróbicas genera como productos: dióxido de carbono y agua, mientras que en condiciones anaerobias produce metano y dióxido de carbono. La biodegradación de los polímeros puede ser favorecida mediante la degradación física de los polímeros, la foto o termo-oxidación o algún otro proceso que contribuya al incremento de la superficie de colonización microbiana o a la reducción del peso molecular del polímero en cuestión (Palmisano et al., 1992).

La biodegradación se ha definido de diversas maneras por diferentes investigadores, dependiendo en gran medida del mecanismo involucrado. Se define como el cambio en las propiedades de superficie o pérdida de resistencia mecánica debida a: la asimilación por microorganismos, la degradación por enzimas o la ruptura de la cadena principal y la posterior reducción en el peso molecular medio de los polímeros.

La degradación puede ser producida mediante los mecanismos antes mencionados, solos o en combinación uno con el otro, así como por uno o varios tipos de microorganismos. La biodegradación puede ocurrir en diferentes niveles estructurales, es decir, molecular, macromolecular, microscópico o macroscópico dependiendo del mecanismo implicado.



MARCO TEÓRICO



La susceptibilidad de los polímeros al ataque microbiológico, depende de la formulación del polímero, su morfología y cristalinidad, la presencia de ciertos grupos funcionales, la disponibilidad de enzimas y de un sitio dentro de la estructura de los polímeros para el ataque de las mismas, y también de la especificidad de enzimas hacia el polímero (Singh y Sharma, 2008).

La biodegradación también puede ser definida como, la conversión de materiales en productos intermedios menos complejos o productos finales por solubilización, hidrólisis simple o la acción de entidades formadas biológicamente, tales como enzimas y otros productos del organismo. La biodegradación de los polímeros se produce a través de cuatro mecanismos diferentes: de solubilización, formación de carga seguida de disolución, la hidrólisis y la degradación catalizada por la enzima (Gilding, 1981; Kronenthal, 1975).

PANORAMA DE LOS PLÁSTICOS EN MÉXICO

Ante la problemática que se presenta por la contaminación con residuos plásticos, se han tratado de adoptar diversas medidas para disminuir este problema ambiental. Una de las principales ha sido el cambio del tipo de plástico utilizado para la producción de ciertos tipos de bolsa o de empaques empleados para diversos tipos de alimentos, los cuales ahora son elaborados con plástico “biodegradable”. Se dice que este tipo de plástico es más amable con el medio ambiente, puesto que el periodo de degradación es menor que para el plástico anteriormente utilizado.

Otra medida implementada para disminuir la cantidad de bolsas presentes en los residuos plásticos, fue prohibir la entrega de manera gratuita bolsas desechables en los centros comerciales, esto logró darse mediante la aprobación de modificaciones a la Ley de Residuos Sólidos por parte de la Asamblea Legislativa del Distrito Federal en marzo del año 2009.



MARCO TEÓRICO



En algunas tiendas de autoservicio, se optó por realizar el cobro de las bolsas de plástico que se proporcionaban, no sin antes preguntarles a los consumidores si querían una bolsa e informándoles del costo que ahora tenían estas, quedando la decisión en el cliente, de si comprar bolsas cada que iban a las tiendas, reutilizar la bolsa adquirida con anterioridad o cargar con su bolsa de mandado. Sin embargo en ciertos lugares, seguían proporcionando de manera gratuita las bolsas, la justificación ante esto fue que el costo estaba incluido en el precio que ellos pagaban.

El uso de bolsas ecológicas ha sido una opción más para eliminar el uso de bolsas plásticas, solo que estas no tuvieron gran aceptación debido a que tienen un costo mayor a una bolsa de plástico. Lo cual es más conveniente para cuando se transportan pocas cosas o productos, además de que para muchas personas este tipo de bolsa no les generaba confianza puesto que tenían la idea de que eran muy frágiles y se les romperían en el trayecto.

Existe una campaña permanente denominada las 3R's (Reduce, Reutiliza, Recicla) en la cual se le indica al público en general que una manera de cuidar el medio ambiente es: reducir la cantidad de residuos que genera (dentro de los cuales se encuentra el plástico), reutilizar en la medida de lo posible las cosas que pueden ser reutilizables como es el caso de las bolsas entre otros artículos y finalmente llevar a cabo el reciclaje de los residuos generados. Existen varias formas de realizar el reciclaje, entre las más empleadas se encuentra la recolección de ciertos materiales para su venta o traslado a centros encargados de dicho proceso.

Ante la preocupación por el problema que representa el uso indiscriminado de bolsas, envolturas y empaques de plástico, en el año 2013 se inició una campaña por parte de la Secretaria del Medio Ambiente del Distrito Federal, denominada "Sin moño y sin bolsita, por favor", con la cual se intenta generar conciencia en la población para tratar de reducir la cantidad de residuos plásticos generados.



MARCO TEÓRICO



La alternativa que ha tenido un mayor auge, en el mundo, es la referida a la búsqueda y el desarrollo de materiales plásticos que sean más fácilmente degradados bajo condiciones medioambientales, es decir, que tengan una sensibilidad alta a factores como son: luz (foto-degradación), calor (termo-degradación) y microorganismos (biodegradación).

Este tipo de materiales pueden ser generados a partir de la introducción de aditivos, capaces de acelerar la reacción de oxidación del plástico en cuestión, al proceso de producción de los materiales plásticos (bolsas, empaques y películas). Los aditivos pro-oxidantes, como se les conoce, están elaborados a partir de metales de transición, que sean capaces de tener por lo menos dos estados de oxidación, como es el caso de: Co, Mn, Fe y Cu (Pablos et al, 2009).

Complementario al desarrollo y producción de plásticos oxo-degradables, se busca que una vez que se tengan este tipo de plásticos, estos se puedan someter a ciertos procesos en los cuales se logre su descomposición e incorporación al medio ambiente de manera benéfica. Esto posiblemente se podría lograr con la elaboración de compostas, en las cuales se lleve a cabo la degradación de estos materiales.

COMPOSTAS

La elaboración de compostas que se lleva a cabo mediante composteo o compostaje (proceso de tipo biológico), es una forma de utilizar los diversos residuos generados por la población, ya que en estas se emplean distintos tipos de materiales, incluyendo los orgánicos.

Según cifras reportadas, en el año 2014, por el INEGI (Figura 6), la basura orgánica generada ocupa un poco más del 50% de los residuos sólidos urbanos (RSU). Este uso sería altamente benéfico para el ambiente, pues no solo se utilizan los desechos, sino que, además se puede reincorporar al medio ambiente como abono orgánico.

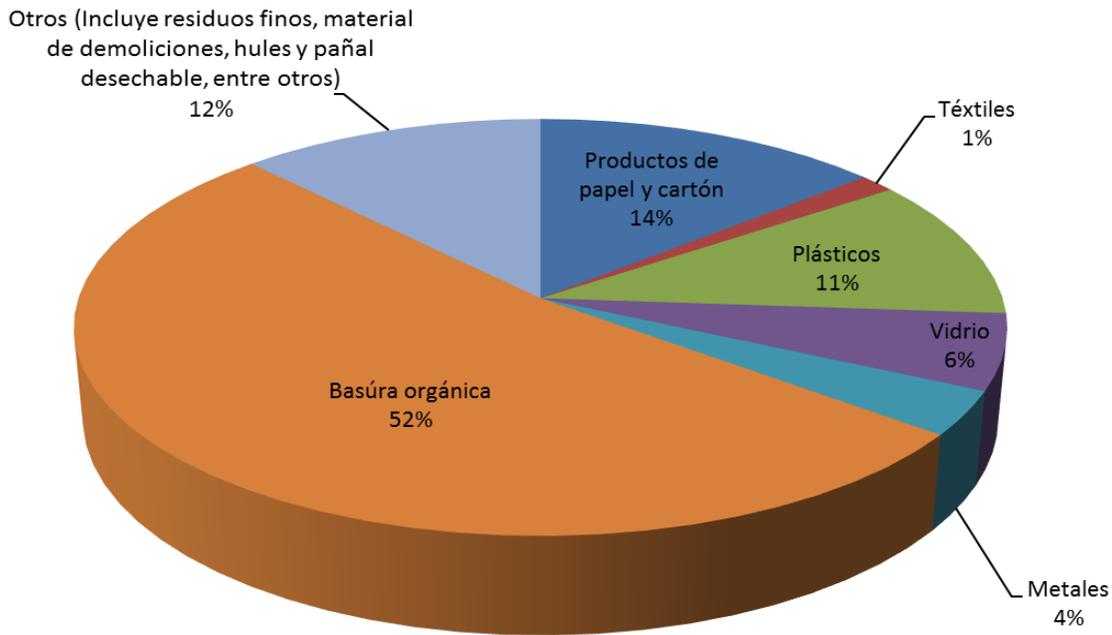


Figura 6: Gráfica que muestra la composición de los residuos sólidos urbanos en el año 2012 (INEGI, 2014).

Durante un proceso de compostaje se identifican tres etapas: mesofílica, termofílica y de enfriamiento. Existen algunos parámetros (humedad, pH, aireación y temperatura) que deben de ser considerados para que se obtenga una composta de calidad; que sirva como abono para las plantas y contribuya a proteger al suelo fértil contra la erosión, lo cual se logra con el aporte de materia orgánica de la composta al suelo.

Uno de los componentes más abundantes a lo largo de un proceso de compostaje son los microorganismos, estos varían con respecto a las condiciones y a la etapa en la cual se encuentre la composta y son los encargados de llevar a cabo el proceso de transformación de los componentes iniciales al producto final, que será la composta o también denominado humus.



MARCO TEÓRICO



La cantidad de microorganismos predominantes en una composta se determina por la composición de los residuos a compostar. La participación de diversos microorganismos (bacterias y hongos) que crecen en condiciones mesófilas o termófilas, es un requisito previo para la formación de la composta. La composición de las comunidades de microorganismos depende, en gran medida de la estructura de los componentes sometidos a la biodegradación y el contenido relativo de los mismos en las mezclas (Neklyudov *et al.*, 2008).

Con el fin de proporcionar los nutrientes necesarios para el crecimiento normal y el desarrollo de las plantas, las mezclas a compostar deben contener microelementos (Shiralipour *et al.*, 1993), el exceso de estos puede disminuir la calidad de la composta, en estos casos, los microelementos deben ser eliminados (por ejemplo, mediante la adición de carbón vegetal activado) (Wong *et al.*, 1997).

Micronutrientes como Co, Ni, Mo, Fe, Mg, Zn y Na son necesarios para las funciones enzimáticas, pero poco se sabe acerca de su importancia para el proceso de compostaje (Epstein, 1997). El contenido de algunos de los microelementos, presentes en una composta, se muestran en la tabla 1 (Neklyudov *et al.*, 2008).

Tabla 1: Contenido de microelementos en composta

Microelemento	Contenido (mg/kg)
Cobre (Cu)	3-3.6
Zinc (Zn)	40-50
Cobalto (Co)	0.05-0.1
Manganeso (Mn)	40-45
Hierro (Fe)	100



Las compostas pueden clasificarse en dos tipos dependiendo de la presencia o ausencia de oxígeno dentro del proceso, procesos aerobios y anaerobios, respectivamente. Los productos que se obtienen en ambos casos son el dióxido de carbono, agua y biomasa microbiana, en el caso del proceso anaerobio además de los anteriores también se puede tener como producto metano. Los microorganismos que se desarrollaran en cada tipo de procesos serán distintos, puesto que, para crecer y realizar sus actividades metabólicas, los microorganismos deben disponer de un ambiente propicio, es decir, condiciones óptimas para su desarrollo (temperatura, humedad y cantidad de oxígeno, principalmente).

En el proceso anaerobio se da la desintegración de la materia orgánica, en ausencia de oxígeno, los productos generados a partir de este proceso son: gas metano, dióxido de carbono, sulfuro de hidrógeno, amoníaco, hidrógeno, agua y composta, esta última puede ser utilizada para mejorar las condiciones del suelo al cual se le adicione. La biodegradación anaeróbica se produce como consecuencia de una serie de interacciones metabólicas entre los diversos grupos de microorganismos presentes en este tipo de proceso (Mohee *et al.*, 2008).

El proceso aerobio se caracteriza por la presencia de microorganismos mesófilicos y termófilicos, los cuales pueden encontrarse, de forma predominante, en las etapas mesófila (25 a 40 °C) y termófila (>45°C) respectivamente (Castillo, 2005). Las altas temperatura que suelen alcanzarse durante el proceso de compostaje son producidas por las actividades metabólicas de las diferentes poblaciones microbianas (Moreno y Moral, 2007).

Durante la fase mesófila se da un incremento gradual en la actividad metabólica y por consecuencia en la temperatura del sistema, favoreciendo el inicio de la fase termofílica, en la cual se eliminan los microorganismos mesófilos patógenos y predominan los termófilos.



MARCO TEÓRICO



Esta fase generalmente finaliza cuando se agotan los nutrientes, con lo cual las poblaciones existentes, entran en fase de muerte y comienza el descenso de temperatura, lo que se conoce como fase de enfriamiento (Díaz L.F., *et al.*, 2007).

Cuando la temperatura del proceso de compostaje desciende hasta aproximadamente 40 °C o menos, pueden desarrollarse nuevamente microorganismos mesófilos, los cuales usaran como fuente de nutrientes, los materiales que hayan resistido el proceso de biodegradación, a esta última parte del proceso se le conoce como etapa de maduración (Díaz L.F., *et al.*, 2007).

Para que se pueda decir que el proceso de composteo terminó, desde el punto de vista microbiológico, se requiere que haya cesado la actividad metabólica, lo cual se presenta cuando la población microbiana inicia la fase de muerte, por carencia de nutrientes (Moreno y Moral, 2007).

Sistemas de compostaje

Existen diversos sistemas para llevar a cabo el proceso de composteo, los cuales comparten el objetivo de transformar los residuos seleccionados en composta; y eliminar de la misma los componentes que pudieran ser nocivos para el suelo o el ambiente en el cual se incorpore esta. Entre los sistemas más comunes podemos encontrar: pilas estáticas, compostaje en hileras, compostaje cerrado y el vermicompostaje (Cooperband, 2002).

El composteo en pilas estáticas (Figura 7) es el más sencillo de los sistemas y también el más antiguo. Una vez que se han seleccionado los materiales a compostar, estos se colocan en pilas, las cuales pueden ser triangulares o circulares. Un aspecto que se debe considerar es la altura que tendrán las pilas, debido a que, en pilas muy altas se puede propiciar un ambiente anaerobio, modificando las condiciones ambientales de los microorganismos presentes en el proceso y por lo tanto a estos (Cooperband, 2002).

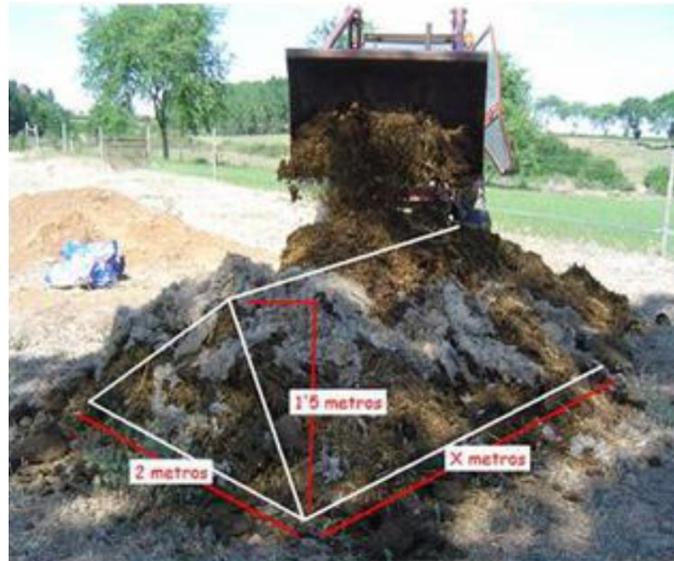


Figura 7: Compostaje en pila estática (Landín, 2010).

A pesar de que las pilas sean estáticas, dentro de un proceso de composteo uno de los parámetros importantes es la aireación, hay diversas formas de someter las pilas a aireación, podemos encontrar las pilas estáticas con aireación, en las cuales se colocan respiradores que permitan la entrada de oxígeno a la pila. Otra forma de airear es realizar volteos a la pila de composta, solo que en este caso, la pila ya no se conoce como estática sino como pila con volteo o pila dinámica (Cooperband, 2002).

El composteo en hileras, es similar al composteo en pilas, la única diferencia son las dimensiones que tienen cada uno, mientras las pilas son pequeñas, las hileras son más largas, en ocasiones se dice que el sistema de hileras es un sistema de pilas alargadas. Al igual que en las pilas, las hileras deben de tener aireación y se utilizan los mismos métodos de aireación que en las pilas (respiradores o volteos, este último se puede realizar con un tornero hilera) (Landín, 2010).



Figura 8: Compostaje en hileras (Cooperband, 2002)

En el sistema de compostaje cerrado, encontramos los reactores y el composteo en contenedores. En los reactores las condiciones ambientales pueden ser controladas. Las fuentes de aire que pueden ser utilizadas son compresores de desplazamiento positivo, ventiladores axiales o compresores de baja presión. Las ventajas de utilizar reactores son que: el área requerida es pequeña; se tiene un control del proceso, ya que no pueden influir los cambios meteorológicos; y se puede tener control sobre los gases generados (cuantificarse). La principal desventaja radica en los costos, tanto iniciales como de mantenimiento (Landín, 2010).

Para el sistema de composteo en contenedores (Figura 9), los materiales a compostar se vierten en un contenedor, este se puede mover con la ayuda de grúas, por lo regular tienen aditamentos para medir las condiciones en el interior y en ocasiones también para mezclar el material que contienen.

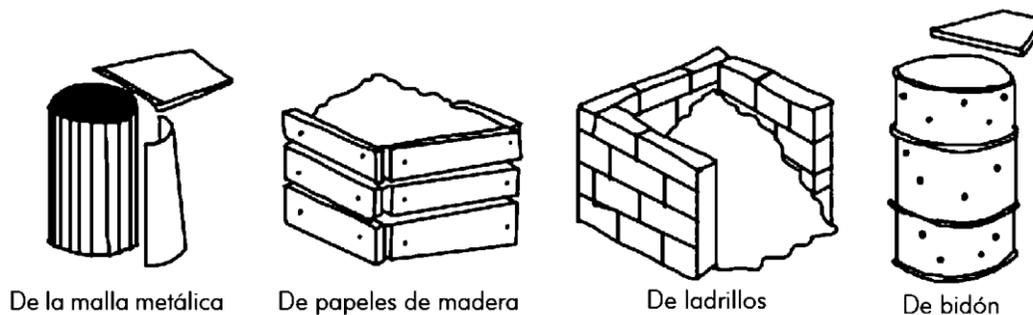


Figura 9: Tipos de contenedores utilizados para compostaje (FAO, 2013).



MARCO TEÓRICO



Las ventajas que presenta el composteo en contenedores, es que se pueden operar varios contenedores independientes, y se pueden arreglar las condiciones a las necesidades específicas de cada contenedor, la principal desventaja radica en que los contenedores son susceptibles a daños mecánicos (Landín, 2010).

El vermicompostaje o lombricompostaje es un tipo de compostaje en el cual se requiere de la presencia de lombrices (Figura 10), las cuales son las encargadas de transformar los desechos orgánicos en composta, la cual, al originarse con este proceso, puede llamarse vermicomposta. En el proceso, las lombrices de tierra no sólo usan los microorganismos que crecen en los residuos para su nutrición, sino que también propician la actividad microbiana en la vermicomposta producida (Edwards y Arancon, 2007).

En el vermicompostaje, las temperaturas que se alcanzan oscilan entre 20-25 °C, ya que a temperaturas superiores las lombrices no lograrían sobrevivir (Naturland Internacionales).



Figura 10: Lombriz rubellus utilizada en lombricomposta (Landín, 2010)

Como componentes naturales presentes en la composta se han reportado hongos y levaduras, bacterias, actinomicetos y una gran variedad de enzimas. El hongo correspondiente a la especie *Aspergillus niger*, una de las cinco más abundantes (*Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Cyriodontium* y *Pleurotus*) muestra un mayor potencial para biodegradar la materia orgánica, por lo que estos microorganismos junto con las levaduras, son responsables de la descomposición de polímeros complejos como celulosa, hemicelulosas, pectinas y lignina (Molla, 2002).



MARCO TEÓRICO



Las bacterias, también inciden en la biodegradación de la materia orgánica, ya que existen diferentes tipos: aerobias y anaerobias, relacionadas con el consumo de oxígeno; termofílicas y mesofílicas, relacionadas con la temperatura; nitrificantes, desnitrificantes y amonificantes, vinculadas con la liberación y la fijación del nitrógeno (Haugh, 2002). En lo que corresponde a las enzimas, que también juegan un papel importante en la biodegradación, se encuentran diferentes tipos: proteasa, hemicelulasa, hidrolasa, amilasa, lipasa, pectinasa, poligalacturonasa, endoglucanasa y quitinasa (Charest, 2005).

Debido a que las bolsas de plástico llegan a las plantas de composta, es importante observar el efecto que tienen las bolsas con aditivos pro-oxidantes, en el proceso de compostaje y la calidad del producto final. En las diferentes etapas que se presentan en el proceso de compostaje, se evalúan el tipo de bacterias, hongos y actinomicetos preponderantes.

Durante las tres etapas que se presentan en el compostaje (mesofílica, termofílica y de maduración), se ha reportado la presencia de bacterias (*Pseudomonas* sp., *Bacillus* sp.), hongos (*Penicillium*) y actinomicetos (*Streptomyces*) (Lee, 1990; Hassen, 2001; Velasco, 2004; Uribe, 2010). Sin embargo se desconoce si el metal pesado presente en las nuevas bolsas oxo-biodegradables inhibe el crecimiento de dichos microorganismos, y con ello afecta el proceso de compostaje, respecto al tiempo y a la calidad de la composta.



METODOLOGÍAS UTILIZADAS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS

Debido a que existe una amplia diversidad microbiana y dada la importancia de los microorganismos para el ser humano, se han desarrollado varias metodologías para lograr la identificación de los mismos y poder diferenciarlos entre ellos. Estas metodologías van desde la observación de características macroscópicas y microscópicas, la utilización de tinciones diferenciales, pruebas bioquímicas, pruebas serológicas o el uso de métodos moleculares. Dentro de estas metodologías podemos encontrar tanto manuales como automatizadas. Para realizar la identificación de microorganismos se pueden emplear una o más de las metodologías mencionadas anteriormente.

La identificación microscópica puede realizarse mediante algún o algunos tipos de tinciones, este es uno de los primeros acercamientos para la obtención de información de los microorganismos como morfología agrupación y comportamiento en tinciones de tipo diferencial como Gram o BAAR (Koneman, 2008).

La tinción de Gram es especialmente utilizada para ver las propiedades de tinción de bacterias, se basa en la capacidad de las bacterias de retener el colorante primario (cristal violeta), aun después de haber sido sometidas a un proceso de decoloración con una mezcla de alcohol-acetona. Con esta tinción se distinguen dos grandes grupos de bacterias: Gram positivas y Gram negativas (Montoya, 2008).

La identificación macroscópica de bacterias se debe de llevar a cabo con un cultivo puro, puesto que una colonia de cultivo puro está compuesta por un sólo tipo de microorganismos y procede de una única célula, por lo tanto, el primer paso es la obtención de dicho cultivo, posteriormente se requiere conocer sus características ambientales de crecimiento (aerobio, anaerobio, temperatura óptima de crecimiento, tiempo de cultivo) (Gobernado y Lopéz-Hontangas, 2003).



MARCO TEÓRICO



Para el análisis macroscópico de las bacterias se debe tener en cuenta el aspecto visual de las colonias, lo cual se logra con la observación de los bordes, el tamaño de la colonia, el tipo de elevación y color (si desarrolla alguno), así como, su comportamiento frente a los distintos sustratos incorporados al medio de cultivo como hemólisis, fermentación de azúcares, utilización de sales, etc. (medios diferenciales) (Gobernado y Lopéz-Hontangas, 2003).

En la identificación de bacterias puede analizarse la actividad metabólica de estas, mediante pruebas bioquímicas, en las cuales se observa la producción de sustancias detectables por reacciones directas e indirectas. Las pruebas bioquímicas pueden ser rápidas y sencillas, como la detección de la producción de catalasa por medio de H_2O_2 , o lentas y complejas las cuales deben llevarse a cabo con técnicas manuales o automatizadas (Gobernado y Lopéz-Hontangas, 2003).

Estas pruebas tienen una enorme utilidad debido a que involucran la actividad enzimática de las bacterias, con lo que se puede diferenciar incluso las bacterias que se encuentran estrechamente relacionadas, sin embargo, estas pruebas deben de ser interpretadas correctamente, dado que un error en la interpretación, nos llevaría a una identificación errónea (Tortora et al., 2007).

Lo anterior llevo al desarrollo de sistemas de identificación comerciales, en los cuales se realiza la combinación de sustratos, los cuales son seleccionados para ayudar a la identificación de miembros de un grupo de bacterias. La construcción compacta, las reacciones químicas fácilmente visibles, un tiempo de conservación prolongado y un control de calidad estandarizado provisto por los fabricantes de estos sistemas hacen que su uso en los laboratorios de microbiología sea muy conveniente (Koneman, 2008).

Dentro de los sistemas de identificación existen dos tipos los manuales y los automatizados. Los sistemas manuales constan de celdillas aisladas que contienen sustrato liofilizado, estas son inoculadas individualmente (Bou, 2011).



MARCO TEÓRICO



Los resultados de las pruebas se expresan de forma numérica y cada especie se define con un código numérico, el cual es resultado de los códigos aplicados a las reacciones de las pruebas utilizadas. Algunos de los sistemas disponibles en el mercado son: API® (bioMérieux), Micro-ID® (Remel), BBL™ Crystal™ (Becton Dickinson BBL), etc. (Bou, 2011).

Además de los sistemas manuales se cuenta con los sistemas automatizados y semiautomatizados para la identificación de bacterias, en los que además de sustratos para el desarrollo de pruebas bioquímicas, se encuentran diversos compuestos antimicrobianos, realizándose simultáneamente la identificación y pruebas de susceptibilidad a antimicrobianos. Los más usados en la actualidad son Microscan® WalkAway® (Dade), BD™ Phoenix™ (Becton-Dickinson) y Wider (Francisco Soria Melguizo, S. A.) (Gobernado y Lopéz-Hontangas, 2003; Bou, 2011).

Los sistemas de identificación consisten en paneles con una serie de pocillos con diversos sustratos liofilizados. En cada uno de ellos se determina una prueba y los resultados de estas se expresan en forma numérica, en porcentaje de identificación o en porcentaje de tipificación (Bou, 2011).

Las técnicas citadas se basan en la identificación fenotípica de los microorganismos, sin embargo una pequeña desventaja de éstas es el tiempo empleado en la identificación correcta de las bacterias.

Para facilitar la identificación de microorganismos se han desarrollado diversas metodologías genotípicas, las cuales consideran una amplia variedad de genes que han sido utilizados como dianas moleculares en los estudios taxonómicos o de filogenia en los distintos géneros y distintas especies bacterianas, constituyendo el análisis del ARNr 16S el marcador inicial y en numerosas situaciones el marcador es suficiente para realizar una identificación precisa (Clarridge, 2004).



El RNA 16S es un polirribonucleótido incluido en la subunidad 30 S del ribosoma bacteriano, actúa como un cronómetro molecular al presentar un alto grado de conservación. La secuencia del gen presenta de forma aproximada 1500 pb. Este tamaño proporciona suficiente polimorfismo interespecífico para diferenciar y establecer medidas estadísticas válidas.

Las técnicas de identificación molecular mediante el análisis del RNA 16S se basan en la amplificación genómica y en la secuenciación del gen o sus fragmentos (Gürtler y Stanisich, 1996). Para lograr la obtención de la cantidad suficiente de dicho gen se recurre a una técnica conocida como reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para realizar la amplificación genómica de un determinado fragmento de ADN se utiliza la reacción en cadena de la polimerasa, también conocida como PCR por sus siglas en inglés (Polymerase Chain Reaction). Con la PCR se puede obtener una secuencia específica de interés (McPherson, 2007).

La obtención de la secuencia de interés, permite la posterior multiplicación del material genético necesario, el cual es escaso después de la extracción desde una muestra biológica. La manipulación de dichas copias puede tener varias aplicaciones, como la secuenciación e identificación de dicha secuencia, la cual puede ser de gran utilidad en el diagnóstico de enfermedades genéticas, cáncer, medicina forense (huella génica); las cuales permiten el monitoreo de poblaciones, control de calidad e investigación.

Al poseer una secuencia específica en una concentración útil; es posible la biotecnología. Por ejemplo, al aislar una secuencia y amplificarla por medio de PCR, pueden producirse organismos transgénicos con características nuevas, según la secuencia insertada en su genoma; para la producción industrial de fármacos, alimentos y otros productos, así como la optimización de la producción misma (McPherson, 2007).



MARCO TEÓRICO



La multiplicación del material genético se produce debido a que la PCR consiste en la replicación in vitro de secuencias específicas de ADN, para ello se utilizan dos primers (secuencias cortas de ADN llamados también oligonucleótidos o cebadores), los cuales deben de ser complementarios cada uno a las cadenas opuestas de la región de ADN desnaturalizada, sintetizándose la región de ADN acotada por el par de oligonucleótidos empleado, dicha región incluirá además la secuencia de estos últimos. Los demás componentes esenciales para la PCR son el ADN molde, la ADN polimerasa y desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs).

Fases de la PCR

La PCR está dividida en tres fases:

- **Desnaturalización:** en esta etapa se lleva a cabo la desnaturalización de la cadena de ADN molde, ya que para que pueda iniciarse la replicación se requiere partir de una cadena sencilla y no doble, por lo regular este paso se realiza a una temperatura que oscila entre los 94-96°C.
- **Alineamiento:** una vez que se tiene la cadena sencilla, se dará la unión del oligonucleótido a su secuencia complementaria en dicha cadena, para que se realice esta unión la temperatura debe ser cercana a la T_m (temperatura a la cual la mitad de los oligos están unidos a su blanco, se calcula tomando en cuenta el tamaño de los oligos y su %GC) la cual puede encontrarse entre 45-65 °C, dependiendo de los cebadores en cuestión.
- **Extensión:** en esta etapa el ADN de cadena sencilla, que ya se encuentra alineado con su oligonucleótido correspondiente, comienza a ser complementado con una nueva cadena, esta se va formando por acción de la ADN polimerasa que va uniendo los dNTPs en el orden adecuado para formar nuevamente una doble cadena del fragmento de ADN deseado y comienza a realizarse una síntesis exponencial, ya que al final del primer ciclo se tendrá el doble de ADN.



La temperatura elegida para esta etapa es la temperatura a la cual se observa la actividad óptima de la enzima ADN polimerasa empleada. Seguida a esta etapa continúa una extensión final, la diferencia con la extensión anterior es que la última no se repite y es de mayor duración.

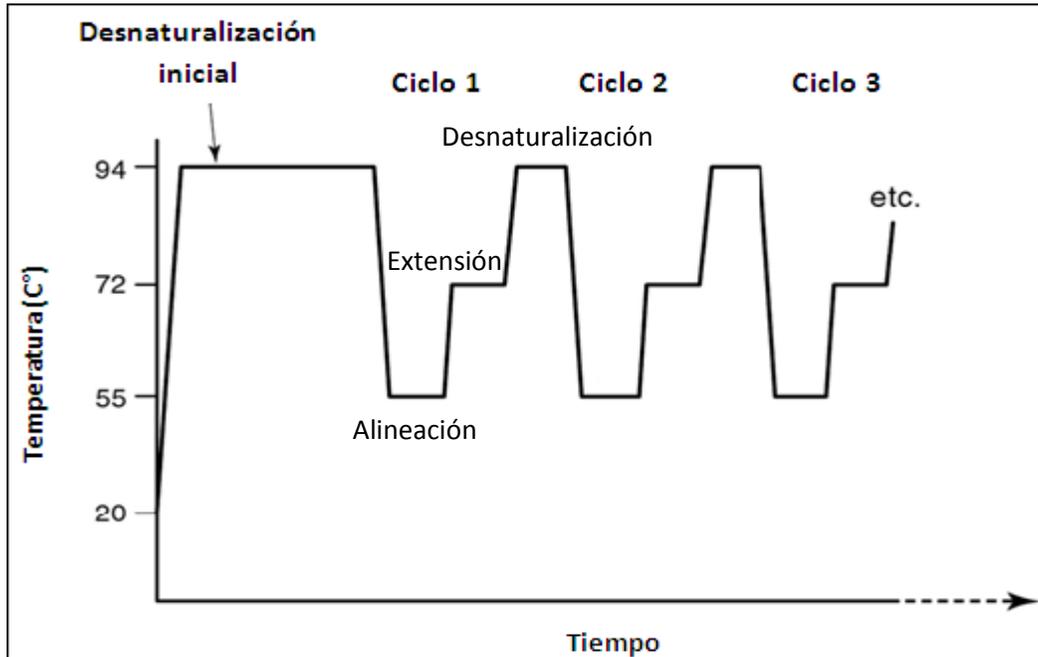


Figura 11: Fases de la PCR (modificada de McPherson, 2007)

Al igual que hay dos tipos de extensiones, también hay dos tipos de desnaturalizaciones, una inicial que es de mayor duración que las desnaturalizaciones subsecuentes y que al igual que la extensión final no se repite. Los pasos que repiten cuantos ciclos sean necesarios son la desnaturalización posterior a la inicial (1 minuto), alineación y extensión, esta última es la previa a la extensión final (Figura 7).

En la actualidad el estudio del material genético (ADN y RNA) revela la existencia de miles de millones de especies microbianas, sugiriendo que habitamos un mundo plagado de microorganismos que incluso habitan el planeta desde mucho antes que cualquier otro ser vivo, se estima que sólo se conoce el 3% de los microorganismos y que pocos se han estudiado con profundidad (Cavalier-Smith, 2004).



Las técnicas de identificación molecular de bacterias mediante el análisis del gen 16S, se basan en la amplificación genómica y en la secuenciación de esos genes o sus fragmentos (Bou, 2011).

Secuenciación

La identificación de microorganismos basada en la determinación de las secuencias de nucleótidos a través de un segmento de ADN extraído de estos, ha tenido un avance muy importante debido a la especificidad, la sensibilidad y la rapidez con la que pueden llevarse a cabo. La identificación basada en la secuenciación del genoma de una bacteria es objetiva y posee mayor precisión que los métodos convencionales (Hernández, 2014).

La estrategia básica de la secuenciación de ácidos nucleicos involucra (De Necochea y Canultec, 2004):

- La degradación específica y el fraccionamiento de los polinucleótidos de interés a fragmentos pequeños para ser secuenciados.
- La secuenciación de los fragmentos.
- El ordenamiento de los fragmentos.

La técnica de secuenciación en general se basa en la fragmentación de ADN genómico completo, la posterior clonación de los distintos fragmentos, secuenciar los fragmentos y finalmente el ensamblado de estos (Riveros, 2014).



ANTECEDENTES



Desde el inicio de los tiempos los seres humanos hemos sido generadores de desechos, a lo largo de la historia de la humanidad solo ha cambiado el tipo y cantidad que se genera de los mismos. Por ejemplo: no era el mismo tipo de desechos en la época en la cual los seres humanos eran nómadas, comparado con los desechos generados a partir de que se convirtieron en sedentarios.

Debe de tomarse en cuenta que conforme ha avanzado el tiempo se ha tratado de facilitar la vida para la humanidad. Con la evolución en ciertos aspectos, siendo el más relevante el tecnológico, también ha evolucionado el tipo y cantidad de residuos.

Con el tiempo los seres humanos han encontrado diversas formas de tratar los residuo, por ejemplo: la incineración, con esta forma eliminan los residuos físicamente, pero generan contaminación en el aire; la recolección, es la forma más habitual de deshacernos de éstos, colocándolos en bolsas y depositándolos en contenedores o entregándolos al camión recolector, según sea el caso, otra forma conocida para tratar los residuos; particularmente los orgánicos es la elaboración de compostas.

El proceso de compostaje ha sido muy utilizado desde hace ya bastante tiempo, en un principio se consideraba sólo como tratamiento para los residuos orgánicos, sin embargo, dicho proceso ha evolucionado cíclicamente, sus objetivos han ido variando al cambiar el desarrollo y los intereses de la sociedad (Moreno y Moral, 2007).

La historia de este sistema de tratamiento de residuos orgánicos, ha transcurrido entre el entusiasmo por aprovechar la energía y nutrientes contenidos en los tejidos animales y vegetales o por imitar a la naturaleza que recicla y no acumula residuos, aunado al desencanto producido por resultados inconsistentes de las instalaciones y el consiguiente escepticismo por parte de los posibles usuarios de la composta (Crowe y col., 2002; Giménez y col., 2005).



ANTECEDENTES



El arte del compostaje es muy antiguo y sus principios básicos han sido apreciados y usados a lo largo de los siglos, aunque con distinta intensidad según la situación económica y social de la época (Misra y col., 2003). A últimas fechas se ha incrementado el interés por el compostaje debido al crecimiento desmesurado de la generación de residuos, y a la falta de espacios para ubicar vertederos en los cuales depositar los residuos recolectados.

La bolsa de plástico es un objeto cotidiano utilizado a gran escala para contener y transportar mercancías en el mercado mexicano. Las bolsas de LDPE se introdujeron progresivamente a partir de los años setenta, popularizándose rápidamente en establecimientos como mercados, centros comerciales y tiendas de autoservicio (Encarnación G., *et al.*, 2009).

Limón, en el año 2001 llevó a cabo un trabajo en el cual, muestras de LDPE fueron sometidas a dos tipos de tratamientos fisicoquímicos diferentes para facilitar la acción de los microorganismos sobre dicho material. Uno de dichos tratamientos fue el térmico, en el cual las muestras fueron expuestas a 5 temperaturas diferentes (90, 105, 120, 135 y 150 °C) por un periodo de 5 días, el otro tratamiento fue con envejecimiento acelerado, para este último se utilizó radiación UV (310 nm) y una temperatura de 70 °C, durante 29 días.

Posteriormente las muestras se incubaron con un consorcio de cuatro cepas de hongos filamentosos (*Aspergillus niger*, *Penicillium pinophilum*, *Gliocadium virens* y *Phanerochaete chrysosporium*) en condiciones aeróbicas durante nueve meses. Los cambios en la estructura química debidos al tratamiento biológico en la muestra con envejecimiento acelerado, indicaron la oxidación microbiana en las cadenas cortas. Las muestras con tratamiento térmico tratadas con temperaturas mayores al punto de fusión del LPDE (105-110 °C) presentaron una disminución en los grupos carbonilo, lo que indico el ataque microbiano sobre cadenas más oxidadas.



ANTECEDENTES



Con lo anterior se infiere que los microorganismos no solamente atacan la fracción amorfa del LPDE sino que es posible que ataquen cristales menos perfectos. A lo largo del tratamiento biológico se observaron dos etapas. En la primera etapa (tres primeros meses) se observa un incremento en la cristalinidad, asociado al consumo de la parte amorfa del LPDE.

En la segunda etapa (después de tres meses) se detectó una disminución en la cristalinidad, asociada al ataque microbiano sobre cristales más pequeños. Una de las conclusiones de este trabajo fue que hay coexistencia de mecanismos de biodegradación, que dependen de la accesibilidad que los microorganismos tengan sobre los grupos oxidados (Limón, 2001).

En el año 2004 se llevó a cabo la evaluación de la composteabilidad de bolsas de PE degradables y bolsas de polímero a base de almidón en pilas de composta. Para cuantificar la degradación se evaluó la pérdida de peso en las bolsas de PE antes de la prueba y en la composta; al término del experimento se realizó un análisis químico y se encontró que las bolsas de PE contenían pequeñas cantidades de cobre, cobalto y otros metales de transición.

En lo que se refiere a la pérdida de peso, solo es medible en el caso de la bolsa de almidón, puesto que, en el caso de la bolsa de PE no se observaron signos de degradación y por lo tanto no hubo una disminución de peso. Al llevar a cabo el análisis de la composta, en busca de metales, se llegó a la conclusión de que los componentes metálicos presentes en las bolsas de PE no contribuyen de manera significativa al incremento de metales en dicha matriz (Davis *et al.*, 2004).

Durante el 2006, E. Chiellini, realizó una investigación acerca del efecto de la temperatura y la humedad relativa en el proceso de degradación de películas de PE con aditivos pro-oxidantes, concluyendo que el aditivo prodegradante utilizado en las películas de LDPE (pLDPE) es eficaz en la inducción de la degradación oxidativa de la cadena principal del polímero (Chiellini, 2006).



ANTECEDENTES



En otro estudio realizado en el 2006 se evaluó el efecto de tres carboxilatos de cobalto (estearato, palmitato y laurato de cobalto) en la degradación por exposición a luz UV de pLDPE. Para este estudio se utilizaron diferentes concentraciones de estearato de cobalto en la fabricación de pLDPE, se irradiaron con lámparas de luz UV y posteriormente se evaluó la degradación de las mismas, llegando a la conclusión de que los tres carboxilatos de cobalto promueven la fotodegradación, siendo el estearato de cobalto el más agresivo (Roy, 2006).

Ammala, en el 2011 elaboró una revisión de las poliolefinas de tipo biodegradable que se encontraban en uso, señaló que no se conocía con seguridad el destino final de los productos generados a partir de la degradación de los aditivos prodegradantes (Ammala, 2011).

En 2012, Rabell Contreras realizó un estudio, el cual tuvo como finalidad la de proponer una metodología de prueba para evaluar la biodegradabilidad y ecotoxicidad de PE, formulado con aditivos pro-oxidantes, de acuerdo a las condiciones ambientales, de infraestructura, composición y manejo de residuos en la Ciudad de México. En este trabajo las muestras plásticas se sometieron a un proceso de degradación oxidativa, posteriormente dichas muestras fueron sometidas a un proceso de biodegradación por medio de compostaje con residuos sólidos orgánicos.

Para evaluar la degradación se consideró el porcentaje de elongación antes de la ruptura y el índice de carbonilo. La ecotoxicidad se evaluó para el crecimiento de pasto. Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que evaluar la degradabilidad de plásticos oxo-degradables previamente oxidados en un sistema de compostaje de residuos sólidos orgánicos puede ser una opción confiable y económica para sustituir a los sistemas de compostaje controlado, tomando como parámetro de evaluación alguna propiedad mecánica o química, las cuales son pruebas de fácil acceso en México (Rabell, 2012).



ANTECEDENTES



Gutiérrez en el 2013, llevó a cabo un trabajo en el cual se encontraron y aislaron consorcios de microorganismos los cuales son capaces de degradar el LDPE, para lograr dicho aislamiento se usaron medios de cultivo, en los cuales la única fuente de carbono disponible era el PE.

Para lograr el aislamiento se partió de plásticos enterrados por aproximadamente 20 años, su posterior cultivo en medios líquidos y sólidos, así como la observación mediante microscopía óptica y electrónica de barrido. La identificación de los microorganismos se realizó basándose en las características macroscópicas y de crecimiento en medios específicos, lográndose la identificación de tres grupos de microorganismos: hongos, levaduras y bacterias.

La mayor capacidad para degradar el PE se observó en un consorcio conformado por hongos y levaduras en un medio de cultivo líquido con agitación constante. Se concluye que los consorcios microbianos forman una biopelícula sobre el polímero, la cual es la responsable de la biodegradación de dicho material (Gutiérrez, 2013).



OBJETIVOS



OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los aditivos pro-oxidantes presentes en películas de polietileno sobre la comunidad microbiana de composta, mediante la cuantificación de bacterias mesofílicas y termofílicas e identificar a los hongos y las bacterias presentes en el proceso de compostaje durante la biodegradación de películas de polietileno de baja densidad (pLDPE), elaboradas con aditivos pro-oxidantes (estearato de manganeso y estearato de cobalto).

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar si existe algún efecto de los aditivos pro-oxidantes utilizados en la elaboración de las pLDPE, sobre la densidad de bacterias termofílicas y mesofílicas aisladas de la composta utilizada en el proceso de biodegradación.
- Aislar los hongos y las bacterias presentes en la composta madura antes y durante la biodegradación de pLDPE elaboradas con aditivos pro-oxidantes (estearato de manganeso y estearato de cobalto).
- Identificar mediante la técnica de PCR, las especies de las bacterias aisladas a partir de la composta utilizada en el proceso de biodegradación de pLDPE, elaboradas con aditivos pro-oxidantes (estearato de manganeso y estearato de cobalto).
- Identificar mediante observación micro y macroscópica, los hongos aislados a partir de la composta utilizada en el proceso de biodegradación de pLDPE elaboradas con aditivos pro-oxidantes (estearato de manganeso y estearato de cobalto).

En la presente tesis se utilizaron películas de LDPE (pLDPE) elaboradas con dos diferentes aditivos pro-oxidantes sometidas a un proceso de biodegradabilidad por compostaje. Se determinó la densidad celular de las bacterias mesofílicas y termofílicas y se llevó a cabo el aislamiento de cultivos bacterianos y de hongos filamentosos para su posterior identificación, dicha identificación se llevó a cabo mediante observación de características macroscópicas para los hongos y para el caso de las bacterias mediante el uso de la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para llevar a cabo la simulación de un proceso de compostaje, se realizó el montaje de una serie de reactores aerobios, los cuales contenían composta de poda madura proveniente de los jardines del campus Ciudad Universitaria (CU) de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). El proceso de biodegradación se llevó a cabo bajo condiciones controladas de laboratorio por 55 días (Figura 12).



Figura 12: Arreglo de reactores utilizados para la biodegradación de películas de LDPE (pLDPE) elaboradas con dos diferentes aditivos pro-oxidantes.

Las películas de LDPE utilizadas en el experimento, fueron elaboradas con dos diferentes aditivos pro-oxidantes: estearato de manganeso (Mn) en un porcentaje de 0.2% y estearato de cobalto (Co) en un porcentaje de 0.1% (Figura 13 A). Las cuales fueron fabricadas expresamente para el experimento (datos presentados en otras tesis del mismo proyecto).



Figura 13: A) Perlas de polietileno mezcladas con aditivos pro-oxidantes. B) Horno marca Felisa en el cual se sometieron a termo-oxidación las películas elaboradas con aditivos pro-oxidantes.

Para fines prácticos se les asignaron las siguientes claves: pLDPE+Mn y pLDPE+Co. Dichas pLDPE fueron sometidas previamente a un pretratamiento de termo-oxidación en un horno marca Felisa modelo: FE-291^a a una temperatura de 50°C (Figura 13 B), las pLDPE+Mn por 16 días y pLDPE+Co por 21 días.

En la Figura 14, se muestra el diagrama que incluye las etapas del proceso mediante el cual se llevó a cabo el aislamiento y posterior identificación, de los hongos y bacterias a partir de la composta utilizada para el proceso de biodegradación de las pLDPE+Mn y pLDPE+Co.



METODOLOGÍA

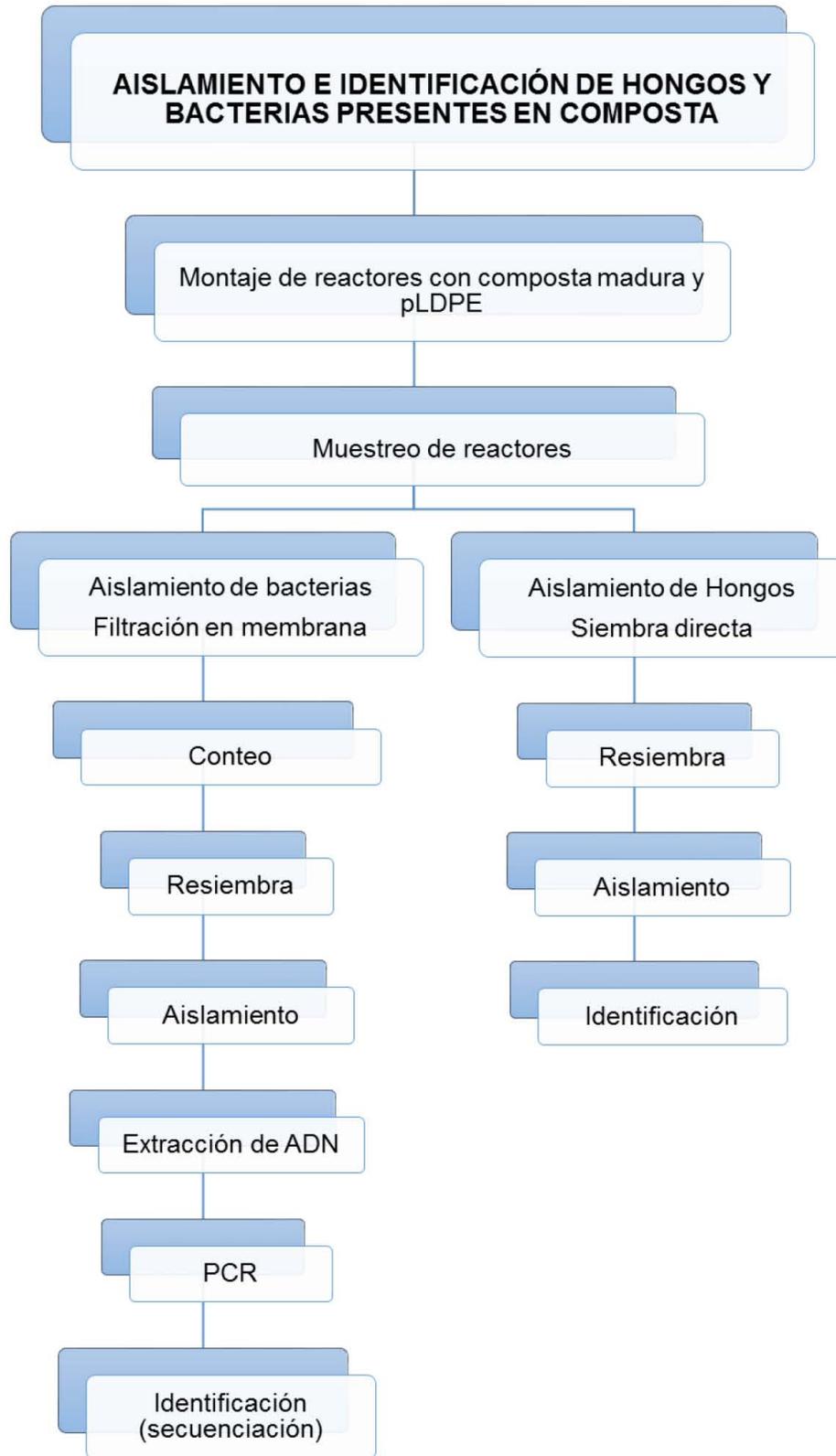


Figura 14: Metodología empleada para el aislamiento e identificación de bacterias y hongos presentes en composta, durante un proceso de biodegradación de pLDPE elaboradas con aditivos pro-oxidantes: estearato de manganeso y estearato de cobalto.

- Montaje de reactores con composta de poda madura y pLDPE

Los reactores utilizados fueron frascos de vidrio con capacidad de 1.8 L (Figura 15). A cada reactor se le adicionaron 230 g de composta. Posteriormente los reactores fueron conectados a un sistema de aireación en un baño de agua previamente fabricado con acrílico, el cual se mantuvo a 55°C durante todo el experimento. El sistema de aireación se acondicionó realizando dos orificios en los tapones de hule usados para tapar los reactores, a dichos tapones se les se insertaron mangueras que servirían para permitir la circulación del aire dentro del sistema. Las manguera provenientes de los reactores fueron conectadas a contenedores de plástico con capacidad de 1L, los cuales contenían 700 mL de hidróxido de Sodio (NaOH) en donde se atrapó el dióxido de carbono generado en los reactores durante el proceso de biodegradación.

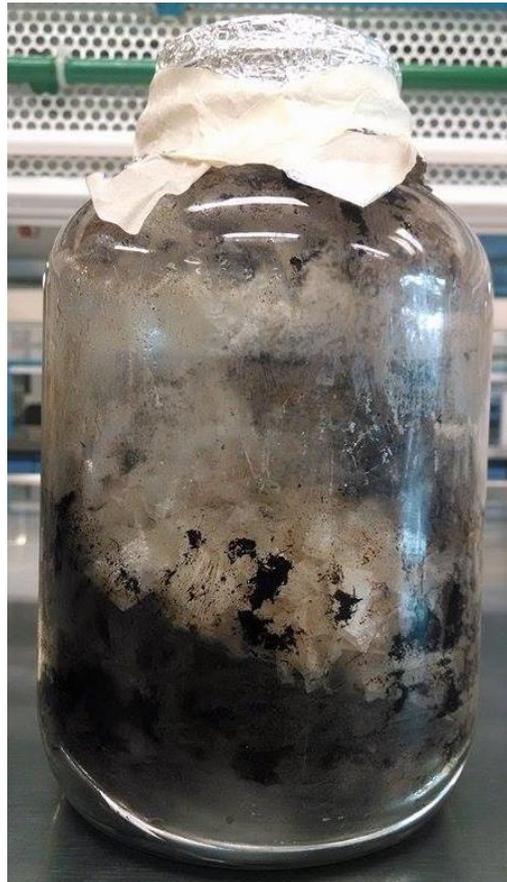


Figura 15: Frasco de vidrio, ejemplo de los utilizados como reactores.

Una vez montados los reactores, la composta se sometió a un proceso de estabilización en el baño de agua (aproximadamente una semana a 55°C). Posteriormente, las pLDPE+Mn y pLDPE+Co previamente termo-oxidadas fueron adicionadas a la composta, se homogeneizó todo el material y se conectaron los reactores nuevamente al sistema de aireación en un baño de agua a 55 °C. El experimento tuvo una duración de 45 días.

- Muestreo de reactores para el aislamiento de hongos y bacterias.

Una vez estabilizado el sistema, se tomó una primera muestra de 0.5 g aproximadamente de composta, utilizando una espátula de cuchara. Esta muestra se consideró como muestra del día uno. Posteriormente (dentro del día uno) se colocaron las películas de polietileno dentro de los reactores para su interacción con la composta. Se dejaron transcurrir 15, 30 y 45 días naturales, en los cuales se tomaron las muestras para el aislamiento de hongos y bacterias (por duplicado), aplicando el mismo procedimiento que para la muestra del día uno (Figura 16).

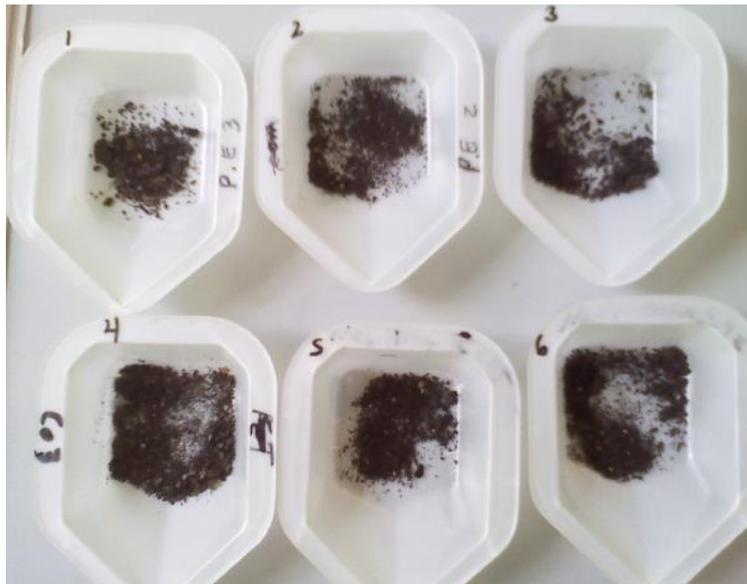


Figura 16: Muestras de composta, antes de ser homogeneizadas con el agua de dilución.

BACTERIAS

- Cuantificación de bacterias

La cuantificación de bacterias se realizó mediante la técnica de filtración en membrana. Para ello, se pesó 0.1 g de la muestra, la cual se colocó en frascos de dilución que contenían 99.9 mL de agua de dilución estéril y se mezcló; posteriormente se realizaron diluciones tomando 1 mL de muestra y colocándola en un tubo con 9 mL de agua de dilución estéril para llevar a un volumen final de 10 mL (Figura 17). Al concluir la serie de diluciones, se tomó 1 mL de cada dilución y se filtró por una membrana de celulosa con ayuda de un equipo de filtración, este paso se realizó dos veces por cada dilución. Previo a filtrar la muestra, se colocó agua de dilución (aproximadamente 10 mL) con la finalidad de humedecer la membrana y que al colocar la muestra esta cubriera toda la superficie de la membrana y no solo una parte. Las membranas sobre las cuales se filtraron las muestras fueron transferidas a cajas Petri que contenía agar cuenta en placa y estas fueron incubadas a 36°C para las bacterias mesofílicas y 55°C para las bacterias termofílicas.

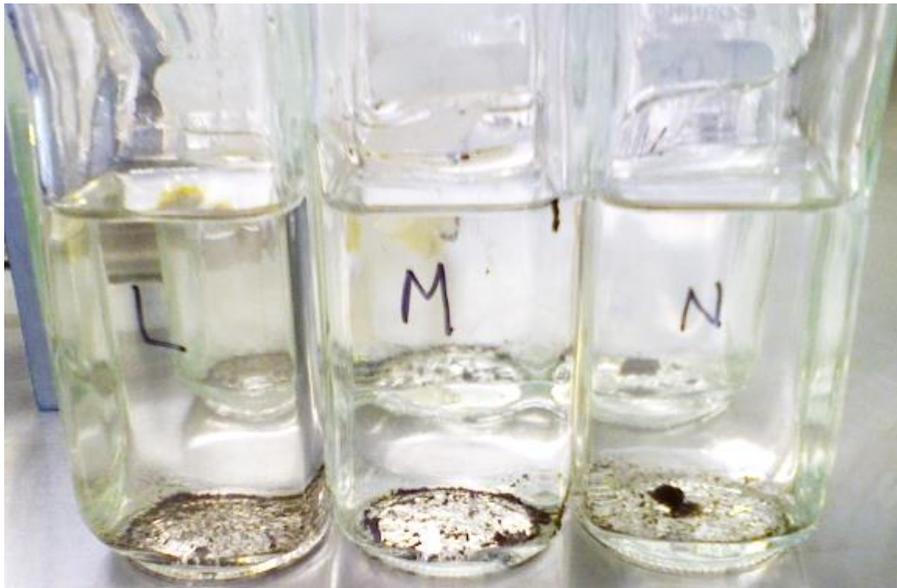


Figura 17: Frascos de dilución con muestra de composta, previo a su homogeneización. Las letras L, M y N son algunas de las claves asignadas a las muestras tomadas de los reactores.



METODOLOGÍA



Una vez transcurrido el periodo de incubación, se llevó a cabo el conteo de las colonias. Los resultados de la densidad celular de bacterias se expresan como Unidades Formadoras de Colonias (UFC), siguiendo lo recomendado en la NMX-AA-102-SCFI-2006 se reportan las diluciones en las cuales se observaron menos de 100 UFC, con los cálculos respectivos para reportar UFC por gramo de muestra (UFC/g) utilizando la siguiente fórmula:

$$UFC = \frac{\text{número de colonias}}{\text{volúmen de muestra ó dilución}} \times 1g$$

Se registró la morfología colonial y se aislaron las colonias que presentaron morfologías diferentes.

- Aislamiento de bacterias

A partir de los cultivos obtenidos en la técnica de filtración de membrana, se seleccionaron las colonias que presentaban características morfológicas diferentes (borde, elevación, color, tamaño, etc). Se llevó a cabo el aislamiento de cada una de las colonias diferentes y se sembraron en placas de agar nutritivo, estas fueron incubadas a 36°C para las bacterias mesofílicas y 55°C para las bacterias termofílicas. A cada aislamiento se le asignó una clave de control de cultivos.

A cada uno de los aislamientos se les realizó tinción de Gram, esto con la finalidad de verificar la pureza de los cultivos mediante la observación de la morfología celular y diferenciar las bacterias Gram positivas de las Gram negativas. En el caso de no tener cultivos puros se realizaron resiembras en agar nutritivo hasta obtenerlos.

- Extracción de ADN (Ácido Desoxirribonucleico)

A partir de los cultivos puros, fueron identificadas las bacterias aisladas mediante técnicas moleculares de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

Para ello se llevó a cabo la extracción de ADN genómico (ADN bacteriano), siguiendo las indicaciones del protocolo del kit de extracción: Wizard® Genomic ADN Purification Kit de la marca PROMEGA Cat. A1120 (Figura 18).



Figura 18: Kit utilizado para la extracción de ADN bacteriano.

La extracción puede resumirse en:

- Suspensión de células bacterianas
 - Lisis celular
 - Precipitación de proteínas
 - Obtención, enjuague y rehidratación del ADN
-
- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Del ADN genómico obtenido, fue amplificada la región del gen 16s empleando la técnica PCR. Las condiciones a las cuales se programó el termociclador se presentan en la tabla 2. Para ello se seleccionaron los primers universales para bacteria 24f y 1492r, con las secuencias AGAGTTTGATCMTGGCTCAG y TACGGYTACCTTGTTACGACTT, respectivamente, lo anterior se realizó en un termociclador Mastercycler ep gradient S, marca eppendorf (Figura 19).



Figura 19: Fotografías del Termociclador empleado para la realización de la PCR

Las condiciones a las cuales se programó el termociclador fueron:

Tabla 2: Condiciones de trabajo en el termociclador Mastercycler ep gradient S

Etapa	Temperatura (°C)	Tiempo
Desnaturalización	95	10 min
Desnaturalización	95	1 min
Alineación	55	30 s
Extensión	72	1.5 min
Extensión final	72	10 min

Estas etapas se llevaron a cabo 35 veces.

- Identificación de bacterias

Los productos de PCR obtenidos fueron enviados para su secuenciación al Instituto de Biotecnología de la UNAM. Para la identificación de las bacterias se compararon las secuencias obtenidas con las reportadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). A partir de la cual se obtuvo la identificación de las especies aisladas.

HONGOS

- Siembra directa para el aislamiento de hongos

A partir de la muestra de composta con y sin pLDPE se realizó una siembra directa mediante asada utilizando un asa micológica. Para ello se utilizó agar Sabouraud en placa, adicionado con cloranfenicol para evitar contaminación bacteriana. Se incubaron a temperatura ambiente por 5 días (Figura 20). La siembra directa se realizó por duplicado para cada una de las muestras obtenidas.

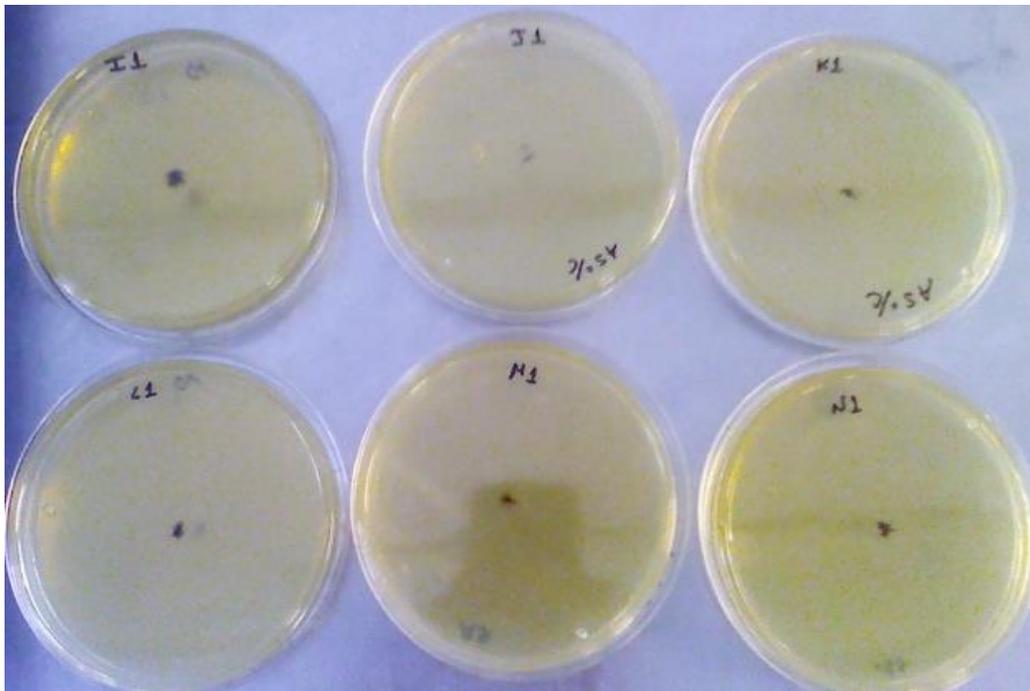


Figura 20: Cajas Petri con agar Sabouraud adicionado con cloranfenicol, en las cuales se realizó la siembra directa de las muestras de composta.

- Aislamiento

Una vez que se obtuvo crecimiento micológico (después de los 5-7 días), se tomó un inóculo y se sembró en un tubo inclinado de agar Sabouraud para su conservación.



METODOLOGÍA



- Resiembr

A partir del cultivo en tubo, se resembró en placas de agar Sabouraud con la finalidad de obtener una impronta que se utilizó para la identificación de los géneros aislados. La identificación de los hongos se efectuó utilizando tinción con azul de algodón lacto fenol, la cual fue observada en microscopio óptico a un aumento de 40X.

- Identificación

La identificación se efectuó mediante la observación de características macro y microscópicas, las cuales fueron contrastadas con las características reportadas en la literatura, para los posibles géneros de los hongos aislados.



AISLAMIENTO DE MICROORGANISMOS

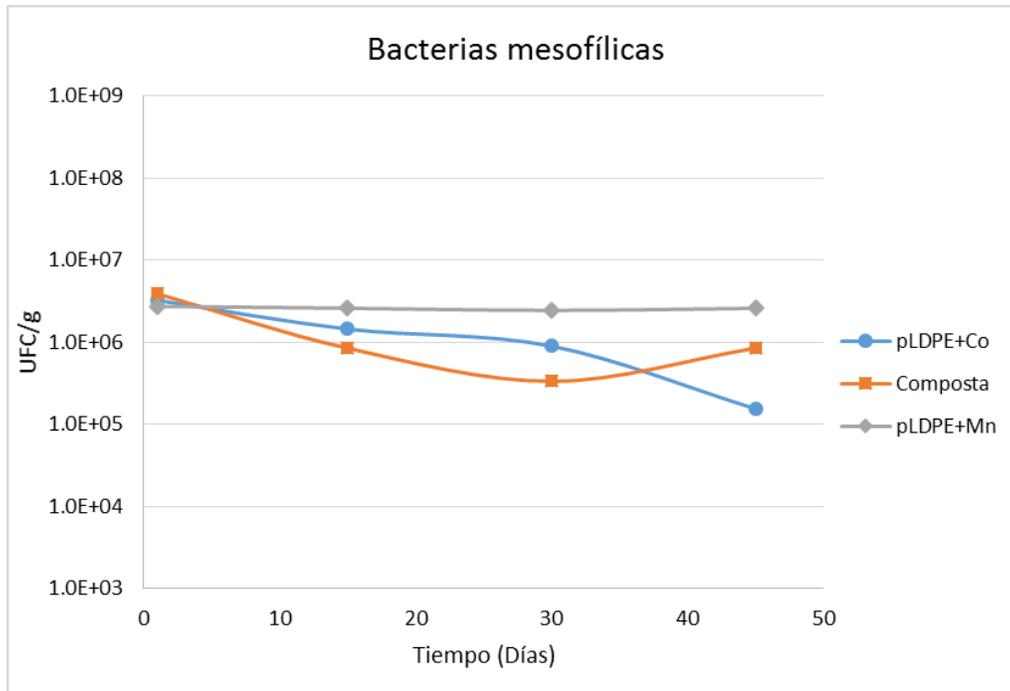
Para el aislamiento de los microorganismos, tanto bacterias como hongos, se tomaron muestras de composta estabilizada (aproximadamente una semana), considerando ésta como día uno. Posteriormente, las muestras fueron tomadas por duplicado después de 15, 30 y 45 días naturales, las cuales contenía las pLDPE elaboradas con dos diferentes aditivos pro-oxidantes (estearato de manganeso y estearato de cobalto) previamente sometidas a un proceso de termo-oxidación.

Una vez realizados cada uno de los muestreos programados, se procedió al análisis de las muestras. Para el aislamiento y cuantificación de las bacterias se utilizó la técnica de filtración en membrana, los resultados de la densidad celular de bacterias se expresa como Unidades Formadoras de Colonias por gramo de muestra (UFC/g).

CUANTIFICACIÓN DE BACTERIAS

En la gráfica 1 se muestra la densidad de bacterias mesofílicas aisladas a partir de la composta control y de la composta que contenía las pLDPE+Mn y pLDPE+Co. En la composta control se registró una densidad celular en el orden del 3.9×10^6 (UFC/g) la cual disminuyó a 3.4×10^5 (UFC/g) después de 30 días del experimento, a pesar de esta tendencia, se observó un incremento a 8.50×10^5 (UFC/g) al finalizar el proceso, es decir el día 45.

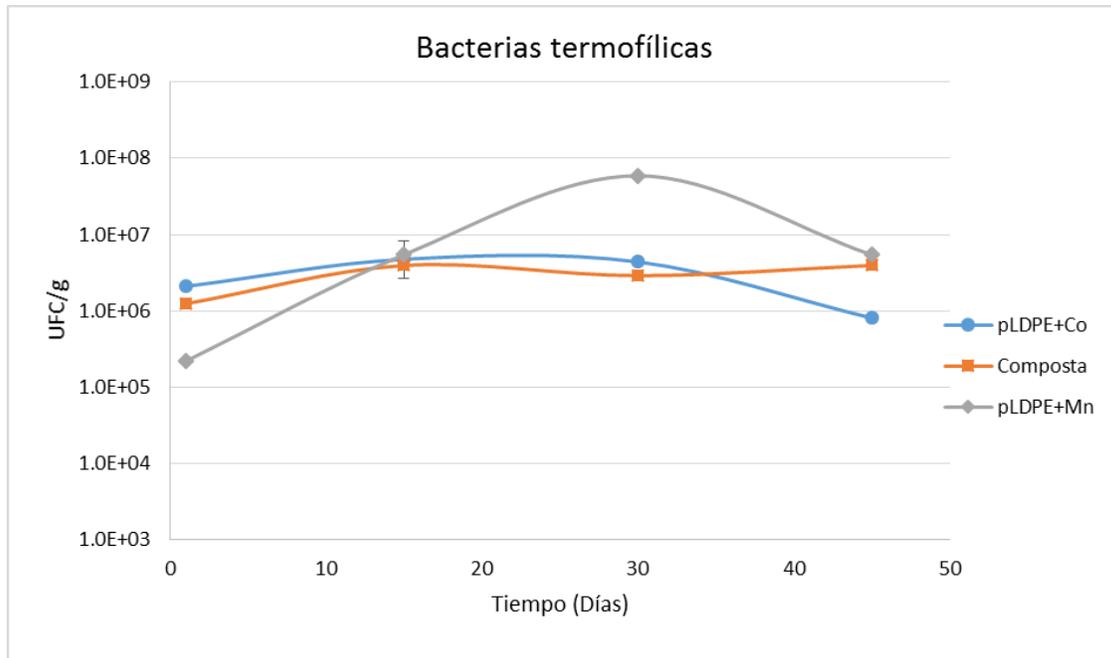
Para el caso de los reactores con pLDPE+Mn, se observó que la densidad de bacterias mesofílicas se cuantificó en el orden del 2.8×10^6 (UFC/g) la cual se mantuvo dentro de ese rango durante todo el proceso de biodegradación, cabe hacer mención que los valores registrados para éste caso, fueron superiores (10^6 UFC/g) a los encontrados en los reactores que contenían tanto pLDPE+Co y sólo composta (control).



Gráfica 1: Resultados del conteo de UFC con la técnica de filtración en membrana para el caso de las bacterias mesofílicas

La densidad de bacterias mesofílicas encontrada en la composta adicionada con pLDPE+Co al inicio del experimento fue de 3.2×10^6 (UFC/g), el cual disminuyó a 1.5×10^5 (UFC/g), lo que evidencia una tendencia descendente en la densidad de bacterias en presencia de la pLDPE+Co (concentraciones bajas de Co < 0.1%). Es probable que éste efecto negativo en la densidad de bacterias, pudo haberse incrementado al haber una mayor concentración de Co, provocando un efecto negativo en la comunidad microbiana.

En la gráfica 2, se muestran los resultados correspondientes a la cuantificación de bacterias termofílicas.



Gráfica 2: Resultados del conteo de UFC con la técnica de filtración en membrana para el caso de las bacterias termofílicas

Para el caso del reactor que sólo contenía composta, se observó una la densidad de bacterias de 1.25×10^6 UFC/g al inicio del experimento. Para el día 45 mostró un ligero incremento de hasta 3.95×10^6 UFC/g, con lo cual se muestra que no existió una variación considerable en la densidad bacteriana de este reactor; la cual se mantuvo en el orden de 10^6 UFC/g, durante los 45 días de la experimentación.

En el caso del reactor que contenía las pLDPE+Mn, la densidad inicial de bacterias se registró en 2.2×10^5 UFC/g, el valor más bajo de los tres reactores (pLDPE+Mn, pLDPE+Co y composta), sin embargo fue aumentando en el transcurso del tiempo y al finalizar el experimento (45 días) se registró en 5.4×10^6 UFC/g.

Para el reactor con pLDPE+Co la densidad inicial de bacterias fue de 2.1×10^6 (UFC/g), la cual disminuyó a 8.1×10^5 UFC/g. Estos resultados indican la tendencia descendente de la densidad de bacterias presentes en el reactor que contenía pLDPE+Co, la cual es más evidente en los días 30 y 45. Este efecto pudo deberse a la presencia del aditivo de Co, el cual podría inhibir el metabolismo de las bacterias, como lo sugirieron Fontanella *et al.* en el año 2010.

AISLAMIENTO DE BACTERIAS

El aislamiento de las bacterias se realizó a partir de los cultivos obtenidos de la cuantificación bacteriana. Posteriormente se corroboró que los cultivos estuvieran puros, de no ser así, se hicieron las resiembras necesarias hasta obtener cultivos de bacterias totalmente puros (Figura 21).

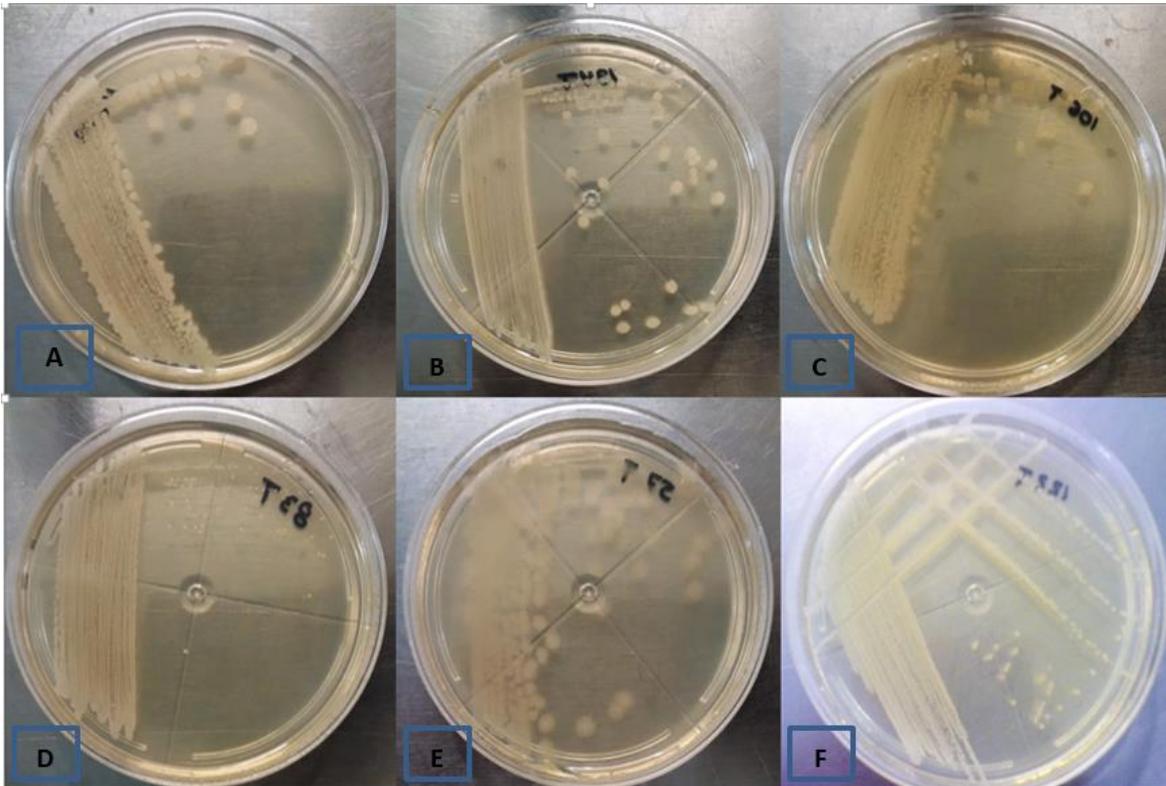


Figura 21: Imágenes de bacterias aisladas a partir de la composta madura que fue utilizada para el proceso de biodegradación de las pLDPE+Mn y pLDPE+Co. En estas imágenes podemos observar diferentes tipos de morfologías, podemos notar que en cada imagen, la cual corresponde a un aislamiento distinto, sólo se observa un tipo de morfología colonial, lo cual es indicativo de un cultivo puro.

A cada uno de los aislamientos se les realizó tinción de Gram, esto con la finalidad de determinar el grupo de bacterias al que pertenecían, es decir, diferenciar las bacterias Gram positivas de las Gram negativas. La tinción de Gram, también permitió confirmar la pureza de los cultivos aislados, en algunos casos se llegó a observar la presencia de posibles esporas (Figura 22), dicha presencia se verificó con una tinción de esporas (Figura 23), las cuales son características de algunos géneros de bacterias como en el caso del género *Bacillus*.

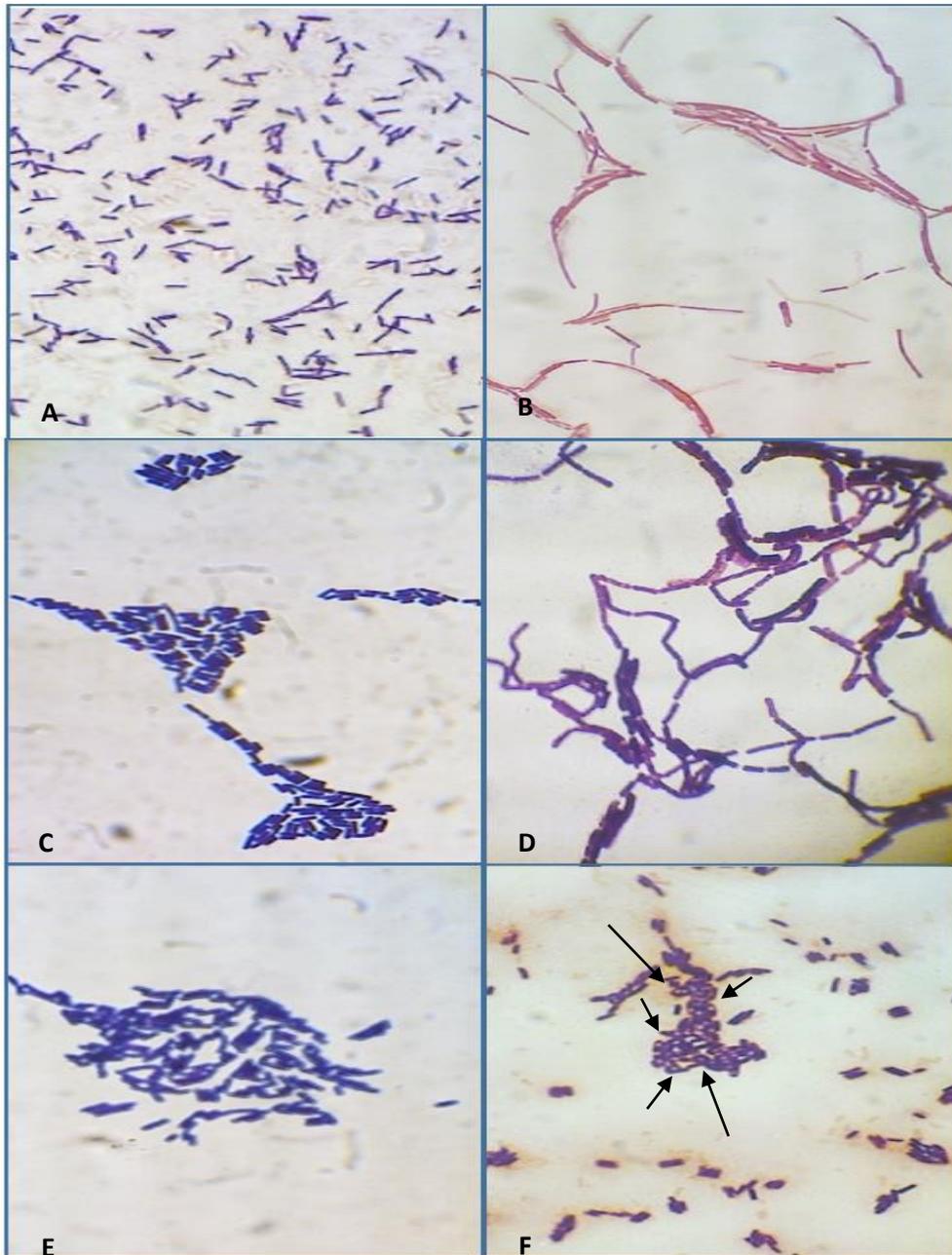


Figura 22: Imágenes de tinciones de Gram vistas al microscopio óptico con el objetivo de 100X, en los recuadros A, C, D, E y F se observan bacterias de tipo Gram positivas, mientras que en B se logran visualizar bacterias de tipo Gram negativas, en B y D se observan bacilos agrupados en cadenas. En la imagen F se logra observar la presencia de posibles esporas.

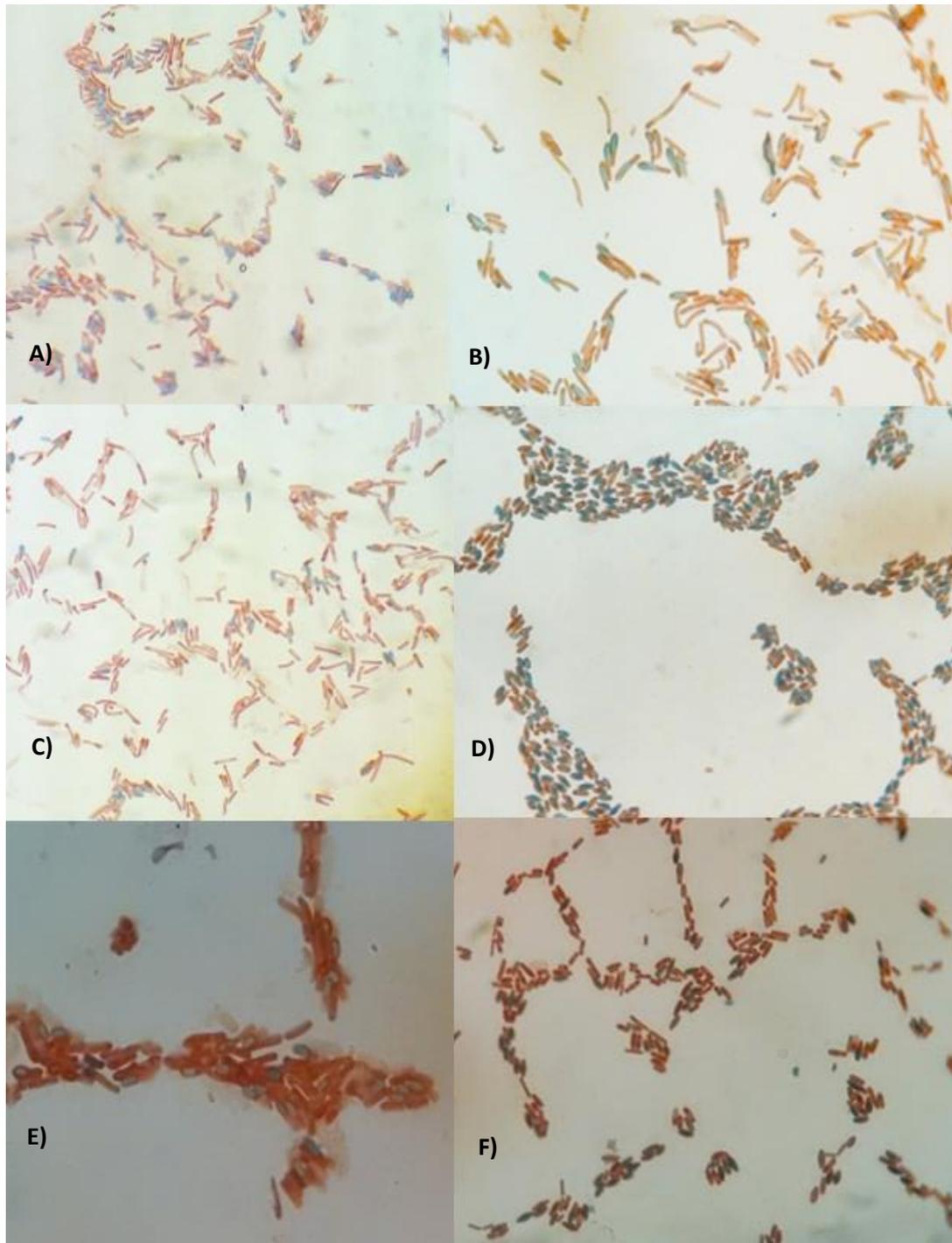


Figura 23: Imágenes de tinciones de esporas, vistas al microscopio óptico con el objetivo de 100X, en las cuales podemos observar endosporas (A, B, C, D, E y F), células vegetativas (A, B, C, D, E y F) y algunas esporas libres (F).

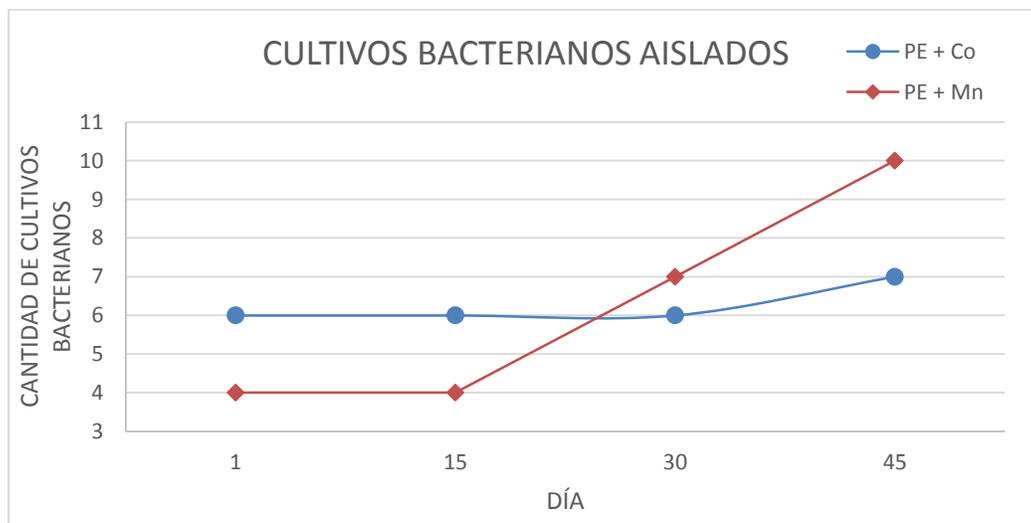


RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



Cabe hacer mención que la cantidad de cultivos bacterianos aislados en cada muestreo tuvo un comportamiento particular. En la gráfica 3 se representa la relación entre la cantidad de cultivos bacterianos aislados y los días de tratamiento transcurridos.

En los reactores que contenían pLDPE+Co se observó mayor número de aislamiento diferentes en los días 1 y 15; sin embargo, después del día 15 se da un cambio en esta relación observándose mayor número de aislamientos en las muestras pertenecientes a los reactores que contenían pLDPE+Mn. Esto se debió probablemente a que durante el proceso de biodegradación, la composta que contenía las pLDPE+Co empezó a tener un efecto tóxico o negativo en la comunidad microbiana, particularmente en las bacterias; el cual no permitió el desarrollo de mayor diversidad de especies bacterianas.



Gráfica 3: Cantidad de cultivos bacterianos aislados a partir de los reactores que contenían las pLDPE+Mn y pLDPE + Co.

IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS

Una vez que se obtuvieron los cultivos puros, se procedió a realizar la extracción de ADN, con el ADN obtenido se realizó un procedimiento de electroforesis (Figura 24) en gel de agarosa (al 1.0 %), con el cual se logró verificar la presencia o ausencia de ADN genómico. Para la visualización del ADN en el gel de agarosa con luz UV se utilizó *GelRed*TM (el cual fue agregado al gel de agarosa durante su preparación).

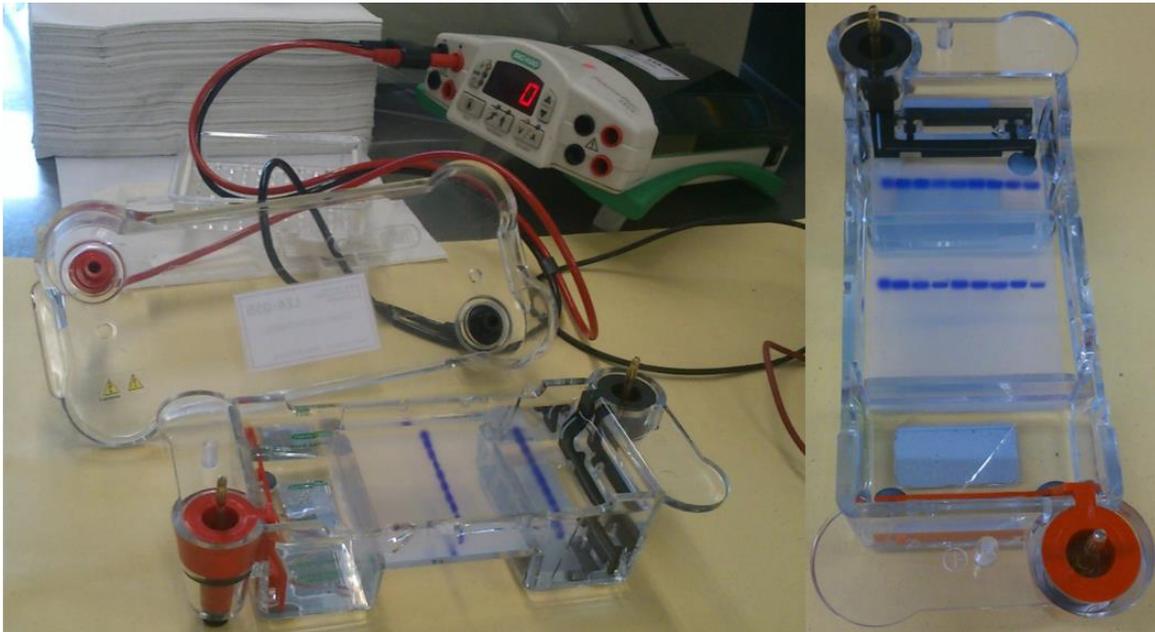


Figura 24: Fotografía de uno de los geles elaborados, colocado en cámara de electroforesis, ya con muestras.

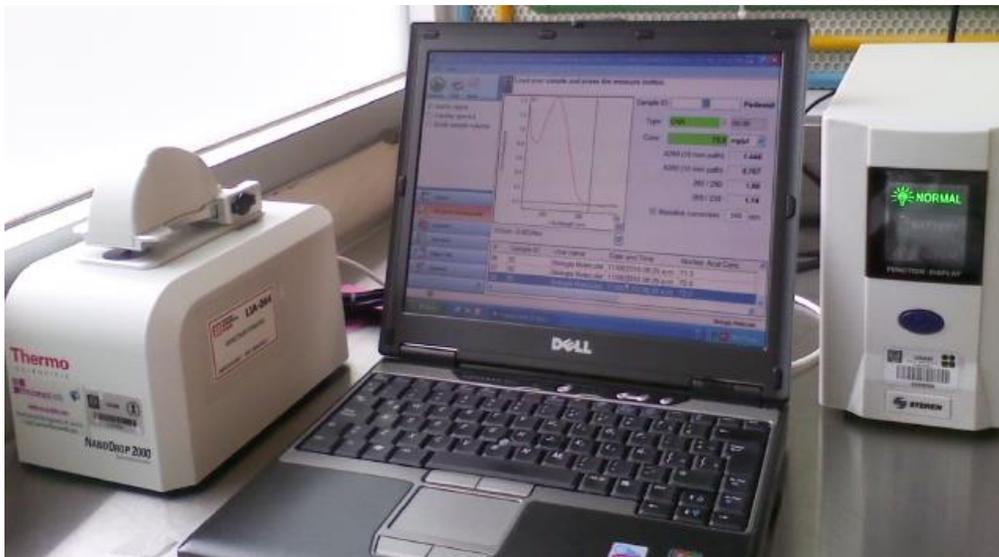


Figura 25: Fotografía del equipo empleado para medir la concentración de ADN (NanoDrop 2000).



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



Para tener mayor precisión y certeza en las mediciones de la concentración de las muestras de ADN se utilizó un espectrofotómetro *NanoDrop 2000* (Figura 25) con el cual se corroboraron las mediciones. Posteriormente se efectuaron los cálculos necesarios para que en las reacciones de PCR se utilizaran de 25 a 50 ng de ADN, cantidad recomendada para una óptima actividad de la enzima utilizada.

Una vez obtenidos los productos de la PCR, estos se colocaron y corrieron en un gel de agarosa (1.0%) [Figura 26] posteriormente se purificaron a partir de este, mediante el uso del kit de purificación GenElute™ de Sigma-Aldrich.

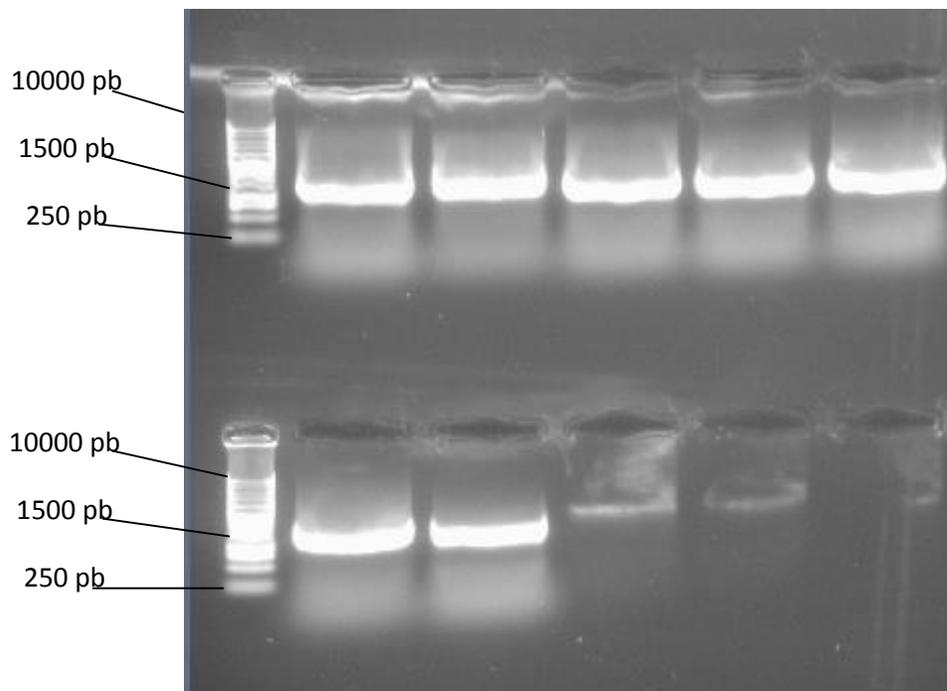


Figura 26: Gel de agarosa a partir del cual fueron purificados los productos de la PCR.

Los productos purificados se enviaron para su secuenciación al Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT), posteriormente se recibieron los datos obtenidos de la secuenciación y fueron comparados con la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Los datos obtenidos se encuentran reportados en la tabla 3.



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



Tabla 3: Microorganismos aislados a partir de composta usada para la biodegradación de p LDPE

Procedencia	Clave	Organismo	% de identidad	E- value	No. de acceso NCBI
Caracterización	2	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	94%	1e-171	NC_000964.3
Caracterización	5	<i>Desulfatibacillum alkenivorans</i>	96%	0.91	NC_011768.1
Caracterización	11	<i>Fibrobacter succinogenes</i> subsp. <i>succinogenes</i>	100%	0.96	NC_013410.1
Co-1	34	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	95%	0.0	NC_000964.3
Co-1	36	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	91%	2e-77	NC_000964.3
Comp-1	42	<i>Bacillus licheniformis</i>	90%	3e-27	NC_006322.1
Mn-1	45	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	87%	0.0	NC_000964.3
Mn-15	48	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	84%	4e-33	NC_000964.3
Mn-15	49	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	74%	3e-169	NC_009725.1
Comp-15	51	<i>Bacillus megaterium</i>	96%	0.0	NC_014103.1
Comp-1	57	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	88%	3e-153	NC_000964.3
Comp-15	58	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	97%	0.0	NC_000964.3
Comp-15	64	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	73%	4e-30	NC_009328.1
Co-30	70	<i>Bacillus pumilus</i>	89%	2.9	NC_009848.1
Co-30	71	<i>Bacillus licheniformis</i>	94%	0.0	NC_006322.1
Comp-30	74	<i>Edwardsiella tarda</i>	89%	2.8	NC_020796.1
Mn-30	77	<i>Geobacillus thermodenitrificans</i>	83%	3e-15	NC_009328.1



RESULTADOS Y ANÁLISIS DE RESULTADOS



Tabla 3: Microorganismos aislados a partir de composta usada para la biodegradación de p LDPE (Continuación)

Procedencia	Clave	Organismo	% de identidad	E- value	No. de acceso NCBI
Co-30	80	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	78%	2e-06	NC_016593.1
Comp-30	83	<i>Geobacillus</i> sp.	95%	0.0	NC_012793.1
Comp-30	92	<i>Bacillus cytotoxicus</i>	84%	1e-93	NC_009674.1
Co-45	95	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	93%	2e-173	NC_000964.3
Co-45	99	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	82%	0.0	NC_016593.1
Comp-45	104	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	78%	1e-114	NC_015660.1
Comp-45	106	<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	95%	0.0	NC_015660.1
Mn-45	113	<i>Bacillus licheniformis</i>	76%	7e-11	NC_006322.1
Mn-45	114	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	94%	0.0	NC_000964.3
Mn-15	127	<i>Bacillus subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i>	90%	7e-129	NC_000964.3

Se identificaron trece especies bacterianas diferentes. La bacteria *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* se aisló tanto del reactor que contenía sólo composta como de los que contenían películas con aditivos pro-oxidantes (control, pLDPE+Mn y pLDPE+Co). Se observó que la diversidad de especies bacterianas se mantuvo durante el proceso, de tal manera que no hubo efecto negativo para el desarrollo de las diferentes especies encontradas.

AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE HONGOS

En lo referente al aislamiento e identificación de hongos, se observó la presencia de tres géneros diferentes de hongos, los cuales corresponden a: *Aspergillus sp.*, *Rhizopus sp.* y *Mucor sp.*. Lo anterior se realizó mediante la observación y comparación de las características microscópicas de las muestras obtenidas (Figuras 27-32).

Los géneros de hongos identificados estuvieron presentes en los tres tipos de reactores (control, pLDPE+Mn y pLDPE+Co) al inicio del experimento. No obstante en el caso de *Aspergillus sp.* fue posible aislarlo a los 15 días del experimento. Sin embargo no se logró su aislamiento en los muestreos de los días 30 y 45.

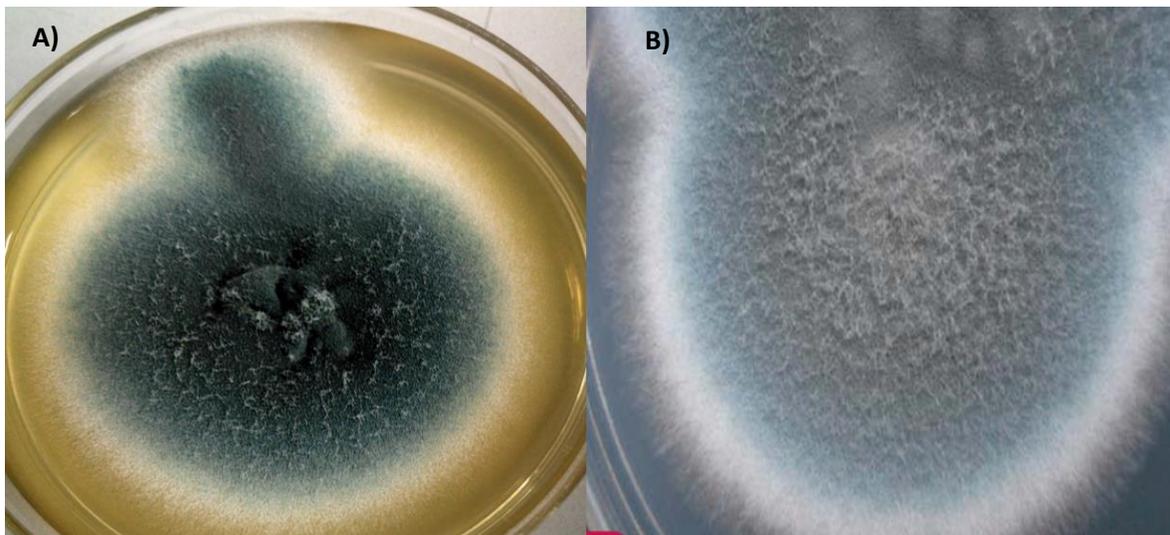


Figura 27: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como β , sembrado en agar Sabouraud. B) Imagen de un hongo del género *Aspergillus fumigatus* (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambos casos se observa desarrollo de colonia plana de aspecto aterciopelado de color verde con halo blanco.

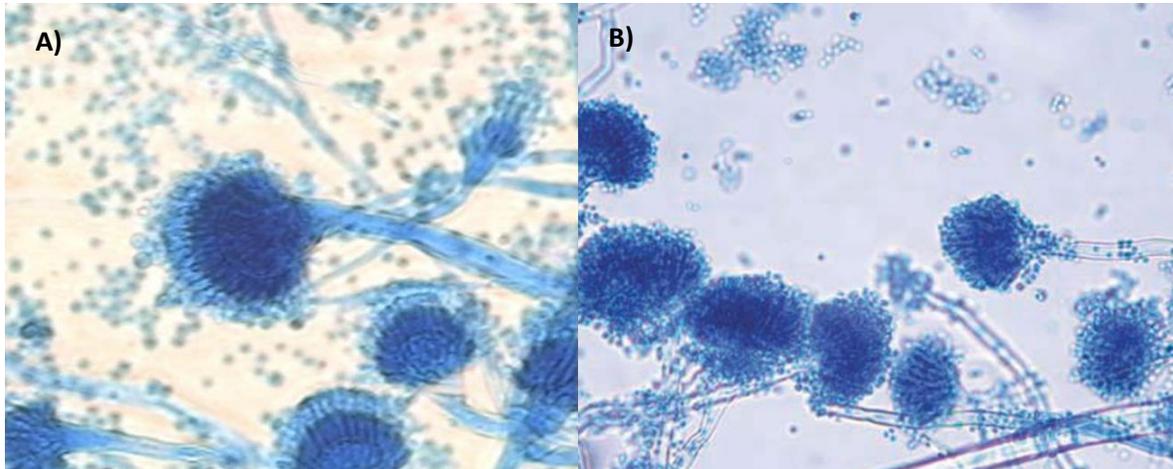


Figura 28: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como β , visto al microscopio óptico con un aumento de 40X. B) Imagen microscópica de un hongo del género *Aspergillus fumigatus* (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambas imágenes se observan cabezas aspergilaes con microconidios redondos.

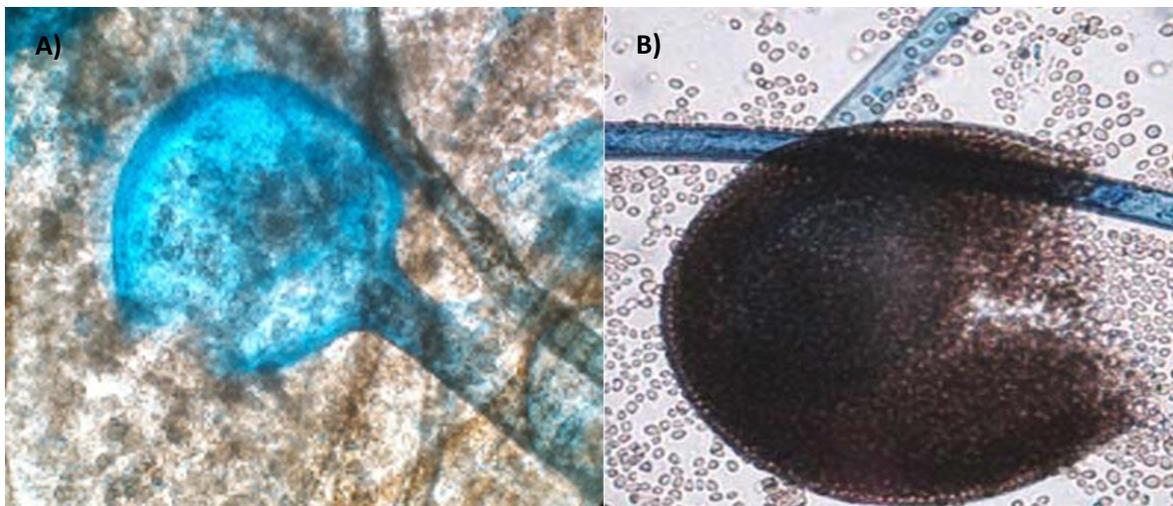


Figura 29: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como A3, visto al microscopio óptico con un aumento de 40X. B) Imagen microscópica de un hongo del género *Rhizopus* sp. (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambas imágenes se observa esporangio con esporangiosporas.

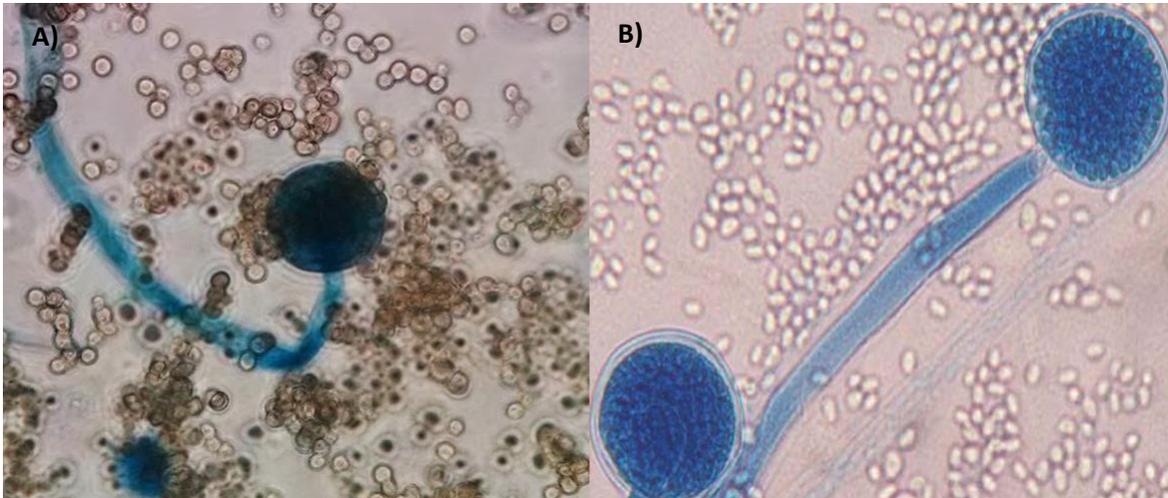


Figura 30: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como B2, visto al microscopio óptico con un aumento de 40X. B) Imagen microscópica de un hongo del género *Mucor* sp. (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambas imágenes se observa esporangio con endosporas redondas.

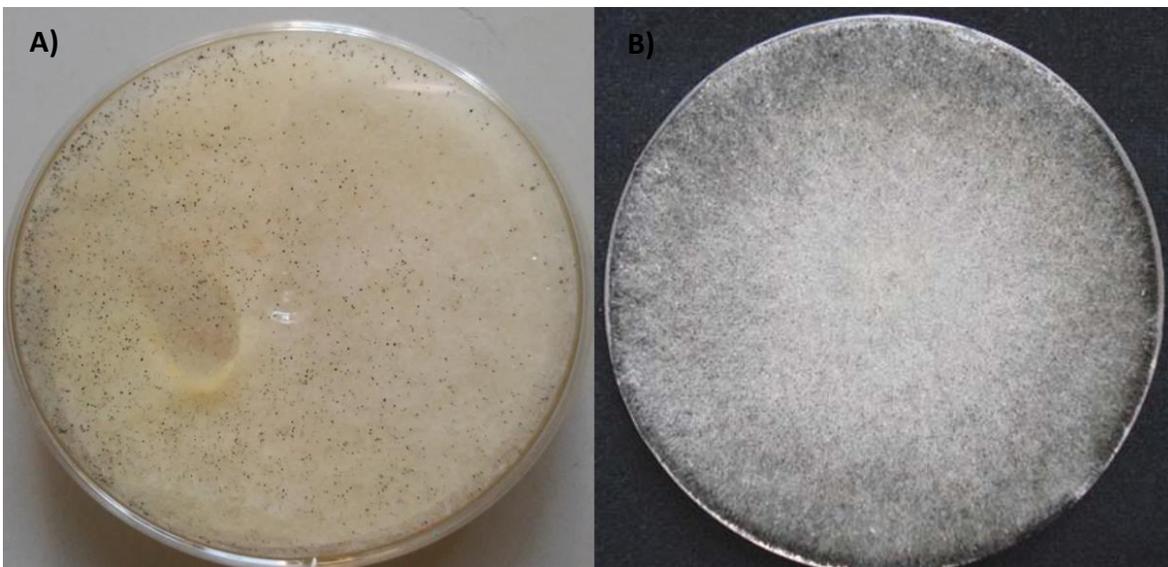


Figura 31: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como B3, sembrado en agar Sabouraud. B) Imagen de un hongo del género *Rhizopus* sp. (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambas imágenes se observa un crecimiento veloso-algodonoso, de color blanco con tonos grisáceos.

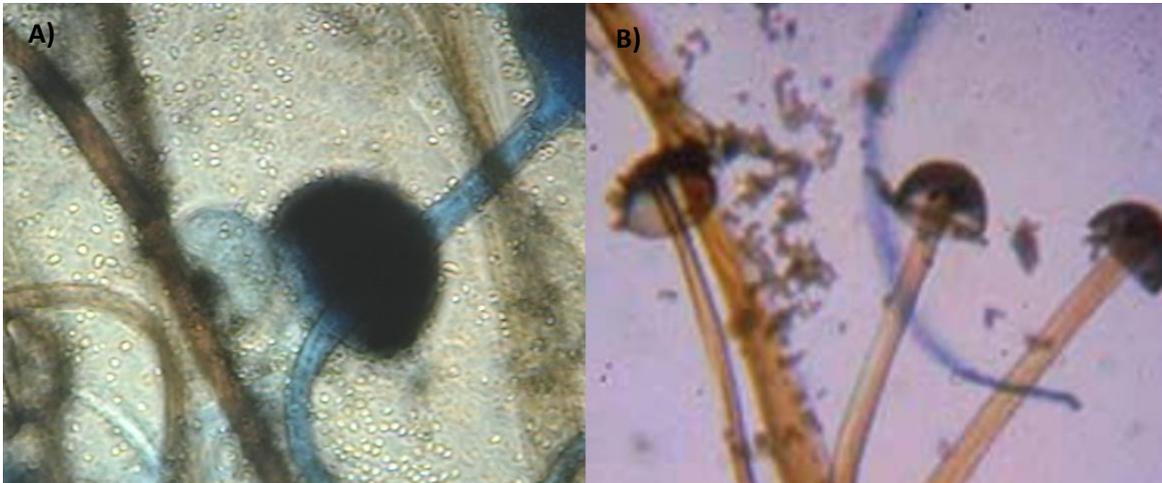


Figura 32: Comparación de fotografías de hongos. A) Imagen del hongo aislado e identificado como B3, visto al microscopio óptico con un aumento de 40X. B) Imagen microscópica de un hongo del género *Rhizopus* sp. (Observada con aumento de 10X) (Obtenida de: Bonifaz A., 2012). En ambas imágenes se observa esporangio con esporangiosporas.



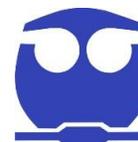
CONCLUSIONES



- Se observó que la densidad bacteriana determinada en la composta con pLDPE+Mn se mantuvo constante durante todo el experimento.
- La composta con pLDPE+Co (Co < 0.5%) mostró una ligera disminución (un log10) en la densidad bacteriana. Este efecto pudo deberse a la presencia del aditivo de Co, la cual puede ser negativa para el desarrollo de las bacterias.
- De las 27 muestras analizadas, se identificaron trece especies bacterianas diferentes, siendo *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*. la que se aisló tanto del reactor que sólo contenía composta, como de los que contenían películas con aditivos pro-oxidantes (pLDPE+Mn y pLDPE+Co).
- Se concluye que la diversidad de especies bacterianas se mantuvo durante el proceso, de tal manera que no hubo efecto negativo por la presencia de los aditivos pro-oxidantes.
- Los hongos identificados fueron: *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus sp.* y *Mucor sp.* Los cuales estuvieron presentes en los tres tipos de reactores (control, pLDPE+Mn y pLDPE+Co) al inicio del experimento; *Aspergillus fumigatus* fue aislado en el muestreo de los 15 días posteriores, no así a los 30 y 45 días del proceso.
- No es contundente la participación de *Aspergillus fumigatus*, *Rhizopus sp.* y *Mucor sp.* en el proceso de biodegradación de pLPDE.



BIBLIOGRAFÍA



1. Alauddin M., Choudkury I. A., Baradie M. A., Hashmi M. S. J.; Plastics and their machining: a review. *Journal Materials Processing Technology*. 1995, volume 54, pp. 40-46.
2. Ammala A., Bateman S., Dean K., Petinakis E., Sangwan P., Wong S., Yuan Q., Yu L., Patrick C., Leong K.H., An overview of degradable and biodegradable polyolefins, *Progress in Polymer Science*, 36: 8, 1015-1049, 2011.
3. ANIPAC (Asociación Nacional de la Industria del Plástico A. C.) [En línea]. México D. F. Boletín: Estadísticas del sector plástico. Materia Prima Petroquímicas (Resinas). Reporte 01-04-04-11. <http://www.anipac.com> México 2011. Fecha de consulta: Febrero 2015.
4. Billmeyer Fred W. Jr. Plásticos y elastómeros hidrocarburoados en Ciencia de los polímeros. Editorial Reverte. Barcelona, España. 1978. p.p. 385-390.
5. Bolsas de plástico, mal que dura hasta mil años. En *Informador.mx*: <http://www.informador.com.mx/mexico/2009/79222/6/bolsas-de-plastico-mal-que-dura-hasta-mil-anos.htm>
6. Bonifaz A. *Micología médica básica*. Cuarta edición. McGraw-Hill Educación. México, D.F. 570 pp. 2012.
7. Bou G. Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 2011; 29 (8): p. 601-608.
8. Castillo Rodríguez Francisco. *Biotecnología ambiental*. Editorial Tébar. Madrid, España. 2005.
9. Cataldo F, Ricci G, Crescenzi V. Ozonization of atactic and tactic polymers having vinyl, methylvinyl, and dimethylvinyl pendant groups. *Polym Degrad Stab* 2000, volume 67:421-426.
10. Cataldo F. Ozone interaction with conjugated polymers - I. Polyacetylene. *Polym Degrad Stab* 1998; 60: 223-231.
11. Cataldo F. Ozone interaction with conjugated polymers - II. Polyphenylacetylene. *Polym Degrad Stab* 1998; 60: 233-237.



BIBLIOGRAFÍA



12. Cavalier-Smith T. Only six kingdoms of life. *Proceedings the Royal Society. Lond. B* 271. 1251-1262. 2004.
13. Cerillo Galán Juan José, Síntesis y caracterización de carboxilatos metálicos, departamento de Ingeniería Química, EPSEVG, 2009.
14. Charest, M.H., Antoun, H., and Beauchamp, C.J. Effects of the humic substances of de-inking paper sludge on the antagonism between two compost bacteria and *Pythium ultimum* *Bioresour. FEMS Microbiology Ecology.*, 2005, vol. 52, pp. 219-227.
15. Chiellini E., Corti A., D'Antone s., Baciú R., Oxo-biodegradable carbon backbone polymers- Oxydative degradation of polyethylene under accelerated test conditions, *Polymer Degradation and Stability*, 91: 11, 2739–2747, 2006.
16. Clarridge III JE. Impact of 16S rRNA Gene Sequence Analysis for Identification of Bacteria on Clinical Microbiology and Infectious Diseases. *Clin Microbiol Rev.* 2004; 17: 840–862.
17. Cooperband Leslie. *The Art and Science of Composting. A resource for farmers and compost producers.* Center for Integrated Agricultural Systems, University of Wisconsin-Madison. 2002
18. Cristán Arturo, Ize Irina y Gavilán Arturo. La situación de los envases de plástico en México. *Gaceta Ecológica* No. 69. INE-SEMARNAT. México. 2003. pp. 67-82.
19. Crowe M., Nolan K., Collins C., Carty C., Donlon B. y Kristoffersen M. 2002 Biodegradable municipal waste management in Europe. Part 3: Technology and market issues. *European Environment Agency*, p. 32.
20. Davis G., Read A., Bulson H., Harrison D., Billett E., Open windrow composting of polymers: An investigation into the rate of degradation of polyethylene, *Resources, Conservation and Recycling*, 40:4, pp 343- 357, 2004.
21. De Necochea Rosalia y Canultec Juan Carlos. Secuenciación de ácidos nucleicos. Instituto de Biotecnología-UNAM. Cuernavaca, Mor. 2004.



BIBLIOGRAFÍA



22. Díaz L. F., De Bertoldi M., Bidlingmaier W. y Stentiford E. Compost Science and Technology. Waste management series. Elsevier. Amsterdam. 2007.
23. Díaz. L. El reciclado del polietileno en el contexto del desarrollo sustentable. Facultad de estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México, D.F, 2007.
24. Edwards Clive A. and Arancon Norman Q. The utilization of vermicomposts in horticulture and agricultura. Soil Ecology Laboratory, The Ohio State University, Columbus, Ohio, U.S.A. 2007
25. Encarnación G., Ana Paulina Avila A. P., Campos A. J. y Solórzano G. Estudio comparativo de bolsas de plástico degradables versus convencionales mediante la herramienta de Análisis de Ciclo de Vida. Dirección de Investigación en Residuos y Sitios Contaminados. SEMARNAT. 2009.
26. Epstein E. The science of composting. CRC Press LLC. Estados Unidos de América. 1997
27. FAO. Marcadores moleculares: una herramienta para explorar la diversidad genética. Disponible en: www.fao.org/docrep/012/a1250s/a1250s17.pdf
28. Fontanella S., Bonhomme S., Koutny M., Husarova L., Brusson J. M., Courdavault J. P., Pitteri S., Samuel G., Pichon G., Lemaire J., Delort A. M. Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. Polymer Degradation and Stability 95. 1011-1021. 2010
29. Gilding DK. Biodegradable polymers. In: Williams DF, editor. Biocompatibility of clinical implant materials, vol. II. Boca Raton, Fla., CRC Press, 1981 [chapter 9].
30. Giménez A., Gea V., Huerta O., López M. y Soliva M. 2005. II congreso sobre residuos biodegradables y compost: El reto de fomentar el consumo de los productos finales. Sevilla
31. Gobernado M. y López-Hontangas J.L. Identificación bacteriana. Enfermedades infecciosas y Microbiología Clínica. 2003; 21 (Supl. 2): p. 54-60.



BIBLIOGRAFÍA



32. Grassie N, Scott G. Polymer degradation and stabilization. New York, NY: Cambridge University Press, 1985.
33. Gürtler V, Stanisich VA. New approaches to typing and identification of bacteria using the 16S-23S rADN spacer region. *Microbiol.* 1996; 142: 3–16
34. Gutiérrez J. Biodegradación de polietileno de baja densidad por consorcios microbianos. Facultad de estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México, D.F. 2013.
35. Hassen A., Belguith K., Jedidi N., Cherif A., Cherif M. and Boudabous A. “Microbial characterization during composting of municipal solid waste”. *Bioresource Technology*, 2001, Vol. 80, no.3, pp 217-225.
36. Haugh. *The Practical Handbook of compost Engineering*. Lewis publishers ISBN 0873713737; *The Animal By-Products*, 2002, pp. 374.
37. Hernández G. Identificación de bacterias del género Salmonella mediante la secuenciación de ADN de nueva generación. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química. 2014.
38. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI). Anuario estadístico y geográfico de los Estados Unidos Mexicanos 2013. 2014.
39. Jensen JPT, Kops J. Photochemical degradation of blends of polystyrene and poly (2, 6-dimethyl-1, 4-phenylene oxide). *Journal of Polymer Science: Polymer Chemistry Edition* 2003, Vol. 18, issue 8, pp. 2737-2746.
40. Khabbaz F, Albertsson AC, Karlsson S. Chemical and morphological changes of environmentally degradable polyethylene films exposed to thermo-oxidation. *Polym. Degrad. Stabil.* 1999; 63: 127-138.
41. Koneman E. Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 2008.
42. Kronenthal R. L. Biodegradable polymers in medicine and surgery. In: Kronenthal R.L, Oser Z, Martin E, editors. *Polymers in medicine and surgery*. New York, Plenum Press, 1975. pp. 119-137.
43. LA INDUSTRIA DEL PLASTICO EN MEXICO. *Revista Ingeniería Plástica* en:



BIBLIOGRAFÍA



http://www.ingenieriaplastica.com/novedades_ip/instituciones/Anipac/anipac_indmex.html consultada: 6/02/2015.

44. Landín G. El composteo como opción para el aprovechamiento de Residuos orgánicos en asentamientos irregulares. Facultad de Ingeniería. UNAM. México, D.F. 2010.
45. Lee B., A.L. Pometto III, A. Fratzke, et al. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by Phanerochaete and Streptomyces species. Applied And Environmental Microbiology, 1990, Vol. 57, pp. 678-685.
46. Li J, Guo S, Li X. Degradation kinetics of polystyrene and EPDM melts under ultrasonic irradiation. Polym Degrad Stab 2006; 89(1): 6-14
47. Limón Margarita, Biodegradación de polietileno de baja densidad por hongos filamentosos. UAM Iztapalapa, México, D. F., 2001, 134 pp.
48. Marcilla A, Gomez A, Menargues S, Garcia-Martinez J, Cazorla-Amoros D. Catalytic cracking of ethylene-vinyl acetate copolymers: comparison of different zeolites. J Anal Appl Pyrolysis 2003; 68-69:495-506.
49. McPherson M. y Moller S. "PCR". THE BASICS (Garland Science). Taylor y Francis Group, UK. Capítulo 1. 2007
50. Misra R. V., Roy R. N. y Hiraoka H. 2003. On-Farm Composting Methods. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2003. ISSN 1729-0554.
51. Mohee R., Unmar G.D., Mudhoo A., Khadoo P. Biodegradability of biodegradable/degradable plastic materials under aerobic and anaerobic conditions. Waste Management. 28 (2008). 1624–1629.
52. Molla, A.H., Fakhru-Razi, A., Abd-Aziz, S., Hanqfi, M.M., Roychoudhury, P.K., and Akan, M.Z., A potential resource for bioconversion of domestic wastewater sludge. Bioresour, Technol, 2002, vol. 85, pp. 263-272.
53. Montaña N, Sandoval A. Camargo S, Sánchez J. Los microorganismos: pequeños gigantes. Elementos 77. 15-23. 2010
54. Montoya H. Microbiología básica para el área de salud y afines. Segunda Edición. Editorial Universidad de Antioquía. Colombia. 2008. 31-42.



BIBLIOGRAFÍA



55. Moreno Casco J. y Moral Herrero R (Editores científicos). Compostaje. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 2007. 530 págs. pp. 77
56. Neklyudov A. D., Fedotov G. N., Ivankin A. N.. Intensification of Composting Processes by Aerobic Microorganisms: A Review. Applied Biochemistry and Microbiology. 2008; Vol. 44 (1): 6–18.
57. Pablos J. L., Abrusci C., Corrales T., Catalina F., González A., López-Marín J., Marín I. Biodegradación de filmes agrícolas basados en polietileno y aditivos pro-oxidantes. Revista de Plásticos Modernos. 2009, Vol. 98; 639: 198-203.
58. Palmisano AC, Pettigrew CA. Biodegradability of plastics. Bioscience 1992; 42 (9): 680-5.
59. Pérez Carmen. Empaques y embalajes. Red tercer milenio. Estado de México. 2012.
60. Plásticos - Situación en 2011. Análisis de la producción, la demanda y la recuperación de plásticos en Europa en 2010. Disponible en: <http://www.plasticseurope.es/centro-de-conocimiento/publicaciones.aspx>
61. Pospisil J, Horak Z, Krulis Z, Nespurek S. The origin and role of structural inhomogeneities and impurities in material recycling of plastics. Macromolecular Symposia 1998, volume 135, pp. 247-63.
62. Rabell M. F. Estudio de la biodegradabilidad y ecotoxicidad de polietileno formulado con aditivos pro-oxidantes en las condiciones ambientales de la Ciudad de México. UAM Azcapotzalco. México, D. F. 2012.
63. Ranby B. Photodegradation and photo-oxidation of synthetic polymers. Journal of Analytical and Applied Pyrolysis 1989, volume 15, pp. 237-247.
64. Riveros F. Uso de tecnologías para el análisis bioinformático de datos de secuenciación masiva. Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología. Cuernavaca Morelos. 2014.
65. Rodríguez y Rosagel. Industria. Los cinco insumos más utilizados. Diciembre 2011. Disponible en: <http://www.manufactura.mx/industria/2011/12/29/los-cinco-insumos-mas-utilizados>



BIBLIOGRAFÍA



66. Román P., Martínez M., Pantoja A. Manual de compostaje del agricultor. Experiencias en América Latina. Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Oficina Regional para América Latina y el Caribe. Santiago de Chile. 2013.
67. Roy P.K., Surekha P., Rajagopal C., Choudhary V., Effect of cobalt carboxylates on the photo-oxidative degradation of low density polyethylene, Part I, Polymer Degradation and Stability 91: 9, 2006.
68. Ruiz B. ¿Papel o plástico? En: ¿Cómo ves?, No. 138, mayo 2010. Universidad Nacional Autónoma de México. pp. 10-14.
69. Sheldrick GE, Vogl O. Induced photodegradation of styrene polymers: a survey. Journal Polymer Engineering and Science 2004, volume 16, issue 2, pp. 65-73.
70. Shiralipour A., McConnell D.B., and Smith W.H., Biomass Bioenergy, 1992, vol. 3, nos. 3-4, pp. 262-266 (Chem. Abstr., 1993, vol. 118, no. 58704).
71. Singh B., Sharma N. Mechanistic implications of plastic degradation. Polymer Degradation and Stability. 2008; 93: 561-584.
72. Tayler DR. Mechanistic aspects of the effect of stress on the rate of photochemical degradation reactions in polymers. J Macromol Sci Part C Polym Rev 2004; 44(4):351-388.
73. Teare DOH, Emmison N, Tonthat C, Bradley RH. Cellular attachment to UV ozone modified polystyrene surfaces. Langmuir 2000; 16(6): 2818-2824.
74. Tharanathan R. N., Biodegradable films and composite coatings: past, present and future, Trends in Food Science & Technology, 2003, Vol. 14, issue 71.
75. Tortora G., Funke B., Case C. Introducción a la microbiología. 9ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, 2007.
76. Uribe, Diego; Giraldo, Daniel; Gutierrez, Susana y Merino, Fernando. Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. Rev. peru biol. [online]. 2010, Vol.17, n.1, pp. 133-136. ISSN 1727-9933.



BIBLIOGRAFÍA



77. Velasco-Velasco, et al. CO₂ y dinámica de poblaciones microbianas en composta de estiércol y paja con aireación. *TERRA Latinoamericana*, Vol. 22, Num.3, Julio-septiembre, 2004., pp. 307-316. Universidad Autónoma de Chapingo, México. ISSN (Versión impresa): 0187-5779.
78. Vermicompost. Un abono de alta calidad para mejorar la fertilidad del suelo. Naturland Internacionales. Disponible en: http://www.naturland.de/fileadmin/MDB/documents/International/Espanol/06_2011_Vermikompost_Homepage_ES.pdf. Consultado en Febrero 2015.
79. Wong J.W.C., Fang M., Li G.X., and Wong M.H., Feasibility of Using Coal Ash Residues as CO-Composting Materials for Sewage Sludge, *Environ. Technol.*, 1997, vol. 18, no. 5, pp. 563–568.