

**FACULTAD DE
CIENCIAS AGRONÓMICAS
Y DE LOS ALIMENTOS**



**PONTIFICIA
UNIVERSIDAD
CATÓLICA DE
VALPARAÍSO**

TALLER DE TÍTULO

PROYECTO DE INVESTIGACIÓN

Hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* presentes en vertederos de la Región de Valparaíso son capaces de biodegradar polietileno de alta densidad (PEAD) proveniente de residuos plásticos agrícolas

CAMILA PATRICIA MANZO CONTRERAS

QUILLOTA, CHILE

2019

Índice

1.	Resumen	1
2.	Definición del problema u oportunidad	2
3.	Hipótesis	4
4.	Objetivos.....	4
4.1	Objetivo general	4
4.2	Objetivos específicos.....	4
5.	Estado del arte.....	5
5.1	Antecedentes de los plásticos	5
5.2	El plástico en la industria agrícola	6
5.2.1	Materiales plásticos más usados en la industria agrícola.....	6
5.3	Manejo y biodegradación de los residuos plásticos agrícolas.....	7
5.3.1	Biodegradación de polietileno de alta densidad	8
6.	Metodología	11
6.1	Preparación de la película de polietileno de alta densidad	11
6.2	Las muestras de suelo	11
6.3	Aislamiento de los hongos degradadores de polietileno	11
6.4	Identificación de los microorganismos degradantes	12
6.5	Pruebas de biodegradación de polietileno de alta densidad	12
6.6	Análisis de los productos intermediarios de la biodegradación.....	13
6.7	Análisis de la eficiencia de biodegradación	13
6.8	Diseño experimental	13
	Literatura citada.....	14
7.	Plan de trabajo.....	16
7.1	Carta Gantt	16

7.2 Plan de trabajo	17
7.2.1 Cotización y compra de insumos	17
7.2.2 Recolección y preparación de la película de polietileno	17
7.2.3 Recolección de las muestras de suelo.....	17
7.2.4 Aislamiento de los hongos degradadores de polietileno	17
7.2.5 Identificación de los microorganismos degradantes.....	18
7.2.6 Pruebas de biodegradación de polietileno de alta densidad	18
7.2.7 Análisis de los productos intermedarios de la biodegradación	18
7.2.8 Análisis de la eficiencia de biodegradación.....	19
7.2.9 Obtención y análisis de resultados	19
8. Resultados esperados	20
8.1 Tabla 1. Resultados esperados	20
9. Organización.....	21
9.1 Cargos y funciones.....	21
9.1.1 Tabla 2. Cargos y funciones	21
9.2 Organigrama	22
10. Presupuesto	23
10.1 Presupuesto total por cuenta (MM\$).....	23
10.1.1 Tabla 3. Presupuesto total por cuenta	23
10.1.2 Presupuesto total por año (MM\$).....	24
Anexo. Hoja de cálculo	

1. Resumen

El polietileno de alta densidad es el polímero sintético más utilizado en la agricultura debido a sus múltiples propiedades. Sin embargo, cada año la producción excesiva de este tipo de compuestos xenobióticos ha llevado a altos niveles de acumulación en el medio ambiente debido a su alta resistencia a la degradación. Hasta la fecha ningún proceso de reciclaje permite un manejo eficiente de los desechos de este recurso, por lo tanto para buscar alternativas y tratamientos que resuelvan el problema que causa una actividad humana tan necesaria como lo es la agricultura, se realizó un análisis bibliográfico de los principales avances científicos en biodegradación del polietileno de alta densidad a través de microorganismos, principalmente de hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*, para luego proponer una metodología con el objetivo de identificarlos y evaluar la capacidad biodegradante que estos poseen. Además, se busca identificar los principales compuestos que resultan de esta biodegradación, para así proponer técnicas de manejo de residuos de polietileno de alta densidad y hacer frente a los nuevos desafíos que podría llevar al desarrollo de procesos de gestión más sostenible, que implican el reciclaje o reutilización de polímeros como opciones seguras para el medio ambiente y para las industrias agrícolas.

2. Definición del problema u oportunidad

Durante las últimas décadas han sido sintetizados una amplia variedad de elementos xenobióticos (xeno: extraño, biótico: vida), concepto que se aplica para compuestos cuya estructura química no se encuentra en la naturaleza ya que son sintetizados por el ser humano. Entre estos compuestos están los polímeros sintéticos artificiales o también llamados plásticos, materiales que son sintetizados a partir de derivados del petróleo. Los plásticos han sido utilizados en diversos ámbitos de la vida humana y de forma importante en las industrias, provocando un aumento en su uso debido a sus múltiples propiedades (Pérez, 2012).

Entre la diversidad de polímeros existen distintos tipos, los más utilizados y populares son el polietileno de alta densidad (PEAD), polietileno de baja densidad (PEBD), cloruro de polivinilo (PVC), nylon, polipropileno (PP), poliestireno (PS), tereftalato de polietileno (PET), poliuretano (PU), entre otros (Devi *et al.*, 2015).

Los polímeros sintéticos se comenzaron a utilizar en la agricultura a inicios de la década de los sesentas, estos reemplazaron los invernaderos de vidrio y ensilados de acero los cuales tenían costos muy elevados, permitiendo convertir tierras aparentemente improductivas en explotaciones agrícolas altamente rentables (De los Ángeles *et al.*, 2003).

El plástico en la agricultura es utilizado a lo largo de toda la cadena productiva, pero principalmente es utilizado para protección, como, por ejemplo, en acolchados, túneles e invernaderos, mallas de sombreado, cortavientos, antigranizo, o bien otros usos como tuberías para riego y drenaje. También en los procesos finales para envasado y embalado de los productos (De los Ángeles *et al.*, 2003).

Sin embargo, una vez cumplida la misión del plástico éste se convierte en un residuo el cual posee una capacidad de descomposición y degradación aparentemente nula (entre cincuenta y seiscientos años) por lo tanto la eliminación o tratamientos que se han implementado no han resultado los adecuados (GREENPEACE, 2017).

Durante muchos años los agricultores eliminaron el plástico procedente de su actividad incinerándolos o acumulándolos, esta acción provoca graves riesgos de incendios, contaminación y un importante impacto visual y paisajístico que genera la degradación del entorno. (De los Ángeles *et al.*, 2003).

El aumento en la producción y el uso de estos polímeros artificiales han creado un problema que afecta negativamente el medio ambiente, generando altos niveles de acumulación, contaminación de ríos, mares y aguas subterráneas, contaminación del suelo debido a la lixiviación de productos químicos alterando el hábitat de flora y fauna y además causando problemas de salud para la humanidad (Derraik, 2002).

En los últimos años ha sido objeto de estudio y de interés comunitario cada vez más fuerte el contar con un sistema que reduzca el impacto de los plásticos en el medio ambiente, ya que el amplio uso de estos materiales no ha sido desarrollado en conjunto con protocolos de seguridad y de degradación en forma segura, provocando que anualmente 25 millones de toneladas de estos compuestos sintéticos se hayan acumulado en medio ambientes costeros y terrestres (Devi *et al.*, 2015).

Muchos de estos tipos de polímeros han demostrado ser vulnerables a los efectos biodegradantes de microorganismos, debido a su composición con enlaces resistentes. Sin embargo, actualmente gracias al desarrollo de la microbiología y la biología molecular, se han proporcionado herramientas conceptuales y materiales para abordar el tratamiento biológico de este tipo de residuos (Devi *et al.*, 2015).

Se han investigado las rutas de degradación de numerosas cepas tanto de hongos y bacterias capaces de degradar polímeros sintéticos a través de la acción de enzimas que estos microorganismos producen, obteniendo en algunos casos la descomposición completa del material plástico. La potencialidad de estos microorganismos biodegradadores de residuos plásticos da posibilidades a futuro de aportar ideas y nuevas alternativas para iniciar mejoras en los procesos implicados en el tratamiento de residuos plásticos generados por la agricultura, que por medio de su evolución y adaptación han demostrado ser agentes biodegradantes de gran alcance en la naturaleza (Devi *et al.*, 2015).

3. Hipótesis

Hongos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium* presentes en vertederos de la Región de Valparaíso son capaces de biodegradar polietileno de alta densidad (PEAD) proveniente de residuos plásticos agrícolas.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

- Evaluar la capacidad de hongos recopilados en tres vertederos de residuos urbanos de la región de Valparaíso de biodegradar polietileno de alta densidad, proveniente de residuos plásticos agrícolas.

4.2 Objetivos específicos

- Aislar e identificar los principales hongos de los géneros *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*, potencialmente capaces de biodegradar polietileno de alta densidad.
- Medir la capacidad biodegradante de los hongos en el tiempo.
- Identificar los principales compuestos que resultan de esta biodegradación, para hacer uso de estos microorganismos y así proponer un destino final de los residuos plásticos agrícolas a partir de métodos de degradación microbiológica.

5. Estado del arte

5.1 Antecedentes de los plásticos

Antes de que se descubrieran los polímeros sintéticos la naturaleza era la única fuente de materiales y recursos con que el hombre contaba para la elaboración de sus herramientas de uso cotidiano. Las piedras, maderas o metales no satisficieron las demandas de una población en crecimiento, por lo tanto, en su innato afán de búsqueda, el hombre comienza a manipular los polímeros naturales como lo fue el ámbar, la goma laca y la gutapercha, siendo estos los precursores de los polímeros sintéticos que actualmente llamamos plásticos (García, 2009).

Los plásticos sintéticos aparecen por primera vez después del descubrimiento de la reacción de polimerización. Por definición, los plásticos sintetizados son productos manufacturados compuestos por numerosas cadenas de polímeros orgánicos (petróleo, carbón y gas natural) unidos por enlaces covalentes y que pueden poseer grupos laterales o radicales con uno o más átomos (García, 2009).

Con este descubrimiento se avecina una nueva era al saber, ya que se logran obtener nuevos plásticos a partir de la química, capaces de imitar y superar las prestaciones de los plásticos naturales que quedaron obsoletos. Todo esto en una fase que tenía lugar la industrialización y una creciente demanda por parte de una sociedad cada vez más consumista, estimulando la producción masiva de objetos plásticos (García, 2009).

El consumo de plásticos aumento de 1,5 millones de toneladas por año (Mt/año) en 1950 a 265 Mt/año en 2011, su producción comenzó a masificarse en gran parte del mundo para evitar costos de importación. Sin embargo, como efecto de esta oleada industrial se genera una cantidad increíble de contaminación, las plantas de producción en todo el mundo son responsables de la contaminación local generada por los desechos de la producción, resultando en una contaminación globalizada (Cregut *et al.*, 2013).

5.2 El plástico en la industria agrícola

Los precios relativamente estables del petróleo y el aumento en el conocimiento sobre las innumerables aplicaciones que poseen los diferentes tipos de plásticos han permitido un crecimiento continuo de los volúmenes destinados a uso agrícola en el mundo. A estos materiales se les puede adjudicar una parte importante del progreso alcanzado por la agricultura, siendo actualmente un componente esencial en los diferentes eslabones de la cadena productiva (Malagamba, 2015).

En la agricultura moderna se utilizan plásticos para mejorar diversas técnicas e innovar a través de nuevas tecnologías con el fin de mejorar la productividad, siendo una de estas el cultivo bajo condiciones ambientales controladas como lo son los invernaderos. Estos facilitan el manejo de temperaturas, humedad y otros factores que hacen posible tener alimento en toda época del año. Además, los plásticos son utilizados en la conservación y comercialización de los productos agrícolas, también en la tecnificación del riego a través de obras de regadío, revestimiento de embalses y canales. Una enorme cantidad es destinada a elaborar diversos formatos de contenedores como “bins” para cosechas y “speedlings” para producción de plántulas (Malagamba, 2015).

5.2.1 Materiales plásticos más usados en la industria agrícola

Dentro de la cadena productiva agrícola el plástico se ha posicionado como un componente fundamental. Los plásticos de mayor uso en la industria agrícola son el PEAD y PEBD, el PVC, el PP y el PS de alta resistencia, siendo el PEAD y PEAB los más consumidos debido a que a partir de estos se fabrican los films de plástico utilizados para recubrir invernaderos y mulch. Por otra parte, y no menos importante existe una gran cantidad de plástico destinado al uso de envases y contenedores a partir del PP y el PS (Malagamba, 2015).

El PEAD fue el plástico que demostró más tempranamente sus bondades al cubrir estructuras simples o naves en la producción de hortalizas y flores a un costo relativamente fácil de recuperar. Además, se comenzó a utilizar en la agricultura intensiva

como cubierta de suelo, sin embargo, este material es de limitada durabilidad al ser afectado por la radiación ultravioleta (UV) (Malagamba, 2015).

El polietileno de alta densidad (PEAD), es uno de los plásticos de mayor difusión actualmente, a diferencia del PEBD posee mayor densidad, resistencia a agentes químicos y a temperaturas más elevadas sin que se degrade fácilmente por acción de los rayos UV. Debido a su dureza se ha utilizado en muchas aplicaciones agrícolas como fabricación de macetas, jardineras, cajas, bandejas, tuberías de agua, botellas y envases para alimentos. Una de las grandes ventajas del PEAD es que mantiene sus propiedades físicas y mecánicas después de ser reciclado (Malagamba, 2015).

5.3 Manejo y biodegradación de los residuos plásticos agrícolas

Dentro de la actividad agropecuaria los residuos más comunes son los residuos vegetales, plásticos y envases de productos agroquímicos, debido a la magnitud de estos dos últimos es que se hace absolutamente necesario la gestión de los residuos, ya que son compuestos difíciles de degradar (Mendoza, 2017).

Con respecto al reciclaje y reutilización de los plásticos producidos por la agricultura en Chile, no existen reportes por parte de las entidades públicas ni privadas que permitan establecer o cuantificar la generación y la gestión de los residuos plásticos agrícolas, aunque estas deberían ser prácticas de absoluta exigencia tanto de las empresas que los producen como las que los utilizan (Mendoza, 2017).

Hay zonas de Chile donde el uso de los plásticos en la agricultura es muy intensivo, específicamente en la Región de Valparaíso en el sector agrícola de Olmué, Limache, Quillota, siendo estas unas de las zonas con mayores hectáreas de cultivos bajo invernadero. Aproximadamente 1.300 hectáreas (ha) de cultivo son bajo plástico, produciendo alrededor de 2.400 toneladas por hectárea (ton/ha) de residuos provenientes principalmente de invernaderos, cintas de riego y mulch (Mendoza, 2017).

En estas zonas se ha formado una industria de reciclaje informal la que realiza tratamiento a casi el 90% de los residuos plásticos generados, basado en la recolección,

pre-tratamiento, distribución y comercialización del residuo a empresas recicladoras principalmente de Santiago (Mendoza, 2017).

De esta actividad se generan residuos tanto sólidos como líquidos, proveniente de los plásticos no reciclables y de la operación de lavado del material, los que no alcanzan una buena disposición, ya que los residuos líquidos son vertidos en las fuentes de agua cercanos a los centros de reciclaje como canales de regadío, sin un tratamiento que permita eliminar posibles agentes contaminantes (agroquímicos) (Mendoza, 2017).

Mientras que los residuos sólidos, son incinerados de forma ilegal o mezclados con otros residuos con destino a vertederos. Por lo que se estima se generan 3.300 m³ de residuos líquidos, y un poco más de 19 ton. de plástico no reciclable (Mendoza, 2017).

5.3.1 Biodegradación de polietileno de alta densidad

Uno de los principales problemas de los materiales sintéticos es que la degradación es muy lenta, debido a la composición polimérica que estos poseen. Es por eso que en los últimos tiempos los esfuerzos se han enfocado hacia la búsqueda de formas que aceleren la descomposición de los plásticos sintéticos, para reducir los impactos que genera la industria agrícola, y se ha demostrado la actividad biodegradante de diferentes microorganismos con resultados muy promisorios (Malagamba, 2015).

La descomposición de moléculas por acción de enzimas secretadas por microorganismos se conoce como biodegradación, en este proceso los polímeros se convierten primero en monómeros y luego son mineralizados completamente por medio de un mecanismo catalítico de degradación, proceso en el cual las enzimas producidas por estos mismos provocan un aumento en la velocidad de la reacción química (Jasmala Joy *et al.*, 2017).

Algunas de las enzimas que han sido identificadas en la acción biodegradante de polímeros sintéticos son las cutinasas, hidrolasas, peroxidasas, oxidasas y oxidoreductasas, provenientes de microorganismos de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Geotrichum*, *Mucor*, *Helminthosporium*, *Chaetomium*, *Fusarium*, *Hormodendrum*, *Cephalosporium* y *Nigrospora*. También se destacan bacterias

de los géneros *Pseudomonas sp.*, *Arthrobacter sp.*, *Rhodococcus sp.* y *Bacillus circulans* (Acuña, 2017).

Como se revisó anteriormente el polietileno de alta densidad (HDPE) es el plástico más usado por la agricultura y según diversos autores es el residuo sólido de difícil degradación más comúnmente encontrado. Sin embargo, estudios han demostrado que los actinomicetes y los hongos filamentosos son los microorganismos con mejores rendimientos en la biodegradación del polietileno y que medios sólidos como el compost o medios líquidos minerales serían los óptimos para que lleven a cabo esta labor (Devi, *et al.*, 2015).

La capacidad de estos microorganismos para utilizar polímeros sintéticos de HDPE como fuente de carbono depende de la capacidad de formar biofilm sobre la superficie del polímero. En general los microorganismos con mayor hidrofobicidad en su superficie celular favorecen una asociación más estrecha con el PEAD (Devi *et al.*, 2015).

Según Albertson *et al.* (1987), un paso inicial para lograr la biodegradación del polietileno involucra un pre-tratamiento por medio de una degradación oxidativa abiótica por acción de luz (fotooxidación) o por degradación térmica. Esto facilita el rompimiento de enlaces, lo que produce un material de bajo peso molecular y provoca un aumento en la superficie de contacto del material con el microorganismo produciendo el biofilm antes mencionado.

Luego en la segunda etapa se lleva a cabo la biodegradación de los productos obtenidos de la oxidación de la primera etapa, por parte de los microorganismos, los que consumen los fragmentos de las cadenas de carbono oxidadas para formar dióxido de carbono (CO₂), agua (H₂O) y biomasa (Martin, 2012).

Los medios de cultivo para realizar las pruebas de biodegradación utilizando este tipo de microorganismos han resultado ser suelos con compost y también medios líquidos minerales. La composición del suelo con compost ayudará a la biodegradación del polímero, sin embargo, el medio líquido (medio sintético (MS)) proporciona condiciones más controladas, ya que el polímero sería la única fuente de carbono del microorganismo asegurando el desarrollo de estos (Fontanella *et al.*, 2010).

La morfología tanto del microorganismo como la de los polímeros afectan la tasa de biodegradación, en conjunto con parámetros ambientales como humedad, temperatura, el pH y la luz solar (Devi *et al.*, 2015)

El PEAD se ha convertido en una parte integral de las actividades agrícolas, provocando basura indiscriminada y la lenta degradación del HDPE plantea varios problemas ambientales. Por lo que la biodegradación de PEAD por microorganismos y enzimas parece ser el proceso más efectivo (Devi *et al.*, 2015).

Zahra *et al.* (2010) y Ojeda *et al.* (2009) coinciden en que cepas fúngicas del genero *Aspergillus* son capaces de biodegradar polietileno, así como hongos del genero *Penicillium*. *Fusarium* es otro género que también ha demostrado ser capaz de biodegradar polietileno, y puede utilizar este como fuente de carbono, aunque haya disponibilidad de carbono orgánico de otros materiales.

Basado en los resultados de la investigación de Devi *et al.* (2015), la cepa *Aspergillus flavus* y *A. tubingensis* son potenciales biodegradadoras de polietileno de alta densidad de acuerdo a la pérdida de peso, formación de biofilm sobre la superficie de la película de polietileno, siendo *A. flavus* el microorganismo que mostró mayor eficiencia.

Con respecto a microorganismos del genero *Penicillium*, según los resultados de los estudios de Yamada-Onodera *et al.* (2001), indica que la cepa fúngica *P. simplissicium*, utiliza el polietileno sin la necesidad de aditivos que ayuden en la biodegradación. Además, logra colonizar más efectivamente láminas de polietileno con pre-tratamiento oxidativo, que da lugar a la degradación de los dobles enlaces de carbono donde luego la biodegradación dependerá de la fase de crecimiento del cultivo sobre la lámina de polietileno

Recientemente los esfuerzos se han centrado en la biodegradación de los desechos debido a las desventajas de otros métodos como el costo y la contaminación y como se logró evidenciar a través de estos diversos estudios, existen técnicas que pueden facilitar y aumentar la eficiencia de biodegradación de las cepas fúngicas mencionadas, que dan

origen a nuevas perspectivas de tratar las problemáticas asociadas a la producción y uso de materiales sintéticos de difícil degradación.

6. Metodología

Materiales y métodos

6.1 Preparación de la película de polietileno de alta densidad

El plástico que será utilizado para realizar las pruebas de biodegradación será polietileno de alta densidad proveniente de residuos plásticos agrícolas con una vida de uso de al menos tres años, el cual será recolectado en predios aledaños a la Escuela de Agronomía de la PUCV, en La Palma, así como también de la misma Estación Experimental.

El polietileno recolectado será cortado en tiras pequeñas, se desinfectará con etanol al 70% y se secará bajo condiciones estériles en cuatro cajas de cristal y será conservado hasta su uso. Para asegurar que este plástico es realmente polietileno de alta densidad se le realizará una prueba de identificación mediante observación. Primero se dejará en agua, si esta flota es porque es polietileno, luego al rascarlo con la uña si queda la marca es de baja densidad, si no queda la marca será de alta densidad. Cuidadosamente se expondrá una lámina del plástico a una llama, si la superficie es brillante, se quema y gotea como cera, se tratará de polietileno de alta densidad.

6.2 Las muestras de suelo

Las muestras de suelo para la aislación de los organismos biodegradadores serán recolectadas de los vertederos de Olmué, San Pedro de Quillota y del vertedero de Limache de la Región de Valparaíso. El suelo se limpiará de cualquier residuo o basura y luego será almacenado en frascos de vidrio previamente esterilizados con etanol, los cuales se llevarán a laboratorio y se dejarán a temperatura ambiente en oscuridad hasta su uso.

6.3 Aislamiento de los hongos degradadores de polietileno

Para aislar los microorganismos biodegradadores de polietileno de alta densidad se le añadirán a las muestras de suelo contenidas en los frascos de vidrio, películas de polietileno de alta densidad previamente recolectado y preparado, estas serán enterradas a 10 cm de profundidad, además se le añadirán 2 mg de glucosa diluida en 200 ml de medio sintético (MS). Luego de un mes se retira la película de polietileno y se lava suavemente con agua destilada. De las muestras de polietileno se aislarán los microorganismos buscados, se le otorgará a cada uno de estos el medio de cultivo más óptimo para su proliferación. En el caso de *Aspergillus* se lleva a placas Petri con Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y se deja incubando a 37°C en oscuridad durante una semana. En el caso de *Fusarium* la cepa será cultivada sobre agar de extracto de malta (AEM) a 20 ° C y será almacenado a 4 ° C hasta su uso. Para *Penicillium* se cultivará en agar PDA, el cual se incuba a 30°C durante 10 días. Luego los hongos que logran colonizar la lámina se vuelven a cultivar en otra placa separada, con las mismas condiciones y se dejan nuevamente a la temperatura indicada durante 20 días, con revisión una vez al día.

6.4 Identificación de los microorganismos degradantes

Las cepas fúngicas purificadas en las placas serán observadas en microscopios y lupa estereoscópica, sobre la base de la morfología de las colonias y análisis filogenéticos. Se observará la estructura de los conidios, hifas, cabeza conidial y conidióforos.

Para el análisis molecular se solicitará al laboratorio de fitopatología de la Escuela de Agronomía de la PUCV realizar el correspondiente análisis. Luego de identificar cada cepa estos serán utilizados en las pruebas de biodegradación con el polietileno de alta densidad previamente preparado.

6.5 Pruebas de biodegradación de polietileno de alta densidad

Los hongos de los géneros mencionados obtenidos del paso anterior se cultivarán en medio líquido. Se añade glucosa al dos por ciento 4 g a 200 ml de medio de sal mineral (MSM) en un matraz de 500 ml que tendrá películas de polietileno previamente esterilizadas. En el matraz se inocularán 2 ml de suspensión de esporas a concentración de 1×10^5 esporas/ml, y a continuación se incuba a 37°C en una incubadora agitadora a

150 rpm durante tres semanas después de la inoculación con los 2 ml de esporas. Después de 20 días de incubación, las películas se lavarán con agua destilada y se analizarán para detectar cambios degradativos.

6.6 Análisis de los productos intermediarios de la biodegradación

Se realiza análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas para reconocer los productos que surgen de la biodegradación del polietileno. El servicio se solicitará al laboratorio del Laboratorio de Facultad de Química y Biología de la Universidad de Santiago de Chile.

6.7 Análisis de la eficiencia de biodegradación

Se medirá la eficiencia de biodegradación del microorganismo por medio del porcentaje de pérdida de peso de la película de polietileno de alta densidad que fue sometido a prueba.

Se calculará un promedio entre las repeticiones de cada tratamiento y se calculará el % de pérdida de peso mediante la fórmula que se muestra en la figura 1. :

$$\text{Weight loss \%} = \left[\frac{(W_i - W_f)}{W_i} \right] \times 100$$

Figura 1. Donde W_i y W_f es el peso de las muestras antes y después de la degradación respectivamente. Fuente: Sponton *et al.*, 2012.

6.8 Diseño experimental

Para cada prueba de degradación de polietileno de alta densidad usando los microorganismos se realizará triple repeticiones por cada prueba, es decir, habrá doce pruebas con 4 tratamientos distintos y tres repeticiones para cada tratamiento. Tres utilizando *Aspergillus*, tres con *Fusarium* y tres con *Penicillium*, además se dejarán tres

muestras control donde se depositará el plástico en el medio sin inoculación. Luego se calcularán los promedios de pérdida de peso para conocer la eficiencia de biodegradación

Literatura citada

Acuña, N. 2017. Revisión bibliográfica sobre los microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material. (Tesis) Universidad distrital Francisco José de Caldas. Facultad de Ciencias y Educación, Bogotá D.C

Cregut, M., Bedas, M., Durand, M.J., Thouand, G. 2013. New insights into polyurethane biodegradation and realistic prospects for the development of a sustainable waste recycling process. *Biotechnology Advances* Vol. 31: 1634–1647.

De los ángeles, M. 2003. Los residuos urbanos asimilables. Pág. 308-326, Cap. X. Junta de Andalucía, Consejería de Medio Ambiente de Andalucía. Comunidad Europea.

Derraik, J. 2002. The pollution of the marine environment by plastic debris: a review. Ecology and Health Research Centre, Department of Public Health, Wellington School of Medicine and Health Sciences, University of Otago, P.O. Box 7343, Wellington, New Zealand. *Marine Pollution Bulletin*. Vol. 44: 842-852.

Devi, R.S., Kannan, V.R., Nivas, D., Kannan, K., Chandru, S., Antony, A.R. 2015. Biodegradation of HDPE by *Aspergillus spp.* from marine ecosystem of Gull of Mannar, India. *Marine Pollution Bulletin* Vol. 96: 32-40.

Fontanella, S., Bonhomme, S., Kountny, M., Husarova, L., Brusson JM., Courdavault, JP. Pitter, S., Samuel, G., Pichon, G., Lemaire, J., Delort, AM. 2010. Comparison of the biodegradability of various polyethylene films containing pro-oxidant additives. *Polymer Degradation and Stability*. Vol. 95: 1011-1021.

García, S. 2009. Referencias históricas y evolución de los plásticos. Universidad Politécnica de Valencia, Facultad de Bellas Artes, Departamento de escultura, España. Revista Iberoamericana de Polímeros. Vol. 10.

GREENPEACE, 2017. Un mediterráneo lleno de plásticos. Estudio sobre la contaminación por plásticos, impactos y soluciones. Greenpeace. San Bernardo, 107 1ª planta 28015, Madrid, España.

Jasmala Joy, A., Malar Retna, A. 2017. New insight of degradation and stability performance of polyurethane and its composites. Materials Today Vol. 5: 6082–6089

Malagamba, P. 2015. Plásticos Agrícolas. Sus usos y problemas. Agricultureros, red de especialistas en agricultura. Visto en: <http://agricultureros.com/plasticos-agricolas-sus-usos-y-problemas/>. Leído el: 23 de Junio del 2018.

Mendoza, S.F. 2017. Proyecto de gestión integral de residuos plásticos agrícolas provenientes de la Región de Valparaíso. 103 p. Tesis Ingeniería Ambiental. Universidad Técnica Federico Santa María, Valparaíso, Chile.

Martin, K. 2012. BIOPROSPECCIÓN DE LA DEGRADACIÓN DEL POLIETILENO. Facultad de Ciencias Básicas. Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá.

Pérez, I. 2012. Agentes xenobióticos y su degradación microbológica. Bachillerato en Ciencias de la Naturaleza y de la Salud. Publicaciones Didácticas.

Serrano, Z. 1990. Técnicas de invernadero. 644 pág. Edición del autor. Sevilla, España.

7. Plan de trabajo

7.1 Carta Gantt

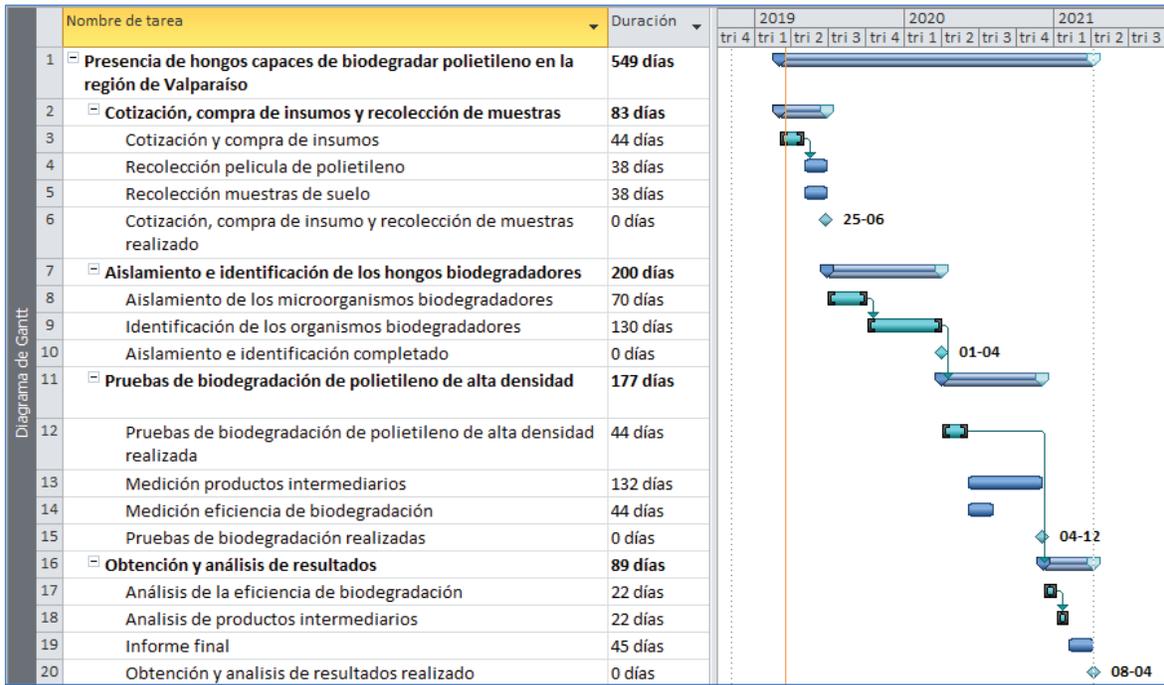


Figura 2. Plan de trabajo en Carta Gantt.

7.2 Plan de trabajo

7.2.1 Cotización y compra de insumos

Se cotizarán y comprarán los insumos necesarios para realizar las muestras y pruebas de biodegradación que se detallan en la Tabla x del Anexo. **Duración:** 44 días.

7.2.2 Recolección y preparación de la película de polietileno

Se arrendará vehículo y se pedirá a la Estación Experimental permiso para recolectar PEAD que haya tenido a lo menos tres años de uso. Se recogerán en bolsas plásticas de 110 x 120 cm y se llevarán a laboratorio. Luego se cortará el plástico en tiritas, se desinfectarán y se almacenara en cajas de cristal hasta su uso. **Duración:** 38 días.

7.2.3 Recolección de las muestras de suelo

Se solicitará permiso de acceso a los vertederos, a través de una carta formal. Se visitará el vertedero y se pedirá al encargado del lugar indicar la zona donde haya una alta concentración de residuos plásticos para seleccionar el sector de muestreo el cual será georreferenciado por GPS. Se recogerán 12 muestras de 500 g en frascos de vidrios previamente esterilizados. Las muestras serán llevadas a laboratorio, se limpiarán de restos y se mantendrán a temperatura ambiente en oscuridad hasta su uso. **Duración:** 40 días.

7.2.4 Aislamiento de los hongos degradadores de polietileno

A los frascos con las muestras de suelo se le añadirán 100 g de PEAD, estas serán enterradas a 10 cm de profundidad. Se añadirá 2 mg de glucosa diluida en 200 ml de medio sintético (MS). Estos se mantienen a temperatura ambiente en oscuridad, durante un mes. Luego de transcurrido el mes, se retira la película de polietileno, se lava suavemente con agua destilada y se lleva a placas donde queremos aislar los hongos que buscamos. Para el cultivo de los microorganismos buscados, se otorgará a cada uno de

estos el medio de cultivo más óptimo para su proliferación. Se realizarán 4 tratamientos, uno para cada tipo de microorganismo más un control sin inoculación, con 3 repeticiones cada uno.

En el caso de *Aspergillus* se lleva a 3 placas Petri con Sabouraud Dextrosa Agar (SDA) y se deja incubando a 37°C en oscuridad durante una semana. En el caso de *Fusarium* la cepa será cultivada sobre 3 placas Petri con agar de extracto de malta (AEM) a 20 ° C y será almacenado a 4 ° C hasta su uso. Para *Penicillium* se cultivará en 3 placas con agar PDA, el cual se incubaba a 30°C durante 10 días. Luego los hongos que logran colonizar la lámina de plástico se vuelven a aislar en otras 3 placas, con las mismas condiciones y se dejan nuevamente a la temperatura indicada durante 20 días, con revisión una vez al día.
Duración: 70 días.

7.2.5 Identificación de los microorganismos degradantes

Las cepas fúngicas purificadas en las placas con la película de PEAD serán observadas mediante la estructura según bibliografía. Para el análisis molecular se procederá a solicitar a laboratorio. **Duración:** 130 días.

7.2.6 Pruebas de biodegradación de polietileno de alta densidad

Los hongos obtenidos del paso anterior se procederán a cultivar en matraz de 500 ml en un medio líquido, a este se le añade glucosa al dos por ciento, 4 g a 200 ml de medio de sal mineral (MSM). A este medio líquido se le añadirán 100 g de PEAD previamente esterilizadas. Se inocularán 2 ml de suspensión de esporas a concentración de 1×10^5 esporas/ml, y a continuación se incubaba a 37°C en una incubadora agitadora a 150 rpm durante tres semanas. **Duración:** 90 días.

7.2.7 Análisis de los productos intermediarios de la biodegradación

Se preparan las muestras y se enviarán a laboratorio indicado para reconocer los productos que surgen de la biodegradación del PEAD. Se realizará análisis de cromatografía de gases y espectrometría de masas, (puede que este varíe de acuerdo a

la naturaleza de las muestras). Finalmente, el labrarlo entrega un informe final con los resultados. En esta etapa se solicita asistencia de un Bioquímico. **Duración:** 132 días.

7.2.8 Análisis de la eficiencia de biodegradación

La biodegradación de polietileno de alta densidad se determinará midiendo la desaparición del polímero en las placas con los cultivos. Una vez pasado el tiempo en las pruebas de biodegradación, se procede a pesar las películas de polietileno y seguir la metodología antes descrita. **Duración:** 54 días.

7.2.9 Obtención y análisis de resultados

Una vez realizada las labores anteriores, se procederá a recopilar los resultados y llevarlas a un análisis, el cual se podrá obtener una sistematización de los resultados y con ello realizar una discusión y conclusión de estos. Para finalmente realizar un informe final de investigación. **Duración:** 45 días.

8. Resultados esperados

8.1 Tabla 1. Resultados esperados

Objetivo específico	Resultado esperado
<p>Aislar e identificar los principales hongos de los géneros <i>Aspergillus</i>, <i>Fusarium</i> y <i>Penicillium</i>, potencialmente capaces de biodegradar polietileno de alta densidad</p>	<p>Cepas fungosas aisladas e identificadas</p>
<p>Medir la capacidad biodegradante de los hongos en el tiempo</p>	<p>Biodegradación del polietileno utilizando las cepas fungosas aisladas e identificadas y medición de la eficiencia en el tiempo de cada una de estas por métodos de regresión lineal y vida media del producto.</p>
<p>Identificar los principales compuestos que resultan de esta biodegradación, para hacer uso de estos microorganismos y así proponer un destino final de los residuos plásticos agrícolas a partir de métodos de degradación microbiológica</p>	<p>Conocer productos intermediarios de la biodegradación para luego proponer técnica donde se utilicen estos</p>

9. Organización

9.1 Cargos y funciones

9.1.1 Tabla 2. Cargos y funciones

Nombre del profesional	Formación/grado académico	Cargo en el proyecto	Funciones (N°)	Costo del personal (MM\$)	Aporte FONDO CONCURSABLE (MM\$)
A definir	Ingeniero Agrónomo (a), Dra.	Jefe de proyecto	Coordinar y dirigir las principales acciones para cumplir el proceso del proyecto	16,8	
A definir	Ingeniero Agrónomo (a)	Asistente de proyecto	Asistir al jefe de proyecto en las acciones principales para la ejecución de las tareas planificadas	20,4	
A definir	Contador (a)	Subcontrato	Llevar la contabilidad y la administración de los recursos económicos	9,12	
A definir	Ayudante de laboratorio	Subcontrato	Apoyo al Ing. Agrónomo para las labores de laboratorio, como preparación de muestras o limpieza de utensilios	9,6	
A definir	Bioquímico (a)	Subcontrato	Apoyo para identificación de productos intermedarios en el proceso de biodegradación de los hongos	5,1	

La directora del proyecto debe otorgar 1 o 2 días a la semana al proyecto, en el cual debe reunirse con el Ingeniero Agrónomo para dirigir, orientar, y evaluar semanalmente los avances del proceso.

El Ingeniero Agrónomo debe otorgar los cinco días a la semana al proyecto, o bien de acuerdo con el calendario cumplir las tareas propuestas en el plazo pre-dispuesto.

El contador será subcontratado para realizar las labores administrativas y de gestión de los recursos, además de llevar las cuentas de la “caja chica”, esta labor será realizada una vez al mes con el fin de rendir cuentas y llevar el orden en las finanzas.

El ayudante de laboratorio debe asistir al Ingeniero Agrónomo los cinco días de la semana o bien de acuerdo con las labores predispuestas en el calendario con el fin de cumplir las tareas en el plazo correspondiente.

El bioquímico será subcontratado por un periodo de seis meses, ya que será el encargado de realizar las pruebas de identificación de los compuestos intermediarios los que serán enviados a muestrear al laboratorio ya mencionado.

9.2 Organigrama

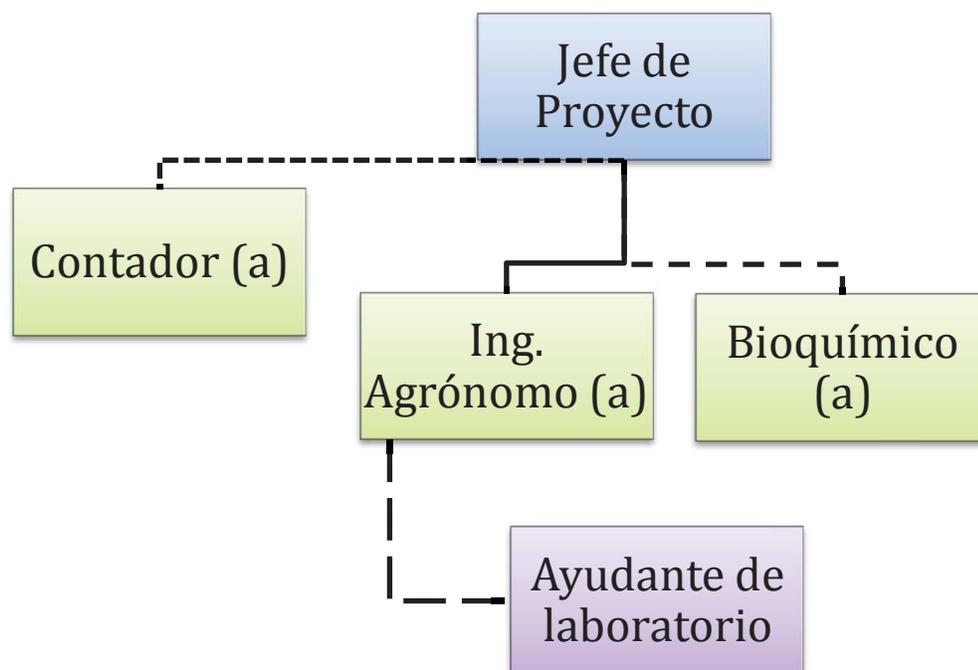


Figura 3. Organigrama

10. Presupuesto

10.1 Presupuesto total por cuenta (MM\$)

10.1.1 Tabla 3. Presupuesto total por cuenta

	Cuenta	FONDO CONCURSABLE	APORTE EMPRESA		Total(MM\$)
			Pecuniario	No pecuniario	
A.	Total Recursos Humanos	38,4	-	-	38,4
B.	Total Subcontratos	15,72		19,8	35,52
C.	Total Gastos de Inversión		-	0,5	0,5
D.	Total Gastos de Operación	0,5	-	-	0,5
E.	Total Gastos de Administración	-	-	0,72	1,08
SUBTOTAL (MM\$)					75,64
Imprevistos 5 %			3,7		79,34
TOTAL(MM\$)					79,34
Porcentaje de Aporte (%)		68,8%	-	31,2%	79,34

10.1.2 Presupuesto total por año (MM\$)

	Cuenta	Año 1	Año 2	Total(MM\$)	
A.	Total Recursos humanos				
	<i>Pecuniario</i>	19,2	19,2	38,4	38,4
	<i>No Pecuniario</i>				
B.	Total Subcontratos				35,52
	<i>Pecuniario</i>	4,56	11,16	15,72	
	<i>No Pecuniario</i>	13,6	6,2	19,8	
C.	Total Gastos de Inversión				0,5
	<i>Pecuniario</i>				
	<i>No Pecuniario</i>	0,5		0,5	
G.	Total Gastos de Operación				0,5
	<i>Pecuniario</i>	0,5		0,5	
	<i>No Pecuniario</i>				
H.	Total Gastos de Administración				0,72
	<i>Pecuniario</i>				
	<i>No Pecuniario</i>	0,72		0,72	
	subtotal (MM\$)				75,64
	<i>Pecuniario</i>	24,26	30,36	54,62	
	<i>No Pecuniario</i>	14,82	6,2	21,02	

Anexo. Hoja de cálculo con detalle

Anexo. Hoja de cálculo

Las celdas con * representan los aportes no pecuniarios realizados por la empresa al proyecto.

Recursos humanos	Valor mes \$	Valor total anual \$
Ing. Agrónomo, Dra.	700.000	8.400.000
Ing. Agrónomo	900.000	10.800.000
Total	1.600.000	19.200.000

Subcontratos	Valor mes \$	Duración subcontrato	Valor total anual \$
Ayudante de laboratorio*	400.000	12 meses	4.800.000
Bioquímico	850.000	6 meses	5.100.000
Contador	380.000	24 meses	9.120.000
Arriendo laboratorio*	400.000	20 meses	8.000.000
Arriendo oficina*	250.000	24 meses	6.000.000
PCR*	1.000.000	-	1.000.000
GC-MS	1.500.000	-	1.500.000
Total			35.520.000

Gastos de administración	Valor mes \$	Valor total proyecto \$
Luz*	15.000	360.000
Agua*	15.000	360.000
Total		720.000

Gastos de inversión	Cantidad	Valor unitario \$	Total \$
Cooler	1	104.000	104.000
Computador HP	1	350.000	350.000
Impresora multifuncional	1	39.990	39.990
Mouse + teclado USB	1	10.000	10.000
Total			500.000

Gastos de operación	Unidades	Valor unitario \$	Valor total \$
frascos de vidrio	12	500	6.000
etanol 70%	4	26.990	107.960
tijeras	2	2.000	4.000
cajas plásticas	6	5.000	30.000
glucosa	2	2.000	4.000
medio sintético	1	25.000	25.000
agua destilada	4	400	1.600
guantes	2	2.000	4.000
placa con agar PDA	20		282
placa con agar AEM	20		282
placa con agar SDA	20		202
micro pipeta	1		12.990
vaso precipitado	3	2.500	7.600
medio sal mineral 1L	12	9.000	108.000
matraz 500 ml	12	3.000	36.000
bencina (viajes)	5	20.000	100.000
viáticos (viajes, 2 personas)	10	7.000	70.000
Hojas para impresión	2	2.990	5.980
Total			517.000