

Efectos de las Asociaciones Microbianas sobre la Degradabilidad del Polietileno de Baja Densidad

Autora: Patricia Noemí Martínez Lovera¹

Resumen

Se determinó la biodegradabilidad del polietileno de baja densidad por acción de bacterias nativas presentes en el relleno sanitario de la Ciudad de Encarnación. Para esto se utilizaron muestras de suelo de dos zonas del relleno sanitario y muestras de polietileno de baja densidad. Los microorganismos presentes en el suelo fueron adaptados hasta la obtención de biomasa en condiciones controladas utilizando polvo de polietileno y un medio enriquecido como medio de crecimiento. Una vez cumplido el tiempo de adaptación se procedió a evaluar la acción biodegradadora de las bacterias presentes en el relleno sanitario sobre el polietileno utilizando el mismo como única fuente de carbono, constituido por una alícuota de bacterias y de medio de crecimiento. El efecto de las bacterias nativas sobre el polietileno se determinó mediante el peso residual [mg] de los pedazos de plásticos pesados cada 7 días durante 35 días. Como resultado, se obtuvo que las bacterias nativas al finalizar los 35 días del tiempo experimental, biodegradaron un 8,5 % de polietileno de baja densidad. Se realizó bioaugmentación con cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, considerando que se detectó la presencia en los medios enriquecidos, no dando ninguna variación de peso con respecto a los valores ya obtenidos.

Palabras Claves

Biodegradación, bacterias nativas, plásticos, medio de crecimiento, relleno sanitario

Abstract

This study determined the biodegradability of low-density polyethylene (LPDE) by the action of native bacteria in the landfill of the City of Encarnación. To do this research, low-density polyethylene samples of soil were taken from two areas of the landfill. Microorganisms present in the soil were adapted to produce biomass in controlled conditions using polyethylene powder and enriched environment as the source of growth. Once the adaptation time was reached, it was evaluated the biodegrading action of bacteria in the landfill on polyethylene using it as the only carbon source, which consisted of an aliquot of bacteria and the source of growth. The Effect of the native bacteria on the polyethylene was determined by the remaining weight [mg] of the heavy plastics pieces, which were weighed every 7 days for 35 days. As a result, after 35 days of experimental period it was detected that the native bacteria biodegraded 8.5% of low-density polyethylene. Bioaugmentation was performed with strains of *Pseudomonas aeruginosa*, whereas its presence was detected in an enriched environment, not providing any weight variation in comparison to the values acquired previously.

Keywords

Biodegradation, native bacteria, plastics, growing environment, landfill site.

¹Profesora Investigadora de la UNI

e-mail: patricia.martinezlovera@gmail.com

Recibido: 05/05/2016 Aceptado: 26/09/2016

Introducción

Los desechos sólidos más producidos en nuestro país y a nivel global son los plásticos. Su proceso natural de degradación es lento ya que le toma entre 50 y 300 años completarlo y producen una gran cantidad de lixiviados.

La biorremediación puede ser una alternativa para degradar los plásticos, considerando que se basa en el uso de sistemas biológicos para la reducción de sustancias tóxicas y contaminantes, pretendiendo acelerar ciclos naturales mediante la combinación de colonias microbianas (Manahan, 2006)).

Considerando que en los rellenos sanitarios el polietileno de baja densidad es mezclado con materia orgánica en estado de descomposición, es común encontrar diferentes microorganismos en esos lugares, y teniendo en cuenta la estructura química de los plásticos, los microorganismos podrían nutrirse de ellos. (Uribe, 2010)

Por ello, se planteó como trabajo de investigación estudiar la acción biodegradadora de las diferentes colonias de microorganismos presentes en el Relleno Sanitario de la Ciudad de Encarnación a escala laboratorio y bioaumentando con los microorganismos encontrados.

Las bolsas plásticas hechas de polietileno son los tipos de plásticos que más contaminan el ambiente debido a que son utilizados de forma indiscriminada, según la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) cada año aproximadamente entre 500.000 millones y 1 billón de bolsas de plástico son consumidas alrededor del mundo, lo que representa que cada minuto se consumen 1 millón de estas bolsas. Además millones de ellas se convierten en basura cada año, por lo que es fundamental encontrar un método natural como la biorremediación que degrade los desechos a fin de optimizarlo por medio de los procesos naturales que ya existen como una alternativa de biorremediación para disminuir la cantidad de polietileno que se deposita en el relleno sanitario.

Existen antecedentes de microorganismos capaces de degradar los plásticos entre los que se pueden mencionar el trabajo de investigación realizado por Alonso y otros (2012) el cual estudió la degradación del poliestireno y polipropileno con microorganismos de vermicompost, donde se encontró que la *Pseudomonas aeruginosa* sobre los materiales presentaron degradación de los polímeros.

Así también Meza (2013) investigó la Biodegradabilidad de Polietileno Tereftalato y de Oxopolietileno, a nivel de laboratorio, por la acción de bacterias nativas presentes en humus de lombriz, heces de caballo y heces de gallina, donde se pudo encontrar una mayor acción degradadora por parte del humus de lombriz sobre el oxopolietileno. Asimismo, Uribe (2010) estudió Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú, que determinó el porcentaje de peso perdido por el polietileno sometido a las cepas aisladas, las variaciones se midieron por espectro infrarrojo, observándose una disminución de 5,4% a pH 7 y 4,8% a pH 5,5.

Materiales y Métodos

Selección de las muestras de suelos.

Se realizó un recorrido por el relleno sanitario de la ciudad de Encarnación para la selección de la zona donde se tomaron las muestras de suelo que fueron utilizadas para la producción de biomasa, considerando que poseen una microbiota nativa que es incrementada cuando entra en contacto con los residuos que sirven de sustrato para la proliferación de microorganismos.

Se seleccionaron cuatros zonas de la cual se obtuvieron 300 gr de suelo y las muestras fueron analizadas utilizando un equipo multianalizador el pH, conductividad y salinidad, a fin de determinar sus características y que éstas sean propicias para el crecimiento de los microorganismos que serán utilizados para la producción de biomasa en la investigación.

Para realizar estos análisis se prepararon las muestras en base a la Norma Oficial Mexicana, (2002) la cual establece las especificaciones de fertilidad, salinidad y clasificación de suelos.

Una vez determinados los parámetros de pH, conductividad y salinidad se procedió a la selección de las muestras que presentaron las mejores características utilizadas para la obtención de biomasa para las pruebas de degradabilidad del polietileno de baja densidad.

Obtención de biomasa

La muestra de polietileno de baja densidad fue adquirida de un supermercado local.

Preparación de polvo de polietileno

A partir de esta muestra se preparó el polvo necesario para las pruebas; para esto se recortaron y se pesaron 6 gr del polietileno cada uno con 6 gr. de Cloruro de Sodio (Uribe, 2008). Finalmente se secó el papel de filtro en la estufa a 130 °C por 30 minutos.

Preparación de medio de crecimiento y medio de enriquecimiento

Para la preparación del medio de crecimiento se empleó un cultivo de macro y microelementos siendo el polietileno la única fuente de carbono del medio necesaria para el crecimiento de los microorganismos presentes en el suelo del relleno sanitario (Uribe & otros, 2010).

Se procedió a preparar el medio de enriquecimiento para la cual se transvasó 100 ml del medio de crecimiento en 6 frascos boeco estériles de 500 ml en donde se añadió 0,2 gr de polvo de polietileno y 1 gr de cada muestra de suelo del relleno sanitario seleccionado para la investigación.

Para la adaptación y obtención de biomasa de las bacterias nativas se procedió a incubar a los frascos enriquecidos a temperatura ambiente de 25°C por 30 días controlando su crecimiento, luz, temperatura, pH y oxigenación, parámetros necesarios para el crecimiento de los microorganismos.

La cinética de crecimiento de las bacterias nativas en el medio de enriquecimiento se cuantificó por espectrofotómetro UV/Visible.

Considerando la conversión de 1 OD600 = 1.109 células/ml de Ausebel es aplicable para asociaciones de microorganismos (Niño, 2009).

Determinación de la acción biodegradadora utilizando biomasa obtenida.

Una vez cumplidos los 30 días de adaptación, se procedió a determinar si es posible degradar el polietileno con las bacterias presentes en el suelo del relleno sanitario.

Se tomó una alícuota de 10 ml del medio enriquecido y se transvasó a nuevos frascos boeco estériles de 500 ml añadiendo 90 ml de medio de crecimiento hasta completar un volumen de 100 ml.

Se preparó el polietileno para la prueba, recortándolo con una dimensión de 2 cm x 4 cm. (Meza, 2013)

Una vez identificado el peso de cada pedazo de polietileno se pusieron en contacto en los frascos preparados que contienen los microorganismos adaptados.

Se determinó la biodegradabilidad por el peso residual en miligramos cada 3 días durante 35 días del polietileno por acción de bacterias nativas presentes en el suelo del relleno sanitario, considerando que si existiera degradación, debería llevar a la reducción de peso del polietileno, ya que algunos componentes podrían ser metabolizados por los microorganismos.

Para determinar el porcentaje de pérdida de peso residual del polietileno se aplicó la siguiente fórmula matemática, utilizado comúnmente en la medición de humedad de producto sólido.

$$\% \text{ pérdida} = (W_i - W_f) / W_i$$

W_i: peso inicial del polietileno

W_f: peso final del polietileno en función al tiempo.

Identificaciones morfológicas de las bacterias.

Una vez realizada la última medición del peso residual de cada fragmento de polietileno, se procedió a la identificación de microorganismos presentes en los medios enriquecidos donde se realizaron las pruebas de biodegradabilidad.

Los microorganismos se identificaron teniendo en cuenta las características morfológicas microscópicas por medio de tinción de Gram.

En la tinción se observan de color azul-violeta las gram positivas y de color rosa las negativas. Luego se examinó al microscopio con aceite de inmersión y fijándose sobre todo en el color y las formas de cada preparación.

Inoculación de cepa de *Pseudomona aeuroginosa* estandarizados.

Una vez identificado el grupo de microorganismos predominante en el medio de enriquecimiento, se realizó la bioaumentación de la biomasa de microorganismos con el fin de aumentar la actividad microbiana utilizando cepa pura de *Pseudomona aeuroginosa*.

Se realizó la estandarización de la cantidad de bacterias a agregar en los medios de enriquecimientos usando como referencia 0,5 de Mc Farland que corresponde a $1,5 \cdot 10^8$ bacterias por ml.

Una vez estandarizada, se agregó a los medios de enriquecimientos que poseen el polietileno a ser biodegradado y se determinó el peso residual al igual que la primera prueba.

Resultados y Discusión

Para poder discutir las características se tomaron los valores de referencias de la Norma Oficial Mexicana NOM-021 RECNAT-2000 en cuanto a los valores de pH y conductividad eléctrica.

Tabla 1

Análisis muestras: M1, M2, M3 y M4.

Parámetros	M ₁	M ₂	M ₃	M ₄
pH	7,15	7,72	7,88	7,07
Conductividad eléctrica (ds/m)	0,0034	0,0029	0,0068	0,00088
Salinidad (%)	0,0000	0,0000	0,0000	0,00000
	1	0	3	

Considerando los resultados de las cuatro muestras, se seleccionaron la muestra 1 y la muestra 4 debido a los valores de pH como parámetro importante ya que la mayoría de los microorganismos se desarrollan normalmente a pH neutro. La conductividad es considerada despreciable por los valores bajos que presentaron, indicando que existen pocos electrolitos en solución.

Obtención de biomasa.

Se realizó la lectura de la absorbancia a una longitud de onda de 600 nm, que sirvió para demostrar el aumento de números de células en los medios de enriquecimiento, utilizando la siguiente relación:

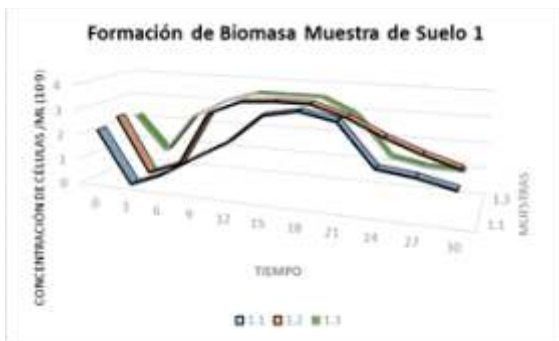
$$1 \text{ OD}_{600} = 1 \cdot 10^9 \text{ células/ml}$$

Analizando los datos de medición de absorbancia de los datos de las muestras 1 y 2, estos demuestran cómo los valores de la misma varían en forma proporcional con la concentración estimada de células por ml de medio enriquecido.

A continuación se puede observar el aumento de la masa del cultivo de los medios enriquecidos utilizando como muestra 1 para producción de biomasa, las mismas presentaron un comportamiento característico de las fases de crecimiento microbiano.

Para el procesamiento de datos se recurrió a programa estadístico Microsoft Excel.

Gráfico 1 Formación de biomasa Muestra suelo 1



En el gráfico 1 se puede observar el comportamiento de cada uno de los medios de enriquecimiento de la muestra 1. La muestra con la identificación 1.3 es la que presenta la mejor curva de crecimiento en comparación con las demás muestras, por lo que se usó para realizar la prueba de biodegradabilidad del polietileno.

Gráfico 2
Formación de biomasa Muestra de suelo 2



En el gráfico 2 se puede observar el comportamiento de cada uno de los medios de enriquecimiento de la muestra 2 que utilizaron como única base de carbono polvo de polietileno. La muestra con la identificación 2.1 es la que presenta la mejor curva de crecimiento en comparación con las demás muestras, por lo que se usó para realizar la prueba de biodegradabilidad del polietileno.

Determinación de la acción biodegradadora

Muestras de polietileno	% Pérdida de peso	Muestras de polietileno	% Pérdida de peso
1.3.1	1,1%	2.1.1	1,1%
1.3.2	1,0%	2.1.2	1,2%
1.3.3	1,3%	2.1.3	1,1%

Pérdida de peso muestra 1.3 y 2.1

El peso del polietileno en las muestras 1.3.1, 1.3.2 y 1.3.3, no es significativo considerando que el error de la balanza es de $\pm 0,0001$ gr, dando valores despreciables a las variaciones del peso en estas muestras.

Las mayores variaciones de peso se observan en las muestras de polietileno 2.1.2. y 2.1.3; en cambio en la muestra 2.1.1, no hubo variación. Convirtiendo las variaciones de peso en porcentaje y restándole el valor de error de la balanza que es de $\pm 0,0001$ gr, los valores para el 2.1.2 sería 6,5 % y para 2.1.3 sería de 8,3%.

Identificaciones morfológicas de las bacterias.

Los microorganismos observados a microscopio tenían forma baciliforme, sugiriendo así que el género de estas bacterias era *Pseudomona spp.*

Pruebas cepas de *Pseudomona aeuroginosa.*

A continuación se pueden ver las pérdidas de peso posterior a la inoculación de los microorganismos

Tabla 3
Pérdida de peso muestra 1.3 y 2.1

Muestras de polietileno	% Pérdida de peso	Muestras de polietileno	% Pérdida de peso
1.3.1	1,1%	2.1.1	0,0%
1.3.2	2,0%	2.1.2	8,5%
1.3.3	2,5%	2.1.3	10,3%

En la tabla 3 se puede observar el porcentaje de pérdida de peso que presentó el polietileno de las muestras 1.3 y 2.1. Estos valores no serían significativos debido al margen de error de la balanza es de $\pm 0,0001$ gr y considerando los resultados obtenidos se puede ver que no hubo variación de peso. Esto se pudo deber a que la concentración de bacteria inoculada fue baja, considerando la menor concentración del medio de enriquecimiento utilizado como referencia 0,5 de Mc Farland que corresponde a 1,5.10⁸ bacterias por ml.

Considerando todos los datos obtenidos y como discusión general se pudo determinar que los valores de las muestras 2.1.2 y 2.1.3 son las que presentaron mayor porcentaje de pérdida de peso del polietileno 6,5 % y 8,3% respectivamente en 35 días.

Los grupos de bacterias desarrollados en el medio enriquecido son gram negativos, identificado claramente el género *Pseudomona* spp.

La inoculación de cepas de *Pseudomona* aeuroginosa no varió la acción biodegradadora del polietileno utilizado en la prueba inicial.

Conclusión

Respondiendo al objetivo general planteado se concluye que los microorganismos presentes en el suelo del relleno sanitario degradan débilmente el polietileno de baja densidad, no pudiendo ser considerada una alternativa de tratamiento de biorremediación eficaz.

El suelo con mejor característica para crecimiento de microorganismos son los puntos 1 y 4 según los valores de pH medidos en las muestras.

Hubo formación de biomasa utilizando el medio de crecimiento adecuado y el suelo del relleno sanitario comprobado por el método de estimación de cantidad de células por ml de cultivo

Bibliografía

- Alonso, M. (2012). Degradación del poliestireno y polipropileno con microorganismos con microorganismos de vermicompost. BVSE.
- Casal, I. (2004). Bioetecnología y medio ambiente. Sebiot, 1-68. Cornish, A. (1997). EL ABC de los Plásticos. Mexico: IBERO.
- García de Salome, I. (2011). Microorganismos del suelo y sustentabilidad de los agrosistemas. Editorial, 1-3. García, S. (2008). Reerencias históricas y evaluación de los plásticos. Revista Iberoamericana, 71-80.
- González Delgado, M. N. (2004). Contaminación Ambiental. España: Paranofi.
- Gonzalez García, Y. (2003). Síntesis y biodegradación de polihidroxialcanoatos: plásticos de origen microbiano. Revista internacional de contaminación.
- Leja, K. (2010). Polymer Biodegradation an Biodegradable Polymers. Review Polish Journal of Environ, 255-266.
- Manahan, S. (2006). Introducción a la química ambiental. México: Reverte.
- Meza, V. (9 de enero de 2013). Biodegradabilidad de Polietileno Tere y de Oxopolietileno a nivel laboratorio, por bacterias nativas presentes en humus. Obtenido de Repositorio ESPE: www.repositorio.espe.edu.ec
- Niño, R. (2009). Implementación de diferentes técnicas analíticas para la determinación de biomasa bacterianas de cepas de *Pseudomonas putida* biodegradadora de fenol. Santander.
- Norma Oficial Mexicana. (31 de diciembre de 2002). Secretaría de Medioambiente y Recursos Naturales. Obtenido de Norma Oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT- 2000 que establece las especificaciones de fertilidad, Salinidad y Clasificación de Suelos, Estudio, Muestreo y Análisis: <http://biblioteca.semarnat.gob.mx/janium/Documents/Ciga/libros2009/DO2280n.pdf>
- Tairouz, M. (2011). Las bolsas y su impacto ambiental. Venezuela: Polinter. Obtenido de <http://www.polinter.com.ve/>
- Uribe, D. (2010). Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú. Revista Peruana de Biología.
- UTEPI. (Junio de 2009). Informe Técnico. Obtenido de MIC: www.mic.gov.py
- Wiltz, J. (2013). Datos sobre la contaminación producidas por las bolsas de plásticos. México: La jornada ecológica.