



# ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DEGRADATIVA SOBRE MATERIALES PLÁSTICOS DE MICROORGANISMOS AISLADOS DEL LIXIVIADO DEL RELLENO SANITARIO DE LA CIUDAD DE SANTA FE

**Olaguibe, María Agustina**

*Cátedra de Microbiología General, Facultad de Ciencias Biológicas, UNL  
Directora: Vaccari, María Celia*

**Área:** Ciencias Biológicas

Palabras claves: Degradación, Polipropileno Biorientado, Plásticos.

## INTRODUCCIÓN

El relleno sanitario es un lugar destinado a la disposición final de los residuos en el cual los mismos son esparcidos, compactados y dispuestos entre capas de suelo. Asimismo, cuenta con respiraderos para los gases que se originan de la putrefacción y con sitios de tratamiento de efluentes, previniendo los efectos adversos de los residuos en el ambiente.

Sin embargo, uno de los problemas más importantes para diseñar y mantener un relleno sanitario radica en el adecuado manejo del lixiviado que se genera tras el paso de agua a través de la basura. Estos efluentes líquidos contienen compuestos orgánicos e inorgánicos que plantean un problema potencial de contaminación de cursos de agua.

Los plásticos constituyen una gran proporción de los residuos que se acumulan en la naturaleza, y entre ellos se encuentra el polipropileno biorientado (BOPP). Este plástico es ampliamente utilizado para el empaque debido a su versatilidad y sustentabilidad. La biodegradación microbiana de este tipo de materiales surge como un método atractivo para reducir el volumen de residuos plásticos (Yoon y col., 2012). Es de esperar que en los lixiviados se encuentren microorganismos biodegradadores, es decir, que hayan desarrollado la capacidad de expresar enzimas que descompongan polímeros complejos en moléculas más simples para ser utilizadas como fuente de carbono y energía. Este proceso, conocido como biorremediación, contribuiría a la reducción del volumen total de residuos plásticos, mientras que promete ser eficiente y amigable con el medio ambiente (Alonso y col., 2002; Hadad y col., 2005).

En base a lo mencionado anteriormente, el presente trabajo se centró en el estudio de microorganismos aislados del lixiviado del relleno sanitario para ser empleados en técnicas de biorremediación.

## OBJETIVOS

- Caracterizar e identificar microorganismos aislados del lixiviado del relleno sanitario.
- Determinar el porcentaje de degradación de material plástico por acción de los microorganismos seleccionados, a través de un método cuantitativo gravimétrico.

Título del proyecto: "Caracterización microbiológica del lixiviado y lagunas de tratamiento del relleno sanitario de la ciudad de Santa Fe. Estudio de microorganismos de interés biotecnológico"

Instrumento: CAI+D

Año convocatoria: 2016

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral

Directora: Dra. María Gabriela Latorre Rapela

## METODOLOGÍA

### Selección de los microorganismos

En el presente trabajo se utilizaron dos microorganismos aislados del lixiviado del relleno sanitario de la ciudad de Santa Fe, seleccionados previamente por presentar un halo de degradación en medios conteniendo hexadecano como método de screening.

Los microorganismos conservados en estrías de Agar Nutritivo a temperatura ambiente, se reactivaron en placas de Petri conteniendo Agar Nutritivo y se incubaron a 37°C durante 24 h.

### Caracterización e identificación de los microorganismos seleccionados

Con el propósito de caracterizar e identificar los microorganismos se realizó, a partir de las colonias aisladas, el estudio morfológico y bioquímico de los mismos. Se efectuó la observación microscópica mediante técnicas de coloración simple y coloración diferencial de Gram y diferentes pruebas bioquímicas dependientes de cultivo, entre ellas: Prueba de la catalasa, Prueba de utilización del citrato, Prueba de reducción del nitrato, Prueba de Voges Proskauer y Prueba de Oxidación-Fermentación (Bergey, 1994). Se utilizó como testigo una cepa de *Bacillus subtilis* ATCC 6633 perteneciente al cepario de la Cátedra de Microbiología General de la FBCB.

### Evaluación de la degradación del material plástico por acción de los microorganismos seleccionados a través de un método cuantitativo

Con el objetivo de evaluar el potencial degradativo de los microorganismos seleccionados se prepararon dos tratamientos a diferentes tiempos de incubación, correspondientes a 30 y 90 días. Cada tratamiento se realizó por duplicado y para cada uno de ellos se pesaron 10 tiras de BOPP de un tamaño aproximado de 1 cm por 5 cm, en una balanza de precisión (Pioneer). Para tal fin, previamente se lavaron las tiras con solución acuosa de etanol al 70%, se enjuagaron con agua destilada estéril y se llevaron a secar en estufa a 60°C hasta peso constante. Luego se colocaron en botellas conteniendo 40 mL de medio mínimo de sales y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

La preparación del inóculo se realizó mediante un cultivo overnight de cada microorganismo, en medio mínimo de sales suplementado con glucosa (0,05%) y se ajustó el mismo a 0,5 de McFarland. De esta suspensión se inocularon 600 µL en cada botella y se incubaron a 35°C.

En paralelo, se realizaron tres controles con el fin de validar el ensayo. Para el control positivo se colocaron las tiras de BOPP en una botella conteniendo medio mínimo de sales y se inoculó con la cepa *Pseudomonas* P16, obtenida previamente por el grupo de investigación. Como control negativo se empleó una botella preparada de la misma manera pero sin inocular. Un tercer control, denominado control de inóculo, consistió en una suspensión de cada

microorganismo en medio mínimo de sales pero en ausencia del material plástico, donde se determinó la concentración de los microorganismos inoculados mediante un recuento microbiológico en placa.

Una vez concluidos los 30 días de incubación, las tiras de BOPP se lavaron con una solución acuosa de SDS al 2% durante dos horas para eliminar el biofilm bacteriano, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron en estufa a 60°C hasta peso constante.

Finalmente se calculó la diferencia de peso en términos de porcentaje según la Ecuación 1:

$$Pp(\%) = \left( \frac{P_i - P_f}{P_i} \right) * 100 \quad \text{(Ecuación 1)}$$

Donde, Pp: peso perdido

Pi: peso inicial

Pf: peso final

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### Caracterización e identificación de los microorganismos seleccionados

Las características microscópicas y los resultados de las pruebas bioquímicas de los microorganismos seleccionados se detallan en la Tabla 1.

**Tabla 1:** Características morfológicas y bioquímicas de los microorganismos.

		Microorganismo B <sub>1</sub>	Microorganismo C <sub>2</sub>
<b>Morfología</b>		Bacilo	Bacilo
<b>Gram</b>		Positivo	Positivo
<b>Esporos</b>	<b>Forma Posición</b>	Elipsoidal Subterminal	Elipsoidal Subterminal y terminal
<b>Catalasa</b>		Positiva	Positiva
<b>Utilización del Citrato</b>		Positiva	Positiva
<b>Reducción del Nitrato</b>		Positivo	Positivo
<b>Prueba de Voges Proskauer</b>		Positiva	Negativo
<b>Crecimiento en anaerobiosis</b>		Negativo	Negativo
<b>Ácido a partir de glucosa</b>		Positivo	Positivo
<b>Gas a partir de glucosa</b>		Negativo	Negativo

En base a los resultados obtenidos los microorganismos se identificaron como:

Microorganismo B<sub>1</sub>: compatible con *Bacillus subtilis*

Microorganismo C<sub>2</sub>: compatible con *Bacillus megaterium*

### Evaluación de la degradación del material plástico por acción de los microorganismos seleccionados a través de un método cuantitativo

Los recuentos microbiológicos de los controles de inóculo correspondientes a los tiempos 0 y 30 días se presentan en la Tabla 2.

**Tabla 2:** Concentración de microorganismos a los tiempos 0 y 30 días.

Microorganismo	Tiempo: 0 días UFC/mL	Tiempo: 30 días UFC/mL
B <sub>1</sub>	1,8 x 10 <sup>6</sup>	1,2 x 10 <sup>6</sup>
C <sub>2</sub>	1,1 x 10 <sup>6</sup>	2,0 x 10 <sup>6</sup>
P16	2,4 x 10 <sup>6</sup>	1,1 x 10 <sup>6</sup>

UFC: unidades formadoras de colonias

Como puede observarse, el número de microorganismos viables se mantuvo en niveles adecuados de concentración luego de 30 días de incubación.

Se evaluó la pérdida de peso de las tiras de BOPP para los tratamientos correspondientes a 30 días de incubación. Los porcentajes de pérdida de peso calculados se detallan en la Tabla 3.

**Tabla 3:** Porcentajes de pérdida de peso de las tiras de BOPP en el tratamiento de 30 días.

Aislamiento/control	Porcentaje de pérdida de peso (%)
B <sub>1</sub>	0,31
C <sub>2</sub>	0,12
Control positivo: P16	5,06
Control negativo	0,12

Los resultados obtenidos muestran que las tiras tratadas con B<sub>1</sub> presentaron mayor porcentaje de pérdida de peso respecto al control negativo, mientras que las tratadas con C<sub>2</sub> no mostraron ninguna variación. El mayor porcentaje de pérdida de peso correspondió al control positivo P16. Esto sugiere que los microorganismos estudiados poseen una menor capacidad degradativa que el control positivo. Cabe mencionar que actualmente está en curso la incubación del tratamiento correspondiente a 90 días, el cual podría resultar en una capacidad degradativa mayor.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Alonso, M.S.; Lozano, A.R.; Madregal, S.O.; Vilte, E.D.; Apaza, A.M.y Saravia, J.I.,** 2002. Degradación de poliestireno y polipropileno con microorganismos de vermicompost. Facultad de Ingeniería. Universidad Nacional de Jujuy. <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/aidis12/plasticos.pdf>

**Bergey, David H.; Holt, John G.; Krieg, Noel R.; Sneath, Peter H. A.,** 1994. Bergey's manual of determinative bacteriology. Lippincott Williams & Wilkins, 9° ed., 1994.

**Hadad, D.; Geresh, S. y Sivan, A.,** 2005. Biodegradation of polyethylene by the thermophilic bacterium *Brevibacillus borstelensis*. J Appl. Microbiol 98: 1093-1100.

**Kyaw, B.M.; Champakalakshmi, R.; Sakharkar, M.K.; Lim, C.S. y Sakharkar, K.R.,** 2012. Biodegradation of low density polythene (LDPE) by *Pseudomonas* species. Indian J Microbiol 52 (3): 411-419.

**Shah, A.A.; Hasan, F.; Hameed, A. y Ahmed, S,** 2008. Biological degradation of plastic: A comprehensive review. Biotechnol Adv 26: 246-265.