

**Estudio preliminar de la degradación de
plásticos por poblaciones bacterianas presentes
en suelo del Complejo Ambiental de Arico**

**Preliminary study of the degradation of plastics
by bacterial populations present in soil of
Complejo Ambiental de Arico**

Trabajo de Fin de Grado
Marta Espinilla Peña
3 de Julio 2017

INDICE

1. Introducción	3
2. Objetivos	4
3. Materiales y Métodos	5
3.1 Muestras y procedimiento de muestreo.....	5
3.2 Sustratos plásticos.....	5
3.2.1 Preparación de plástico granulado.....	6
3.2.2 Preparación de las láminas de plástico.....	6
3.3 Enriquecimiento selectivo de poblaciones microbianas terrestres.....	6
3.4 Susceptibilidad de los diferentes plásticos a la biodegradación.....	7
3.4.1 Determinación de la pérdida de peso.....	7
3.4.2 Espectroscopia FT-IR.....	8
3.5 Biodegradación de LDPE por las poblaciones microbianas seleccionadas en el proceso de enriquecimiento.....	8
3.6 Viabilidad bacteriana para formar biopelículas.....	9
3.7 Evaluación de la biodegradación de LDPE, mediante gravimetría, FTIR y AFM.....	9
3.8 Caracterización de los aislados.....	10
4. Resultados y Discusión	11
4.1 Susceptibilidad de los plásticos al ataque microbiano en la etapa de enriquecimiento.....	11
4.2 Biodegradación de LDPE por poblaciones microbianas del suelo.....	12
4.2.1 Valoración gravimétrica de la degradación de LDPE.....	12
4.2.2 Análisis espectroscópico de LDPE mediante FT-IR.....	14
4.2.3 Análisis de LDPE mediante AFM.....	16
4.3 Capacidad formadora de biopelículas en LDPE.....	17
4.4 Caracterización de los aislados.....	20
5. Conclusiones	21
6. Bibliografía	23

Resumen

Los plásticos son polímeros sintéticos cuya acumulación produce cambios únicos y duraderos en el ambiente. Debido a la ausencia de métodos eficientes para su eliminación, representan una creciente amenaza ecológica en todos los ambientes. El objetivo del presente trabajo es el estudio de microorganismos potencialmente degradadores de plásticos, presentes en muestras de suelo de una planta de tratamiento de residuos. En una primera etapa, se realizaron cultivos de enriquecimiento con medio mínimo mineral suplementados con distintos polímeros (PETE; polietileno tereftalato, HDPE; poliestireno de alta densidad, LDPE; poliestireno de baja densidad, PS; poliestireno y PP; polipropileno) y extracto de levadura. Después de 32 días de incubación solo se observó una limitada pérdida de peso (1,37%) en el mejor de los casos, para las láminas de LDPE. En una segunda etapa, la biodegradación de este plástico, se estudió en el mismo medio mineral inoculado a partir de los cultivos de enriquecimiento. Después de 45 días de incubación, no se observaron pérdidas de peso significativas en las láminas de LDPE, ni se detectó la formación de biopelículas sobre su superficie. Sin embargo, sí se apreciaron alteraciones mediante espectroscopia transformada de Fourier (FT-IR) y microscopía de fuerza atómica (AFM), lo que puede ser un indicio de ataque microbiano al polímero. Al final del periodo de incubación, pudo comprobarse la existencia de una población mixta formada por bacilos gram positivos y gram negativos

Palabras clave: plásticos, microorganismos, residuos, LDPE.

Abstract

Plastics are synthetic polymers whose accumulation produces unique and long-lasting changes in the environment. Due to the absence of efficient methods for their disposal, they represent an increasing ecological threat in all environments. The objective of the present work is the study of potentially plastic degrading microorganisms present in soil samples from a waste treatment plant. In the first stage, mineral enrichment cultures were performed in mineral medium supplemented with different polymers (PETE; polyethylene terephthalate, HDPE; high density polyethylene, LDPE; low density polyethylene, PS; polystyrene and PP; polypropylene) and yeast extract. After 32 days of incubation only a limited loss of weight (1.37%) was observed in the best case, for LDPE films. In a second stage, the biodegradation of this plastic was studied in the same mineral

medium inoculated from the enrichment cultures. After 45 days of incubation, no significant weight loss was observed in the LDPE films, nor biofilm formation was detected on its surface. However, some alterations were observed by transformed Fourier Spectroscopy (FTIR) and atomic force microscopy (AFM), which may be an indication of microbial attack on the polymer. At the end of the incubation period, it was observed the existence of a mixed population consisting of gram positive and gram-negative bacilli.

Key words: plastics, microorganisms, waste, LDPE.

1. INTRODUCCIÓN

Los plásticos son polímeros sintéticos cuya acumulación es responsable de cambios únicos y duraderos en el medioambiente. Su extraordinaria estabilidad y durabilidad, los convierte en materiales ampliamente utilizados con diferentes fines. Los plásticos más utilizados son polietileno de baja, media y alta densidad (LDPE, MDPE, HDPE), polietileno tereftalato (PETE), polibutilentereftalato (PBT), nylon, polipropileno (PP), poliestireno (PS), cloruro de polivinilo (PVC) y poliuretano (PUR), cuya acumulación excede los 200 millones de toneladas anuales. De hecho, el uso de los derivados del polietileno en envases y otras aplicaciones industriales y agrícolas, aumenta cada año con una tasa del orden del 12% (Skariyachan, *et al.*, 2016).

La ausencia de métodos eficientes para su eliminación hace que estos polímeros sintéticos se acumulen, tanto en ambientes acuáticos como terrestres, representando una creciente amenaza ecológica (Bhardwaj *et al.*, 2013; Skariyachan *et al.*, 2016). Además, su carácter inerte y resistencia al ataque microbiano, contribuye a su recalcitrancia y, por tanto, a su acumulación en el medio ambiente (Esmaeili *et al.*, 2013). Aun así, son susceptibles de experimentar lentos procesos de transformación físico-química como, por ejemplo, fotodegradación, la cual puede dar lugar a compuestos más tóxicos, de bajo peso molecular, que contaminan los suelos y hábitats acuáticos. De hecho, se ha descrito su efecto sobre la fertilidad de los suelos, al inhibir los procesos naturales de reciclado de la materia orgánica presente en los mismos, lo que representa una amenaza desde una perspectiva ecológica global (Kale *et al.*, 2015).

Recientemente y más concretamente, en el campo de la agricultura, los plásticos biodegradables han surgido como una alternativa para reemplazar el polietileno convencional y reducir así la contaminación generada por estos residuos. Los materiales biodegradables pueden descomponerse en el campo a través de la acción conjunta de dos

mecanismos: la fotodegradación, debido a la exposición de los plásticos a la radiación solar; y la biodegradación resultante de la acción de microorganismos del suelo. En este sentido, es bien conocido que la diversidad microbiológica de los suelos proporciona beneficios en estos ecosistemas, esenciales para los propios seres humanos y el medio ambiente (Brevik *et al.*, 2015). Entre otras funciones, los microorganismos que colonizan estos hábitats terrestres pueden ser utilizados como instrumentos en los procesos de biorrecuperación ambiental.

En la degradación microbiana de polímeros sintéticos, el primer paso consiste en la adherencia y posterior colonización de su superficie. Debido a la falta de solubilidad en agua, el gran tamaño de las moléculas y la diversidad de enlaces poco reactivos, los microorganismos no son capaces de transportar los polímeros al interior celular, donde tienen lugar la mayoría de los procesos bioquímicos (Sekhar *et al.*, 2016). Para poder utilizar tales materiales como fuente de carbono y energía, los microorganismos han desarrollado una estrategia especial: excretar enzimas extracelulares que se unen a los sustratos plásticos, pudiendo catalizar su escisión hidrolítica (Shalini *et al.*, 2015). De esta forma, los polímeros pueden ser fragmentados en oligómeros, dímeros y monómeros de bajo peso molecular, que finalmente se mineralizan en CO₂ y H₂O. La selección adecuada de microorganismos con capacidades enzimáticas amplias puede lograr una extensa biodegradación de polímeros altamente compactos (Sekhar *et al.*, 2016). La decoloración, la separación de fases, el agrietamiento y la erosión son algunas de las alteraciones observables que indican la degradación de los polímeros plásticos (Bhardwaj *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo fue estudiar el potencial de las poblaciones microbianas presentes en muestras de suelo, recolectadas en el Complejo Ambiental de Arico, para degradar diferentes tipos de plásticos de uso común, así como llevar a cabo un estudio adicional sobre el plástico que resultó más susceptible en el ensayo preliminar.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. Muestras y procedimiento de muestreo

En este estudio se tomaron muestra de suelo en el Complejo Ambiental de Tenerife, ubicado en el término municipal de Arico, donde ocupa una superficie aproximada de 243 hectáreas en el paraje denominado Llanos de Guama. Las muestras fueron recogidas de las denominadas celdas de vertido, esto es, zonas donde se extienden y compactan aquellos residuos que no han podido ser introducidos en el programa de reciclado. Estas celdas de vertido se encuentran divididas en sectores en función de su antigüedad. En nuestro caso, tomamos muestras de la Celda 1, que en este caso es la más longeva. Esta celda fue puesta en funcionamiento en marzo de 2003 y su colmatación tuvo lugar en marzo de 2005. Durante los 2 años que se mantuvo en funcionamiento la celda, se vertieron diariamente en ella 1.742,87 toneladas de residuos plásticos (www.reste.es).

El muestreo se realizó con el asesoramiento de personal del complejo, realizando transeptos a lo largo de la celda para localizar las zonas con mayor cantidad de restos de plásticos, en las que se tomaron las muestras. Estas fueron recogidas a diferentes profundidades con ayuda de una espátula y utilizando bolsas de muestreo estériles. Estas bolsas fueron trasladadas inmediatamente al laboratorio donde se mezcló su contenido, obteniéndose una muestra combinada de suelo a partir de la cual se inocularon los cultivos de enriquecimiento.

3.2. Sustratos plásticos

Para este estudio de biodegradación, se utilizaron cinco tipos de plásticos diferentes: (1) Polietileno tereftalato (Polyethylene Terephthalate, PETE), es el plástico típico de envases de alimentos y bebidas, en nuestro caso utilizamos botellas de H₂O; (2) Polietileno de alta densidad (High Density Polyethylene, HDPE), gracias a su versatilidad y resistencia química se utiliza sobre todo en envases de productos de limpieza del hogar, o productos químicos industriales, en nuestro caso utilizamos botellas de alcohol de farmacia; (3) Polietileno de baja densidad (Low Density Polyethylene, LDPE); este plástico fuerte, flexible y transparente se puede encontrar en las bolsas de la compra, que fueron las utilizadas en nuestro caso; (4) Poliestireno (Polystyrene, PS), utilizado en vasos de usar y tirar transparentes, como los utilizados en este estudio, su bajo punto de fusión hace que pueda derretirse en contacto con alimentos calientes; y (5) Polipropileno (Polypropylene, PP), que tiene un punto de fusión más elevado que el PS, de forma que

se utiliza para fabricar envases capaces de contener líquidos y alimentos calientes, en nuestro caso se utilizaron vasos desechables blancos.

3.2.1 Preparación de plástico granulado

Para la obtención del granulado, los distintos plásticos se cortaron en pequeños trozos, que fueron posteriormente triturados en un molinillo (Culatti, Bioblock Scientific), usando un tamiz 0,5 mm. Para esterilizar el granulado así obtenido, se pesaron aproximadamente 3 gr del mismo, que fueron tratados con 10 ml de alcohol etílico (96%) durante 30 minutos. Transcurrido ese tiempo, el alcohol se evaporó en una estufa de corriente de aire a 60°C. A continuación, se repitió el proceso, pero utilizando alcohol etílico al 70%. El granulado de plástico estéril que se obtuvo mediante el procedimiento descrito, se conservó en placas de Petri estériles hasta su posterior utilización.

3.2.2 Preparación de las láminas de plástico

Para la preparación de las láminas de los diferentes plásticos (PETE, HDPE, LDPE, PS y PP), éstos se cortaron en láminas de 6x2 cm. Las láminas fueron pesadas y esterilizadas. El proceso de esterilización se realizó como se indica a continuación: las láminas se sumergieron en 20 ml de alcohol etílico (96%) durante 30 y, a continuación, fueron nuevamente sumergidas en 20 ml de alcohol etílico (70%), también durante 30 min. En ambos casos, las láminas se voltearon dentro del alcohol cada 5-10 minutos, para asegurar la acción del desinfectante en toda su superficie. Finalmente, las láminas se lavaron con 50 ml de agua destilada estéril, para eliminar los restos de alcohol y, una vez secas, se añadieron a sus respectivos matraces.

3.3 Enriquecimiento selectivo de poblaciones microbianas del suelo

Con el objetivo de seleccionar aquellas poblaciones de microorganismos del suelo potencialmente degradadores de plásticos, se realizaron dos cultivos de enriquecimiento sucesivos, utilizando como inóculo la muestra combinada de suelo procedente del complejo ambiental de Arico (apartado 3.1.). Para ello, se pesaron 50 gramos de suelo, que se añadieron a matraces de 500 ml de capacidad conteniendo 200 ml de Medio Mínimo Mineral (MMM) (Augusta *et al.*, 1993), suplementado con extracto de levadura (0,1%), plástico granulado (0,3%) y una lámina de plástico (apartado 3.2). Como controles, se utilizaron los mismos medios de cultivo, pero sin inóculo. Todos los

matraces (cultivos y controles), fueron incubados en agitación (150 rpm) a 28°C, durante 13 días.

Cumplido el periodo de incubación, se procedió a transferir a medios frescos idénticos a los utilizados en un principio, alícuotas de 10 ml de cada cultivo, así como las láminas de los diferentes plásticos dispuestos en sus respectivos matraces. En este segundo periodo de enriquecimiento, la incubación se realizó en las mismas condiciones que en el primer enriquecimiento, pero se llevó a cabo durante 19 días.

3.4 Susceptibilidad de los diferentes plásticos a la biodegradación

Concluidas las dos etapas de enriquecimiento, las láminas de plástico fueron recogidas y lavadas para eliminar los restos de biomasa adheridos a las mismas. Este proceso consistió en sumergir las láminas en dodecil sulfato sódico (SDS, 2%) durante 4 horas en agitación (Kyaw *et al.*, 2012). Seguidamente, las láminas fueron lavadas con agua destilada estéril durante 12 horas en agitación y, finalmente, se trataron con alcohol etílico (70%) durante 2 horas en las mismas condiciones. A continuación, las láminas se secaron a 60°C en una estufa de corriente de aire y se dejaron atemperar durante 2 horas a temperatura ambiente antes de pesarlas. Todas las láminas, tanto provenientes de los cultivos como de los controles, se sometieron a este tratamiento.

3.4.1 Determinación de la pérdida de peso

Una vez secas, se procedió a pesar las láminas de los diferentes plásticos con el fin de determinar si se había producido una pérdida de peso durante su incubación en los cultivos de enriquecimiento. Se realizaron tres pesadas por lámina en una balanza electrónica AA-200 DS (Denver Instrument Company). Para la determinación de pérdida de peso, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\frac{Pf - Pi}{Pi} \times 100$$

Dónde: *Pf* es el peso final (después de la incubación) y *Pi* es el peso inicial.

3.4.2 Espectroscopia FT-IR

Para evaluar los cambios producidos en la estructura de los diferentes sustratos plásticos tras ser sometidos al ataque microbiano, se procedió a su análisis mediante Espectroscopia Infrarroja de Transformada Fourier (FT-IR) (Thermo NICOLET Avatar 360 FT-IR; Software de control EZ OMNIC, Version 6.0; Rango espectral 4000-400 cm^{-1} ; resolución de 2 cm^{-1}), utilizando la técnica de reflectancia difusa.

3.5 Biodegradación de LDPE por las poblaciones microbianas seleccionadas en el proceso de enriquecimiento

En base a los resultados obtenidos en el proceso de enriquecimiento, se seleccionó el polietileno de baja densidad (LDPE), como sustrato plástico sobre el que realizar un estudio más detallado del proceso de biodegradación. Con este fin, se diseñó un experimento en el que se utilizó el mismo medio de cultivo y condiciones de incubación que en la etapa de enriquecimiento (apartado 3.3), pero utilizando exclusivamente LPDE en láminas, de forma que en este ensayo no se utilizó plástico granulado. Estos nuevos cultivos (200 ml), fueron inoculados a partir del cultivo de enriquecimiento (20 ml) realizado en presencia del mismo plástico. La concentración celular del cultivo al inicio y al final del periodo de incubación (45 días) se determinó mediante la técnica de dilución en placa, con agar de tripton y soja (TSA, PanReac, AppliChem) como medio de cultivo.

Para realizar una valoración final de la degradación mediante gravimetría, espectroscopia infrarroja (FT-IR), microscopia de fuerza atómica (AFM), así como la evaluación de biopelículas, se prepararon los siguientes cultivos y sus respectivos controles no inoculados:

- 3 cultivos (R1, R2, R3) + 3 controles (C4, C5, C6), para evaluación gravimetría y análisis FT-IR
- 3 cultivos (R7, R8, R9) + 3 controles (C10, C11, C12), para evaluación gravimétrica y microscopía AFM
- 3 cultivos (R13, R14, R15) + 3 controles (C16, C17, C18), para evaluar la formación de biopelículas

3.6 Viabilidad bacteriana para formar biopelículas

La capacidad de los microorganismos para formar un ecosistema organizado sobre las láminas de plástico (biopelículas), se determinó transfiriendo cada lámina, sin lavar, a un matraz de 250 ml de capacidad que contenía 20 ml de tampón fosfato sódico 60 mM (pH 7,6). A continuación, se les añadió diacetato de fluoresceína (DAF) para obtener una concentración final 10 mg DAF/ml (100 µl de solución DAF, 2 mg/ml acetona). Estos matraces, fueron incubados en agitación a 28°C durante un periodo de 3 horas y media, transcurrido el cual se evaluó la actividad biológica adherida al sustrato, mediante la hidrólisis de DAF a fluoresceína. Para ello, se detuvo la reacción añadiendo 20 ml de acetona a cada matraz, se tomaron alícuotas de 1,5 ml que fueron centrifugadas a 13.000 rpm durante 5 minutos (Biofuge Pico, Heraeus), y se leyó la absorbancia de los sobrenadantes a 490 nm (pico de absorción de la fluoresceína) en un espectrofotómetro (Ultrospec 2100 pro, UV/Visible Spectrophotometer). La concentración de DAF hidrolizado, se calculó utilizando una recta patrón elaborada a partir de una solución *stock* de DAF (10 mg DAF/ml), en la que todo el compuesto fue hidrolizado a fluoresceína calentando al baño maría, durante 1 hora (Schnurer y Rosswall, 1982).

3.7 Evaluación de la biodegradación de LDPE, mediante gravimetría, FT-IR y Microscopía de Fuerza Atómica (AFM).

Transcurrido el periodo de incubación (45 días) en presencia de LDPE, se procedió a retirar las láminas de plástico de los cultivos y controles, con el fin de evaluar la biodegradación microbiana. En todos los casos, las muestras fueron tratadas como se describe en el apartado 3.3 y la determinación gravimétrica y el análisis mediante FI-TR, fueron realizadas siguiendo la metodología descrita previamente (apartado 3.4.1 y 3.4.2). Las alteraciones topográficas resultantes del ataque microbiano sobre el plástico fueron analizadas empleando la técnica de microscopía de fuerza atómica (Servicio de Microscopía de Fuerza Atómica de la ULL). Dada la sensibilidad de la técnica, los plásticos fueron sometidos a un tratamiento adicional (lavado con alcohol etílico al 96% durante 1 hora en agitación), para eliminar cualquier resto adherido.

3.8 Caracterización de los aislados

Las cepas bacterianas que se obtuvieron (apartado 3.5), fueron sometidas a una caracterización morfológica y bioquímica preliminar. Por lo tanto, a partir de las placas de TSA utilizadas en los recuentos (apartado 3.5), se seleccionaron distintas colonias que mostraban una morfología diferente para ser sometidas a distintas pruebas (tinción de Gram y tinción de endosporas) y bioquímicas (prueba de la catalasa, oxidasa y oxidación-fermentación).

La prueba de la catalasa se llevó a cabo agregando una gota de peróxido de hidrógeno al 30% sobre una colonia aislada. La producción de efervescencia indica la rotura del peróxido de hidrógeno y la liberación de oxígeno como consecuencia de la actividad enzimática, considerando a la bacteria catalasa positiva. Por su parte, la prueba de la oxidasa se realizó empleando una tira comercial (Panreac), depositando una colonia de la bacteria en el extremo de la tira y ver la aparición inmediata en la tira de una tonalidad azul, lo que indica que la prueba es positiva y por lo tanto revela la presencia de la enzima citocromo oxidasa.

Con objeto de determinar la capacidad de los microorganismos para utilizar los hidratos de carbono por vía oxidativa o fermentativa, se realizó la prueba de oxidación/fermentación, inoculando dos tubos conteniendo el medio semisólido Hugh-Leifson (Cultimed). Tras 24 h de incubación (uno en aerobiosis y otro en anaerobiosis) a 28°C, el viraje en el color del indicador revela el proceso metabólico ocurrido.

Las cepas seleccionadas fueron sembradas también en el medio King B (Cultimed) y en el medio P.I.A selectivo para el género *Pseudomonas* (medio base de pseudomonas, suplementado con cetrimina, 10 µg/ml; fucidina, 10 µg/ml y cefalosporina 50 µg/ml; Oxoid), habitualmente empleados para el aislamiento y diferenciación *Pseudomonas*, basándose en la formación de pioverdina y/o piocianina. Después de 24-48 horas de incubación, ambos medios, fueron observadas bajo luz UV (260 nm) para comprobar la producción de pigmentos fluorescentes.

4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Susceptibilidad de los plásticos al ataque microbiano en la etapa de enriquecimiento

Tal y como se describe en el apartado 3.4, tras un periodo total de 32 días de enriquecimiento, las láminas de los diferentes tipos de plásticos fueron retiradas de los cultivos y sus correspondientes controles, para su análisis mediante gravimetría y espectroscopia FT-IR.

Como se muestra en la tabla 1, no se observaron grandes diferencias en el peso de las láminas antes y después de la incubación, aun así, cabe destacar que el plástico que experimentó una mayor pérdida de peso fue el LDPE (-1,37 %), si bien el análisis espectroscópico no mostró alteraciones en las bandas de absorción de energía de ninguno de los plásticos.

Tabla 1. Porcentaje de pérdida de peso de los distintos plásticos en los cultivos de enriquecimiento.

ENSAYOS	PLÁSTICOS	% PERDIDA DE PESO
CULTIVOS	PETE	0,19
	HDPE	-0,08
	LDPE	-1,37
	PS	-1,28
	PP	0,118
CONTROLES	PETE	0,0693
	HDPE	0,0127
	LDPE	0,0348
	PS	-0,116
	PP	0,046

A la vista de los resultados obtenidos, se seleccionó LDPE para profundizar en el estudio de su biodegradación, utilizando las poblaciones microbianas presentes en las muestras de suelo recolectadas en el complejo ambiental de Arico.

Skariyachan *et al.* (2016) describieron pérdidas de peso del orden de 3-5% en pequeñas bolas (pellets) de LDPE después de 120 días de incubación con un consorcio microbiano, si bien la degradación observada sobre tiras del mismo plástico fue considerablemente mayor (20-50%). Otros autores describen pérdidas de peso

comprendidas entre el 4,96 y 15% después de 357 días de incubación, según el tipo de plástico, observándose la menor pérdida de peso sobre LDPE. En este caso, la incubación se realizó con un consorcio microbiano procedente de un lisímetro de vertido abierto (Muenmee *et al.*, 2015).

4.2 Biodegradación de LDPE por poblaciones microbianas del suelo

El estudio de la biodegradación de LDPE por parte de poblaciones microbianas obtenidas en el proceso de enriquecimiento, se realizó en cultivos incubados durante 45 días, tal y como se describe en el apartado 3.5. Al final de este periodo de incubación, se observó un incremento en la densidad de población microbiana de menos de dos órdenes de magnitud (población inicial, $8,8 \cdot 10^6$ UFC/ml; población final, $1,2 \cdot 10^8$ UFC/ml) (tabla 2).

Tabla 2. Poblaciones microbianas en los cultivos realizados en presencia de LDPE al inicio y al final del periodo de incubación.

RÉPLICA	DÍA 0 (UFC/ml)	DÍA 45 (UFC/ml)
1	$9,2 \cdot 10^6$	$1,1 \cdot 10^8$
2	$3,7 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^8$
3	$1,3 \cdot 10^7$	$1,3 \cdot 10^8$
Media	$8,6 \cdot 10^6$	$1,2 \cdot 10^8$

4.2.1 Valoración gravimétrica de la degradación de LDPE

Una manera simple y rápida de medir la biodegradación de los polímeros es mediante la determinación de la pérdida de peso. Aunque los microorganismos que crecen utilizando un sustrato polimérico pueden conducir a un aumento de peso debido a su adherencia, la pérdida de peso detectada sobre dicho polímero indica un deterioro de su integridad, producto del ataque microbiano (Gajendiran *et al.*, 2016). De ahí que la evaluación gravimétrica en los estudios de biodegradación, aunque no proporciona una prueba directa de la misma, es ampliamente utilizada, dada su sencillez y adaptabilidad (Sangale *et al.*, 2012; Troiano *et al.*, 2014).

El análisis gravimétrico realizado sobre las láminas de LDPE, después de 45 días de incubación en presencia de las poblaciones microbianas seleccionadas, mostró la ausencia de pérdidas de peso significativas, de acuerdo con el resultado del análisis estadístico de los datos, mediante una T de Student (programa Statistix, versión 9, Analytical Software) (Tabla 3).

Tabla 3. Pérdida de peso de láminas de LDPE, tras 45 días de incubación con poblaciones microbianas terrestres.

ENSAYOS	RÉPLICAS	PESO INICIAL	PESO FINAL	PÉRDIDA DE PESO (%)	
Cultivos	R1	0,1094	0,1084	-0,914	
	R2	0,0825	0,0865	4,14	
	R3	0,0867	0,0823	-0,230	
	R7	0,1149	0,1145	-0,35	
	R8	0,0933	0,0943	1,07	
	R9	0,0875	0,0870	-0,57	
	Controles	C4	0,0897	0,0892	-0,557
		C5	0,0959	0,0957	-0,209
		C6	0,0906	0,0909	0,33
C10		0,0933	0,0936	0,32	
C11		0,1126	0,1129	0,26	
C12		0,0966	0,0968	0,20	
Media Cultivo ±SE				0,641±0,88	
Media Control ±SE				0,057±0,15	

La pérdida de peso en láminas de LDPE después de 90 días de incubación, ha sido descrita por Abranham *et al.* (2016) en cultivos de *Aspergillus nomius* y *Streptomyces* sp., valorándose dichas pérdidas en un 4,9% y 5,2%, respectivamente. Pérdidas ligeramente inferiores en el peso de LDPE (1,3 %) fueron descritas por Kavitha *et al.* (2014), para dos bacterias aisladas de suelos contaminados con petróleo, después de 30 días de incubación en presencia del plástico. Sin embargo, Kyaw *et al.* (2012), en un estudio realizado con cuatro cepas de *Pseudomonas*, ensayadas frente láminas de LDPE durante 120 días, descubrieron pérdidas de peso que oscilaron entre el 20% y el 9%,

atribuyendo dicha pérdida al ataque enzimático ocurrido en el periodo comprendido entre los 40 y 120 días. Resultados similares fueron descritos por Anbuselvi (2015) para dos cepas de *Escherichia coli* y *Klebsiella*, aisladas de suelos de basurero con polietileno, incubadas en este caso, durante 60 días.

4.2.2 Análisis espectroscópico de LDPE mediante FT-IR

El análisis espectroscópico es una herramienta muy útil para poner de manifiesto cambios estructurales, que aparecen sobre los polímeros cuando estos están sujetos a procesos de degradación. Concretamente, la espectroscopía FT-IR es una técnica muy sensible, que revela cambios en grupos químicos funcionales, rotura de enlaces, etc, dependiendo de su energía de absorción, en las bandas del espectro (Gajendiran *et al.*, 2016). Como se indicó en el apartado 3.4.2, las muestras fueron analizadas mediante FT-IR, en un rango de 4000-400 cm^{-1} , utilizando la técnica de reflectancia difusa. Se trata de una técnica en la que el haz de luz incidente se refleja en la superficie de la muestra en lugar de transmitirse a través de ella, con el fin de obtener medidas reales de reflectancia (Dr. Martín, comunicación personal).

Como sugieren Kavitha *et al.* (2014), para elucidar el mecanismo de la biodegradación es recomendable realizar el seguimiento de la formación y/o desaparición de las bandas correspondientes a los grupos carbonilos y a los dobles enlaces. En nuestro caso, los análisis espectroscópicos realizados sobre las láminas de LDPE recogidas de los cultivos después del periodo de incubación, no mostraron alteraciones en esta franja del espectro (1700-1750 cm^{-1}).

Aunque el estudio comparativo del espectro completo, realizado entre los cultivos y sus controles, mostró pequeñas diferencias en algunas franjas del mismo, éstas no se comportaron de forma homogénea en todas las réplicas (Figuras 1 y 2). Aun así, es posible detectar la aparición/desaparición de algunas bandas, lo que sugiere un ataque al polímero. Debe tenerse en cuenta que la estrategia analítica utilizada no permite determinaciones cuantitativas, por lo que las diferencias en la intensidad de la señal entre cultivos y controles, a lo largo del espectro, no guardan relación con la mayor o menor cantidad de grupos funcionales (Dr. Martín, comunicación personal).

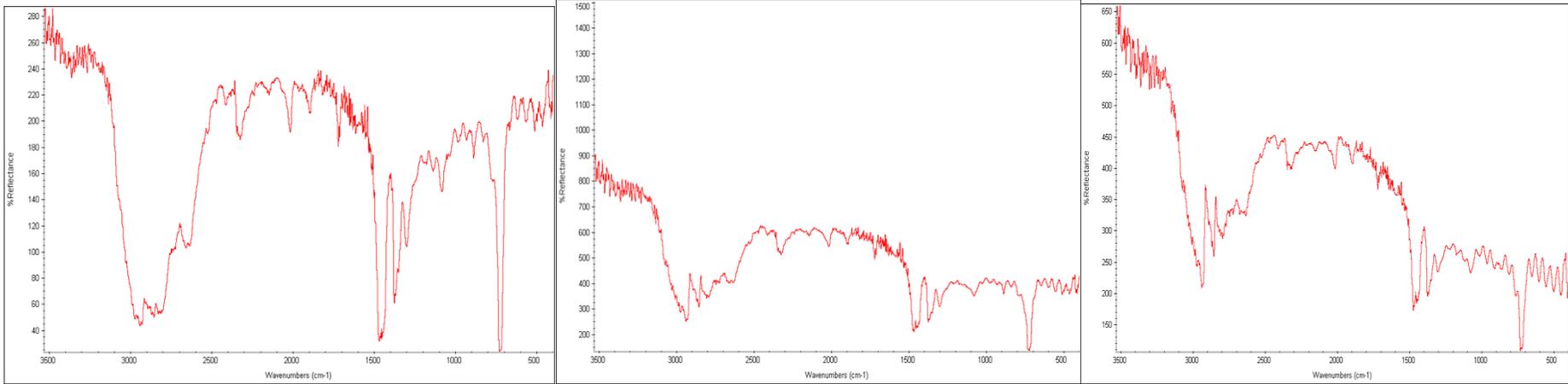


Figura 1. Espectros infrarrojos de los cultivos (R1, R2 y R3, respectivamente)

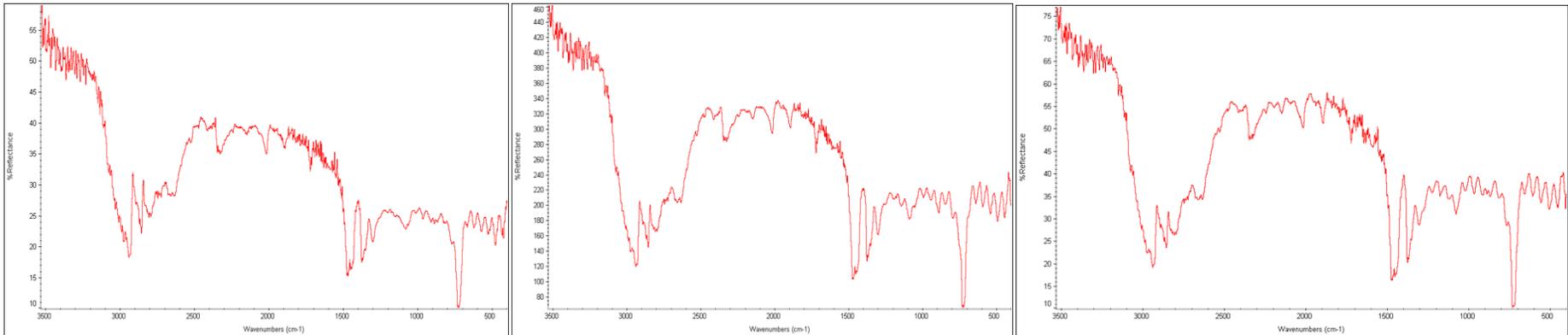


Figura 2. Espectros infrarrojos de los controles (C4, C5 y C6, respectivamente)

4.2.3 Análisis de LDPE mediante microscopía de fuerza atómica (AFM)

La microscopía de fuerza atómica es una técnica que se utiliza para caracterizar la superficie de muestras sólidas y semisólidas, relativamente planas. La técnica proporciona información morfológica en 3D a escala nanométrica, a partir de imágenes topográficas de las mismas, así como parámetros superficiales tales como rugosidad, distribución (homogeneidad) de partículas sobre diversos materiales, por ejemplo, láminas de plástico (Dr. Hernández, comunicación personal).

La imagen tridimensional del plástico LDPE (Figura 3) muestra la topografía del material, en la que se puede observar la gran rugosidad que presenta la superficie de la lámina.

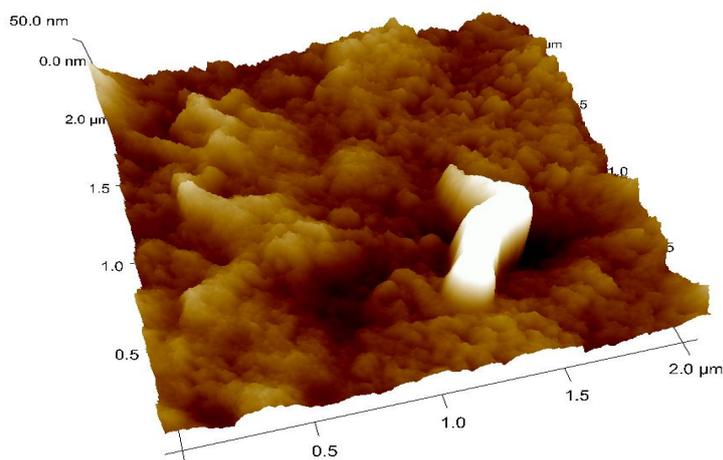


Figura 3. Superficie de una lámina de LDPE original en 3D. Análisis realizado en el Servicio General de Microscopía de Fuerza Atómica de la ULL (Dr. Hernández).

El análisis microscópico de las superficies de LDPE antes y después de su incubación en presencia de las poblaciones microbianas, mostró variaciones entre ellas (Figura 4). Así, mientras el aspecto de las mismas, tanto en el plástico original como en el control, mostraba una serie de fracturas, las láminas recuperadas de los cultivos después de 45 días de incubación, presentaban una superficie más homogénea. Este resultado sugiere un ataque microbiano sobre las láminas del LDPE.

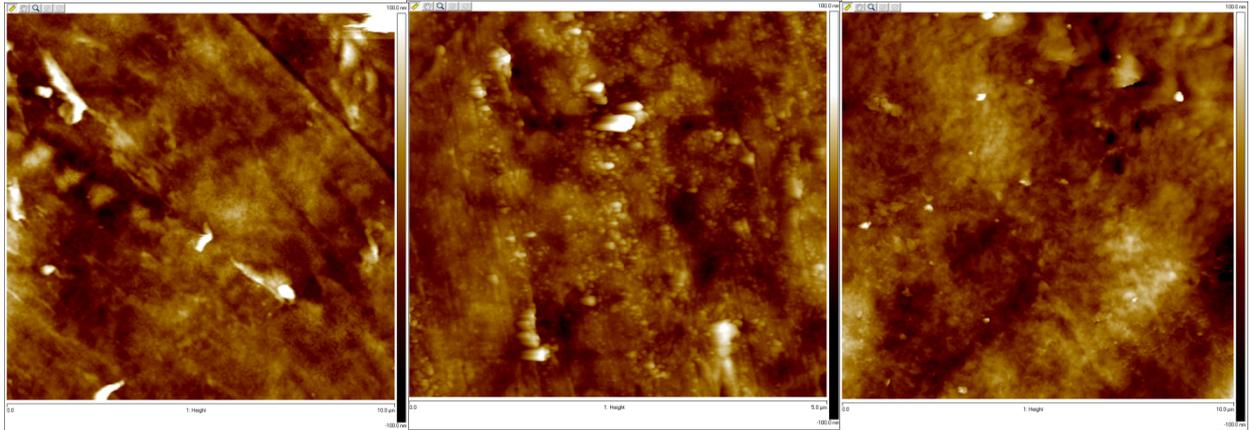


Figura 4. Imágenes obtenidas mediante microscopía de fuerza atómica en las que se muestran: a la izquierda, el plástico original; en el centro, el plástico recuperado de los controles; a la derecha, el plástico recuperado de los cultivos inoculados. En estas imágenes (2D), las partes más elevadas son representadas con colores claros, mientras que las partes oscuras son las más bajas.

Al contrario de lo observado en nuestro estudio, otros autores (Ojha *et al.*, 2017) describen que las superficies, tanto de LDPE como de HDPE, experimentan un aumento de su rugosidad con desarrollo de grietas y ranuras, después de 90 días de incubación en presencia de aislados fúngicos.

4.3 Capacidad formadoras de biopelículas en LDPE

Para valorar la capacidad de las poblaciones microbianas para formar biopelículas sobre el plástico en estudio, se determinó la actividad biológica mediante hidrólisis de DAF en las láminas de LDPE después del periodo de incubación. Las células microbianas viables producen una gran cantidad de enzimas hidrolíticas, que pueden escindir DAF para producir fluoresceína, cuya formación puede ser detectada espectrofotométricamente (Shnurer y Roswall, 1982). Esta técnica es ampliamente utilizada para medir la actividad metabólica y la viabilidad celular de las biopelículas (Killham y Staddon 2002; Al., 2010). En nuestro caso, la concentración de DAF hidrolizado por ml se determinó utilizando la recta patrón que se muestra en la figura 5.

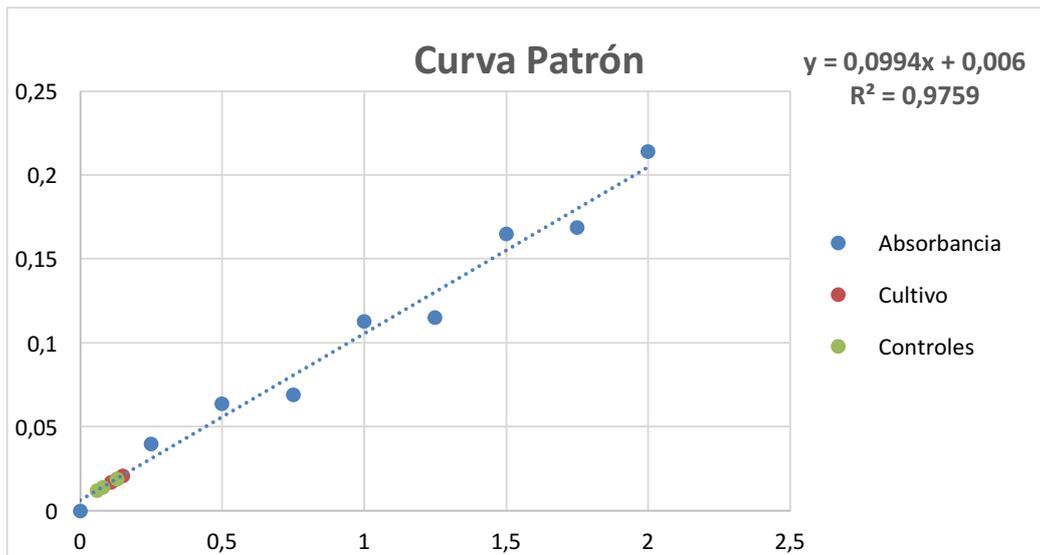


Figura 5. Recta patrón, en la que se representa la relación entre la absorbancia del producto formado a 490nm y la concentración de DAF hidrolizado. En la recta se sitúan los datos correspondientes a los cultivos (rojos) y sus controles (verdes).

Los datos de la actividad biológica, expresados como mg de DAF hidrolizado por cm^2 y hora, se calcularon teniendo en cuenta la concentración de DAF hidrolizado, el volumen de reacción (20 ml), la superficie de la lámina de LDPE (12 cm^2) y el tiempo de reacción (3 horas y media). Los resultados se muestran en la tabla 4. Como puede observarse, la actividad biológica detectada en las láminas de los cultivos fue despreciable y sin diferencias significativas con respecto a los controles no inoculados, de acuerdo al análisis estadístico de los datos con una T de Student.

Tabla 4. Valores de absorbancia (490 nm) y la actividad biológica (mg DAF hidrolizado/h·cm²) en láminas de LDPE al concluir el periodo de incubación.

MUESTRA	ABSORBANCIA	mg DAF / h·cm ²
R13	0,021	0,072
Cultivos R14	0,019	0,0623
R15	0,017	0,053
Media±SE		0,0624±0,0055
C16	0,012	0,028
Control C17	0,019	0,0623
C18	0,014	0,039
Media ±SE		0,0431±0,010

Es un hecho bien conocido que la capacidad de un microorganismo para formar biopelículas mejora significativamente su potencial de biodegradación (Gilan et al., 2004, Balasubramanian et al., 2010). Así, en estudios recientes sobre biodegradación de LDPE, se puso de manifiesto la capacidad de una cepa de *Pseudomonas* para formar biopelículas sobre la superficie de LDPE y degradar el plástico (Tribeti *et al.*, 2012, Tribeti y Sil, 2013). Si bien la formación de biopelículas tenía lugar tanto en presencia como en ausencia de aceite mineral, la presencia de este compuesto mejoraba notablemente su tasa de formación. Además, los autores constataron una reducción en el tamaño de las bacterias cuando formaban parte de las biopelículas. Este hecho es interpretado como una adaptación celular a los cambios en la topografía del LDPE que tienen lugar como consecuencia del ataque enzimático, ya que se generan en la superficie del plástico ranuras e irregularidades, a las que la bacteria no puede acceder en su tamaño original. Por lo tanto, la reducción de tamaño puede proporcionar a esta bacteria un mejor acceso a los nutrientes disponibles en su entorno y contribuir a una mejor degradación del polímero (Tribeti *et al.*, 2012, Tribeti y Sil, 2013).

4.4 Caracterización preliminar de las poblaciones microbianas

Con el fin de iniciar un estudio sobre la diversidad microbiana existente en los cultivos, se llevó a cabo una caracterización preliminar a partir de las placas de TSA utilizadas en los recuentos al finalizar el periodo de incubación. En estas se observaron, al menos, 3 tipos de colonias diferentes, que fueron sometidas en primer lugar a una tinción de Gram. Las cepas C-1 y C-3 eran bacilos gram positivos, y la tinción de endosporas reveló la presencia de estas estructuras en la primera de ellas (Figura 6, Tabla 5).

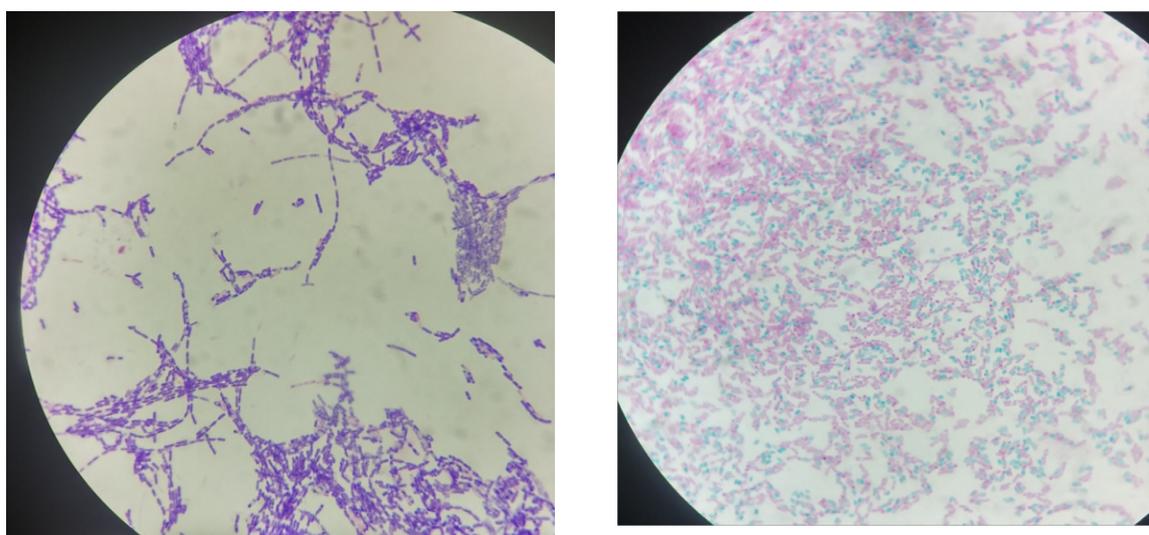


Figura 6. Tinción de Gram (izquierda) y tinción de endosporas (derecha) de la cepa C-1

Tabla 5. Caracterización morfológica

CEPA	MORFOLOGÍA	TINCIÓN DE GRAM	TINCIÓN ENDOSPORA
C-1	Bacilo	Gram +	+
C-2	Bacilo	Gram –	No realizada
C-3	Bacilo	Gram +	-

La cepa C-2 eran bacilos gram negativos, catalasa y oxidasa positivos, que no metabolizaron la glucosa en la prueba de oxidación/fermentación y no crecieron en el medio PIA, selectivo para el género *Pseudomonas*. Tampoco mostraron producción de pigmentos fluorescentes en medio King B.

5. COCLUSIONES

1. Un estudio sobre la capacidad degradadora de poblaciones microbianas obtenidas mediante enriquecimiento, a partir de muestras de suelo de una planta de tratamiento de residuos, reveló que el LDPE fue el plástico más susceptible al ataque microbiano, con pérdidas de peso estimadas en un 1,37%.
2. El estudio más detallado sobre la biodegradación de láminas de LDPE, no mostró pérdidas de peso significativas después de un periodo de incubación de 45 días.
3. El análisis cualitativo, mediante FT-IR, reveló un comportamiento desigual, con la aparición y desaparición de algunas bandas del espectro. Así mismo, el estudio realizado mediante AFM, mostró alteraciones en la superficie del plástico, cuando se compararon las láminas de los cultivos con las de los correspondientes controles. Ambos resultados sugieren un ataque microbiano sobre el polímero.
4. El ensayo realizado para poner de manifiesto la formación de biopelículas metabólicamente activas sobre LDPE, reveló la ausencia de estas complejas organizaciones microbianas.
5. La estimación de las concentraciones celulares de los cultivos, realizada al inicio y al final del periodo de incubación, indicó un incremento próximo a dos órdenes de magnitud. Estas poblaciones estaban formadas, al menos, por dos tipos de bacilos gram positivos (uno de ellos esporulado) y un tipo de bacilo gram negativo.

5. CONCLUSIONS

1. A study on the degradability of microbial populations obtained by enrichment from soil samples from a waste treatment plant revealed that LDPE was the plastic most susceptible to microbial attack, with weight losses estimated at 1,37%.
2. The most detailed study on the biodegradation of LDPE films didn't show significant weight losses after a 45-day incubation period.
3. The qualitative analysis, through FT-IR, revealed an unequal behavior, with the appearance and disappearance of some bands of the spectrum. Likewise, the AFM study showed alterations in the surface of the plastic, when the plates of the cultures were compared with those of the corresponding controls. Both results suggest a microbial attack on the polymer.
4. The assay performed to demonstrate the formation of metabolically active biofilms on LDPE revealed the absence of these complex microbial organizations.
5. The estimation of the cellular concentrations of the cultures, performed at the beginning and at the end of the incubation period, indicated an increase close to two orders of magnitude. These populations were formed by at least two types of gram positive bacilli (one of them sporulated) and one type of gram-negative bacillus.

6. BIBLIOGRAFÍA

Abraham J, Ghosh E, Mukherjee P, Gajendiran A. Microbial degradation of low density polyethylene. *Environmental Progress & Sustainable Energy*. 2017;36(1):147-154.

Anbuselvi, S. 2015. A comparative study of LDPE degrading bacteria from polythene dumped garbage. *International Journal Of Pharmacy & Technology*, 6 (4), 7720-7725.

Augusta, J., Müller, R.J., Widdecke H., 1993. A rapid evaluation plate-test for the biodegradability of plastics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 39: 673-678.

Balasubramanian V; Natarajan, K. Hemambika, B. et al. High-density polyethylene (HDPE)-degrading potential bacteria from marine ecosystem of gulf of mannar, india. . . doi: 10.1111/j.1472-765X.2010.02883. x.

Bhardwaj H, Gupta R, Tiwari A. Communities of microbial enzymes associated with biodegradation of plastics. *J Polym Environ*. 2013;21(2):575-579.

Brevik E C; T J Sauer. The past, present, and future of soils and human health studies. *SOIL*. 2015;1(1):35-46.

Esmaeili A, Pourbabaee AA, Alikhani HA, Shabani F, Esmaeili E. Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of lysinibacillus xylanilyticus and aspergillus niger in soil. *PloS one*. 2013;8(9): e71720.

Gajendiran, A., Krishnamoorthy, S. y Abraham, J. 2016. Microbial degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Aspergillus clavatus* strain JASK1 isolated from landfill soil. *3 Biotech*, 6:52

Gilan, I., Hadar, Y. y Sivan, A., 2004. Colonization, biofilm formation and biodegradation of polyethylene by a train of *Rhodococcus ruber*. *Applied microbial and cell physiology*, 65: 97-104.

Kale, S.K., Deshmukh, A.G., Dudhare, M.S., Patilponer, V.B., 2015. Microbial degradation of plastic: a review. *J Biochem Tech.*, 6 (1): 952-961.

Kavitha, R., Mohanan, A.K., y Bhuvaneshwari, V., 2014. Biodegradation of low density polyethylene by bacteria isolated from oil contaminated soil. *International Journal of Plant, Animal and Environmental Sciences*. 4(3):601-610.

Kowalczyk, A., Chyc, M., Ryszka, P., Latowski, D., 2016. *Achromobacter xylosoxidans* as a new microorganism strain colonizing high-density polyethylene as a key step to its biodegradation. *Environ Sci Pollut Res.*, 23:11349-11356.

Kyaw, B.M., Champakalakshmi, R., Sakharkar, M.K., Lim, C.S., Sakharkar, R., 2012. Biodegradation of Low Density Polythene (LDPE) by *Pseudomonas* species. *Indian J Microbiol*, 52(3): 411-419.

Muenmee S, Chiemchaisri W, Chiemchaisri C. Microbial consortium involving biological methane oxidation in relation to the biodegradation of waste plastics in a solid waste disposal open dump site. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 2015; 102:172-181.

- Nowak, B., Pajak, J., Drozd-Bratkowicz, M. y Rymarz, G., 2011. Microorganisms participating in the biodegradation of modified polyethylene films in different soils under laboratory conditions. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 65: 757-767.
- Nupur Ojha, Neha Pradhan, Surjit Singh, et al. Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific reports*. 2017; 7:39515.
- Sangale, M.K., Shah Nawaz, M., y Ade, A.B., 2012. A Review on Biodegradation of Polythene: The Microbial Approach. *J. Bioremed Biodeg.*, 3 (10): 164.
- Shalini, R., y Sasikumar, C., 2015. Biodegradation of Low Density Polythene materials using microbial consortium – An overview. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 4(4): 507- 514.
- Sharon C. y Sharon, M., 2012. Studies on Biodegradation of Polyethylene terephthalate: A synthetic polymer. *J. Microbiol. Biotech. Res.*, 2 (2): 248-257.
- Schnurer J., Rosswall, T. 1982. Fluorescein diacetate hydrolysis as a measure of total microbial activity in soil and litter. *Appl. Environ. Microbiol* 43:1256-1261
- Skariyachan S, Setlur A, Naik S, Naik A, Usharani M, Vasist K. Enhanced biodegradation of low and high-density polyethylene by novel bacterial consortia formulated from plastic-contaminated cow dung under thermophilic conditions. *Environ Sci Pollut Res*. 2017;24(9):8443-8457.
- Skariyachan, S., Megha, M., Kini, M.N., Mukund, K.M., Rizvi, A., Vasist, K. 2015. Selection and screening of microbial consortia for efficient and ecofriendly degradation of plastic garbage collected from urban and rural areas of Bangalore, India. *Environ Monit Assess*, 187:4174
- Sekhar VC, Nampoothiri KM, Mohan AJ, Nair NR, Bhaskar T, Pandey A. Microbial degradation of high impact polystyrene (HIPS), an e-plastic with decabromodiphenyl oxide and antimony trioxide. *Journal of hazardous materials*. 2016; 318:347-354.
- Tribedi P, Sarkar S, Mukherjee K, Sil A. Isolation of a novel pseudomonas sp from soil that can efficiently degrade polyethylene succinate. *Environ Sci Pollut Res*. 2012;19(6):2115-2124.
- Tribedi P, Sil A. Low-density polyethylene degradation by pseudomonas sp. AKS2 biofilm. *Environ Sci Pollut Res*. 2013;20(6):4146-4153
- Troiano, F., Vicini, S., Gioventu, E., Lorenzi, P.F., Improta, C.M. y Cappitelli, F., 2014. A methodology to select bacteria able to remove synthetic polymers. *Polymer Degradation and Stability*, 107: 321-327.