

**DESARROLLO DE UN MODELO DE BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE
BAJA DENSIDAD (LDPE) POR *ASPERGILLUS BRAZILIENSIS* EN BIORREACTOR**

DANIELA GARCÍA MORENO

**Proyecto Integral de Grado para optar al título de
INGENIERO QUÍMICO**

Director,

DIANA MILENA MORALES FONSECA

M. Sc. Microbióloga

Co director,

GLORIA ASTRID NAUSA GALEANO

M. Eng. Ingeniería Química

FUNDACIÓN UNIVERSIDAD DE AMÉRICA

FACULTAD DE INGENIERÍAS

PROGRAMA DE INGENIERÍA QUÍMICA

BOGOTÁ D.C

2022

NOTA DE ACEPTACIÓN

Ing. Nubia Liliana Becerra Ospina

Presidente del jurado

Ing. Juan Andrés Sandoval Herrera

Ing. Felipe Correa Mahecha

Bogotá D.C., junio 2022

DIRECTIVOS DE LA UNIVERSIDAD

Presidente de la Universidad y Rector del Claustro.

Dr. Mario Posada García-Peña

Consejero Institucional

Dr. Luis Jaime Posada García-Peña

Vicerrectora Académica y de Investigaciones

Dra. Alexandra Mejía Guzmán

Vicerrector Administrativo y Financiero

Dr. Ricardo Alfonso Peñaranda Castro

Secretario General

Dr. José Luis Macías Rodríguez

Decano de la Facultad de Ingenierías

Ing. Naliny Patricia Guerra Prieto

Director Programa de Ingeniería Química

Ing. Nubia Liliana Becerra Ospina

Las directivas de la Universidad de América, los jurados calificadores y el cuerpo docente no son responsables de los criterios e ideas expuestas en el presente documento. Estos corresponden únicamente a los autores.

DEDICATORIA

Quiero dedicarle este proyecto a Dios en primer lugar porque es mi guía, mi fortaleza y puso en mi camino esta gran carrera y a mis padres por ser mi motor, por apoyarme a cumplir mis sueños, ser mi apoyo y mi polo a tierra en momentos bueno y momentos de dificultades, estando ahí para mí incondicionalmente en el cumplimiento y desarrollo de mi carrera profesional y la búsqueda de nuevas oportunidades, propósitos, sueños y metas que me he propuesto y están por venir.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece especialmente a:

La directora del proyecto, Microbióloga Diana Milena Morales Fonseca, y a la profesora Gloria Astrid Nausa por compartir sus conocimientos, orientarme y apoyarme en la realización de este proyecto y las investigaciones en progreso.

Al tecnoparque del SENA, especialmente a la gestora Ana María Gómez por asesorarme y compartir sus conocimientos en la parte biológica y nanotecnología para llevar a cabo el proyecto.

Al personal del Laboratorio de investigación de la Universidad Nacional de Colombia y a la Universidad ECCI por su ayuda en la obtención de los resultados propuestos en este proyecto.

TABLA DE CONTENIDO

	pág.
INTRODUCCIÓN	17
OBJETIVOS	19
1. MARCO TEÓRICO	20
1.1. Industria de los polímeros	20
1.2 Caracterización de los polímeros industriales	21
<i>1.2.1 Versatilidad de los polímeros</i>	21
<i>1.2.2 Propiedades de los polímeros</i>	24
<i>1.2.3 Clasificación de los polímeros</i>	26
1.3 Polietileno de baja densidad	27
<i>1.3.1 Propiedades físicas</i>	29
<i>1.3.2 Propiedades químicas</i>	30
<i>1.3.3 Propiedades mecánicas</i>	31
<i>1.3.4 Propiedades térmicas</i>	32
<i>1.3.5 Propiedades eléctricas</i>	34
1.4 Aspectos normativos de la biodegradación	35
<i>1.4.1 ASTM D 6954-04</i>	35
<i>1.4.2 ASTM D 5988-03</i>	35
<i>1.4.3 ASTM D 5338-15</i>	35
2. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO DE LOS PROCESOS DE BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD MEDIADOS POR HONGOS	37
2.1 Análisis bibliométrico	37
2.2. Biodegradación	43
<i>2.2.1 Procesos de biodegradación de LDPE</i>	44
2.3 Cultivos fúngicos que favorecen el proceso de biodegradación	65
<i>2.3.1 Aspergillus</i>	66
<i>2.3.2 Penicillium</i>	68
<i>2.3.3 Pleurotus ostreatus</i>	68
<i>2.3.4 Rhizopus oryzae</i>	68
<i>2.3.5 Trichoderma viride</i>	68

2.4 Métodos de caracterización y análisis para la biodegradación de LDPE	69
2.4.1 <i>Análisis Termogravimétrico (TGA)</i>	69
2.4.2 <i>Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)</i>	69
2.4.3 <i>Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)</i>	69
2.4.4 <i>Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)</i>	69
2.4.5 <i>Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)</i>	70
2.4.6 <i>Pérdida de peso del material</i>	70
3. CONDICIONES DE OPERACIÓN QUE FAVORECEN LA BIODEGRADACIÓN DEL LDPE EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA SUMERGIDA	76
3.1 <i>Análisis bibliométrico</i>	76
3.2 <i>Condiciones de operación</i>	83
3.2.1 <i>Medio de Cultivo</i>	83
3.2.2 <i>pH</i>	86
3.2.3 <i>Temperatura</i>	86
3.2.4 <i>Aireación</i>	87
3.2.5 <i>Humedad</i>	89
3.2.6 <i>Radiación</i>	89
4. PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DEL LDPE EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA SUMERGIDA MEDIADO POR <i>ASPERGILLUS BRAZILIENSIS</i>	93
4.1 Metodología para el acondicionamiento del microorganismo	93
4.1.1 <i>Aspergillus braziliensis</i>	93
4.1.2 <i>Inoculación del microorganismo</i>	94
4.1.3 <i>Producción de biomasa del microorganismo</i>	96
4.1.4 <i>Evaluación de la concentración de inóculo por peso seco</i>	99
4.2 Metodología para el ajuste del polietileno de baja densidad	100
4.2.1 <i>Tamaño de la muestra</i>	100
4.2.2 <i>Pesaje inicial LDPE</i>	100
4.3 Metodología para el proceso de biodegradación en biorreactor	101
4.3.1 <i>Características del campo experimental</i>	101
4.3.2 <i>Acondicionamiento biorreactor</i>	102
4.3.3 <i>Inoculación y puesta en marcha del biorreactor</i>	102
4.4 Metodología para la determinación de azúcares	103
4.4.1 <i>Determinación de azúcares por análisis cualitativo</i>	103

4.4.2 <i>Determinación de azúcares por análisis cuantitativo</i>	105
4.5 Resultados y análisis	106
4.5.1 <i>Pureza</i>	106
4.5.2 <i>Resultados evaluación de la concentración de inóculo por peso seco</i>	107
4.5.3 <i>Proceso de biodegradación en biorreactor</i>	108
4.5.4 <i>Determinación de azúcares</i>	114
4.4.5 <i>Porcentaje de biodegradación</i>	117
4.5.6 <i>Caracterización del material</i>	119
4.6 Diseño conceptual del diagrama de flujo de proceso (PFD) para la biodegradación de LDPE en fermentación líquida sumergida	123
5. CONCLUSIONES	130
BIBLIOGRAFÍA	131
ANEXOS	143

LISTA DE FIGURAS

	pág.
Figura 1. Estructura del polietileno	22
Figura 2. Molécula ramificada de LDPE.	28
Figura 3. Efecto de la densidad del polímero, la tasa de prueba y la temperatura sobre la forma de la tensión de deformación para polietileno.	32
Figura 4. Calor específico y relaciones de temperatura para el polietileno de baja, alta densidad y poliestireno.	33
Figura 5. Documentos por año biodegradación de LDPE mediados por hongos.	38
Figura 6. Documentos por tipo biodegradación de LDPE mediados por hongos	39
Figura 7. Documento área de investigación biodegradación de LDPE mediados por hongos	41
Figura 8. Documentos seleccionados por tipo biodegradación de LDPE mediados por hongos.	41
Figura 9. Documentos seleccionados por área de investigación biodegradación de LDPE mediados por hongos.	42
Figura 10. Mecanismo general de biodegradación en plásticos.	43
Figura 11. Abundancias relativas de taxones microbianos presentes en el compostaje.	46
Figura 12. Colonización de <i>Aspergillus niger</i> .	47
Figura 13. <i>Aspergillus niger</i> en lámina de LDPE irradiada.	48
Figura 14. Perfil de mineralización de películas de LDPE puro irradiadas con y sin luz U	49
Figura 15. % de pérdida de peso de las hojas de LDPE incubadas en 16 semanas por cultivo mixto.	50
Figura 16. Resultados análisis SEM por degradación in vitro.	51
Figura 17. Medición de temperatura y pH en el proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida.	54
Figura 18. Degradación de LDPE por fotooxidación UV.	56
Figura 19. Esfera de color negro o verdoso modificado con LDPE pre tratado después de 150 días por actividad enzimática.	58
Figura 20. Actividad enzimática de diferentes cultivos fúngicos después de proceso de incubación.	61
Figura 21. % de pérdida de peso de biocompuestos para análisis de hongos.	64
Figura 22. Características morfológicas de los hongos filamentosos	66

Figura 23. Documentos por año biodegradación en fermentación líquida sumergida.	77
Figura 24. Documentos por tipo biodegradación en fermentación líquida sumergida.	78
Figura 25. Documentos por área de investigación biodegradación en fermentación líquida sumergida.	79
Figura 26. Documentos por año condiciones de operación cultivos fúngicos.	80
Figura 27. Documentos por tipo condiciones de operación cultivos fúngicos.	81
Figura 28. Documentos por área de investigación condiciones de operación cultivos fúngicos.	82
Figura 29. Coeficiente de transferencia de masa de oxígeno.	88
Figura 30. Micromorfología de <i>A. brasiliensis</i> .	94
Figura 31. Diagrama de flujo de la preparación de los medios de cultivo.	95
Figura 32. Resultado final de la incubación del microorganismo	96
Figura 33. Diagrama de flujo de la producción del inóculo.	97
Figura 34. Diagrama de flujo de la elaboración del banco de trabajo.	98
Figura 35. Diagrama de flujo de la producción de biomasa	98
Figura 36. Diagrama de flujo procedimiento prueba de pureza.	99
Figura 37. Diagrama de flujo evaluación concentración de inóculo por peso seco.	100
Figura 38. Diagrama de flujo ajuste del LDPE.	101
Figura 39. Diagrama de flujo acondicionamiento del biorreactor.	102
Figura 40. Diagrama de flujo puesta en marcha del biorreactor.	103
Figura 41. Diagrama de flujo prueba de Tollens para determinación de azúcares.	104
Figura 42. Diagrama de flujo prueba de Fehling para determinación de azúcares	104
Figura 43. Ecuación de la recta para determinación de azúcares.	106
Figura 44. Morfología <i>Aspergillus brasiliensis</i>	107
Figura 45. Montaje del biorreactor.	109
Figura 46. Semana 1 Proceso de biodegradación.	109
Figura 47. Semana 2 Proceso de biodegradación.	110
Figura 48. Semana 3 Proceso de biodegradación.	111
Figura 49. Semana 4 Proceso de biodegradación	112
Figura 50. Láminas de LDPE antes y después del proceso de biodegradación.	113
Figura 51. Temperatura Vs Tiempo de biodegradación en fermentación líquida sumergida	113
Figura 52. pH Vs Tiempo de biodegradación en fermentación líquida sumergida.	114

Figura 53. Prueba de Tollens proceso de biodegradación de LDPE.	115
Figura 54. Prueba de Fehling proceso de biodegradación de LDPE.	116
Figura 55. Porcentaje de biodegradación de LDPE.	119
Figura 56. Resultados análisis SEM	120
Figura 57. Resultados análisis FTIR	122
Figura 58. Diagrama de bloques del proceso.	126
Figura 59. Diagrama PFD del proceso de biodegradación.	127
Figura 60. Balance de masa del proceso de biodegradación	1278
Figura 61. Diagrama de Gantt del proceso de biodegradación	129

LISTA DE TABLAS

	pág.
Tabla 1. Propiedades físicas del LDPE	29
Tabla 2. Absorción de líquidos por polietilenos de densidad 920 y 960 kg/m ³ a 20°C después de 30 días de inmersión	30
Tabla 3. Influencia de la densidad/cristalinidad, índice de fluidez y distribución de masa molar en las propiedades del polietileno.	31
Tabla 4. Propiedades eléctricas del polietileno de baja densidad.	34
Tabla 5. Prueba piloto de la aplicación de microorganismos fúngicos en degradación in vitro.	52
Tabla 6. Procesos de biodegradación de LDPE mediados por hongos.	71
Tabla 7. Características principales cultivos fúngicos presentes en el proceso de biodegradación de LDPE.	74
Tabla 8. Métodos de caracterización y análisis de la biodegradación del LDPE.	75
Tabla 9. Condiciones de operación que favorecen el proceso de fermentación líquida sumergida.	91
Tabla 10. Curva patrón DNS.	105
Tabla 11. Recopilación resultados inóculo inicial.	108
Tabla 12. Resultados análisis cuantitativo por la técnica DNS.	117
Tabla 13. Resultados del proceso de biodegradación de LDPE.	118

LISTA DE ABREVIATURAS

AM	Anhídrido maleico
Atm	Atmósfera
CH₂	Etano
cm	Centímetro
cm³	Centímetro cúbico
CO₂	Dióxido de Carbono
°C	Celsius
°F	Fahrenheit
g	Gramos
HR	Humedad relativa
in²	Pulgada cuadrada
kg	Kilogramo
kV	Kilovoltio
LDPE	Polietileno de baja densidad
mL	Mililitro
mm	Milímetro
MPa	Megapascal
m²	Metro cuadrado
m³	Metro cúbico
µm	Micrómetro
Ω	Ohmio
O₂	Oxígeno
PE	Polietileno

PE-HD	Polietileno de alta densidad
PET	Polietileno tereftalato
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PVC	Cloruro de polivinilo
rpm	Revoluciones por minuto
UV	Ultravioleta

RESUMEN

Uno de los polímeros más utilizados en la industria es el polietileno de baja densidad gracias a sus propiedades fisicoquímicas, resistencia a altas temperaturas y dureza mecánica sin embargo, dado el uso masivo que la sociedad le ha dado a este material, ha traído consigo problemas ambientales, en donde su acumulación y disposición final han afectado el ecosistema y la salud de las personas. Por ello en este proyecto se busca llevar a cabo un modelo de biodegradación del LDPE mediado por cultivos fúngicos en fermentación líquida sumergida con la colonización del material y así mismo disminuir en un futuro la contaminación generada por estos residuos.

La investigación se enfocó en el desarrollo de un modelo de biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE) por *Aspergillus brasiliensis* en biorreactor, realizando inicialmente un análisis bibliográfico de los procesos de biodegradación físicos, químicos y biológicos mediados por hongos, identificando en cada uno de estos el microorganismo asociado, condiciones de operación, resultados obtenidos y caracterización del material al finalizar el proceso. De igual modo, se efectúa la revisión de las condiciones de operación adecuadas tales como (medio de cultivo, temperatura, pH, aireación y humedad) para llevar a cabo el proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida. Por último, se presentan los resultados del estudio del proceso al cabo de 1 mes en un prototipo de biorreactor a escala laboratorio en presencia de aire con ayuda de una bomba de pecera, monitoreo de temperatura y ajuste de pH, evidenciando con ayuda de análisis de microscopia electrónica de barrido (SEM) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) la eficacia en la biodegradación con la colonización del material y formación de biopelículas, alcanzando un porcentaje de biodegradación de +/-1,89%.

Palabras clave: Biodegradación, *Aspergillus brasiliensis*, fermentación líquida sumergida, polietileno de baja densidad (LDPE), biorreactor, microscopia electrónica de barrido (SEM), espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

INTRODUCCIÓN

El uso excesivo de los polímeros trae consigo una problemática ambiental y ecológica que afecta a las personas que están directamente relacionadas con su implementación y el entorno, ocupando los 10 primeros lugares en materiales recolectados de los océanos y de los 300 millones de toneladas de bolsas plásticas que se obtienen al año [1] “solo se recicla el 7% mientras que el 93% restante termina acumulado en los rellenos sanitarios o se arroja a las montañas, valles y ríos” [2]; si bien es cierto los materiales poliméricos son de gran importancia “teniendo una amplia participación por su bajo costo, buenas propiedades y fácil maleabilidad” [3] siendo la materia prima fundamental ya sea para la industria de la construcción, plásticos, empaques o las diferentes cadenas de producción de la industria. Estas ventajas que los polímeros ofrecen los convierten en materiales de difícil degradación y con efectos secundarios sobre el medio ambiente. Debido a la corta vida útil de estos productos y las altas tasas de producción, “los desechos generados representan cantidades alarmantes de contaminantes” [3], produciendo un estimado de 1,2 millones de toneladas anuales de residuos en Colombia [2] que podrían tomarse entre 100 y 1000 años para su degradación.

Como uno de los polímeros más producidos a nivel mundial se encuentra el polietileno de baja densidad con sus siglas en inglés (LDPE) con un total de 5 billones de bolsas al año [1], el cual gracias a sus propiedades fisicoquímicas es usado en la industria química por su dureza, resistencia y durabilidad no obstante, la mayoría de los desechos en Colombia son generados por este polímero causando cantidades alarmantes de contaminación, siendo alrededor de 13 millones de toneladas de plástico las que van dirigidas a océanos y botaderos [1] sin un tratamiento previo o una reutilización adecuada de los mismos, teniendo como única alternativa procesos de eliminación que resultan agravando el problema con emisiones tóxicas llevados a cabo con costos de operación elevados y aumento energético en el proceso.

Sin embargo, hoy en día se ha buscado la manera de solventar dicha problemática con ayuda de microorganismos, en su mayoría hongos mediante el proceso de biodegradación para la eliminación y control de estos materiales al ambiente [3], los cuales utilizan la estructura carbonada de los polímeros como fuente de carbono para la mineralización total del material y así comprobar la viabilidad del proceso para poder implementarlo a escala industrial.

Tal es la importancia de esta problemática, que en el semillero de investigación Bioside de la Universidad de América se han venido desarrollando investigaciones para la degradación biológica de polímeros como el ácido poliláctico a partir de lodo activo [3] y polietileno de baja densidad en matriz de compostaje [31], con ayuda de microorganismos, los cuales colonizan el material hasta lograr cambios morfológicos en los mismos como pérdida de peso, agrietamiento o formación de biopelículas en un tiempo de 1 a 4 meses aproximadamente.

A pesar de la existencia de diversas técnicas para la degradación de estos residuos, lo que se busca en este estudio es llenar los vacíos de conocimiento en el proceso efectuado en fermentación líquida sumergida. Por tal razón, en la presente investigación se desarrolla un modelo de biodegradación de polietileno de baja densidad LDPE por *Aspergillus brasiliensis* en biorreactor a escala laboratorio, identificando los diferentes procesos mediados por hongos y las condiciones de operación que favorecen la colonización del material en fermentación líquida sumergida para la determinación del grado de biodegradación del material al cabo de 30 días.

Este documento ha sido estructurado en 5 capítulos abordando las diferentes características mencionadas anteriormente para evaluar la viabilidad del proceso de biodegradación del LDPE bajo condiciones controladas de pH y temperatura a partir de revisiones bibliográficas y un proceso experimental, llevando a cabo un acondicionamiento del microorganismo, ajuste del LDPE, acondicionamiento del biorreactor a escala laboratorio y los análisis pertinentes para evidenciar la eficacia de la biodegradación.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE) mediante *Aspergillus braziliensis* en biorreactor a escala laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar un análisis bibliográfico de los procesos de biodegradación de LDPE mediados por hongos.
- Determinar por análisis bibliográfico las condiciones de operación para la biodegradación de LDPE bajo fermentación líquida sumergida.
- Determinar el grado de biodegradación de polietileno de baja densidad (LDPE) en fermentación líquida sumergida por *Aspergillus braziliensis*.

1. MARCO TEÓRICO

En este capítulo se abordarán las principales propiedades físicas, químicas y térmicas de los polímeros, así como también su clasificación y versatilidad en la industria química, haciendo énfasis en el polietileno de baja densidad gracias a sus características (físicas, químicas, térmicas, mecánicas y eléctricas) y su impacto en un proceso de biodegradación con base a la normativa.

1.1. Industria de los polímeros

La industria de los polímeros ha posibilitado la vida de las personas, tal es el caso que de Japón, América y la Unión Europea produciendo cerca de 9,000 millones de toneladas de plástico utilizadas para los hogares o para la industria en general, los cuales gracias a su versatilidad y sus propiedades de resistencia y durabilidad 5 billones de bolsas plásticas se utilizan al año en el mundo [1] [2], y el 1,2 millones de toneladas de ese total son producidos en Colombia, llegando a ser un material que ha ido evolucionando en el país a lo largo de los años [3].

Evidenciando el comportamiento de la industria de los polímeros en Colombia, “en la década del 30, químicos ingleses descubrieron que el gas etileno polimerizaba bajo la acción de calor y presión, formando un termoplástico al que llamaron (PE). Hacia los años 50 aparece el polipropileno (PP). Al reemplazar en el etileno un átomo de hidrogeno por uno de cloruro se produjo el cloruro de polivinilo (PVC)”, conocido en múltiples industrias gracias a sus características de dureza y resistencia a altas temperaturas, el cual, al adicionarle aditivos, da como resultado un material más blando [4] [5].

“En Colombia la primera empresa productora de artículos obtenidos a través del moldeo de resinas plásticas (Tres Estrellas) se estableció en Cali en 1939” dedicándose a la fabricación de artículos personales y juguetes a través del moldeo de inyección [4]. Para dar un panorama de la evolución del sector de los polímeros en Colombia a partir de los años 60, se denota la siguiente información: haciendo el análisis de 35 empresas pertenecientes al sector, “se encuentra que un 2,80% de las mismas fueron establecidas en la década de los 30; 11,40% en la década de los 40; 14,30% en la década de los 50; 34,30% en la década del 60 y el 37,10% en la década de los 70” [4], presentando así un aumento sustancial en los años posteriores siendo una de las industrias más utilizadas y llevadas a cabo en Colombia.

Las primeras innovaciones del sector se llevaron a cabo mediante el proceso de inyección, de ese momento a la fecha “se ha presentado un desarrollo acelerado del proceso de extrusión y de otros procesos alternativos” [4] consecuencia de la economía del país en la oferta y demanda de productos del sector y del conocimiento técnico por parte de las empresas para explotar nuevos métodos y mercados para los productos de plástico [4].

La industria de los plásticos en Colombia ha venido creciendo en los últimos años, demostrando que “en los primeros trimestres del año 2021 aumentó en un 22,20% frente a 2020 y 8,60% frente al mismo periodo de 2019”. En el 2020, ACOPLÁSTICOS registró un aumento de 1,33 millones de polímeros, estando entre los materiales más comercializados los polietilenos con un 39%, los materiales de propileno en un 19,50%, policloruros de vinilo en un 16%, resinas de poli o PET en un 12,50%, poliestirenos en un 6% y otros polímeros en un 8% [6].

Dentro de los datos relevantes de la industria de los plásticos se encuentra que hay alrededor de 3.600 empresas en el país en producción y comercialización de plásticos con un aumento de 22,20% en el primer semestre de 2021, adicionalmente la importación en el primer semestre del 2021 tuvo un crecimiento del 51% para las resinas plásticas y 40% para maquinaria para plásticos y caucho. Con respecto a la representación del PIB en el año 2020 frente a los productos químicos disminuyó un 1,30% y en la producción de plásticos y de caucho una disminución del 6,70% frente al 2019. Por último, se encuentran la producción con una variación del 25,80% en sustancias químicas básicas con respecto al 2020 y 25,60% con respecto al 2019 y en productos de plástico un 22,20% con respecto al 2020 y 8,60% en relación al 2019 [6].

1.2 Caracterización de los polímeros industriales

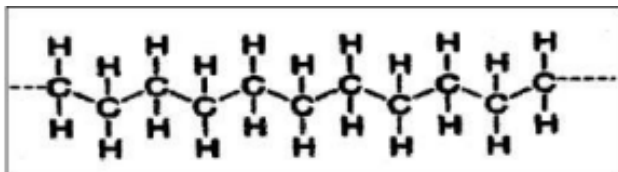
1.2.1 Versatilidad de los polímeros

Los polímeros son moléculas constituidas por la reiteración de pequeñas unidades químicas simples, las cuales pueden ser de forma lineal parecida a una “cadena de eslabones o cadenas ramificadas o interconectadas formando retículos tridimensionales”. Esta repetición en su estructura es equivalente al monómero o material de inicio para la formación del monómero de interés [7].

La mayoría de los polímeros están compuestos de hidrocarburos elaborados de unidades pequeñas dentro de cadenas largas [5], como se evidencia en la Figura 1 siendo el polietileno la estructura más simple.

Figura 1.

Estructura del polietileno.



Nota. Esta figura representa la estructura del polietileno.

Tomada de: Escuela Colombiana de Ingeniería,
“Identificación de plástico curso de materiales”, ed. 2008-
1, pp 1-30, 2008

Por otro lado, los polímeros sintéticos como las macromoléculas, son obtenidas a partir de síntesis química y procesos de calentamiento o ablandamiento del material [8], presentando una diversidad de homólogos con base a la aplicación que se le quiera dar a estos, lo que permite adaptar sus propiedades fisicoquímicas a las necesidades específicas de la industria al combinar monómeros y estructuras macromoleculares [9].

Es tal la versatilidad de los polímeros sintéticos que hoy en día sus aplicaciones se reflejan en la medicina ya que estas al basarse en cadenas de carbono pueden interactuar específicamente con el cuerpo trayendo consigo la formación de “procesos degradativos indeseados o aditivos con respuesta bioquímica”, por lo cual estos materiales ofrecen la posibilidad de modificar otros polímeros con propiedades intrínsecas en relación a la aplicación que este va a ejercer y evitar los problemas mencionados anteriormente [10].

Muchas de las aplicaciones en medicina se ven evidenciadas en el embalaje, contenedores y dispositivos médicos donde el policloruro de vinilo (PVC) toma gran importancia para el control de pH, permeación de gases, propiedades ópticas o migración de aditivos [10]. Adicionalmente los instrumentos utilizados como lo son los catéteres fabricados con el mismo polímero mencionado anteriormente gracias a su flexibilidad y propiedades mecánicas para su adecuado desempeño y empleando a su vez polietileno de alta densidad o politetrafluoroetileno debido a su bajo coeficiente de rozamiento [10], de igual manera se presenta una ventaja en movilización de las

personas, mejorando su estilo de vida al necesitar una prótesis o el uso de adhesivos en mallas quirúrgicas debido a su respuesta de rechazo inferior, presentando avances tecnológicos y de innovación con la aplicación de estos polímeros en la salud de las personas sin embargo, algunas de estas ventajas se ven opacadas a la regulación y toxicidad que estos puedan causar en la salud de las personas debido a que el escaso bagaje no permite tener una base de datos equiparable a otros materiales [10].

Por otro lado, en la industria de la construcción, la utilización de fibras de carbono soluciona gran parte de los problemas que puedan darse en los refuerzos estructurales de las edificaciones con altos estándares de seguridad y capacidad portante de los elementos de la estructura del mismo, teniendo la facilidad de colocarse sobre las superficies deterioradas gracias a su matriz y propiedades ligeras en su resistencia, dicho material se basa fundamentalmente en dos técnicas de reparación: la aplicación de una lámina de fibra de carbono y resina epoxi endurecida previamente presentando limitaciones en la dureza del material compuesto y la impregnación de la fibra de carbono con resina epoxi en obra combinando en húmedo la fibra gracias al control de calidad realizado al compuesto [11].

En cuanto a la utilización de polímeros en el transporte, se puede evidenciar el empleo de estos en vehículos ya que estos presentan ventajas en la “disminución del peso que puede oscilar del 17 al 50% consiguiendo con ello aumentar las prestaciones finales del vehículo, mayor resistencia a la fricción, absorción de energía durante un impacto sin deformarse dependiendo de la magnitud de este, resistencia al efecto de productos químicos y la corrosión, facilidad de combinarse con otros materiales para mejorar la estética del vehículo, alta maleabilidad que permite conseguir piezas variadas y complejas y buenas propiedades de aislamiento térmico, eléctrico y acústico” [12]. De igual manera, las bolsas plásticas (polietileno de baja densidad) tienen múltiples ventajas no solo en el transporte como se evidenció anteriormente sino también en la industria de los alimentos al usarlo como empaque y almacenamiento para evitar alteración en los componentes presentes en los alimentos, conservando así su vida útil.

Los polímeros, al desarrollarse de acuerdo a las necesidades de las personas, resultan versátiles en la industria usados especialmente en medicina, transporte, construcción y en la industria en general sin embargo, al ser resistentes a altas temperaturas, presiones y sometimiento en sus propiedades

físicas, muchos de estos polímeros no pueden ser transformados para usarse nuevamente, lo cual provoca un problema ambiental debido a su corta vida útil como es el caso de las bolsas plásticas o el icopor, teniendo que ser acumulados en botaderos sin un acondicionamiento ni tratamiento previo causando un gran impacto ambiental y económico en su uso; es por ello que hoy en día dichas ventajas de los polímeros se buscan solventar con el uso de las tres R (reciclar, reutilizar y reducir), generando conciencia en las personas y aprovechar los materiales que se usan en el hogar como el PET especialmente para darle una nueva funcionalidad a los mismos y mitigar los problemas que estos ocasionan en el presente y en el futuro.

1.2.2 Propiedades de los polímeros

Gracias a la versatilidad que traen consigo los polímeros en la industria, es necesario identificar sus propiedades físicas, químicas y térmicas para evidenciar la estructura química y las propiedades macroscópicas que exhibe el material.

1.2.2.i Propiedades físicas. “En estado sólido algunos polímeros son completamente amorfos o semicristalinos dependiendo de las condiciones de cristalización del material”, los polímeros con capacidad de cristalizar son aquellos cuyas moléculas son ordenadas en su estructura, mientras que las que no se pueden cristalizar presentan irregularidades, siendo más común este caso en polímeros ramificados [13] [12].

Por otro lado, en el estado líquido o fundido las moléculas del polímero se encuentran ovilladas en ausencia de fuerzas externas para permanecer en una dirección definida; en las moléculas reales [11], “la capacidad de rotación de los enlaces de cadena está en la mayoría de los casos limitada por impedimentos estéricos” [13].

Las moléculas del material que contienen una estructura muy compleja e irregular presentan viscosidades muy altas en el estado líquido, no obstante, cuando estas moléculas se enfrían, la viscosidad aumenta directamente. En relación con la cristalinidad y el comportamiento del procesado, los polímeros se comportan de diferente forma dependiendo su grado de cristalización, estando fuertemente relacionado con el producto final y las propiedades del mismo [13] [12].

1.2.2.ii Propiedades químicas. “La unión entre monómeros se realiza mediante enlaces covalentes” en donde los enlaces de carbono constituyen la cadena principal de los mismos formando un

tetraedro en torno del átomo de carbono “y el ángulo de enlace de dos carbonos consecutivos será de aproximadamente 109° ” en el caso del polietileno [13] [14], la polaridad y el volumen de los átomos que conforman la molécula son los responsables de las fuerzas de cohesión entre cadenas determinando “la flexibilidad del material, temperatura de transición vítrea, temperatura de fusión y capacidad de cristalización” [13].

En estos polímeros, “cuanto mayor sean las fuerzas de cohesión entre las cadenas, más rígido resultara el polímero y por lo tanto mayor será la temperatura de fusión en el caso que este sea cristalino o temperatura de reblandecimiento en caso contrario” [13] [12]. Así mismo las propiedades de estos materiales se ven influenciadas en gran medida con su alto peso molecular, en donde los polímeros sintéticos están constituidos por la combinación de moléculas de distinto grado de polimerización, con el fin de determinar la longitud de la cadena con respecto al tiempo de crecimiento “debido a la disponibilidad de localización de grupos reactivos en los extremos de la cadena”, por último, se presentan ramificaciones y entrecruzamiento en su estructura dependiendo de la formación de cadenas, condicionando el comportamiento del material [13] [15].

1.2.2.iii Propiedades térmicas. En cuanto a la temperatura de degradación, “a muy alta temperatura, los enlaces covalentes entre los átomos de la macromolécula pueden destruirse, haciendo que el polímero se queme o se carbonice, lo cual limita la utilidad del polímero representando la temperatura superior a la cual el polímero puede ser conformado en forma útil” [8]. Así mismo, la temperatura de fusión es “la temperatura por debajo de la cual las cadenas se organizan en regiones cristalinas” y la temperatura de transición vítrea producida al pasar del comportamiento elastomérico a comportamiento vítreo manifestada en la mayoría de los casos a los metales y “modificarse con base al grado de ramificación o entrecruzamiento de los mismos” [8].

Por otro lado, se evidencia el procesamiento, siendo un proceso en el cual “el polímero se calienta a una temperatura cercana o superior a la de fusión”, con el fin de que el polímero se funda o se inyecte dentro de un molde o en una boquilla para conseguir la forma requerida. [8], dentro de este proceso se aplican diferentes mecanismos tales como la extrusión para reducir formas sólidas, películas, láminas y bolsas, moldeo por soplado introduciendo el polímero en un molde y expandiéndolo mediante un gas a presión, moldeo por inyección en donde los termoplásticos se calientan por encima de la temperatura de fusión forzándolo a entrar a un molde cerrado,

conformado al vacío empleado para la fabricación de recipientes delgados y poco profundos como lo son el PVC, poliestireno y plásticos acrílicos, calandrado vertiendo un plástico fundido para generar una delgada película de polímero, hilado donde se produce una fibra o cordón, moldeo por compresión consistiendo en introducir entre dos moldes complementarios y calientes una pieza de polvo comprimido para la fabricación de material eléctrico, moldeo por transferencia calentando el polímero bajo presión en un intercambiador y colado para producir laminas gruesas de termoplástico o bandas móviles de acero inoxidable [8] [9] [14].

1.2.3 Clasificación de los polímeros

Los polímeros industriales se clasifican fundamentalmente en tres grupos: termoestables, elastómeros y termoplásticos.

1.2.3.i Polímeros termoestables. “Son polímeros reticulados durante la reacción de polimerización o la adición de entrecruzamientos químicos lo cual no permite que sean reprocesados después de haber sido conformados” [8], así mismo “son aquellos que solamente son blandos o “plásticos” al calentarlos por primera vez, al enfriarlos estos no pueden recuperarse para procesos posteriores, es un material compacto y duro, insoluble para la mayoría de los solventes” siendo eficaces a altas temperaturas y resistentes al calor gracias a su estructura de forma reticular tridimensional que consta de una red con enlaces transversales activados por el calor y el tipo de catalizador usado para su producción, entre este grupo de polímeros se encuentran las resinas fenólicas, resinas de poliéster, resinas ureicas, poliuretano, resinas de melanina y las resinas epóxicas [5].

1.2.3.ii Polímeros elastómeros. Son aquellos que poseen la particularidad de deformarse en gran medida (mucho más que el 300% en forma elástica) [8] sin llegar a la zona de deformación plástica, “son compuestos químicos cuyas moléculas consisten en varias moléculas llamadas monómeros formando grandes cadenas flexibles, desordenadas y entrelazadas” [5], al momento de estirar las moléculas, estas toman una forma de distribución cristalina, pero al dejar la tensión, entran en un desorden natural al enredarse y el polímero regresa a su forma y tamaño original [5] [8], dentro de estos polímeros se encuentran el poliestireno-butadieno-estireno, SBS, polisobutileno y polibutadieno [5].

1.2.3.iii Polímeros termoplásticos. Estos polímeros se obtienen fácilmente “al aplicarles temperatura y presión, las temperaturas máximas de trabajo para los productos moldeados son más bajas que a temperatura de ablandamiento o de fusión” [5], sometidos a temperaturas altas o bajas no se altera el comportamiento del polímero [8]. Las alteraciones a las cuales puede ser sometido el polímero como los procesos de fatiga o condiciones ambientales, ocasionan la disminución de la resistencia del mismo, siendo grandes absorbentes de agua en ambientes normales o por inmersión [5], así mismo “están conformados por cadenas de polímero de diferentes longitudes donde cada una tiene su peso molecular y grado de polimerización” [8], dentro de estos polímeros se pueden encontrar el polietileno tereftalato (PET), polietileno de alta densidad (PE-HD), polietileno de baja densidad (LDPE), cloruro de polivinilo (PVC), polipropileno (PP), poliestireno (PS) y otras resinas como ABS o PC [5], los cuales se deforman en primer lugar de manera elástica y plástica, hasta llegar a una deformación remanente al ser termosensibles.

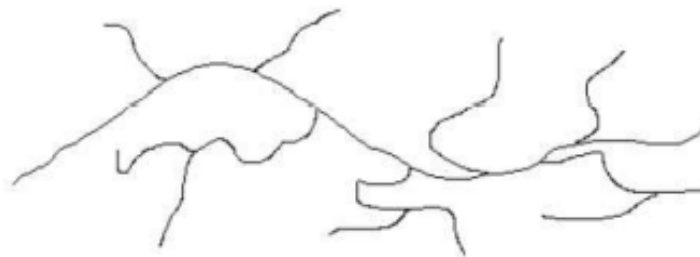
1.3 Polietileno de baja densidad

“El polietileno de baja densidad tiene una estructura ramificada, parcialmente cristalina y pertenece a los polímeros termoplásticos, este polímero es fabricado bajo altas condiciones de presión y temperatura mediante un proceso de polimerización por radical libre” [14]. Es usado principalmente en películas flexibles y transparentes tales como “bolsas plásticas y publicitarias como las utilizadas en las bolsas de pan, para alimentos congelados y para dulces, manufacturas de tapas flexibles, alambres y cables por sus buenas propiedades de aislamiento térmico” [5].

Aunque el polietileno de baja densidad se define por su nombre, obtenido de la polimerización del etileno (polímero de etileno) por polímeros lineales de la forma CH_2 , por reacciones de condensación, dando como resultado una combinación de largas moléculas con columnas vertebrales de distintas longitudes y cadena ramificada a los lados [14] [17] como se evidencia en la Figura 2, la presencia de los puntos ramificada en la estructura del polímero son determinantes para su facilidad de cristalización debido a la densidad y opacidad baja del mismo al contener ramificaciones de alta presión, lo que ocasiona “el crecimiento de estructuras cristalinas grandes” [17].

Figura 2.

Molécula ramificada de LDPE.



Nota. Esta figura representa la molécula ramificada del polietileno de baja densidad. Tomada de: A, Salas. (2005). Tecnología de las películas multicapa. Capítulo 3 [en línea]. Disponible en: <https://docplayer.es/76053087-Capitulo-3-3-tecnologia-de-las-peliculas-multicapa-debido-a-que-el-presente-estudio-radica-en-peliculas-multicapa-de.html>

“La ramificación de cadenas homopolímero de LDPE le brinda características deseables como: claridad, flexibilidad, sellabilidad y fácil procesado. Es muy versátil adaptado a todo tipo de procesamiento de extrusión, inyección, entre otros, adicionalmente se caracteriza por su excelente flexibilidad, buena resistencia al impacto, maquinabilidad, resistencia a aceites, químicos, sellabilidad al calor y bajo costo (cerca de \$1.6/kg)” [14], fáciles de procesar y resistentes a la humedad con un bajo punto de fusión [5].

Adicionalmente, “es un polímero sintético derivado del petróleo gracias a su tenacidad, ductilidad, excelente resistencia química y permeabilidad al vapor de agua, este polímero ha sido modificado con anhídrido maleico (AM)” provocando el entrecruzamiento de las cadenas del polietileno de baja densidad y la reducción de la formación de radicales del AM y la estructura de este en el polímero [15]

Este polímero resiste una presión de 100 a 300 psi (0,70 a 2 MPa) y una temperatura de unos 300°C, teniendo su primera aplicación en aislantes en los cables submarinos y formas de recubrimiento de conductores del material, así mismo es empleado en “tuberías, fibras, películas, aislamiento eléctrico, revestimiento, envases, utensilios caseros, aparatos quirúrgicos, juguetes y artículos de fantasía, teniendo como característica principal una mayor flexibilidad en comparación con el polietileno de alta densidad, coloración transparente opaciéndose a medida que

aumenta su espesor con una complejidad al imprimirse, pegarse o pintarse en su superficie” [16], siendo uno de los más contaminantes a nivel mundial con un total de 13’000.000 de toneladas aproximadamente vertidos en el ecosistema [1]

1.3.1 Propiedades físicas

“El LDPE tiene una baja cristalinidad entre 40 a 60% y una baja densidad entre 0,91 a 0,93 g/cm³” [14], “su temperatura de fusión cristalina está en un rango de 108-132°C, no hay fuerzas intermoleculares fuertes, siendo concentrada la mayor parte de su fuerza en el empaquetamiento molecular cercano” [17] [15].

El LDPE es un polímero termoplástico con características de ablandamiento similar al de la cera a unos 80-139°C, es resistente a la tracción moderada y química ejercida en este, gracias a sus propiedades, es catalogado como excelente aislante térmico, tiene una densidad menor a la del agua, a plena vista es translucido u opaco con tendencia a la transparencia [17]. En la Tabla 1 se presenta una recopilación de las propiedades físicas del LDPE.

Tabla 1.
Propiedades físicas del LDPE.

Propiedades Físicas	Parámetros
Densidad	0,91 a 0,93 g/cm ³
Tg	-120°C
T _{fusión}	105 - 115°C
Módulo de tensión	172 - 517 MPa (24.900 - 75.000 psi)
Elongación	100 - 965 %
Resistencia al rasgado	200 - 300 g/25µm
WVTR	375 - 500 gµm/m ² d a 3,8°C, 90% HR 0,95 - 1,30 g mil/ in ² d a 95°F, 90% HR
Permeabilidad al O ₂ a 25°C	163.000 - 213.000 cm ³ µm/m ² d atm 400 - 540 cm ³ mil/ 100 in ² d atm
Permeabilidad al CO ₂ a 25°C	750.000 - 1.060.000 cm ³ µm/m ² d atm 1.900 - 2.700 cm ³ mil/ 100 in ² d atm
Absorción del agua	<0,01

Nota. Esta tabla representa las propiedades físicas más importantes del polietileno de baja densidad. Tomada de: A, Salas. (2005). Tecnología de las películas multicapa. Capítulo 3 [en línea]. Disponible en: <https://docplayer.es/76053087-Capitulo-3-3-tecnologia-de-las-peliculas-multicapa-debido-a-que-el-presente-estudio-radica-en-peliculas-multicapa-de.html>

1.3.2 Propiedades químicas

“El polietileno de baja densidad es químicamente el polímero más simple, siendo su estructura fundamental $(-CH_2-CH_2-)_n$ obtenido de la polimerización del etileno” [18], es resistente químicamente a ácidos no oxidantes, álcalis o soluciones acuosas sin evidencias de alteraciones morfológicas en su estructura [15] sin embargo, “al ser sometido a ácido nítrico, provoca en el polímero un aumento del factor de potencia y deterioro en sus propiedades mecánicas” [17].

La oxidación del material puede evidenciarse a bajas temperatura ($50^{\circ}C$) y en presencia de luz UV, causando reducción “de la viscosidad de la masa fundida, decoloración y rayas en la estructura del material” a temperatura ambiente, es soluble en solventes como el benceno a $60^{\circ}C$ “gracias a la absorción de energía por los grupos carbonilo introducidos en la cadena durante la polimerización”, adicionalmente, “contiene permeabilidad a los gases debido a que en las zonas amorfas el volumen libre y los movimientos segmentarios facilitan el paso de pequeñas moléculas” [17] como se evidencia en la Tabla 2.

Tabla 2.

Absorción de líquidos por polietilenos de densidad 920 y 960 kg/m³ a 20°C después de 30 días de inmersión.

Solvente	Solubilidad Parámetro D MPa	% Aumento de peso en polímeros	
		920 kg/m ³	960 kg/m ³
Tetracloruro de carbono	17,50	42,40	13,50
Benceno	18,70	14,60	5,00
Tetrahidrofurano	19,40	13,80	4,60
Gasolina (BP 60 -100°C)	-	12,80	5,80
Éter dietílico	15,10	8,50	2,60
Aceite lubricante	-	4,90	0,95
Ciclohexanona	20,30	3,90	2,40
Acetato de etilo	18,60	2,90	1,60
Ácido oleico	-	1,81	1,53
Acetona	20,40	1,24	0,79
Ácido acético	-	1,01	0,85
Etanol	26,00	0,70	0,40
Agua	48,00	<0,01	<0,01

Nota. Esta tabla representa la diferencia de la absorción de líquido en el polietileno con respecto a las densidades de 920 y 960 kg/m³. Tomado de: M. Gilbert. (2017). *Brydson's Plastics Materials*. (8va ed.) [En línea].

Disponible

en:

https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpBPME0001/viewerType:toc//root_slug:brydsonsplastics-materials/url_slug:relation-structure-electrical?issue_id=kpBPME000

“Cuando el polietileno es sometido a irradiación de alta energía, se produce un desprendimiento de gases tales como hidrógeno e hidrocarburos inferiores, provocando un aumento de la instauración y la reticulación de moléculas, así mismo cuando es expuesto a tensión mecánica, la fractura de la muestra se produce a tensiones mucho menores que en ausencia del entorno al que fue sometido” [17].

Se ha estudiado que el polietileno de baja densidad, en términos de resistencia con base en la ASTM D 1693 es un material resistente debido a su alto peso molecular [17].

1.3.3 Propiedades mecánicas

“Las propiedades mecánicas del polietileno de baja densidad dependen de la masa molar y el grado de ramificación del mismo, así como también de la velocidad y temperatura de la prueba, método de preparación, tamaño y forma de la muestra” [17] evidenciadas en la Tabla 3.

Tabla 3.

Influencia de la densidad/cristalinidad, índice de fluidez y distribución de masa molar en las propiedades del polietileno.

	Aumento de la densidad/cristalinidad	Aumento del índice de fluidez en fusión	Determinación de la distribución de masa molar
Derretir la viscosidad	Sin efecto	Mucho más bajo	Ligeramente más alto
Temperatura de ablandamiento Vicat	Mucho más alto	Ligeramente menor	Ligeramente más alto
Punto de fusión	Mucho más alto	Más bajo	Ligeramente más alto
Resistencia a la tracción a la rotura	Más alto	Más bajo	Sin efecto
Alargamiento a la rotura	Más bajo	Mucho más bajo	Sin efecto
Módulos elásticos	Mucho más alto	Ligeramente menor	Sin efecto
Resistencia al impacto	Mucho más bajo	Mucho más bajo	Ligeramente más alto
Resistencia a la fluencia	Más alto	Ligeramente menor	Ligeramente más alto
Resistencia al alargamiento por tensión ambiental	Más bajo	Mucho más bajo	Ligeramente más alto
Resistencia a la abrasión	Más bajo	Ligeramente menor	Sin efecto
Propiedades de barrera	Mucho más alto	Sin efecto	Más alto
Resistencia a la interperie	Sin efecto	Ligeramente menor	Sin efecto

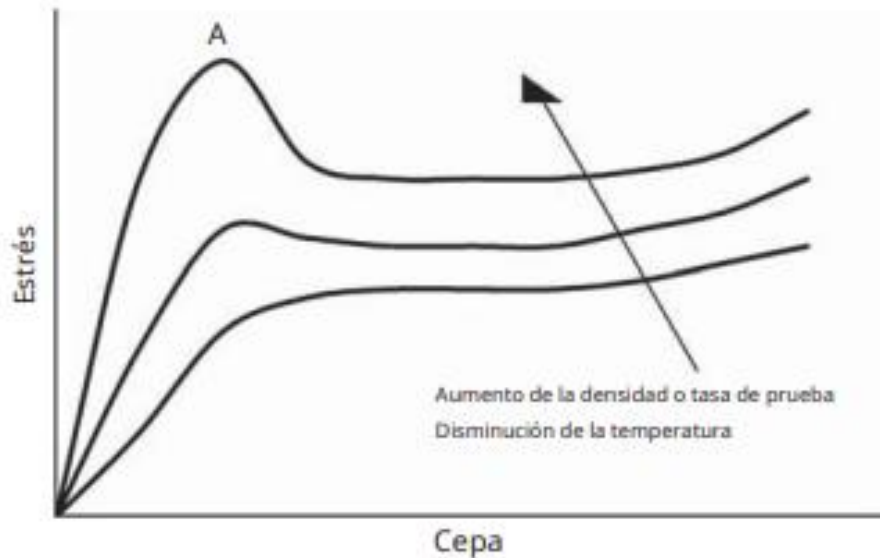
Nota. Esta tabla representa la influencia de la densidad, cristalinidad, índice de fluidez y distribución en el polietileno de baja densidad al ser sometido a pruebas mecánicas. Tomado de: M. Gilbert. (2017). *Brydson’s Plastics Materials*. (8va ed.) [En línea]. Disponible en: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpBPME0001/viewerType:toc//root_slug:brydsonsplastics-materials/url_slug:relation-structure-electrical?issue_id=kpBPME000

Así mismo, en la Figura 3 se puede evidenciar que a medida que la temperatura de prueba disminuye o aumenta la densidad o la tasa de prueba, se hace presente un límite de fluencia en la

curva, provocando un ablandamiento por deformación extendiendo el polímero por tensión constante [17] [18].

Figura 3.

Efecto de la densidad del polímero, la tasa de prueba y la temperatura sobre la forma de la tensión de deformación para polietileno.



Nota. Esta figura representa la deformación del polietileno al ser sometido a condiciones de estrés. Tomado de: M. Gilbert. (2017). *Brydson's Plastics Materials*. (8va ed.) [En línea]. Disponible en: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpBPME0001/viewerType:toc//root_slug:brydsonsplastics-materials/url_slug:relation-structure-electrical?issue_id=kpBPME000

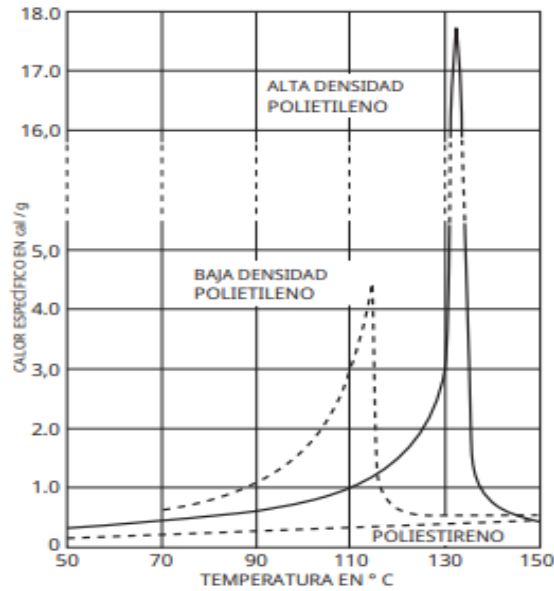
1.3.4 Propiedades térmicas

Debido a la alta cristalinidad de los materiales, estos polímeros son duros a temperatura ambiente, volviéndose frágiles cuando se enfrían (-70°C). Cuanto más grande es la masa molar y la ramificación, menor es el punto de fragilidad de estos materiales [17] [15], lo que los hace eficaces al ser utilizados en la industria.

Por otro lado, el material resulta ser más viscoso al ser sometido a velocidades de cizallamiento durante el proceso y “el calor específico del polietileno es más alto que la mayoría de los termoplásticos, dependiendo de la temperatura aproximadamente de $2,30 \text{ J/g}$ a temperatura ambiente” [17] como se evidencia en la Figura 4.

Figura 4.

Calor específico y relaciones de temperatura para el polietileno de baja, alta densidad y poliestireno.



Nota. Esta figura representa el comportamiento del calor específico de las dos clases de polietileno junto con el poliestireno. Tomado de: M. Gilbert. (2017). *Brydson's Plastics Materials*. (8va ed.) [En línea]. Disponible en: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpBPME0001/viewerType:toc//root_slug:brydsonsplastics-materials/url_slug:relation-structure-electrical?issue_id=kpBPME000

De igual modo, “en una atmósfera inerte, el polímero es estable hasta temperaturas de 300°C para evitar problemas graves de degradación y en procesos de baja temperatura y extrusión a velocidades altas pueden provocar el fenómeno de turbulencia elástica (ondulación o fractura por fusión), viéndose agravada principalmente cuando la masa molar es alta y temperaturas bajas” [17].

Así mismo, se puede evidenciar otro fenómeno conocido como piel de tiburón, el cual es “una serie de crestas transversales a la dirección de extrusión presentes en la superficie del material debido a tensiones de alargamiento en la salida de la matriz relacionada a temperaturas altas o

masa molar baja del polietileno” [17], causando alteraciones en su morfología y características de resistencia [15].

1.3.5 Propiedades eléctricas

Gracias a sus propiedades fisicoquímicas, el polietileno de baja densidad es un excelente aislante térmico debido a las grandes temperaturas que soportan sin alterar su composición ni su morfología. “Las propiedades aislantes del polietileno de baja densidad son comparables a cualquier tipo de material dieléctrico, en el cual propiedades como el factor de potencia y la constante dieléctrica son independientes de la temperatura y la frecuencia del mismo” [17]. A continuación, en la Tabla 4 se evidencia una recopilación de las propiedades eléctricas más importantes del polímero.

Tabla 4.

Propiedades eléctricas del polietileno de baja densidad.

Propiedades Eléctricas	Parámetros
Resistividad de volumen	$10^{15} - 10^{18} \Omega cm$
Resistencia dieléctrica	20 kV/mm
Constante Dieléctrica	
Densidad 920 kg/m ³	2,28
Densidad 960 kg/m ³	2,35
Factor de potencia	$\sim 1 - 2 \times 10^{-4}$

Nota. Esta tabla recopila las propiedades eléctricas más importantes del polietileno de baja densidad. Tomado de: M. Gilbert. (2017). *Brydson’s Plastics Materials*. (8va ed.) [En línea]. Disponible en: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpBPME0001/viewerType:toc//root_slug:brydsonplastics-materials/url_slug:relation-structure-electrical?issue_id=kpBPME000

La constante dieléctrica del polietileno como se identifica en la Tabla 4 “es directamente relacionada con la densidad del material, es decir, sí se presenta un calentamiento en este, ocasionará una reducción en su densidad y así mismo una reducción en la constante” [17]. Igualmente, al presentarse una oxidación en el polímero con la formación de grupos carbonilo, “esto conducirá a un aumento del factor de potencia, es por ello que en la industria se emplean antioxidantes para solventar dicho problema con el fin de reducir este efecto” [17].

1.4 Aspectos normativos de la biodegradación

Para evaluar la biodegradabilidad de un material, en este caso el polietileno de baja densidad se debe tomar en consideración la normativa del ASTM para el control y verificación de la degradación, las cuales se evidencian en sus propiedades físicas y morfológicas en presencia de microorganismos.

1.4.1 ASTM D 6954-04

“Esta guía proporciona una hoja de ruta para la clasificación de las tasas controladas de degradación y la pérdida de propiedades físicas de los polímeros con ayuda de procesos térmicos, fotooxidación y biodegradación, viéndose reflejado en los impactos ecológicos y entornos de eliminación después del proceso de degradación. Estos entornos varían con respecto a la exposición de suelos, vertederos y compost en los cuales se pueda producir la oxidación térmica y cobertura del suelo” [19].

1.4.2 ASTM D 5988-03

“Esta guía proporciona una hoja de ruta para la determinación del grado y tasa de biodegradación de materiales plásticos sintéticos, incluyendo los aditivos de formulación que pueden ser biodegradables al estar en contacto con el suelo y compost maduro en condiciones experimentales con un estándar en un ambiente aeróbico. Está diseñado para materiales plásticos que no inhiben las bacterias y hongos presentes en las condiciones mencionadas anteriormente, con el fin de abordar la responsabilidad en la seguridad y salud de las prácticas llevadas a cabo en el proceso y las limitaciones de peligrosidad en su aplicabilidad” [20].

1.4.3 ASTM D 5338-15

“Esta guía proporciona un ahoja de ruta para la determinación del grado y la tasa de biodegradación aeróbica de los materiales plásticos tras la exposición a un entorno de compostaje controlado en condiciones de laboratorio a temperaturas termófilas, produciendo resultados de prueba reproducibles en condiciones controladas de temperatura, aireación y humedad” [21].

En este apartado se identificó la caracterización de la industria de los polímeros, estudiando su impacto, evolución, versatilidad, propiedades su clasificación con base a la aplicación a las cuales

van dirigidos para satisfacer las necesidades de los consumidores gracias a su dureza y resistencia a altas temperaturas y variables de proceso.

Así mismo se estudió el polietileno de baja densidad en relación con sus propiedades físicas, químicas, mecánicas, térmicas y eléctricas y aplicación en el mercado, con base en la normativa vigente en el control y verificación de la biodegradabilidad de plásticos.

2. ANÁLISIS BIBLIOGRÁFICO DE LOS PROCESOS DE BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD MEDIADOS POR HONGOS

En este capítulo se abordan los diferentes procesos de biodegradación, siendo estos en su mayoría tratamientos físicos, químicos y biológicos con ayuda de compostaje o actividad enzimática de los cultivos fúngicos que favorecen el proceso, identificando la metodología de cada uno de estos, condiciones de operación y los resultados obtenidos, así como también la identificación de los hongos filamentosos mediadores del proceso y los análisis de caracterización del material para evidenciar su deterioro y la mineralización del mismo.

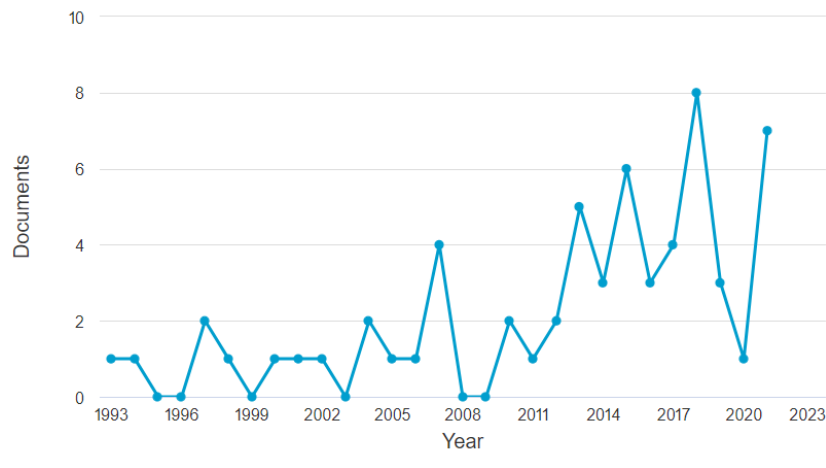
2.1 Análisis bibliométrico

Para identificar los procesos de biodegradación del polietileno de baja densidad mediado por hongos fue necesario el desarrollo del análisis bibliográfico con ayuda de herramientas de bibliometría tales como Mendeley, Scopus, Refworks, Legible y Nube de palabras, con el fin de establecer la información relevante para llevar a cabo la investigación.

Con base en la metodología mencionada anteriormente, se revisaron un total de 61 artículos, agrupando en primer lugar, los documentos relacionados con los procesos de biodegradación obtenidos por año como se evidencia en la Figura 5, así mismo en la Figura 6 se muestran los tipos de documentos con mayor porcentaje y en la Figura 7 los documentos relevantes con base en el área de aplicación de los mismos. La ecuación de búsqueda usada para la ejecución del análisis bibliométrico llevado a cabo en diciembre del 2021 fue: “Biodegradation AND LDPE AND Fungi”.

Figura 5.

Documentos por año biodegradación de LDPE mediados por hongos.

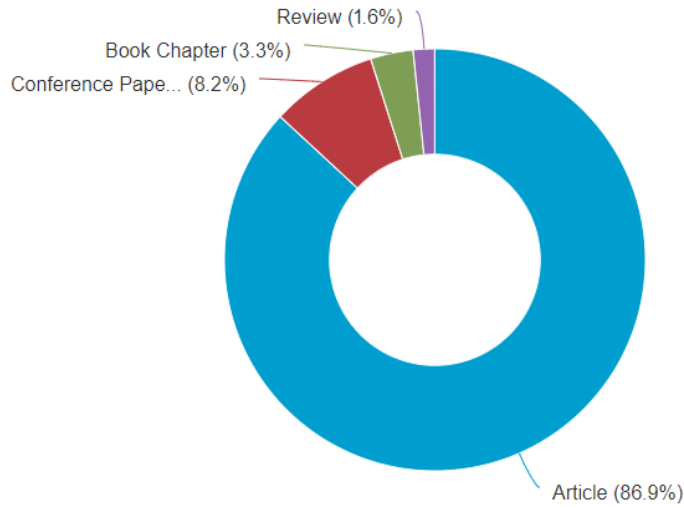


Nota. Esta figura representa el número de documentos publicados por año en procesos de biodegradación de polietileno de baja densidad mediado por hongos. Tomado de: Scopus. (2021). Documento por año procesos de biodegradación mediado por hongos [en línea]. Disponible en: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=f5d975c059880481c17f26e29f77fa61&origin=resultlist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+and+LDPE+and+fungi%29&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=48&count=68&analyzeResults=Analyze+results&txGid=0e3388f0edbcd6d3d42b134dc99f6882>

Como se evidencia en la Figura 5, el año en que se publicaron la gran mayoría de los documentos en procesos de biodegradación de LDPE mediado por hongos es del 2017 al 2021.

Figura 6.

Documentos por tipo biodegradación de LDPE mediados por hongos.

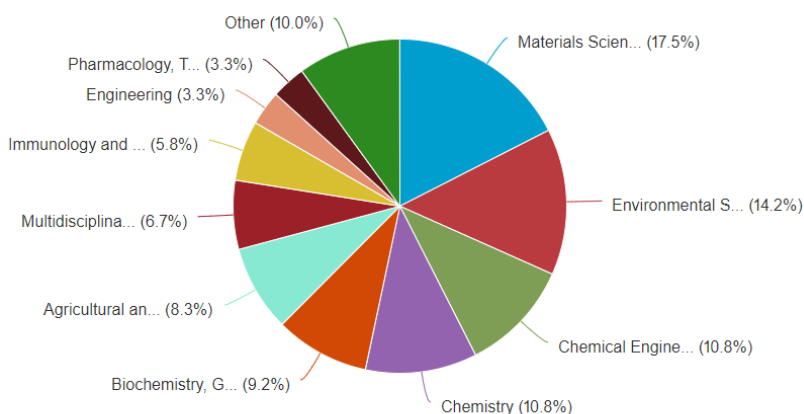


Nota. Esta figura representa el porcentaje de documentos publicados por tipo en procesos de biodegradación de polietileno de baja densidad mediado por hongos. Tomado de: Scopus. (2021). Documento por tipo procesos de biodegradación mediado por hongos [en línea]. Disponible en: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=f5d975c059880481c17f26e29f77fa61&origin=resultslist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+and+LDPE+and+fungi%29&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=48&count=68&analyzeResults=Analyze+results&txGid=0e3388f0edbcd6d3d42b134dc99f6882>

En la Figura 6 se evidencia que la mayoría de los documentos relacionados en el proceso de biodegradación de LDPE mediado por hongos son artículos con un 87,10%, seguido de conferencias con un 8,10%, capítulos de libro con un 3,20% y artículos de revisión con un 1,60%.

Figura 7.

Documentos por área de investigación biodegradación de LDPE mediados por hongos.



Nota. Esta figura representa el porcentaje de documentos publicados por área de investigación en procesos de biodegradación de polietileno de baja densidad mediado por hongos. Tomado de: Scopus. (2021). Documento por área procesos de biodegradación mediado por hongos [en línea]. Disponible en:

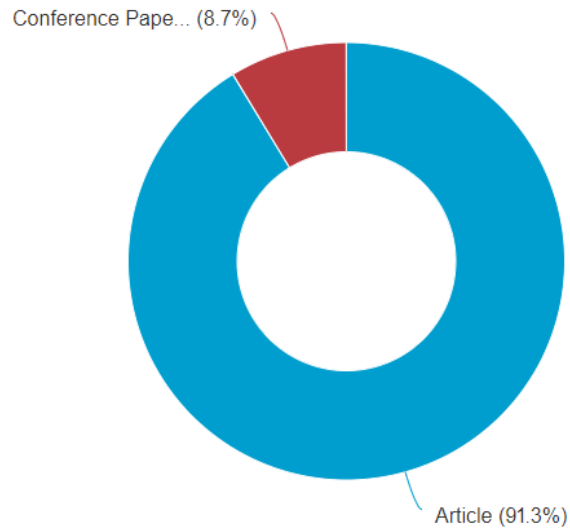
<https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=f5d975c059880481c17f26e29f77fa61&origin=resultslist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+and+LDPE+and+fungi%29&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=48&count=68&analyzeResults=Analyze+results&txGid=0e3388f0edbcd6d3d42b134dc99f6882>

En la Figura 7 se evidencia que la mayoría de documentos encontrados en la biodegradación de LDPE mediado por hongos, se relacionan con el área de materiales con un 17,50%, seguido de ciencia medioambiental con un 14,20%, ingeniería química y química con un 10,80% y bioquímica, genética y biología molecular con un 9,20%.

A partir de la documentación encontrada sobre el tema de interés, se realiza un segundo filtro con base en el año de estudio, tomando como referencia los publicados entre 2017 al 2021, siendo los años donde se publicó la mayoría de documentos con base en la Figura 4, encontrando así un total de 23 artículos recopilados en las Figuras 8 y 9 en relación con los tipos y área de investigación seleccionados.

Figura 8.

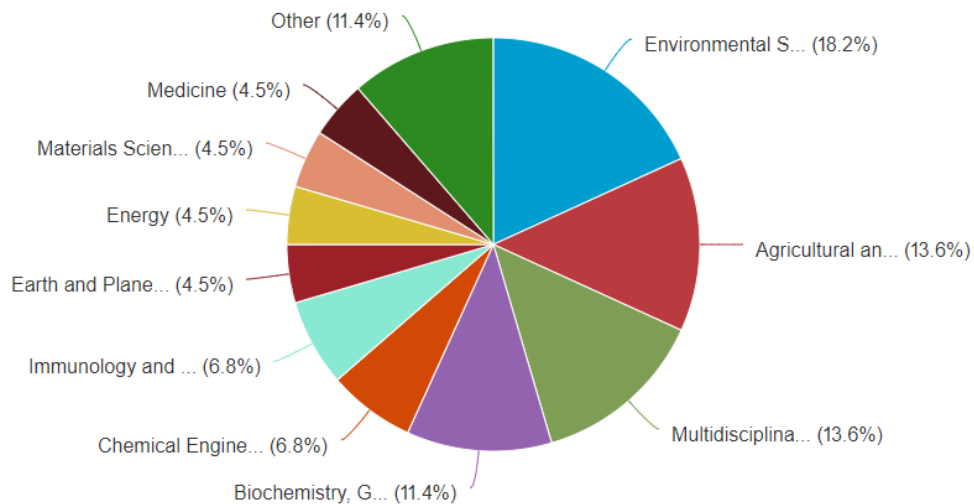
Documentos seleccionados por tipo biodegradación de LDPE mediados por hongos.



Nota. Esta figura representa el porcentaje de documentos seleccionados por tipo en procesos de biodegradación de polietileno de baja densidad mediado por hongos. Tomado de: Scopus. (2021). Documento por tipo procesos de biodegradación mediado por hongos [en línea]. Disponible en: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=f5c16ee62c0cd3a1240d94752e2ea781&origin=resultslist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+and+LDPE+and+fungi%29&sort=plf-f&sdt=cl&sot=b&sl=48&count=25&analyzeResults=Analyze+results&cluster=scopubyr%2c%222021%22%2ct%2c%222020%22%2ct%2c%222019%22%2ct%2c%222018%22%2ct%2c%222017%22%2ct&txGid=f6f45be50b150debd6cc8f3f274fba73>

Figura 9.

Documentos seleccionados por área de investigación biodegradación de LDPE mediados por hongos.



Nota. Esta figura representa el porcentaje de documentos seleccionados por área de investigación en procesos de biodegradación de polietileno de baja densidad mediado por hongos. Tomado de: Scopus. (2021) Documento por área procesos de biodegradación mediado por hongos [en línea]. Disponible en: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=f5c16ee62c0cd3a1240d94752e2ea781&origin=resultslist&src=s&s=TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+and+LDPE+and+fungi%29&sort=plf-f&sdt=cl&sot=b&sl=48&count=25&analyzeResults=Analyze+results&cluster=scopubyr%2c%222021%22%2ct%2c%222020%22%2ct%2c%222019%22%2ct%2c%222018%22%2ct%2c%222017%22%2ct&txGid=f6f45be50b150debd6cc8f3f274fba73>

En la Figura 8 se evidencia que prácticamente la totalidad de los documentos seleccionados para la investigación son artículos con un 91,30% y el restante 8,70% es de conferencias. Así mismo se demuestra en la Figura 9 que el área de mayor interés en ciencias ambientales con un 18,20%, agricultura y multidisciplinar con un 13,60% y bioquímica, genética y biología molecular con un 11,40%.

Adicionalmente, los autores que más se destacan en el área de biodegradación, los cuales M, Imbuga y G, Magoma lideran con 2 documentos cada uno y en cuanto a los países que desarrollan las investigaciones encabeza India con 11 documentos, seguido de Canadá, Indonesia y Kenia con

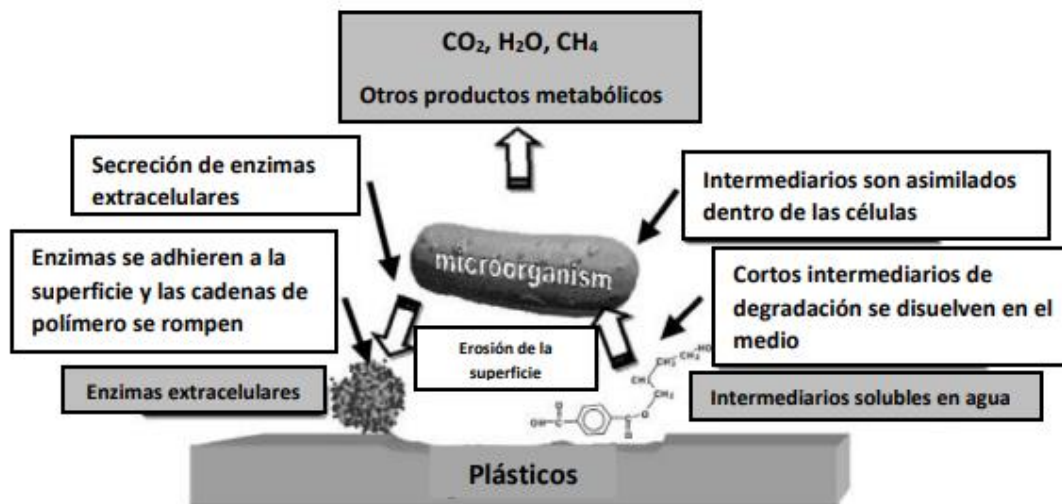
2 documentos cada uno y por último China, Colombia, República Checa, Ecuador, Egipto y Francia con 1 documento cada uno.

2.2. Biodegradación

La biodegradación es un proceso biológico, que consiste en la descomposición de sustancias por la actividad enzimática de microorganismos aeróbicos, con el fin de obtener al final del proceso cambios, alteraciones morfológicas en la superficie y la disminución de las propiedades físicas y mecánicas del material [22] [23]. Este proceso se lleva a cabo por biodeterioro, despolimerización, asimilación y mineralización del microorganismo mediador al material evaluado como se recopila en la Figura 10 [24] [25].

Figura 10.

Mecanismo general de biodegradación en plásticos.



Nota. Esta figura representa el mecanismo general de la biodegradación en plásticos por la acción microbiana. Tomado de: L. M., Yepes Aguirre. “*Degradación de polietileno de baja densidad utilizando hongos. Revisión sistemática de la literatura*”, tesis pre. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 2014. [en línea]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/16184/YepesAguirreLauraMaria2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

Los productos obtenidos de la degradación microbiana de los plásticos se utilizan para obtener energía [26], siendo las bacterias y los hongos (levaduras y mohos) los responsables de dicho proceso donde diecisiete bacterias y nueve hongos son conocidos como biodegradadores del

polietileno [27] tales como: *Rhizopus oryzae*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Cladosporium*, *Pediculosis* y *Leptosphaeria*, en el cual los hongos se ven favorecidos debido a su capacidad y resistencia a altas concentraciones de contaminantes, para sintetizar proteínas hidrófobas, enzimas extracelulares y la capacidad de formación de biopelículas sobre los materiales [28] [29].

La capacidad de los hongos para desarrollarse en condiciones de temperatura, oxígeno disponible, humedad y pH bajos, les brinda una ventaja competitiva para la degradación de materiales poliméricos, con el fin que las hifas presentes en su estructura puedan mineralizar y colonizar los sustratos insolubles en el proceso [29], logrando un grado de degradación del material total o parcial en relación a las condiciones de proceso mencionadas anteriormente para reducir los niveles de contaminación ambiental que se generan con los polímeros tradicionales.

2.2.1 Procesos de biodegradación de LDPE

Para la minimización de los contaminantes ocasionados por la acumulación del LDPE en rellenos sanitarios y botaderos sin un tratamiento previo, se han buscado diferentes alternativas de procesos de biodegradación del material clasificados como físicos, químicos y biológicos.

Entre los procesos físicos se encuentra la fotodegradación, siendo este la degradación del material por la acción de luz UV ocasionando daños morfológicos en el material en condiciones ambientales [18], en segundo lugar se encuentran los procesos químicos determinado por ácidos grasos tensoactivos afectando directamente al polímero [44] y por último se encuentra el proceso biológico a partir de compostaje o cultivo mixto los cuales usan los nutrientes pertenecientes al suelo como fuentes de carbono para el proceso, así mismo el método biológico de enzimas evidenciados en la actividad microbiana, la mineralización y colonización del material y fermentación líquida sumergida, más conocido como biorreactor en donde el LDPE es sometido a condiciones específicas de temperatura, pH y aireación para que la biodegradación se lleve a cabo de una manera más rápida y eficaz [24].

2.2.1.i Compostaje. “El compostaje es un proceso que controla e identifica la descomposición y transformación de materiales biodegradables en una sustancia similar al humus llamada abono. El proceso pasa por fases mesófilas y termófilas en relación al microorganismo presente en el mismo, dando como resultado la producción de dióxido de carbono, agua, minerales y materia orgánica estabilizada (compost o humus)” [22].

Dentro de las ventajas que ofrece este proceso de biodegradación es la existencia de consorcios de microorganismos que garantizan la concentración de enzimas para el deterioro de los polímeros sintéticos, controlándose adecuadamente en sitios de degradación de los residuos orgánicos utilizados en el mismo [30]. Así mismo, “el calor producido puede resultar en la destrucción de patógenos que pueden estar presentes en el flujo y el uso de la combinación de lodos o residuos sólidos proporciona un mejor rendimiento al proceso” [22].

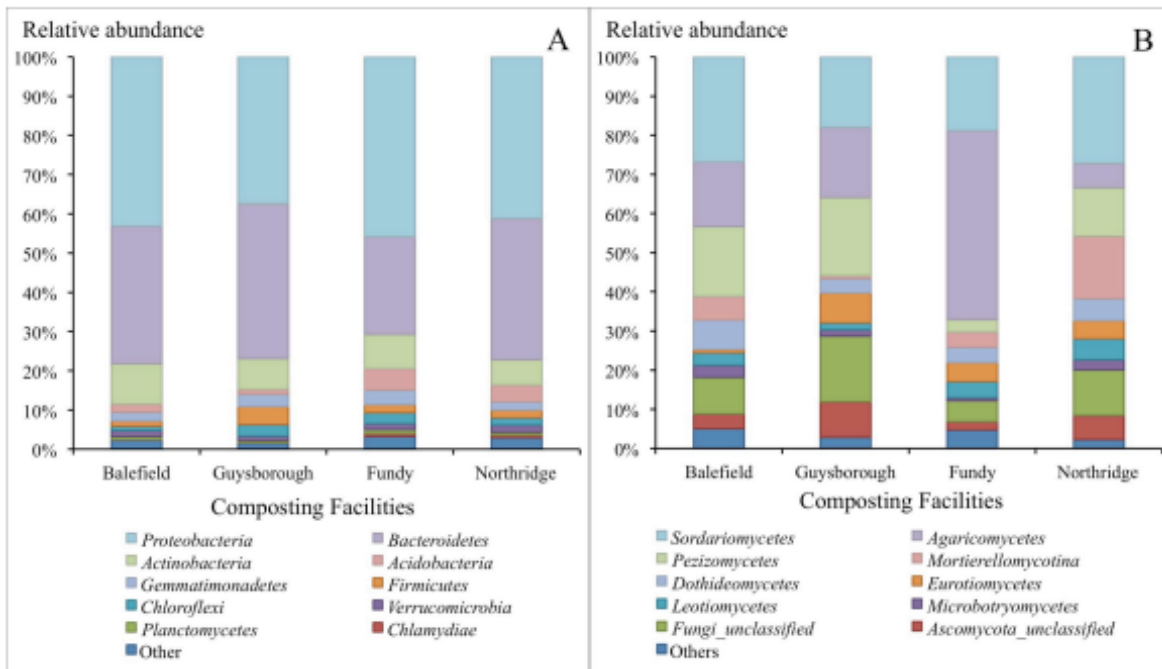
El producto o material plástico debe descomponerse en el compostaje hasta que este no sea visible en el material orgánico dispuesto para realizar el proceso, con el fin de obtener corrugaciones en el LDPE por la acción enzimática del microorganismo y la fijación del mismo para la formación de biofilm entre el compost y la biomasa [31].

Adicionalmente, para llevar a cabo el proceso de biodegradación por compostaje, es necesario la búsqueda de una enzima o microorganismos mesófilos o termófilo capaces de degradar el polímero elegido, para ello se aísla el gen responsable de la actividad enzimática, adicionándolo a la cepa del microorganismo usado en el proceso, con el fin de minimizar la contaminación y la acumulación de los residuos plásticos en el entorno [30].

Siendo el compostaje una de las matrices más utilizadas para favorecer la biodegradación de LDPE, E, Esan, et. al en el año 2019, analizaron el microbioma de compost utilizando como materia prima: astillas de madera durante la temporada de invierno, estanterías de madera, astillas y maderas, henos y paja. Para su procesamiento se emplearon 10 g de las muestras de compost a granel a -80°C para el aislamiento de ADN, siendo necesario el análisis de las comunidades bacterianas y fúngicas en el compostaje como se observa en la Figura 11, las cuales albergaban 593 clases de bacterias y 198 hongos, con el fin de evidenciar el efecto del plástico en la diversidad y estructura de las comunidades microbianas, requiriendo de un cambio sustancial en la cooperación entre los miembros de la comunidad para la adaptación y utilización eficiente del carbono [32].

Figura 11.

Abundancias relativas de taxones microbianos presentes en el compostaje.



Nota. En esta figura se puede observar los diferentes taxones de bacterias y hongos presentes en el compostaje estudiado. Tomado de: EO, Esan, L, Abbey, S, Yurgel. “Explorando el efecto a largo plazo del plástico en el microbioma del compost”. *PLoS ONE*, vol 14, 2019. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214376>

Adicionalmente, la selección del material orgánico cobra gran importancia en este proceso, tal como lo demuestra la investigación realizada por L, Calcetero Moreno y J, Mancera Hernández en el año 2021, en la que se utilizaron de dos tipos de compost provenientes de residuos orgánicos tales como: cáscaras de plátano, papa, zanahoria, lechuga, tomate, lulo, mango, entre otros, así como también trozos de cartón, hojas de papel sin tintas, hojas y ramas de árboles secos, aserrín, cascarillas de arroz y tierra negra. El proceso se llevó a cabo en canecas para acelerar la biodegradación del LDPE mediado por *Aspergillus niger* por un periodo de 30 días, al transcurrir el tiempo de biodegradación se observó la colonización del hongo en el material vegetal usado como compostaje y la colonización del mismo en el polímero utilizado en la investigación como se evidencia en la Figura 12 y 13 respectivamente [33].

Figura 12.

Colonización de Aspergillus niger.



Nota. En esta figura se puede observar la colonización del hongo en el material vegetal del compostaje fresco. Tomado de: L, Calcetero y J, Mancera. “Evaluación del proceso de colonización y degradación de polietileno de baja densidad por inóculo de *Aspergillus niger* en humus y compostaje doméstico”, tesis pre. Facultad de ingenierías. Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia, 2021. [en línea]. Disponible en: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8303/1/6161802-2021-1-IQ.pdf>

Figura 13.

Aspergillus niger en lámina de LDPE irradiada.



Nota. En esta figura se puede observar la colonización del hongo en lámina de LDE. Tomado de: L, Calcetero y J, Mancera. “Evaluación del proceso de colonización y degradación de polietileno de baja densidad por inóculo de *Aspergillus niger* en humus y compostaje doméstico”, tesis pre. Facultad de ingenierías. Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia, 2021. [en línea]. Disponible en:

<https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8303/1/6161802-2021-1-IQ.pdf>

En este estudio se tuvo en cuenta también las condiciones óptimas durante el proceso de degradación, “siendo necesario un rango de temperatura de 20-30°C, pH Superior a 6,14 y 7,14, humedad de 64-82% y pretratamiento con radiación UV” [33] del material, dando como resultado un porcentaje de biodegradación del 4,84% en 30 días [33] [31].

2.2.1.ii Cultivo mixto. Este proceso se basa en la mezcla de dos cepas de cultivos fúngicos ya sea del mismo género o de distinto con características similares para lograr la biodegradación del material, gracias su enriquecimiento y selectividad controlado a partir de la cantidad de población microbiana, el carbono de la biomasa, pH y la respiración en el suelo [34].

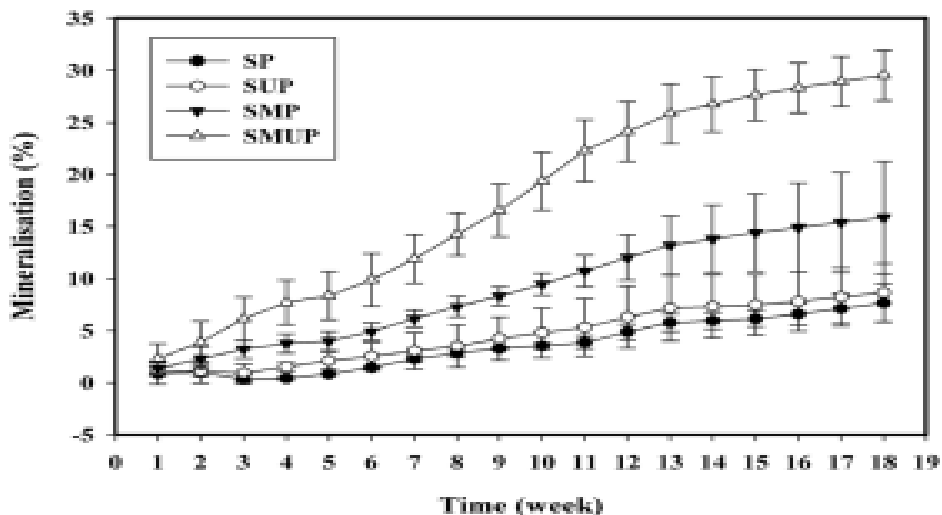
Es allí donde radica la importancia en el tipo de suelo, siendo este el medio en el cual se adiciona el polímero al que se le vaya a aplicar la biodegradación, controlando la medición del pH, el cual debe está en un rango entre 6 y 8 y radiación UV para la deformación térmica del material para el aceleramiento del proceso mediado por hongos [34]. “En los cultivos mixtos los microorganismos

son más rápidos que los puros y actúan de forma multidisciplinar sobre un sustrato complejo y lo degradan fácilmente en diferentes monómeros” [35].

Con base en lo anterior, el procedimiento de enriquecimiento y aislamiento de los microorganismos por cultivo mixto desarrollado por A, Esmaeili, et. al, se realizó utilizando el LDPE como única fuente de carbono, con diferentes muestras de suelo de vertederos en los cuales se habían enterrado residuos del material durante diferentes periodos, con el fin de biodegradar el material al cabo de 126 días presentando un porcentaje de biodegradación de 29,50% y 15,80% en presencia y ausencia de los rayos UV respectivamente, evidenciando su comportamiento en la Figura 14 mediado por *Aspergillus niger* y *Lysinibacillus sp*, siendo importante en este caso la combinación de la luz UV aplicado al polímero previo a la actividad microbiana para obtener mejores resultados de enriquecimiento y colonización del material. Los resultados de los cambios morfológicos del polímero se analizaron mediante microscopia electrónica de barrido antes y después del tiempo estimado para el proceso [34].

Figura 14.

Perfil de mineralización de películas de LDPE puro irradiadas con y sin luz UV.

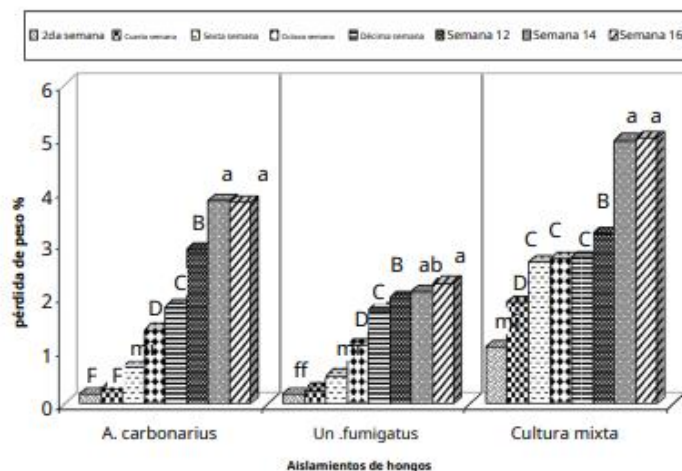


Nota. La figura representa la mineralización del cultivo mixto estudiado en las láminas de polietileno de baja densidad al cabo de 126 días con y sin luz UV, (SP: suelo sin tratamiento UV; SUP: suelo con tratamiento UV; SMP: suelo con microorganismo sin tratamiento UV; SMUP: suelo con microorganismo sin tratamiento UV). Tomado de: A, Esmaeili, A.A, Pourbabae, H.A, Alikhani, F, Shabani, & Esmaeili, E. “Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in soil”. *Plos one*, vol 8, no 9, September 2013.

Otra investigación del efecto de cultivos mixtos sobre la degradación de LDPE fue la realizada por M, El-Sayed, H, Rabie y E, Hamed, utilizando un cultivo mixto de *Aspergillus carbonarius* y *Aspergillus fumigatus*, mostrando una alta eficacia en la biodegradación de LDPE. El polímero fue tratado previamente por tratamiento térmico y tratamiento químico e irradiación gamma. Posteriormente cada tratamiento se incubó a 30°C con agitación continua a 120 rpm midiendo la pérdida de peso de las láminas cada dos semanas por un periodo de 16 semanas como se evidencia en la Figura 15, dando como resultado un porcentaje de biodegradación de 39,10% para tratamiento térmico, 17,76% para tratamiento químico y 5,79% para irradiación gamma con un pH de 7,50, demostrando así la eficacia del proceso de biodegradación llevado a cabo por cultivo mixto [35].

Figura 15.

% de pérdida de peso de las hojas de LDPE incubadas en 16 semanas por cultivo mixto.



Nota. La figura representa el comportamiento de cada uno de los microorganismos *Aspergillus carbonarius* y *fumigatus* por separado y por cultivo mixto incubados hasta 16 semanas. Tomado de: M. T, El-Sayed, G. H, Rabie, & E. A, Hamed. “Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) using the mixed culture of *Aspergillus carbonarius* and *A. fumigates*”. *Environment, Development and Sustainability*, pp. 1-29, january 2021.

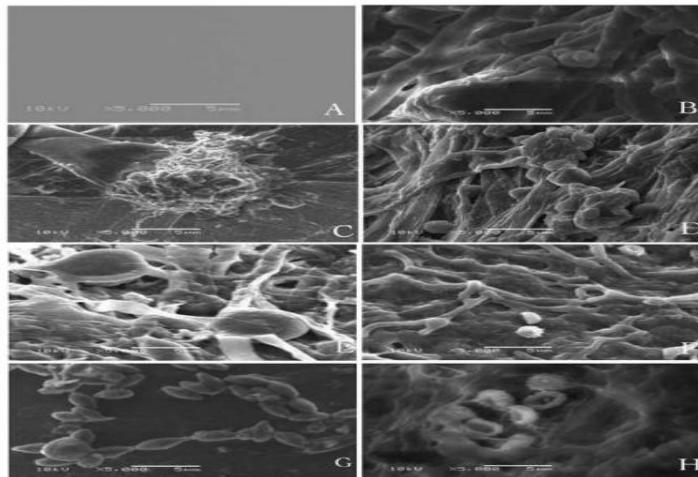
2.2.1.iii Degradación in vitro. Esta matriz se caracteriza por la implementación de los microorganismos obtenidos de cultivo vegetal, hojas o residuos y escombros, conocido como material contaminado, esta recolección es sometida a extracción del microorganismo presente en

cada uno de ellos, identificándolos y separándolos en cajas de Petri o tubos de ensayo para ser incubados y así mismo poder llevar a cabo el proceso de biodegradación [36] [37].

Una de las investigaciones realizadas por degradación *in vitro* fue enfocada en la recolección de sedimentos y escombros presentes en las aguas de Arabia Saudita presentado por F, Ameen, M, Moslem, S, Hadi y A, Al-Sabri, el cual se desarrolló por cuatro semanas en agitación de 100 rpm a 30°C mediado por *Aspergillus* y *Penicillium* principalmente. Luego de ese tiempo se realizaron pruebas de cuantificación para identificar la biodegradabilidad del polietileno de baja densidad a través de ensayos de actividad enzimática, microscopia electrónica de barrido y microscopia óptica de película, demostrando que los hongos en condiciones aeróbicas descomponen enzimáticamente cadenas de polímeros en diferentes tamaños con la generación de fracciones de masa baja, dióxido de carbono y agua, dando como resultado la biodegradación del LDPE bajo pruebas de campo con la alteración de la estructura morfológica del material con ayuda del análisis SEM como se evidencia en la Figura 16 [36].

Figura 16.

Resultados análisis SEM por degradación in vitro.



Nota. La figura representa los resultados obtenidos de la biodegradación de LDPE por degradación *in vitro* (A) antes del tratamiento mostrando superficie lisa y limpia y (BH) después de co-cultivo con hongos al cabo de 4 semanas. Tomado de: F, Ameen, M, Moslem, S, Hadi, & A. E, Al-Sabri. “Biodegradation of Low Density Polyethylene (LDPE) by Mangrove fungi from the red sea coast”. *Progress in Rubber Plastics and Recycling Technology*, vol 31, no 2, pp. 125-143, march 2015.

De igual modo, se identifica otro estudio realizado por J. P. Guerrero Cabrera, abordando la recolección de muestras de hojas, suelos, vegetales y frutas cítricas en el campus de la Universidad Nacional Agraria para ser usados en el proceso in vitro de biodegradación de LDPE mediado por *Pleurotus ostreatus*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium italicum* y *Pycnoporus sanguineus*, mostrando aceptación al plástico por parte de las especies fúngicas como fuente de carbono y producción enzimática al cabo de 4 meses [37].

Para llevar a cabo la biodegradación se desarrollaron 3 repeticiones para cada tratamiento en condiciones controladas en el tiempo inicial del proceso terminando a los 46 días, obteniendo la diferencia de peso inicial y final del material, dando como resultado el peso degradado como se evidencia en la Tabla 5 para cada una de las especies fúngicas estudiadas [37].

Tabla 5.

Prueba piloto de la aplicación de microorganismos fúngicos en degradación in vitro.

Microorganismos Fúngicos	Prueba Piloto			
	HDPE		LDPE	
	Peso Perdido		Peso Perdido	
	g	%	g	%
<i>Aspergillus flavus</i>	0,0006	0,87%	0,0008	0,63%
<i>Aspergillus niger</i>	0,0001	0,14%	0,0002	0,17%
<i>Penicillium italicum</i>	0,0013	1,89%	0,0014	0,90%
<i>Fusarium culmorum</i>	0,0023	2,85%	0,0028	1,83%
<i>Pycnoporus sanguineus</i>	0,0017	2,16%	0,0022	1,73%
<i>Pleurotus ostreatus</i>	0,0000	0,00%	0,0000	0,00%

Nota. La tabla representa los resultados obtenidos en la prueba piloto (46 días) en la biodegradación del LDPE y HDPE por degradación in vitro a partir de la aplicación de microorganismos fúngicos. Tomado de: J. P.C., Guerrero Cabrera. “Aplicación de microorganismos fúngicos para la degradación “in vitro”, de polímeros sintéticos a nivel laboratorio, Lima-2020”, tesis pre. Facultad de ingeniería y arquitectura, Universidad Cesar Vallejo, Lima, Perú, 2020. [en línea]. Disponible en: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/54839>

Como se evidencia en la Tabla 5 el proceso de biodegradación in vitro da como resultado el uso del LDPE como fuente de carbono mediado por los microorganismos mencionados anteriormente, los cuales gracias a los resultados obtenidos por el análisis SEM, se obtuvo un porcentaje de biodegradación de *Aspergillus niger* de 0,17% y 0,63% con *Aspergillus flavus* en la primera prueba

(46 días), mostrando formación de hifas en la superficie del LDPE, adicionalmente se evaluó la biodegradación de *Aspergillus sp* durante 3 meses con ayuda de rayos gammas viendo un porcentaje del 3% con la formación de hifas y micelios sobre la superficie del plástico [37], evidenciando así la viabilidad de este método para la degradación del material.

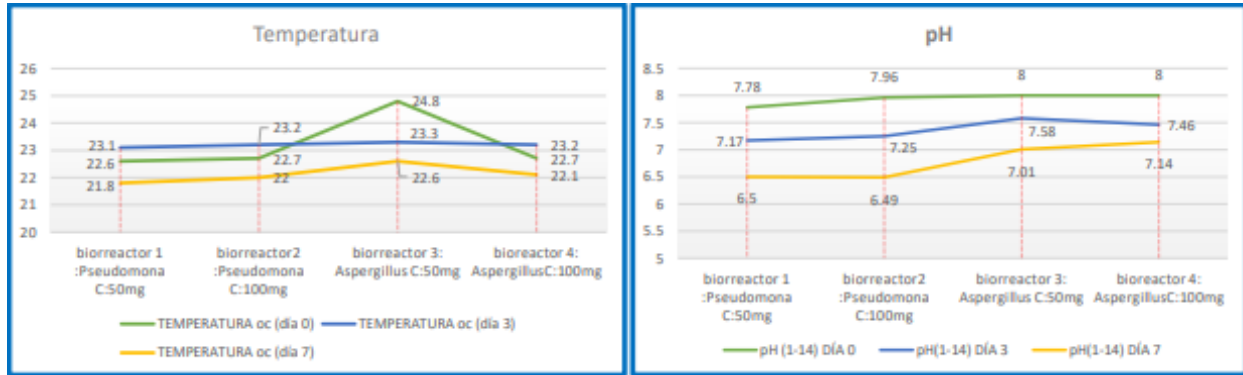
2.2.1.iv Fermentación líquida sumergida. El proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida, está mediado por una fase líquida (medio de cultivo), una fase sólida (biomasa/LDPE) y una fase gaseosa (aire/CO₂), en mezcla al interior de un biorreactor. Este sistema, permite diseño ingenieril y puesta en marcha de reacciones biológicas en relación a las condiciones de operación “con el fin de monitorear, controlar y optimizar el rendimiento” [38].

La biodegradación en fermentación líquida sumergida, se efectúa en un biorreactor o serie de biorreactores, siendo este conocido como “un aparato con forma de cámara para el cultivo de microorganismos, como bacterias, hongos y levaduras, que se puede utilizar para la producción de metabolitos biomoleculares o biopolímeros o para la conversión de desechos orgánicos” [38], en un menor tiempo de proceso que los demás procesos de biodegradación ya que el control de las variables es más estricto y riguroso para que el microorganismo pueda llevar su etapa exponencial a cabalidad, determinando la biodegradabilidad del polímero industrial teniendo a consideración las variables de operación (temperatura y pH) evidenciado en la Figura 17, las cuales deben estar constantes y controladas durante el proceso para que el medio de cultivo y el proceso no tenga contaminación cruzada [39].

A partir de esto la Universidad César Vallejo utiliza en sus estudios la biodegradación del LDPE en un biorreactor *airlift* considerando las variables mencionadas anteriormente, utilizando como microorganismos *Aspergillus niger* y *Aspergillus brasiliensis*, dando como resultado un porcentaje de biodegradación de 6,90% en 10 días y 7% en 7 días respectivamente [39] [40].

Figura 17.

Medición de temperatura y pH en el proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida.



Nota. La figura representa el comportamiento de la temperatura y el pH en el proceso de biodegradación de LDPE en fermentación líquida sumergida. Tomado de: A. M., Hermoza Rojas. “Biodegradación microbiana de polietileno de baja densidad, bajo condiciones térmicas controladas en biorreactor air lift, en Santa Clara-Lima 2019”, tesis pre. Facultad de ingeniería y arquitectura. Universidad Cesar Vallejo, Lima, Perú, 2019. [en línea]. Disponible en: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/51943?locale-attribute=es>

Este método es conocido también como fermentación líquida sumergida o biodegradación en medio líquido bajo pretratamiento oxidativo del LDPE usando irradiación UV, seguido de un tratamiento a alta temperatura con ayuda de 18 cepas de levaduras y hongos, especialmente *Trichoderma hamatum* estudiado por K, Malachova, et.al en el año 2020, los cuales utilizaron cultivos aeróbicos en medio líquido determinando la capacidad de los microorganismos para biodegradar polímeros plásticos, los cultivos se incubaron a 28°C, pH promedio de 6,80 y aireado por difusión de aire. Después de dos meses el porcentaje de biodegradación obtenido fue de 0,50-1,30% presentando una leve disminución de la intensidad de su estructura a partir de los resultados obtenidos en análisis SEM y FTIR [41].

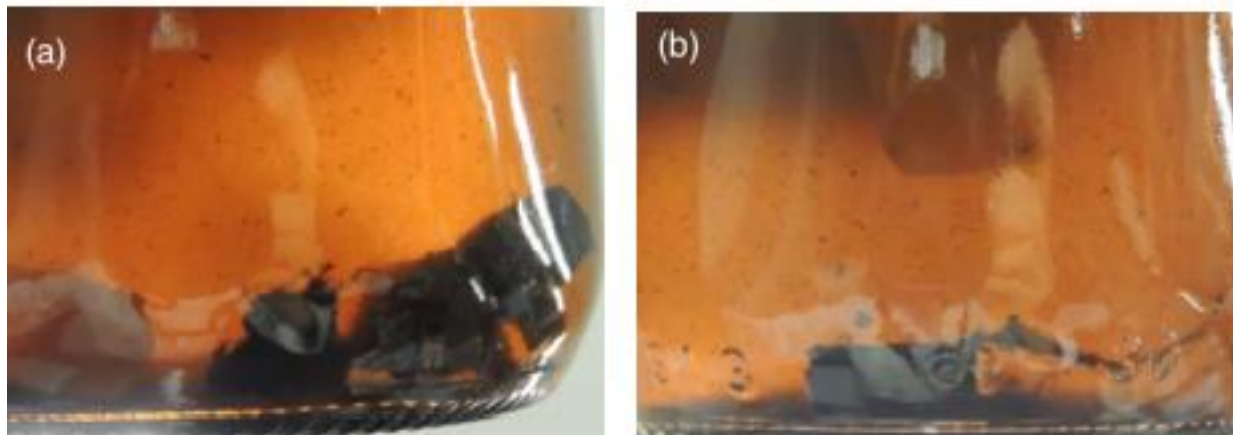
Adicionalmente, se evidencia la investigación llevada a cabo por M, Das, S, Kumar y J, Das, los cuales evaluaron el proceso de biodegradación del polietileno de baja densidad en medio de cultivo líquido aislando el microorganismo de un vertedero municipal de la India mediante la técnica de la placa de extensión utilizando sal mineral. El grado de biodegradación de LDPE se analizó mediante el seguimiento de los cambios en los parámetros fisicoquímicos como el pH estando neutro en lo posible en el proceso y la reducción de peso en un 17, 19 y 13% al cabo de 60 días mediado por el género *Aspergillus*, convirtiendo el polímero en moléculas simples al finalizar el proceso, acumulándose en el suelo como nutriente para favorecer el crecimiento de plantas [42].

Así mismo se afirma que los hongos son eficaces para la biodegradación del LDPE ya que producen enzimas degradantes y polímeros extracelulares como los polisacáridos, ayudando a colonizar la superficie del polímero, observado en el estudio realizado por J, Abraham, E, Ghosh, P, Mukherjee y A, Gajendiran, los cuales realizan el proceso en medio líquido en un agitador rotatorio a 120 rpm por un periodo de 90 días mediado por el género *Aspergillus*, los procedimientos analíticos llevados a cabo es el análisis AFM, GC- MS, FTIR y porcentaje de pérdida de peso, siendo este de 4,90%, presentando un crecimiento de la cantidad de biomasa producida por el microorganismo en presencia del material, lo que quiere decir que el LDPE actúa como fuente de carbono para potenciar el crecimiento dentro del biorreactor [43].

2.2.1.v Fotooxidación UV. Es uno de los procesos de biodegradación más utilizados a escala laboratorio y piloto para descomposición del material, en este se implementan herramientas como la irradiación por luz UV, el calor, es decir, someter al material a altas temperaturas y el tiempo transcurrido para obtener los resultados esperados. Para ello se pone a prueba las características y propiedades de *Aspergillus niger*, siendo objeto de investigación de D, Múnera Parra para el proceso de biodegradación del polietileno de baja densidad, el cual fue expuesto a rayos UV con longitud de onda de 254 nm por un tiempo de 13 horas. Posteriormente, se realizaron 5 montaje en *shaker* a 30°C y 150 rpm con las láminas en presencia y ausencia de irradiación, evidenciando los resultados morfológicos al cabo de 2 meses como se muestra en la Figura 18. Transcurrido ese tiempo se identificó la colonización del microorganismo en la superficie, así como también agrietamiento y pérdida de rugosidad en el material con la formación de biopelículas [18].

Figura 18.

Degradación de LDPE por fotooxidación UV.



Nota. La figura representa la degradación de LDPE dos meses después de la biodegradación sin exposición y con exposición a rayos UV. Tomado de: D.C., Múnera Parra. “Degradación del polietileno de baja densidad por *Aspergillus Niger*”, tesis pre. Facultad de ingeniería, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, 2014. [en línea]. Disponible en: <https://repositorio.uniandes.edu.co/flexpaper/handle/1992/16469/u686780.pdf?sequence=1&isAllowed=y#page=1>

De igual modo se evalúa la efectividad de *Thermomyces lanuginosus* en la degradación del polietileno de baja densidad capaz de soportar temperaturas de 60°C y temperatura óptima de crecimiento entre 45-50°C al ser sometido al efecto sinérgico del tratamiento UV, siendo objeto de investigación de A, Chaudhary, K, Chaitanya, R, Dalmia y RP, Vijayakumar, en el cual las láminas de LDPE fueron sometidas a luz UV por 7 días, luego se calentaron a 100°C durante una semana y después se sumergieron en ácido nítrico durante 7 días, al transcurrir ese tiempo se evaluó la caracterización del material en donde se evidenció una pérdida de peso de 9,21 +/- 0,84%, estiramiento simétrico y deformación por flexión del material, “el efecto combinado de los rayos UV y el calor dio como resultado la adición de más grupos funcionales en las películas de LDPE que surgieron debido a la oxidación de las películas con la generación de radicales libres de carbono en la cadena del polímero seguida de la absorción de oxígeno” [44].

2.2.1.vi Exposición directa del polímero en un cultivo microbiano. La biodegradación llevada a cabo por el método biológico enzimático es uno de los más utilizados a escala laboratorio seguido de la fotooxidación con UV, este proceso se basa en el contacto directo del material, en este caso el LDPE con el microorganismo, generalmente en la caja de Petri en el cual fue inoculado, con el fin de verificar la eficacia del método con la mineralización del material.

Tal es el caso de C, Muhonja, H, Makonde, G, Magoma, y M, Imbuga, los cuales usan los inóculos de cultivos fúngicos tales como el género *Aspergillus* para el proceso de biodegradación en un periodo de 16 semanas a 28°C en una incubadora con agitación, estando en contacto directo con el polietileno de baja densidad virgen gracias a la actividad enzimática del microorganismo, el grado de biodegradación de este proceso se determinó por análisis de pérdida de peso, espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, dando como resultado la “aparición de nuevos grupos funcionales atribuidos a la degradación de hidrocarburos después de la incubación”, teniendo una actividad degradativa de 36,40 +/- 5,53% sin embargo, para obtener mejores resultados se evidencia la necesidad de realizar un pretratamiento al material que pueda romper los enlaces y así mismo causar afectación en la estructura morfológica del mismo ya sea con luz UV o tratamiento térmico [45].

En esta matriz, el control del pH cobra gran importancia para la biodegradación del material, utilizando un medio de solución salina (0,85% de cloruro de sodio) en contacto directo con el microorganismo para la colonización del polímero, para este caso D, Uribe, D, Giraldo, S, Gutiérrez y F, Merino utilizan un filtro de membrana para llevar a cabo el método con un pH de 5,50 por un periodo de 60 días mediado por *Penicillium*, dando como resultado “el desarrollo de micelios sobre la superficie de las perlas de LDPE y la aparición de un posible ataque microbiano” con una reducción de peso de 4,80% [46]. Así mismo se identifica la veracidad del mismo microorganismo mencionado anteriormente aislado de la basura municipal, para ello S. K, Ghosh, y S, Pal utilizaron láminas de LDPE de 2,50 cm x 6,50 cm teniendo un peso inicial de 80 mg cada una, la cepa del cultivo fúngico se inoculó en crecimiento activo sin azúcar en tubos de ensayo en contacto directo con el material como se muestra en la Figura 19 para ser evaluadas a los 40, 80 y 150 días a 30°C, dando como resultado un potencial de biodegradación del 60,10 +/- 3,56 [47].

Figura 19.

Esfera de color negro o verdoso modificado con LDPE pre tratado después de 150 días por actividad enzimática.



Nota. La figura representa la degradación del LDPE a los 150 días de actividad enzimática. Tomado de: S. K, Ghosh, & S, Pal. “De-polymerization of LDPE plastic by *Penicillium simplicissimum* isolated from municipality garbage plastic and identified by ITSs locus of Rdna”. *Vegetos*, vol 34, no 1, pp. 57-67, January 2021.

De igual modo, el género *Penicillium* con las especies *Penicillium oxalicum* y *Penicillium chrysogenum*, resulta competente para la biodegradación del LDPE sometido a tratamiento con cultivo microbiano por análisis SEM, AFM y FTIR para evidenciar los cambios morfológicos del material al cabo de 90 días en optimización estadística, siendo objeto de investigación de N, Ojha, N, Pradhan, S, Singh, A, Barla, A, Shrivastava, P, Khatua y S, Bose, los cuales en comparación con los otros procesos usaron las composiciones y condiciones de crecimiento como el pH y la temperatura para ser modelados y analizar los resultados en el software Design Expert como punto de partida para la determinación de cultivos fúngicos y la degradación del material, el porcentaje de pérdida de peso se trató a los 30, 60 y 90 días de contacto del microorganismo con el material,

dando como resultado un porcentaje de 34,35% y “daños morfológicos como picaduras, surcos, grietas, rugosidad extensa debido a la formación de biofilm, surcos alrededor de las células fúngicas, fragilidad, fragmentaciones y erosión en la superficie de las láminas de LDPE” [23].

Por otro lado, se evidencia la efectividad de la especie *Aspergillus flavus* proveniente de compostaje, glucosa y manitol para el proceso de biodegradación, el cual I. O, Kunlere, O. E, Fagade, & B. I, Nwadike tritura el polietileno de baja densidad en gránulos pequeños para ser usados como fuente de carbono para el microorganismo, al tener el cultivo fúngico inoculado, se adicionaron a este los trozos del LDPE y se incubó a 37°C por un periodo de 6 semanas y medición diaria de su evolución, dando como resultado “que la pérdida de peso registrada en la muestra de LDPE biodegradables en el medio libre de carbono, fue mayor que la pérdida de peso en el medio libre de carbono y nitrógeno”, así como también la presencia de adherencias microbianas en la superficie y decoloración en las muestras [48].

Esta especie de microorganismo resulta favorable para procesos de biodegradación en contacto con tres tipos de plástico, teniendo como variable de respuesta la reducción de la masa del material en ensayos controlados con el control de variables externas y el aislamiento del hongo de un cultivo de maíz contaminado realizado por S. P, Santacoloma-Londoño, M. E, Buitrago-González, V, Lamus-Molina, S, Asprilla-Asprilla, J. E, Ruíz-Terán, L. C y Villegas-Méndez, los cuales agregaron a las cajas de Petri las láminas de LDPE y se incubaron por un periodo de 100 días a 25-28°C, al transcurrir ese tiempo se identificó un porcentaje de degradación de 23,60% y la mineralización del material [49].

De acuerdo con estudios relacionados con la biodegradación del LDPE, se identifican las especies del género *Aspergillus* por su eficacia en el comportamiento de la mineralización del material, en donde el *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* y *Aspergillus oryzae* demuestran una alta aceptación de las propiedades del material para ser descompuesto llevado a cabo por G. C, DSouza, R. S, Sheriff, V, Ullanat, A, Shrikrishna, A. V, Joshi, L, Hiremath, & K, Entoori, los cuales tratan previamente el polímero para romper las cadenas poliméricas de este por fotooxidación UV y tratamiento térmico, llevando a cabo el proceso de biodegradación mediante la actividad enzimática del microorganismo en donde el LDPE es triturado para ser usado como única fuente de carbono en los consorcios microbianos formados en las diferentes cajas de Petri como resultado

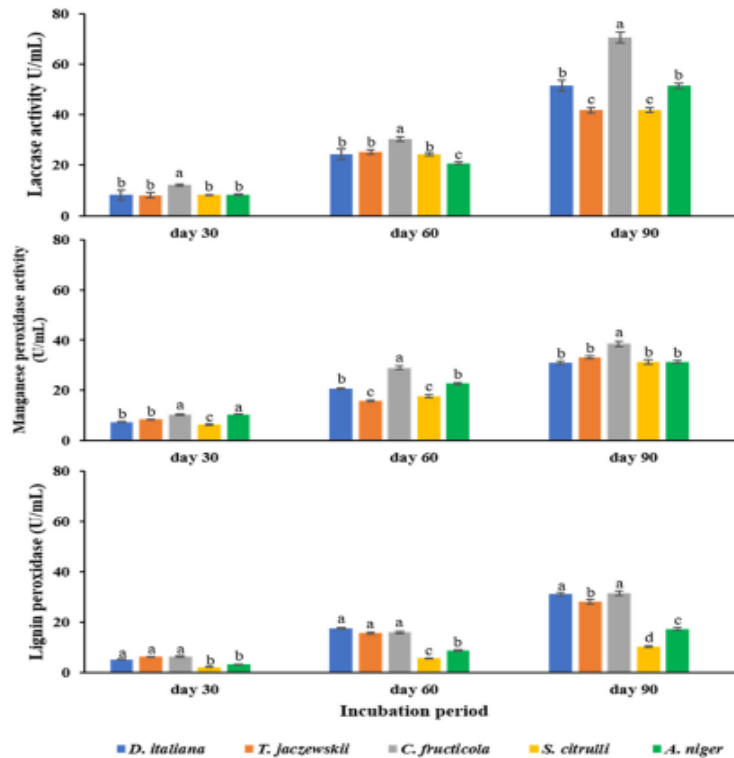
un porcentaje de pérdida de peso de 26,15% por un periodo de 55 días y deterioro de la estructura morfológica del material con la presencia de grietas y rupturas en la superficie [50].

Sin embargo, se ha evidenciado que no solo se puede usar para este proceso una cepa como microorganismo, sino también se puede ver la factibilidad de diferentes cultivos fúngicos para determinan que tan eficaces son en la degradación del material, tal es el caso de S, Khruengsai, T, Sripahco, y P, Pripdeevech que utilizan 30 especies de hongos para su estudio obtenidas de la recolección de cultivos y gránulos microplásticos del polímero de 5 mm tratado térmicamente a 180°C durante 5 minutos, el proceso de biodegradación es llevado a cabo en caldo medio de sal con tapones de agar en presencia del microorganismo principalmente *Aspergillus niger* a temperatura de 27°C por un periodo de 30, 60 y 90 días, dando como resultado un aumento de la actividad enzimática por las enzimas involucradas como las lipasas, lacasa y MnP a medida que transcurría el tiempo de incubación como se evidencia en la Figura 20, “nivel de degradación en la superficie de las películas de LDPE en forma de grietas, vástagos y agujeros”, lo que confirma que los cultivos fúngicos son efectivos para la descomposición del material usándolo como única fuente de carbono con un porcentaje de pérdida de peso entre 7,32 a 48,78% [51].

Y por último, se identifica la versatilidad de los cultivos fúngicos aislados de suelos y vertederos tales como *Trichoderma* y *Aspergillus* evaluado por E, Munir, et.al con el tratamiento de las láminas de LDPE en contacto directo con las cajas de Petri de los microorganismos mencionados anteriormente por un periodo de 45 días de incubación, obteniendo una pérdida de peso total de 5,13% [52] y la verificación de la cepa de *Trichoderma* por medio del potencial de los lignolíticos desarrollado por M, Hikmah, R, Setyaningsih, & A, Pangastuti, sembrado a temperatura ambiente por un periodo de 5, 15, 25 y 35 días en las cajas de Petri, dando como resultado un porcentaje de biodegradación de 4,87%, con cambios morfológicos en la estructura del LDPE [53].

Figura 20.

Actividad enzimática de diferentes cultivos fúngicos después de proceso de incubación.



Nota. La figura representa la actividad enzimática de los cultivos fúngicos seleccionados después de 30, 60 y 90 días de incubación. Tomado de: S, Khruengsai, T, Sripahco, & P, Pripdeevech. “Low-Density Polyethylene Film Biodegradation Potential by Fungal Species from Thailand”. *Journal of Fungi*, vol 7, no 8, 594, July 2021.

2.2.1.vii Pretratamiento plasmático. Otro proceso llevado a cabo para la biodegradación del LDPE es el pretratamiento plasmático, en el cual las láminas del polímero se ponen en contacto con un tratamiento secuencial con descarga luminiscente mediado por *Pleurotus ostratus*, para este proceso L. D, Gómez-Méndez, D. A, Moreno-Bayona, R. A, Poutou-Piñales, J. C, Salcedo-Reyes, A. M, Pedroza-Rodríguez, A, Vargas, y J. M, Bogoya evaluaron las actividades enzimáticas de la lignina peroxidasa presente en el proceso, la pérdida de peso del material siendo este de 88,72% por la colonización del microorganismo, aumento de la rugosidad en un 99,81% al cabo de 150 días, lo que determina que el uso de tratamiento plasmático es eficiente para el deterioro de las

propiedades del polímero en comparación del que no fue expuesto con un porcentaje de colonización de 45,55% [54].

2.2.1.viii Tratamiento con ácidos grasos tensoactivos. Con base en las propiedades químicas mencionadas en el capítulo I del polietileno de baja densidad, el polímero es susceptible al ser sometido a tratamientos químicos con ácidos tales como el ácido nítrico, provocando daños morfológicos y disminución en sus propiedades mecánicas, dicho tratamiento es el foco de investigación de igual manera por A, Chaudhary, K, Chaitanya, R, Dalmia y RP, Vijayakumar, el cual utiliza el ácido nítrico para evidenciar el resultado final del proceso de biodegradación, haciéndolo más rápido y eficaz, dando como resultado “cambios conformacionales en el polímero, reduciendo la estabilidad térmica del material” [44] debido al ataque proporcionado por el ácido, lo que ratifica que dicho proceso es determinante para disminuir los problemas ambientales causados por el material.

De igual manera, se estudian los efectos producidos en el proceso de biodegradación en presencia de otros ácidos a nivel industrial, tal es el caso del ácido palmítico, estudiado por V, Jayaprakash, & U. M. D, Palempalli mediado por *Aspergillus oryzae*, controlando condiciones de operación como el pH estando en un rango de 4-8, temperatura a 25°C y fuentes de carbono y nitrógeno tales como melaza, hidrolizado de papa, dextrosa, almidón y sacarosa principalmente. Este proceso da como resultado una pérdida de peso del material del 40% en 90 días después del tratamiento con el ácido graso tensoactivo junto con la caracterización del material a partir del análisis de microscopia de barrido, determinación del grado de absorción de agua y análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier, mostrando resultados positivos ya que la superficie del LDPE presentaba grietas, erosiones, pérdida de masa, desaparición de grupos funcionales y perturbaciones causadas por la actividad enzimática del microorganismo y el tratamiento químico al cual fue sometido [55].

2.2.1.ix Tratamiento de envejecimiento térmico. Este proceso consiste en sobrepasar las propiedades térmicas del polietileno de baja densidad para el rompimiento de las cadenas poliméricas del mismo, para este proceso se han utilizado diferentes microorganismos como por ejemplo las microalgas, demostrando una selectividad mayor para la colonización del material identificada como *Uronema* en el estudio realizado por E, Sanniyasi, R. K, Gopal, D. K,

Gunasekar, y P. P, Raj, “la microalga pura y aislada se sometió a tratamiento con una hoja de LDPE en medio de cultivo BBM, después de 30 días de incubación, la hoja de LDPE fue colonizada completamente por microalga” visualizando estructuras verdes y daños morfológicos tales como grietas, abrasiones y erosiones en la superficie del material, realizando el proceso de biodegradación a tratamiento térmico del polímero a 240°C [56].

Por otro lado, se identificó el comportamiento de cultivos fúngicos tales como *Rhizopus oryzae*, siendo capaz de adherirse al polímero y utilizarlo como fuente de carbono, usado por S, Awasthi, N, Srivastava, T, Singh, D, Tiwary, y P. K, Mishra para el tratamiento térmico del LDPE, para ello las películas se colocaron en un horno caliente a 70°C durante 10 días antes de ser adicionadas en medio líquido, el cual contenía caldo dextrosa a un pH de 7 y 37°C con agitación continua a 120 rpm por un periodo de 1 mes con ayuda de discos del microorganismo activos, transcurrido este tiempo las láminas se someten nuevamente a tratamiento a 45°C, dando como resultado un porcentaje de biodegradación entre 3,50 y el 8,40% [57].

Así mismo se evalúan las especies *Aspergillus* y *Penicillium* para el proceso de biodegradación, en el cual S, Ávila Jaramillo y E, Morán Peñafiel ponen a prueba las características y propiedades de estos microorganismos, siendo sometidas las láminas de LDPE a temperaturas elevadas de 121°C obteniendo una adhesión en los extremos del polímero, posteriormente el material fue colocado en los medios de cultivo por un periodo de 60 y 90 días, dando como resultado un porcentaje de biodegradación de 28,30% [58]. De igual modo L, Espinosa Arias desarrolla el proceso de biodegradación por envejecimiento térmico mediado por estos microorganismos, en el cual el polietileno fue sometido a 121°C por 20 minutos en autoclave y luego a una cámara de secado a 30°C por 48 horas, registrando el cambio de peso para cada una de las láminas estudiadas sin evidencia de cambios significativos en su composición química, siendo necesario la implementación de la actividad enzimática para la descomposición, dando como resultado un porcentaje de biodegradación media de 0,99 +/- 0,11% durante 90 días [30].

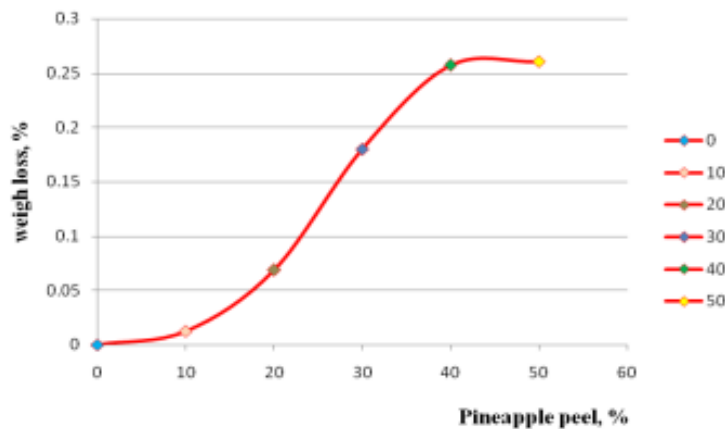
2.2.1.x Tratamiento por biocompuestos y fitogenética. Para efectuar el tratamiento por biocompuestos, se toman en consideración las propiedades de las frutas para la biodegradación ya que estas proporcionan la fuente de carbono necesaria para que el microorganismo pueda utilizar

los contenidos de celulosa para desarrollarse y así mismo poder realizar la mineralización del material.

Tal es el caso del estudio realizado por R. R, Ali, et, al usan la fibra de la cáscara de piña para estudios de biodegradación. Esta fibra es sometida a tratamientos químicos para la eliminación de contaminantes y secadas a 50°C para exponerlas al LDPE y enterrarlas en el suelo por un mes; transcurrido ese tiempo “el 10% de carga de fibra no muestra cambios significativos en su peso en comparación a la expuesta en el material, reduciendo la absorción de agua por la unión interfacial”, observando que las propiedades mecánicas del LDPE disminuyeron en presencia de la fibra de la fruta, siendo la celulosa la fuente en la cual se genera estabilidad entre los enlaces. En la Figura 21 se puede observar la degradación del polímero con un contenido de fibra entre el 10 y el 50% en donde el microorganismo presente en el suelo reconoce las fuentes de carbono y las usa para degradar el material, provocando una fractura de la cadena del material y pérdida de peso entre 0,15 a 0,27 [59].

Figura 21.

% de pérdida de peso de biocompuestos para análisis de hongos.



Nota. La figura representa la relación directamente proporcional del contenido de fibra con respecto a la pérdida de peso del LDPE por biocompuestos. Tomado de: R. R, Ali, A. W. A, Rahman, R. M, Kasmani, N, Ibrahim, H, Hasbullah, A. N, Sadikin, & E, Abouzari. “Pineapple peel fibre biocomposite: Characterization and biodegradation studies”. *Chemical engineering transactions*, vol 56, pp. 1333-1338, 2017.

Así mismo se identifica el tratamiento fitogenético con la caracterización molecular de cultivos fúngicos pertenecientes de vertederos, en el cual C, Ndahebwa, et. al, utiliza la extracción de genes de ADN mediado por el género *Aspergillus* para la producción de la enzima lacasa a una temperatura entre 20-40°C y un pH de 7. Dichos genes fueron establecidos por proceso fitogenético, tratando genéticamente el microorganismo para la degradación del LDPE y deteriorar su estructura, dando como resultado una eficacia en el proceso en biorremediación a partir de la expresión de alcano hidroxilasa [60].

2.3 Cultivos fúngicos que favorecen el proceso de biodegradación

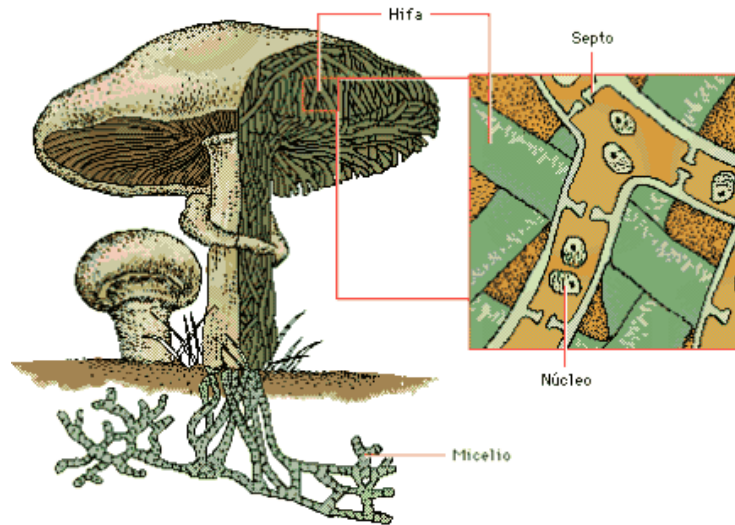
“El reino de los hongos está conformado por organismos eucariotas, heterótrofos que poseen diversidad de estructuras, funciones, formas de crecimiento y estilos de vida”, presentando características excepcionales que los distinguen de los demás seres vivos, trayendo consigo problemas o beneficios en la actividad humana en relación con la aplicación a la cual van dirigidos [61].

“Estos organismos son fundamentales en la degradación de la materia orgánica, en los flujos de nutrientes y en diferentes tipos de simbiosis; se desarrollan preferiblemente en lugares húmedos y oscuros y no necesitan de la luz para sobrevivir” [62], conocidos por ser por su aspecto polvoriento y aterciopelado, siendo microorganismos aerobios estrictos y con tolerancia a condiciones de operación a las cuales son sometidos, sus colores característicos son el blanco, verde, amarillo y negro principalmente. [63] [62].

“Los hongos son organismos que tienen un núcleo definido y que poseen características similares a las plantas y animales. Sin embargo, están conformados por órganos como hojas, raíces, corazón o pulmones. Sus células son largas y al alinearse unas con otras forman filamentos denominados hifas, estas se entrelazan en una masa similar al algodón llamada micelio denominados filamentosos” [61] como se evidencia en la Figura 22, pero también pueden ser formados por una sola célula como es el caso de las levaduras.

Figura 22.

Características morfológicas de los hongos filamentosos.



Nota. La figura representa la morfología de los hongos filamentosos con la identificación de las hifas, micelio, núcleo y septo. Tomado de: J, Cuevas. “Los hongos: Héroes y villanos de la prosperidad humana”, *revista digital universitaria*, vol. 17, no. 9, pp. 1-12, september 2016. Available: <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num9/art69/art69.pdf>

2.3.1 *Aspergillus*

Dentro de la variedad de géneros de cultivos fúngicos utilizados en el proceso de biodegradación se encuentra el género *Aspergillus*, el cual con base en las características morfológicas que este posee puede descomponer el material de 1-8% aproximadamente, dentro de este género, las especies con mayor interés de estudio son: *Aspergillus brasiliensis*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus nonius* y *Aspergillus oryzae*. Este género es el más utilizado para el proceso de biodegradación gracias a su versatilidad y crecimiento en diferentes matrices tales como compostaje, fermentación líquida sumergida y cultivos mixtos, logrando la mineralización del material.

2.3.1.i *Aspergillus brasiliensis*. Es un hongo filamentosos hialino ubicuo, presentando en su estructura hifas, característica principal de los microorganismos de reproducción sexual con la conformación de ascosporas en su interior y asexual con la presencia de conidios, esta especie de *Aspergillus* se diferencia de las demás “en cuanto a su tamaño, tasa de crecimiento, textura y color de la colonia siendo estos de color blancas/amarillentas a negras que se dispersan fácilmente en el

medio ambiente” [64], adicionalmente “se caracteriza por ser termotolerante a las diferentes variaciones de temperatura desde el calor extremo hasta el congelamiento” [65].

2.3.1.ii *Aspergillus carbonarius*. Esta especie de *Aspergillus* es conocida por ser el mayor contaminante de frutas, en especial las uvas, gracias a sus propiedades en producción de aflatoxinas, este cultivo fúngico se diferencia de los demás por la formación de conidios bien elaborados, teniendo la facilidad de trasladarse y adaptarse a las propiedades del cultivo a las cuales estas sean sometidas, siendo valioso para la degradación de polietileno de baja densidad usándolo como única fuente de nutrientes para su crecimiento [66] [35].

2.3.1.iii *Aspergillus flavus*. Se caracteriza por ser de color verde amarillento, polvorosa y aterciopelada con la formación rápida de las colonias entre los 3 y 5 días a 28°C [58], “presentan un micelio septado, macrosifona, hialino, ramificado, con conidióforos cenocíticos largos” [49].

2.3.1.iv *Aspergillus fumigatus*. Se caracteriza por tener colonias de color verde con un halo micelar blanco rodeando la colonia, al ser observadas en el microscopio “se observan hifas de nutrición tabicadas de 2 a 4 μm de diámetro e hifas reproductivas casi siempre cenocíticas de 4-6 μm que terminan en las clásicas cabezas aspergilaes, presentando conidióforos cortos (20-30 μm), que terminan con una vesícula ligeramente alargada” [58], este microorganismo crece a 28°C de 3 a 5 días, siendo competente para la degradación de polietileno de baja densidad usándolo como única fuente de nutrientes para su crecimiento [58] [35].

2.3.1.v *Aspergillus niger*. Es una de las especies de *Aspergillus* con mayor abundancia en el ambiente, siendo utilizado en diferentes aplicaciones por sus características y propiedades, gracias al crecimiento de sus colonias desarrolladas con rapidez, presentando en su estructura colonias planas, crecen a 28°C. Al ser observado este microorganismo en el microscopio “se observan hifas tabicadas de 2,40 μm de diámetro (de nutrición); las hifas reproductivas son más anchas, de 4-8 μm , terminando con las cabezas aspergilaes de 80-200 μm de diámetro, compuestas por conidióforos cenocíticos largos de 100-200 μm y vesículas redondas de 25-100 μm de diámetro” [58].

2.3.1.vi *Aspergillus nonius*. Es una especie de color verde productora de metabolitos secundarios denominados aflatoxinas, está presente en los suelos, siendo un contaminante de alimentos y cultivos, usado en la degradación de materiales [66] [52].

2.3.1.vii *Aspergillus oryzae*. Esta especie está presente en los cultivos de papa con un pH óptimo de crecimiento entre 4 a 8 y temperatura de 28°C, es usado en la biodegradación de materiales y en procesos de fermentación, utilizando la melaza y la harina de soja como fuentes de carbono para su crecimiento [55].

2.3.2 *Penicillium*

Las especies pertenecientes al género *Penicillium* están disponibles en el entorno, principalmente en el suelo, vegetación y el aire con la producción de micotoxinas, las colonias que este microorganismo posee en su estructura es de color pálido o amarillento, en el cual el color de su estado joven es blanco y al ser maduro se vuelve de color verde azulado hasta rosado [58].

2.3.3 *Pleurotus ostreatus*

Este hongo es conocido por ser comestible y cultivable, con alto contenido de proteínas y minerales para ser usado en la industria alimenticia, “entre sus características principales está su crecimiento y color, siendo lo más distintivo el color crema y gris, su cutícula es enroscada cuando el hongo es joven, pero al madurar se observa fino y ondulado, respecto a las láminas son de color claro, el pie se confunde muchas veces con el color de la materia prima donde creció y la carne del hongo es firme y blanca” [67].

2.3.4 *Rhizopus oryzae*

Esta especie de cultivo fúngico juega un papel importante en la biorremediación, siendo versátil y determinante para la degradación de lignocelulosas y metabolismo del mismo, está presente en los cultivos de papa con la producción de lipasa, tirosinasa, peroxidasa y lacasa y sus esporas e hifas son de color blanco a verde [57].

2.3.5 *Trichoderma viride*

Esta especie de cultivo fúngico es eficaz en la biodegradación de polietileno de baja densidad con la producción biosintética de la enzima lacasa, el cual degrada efluentes industriales textiles por medio de la biorremediación, este microorganismo es biofungicida conocido como “la enfermedad del moho verde de los hongos, degradando tanto la quitina (hongos) como la celulosa (madera) utilizadas como fuente de carbono” [68].

2.4 Métodos de caracterización y análisis para la biodegradación de LDPE

2.4.1 Análisis Termogravimétrico (TGA)

El análisis termogravimétrico “mide la masa (pérdida o ganancia) de una muestra cuando esta es sometida a un programa controlado de temperatura, por esta técnica puede determinarse el porcentaje de pérdida de peso por descomposición, deshidratación, pérdida de disolvente, pérdida de plastificante, estabilidad térmica u oxidativa, descarboxilación, pirolisis, porcentaje de aditivos, entre otros” [69].

2.4.2 Cromatografía de Permeación en Gel (GPC)

“Es un tipo de cromatografía sólido-líquido que separa los polímeros polidispersos en fracciones por tamizado mediante un gel de poliestireno con enlaces cruzados u otro de características semejantes”, utiliza estudios de materiales con altos cizallamiento en el peso molecular y ramificación de sus propiedades químicas a partir de la degradación térmico o de por fotooxidación [24].

2.4.3 Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)

La espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier “es un método de análisis químico cuyo fundamento es la interacción de la radiación infrarroja con la materia. El espectrofotómetro es un equipo que direccionan un haz de radiación de dicha frecuencia hacia la muestra a analizar, esta absorbe cierta radiación, mientras que la porción restante la atraviesa”, es utilizada para determinar y cuantificar compuestos químicos, graficando la absorbancia en relación con la frecuencia del material estudiado a través de picos [30].

2.4.4 Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)

“Es una técnica de medida superficial que se basa en la interacción de una punta con la superficie de la muestra. Esta técnica permite el análisis superficial de muestras con resolución manométrica o incluso atómica. Como principal ventaja tiene la posibilidad de hacer medidas sin ningún tratamiento previo de la muestra a medir, sin la presencia de vacío” [70].

2.4.5 Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)

La microscopia electrónica de barrido, “es un método de análisis que enfoca un haz de electrones de alta intensidad sobre una muestra sólida para generar una variedad de señales en su superficie. La reacción entre estos electrones y la muestra analizada rebelan información acerca de la misma, como su morfología externa, estructura cristalina y orientación de sus componentes”, dando como resultado una imagen bidimensional del material analizado [30].

2.4.6 Pérdida de peso del material

Es la caracterización de la biodegradación de materiales más implementada, en la cual se mide el peso inicial del polímero antes de cualquier tratamiento químico, térmico o biológico y al cabo del tiempo estimado de deterioro se mide el peso final del mismo, la diferencia entre estos pesos será la pérdida de peso degradado.

De acuerdo con los procesos de biodegradación mediados por hongos, se evidencia la Tabla 6 con la recopilación de la información con base en los parámetros tomados en cuenta tales como temperatura, humedad, pH o fuentes de carbono y los resultados morfológicos y de biodegradación obtenidos en cada uno de ellos.

Tabla 6.

Procesos de biodegradación de LDPE mediados por hongos.

Proceso de biodegradación	Parámetros	Valor	Cultivos fúngicos	Duración del proceso	Resultados	Fuente
Compostaje	Fuentes de carbono	Cáscaras de plátano, papa, zanahoria, lechuga, tomate, lulo, mango, trozos de cartón, hojas de papel sin tinta, hojas y ramas de arboles secos	<i>Aspergillus niger</i>	30 días	Porcentaje de biodegradación de 4,84% con la colonización del hongo en lámina de LDPE [32]	[31][33]
	Humedad	64-82				
	pH	6,14 - 7,14				
	Temperatura	20 a 30°C				
	Fuentes de carbono	Astillas, madera, henos, paja	198 comunidades fúngicas para su estudio	NR	Adaptación y utilización del LDPE como fuente de carbono	[32]
Cultivo mixto	Fuentes de carbono	Suelo de vertederos	<i>Aspergillus niger</i> y <i>Lysinibacillus sp</i>	126 días	Porcentaje de biodegradación de 29,50% y 15,80% en presencia y ausencia de luz UV	[34]
	pH	6 a 8				
	Temperatura	30°C				
	Fuentes de carbono	Suelo de vertedero	<i>Aspergillus carbonarius</i> y <i>Aspergillus fumigatus</i>	16 semanas	Porcentaje de biodegradación de 39,10%, 17,76% y 5,79%	[35]
	pH	7,50				
Degradación in vitro	Temperatura	30°C	<i>Aspergillus</i> y <i>Penicillium</i>	cuatro semanas	Alteración de la estructura morfológica del LDPE con ayuda de análisis SEM	[36]
	Temperatura	28-30°C	<i>Aspergillus flavus</i> y <i>Aspergillus niger</i> , principalmente	4 meses	Formación de hifas en la superficie del LDPE con un porcentaje de 0,14 y 0,63% respectivamente	[37]
Fermentación líquida sumergida	Temperatura	Temperatura ambiente	<i>Aspergillus niger</i> y <i>Aspergillus brasiliensis</i>	10 días y 7 días	Porcentaje de degradación de 6,90% y 7% respectivamente	[39] [40]
	pH	5 a 6				
	Temperatura	28°C	<i>Trichoderma hamatum</i>	2 meses	Porcentaje de biodegradación de 0,15-1,30% con leve disminución de la intensidad en la estructura del LDPE	[41]
	pH	6,80				
Fotooxidación UV	Temperatura	30°C	<i>Aspergillus niger</i>	2 meses	Colonización del microorganismo en la superficie, agrietamiento y pérdida de rugosidad en el material	[18]
	Revoluciones	150 rpm				
	Temperatura	45-50°C	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1 mes aprox.	Pérdida de peso de 9,21 +/- 0,84%, estiramiento simétrico y deformación por flexión del material	[44]

Tabla 6. Continuación

Exposición directa del polímero en un cultivo microbiano	Temperatura	28°C	<i>Aspergillus</i>	16 semanas	Actividad degradativa de 36,40 +/- 5,53%, aparición de grietas, vástagos y agujeros en la superficie del material y cambios en la morfología de su estructura	[45] [48] [49] [50] [51]
	Temperatura	30°C		40, 80 y 150 días	Degradación del 6,10 +/- 3,56	[47]
	pH	5,50	<i>Penicillium</i>	60 días	Desarrollo de micelas sobre la superficie de las perlas de LDPE con una reducción de peso de 4,80%, daños estructurales como picaduras, surcos, grietas y rugosidad del material	[46] [23]
Pretratamiento plasmático	Temperatura	NR	<i>Pleurotus ostreatus</i>	150 días	Pérdida de peso del 88,72% por la colonización del microorganismo y aumento de rugosidad del 99,81%	[54]
Tratamiento con ácidos grasos tensoactivos	Ácido graso	ácido nítrico	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	1 mes aprox.	Pérdida de peso de 9,21 +/- 0,84%, estiramiento simétrico y deformación por flexión del material	[44]
	Temperatura	45-50°C				
	Ácido graso	Ácido palmítico	<i>Aspergillus oryzae</i>	90 días	La superficie del LDPE presenta grietas, erosiones, pérdida de masa, desaparición de grupos funcionales y perturbaciones	[55]
	Temperatura	25°C				
Tratamiento de envejecimiento térmico	pH	4 a 8				
	Temperatura	45°C	<i>Rhizopus oryzae</i>	1 mes	Porcentaje de biodegradación entre 3,50 y 8,40%	[57]
	pH	7				
Tratamiento por biocompuesto y fitogenética	Temperatura	121°C	<i>Aspergillus y Penicillium</i>	60 y 90 días	Porcentaje de biodegradación de 28,30% y de 0,99 +/- 0,11%.	[58] [31]
	Biocompuesto	Fibra	NR	NR	Fractura de la cadena del material y pérdida de peso entre 0,15 a 0,27	[59]
	pH	7	<i>Aspergillus</i>	NR	Proceso de biodegradación efectivo con la expresión de la alcano hidroxilasa	[60]
	Temperatura	20-40°C				

Nota. Esta tabla recopila los diferentes procesos de biodegradación de LDPE mediados por hongos mostrados en la literatura.

Como se puede evidenciar en la Tabla 6 se han implementado diferentes procesos para la biodegradación del polietileno de baja densidad utilizando residuos sólidos orgánicos tales como astillas, madera, paja o cáscara de plátano, papa, lechuga, suelos de vertedero, entre otros, usados en el compostaje y cultivo mixto con la presencia de una o varias cepas de microorganismos. Así mismo se identifican procesos tales como la degradación in vitro y fermentación líquida sumergida llevados a cabo de 1 a 4 meses con el control de variables de proceso tales como el pH y la temperatura, permitiendo el crecimiento exponencial del microorganismo y degradar el material con cambios en su estructura y colonización en su superficie.

En cuanto a procesos con tratamiento térmico se encuentra la fotooxidación UV y el tratamiento de envejecimiento térmico, con el fin de romper las cadenas y ramificaciones poliméricas del LDPE a partir de sus propiedades térmicas, exponiendo el mismo a radiación UV y temperaturas de 121°C para su deterioro y biodegradación del mismo en presencia de microorganismos al cabo de 1 a 3 meses.

Por último, se encuentran los procesos con exposición directa del polímero en un cultivo microbiano, pretratamiento plasmático, tratamiento por biocompuesto y fitogénica con el contacto directo del microorganismo con el LDPE como fuente de carbono y los procesos químicos con el tratamiento con ácidos grasos tensoactivos como el ácido nítrico y el ácido palmítico para llevar a cabo el proceso de biodegradación del material con el deterioro de sus propiedades químicas y mecánicas.

Por tal motivo, al evaluar los procesos mencionadas anteriormente se elige para este estudio el método de biodegradación ex situ en fermentación líquida sumergida para llenar los vacíos presentes en este tipo de biodegradación, brindando un punto de partida importante para posteriores investigaciones en esta área a partir de un modelo de desarrollo ingenieril de un biorreactor a escala laboratorio.

Teniendo en cuenta la identificación de los procesos térmicos, químicos y biológicos para la degradación de LDPE se toma como caso de estudio la biodegradación por fermentación líquida sumergida para el control y verificación de las variables y condiciones como la aireación, temperatura (20-22°C) y pH (5 a 6), para que el microorganismo pueda desarrollarse y crecer utilizando el LDPE como fuente de carbono. En relación con lo mencionado anteriormente sobre

los cultivos fúngicos que favorecen el proceso de biodegradación, se muestra en la Tabla 7 una recopilación sobre las características principales de los mismos.

Tabla 7.

Características principales cultivos fúngicos presentes en el proceso de biodegradación de LDPE.

Cultivos Fúngicos	Características principales
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	Sus colonias son de color blancas/amarillentas a negras, dispersándose en el ambiente, siendo termotolerante a variaciones de temperatura [64] [65].
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Mayor contaminante de frutas (uvas) por la producción de aflatoxinas, formación de conidios bien elaborados, con la facilidad de raslarse y adaptarse de acuerdo a la aplicación [66] [35].
<i>Aspergillus flavus</i>	Sus colonias son de color verde amarillento, polvorosa y aterciopelada, presentan un micelio septado con conidióforos cenocíticos largos [58] [49].
<i>Aspergillus fumigatus</i>	Sus colonias son de color verde con un halo micelar blanco rodeando la colonia, con hifas de nutrición de 2 a 4 μm de diámetro e hifas reproductivas de 4 a 6 μm [58] [35].
<i>Aspergillus niger</i>	Sus colonias se desarrollan con rapidez, con colonias planas con hifas de nutrición de 2,40 μm e hifas reproductivas de 4 a 8 μm [58].
<i>Aspergillus nomius</i>	Sus colonias son de color verde productora de metabolitos secundarios denominadas aflotoxinas, está presente en los suelos, alimentos y cultivos [66] [52].
<i>Aspergillus oryzae</i>	Es usado en la biodegradación de materiales y proceso de fermentación, utilizando la melaza y la harina de soja para su crecimiento [55].
<i>Penicillium</i>	Sus colonias son de color pálido o amarillento, siendo blancos cuando jóvenes y de color verde azulado hasta rosado en su madurez, está presente en el suelo, vegetación y el aire [58].
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Es un hongo comestible y cultivable, siendo sus colonias de color crema y gris, su retícula es enroscada cuando es joven pero al madurar el fino y ondulado [67].
<i>Rhizopus oryzae</i>	Sus hifas y esporas son de color blanco a verde importantes en los procesos de biorremediación [57].
<i>Trichoderma viride</i>	Es conocido como la enfermedad del moho verde de los hongos, productor de la enzima lacasa para degradar eficazmente efluentes industriales textiles y materiales [68].

Nota. Esta tabla recopila las diferentes especies y géneros de los cultivos fúngicos para degradar el LDPE mostrados en la literatura.

Los microorganismos, en especial los cultivos fúngicos, resultan eficaces para el proceso de biodegradación gracias a su rápido crecimiento y actividad enzimática para descomponer el

polietileno de baja densidad y usarlo como fuente de carbono para su desarrollo, es allí donde el género *Aspergillus* toma la delantera estando presente en el entorno, cultivos contaminados y vegetación, los cuales al ser detectados fácilmente son capaces de alterar las propiedades químicas, físicas y mecánicas del material con la formación de grietas y la colonización del mismo, es por ello que para el estudio a desarrollar se selecciona como microorganismo mediador del proceso el *Aspergillus brasiliensis*, gracias a la versatilidad que este posee para degradar el LDPE en el proceso de biodegradación seleccionado, siendo este la fermentación líquida sumergida y por su robusta estructura, la cual será profundizada más adelante.

Finalmente se recopila la información en la Tabla 8 sobre los análisis de caracterización para evaluar la biodegradación del LDPE, los cuales brindan un acercamiento del deterioro morfológico del mismo, evidencian los cambios físicos por la colonización llevada a cabo por el microorganismo.

Tabla 8.

Métodos de caracterización y análisis de la biodegradación del LDPE.

Métodos de caracterización y análisis	Características principales
Análisis Termogravimétrico (TGA)	Determina la pérdida o ganancia de masa de la muestra analizada sometida a un cambio de temperatura [69].
Cromatografía de Permeación de Gel (GPC)	Separa los polímeros polidispersos en fracciones por tamizado, utilizando altos cizallamientos en el peso molecular y propiedades químicas del material [24].
Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier (FTIR)	Método de análisis químico por interacción infrarroja con la materia, graficando la absorbancia en relación con la frecuencia del material estudiado a través de picos [31].
Microscopia de Fuerza Atómica (AFM)	Método basado en la interacción de una punta con la superficie de la muestra, realizando un análisis superficial del mismo sin la presencia de vacío [70].
Microscopia Electrónica de Barrido (SEM)	Método que enfoca un haz de electrones de alta intensidad sobre una muestra sólida, analizando su morfología, estructura cristalina y orientación de sus componentes [31].
Pérdida de peso del material	Determina el porcentaje de biodegradación con el peso inicial del material sin haber sido tratado térmica, química y biológicamente y el peso final después del proceso.

Nota. Esta tabla recopila los métodos de caracterización y análisis de la biodegradación de LDPE mostrados en la literatura.

Con el fin de identificar el material al finalizar el proceso de biodegradación se realizarán en este estudio análisis de caracterización como lo son: Porcentaje de pérdida de peso, microscopia electrónica de barrido (SEM) y análisis de espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR).

3. CONDICIONES DE OPERACIÓN QUE FAVORECEN LA BIODEGRADACIÓN DEL LDPE EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA SUMERGIDA

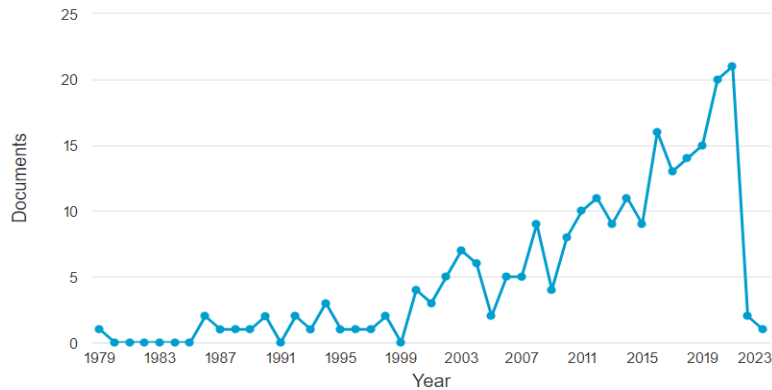
Para llevar a cabo el proceso de biodegradación del polietileno de baja densidad se toma en consideración el proceso en fermentación líquida sumergida, es por ello que en este apartado se estudiarán las diferentes condiciones de operación que favorecen el crecimiento del microorganismo con base en la elección del medio de cultivo líquido y variables como humedad, temperatura, pH, aireación, contenido de azúcares, entre otros, para que el cultivo fúngico pueda utilizar el LDPE como única fuente de carbono para su desarrollo.

3.1 Análisis bibliométrico

Para identificar las condiciones de operación que favorecen la biodegradación del LDPE en fermentación líquida sumergida, fue necesario el uso de análisis bibliográfico en el cual se revisaron un total de 229 documentos con ayuda de herramientas de bibliometría tales como: Mendeley, Scopus, Refworks, Legible y Nube de palabras, con el fin de recopilar la información relevante para llevar a cabo el estudio. En primer lugar, se agruparon los documentos relacionados con biodegradación de LDPE en medio líquido obtenidos por año como se evidencia en la Figura 23, así mismo en la Figura 24 se muestran los tipos de documentos con mayor porcentaje y en la Figura 25 los documentos relevantes con base al área de investigación de los mismos. A ecuación de búsqueda usada para la ejecución del análisis bibliométrico realizado en enero del 2022 fue: “Biodegradation AND fungi AND liquid OR submerged AND fermentation”

Figura 23.

Documentos por año biodegradación en fermentación líquida sumergida.

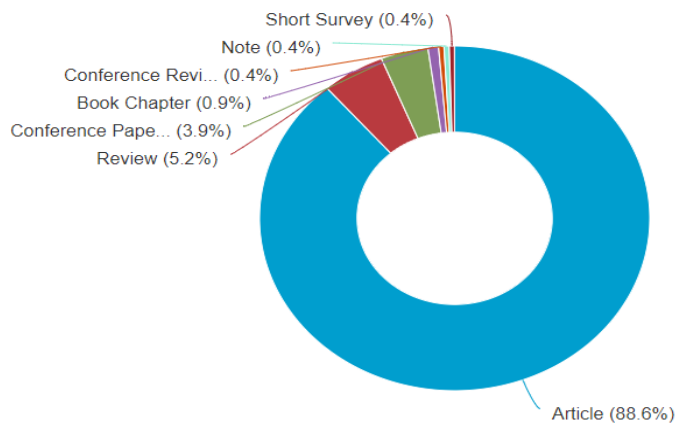


Nota. Esta figura representa el número de documentos publicados por año biodegradación en fermentación líquida sumergida del LDPE. Tomado de: Scopus. (2022). Documentos por año biodegradación en fermentación líquida sumergida [en línea]. Disponible en: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=afc284b02fd83d142f00cbb48137c113&origin=resultslist&src=s&s=%28TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+AND+fungi+AND+liquid+OR+submerged+AND+fermentation%29%29&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=82&count=231&analyzeResults=Analyze+results&txGid=1f76fe00f02bfa89c523a92deb9245e9>

Como se evidencia en la Figura 23, la mayor cantidad de publicaciones se efectuó en los años 2020 y 2021 con un total de 20 y 21 documentos respectivamente, adicionalmente para el año 2022 se han publicado un total de 2 artículos, indicando que el tema de estudio en cuestión es de gran interés para la comunidad científica al utilizar cultivos fúngicos en fermentación líquida sumergida, llegando a ser un proceso de biodegradación innovador para el control, medición y verificación de las condiciones de operación.

Figura 24.

Documentos por tipo biodegradación en fermentación líquida sumergida.

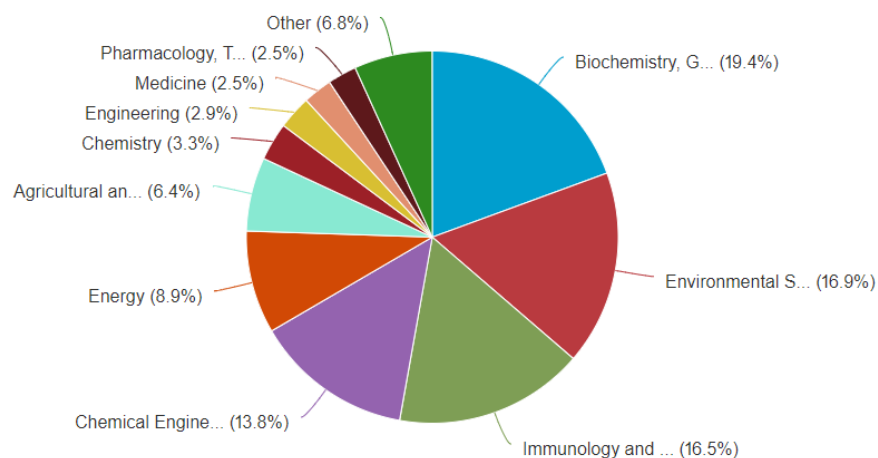


Nota. Esta figura representa el porcentaje de documentos publicados por tipo en biodegradación en fermentación líquida sumergida del LDPE. Tomado de: Scopus. (2022). Documentos por tipo biodegradación en fermentación líquida sumergida [en línea]. Disponible en: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=afc284b02fd83d142f00cbb48137c113&origin=resultlist&src=s&s=%28TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+AND+fungi+AND+liquid+OR+submerged+AND+fermentation%29%29&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=82&count=231&analyzeResults=Analyze+results&txGid=1f76fe00f02bfa89c523a92deb9245e9>

En la Figura 24 se evidencia que, dentro del análisis encontrado, los tipos de documentos más relevantes corresponden a artículos en un 88,60%, seguido de 5,20% a artículos de revisión y 3,90% a conferencias, póster y ponencias.

Figura 25.

Documentos por área de investigación biodegradación en fermentación líquida sumergida.



Nota. Esta figura representa el porcentaje de documentos publicados por área de investigación en biodegradación en fermentación líquida sumergida del LDPE. Tomado de: Scopus. (2022). Documentos por año biodegradación en fermentación líquida sumergida [en línea]. Disponible en: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=afc284b02fd83d142f00cbb48137c113&origin=resultlist&src=s&s=%28TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+AND+fungi+AND+liquid+OR+submerged+AND+fermentation%29%29&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=82&count=231&analyzeResults=Analyze+results&txGid=1f76fe00f02bfa89c523a92deb9245e9>

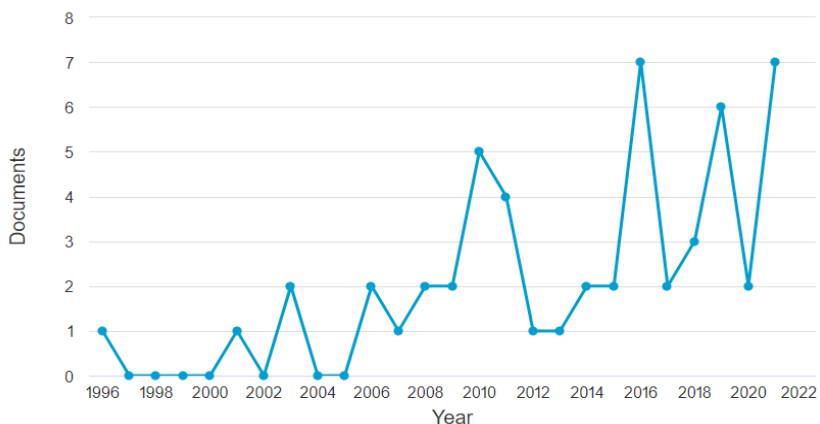
En la Figura 25 se evidencia que el 19,40% corresponden al área de bioquímica, 16,90% en ciencia del medio ambiente, 16,50% en microbiología, 13,80% en ingeniería química, 8,90% en energía, 6,40% en agricultura y los documentos restantes se encuentran enfocados en química, ingeniería, medicina y farmacología.

A partir de los análisis realizados anteriormente, se efectúa un segundo análisis bibliométrico con la misma base de datos tomada en cuenta anteriormente con un total de 229 documentos, los cuales se agruparon con base en los documentos relacionados con condiciones de operación de cultivos fúngicos en fermentación líquida sumergida en la biodegradación de polímeros obtenidos por año como se evidencia en la Figura 26. Así mismo en la Figura 27 se muestran los tipos de documentos con mayor porcentaje y en la Figura 28 los documentos

relevantes con base al área de investigación de los mismos. La ecuación de búsqueda usada para la ejecución del análisis bibliométrico fue: “Biodegradation AND fungi AND liquid OR submerged AND fermentation AND polymer”

Figura 26.

Documentos por año condiciones de operación cultivos fúngicos.

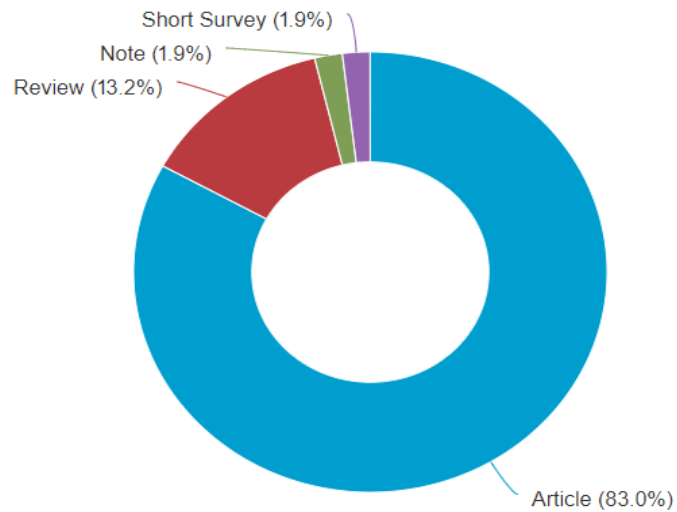


Nota. Esta figura representa el número de documentos publicados por año condiciones de operación cultivos fúngicos. Tomado de: Scopus. (2022). Documentos por año condiciones de operación cultivos fúngicos [en línea]. Disponible en: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=1a1c9dba101525d780481366f4a1b4a2&origin=resultslist&src=s&s=%28TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+AND+fungi+AND+liquid+OR+submerged+AND+fermentation%29%29+AND+%28polymer%29&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=96&count=54&analyzeResults=Analyze+results&txGid=52f6d0b6e16eefc83ad6b6fe9bc4abba>

Como se evidencia en la Figura 26, desde el año 2016 se ha evidenciado un incremento en las investigaciones correspondientes a biodegradación de polímeros, dentro de estos años se destacan el 2019 con un total de 6 documentos y el año 2021 con un total de 7 documentos de las 53 documentaciones encontradas en la segunda búsqueda.

Figura 27.

Documentos por tipo condiciones de operación cultivos fúngicos.

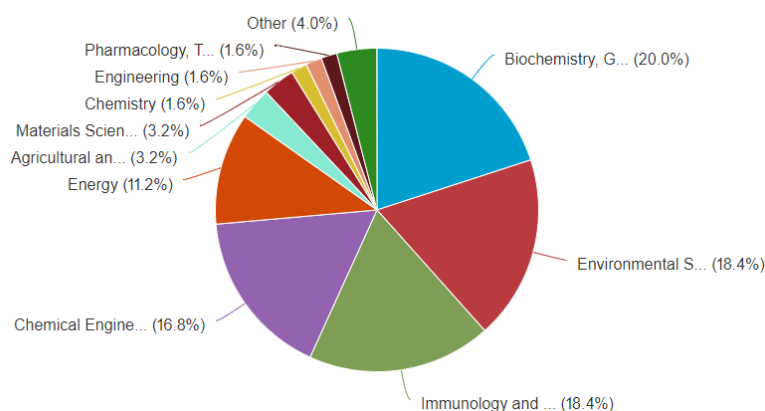


Nota. Esta figura representa el porcentaje de documentos publicados por tipo condiciones de operación cultivos fúngicos. Tomado de: Scopus. (2022). Documentos por tipo condiciones de operación cultivos fúngicos [en línea]. Disponible en: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=1a1c9dba101525d780481366f4a1b4a2&origin=resultslist&src=s&s=%28TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+AND+fungi+AND+liquid+OR+submerged+AND+fermentation%29%29+AND+%28polymer%29&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=96&count=54&analyzeResults=Analyze+results&txGid=52f6d0b6e16eefc83ad6b6fe9bc4abba>

En la Figura 27 se evidencia que el 83,00% de los documentos revisados son artículos, seguido de un 13,20% en artículos de revisión y el 1,90% restante pertenece a notas y resúmenes.

Figura 28.

Documentos por área de investigación condiciones de operación cultivos fúngicos.



Nota. Esta figura representa el porcentaje de documentos publicados por área de investigación condiciones de operación cultivos fúngicos. Tomado de: Scopus. (2022). Documentos por área condiciones de operación cultivos fúngicos [en línea]. Disponible en: <https://www-scopus-com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=1a1c9dba101525d780481366f4a1b4a2&origin=resultlist&src=s&s=%28TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+AND+fungi+AND+liquid+OR+submerged+AND+fermentation%29%29+AND+%28polymer%29&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=96&count=54&analyzeResults=Analyze+results&txGid=52f6d0b6e16eefc83ad6b6fe9bc4abba>

com.ezproxy.uamerica.edu.co/term/analyzer.uri?sid=1a1c9dba101525d780481366f4a1b4a2&origin=resultlist&src=s&s=%28TITLE-ABS-KEY%28biodegradation+AND+fungi+AND+liquid+OR+submerged+AND+fermentation%29%29+AND+%28polymer%29&sort=plf-f&sdt=a&sot=a&sl=96&count=54&analyzeResults=Analyze+results&txGid=52f6d0b6e16eefc83ad6b6fe9bc4abba

En la Figura 28 se puede evidenciar que el 20,00% de los documentos pertenece al área de bioquímica, genética y biología molecular, seguido de un 18,40% en ciencias ambientales, 18,40% a microbiología, 16,80% en ingeniería química, 11,20% en energía y el restante pertenece a agricultura, ciencia de los materiales, química, ingeniería y farmacología.

A partir del análisis obtenido, se evidencian los países destacados en la biodegradación de polímeros en donde China e India lideran con 9 documentos cada uno, Estados Unidos con 7, Brasil e Italia con 5 cada uno, España y Suiza con 4 cada uno, Canadá y México con 3 documentos y por último Colombia con 2 documentos, lo que demuestra que aunque la mayoría de publicaciones se encuentren en Asia o Europa, Colombia ha tomado la iniciativa

de no quedarse atrás, buscando alternativas para la minimización de la contaminación ambiental al implementar estudios en la biodegradación de polímeros.

Entre los autores con más publicaciones se destacan Lennartsson y Taherzadeh con un total de 3 documentos publicados en revistas especializadas en gestión ambiental y tecnología bioambiental, los cuales han trabajado en colaboración en investigaciones de biorrefinería de residuos y combinación de fermentación sumergida y en estado sólido para la biodegradación de materiales.

Teniendo en cuenta los análisis anteriores se usarán los documentos publicados más recientes con base en la Figura 26, siendo estos los publicados desde el año 2019 al 2021, los documentos con mayor número de citas y los capítulos de libro, siendo fundamentales para el estudio de cultivos fúngicos, con un total de 15 artículos seleccionados.

3.2 Condiciones de operación

Para determinar el crecimiento del microorganismo en el proceso de biodegradación del LDPE en fermentación líquida sumergida, es necesario estudiar las condiciones y variables de operación tales como medio de cultivo, pH, temperatura, aireación, contenido de azúcares y humedad.

3.2.1 Medio de Cultivo

“Los hongos crecen mejor en hábitats oscuros y húmedos, pero se encuentran donde hay materia orgánica disponible. Para su crecimiento es necesario carbohidratos como fuente de carbono, sobre todo glucosa, sacarosa, maltosa, nitrógeno (proteínas o sales de hidrógeno) y agua” [71], la mayoría de los cultivos fúngicos tienen respiración aeróbica o anaerobios facultativos o estrictos, son heterótrofos desde el punto de vista metabólico y versátiles produciendo metabolitos primarios y secundarios desde el punto de vista bioquímico [72].

Para el crecimiento de hongos filamentosos se debe tener en cuenta el uso de medios de cultivos líquidos o sólidos que contengan las fuentes de carbono mencionadas anteriormente para el crecimiento dentro o sobre el microorganismo usado en el proceso, con el fin de sintetizar su materia celular, generar energía a partir de biomasa o en este caso biodegradar

materiales. El medio de cultivo generalmente consiste en “sales orgánicas, (macro elementos y micro elementos), una fuente de energía (generalmente un azúcar), complementos orgánicos (principalmente vitaminas y fuente de nitrógeno reducido), reguladores de crecimiento y gelificantes” [72].

Los medios de cultivo usados para el crecimiento de cultivos fúngicos son el extracto de malta usado en el aislamiento, detección y numeración de la cepa, Agar czapek-dox usado para multiplicar cepas de hongos, levaduras y bacterias pertenecientes de residuos orgánicos y suelos conteniendo principalmente sacarosa y nitrato como fuente de carbono y crecimiento, caldo C. Czapek usando nitrato sódico y sacarosa como fuente de nitrógeno y carbono respectivamente para el crecimiento de especies provenientes de *Aspergillus* [72].

Así mismo se evidencia que el medio de cultivo Sabouraud Dextrosa Agar es determinante para el crecimiento de hongos filamentosos en estado sólido con un pH de 5,60 aproximadamente a temperatura ambiente, conteniendo peptona como fuente de nitrógeno, glucosa como fuente de azúcar, agar, dextrosa como fuente de energía y cloranfenicol como antibiótico con efecto inhibidor para bacterias Gram positivas y negativas [73], este cultivo se usa principalmente para el crecimiento de la cepa en cajas de Petri para su determinación, numeración y colonización.

De igual modo se identifica el Caldo Sabouraud Dextrosa, versátil para el crecimiento de cultivos fúngicos, con un alto porcentaje de dextrosa (20 g/L) como fuente de carbono y energía, mezcla de peptona (10 g/L) como fuente de nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos, con un pH ácido aproximadamente de 5,60 +/- 0,20 aproximadamente, presentando para el *Aspergillus brasiliensis*, un buen crecimiento y turbidez a temperatura ambiente al utilizar este medio de cultivo [74], este al ser un polvo fino de color beige requerirá en su preparación la cantidad de gramos de acuerdo con el proveedor, en este caso se toma como referencia el caldo del proveedor Condalab en el cual “se toman 30 g del medio en un litro de agua destilada, mezclar bien y disolver con calor y agitación frecuente” [74].

Los medios de cultivo necesarios para el proceso de biodegradación deben contener azúcares: definidos como carbohidratos caracterizados por “compuestos orgánicos que contienen carbono, hidrógeno y oxígeno” [75] divididos en monosacáridos como la glucosa, fructosa y

galactosa, disacáridos como la sacarosa, lactosa y manosa y polisacáridos como el almidón, glucógeno y celulosa [75].

Para ello se identifican las dos clases de azúcares existentes en la naturaleza. En primer lugar, se encuentran los azúcares reductores los cuales, “son aquellos que poseen un grupo carbonilo (grupo funcional) intacto” [76], en este grupo se encuentran la glucosa, fructosa, maltosa, galactosa, lactosa y manosa, mientras que en los azúcares no reductores se encuentran la sacarosa al no poseer un grupo carbonilo libre. Los azúcares reductores son fundamentales en la medicina para determinar la disminución de enzimas intestinales, la industria láctea en donde la lactosa es su azúcar fundamental [76]. Los azúcares reductores están presentes en el medio de cultivo Sabouraud Dextrosa.

Por otro lado, las hexosas o los azúcares fermentables son aquellos provenientes del sector alimenticio presentes en las frutas, frutos secos, vegetales o en fermentaciones de cerveza y vino, conteniendo en gran proporción fructosa y glucosa proveniente de la uva, responsables del grado alcohólico final y dióxido de carbono de estos procesos [77].

Algunos análisis para medir el comportamiento de nutrientes presentes en el biorreactor son los Grados Brix y la prueba de contenido de azúcares reductores (análisis cualitativos como la prueba de Tollens o Fehling y análisis cuantitativo con análisis de HPLC y espectroscopia con el método del DNS), para conocer la cantidad de polisacáridos presentes en el medio de cultivo, conociendo de igual manera sí el cultivo fúngico seleccionado para realizar la biodegradación utiliza la estructura morfológica del LDPE como fuente de carbono para su crecimiento exponencial dentro del proceso.

Así mismo se mide el comportamiento reológico del caldo de cultivo, mostrando en algunos casos “un comportamiento no newtoniano de adelgazamiento por cizallamiento altamente viscoso”, teniendo una influencia en la morfología, estructura de las células del microorganismo, rendimiento del proceso efectuado en el biorreactor en “procesos de mezcla, transferencia de calor y masa”, en la biomasa producida ya que en algunas ocasiones esta al estar adherida en las paredes del biorreactor puede alterar el rendimiento, la cinética del proceso [78] y la optimización de los componentes presentes en el medio para la producción y biodegradación del material en relación al aumento de la concentración de

glucosa como fuente de carbono y la reducción de metabolitos al efectuar el proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida [79] [80].

Como se mencionó anteriormente, el medio de cultivo para llevar a cabo el proceso resulta efectivo para el crecimiento de cultivos fúngicos con el control del pH y la temperatura en el proceso en relación a la fuente de carbono, para ello se debe evaluar en el medio de cultivo la actividad enzimática a diferentes condiciones de crecimiento con el fin de conocer cuáles son las condiciones y conversión del producto de interés, utilizando la glucosa como fuente de carbono y consumo de energía para ser usados en procesos industriales [81] [83].

3.2.2 pH

El cambio de pH a lo largo del proceso es una de las condiciones que más afecta el crecimiento del microorganismo que va a mediar la biodegradación, para ello es necesario el monitoreo continuo y su ajuste en caso de no estar en las condiciones adecuadas (4 a 6) [78], efectuando una solución ácida con ácido acético glacial al estar el pH con un valor mayor a 6 o una solución básica con hidróxido de sodio al estar el pH con un valor menor a 5.

Para los cultivos fúngicos, el pH adecuado es de 4 a 6, siendo 5,60 a 6 en donde se obtiene el crecimiento exponencial del microorganismo [72] [79] [84], este valor puede manejarse al seleccionar un medio de cultivo que cumpla con los requisitos de desarrollo, es decir, sí se necesita en medio sólido o en medio líquido al realizar el proceso de fermentación en un biorreactor, para ello puede usarse Sabouraud Dextrosa Agar o caldo Sabouraud Dextrosa respectivamente, los cuales se describieron anteriormente.

3.2.3 Temperatura

La temperatura a la cual opera el proceso de fermentación líquida sumergida debe considerarse con base en el microorganismo que se va a utilizar para la biodegradación del LDPE, siendo esta en la mayoría de los casos entre 0 y 55°C clasificado de la siguiente manera: “Psicrófilos: los que se desarrollan entre 0 y 20°C; temperatura alrededor de 15 y 17°C; mesófilos: con amplio rango de crecimiento: 0 a 50°C, rango óptimo entre 15 y 40°C y los termófilos que tienen su rango de crecimiento entre 20 y 50°C” [71].

Sin embargo, se ha demostrado que los cultivos fúngicos eficaces en el proceso de biodegradación son los que pertenecen a la clasificación mesófilas, creciendo a una temperatura entre 25°C a los 7 días de incubación y siembra [80], 26°C en el biorreactor [81] y a temperatura ambiente, siendo determinante para el crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* [40], microorganismo seleccionado para llevar a cabo el proceso de biodegradación.

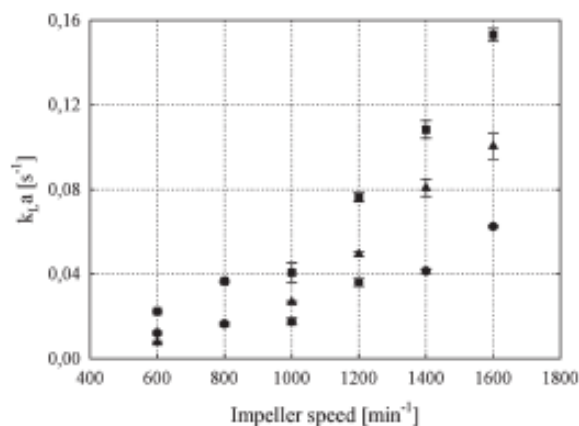
3.2.4 Aireación

Esta condición de operación se mide a partir del oxígeno disuelto dentro del biorreactor en escala laboratorio utilizando sensores ópticos con tiempos de retención para su verificación, algunos estudios demuestran que el método dinámico de sulfito es valioso para su control, añadiendo “una solución para consumir todo el oxígeno disuelto hasta que el valor baje a cero, después del agotamiento del sulfito, se controla la fase de saturación con la concentración de saturación de oxígeno en la entrada de gas” [78], para ello es necesario una salida de aire para que la presencia de dióxido de carbono no afecte el crecimiento del microorganismo y la presencia de una bomba de aire o un impulsor para generar agitación dentro del prototipo, teniendo una velocidad en la mayoría de los casos de 1200 min⁻¹ y flujo de gas de 1,50 Lmin⁻¹ o de 150, 180 a 200 rpm con agitación continua en *shaker* [78] [79] [81] [82].

“El suministro de oxígeno suficiente es crucial para la mayoría de los cultivos microbianos, por lo tanto, el coeficiente de transferencia de oxígeno del impulsor” en el biorreactor que lleva a cabo el proceso se puede medir en referencia a las condiciones normales de operación, siendo estas de 0.05 y 0.3 s⁻¹ como se observa en la Figura 29 donde el kLa (coeficiente de transferencia de oxígeno) es menor al aumentar el volumen de la reacción, esto se debe a que “el área de intercambio gas/líquido específica es más pequeña” [78].

Figura 29.

Coefficiente de transferencia de masa de oxígeno.



Nota. Esta figura representa el comportamiento del coeficiente de transferencia de masa en función con la velocidad de reacción del reactor. Tomado de: R, Hortsch, A, Stratmann, & D, Weuster-Botz. “New milliliter-scale stirred tank bioreactors for the cultivation of mycelium forming microorganisms”. *Biotechnology and bioengineering*, vol 106, no 3, pp. 443-451, February 2010.

Tomando en consideración lo anterior, para que la cantidad de oxígeno sea suficiente en el crecimiento de cultivos microbianos, es necesario aumentar la velocidad del impulsor o agitador con el suministro de gas central o aireación superficial durante el proceso de manera controlada y verificada para evitar daños mecánicos al microorganismo [78], con el fin de evidenciar su comportamiento en la velocidad de reacción del biorreactor y así mismo llevar a cabo el proceso de biodegradación de mejor manera.

Por otro lado, una de las diferencias entre la fermentación en estado sólido y la fermentación líquida sumergida, siendo este último el de mayor interés en la investigación, al desarrollarlo en una escala avanzada en la industria “la velocidad a la que se incorpora aire en el biorreactor se calcula en función de la cantidad de oxígeno demandada del microorganismo; las consideraciones de eliminación de calor no influyen en las decisiones sobre la tasa de aireación, logrando un buen control de temperatura haciendo circular agua fría o caliente a

través de camisas de agua y serpentines de enfriamiento, sin necesidad de suministrar o eliminar calor de la corriente de aire” [85].

3.2.5 Humedad

La humedad es una condición importante al realizar la fermentación líquida sumergida a escala industrial tomando como referencia la ubicación del biorreactor en el cual se va a realizar el proceso y la investigación, estableciendo en la mayoría de los casos una humedad relativa del 80%. Esta condición va a depender de: la altura de la columna del biorreactor, humedad de saturación con respecto al cambio de la temperatura del aire en el interior de la columna, la humedad real del aire conocida como humidificación y la humedad del lugar [85], con el fin de evitar alteraciones en el producto final o problemas corrosivos y abrasivos en el material y puesta en marcha del equipo.

Sin embargo, a escala laboratorio, siendo este el caso de interés en la investigación, es necesario para la biodegradación retirar la humedad presente en las láminas de LDPE al ser sometidas a secado a temperatura ambiente para conocer la pérdida de peso del mismo al finalizar el proceso. Así mismo para la determinación del peso seco de la biomasa usada como inóculo en el biorreactor, es necesario secar los tubos falcon para identificar la cantidad de células presentes. Y por último como se mencionó anteriormente, al ser este proceso a escala laboratorio, hay que tener en cuenta de igual modo la humedad del lugar a realizar el proyecto, al estar en Bogotá, la humedad relativa de este oscila entre 75-80%, lo que quiere decir, que al momento de efectuar este proceso a mayor escala, esta variable puede causar problemas al momento de diseñar el equipo, teniendo que usar materiales con resistencia a la corrosión y la abrasión para disminuir el costo operativo, obteniendo el producto final sin ninguna alteración en relación con el crecimiento del microorganismo y las partículas presentes en el medio.

3.2.6 Radiación

Esta condición no se puede aplicar directamente al proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida ya que puede matar los microorganismos que están presentes en el biorreactor al ser susceptibles a la luz UV, sin embargo se ha demostrado que al aplicarse directamente al material de interés antes y después de la actividad enzimática, puede

ocasionar ruptura y alteración en la cadena polimérica y las propiedades mecánicas del mismo con la “generación de radicales libres de carbono en la cadena del polímero seguida de la absorción de oxígeno, lo que da como resultado la formación de hidroperóxidos” [44].

Este tratamiento se puede llevar a cabo antes y después de la colonización del material para aumentar el grado de biodegradación esperado del mismo, mostrando pérdida de dureza y cambios morfológicos con ayuda de métodos de caracterización tales como análisis de microscopía de barrido o análisis de microscopía de fuerza atómica, demostrando así un desgaste y rugosidad del LDPE [18], sin embargo al utilizarse en menor cantidad y ser expuesto a fermentación líquida sumergida, la luz UV “no genera segmentos de polímero lo suficientemente pequeños como para solubilizarse en el medio de cultivo acuoso, ni la generación de grupos funcionales que potencian el ataque de hongos” [41].

A continuación, en la Tabla 9 se realiza un resumen sobre las condiciones de operación que favorecen el proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida mencionadas anteriormente.

Tabla 9.*Condiciones de operación que favorecen el proceso de fermentación líquida sumergida.*

Condiciones de operación	Características principales
Medio de Cultivo	Los hongos necesitan para su crecimiento fuentes de carbono como la glucosa, sacarosa, maltosa, fuentes de nitrógeno como proteínas y sales de hidrógeno, agua, sales orgánicas como lo son los macro y micro nutrientes y fuentes de energía como reguladores de crecimiento y gelificantes. Los medios de cultivo usados para el crecimiento exponencial de cultivos fúngicos son el extracto de maltosa, Agar czapek-dox, Agar Sabouraud Dextrosa, caldo C. Czapek, medios basales y caldo Sabouraud Dextrosa, teniendo este último un pH de 5,60 usando dextrosa como fuente de energía [71] [72] [73] [74] [78] [79] [80] [81] [83].
pH	El pH propicio para el crecimiento de cultivos fúngicos está entre 4 a 6, siendo 5,60 en donde se obtiene un crecimiento exponencial, si el pH se encuentra en un valor menor a 5 se ajusta con una solución básica de hidróxido de sodio y si el pH se encuentra en un valor mayor a 6 se ajusta con una solución ácida de ácido acético glacial [79] [72] [84].
Temperatura	Los cultivos fúngicos de clasificación mesófila se desarrollan en temperaturas de 0 a 50°C, siendo óptimo de 20 a 26°C para su crecimiento exponencial [71] [80] [81].
Aireación	Se mide a partir del oxígeno disuelto dentro del biorreactor, siendo crucial para el crecimiento de cultivos microbiano, teniendo agitación continua entre 150 a 200 rpm en shaker. Para que la cantidad de oxígeno sea la adecuada en el proceso, se debe aumentar la velocidad del impulsor o agitador con un suministro de gas central o aireación superficial a través de una bomba de aire [78] [79] [81] [82] [85].
Humedad	Al realizarse el proceso de fermentación líquida sumergida a escala industrial, se debe tener en cuenta la ubicación del biorreactor con una humedad relativa del 80%, dependiendo adicionalmente de la altura de la columna y la temperatura del aire. En escala laboratorio se debe retirar la humedad de las láminas después de la biodegradación y para la determinación del inóculo a adicionar en el biorreactor [85].
Radiación	Esta condición aunque no se lleva a cabo durante el proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida en el biorreactor, sí se puede efectuar antes y después de la colonización con el microorganismo con tratamiento de luz UV en el LDPE, con el fin de obtener un mejor resultado en la degradación con cambios físicos y mecánicos del material [44] [18] [41].

Nota. Esta tabla recopila las condiciones de operación que favorecen el proceso de biodegradación del LDPE en fermentación líquida sumergida mostrados en la literatura.

Como se puede evidenciar en la Tabla 9, las condiciones de operación que favorecen el desarrollo de la biodegradación del polietileno de baja densidad en fermentación líquida sumergida es la selección de la fuente de carbono, nitrógeno y nutrientes para que el microorganismo pueda crecer de manera adecuada, para esto se decide utilizar el Agar Sabouraud Dextrosa para la inoculación de *Aspergillus brasiliensis* en las cajas de Petri para su determinación e incubación, con el fin de propagar la biomasa en medio sólido y el caldo Sabouraud Dextrosa para la inoculación y desarrollo de la cepa en medio líquido como inóculo inicial para llevar a cabo la biodegradación, el cual presenta fuentes de carbono, nitrógeno y fuente de energía a un pH de 5,60 propicio para su crecimiento exponencial.

Así mismo se establece un pH entre el rango de 5 a 6 para que la biomasa usada en el proceso pueda desarrollarse adecuadamente para el crecimiento del hongo dentro del biorreactor a temperatura ambiente entre 20 a 25°C. Estas dos condiciones de operación son las de más importancia en la biodegradación, por tal motivo se van a verificar para evitar alteraciones y contaminación cruzada de otros microorganismos en el transcurso del proceso.

En cuanto a la aireación, al realizarse este proceso a escala laboratorio, como medio de aireación se usará una bomba de pecera suministrando una corriente de aire de 90L/h en todo el proceso con ayuda de una manguera al interior del biorreactor, de igual modo, habrá un orificio con por el cual pueda desplazarse el dióxido de carbono a causa de la colonización de *Aspergillus brasiliensis* en el material y la humedad será un factor determinante al momento de realizar los análisis del peso seco de la biomasa del microorganismo y la eliminación de microorganismos presentes en el medio de cultivo a usar.

Sin embargo, la radiación al ser una condición que favorece la biodegradación, esta no va a tenerse en cuenta en la biodegradación del LDPE en fermentación líquida sumergida ya que lo que se quiere es evidenciar la viabilidad de dicho proceso de forma independiente, es decir, adicionar el material y medir el peso inicial y final al transcurrir los 30 días de biodegradación, usando como fuente de carbono las propiedades y características fisicoquímicas del polímero y así degradarlo y alterar su morfología con la colonización del mismo.

4. PROCESO DE BIODEGRADACIÓN DEL LDPE EN FERMENTACIÓN LÍQUIDA SUMERGIDA MEDIADO POR *ASPERGILLUS BRAZILIENSIS*

En el presente capítulo se desarrolla un modelo de biodegradación ex situ del polietileno de baja densidad mediado por *Aspergillus brasiliensis* dividido en cuatro etapas: Acondicionamiento del microorganismo, ajuste del LDPE, proceso de biodegradación en biorreactor y por último análisis físicos y morfológicos para determinar el grado de biodegradación del polímero al cabo de 30 días en los laboratorios de la Fundación Universidad de América y el Tecnoparque del SENA.

4.1 Metodología para el acondicionamiento del microorganismo

Se seleccionó la especie *Aspergillus brasiliensis* para llevar a cabo este estudio como se mencionó anteriormente. Para ello, es necesario conocer su identificación, morfología y las condiciones de crecimiento para que su desarrollo se efectúe de manera satisfactoria, posteriormente se identificó la metodología de los diferentes procesos ejecutados en la investigación para inocular el microorganismo, su incubación, pureza y producción de biomasa del mismo para ser usada como inóculo para el biorreactor.

Adicionalmente se menciona el ajuste de las láminas de LDPE a usar para la biodegradación, el acondicionamiento del biorreactor y la determinación de azúcares por métodos cualitativos y cuantitativos.

4.1.1 *Aspergillus brasiliensis*

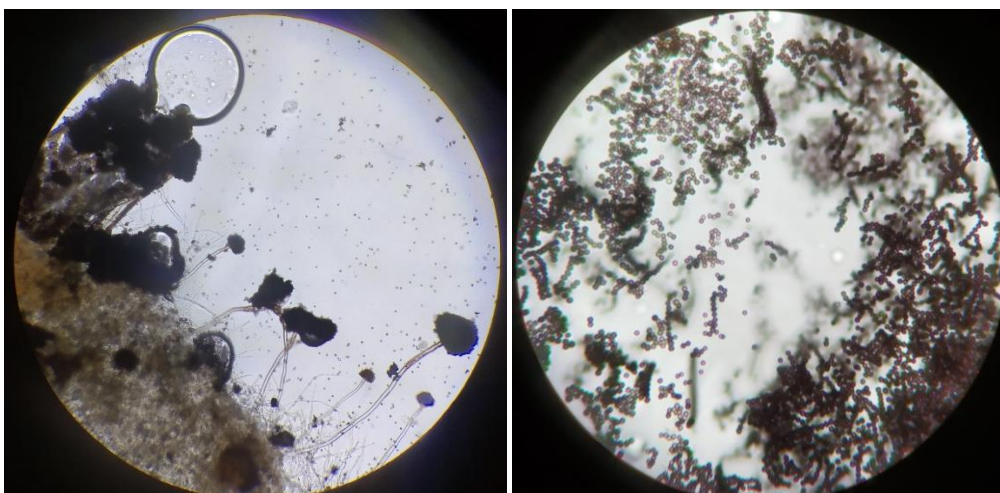
El género *Aspergillus* es conocido por su cabeza conidial esporulada con el nombre de “*aspergillum*”, por ser un hongo filamentoso hialino ubicuo, siendo protagonista de “diversas enfermedades por su universalidad presentándose en forma de brotes hospitalarios por obras de remodelación” [64].

Esta especie de *Aspergillus* pertenece a las especies de *Aspergillus negros*, esto quiere decir que la colonia al inocularse es blanca y luego pasa a ser de un color marrón a negro en su fase de maduración [86] [64]. Dentro de su morfología se encuentra “la presencia de hifas hialinas septadas, su reproducción sexual (con formación de ascosporas en el interior de ascas) y asexual (con formación de conidios)” [64].

Estudios realizados con esta cepa demuestran su estructura morfológica, teniendo conidios biseriados más pequeños a las demás especies de *Aspergillus*, “las cabezas conidiales son globosas al principio y luego radian ocasionalmente y se desarrollan en varias columnas conidiales, paredes gruesas, lisas, de color marrón pálido” [86] observando en la Figura 30 el desarrollo en la formación de esporulaciones a 37°C, demostrando que bajo condiciones de cultivo en medio sólido es propenso a la producción de ácido cítrico con combinaciones únicas de extralitos en su estructura [86], estando presentes en el suelo, residuos sólidos y orgánicos y fragmentos de colecciones de cepas naturales [64] [86].

Figura 30.

Micromorfología de A. braziliensis.



Nota. Esta figura representa la Micromorfología de la especie *A. braziliensis*.

En cuanto a las condiciones de crecimiento se encuentra que el rango de temperatura para su crecimiento está entre los 12-57°C, siendo 35°C la adecuada para su desarrollo exponencial, pueden mantenerse a temperaturas de 70°C sin sufrir alteraciones en su morfología y un rango de pH entre 5-6, siendo 5,60 el valor adecuado de desarrollo [64].

4.1.2 Inoculación del microorganismo

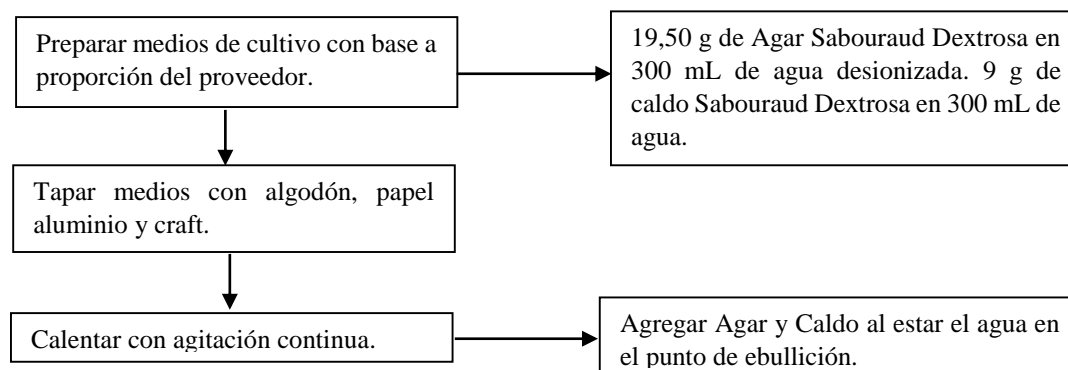
Para efectuar este proceso, se toma la cepa de *Aspergillus braziliensis* preservada en caldo de cultivo Sabouraud Dextrosa y glicerol al 25%, suministrada por los bancos de trabajo del laboratorio de la Fundación Universidad de América almacenada a -4°C [33].

4.1.2.i Preparación del medio de cultivo. Para la preparación de los medios de cultivo usados en esta investigación, en primer lugar, para la preparación del medio de cultivo líquido, siendo este el Caldo Sabouraud Dextrosa, se toma en consideración la proporción suministrada por el proveedor, en el cual se requieren 9 g de caldo en 300 mL de agua desionizada, el sólido se adiciona al agua en ebullición lentamente en agitación continua, obteniendo una mezcla homogénea. Se promueve la salida del CO₂ con ayuda de algodón, papel aluminio y craft [33] (Anexo 1).

Adicionalmente, se prepara el medio de cultivo sólido, siendo este el Agar Sabouraud Dextrosa, tomando a consideración la proporción suministrada por el proveedor, requiriendo 19,50 g de agar en 300 mL de agua desionizada, el sólido se adiciona al agua en ebullición lentamente en agitación continua, obteniendo una mezcla homogénea. Se promueve la salida del CO₂ con ayuda de algodón, papel aluminio y craft [33] (Anexo 1).

Figura 31.

Diagrama de flujo de la preparación de los medios de cultivo.



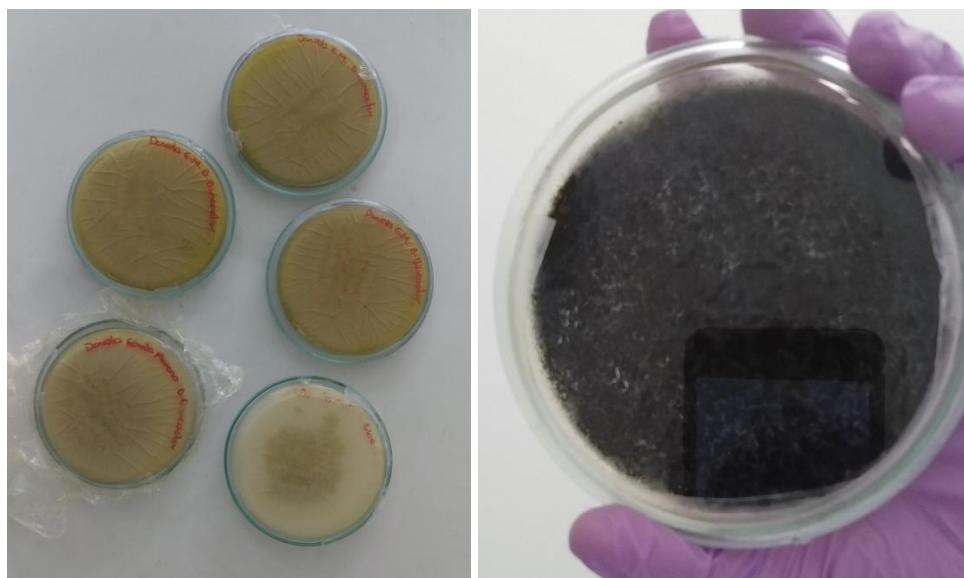
Nota. Esta figura representa el paso a paso para llevar a cabo la preparación de los medios de cultivo.

4.1.2.ii Incubación del microorganismo. Los medios de cultivo se llevan a autoclave a 121°C y 15 psi por 35 minutos junto con los demás utensilios y materiales de laboratorio que se lleguen a necesitar (asas, cajas de Petri, Erlenmeyer, puntas amarillas) para eliminar los microorganismos o impurezas que puedan estar presentes en la preparación, evitando contaminación cruzada en el proceso. Pasado el tiempo de esterilización se procede a realizar la inoculación del microorganismo, para ello se introducen los materiales y el cultivo en medio sólido (Agar Sabouraud Dextrosa) en la cabina de flujo laminar previamente desinfectada y sometida a luz UV, estando el medio de cultivo a temperatura ambiente se

procede a adicionar 20 mL del Agar a cada una de las cajas de Petri dejando la tapa entre abierta para que los vapores condensados salgan de la caja y no afecten el proceso, luego de esto, al estar solidificado el medio, se toma la cepa del microorganismo suministrado por la Fundación Universidad de América, raspando el disco en su interior y con ayuda del asa se pasa por el centro de las cajas de Petri para posteriormente incubarlos por 7 días a 30°C en la incubadora para evidenciar su crecimiento [33], dando como resultado el crecimiento del microorganismo como se evidencia en la Figura 32.

Figura 32.

Resultado final de la incubación del microorganismo.



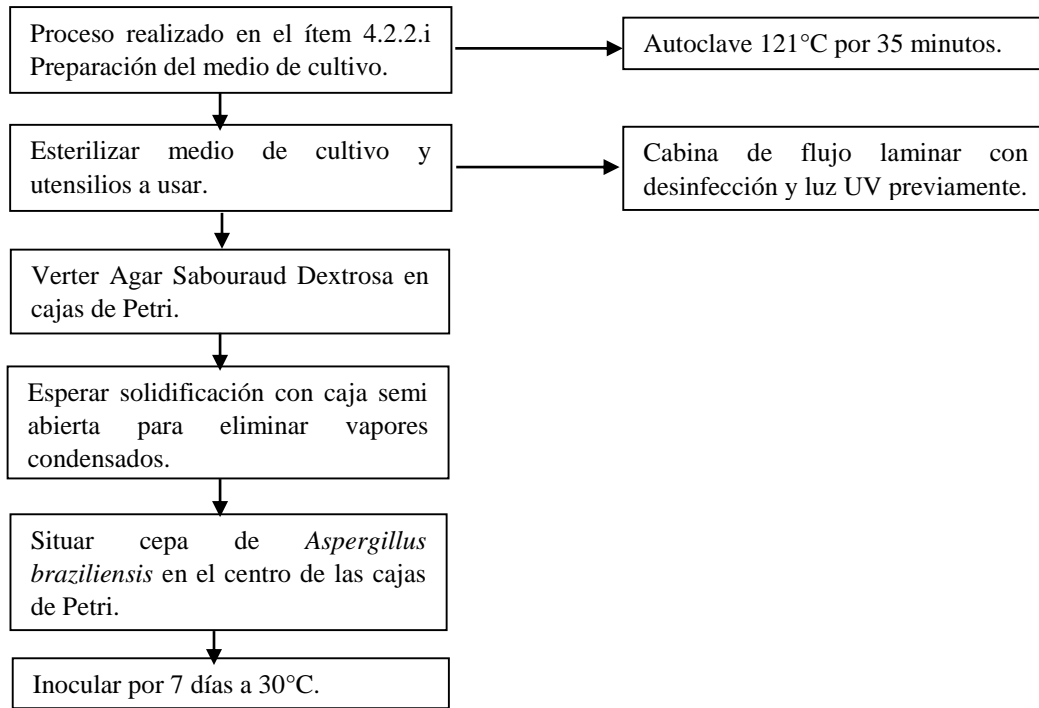
Nota. Esta figura representa el resultado final de la incubación del microorganismo en las cajas de Petri, evidenciando en la figura 1 el micelio vegetativo y en la figura 2 el micelio aéreo.

4.1.3 Producción de biomasa del microorganismo

4.1.3.i Producción del inóculo. A partir de la activación de la cepa en las cajas de Petri en medio sólido, se procede a realizar una nueva inoculación del microorganismo para ser usado en la producción de biomasa; para ello se realiza la preparación del medio de cultivo mencionado en el ítem 4.2.2, teniendo los medios y los utensilios esterilizados, con ayuda de la punta redonda, se toma un disco de las cajas de Petri ya sembradas y se adicionan en el centro de los nuevos medios de cultivo, teniendo un total de 5 cajas con 1 disco en cada una, estas se inocula por 7 días a 30°C en la incubadora.

Figura 33.

Diagrama de flujo de la producción del inóculo.

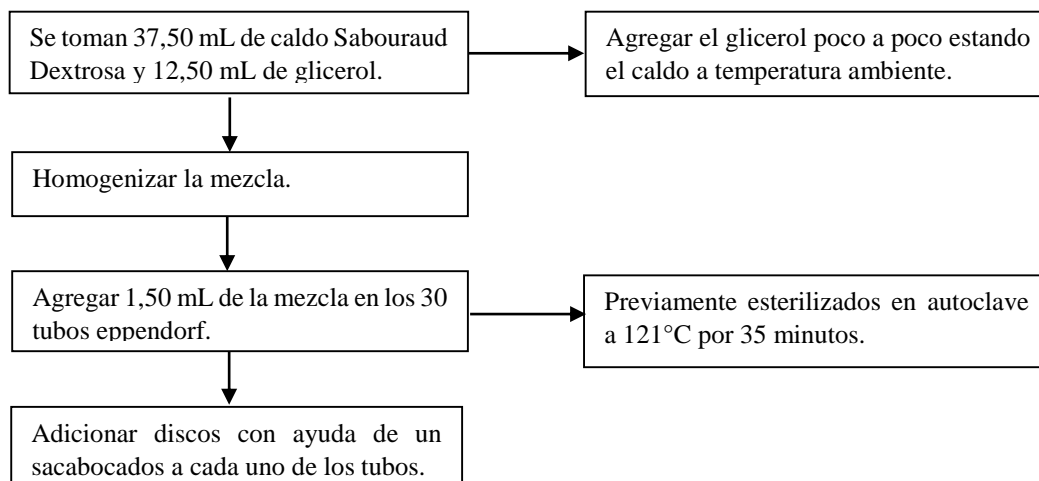


Nota. Esta figura representa el paso a paso para la producción del inóculo.

4.1.3.ii Banco de trabajo. Para la ejecución del banco de trabajo se toman 37,50 mL de caldo Sabouraud Dextrosa y 12,50 mL de glicerol previamente esterilizados agregando este último cuando el caldo se encuentre a temperatura ambiente, posteriormente, se homogeniza la mezcla y se distribuye en 30 tubos eppendorf estériles con 1,50 mL del medio en cada uno de estos, posteriormente con ayuda de un sacabocados se realizan discos en la periferia del microorganismo maduro proveniente de las cajas de Petri para adicionar un disco en cada uno de los tubos, obteniendo el banco de trabajo para llevar a cabo la investigación [33] (Anexo 1).

Figura 34.

Diagrama de flujo de la elaboración del banco de trabajo.

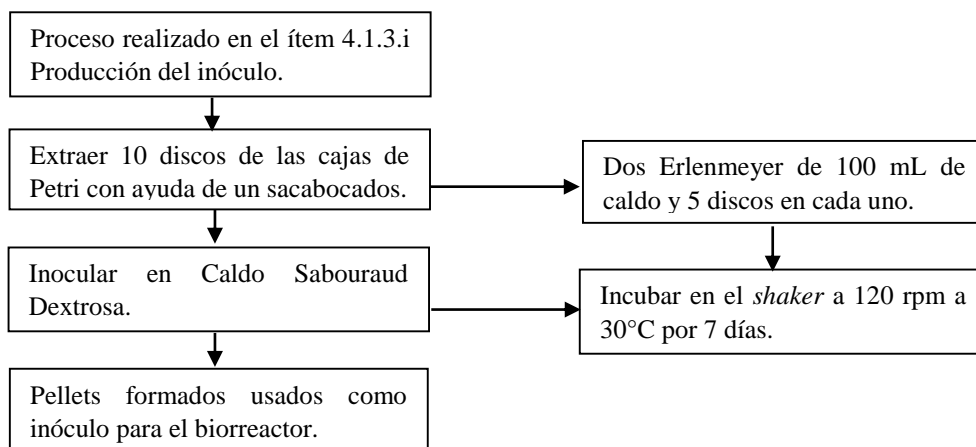


Nota. Esta figura representa el paso a paso para la elaboración del banco de trabajo usado en la investigación.

4.1.3.iii Producción de biomasa. A partir de las cajas de Petri previamente sembradas, se inocula en dos Erlenmeyer 100 mL del caldo de cultivo Sabouraud Dextrosa con 5 discos del microorganismo maduro en cada uno de ellos con ayuda de un sacabocado, estos se incuban por 7 días a 30°C en el *shaker* a 100 rpm, los pellets formados al transcurrir este tiempo son usados como inóculo en el biorreactor [33] (Anexo 1).

Figura 35.

Diagrama de flujo de la producción de biomasa.

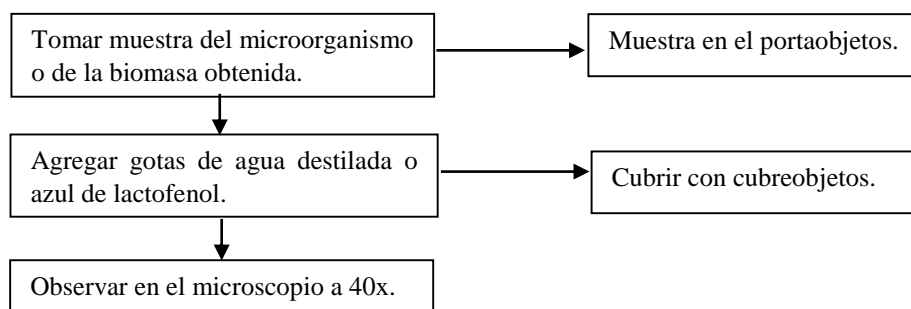


Nota. Esta figura representa el paso a paso para la producción de biomasa del microorganismo.

4.1.3.iv Prueba de pureza. La identificación de la morfología del microorganismo se lleva a cabo en primer lugar en la cabina de flujo laminar tomando una muestra del cultivo presente en la caja de Petri con gotas de agua destilada o de azul de lactofenol sobre un portaobjetos seguido de un cubreobjetos para ser analizada en el microscopio a 40x [33].

Figura 36.

Diagrama de flujo procedimiento prueba de pureza.



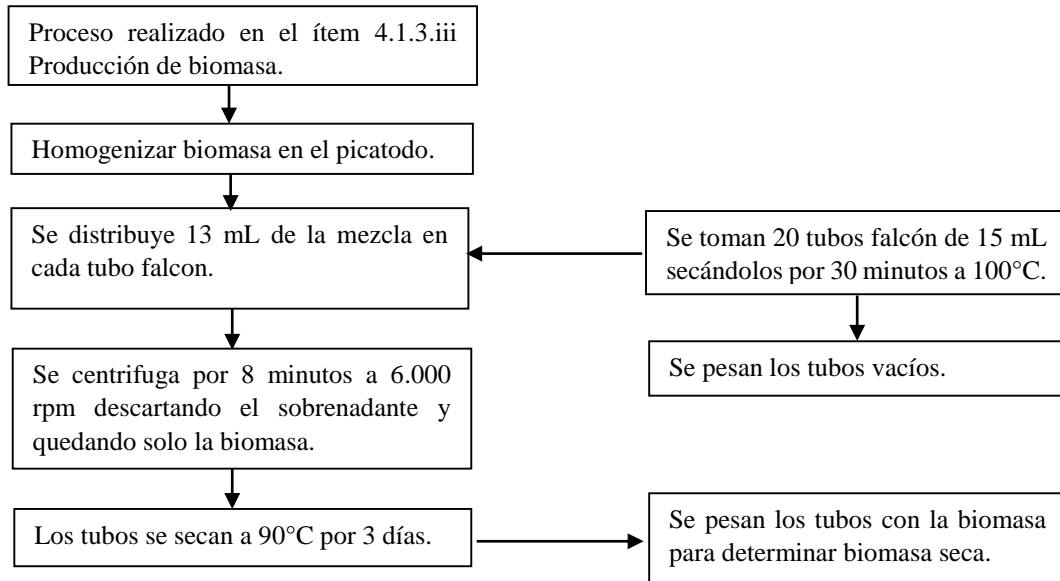
Nota. Esta figura representa el paso a paso para el análisis de la prueba de pureza del microorganismo en el medio de cultivo y en la biomasa obtenida.

4.1.4 Evaluación de la concentración de inóculo por peso seco

Para determinar la biomasa obtenida por el microorganismo, se toma como base el procedimiento realizado en el ítem producción de biomasa en donde los pellets obtenidos en este proceso se homogenizan con ayuda de un picatodo, para este proceso es necesario contar con 20 tubos falcon de 15 mL para determinar el peso seco de la biomasa producida, estos se someten a secado en el horno por 30 minutos a 100°C para pesarlos posteriormente, siendo este el peso del tubo vacío. La mezcla homogenizada se distribuye en cada uno de los tubos con un total de 13 mL en cada uno de ellos, los cuales pasan por el proceso de centrifuga por 8 minutos a 6.000 rpm para separar el caldo de la biomasa, el sobrenadante se descarta quedando en los tubos únicamente la biomasa para ser secada a 90°C por 3 días en el horno hasta obtener peso constante usado finalmente para el cálculo de biomasa seca [33] (Anexo 2).

Figura 37.

Diagrama de flujo evaluación concentración de inóculo por peso seco.



Nota. Esta figura representa el paso a paso para la evaluación de inóculo por peso seco del microorganismo.

4.2 Metodología para el ajuste del polietileno de baja densidad

4.2.1 Tamaño de la muestra

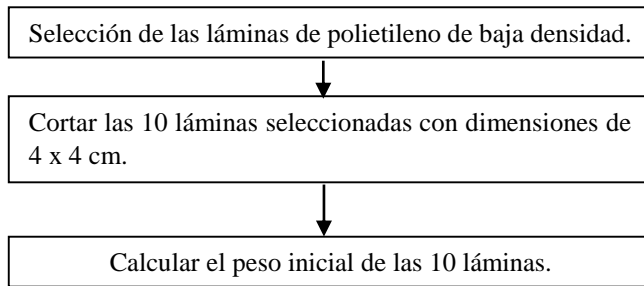
La población utilizada para este estudio serán láminas cuadradas de un empaque plástico comercial, bolsa calibre 1 de polietileno de baja densidad con un tamaño de 4 x 4 cm.

4.2.2 Pesaje inicial LDPE

Luego de acondicionar las láminas de LDPE con base a las especificaciones mencionadas en el ítem 4.2.2, se seleccionan 10 láminas para realizar el estudio, las cuales son pesadas inicialmente para ser introducidas en el biorreactor con el fin de determinar del porcentaje de biodegradación al final del proceso.

Figura 38.

Diagrama de flujo ajuste del LDPE.



Nota. Esta figura representa el paso a paso para el análisis de la prueba de pureza del microorganismo en el medio de cultivo y en la biomasa obtenida.

4.3 Metodología para el proceso de biodegradación en biorreactor

En este ítem se describirá el acondicionamiento del biorreactor para la determinación de las condiciones y variables de operación como lo son el pH, la temperatura y el volumen de medio de cultivo dentro del biorreactor, adicional a esto se describe el proceso de inoculación y de *Aspergillus brasiliensis* en el mismo a partir de la biomasa obtenida anteriormente para la adición final del material a degradar.

4.3.1 Características del campo experimental

El biorreactor presenta las siguientes especificaciones:

Forma del biorreactor: Recipiente cilíndrico

Ancho del biorreactor: 18 cm

Longitud del biorreactor: 27,50 cm

Base: 12 cm de diámetro

Tapa: 8 cm de diámetro

Capacidad del recipiente: 4 L

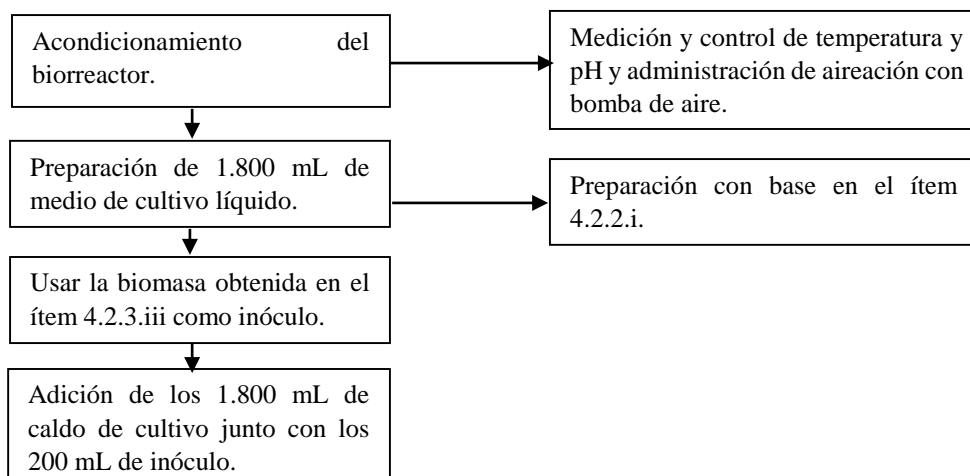
Volumen efectivo de trabajo del biorreactor: 2.000 mL de medio de cultivo líquido (Caldo Sabouraud Dextrosa).

4.3.2 Acondicionamiento biorreactor

Para llevar a cabo el proceso de biodegradación ex situ del polietileno de baja densidad, se desarrolla un prototipo de biorreactor a escala laboratorio en el cual en la parte superior se acondiciona para la medición y control de la temperatura, pH y proceso de aireación a partir de una bomba de pecera con 90 L/h de flujo de aire y salida de dióxido de carbono en el proceso, cuando el prototipo se encuentra listo, se procede a adicionar el volumen de medio de cultivo líquido en el biorreactor siendo este de 1.800 mL previamente esterilizado junto con 200 mL de caldo de cultivo con la biomasa obtenida del microorganismo para un total de 2.000 mL para iniciar la inoculación en el biorreactor.

Figura 39.

Diagrama de flujo acondicionamiento del biorreactor.



Nota. Esta figura representa el paso a paso para el acondicionamiento del biorreactor para la medición de las variables de operación e inoculación del microorganismo.

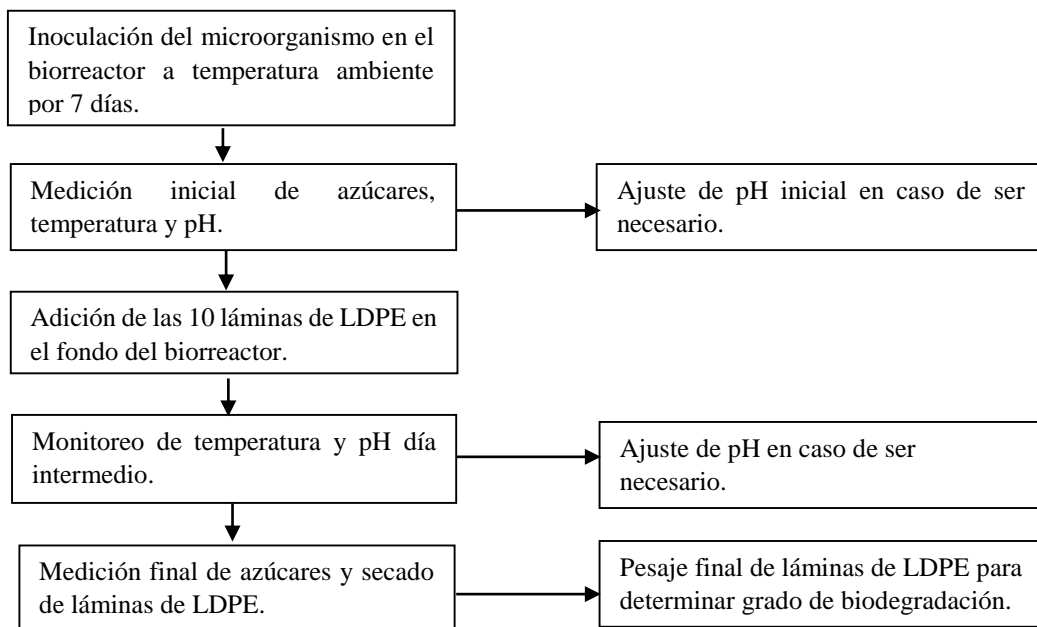
4.3.3 Inoculación y puesta en marcha del biorreactor

Dando continuación al proceso descrito anteriormente, la inoculación del microorganismo en el biorreactor se efectúa por un periodo de 7 días a temperatura ambiente mediante el suministro de aire, transcurrido este tiempo se evalúan los azúcares, temperatura y pH inicial del proceso ajustando este último en caso de ser necesario para que el *Aspergillus brasiliensis* tenga las condiciones para crecer satisfactoriamente, posteriormente se introducen las 10 láminas seleccionadas en el fondo del biorreactor realizando un monitoreo día intermedio para controlar la temperatura y el pH hasta completar 30 días de proceso, finalmente las

láminas se remueven del biorreactor para ser secadas a temperatura ambiente realizando el pesaje final de las mismas para obtener el grado de biodegradación del proceso. Se realizan 3 réplicas para el proceso de biodegradación del LDPE.

Figura 40.

Diagrama de flujo puesta en marcha del biorreactor.



Nota. Esta figura representa el paso a paso para la inoculación y puesta en marcha del biorreactor para llevar a cabo el proceso de biodegradación de las láminas de LDPE.

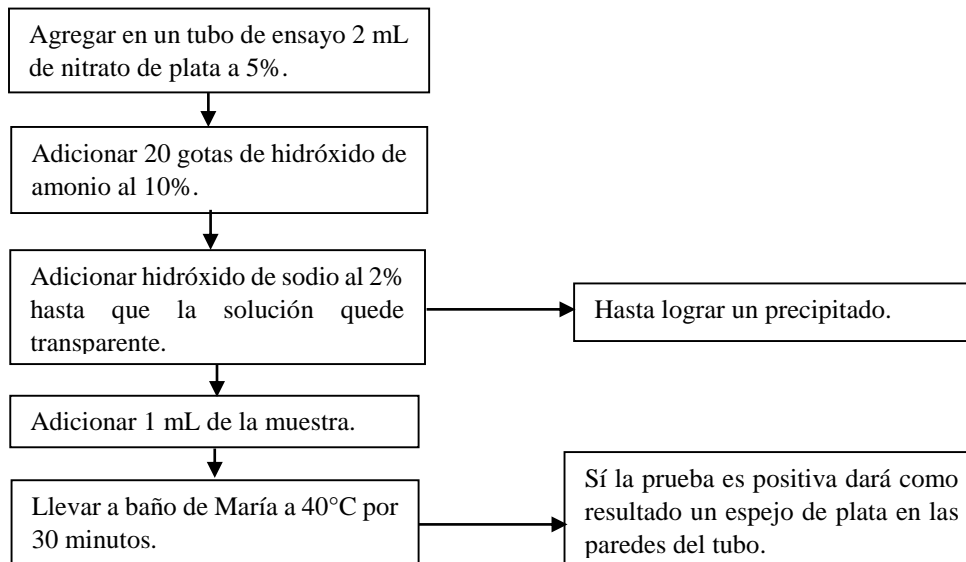
4.4 Metodología para la determinación de azúcares

4.4.1 Determinación de azúcares por análisis cualitativo

4.4.1.i Prueba de Tollens. En primer lugar, se encuentra la prueba de Tollens el cual determina los azúcares reductores que contienen en su estructura aldehídos para reducir el Ag^+ a Ag^0 con la formación de un espejo de plata. Para ello se agregan 2 mL de nitrato de plata al 5% que al ponerse en contacto con 20 gotas de hidróxido de amonio al 10% producen el hidróxido de plata y el nitrato de amonio, los cuales reaccionan con el hidróxido de sodio hasta que los sólidos disueltos se precipiten y el líquido quede transparente, cuando esto ocurre se adiciona 1 mL de la muestra y se calienta a baño de María a 40°C por 30 minutos hasta evidenciar la ausencia o presencia de azúcares reductores, si esta última es positiva se formará un espejo de plata en el tubo de ensayo utilizado para el análisis.

Figura 41.

Diagrama de flujo prueba de Tollens para determinación de azúcares.

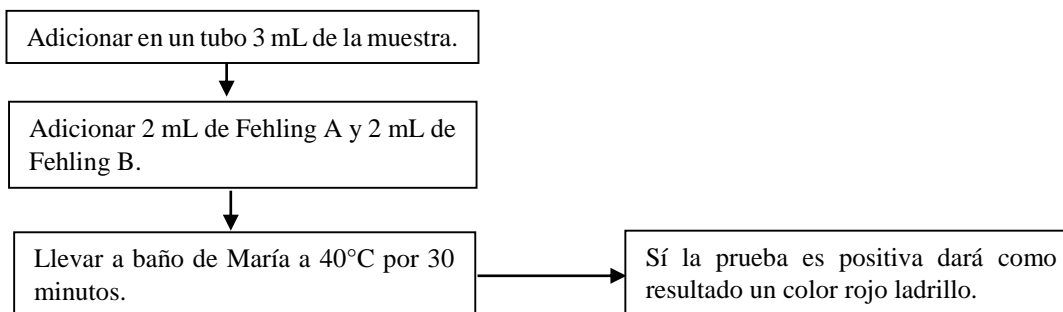


Nota. Esta figura representa el paso a paso para la inoculación y puesta en marcha del biorreactor para llevar a cabo el proceso de biodegradación de las láminas de LDPE.

4.4.1.ii Prueba de Fehling. El segundo análisis corresponde a la prueba de Fehling para la determinación de azúcares reductores de igual modo, para ello se adicionan 2 mL de las muestras en 4 tubos de ensayo diferentes, los cuales se ponen en contacto con 3 mL de Fehling A, siendo una solución celeste y 3 mL de Fehling B, siendo una solución transparente, la mezcla se lleva a baño de María a 40°C por 30 minutos, dando como resultado un color rojo ladrillo al existir presencia de azúcares reductores en el sistema y coloración azul o verde en caso de ser negativa la prueba.

Figura 42.

Diagrama de flujo prueba de Fehling para determinación de azúcares.



Nota. Esta figura representa el paso a paso para la inoculación y puesta en marcha del biorreactor para llevar a cabo el proceso de biodegradación de las láminas de LDPE.

4.4.2 Determinación de azúcares por análisis cuantitativo

Dentro de los análisis cuantitativos para la determinación de azúcares se encuentra la espectrofotometría UV-Vis usando el método DNS, el cual utiliza el reactivo 3.5 ácido dinitrosalicílico como agente oxidante para el método. Para ello se lleva a cabo la curva de calibración a partir de diferentes concentraciones de la solución de glucosa y DNS (0, 0,50, 0,07, 1, 1,50, 1,70, 2) en relación con la absorbancia de la muestra cómo se evidencia en la Tabla 10. Hay que tener en cuenta que para la eficacia de la curva se debe tener un blanco, siendo esta únicamente agua con DNS verificando que los valores de absorbancia se encuentren entre 0 y 1.

Tabla 10.

Curva patrón DNS.

Concentración Glucosa (g/L)	Absorbancia
0,00	0,00
0,50	0,25
0,70	0,36
1,00	0,50
1,50	0,76
1,70	0,84
2,00	1,00

Nota. La tabla representa las diferentes concentraciones de la solución glucosa-DNS en relación a la absorbancia de cada una de estas.

A continuación, en la ecuación 1 y en la Figura 43 se evidencia la ecuación de la recta.

Ecuación 1.

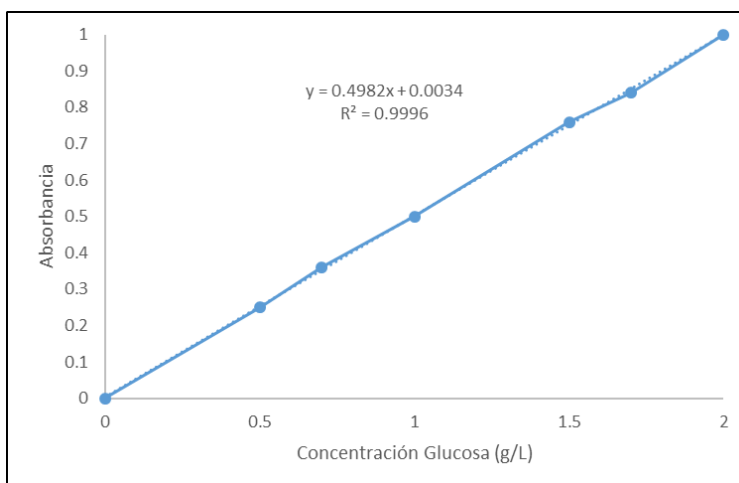
Ecuación de la recta determinación de azúcares.

$$y = 0,982x + 0,0034 \quad R^2 = 0,9996$$

Nota. La ecuación corresponde a la curva de calibración realizada para la determinación de azúcares.

Figura 43.

Ecuación de la recta para determinación de azúcares.



Nota. La figura representa la ecuación de la recta para la determinación de azúcares por el método DNS.

4.5 Resultados y análisis

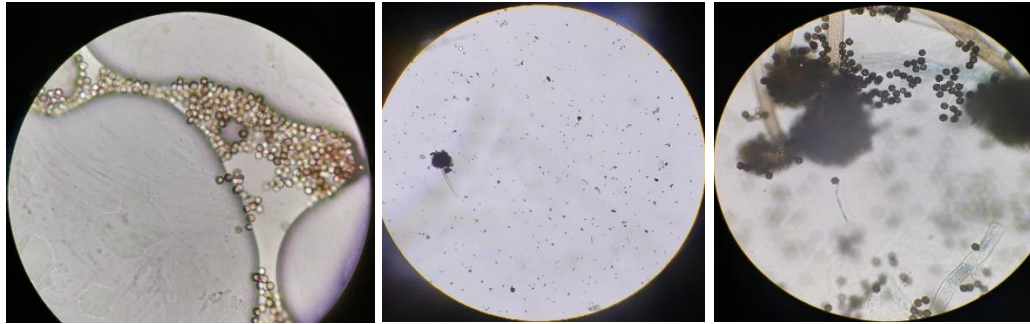
Los resultados obtenidos en el proceso de biodegradación ex situ del polietileno de baja densidad llevado a cabo en 30 días en biorreactor a escala laboratorio se evidencian con base en el grado de biodegradación de las láminas, el monitoreo y calibración de variables de operación, siendo estas la temperatura y el pH con sus respectivos cálculos y gráficas que determinan su comportamiento durante el proceso y la caracterización del resultado final mediante análisis SEM y FTIR.

4.5.1 Pureza

Para identificar la presencia de *Aspergillus brasiliensis* como único agente biológico durante el proceso, se realizaron estudios de prueba de pureza en cada uno de los pasos mencionados en el apartado 4.2 y 4.4, tomando una muestra del microorganismo maduro para minimizar el riesgo de contaminación cruzada en la biodegradación, en la cual en la Figura 44 se identifican las características morfológicas de la cepa seleccionada como lo son las esporas, hifas, conidióforos y conidios. Dicho proceso se realiza al iniciar la inoculación del microorganismo, después del proceso de incubación, en la producción de biomasa y al iniciar y finalizar el proceso de biodegradación para evitar contaminación cruzada durante el proceso.

Figura 44.

Morfología Aspergillus braziliensis.



Esporas

Conidios irregulares

Hifas y conidióforos

Nota. Esta figura representa las características morfológicas de *Aspergillus braziliensis* evidenciadas en el microscopio a 40x.

4.5.2 Resultados evaluación de la concentración de inóculo por peso seco

Con base en el ítem 4.1.4, al ser sometidos los tubos falcon a secado en el horno por 90°C, el peso final e inicial de los mismos son los que determinan los gramos de biomasa obtenidos, logrando cuantificar el peso seco recuperado de 13 ml en 16 tubos, dando como resultado un valor medio de +/-0,09 g para la réplica 1, +/-0,08 g para la réplica 2 y +/-0,08 g para la réplica 3 (Anexo 2), considerando que el peso determinado en estos cálculos corresponde a “material orgánico adsorbido y material inerte, así como la posibilidad de absorber humedad del medio al momento del pesado” [33]. Posteriormente se procede a calcular el inóculo inicial de la suspensión celular (200 mL) correspondiente a una corrida del biorreactor para inocular 1.800 mL de caldo estéril, dando como resultado +/-2,72 g para la réplica 1, +/-2,49 g para la réplica 2 y +/-2,47 g para la réplica 3, obteniendo una media de +/-2,56 g como se recopila en la Tabla 11.

Tabla 11.

Recopilación resultados inóculo inicial.

Inóculo Inicial (g)	
Corrida Biorreactor (Réplica 1)	2,72
Corrida Biorreactor (Réplica 2)	2,49
Corrida Biorreactor (Réplica 3)	2,47
MEDIA	2,56

Nota. Las tablas representan la recopilación de los resultados del inóculo inicial de las tres corridas del biorreactor.

De igual manera se determina el peso seco final del medio de cultivo utilizado para el proceso de biodegradación en el biorreactor, dando como resultado un total de peso seco recuperado promedio para las tres réplicas de $\pm 0,14$ g (Anexo 2), correspondiente a el peso recuperado de 50 mL en 40 tubos.

4.5.3 Proceso de biodegradación en biorreactor

En primer lugar, se realiza la preparación de 1800 mL de medio de cultivo líquido utilizando Caldo Sabouraud Dextrosa y agua desionizada con base en las especificaciones del proveedor, el cual es sometido posteriormente a esterilización en autoclave a 121°C , 15 psi por 35 minutos para evitar la contaminación cruzada al interior del recipiente usado para el prototipo del biorreactor. Transcurrido este tiempo se adiciona a temperatura ambiente el inóculo inicial del microorganismo correspondiente a una media de $\pm 2,56$ g de peso seco presente en 200 mL de medio de cultivo previamente obtenido mencionado en el ítem 4.1.3, obteniendo el montaje mostrado en la Figura 45.

Figura 45.

Montaje del biorreactor.



Nota. Esta figura representa el montaje del biorreactor con la adición del inóculo.

Posterior a los 7 días de incubación a temperatura ambiente, se evidencia en la Figura 46 una mayor producción de pellets de *Aspergillus brasiliensis*, tomando para su desarrollo los nutrientes presentes en el caldo de cultivo, siendo esta principalmente dextrosa. En esta semana, se adicionan las 10 láminas de LDPE seleccionadas para la biodegradación previamente pesadas junto con la medición de valores iniciales de temperatura y pH, iniciando el arranque del proceso.

Figura 46.

Semana 1 Proceso de biodegradación.

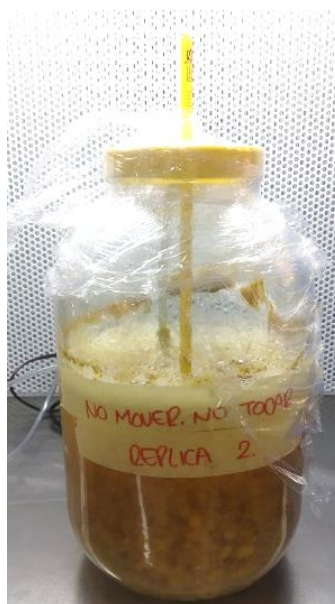


Nota. Esta figura representa el proceso de biodegradación del polietileno de baja densidad al inicio de la 1 semana.

Al transcurrir dos semanas del proceso de biodegradación, se observa en la Figura 47 que el microorganismo ha crecido eficazmente usando como fuente de carbono el medio de cultivo. Así mismo se efectúa el monitoreo de temperatura y ajuste de pH en caso de ser necesario utilizando solución de hidróxido de sodio o ácido acético glacial al encontrarse en un pH ácido o básico respectivamente.

Figura 47.

Semana 2 Proceso de biodegradación.

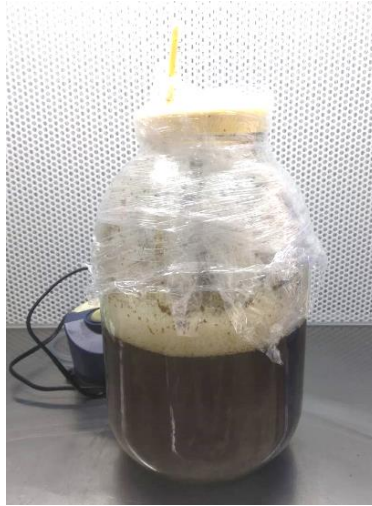


Nota. Esta figura corresponde al biorreactor al cabo de 2 semanas de incubación.

La tercera semana de proceso de biodegradación está evidenciada en la Figura 48 donde el microorganismo se ha desarrollado de manera satisfactoria en el medio dando como resultado el color negro característico de *Aspergillus brasiliensis* en su etapa de maduración producto de la coloración de los conidios. Adicional a esto el material ya se encuentra sometido a la actividad enzimática por parte del microorganismo, lo que podría indicar el uso de LDPE como fuente de carbono.

Figura 48.

Semana 3 Proceso de biodegradación.



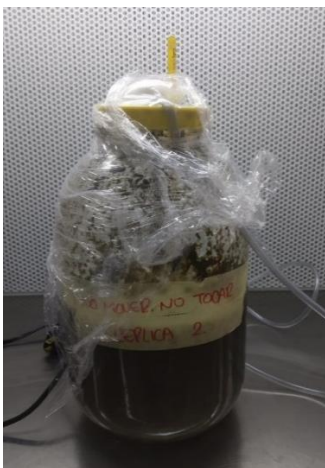
Nota. Esta figura corresponde al biorreactor al cabo de 3 semanas de incubación.

La Figura 49 representa la cuarta semana del proceso de biodegradación con la determinación de azúcares, monitoreo de temperatura y pH final del mismo, al finalizar el proceso de biodegradación se identifica el medio de cultivo oscuro, siendo este de color negro producto de la pigmentación de conidios, lo que sugiere el uso del polímero como fuente de carbono y energía para la producción de biomasa.

De igual modo se realizan las diferentes pruebas de pureza para la identificación morfológica de *Aspergillus brasiliensis* y determinación de peso seco para conocer la cantidad de biomasa producida del mismo, siendo este de 5,64 g durante las 5 semanas totales del proceso, lo que determina el aumento de biomasa obtenido mencionado anteriormente con base en las condiciones de crecimiento, dando como resultado la colonización del microorganismo en la superficie del material. Esto se debe a que la enzima peroxidasa está implicada en la degradación del polietileno, reduciendo el peso molecular del mismo [41] y la acción enzimática de amilasas y proteasas alrededor de las colonias de los hongos [82] [87].

Figura 49.

Semana 4 Proceso de biodegradación



Nota. Esta figura corresponde al biorreactor al cabo de 4 semanas de incubación.

4.5.3.i Colonización del material. El proceso de biodegradación está determinado por los grupos funcionales hidroxilos y carbonilos de la cadena polimérica del material, el cual al estar sometido a la colonización del microorganismo y la actividad enzimática de este “proporciona pequeños fragmentos que ingresan al metabolismo intracelular como fuentes de carbono y energía para el crecimiento” [41].

Al transcurrir las cuatro semanas se evidencia la colonización del material en la superficie sugiriendo que, el microorganismo aparte de usar para su crecimiento la fuente de carbono del medio de cultivo, también utiliza la cadena polimérica del polietileno para degradarlo con el fin de disminuir el peso y así mismo alterar las propiedades físicas y morfológicas del mismo.

La Figura 50 demuestra la colonización del material en la superficie mediado por *Aspergillus brasiliensis*, lo que representa que las condiciones de pH, aireación y temperatura fueron las adecuadas para el crecimiento del microorganismo en el proceso de biodegradación, luego de esto las láminas fueron sometidas a secado a temperatura ambiente para su pesaje final.

Figura 50.

Láminas de LDPE antes y después del proceso de biodegradación.



Antes de la biodegradación

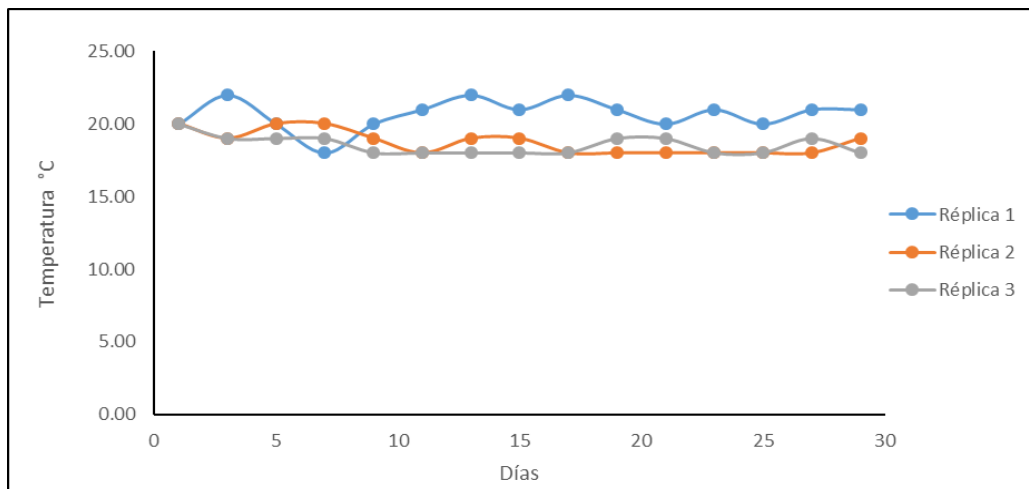
Después de la biodegradación

Nota. Esta figura representa las láminas de polietileno de baja densidad antes y después de llevarse a cabo el proceso de biodegradación.

4.5.3.ii Temperatura. Una de las variables a tener en cuenta en el proceso de biodegradación en biorreactor es la temperatura, la cual fue monitoreada cada dos días con ayuda de un termómetro por un periodo de 4 meses estando en un rango de 18 a 22°C para la primera réplica y de 18 a 20°C para la segunda y tercera réplica (Anexo 4) como se evidencia en la Figura 51, siendo diferentes a las condiciones del lugar en la que se realiza el estudio, lo que demuestra que los valores promedios de temperatura para la biodegradación de las láminas del LDPE son los adecuados para el crecimiento del microorganismo [64].

Figura 51.

Temperatura Vs Tiempo de biodegradación en fermentación líquida sumergida.

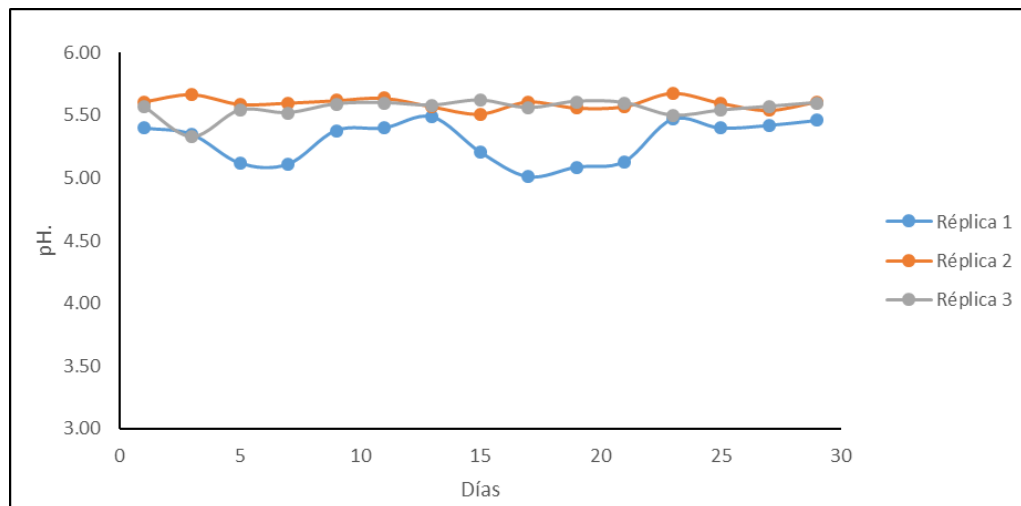


Nota. La figura representa la temperatura promedio de las tres réplicas realizadas para el proceso de biodegradación de LDPE en los días monitoreados.

4.5.3.iii pH. Esta variable al igual que la temperatura se monitorea cada dos días y se ajustó con ácido acético o hidróxido de sodio dependiendo del pH al cual se encontraba el proceso (Anexo 3), el valor inicial de la primera réplica fue de 5,40, el de la segunda réplica fue de 5,61 y 5,57 para la tercera réplica como se evidencia en la Figura 52 (Anexo 4), los cuales iban aumentando diariamente por el proceso metabólico efectuado por el microorganismo, siendo necesario el ajuste mencionado anteriormente [33]. Para este proceso se determina que los rangos de pH favorables para el proceso de biodegradación se encuentran entre 5-6, siendo 5,60 el valor adecuado de crecimiento de *Aspergillus brasiliensis* y así mismo favorecer la colonización de este en la superficie del material [64].

Figura 52.

pH Vs Tiempo de biodegradación en fermentación líquida sumergida.



Nota. La figura representa los valores de pH de las tres réplicas realizadas para el proceso de biodegradación de LDPE en los días monitoreados.

4.5.4 Determinación de azúcares

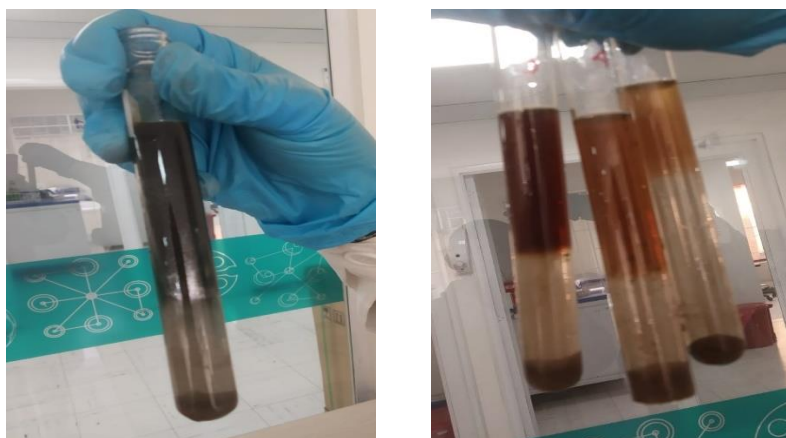
Para conocer el comportamiento del contenido de azúcares dentro del proceso de biodegradación, se deben realizar una serie de análisis cualitativos y cuantitativos para identificar el agotamiento de glucosa del medio de cultivo para el crecimiento del microorganismo en el proceso.

4.5.4.i Análisis cualitativo. Dentro de los análisis cualitativos para la determinación y ausencia o presencia de azúcares reductores en el proceso se encuentran la prueba de Tollens y Fehling.

Al analizar cada una de las muestras por prueba de Tollens, se evidenció que inicialmente (semana 1) había presencia de azúcares reductores en el medio por la aparición del espejo de plata, mientras que el tiempo final del proceso (semana 4) de cada réplica demostró ausencia de los mismos como se muestra en la Figura 53, lo que indica que el microorganismo consumió por completo la dextrosa presente en el medio de cultivo, teniendo la necesidad de utilizar el polímero para seguir con su crecimiento y así comenzar con el proceso de biodegradación.

Figura 53.

Prueba de Tollens proceso de biodegradación de LDPE.



Tiempo inicial de proceso

Tiempo final de proceso

Nota. La figura representa los resultados obtenidos en la prueba de Tollens de azúcares reductores presentes en las muestras tomadas del tiempo inicial y final del proceso.

El segundo análisis corresponde a la prueba de Fehling con solución de Fehling A y B. Como se evidencia en la Figura 54 la muestra correspondiente al tiempo inicial de proceso (semana 1) demostró la presencia de azúcares reductores con el rojo ladrillo característico a la existencia de azúcares reductores en el medio, mientras que el tiempo final de proceso (semana 4) de cada una de las réplicas siguió con el color azul, siendo el color característico de la ausencia de azúcares reductores en el medio afirmando lo anteriormente mencionado.

Figura 54.

Prueba de Fehling proceso de biodegradación de LDPE.



Tiempo inicial de proceso



Tiempo final de proceso

Nota. La figura representa los resultados obtenidos en la prueba de Fehling de azúcares reductores presentes en las muestras tomadas del tiempo inicial y final del proceso.

4.5.4.ii Análisis cuantitativo por la técnica de DNS. A partir de la curva de calibración obtenida en el apartado 4.4, se procede a realizar la determinación de azúcares de cada una de las muestras como indica el método DNS. Para esto se toman 0,25 mL de las muestras en tubos de ensayo adicionando 0,25 mL del reactivo DNS dejándolo a baño de María a 90°C por 5 minutos, luego de esto se enfrían las muestras en cubetas de hielo para parar la reacción y se adicionan 2,50 mL de agua en agitación para realizar la lectura de la absorbancia a 540 nm en el espectrofotómetro y así mismo usando la ecuación 1 calcular la concentración de glucosa. El proceso se debe realizar en menos de 30 minutos para que no se degraden las muestras y evitar que el reactivo DNS esté en contacto con la luz ya que este es una sustancia fotosensible y puede llegar a alterarse su composición si no se toman las medidas requeridas.

Al determinar la concentración de azúcar de cada una de las muestras, se evidenció que en el tiempo inicial de proceso (semana 1) la concentración de glucosa es de +/-13,37 g/L, la cual se fue agotando hasta efectuar el proceso de biodegradación (semana 4), dando como resultado un contenido de glucosa de +/-0,02 g/L para la réplica 1 y +/-0,01 g/L para la segunda y tercera réplica evidenciado en la Tabla 12, lo que demuestra que el microorganismo al no tener suficiente sustrato para consumirlo y efectuar su crecimiento, necesita de otras herramientas como el LDPE presentando una gran fuente de energía y

carbono aparte de las condiciones de crecimiento a través del pH, temperatura y aireación, dando como resultado la colonización de *Aspergillus brasiliensis* en la superficie del materia y así llevar a cabo su proceso de degradación.

Tabla 12.

Resultados análisis cuantitativo por la técnica DNS.

	Concentración Glucosa (g/L)	Absorbancia 1	Absorbancia 2	Absorbancia Promedio
T inicial de proceso (semana 1)	13,37	6,65	6,66	6,66
T final biorreactor (Réplica 1)	1,49E-02	5,00E-03	3,00E-03	4,00E-03
T final biorreactor (Réplica 2)	1,18E-02	3,00E-03	2,00E-03	2,50E-03
T final biorreactor (Réplica 3)	8,83E-03	1,00E-03	1,00E-03	1,00E-03

Nota. La tabla representa los resultados obtenidos en el tiempo inicial de proceso (semana 1) hasta el tiempo final (semana 4) de cada una de las réplicas realizadas para llevar a cabo la biodegradación.

4.4.5 Porcentaje de biodegradación

La biodegradación se determina con la diferencia entre el peso final e inicial del material sobre el peso inicial del mismo como se evidencia en la ecuación 2 para la identificación del porcentaje de pérdida de peso al culminar el proceso [33].

Ecuación 2.

Porcentaje de biodegradación

$$\%Biodegradación = \frac{P_f - P_i}{P_i} * 100$$

Nota. La ecuación muestra el cálculo del porcentaje de biodegradación del LDPE.

Utilizando la ecuación 2, se determinó el porcentaje de biodegradación de las tres réplicas llevadas a cabo en el proceso al cabo de 30 días (Anexo 5), recopilando los resultados en la Tabla 13.

Tabla 13.*Resultados del proceso de biodegradación de LDPE.*

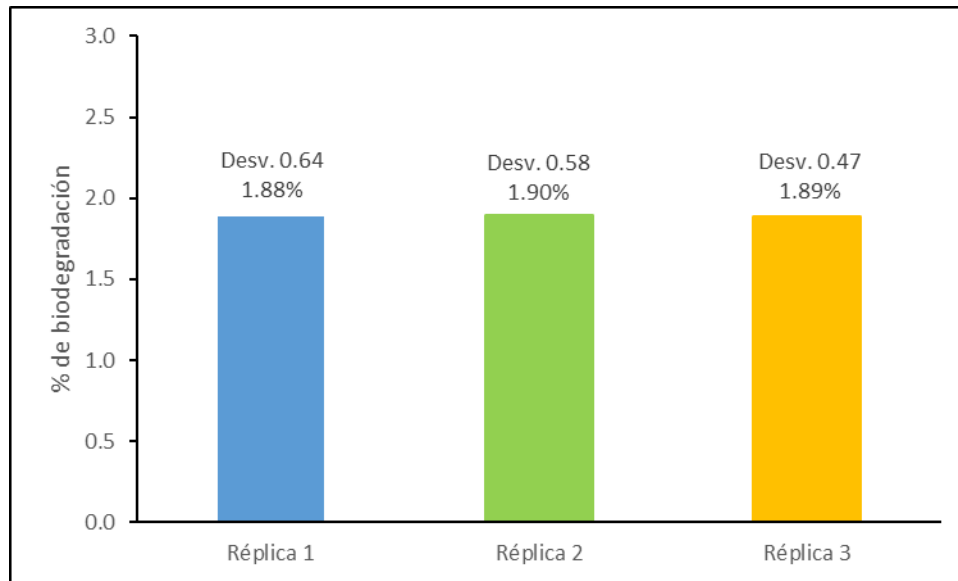
Proceso de Biodegradación Biorreactor (Réplica 1)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pi (g)	0,0271	0,0272	0,0254	0,0274	0,0268	0,0253	0,0251	0,0256	0,0258	0,0296
Pf (g)	0,0268	0,0265	0,0249	0,0269	0,0261	0,0246	0,0249	0,0251	0,0254	0,0291
% degradado	1,1070	2,5735	1,9685	1,8248	2,6119	2,7668	0,7968	1,9531	1,5504	1,6892
Media	1,8842									
Proceso de Biodegradación Biorreactor (Réplica 2)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pi (g)	0,0231	0,0199	0,0195	0,0212	0,0272	0,0278	0,0223	0,0218	0,0171	0,0187
Pf (g)	0,0225	0,0195	0,0190	0,0207	0,0270	0,0272	0,0220	0,0214	0,0168	0,0184
% degradado	2,5974	2,0101	2,5641	2,3585	0,7353	2,1583	1,3453	1,8349	1,7544	1,6043
Media	1,8962									
Proceso de Biodegradación Biorreactor (Réplica 3)										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pi (g)	0,0260	0,0265	0,0253	0,0229	0,0258	0,0267	0,0297	0,0308	0,0259	0,0225
Pf (g)	0,0255	0,0260	0,0247	0,0225	0,0254	0,0260	0,0291	0,0305	0,0255	0,022
% degradado	1,9231	1,8863	2,3715	1,7467	1,5504	2,6217	2,0202	0,9740	1,5444	2,222
Media	1,8861									

Nota. La tabla representa el comportamiento del peso de las láminas de LDPE sometidas a biodegradación en fermentación líquida sumergida.

Dada la diferencia en los resultados obtenidos del porcentaje de biodegradación en cada una de las láminas estudiadas, se identifica la ausencia de un sistema de mezcla que permitiera la distribución homogénea del sustrato, siendo en este caso el LDPE dentro del biorreactor, lo que facilitaría el proceso de colonización por parte del microorganismo para todas las láminas estudiadas en el proceso de biodegradación. Sin embargo, la Figura 55 muestra la media de biodegradación de las tres réplicas realizadas (+/-1,88%, +/-1,90%, +/-1,89% respectivamente), evidenciando que las condiciones de operación involucradas en el proceso como lo son la temperatura, pH y aireación fueron efectivas para que el microorganismo creciera exponencialmente con el fin de mineralizar el material utilizándolo como fuente de carbono.

Figura 55.

Porcentaje de biodegradación de LDPE.



Nota. La figura representa la media del porcentaje de biodegradación en fermentación líquida sumergida.

Estos resultados se comparan con los datos obtenidos en el estudio realizado por K, Malachová, et. al, los cuales obtienen como resultado de biodegradación 0,50 +/-0,40% y 1,30 +/-0,40% para muestras de LDPE tratadas en ausencia y presencia de UV colonizados por *Trichoderma humatum* en fermentación líquida sumergida [41] y los datos obtenidos por L, Calcetero, obteniendo como resultado para su biodegradación un porcentaje de 1,53% y 0,62% evaluadas en presencia y ausencia de UV colonizadas por *Aspergillus braziliensis* en humus de lombriz [31], lo que demuestra que el proceso realizado en el presente estudio mediado por *Aspergillus braziliensis* resulta efectivo para la biodegradación sin la intervención de luz UV, obteniendo como porcentaje de biodegradación una media de +/- 1,89% para las tres réplicas realizadas.

4.5.6 Caracterización del material

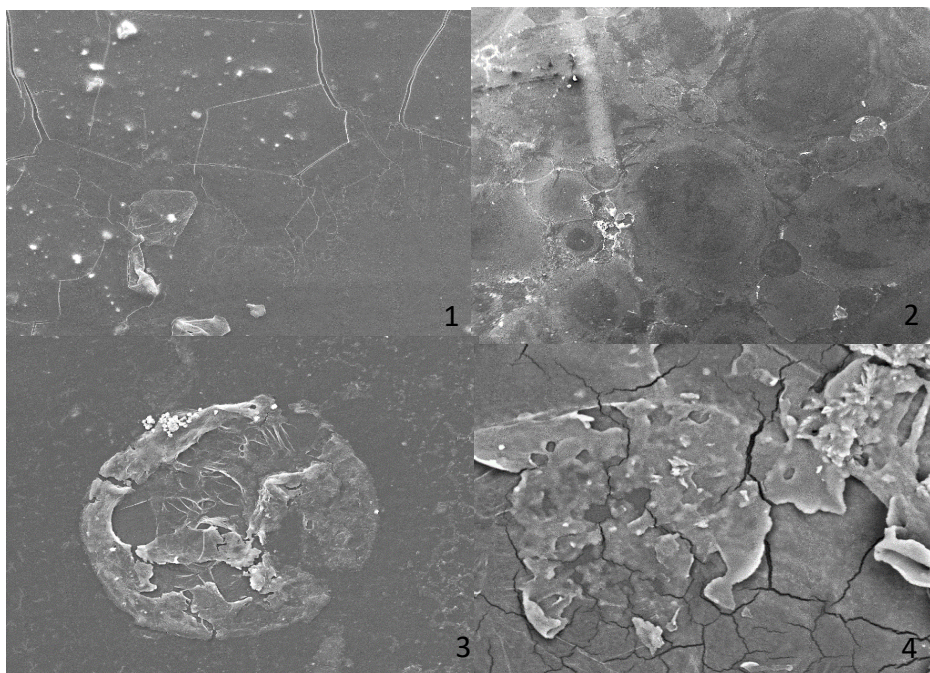
Para evaluar con mayor detenimiento los cambios morfológicos del LDPE en el proceso de biodegradación, se realiza el análisis de microscopia de barrido y el análisis de microscopia de fuerza atómica para evaluar la influencia de la colonización del microorganismo en la superficie del material y así verificar la viabilidad del proceso.

4.5.6.i Microscopia electrónica de barrido. Al finalizar el proceso de biodegradación en el biorreactor a escala laboratorio, es necesario evaluar la alteración de las características morfológicas del material gracias a la colonización que el microorganismo efectuó para su crecimiento. Para ello se realiza el análisis SEM en los laboratorios de la Universidad Nacional tomando una muestra de 1cm x 1cm de una de las láminas de cada réplica realizada junto con un blanco, siendo este una lámina virgen sin ningún tratamiento previo, este análisis comienza con un acondicionamiento del LDPE con recubrimiento en oro con el fin que la caracterización se realice satisfactoriamente y la superficie quede uniforme.

Como se puede observar en la Figura 56, el material 1, muestra patrón, no se presenta variaciones en su estructura ni en su textura sin embargo, en el material 2 se presenta una textura rugosa e irregular, porosidad y ruptura del mismo, signo de biodegradación en presencia de la acción microbiana del hongo filamentoso, así mismo en la muestra 3 un acercamiento del material en uno de los poros mostrando un rompimiento estructural como resultado de la biodegradación con cambios visibles en la textura, presentando la formación de pequeñas biopelículas en la superficie del material.

Figura 56.

Resultados análisis SEM.



Nota. La figura representa los resultados obtenidos del análisis SEM, muestra 1 sin tratar, muestra 2,3,4 correspondientes a las réplicas realizadas en el proceso.

Adicionalmente, en la muestra 4 se evidencia claramente el rompimiento estructural del polímero con la formación de biopelículas en la superficie del material gracias a la presencia y penetración de las hifas y conidios en la misma con la formación de hoyos y cavidades en el material.

Al evidenciar los resultados obtenidos del análisis SEM se determina la eficacia del microorganismo para degradar el polímero, viéndose no solo el proceso de biodegradación con el rompimiento estructural y cambios físicos del mismo, son también con la formación de biopelículas gracias a la presencia de hifas en el mismo, demostrando que el microorganismo es capaz y fuerte para alterar las propiedades del polímero sin necesitar un tratamiento previo de las muestras, es decir, llevándose a cabo únicamente con fermentación líquida sumergida, en donde el microorganismo al no tener suficiente fuente de carbono en el medio de cultivo, se ve en la obligación de utilizar las cadenas del LDPE para su crecimiento.

Como se mencionó anteriormente la formación de biopelículas, es el primer paso que demuestra la colonización de los conidios y las hifas al material, efectuando “procesos de secreción de componentes extracelulares que forman la matriz constituida principalmente de carbohidratos, que sirven de soporte para las hifas que van a constituir la biopelícula” [88], su formación se evidencia con la presencia de depósitos homogéneos y acumulaciones por el movimiento del agua, en este caso el medio de cultivo gracias a las condiciones de operación presentes en el proceso tales como aireación, temperatura y pH y suficiente fuente de carbono, nitrógeno y energía para llevar a cabo su adecuado crecimiento.

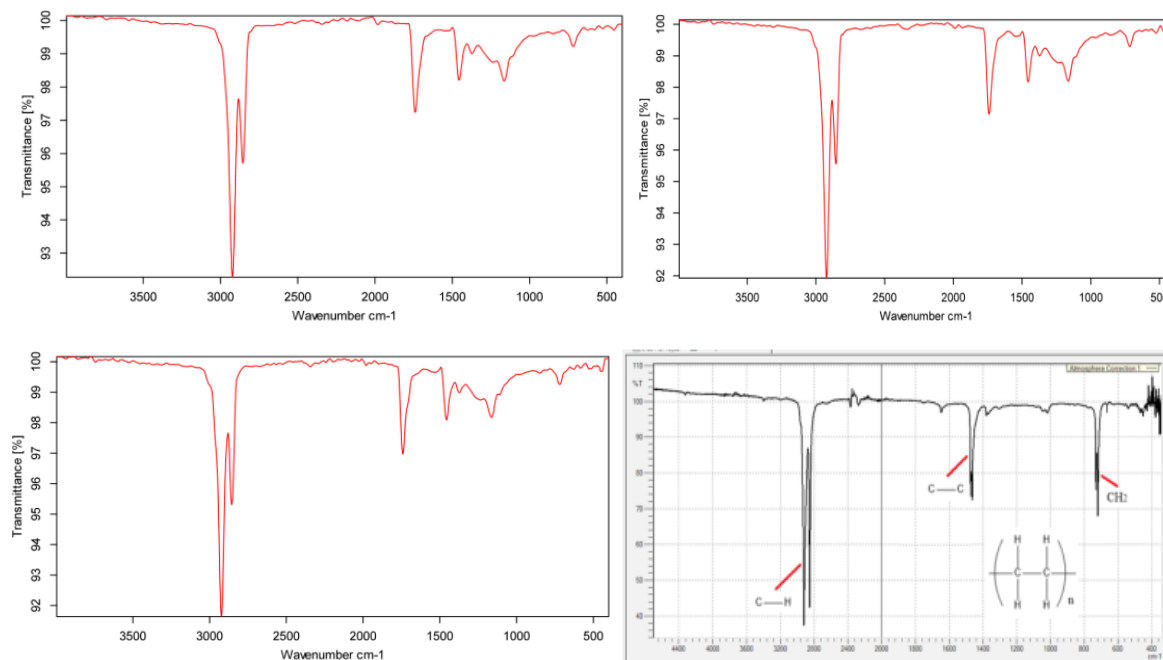
No obstante, aunque la formación de biopelículas en la superficie del material evidencia la colonización del microorganismo, la adherencia de las hifas al LDPE representan un aumento en la masa final del material degradado, requiriendo de un proceso de lavado para su eliminación y así obtener un porcentaje de biodegradación mayor al obtenido únicamente con el proceso de secado a temperatura ambiente.

4.5.6.ii Espectroscopia Infrarroja por Transformada de Fourier. Se realiza el análisis FTIR en los laboratorios de la Universidad ECCI tomando una muestra del material sin biodegradar y dos muestras del material sometido a la mineralización del microorganismo, con tamaño de 4cm x 4cm cada una de estas.

Como se puede observar en la Figura 57, las Figuras No 1, 2 y 3 evidencian la aparición de la banda de carbonilo presente en 2850 cm^{-1} está asociada al estiramiento simétrico y asimétrico de las vibraciones de los grupos C-H en las 3 muestras estudiadas, así como también movimiento de torsión en los enlaces C-C a 1400 cm^{-1} y movimiento de flexión provocado por el enlace de al menos cuatro carbonos consecutivos CH_2 en 700 cm^{-1} , lo que determina que efectivamente se estaban tratando muestras de LDPE para llevar a cabo el estudio mostrado en la Figura No 4 [89]. La biodegradación del material se evidencia en la disminución de la intensidad del carbonilo en el espectro de 2400 a 2100 cm^{-1} y en 500 cm^{-1} aproximadamente, causado por la actividad enzimática de los microorganismos al material, dando como resultado la oxidación de la cadena polimérica que forma los grupos carbonilo del material.

Figura 57.

Resultados análisis FTIR.



Nota. La figura representa los resultados obtenidos del análisis FTIR, muestra 1 sin tratar, muestra 2 y 3 correspondientes a las réplicas realizadas en el proceso y muestra 4 correspondiente al espectro del LDPE con base a la literatura. Última Figura tomada de: J, Velandia. Identificación de polímeros por espectroscopia infrarroja. *Ontare*, vol 5, pp. 115-140. 2017.

Comparando los resultados obtenidos con las investigaciones llevadas a cabo anteriormente, se evidencia una similitud en los resultados al identificar que los espectros corresponden

efectivamente a polietileno de baja densidad, siendo el material a degradar por la colonización del microorganismo al utilizar como fuente de carbono su cadena polimérica, dando como resultado una pérdida de peso del LDPE. Sin embargo, al ser el tiempo de biodegradación de 30 días no se evidencia un rompimiento del monómeros del material, siendo recomendable para otros estudios un tiempo de biodegradación mayor para evidenciar dicho rompimiento con la caracterización en FTIR.

Con base en la información mencionada anteriormente, el *Aspergillus brasiliensis* tiene la capacidad de adherirse al material y colonizarlo para usar sus propiedades fisicoquímicas como fuente de carbono y energía, lo que se pudo corroborar con la determinación de azúcares, grado de biodegradación con el peso inicial y final del LDPE y los análisis de caracterización del material para evidenciar los cambios morfológicos del mismo.

4.6 Diseño conceptual del diagrama de flujo de proceso (PFD) para la biodegradación de LDPE en fermentación líquida sumergida

La biodegradación del polietileno de baja densidad en fermentación líquida sumergida, se presenta el diseño conceptual del proceso expresado en un diagrama PFD que incluye el conocimiento experimental adquirido. Con el fin de escalar al proceso industrialmente, se realiza inicialmente el diagrama de bloques del proceso, identificando las condiciones de operación y balance de masa respectivo para cada una de las corrientes.

El proceso inicia con la preparación del medio de cultivo agregando en la corriente 1 caldo sabouraud dextrosa y en la corriente 2 agua, estos dos componentes se mezclan en un tanque agitado de 2.000 L durante 5 minutos para lograr su homogenización estando en una temperatura de 20-22°C. Esta mezcla sale en la corriente 3 para ser acondicionada en un intercambiador de calor pasando de 22°C a 121°C y ser enviado a un equipo de autoclave con el fin de evitar el ingreso de microorganismo salvajes durante el proceso operando a 121°C por 35 minutos. Al transcurrir este tiempo, se obtiene en la corriente 5 el caldo, siendo este la fuente de carbono y nitrógeno para el microorganismo que será empleado en la biodegradación.

En segundo lugar, se encuentra en la corriente 7 el polietileno de baja densidad correspondiente a la materia prima del proceso, este material se lava con agua y jabón neutro

por 2 horas, eliminando los microorganismos y demás contaminantes provenientes de botaderos. Estos residuos poliméricos son dirigidos posteriormente a un proceso de trituración para obtener partículas más pequeñas del material, entendiendo que a menor área de partícula mayor área de contacto para la ejecución del proceso de biodegradación, (tomando como referencia un tamaño de 16 cm², el cual fue empleado en el presente trabajo). Finalmente, se realiza una operación de tamizado en un tamiz vibratorio para verificar que el tamaño sea acorde a las especificaciones para que la biodegradación y la colonización del material sea estable y predecible.

En tercer lugar, correspondiente a la etapa de inicio a escala laboratorio, se encuentra el acondicionamiento del microorganismo para mediar la biodegradación del material. El proceso inicia con la incubación de la cepa de *Aspergillus brasiliensis* en medio sólido a 30°C en una incubadora durante 8 días. Transcurrido este tiempo la corriente 14 es sembrada en medio líquido a 30°C en *shaker* con agitación continua a 30°C a 120 rpm, dando como resultado el inóculo inicial. La corriente 16 será utilizada para el análisis de biomasa del proceso, la cual es llevada a una centrifuga por 20 minutos a 6000 rpm, seguido de un proceso de secado para retirar la humedad de la biomasa operado a 90°C por 3 días para conocer el porcentaje de biomasa total adicionada al proceso. Por otro lado, la corriente 15 será el tren de inóculo del proceso, realizando tres diferentes escalados con volumen de 2 L, 20 L y 200 L para llevar a escala industrial con un volumen final de 2.000 L.

La biodegradación se efectúa en un biorreactor industrial con un volumen de 2000 L, teniendo como entradas la corriente 6, siendo este el medio de cultivo líquido, el LDPE en la corriente 11, el microorganismo en la corriente 23 y en la corriente 24 el flujo de aire y como corrientes de salida el CO₂, nitrógeno y oxígeno en la corriente 25. El proceso se realiza a 20-22°C por 1 mes.

Transcurrido el mes de biodegradación se obtiene la corriente 26 que contiene la mezcla del microorganismo, el material degradado y el medio de cultivo, pasando por un tanque de mezclado de 2.000 L a 22 °C durante 5 minutos en la corriente 27 con el fin de romper la macro estructura de los hongos para facilitar la operación de separación posterior. Esta corriente pasa a un proceso de filtración para separar el microorganismo y el LDPE de la solución de medio de cultivo. La mezcla del microorganismo y el medio de cultivo presente

en la corriente 28, pasan por una centrifuga a 6.000 rpm por 20 minutos para obtener estos compuestos por separado.

La corriente 31 es sometida a un proceso de lavado con agua por 2 horas para eliminar del polietileno de baja densidad las trazas del microorganismo. Esta corriente pasa finalmente por un proceso de secado a 140°C para eliminar la humedad de las láminas y la inactivación de los microorganismos restantes para ser reciclado y utilizado en procesos industriales.

Cabe aclarar que cada equipo al ser sometido a procesos biológicos, requiere de la instalación de corrientes de servicio para la limpieza y esterilización de los mismos y de las líneas de corriente realizando CIP.

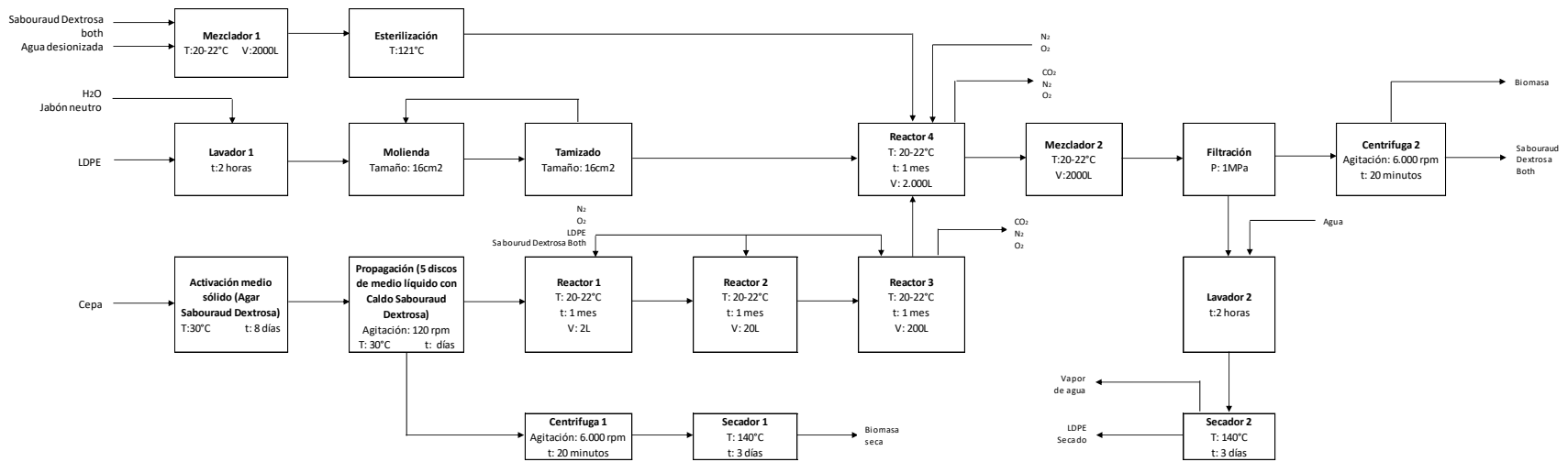
El proceso de biodegradación busca dar respuesta a la biodegradación del 0,10% de la cantidad de LDPE eliminado en Colombia, siendo este de 24 kg/año de basuras plásticas [90] en relación a revisiones bibliográficas, tomando como base el aprovechamiento del 7% de la cantidad mencionada anteriormente y estableciendo para el balance de masa una base de cálculo de 1,68 kg/año y un volumen de 2.000 L como capacidad del biorreactor industrial y producción de CO₂ de 25%. Adicionalmente a partir de los datos experimentales obtenidos en este estudio, se asume como flujo de aire 90 L/h y formación de biomasa de 2,56 g por cada 200 mL de medio de cultivo.

La Figura 58 representa el diagrama de bloques del proceso (BFD), identificando las etapas mencionadas anteriormente. En la Figura 59 y 60, se muestra en diagrama de flujo de proceso (PFD) con su respectivo balance de masa, dando un acercamiento a un diseño conceptual de ingeniería.

Debido a que el medio de cultivo líquido utilizado para la ejecución del proyecto a escala industrial (Caldo Sabouraud Dextrosa) representa un costo elevado en materias primas, se propone la implementación de residuos orgánicos que proporcionen las fuentes de carbono y nitrógeno necesarios para que el microorganismo pueda desarrollarse y así mismo llevar a cabo un proceso de biodegradación mucho más rentable económicamente.

Figura 58.

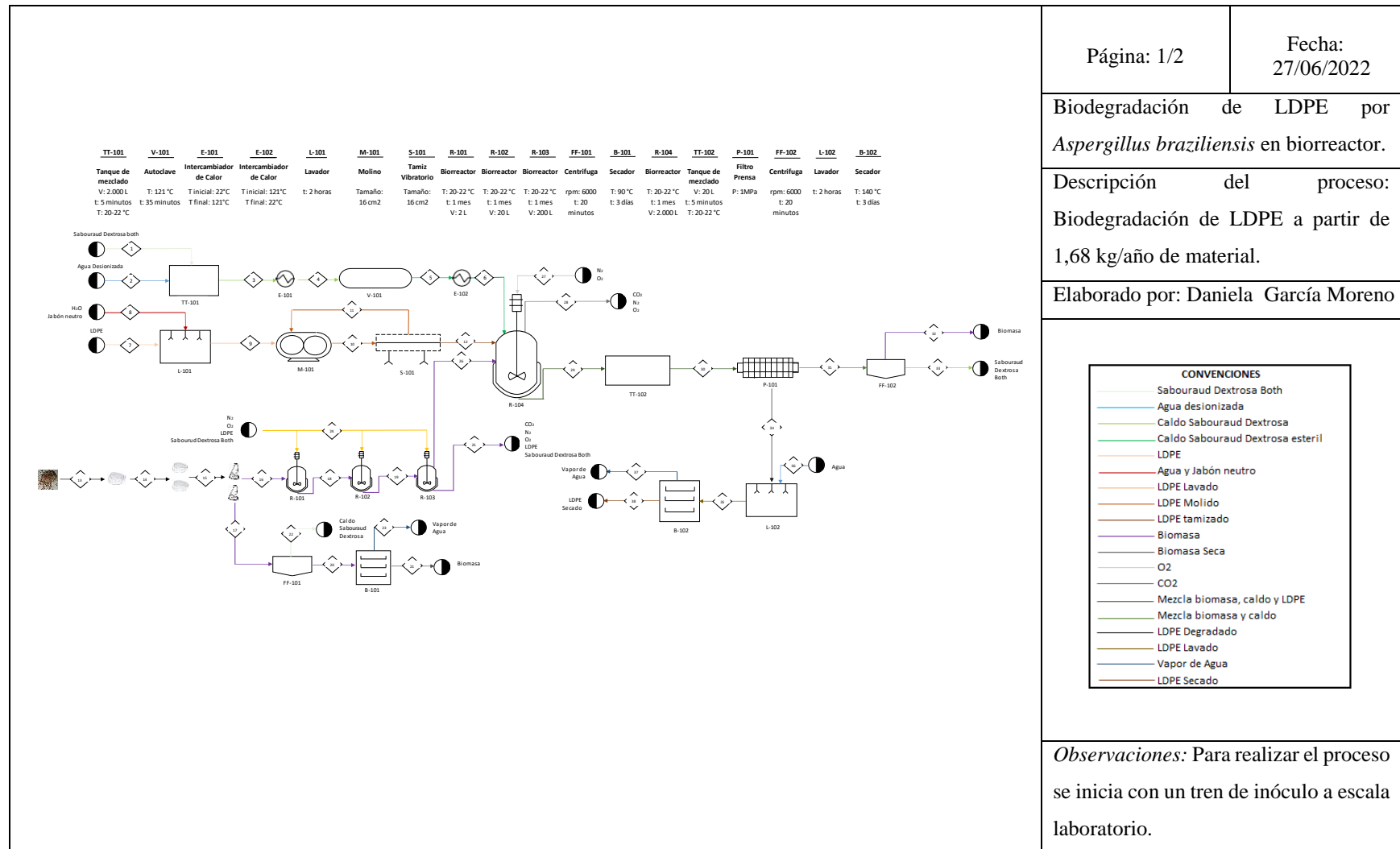
Diagrama de bloques del proceso.



Nota. La figura representa el diagrama de bloques del proceso de biodegradación por fermentación líquida sumergida.

Figura 59.

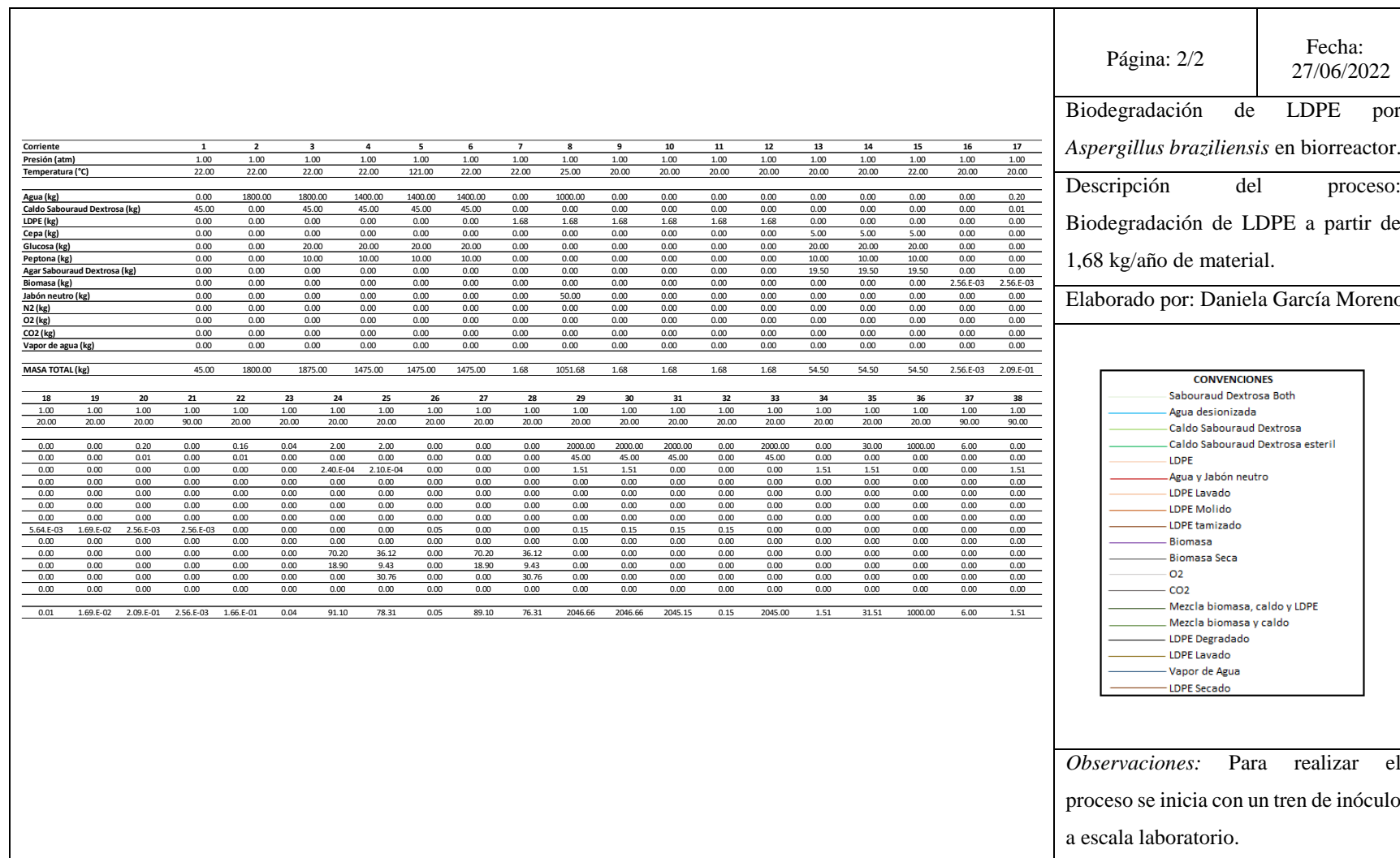
Diagrama PFD del proceso de biodegradación.



Nota. La figura representa el diagrama PFD del proceso de biodegradación por fermentación líquida sumergida.

Figura 60.

Balance de masa del proceso de biodegradación.



Nota. La figura representa el balance de masa del proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida

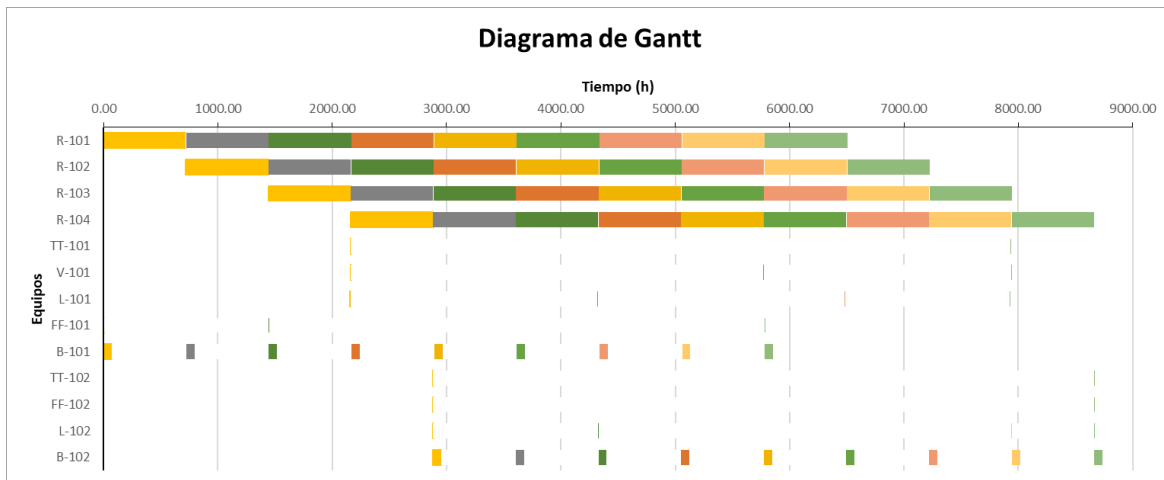
Como la biodegradación ex situ del polietileno de baja densidad es un proceso batch, es necesario efectuar el diagrama de programación de proceso más conocido como diagrama Gantt en el cual, se toman a consideración la duración de cada uno de los equipos involucrados en el proceso.

Los reactores involucrados en el tren de inóculo funcionan en serie, por tal motivo cada uno tiene una duración de 1 mes en donde, el tiempo final del reactor R-101 será el tiempo inicial del reactor R-102 y así sucesivamente con el reactor R-103. En cuanto al reactor R-104, el tiempo inicial de este será el tiempo final del reactor R-103 ocurriendo al mismo tiempo de su operación los procesos de acondicionamiento del medio de cultivo y del polietileno de baja densidad.

Al terminar el proceso en el reactor R-104, comienza a funcionar los equipos posteriores a la caracterización del material y disposición del microorganismo y del medio de cultivo con un tiempo total de duración de proceso de **2954,08 horas** correspondiente a un lote. Para efectuar el proceso al cabo de 1 año (8640,00 horas), se necesita un total de **9 lotes** para su funcionamiento. En la Figura 61 se observa el diagrama de Gantt del proceso.

Figura 61.

Diagrama de Gantt del proceso de biodegradación.



Nota. La figura representa el diagrama de Gantt del proceso de biodegradación del polietileno de baja densidad mediado por *Aspergillus brasiliensis* en biorreactor.

5. CONCLUSIONES

Con base en la revisión bibliográfica sobre los procesos de biodegradación de polietileno de baja densidad mediado por hongos, se evidenció un aumento de investigaciones realizadas del 2017 al 2021, destacando las matrices en procesos de compostaje, cultivo mixto, degradación in vitro, fermentación líquida sumergida, fotooxidación UV, exposición directa del polímero en un cultivo microbiano, pretratamiento por biocompuestos y fitogenética, encontrando que los hongos filamentosos más versátiles para llevar a cabo el proceso son el género *Aspergillus*, *Penicillium*, *Pleurotus ostreatus*, *Rhizopus oryzae* y *Trichoderma viride*.

Así mismo, en cuanto a la revisión bibliográfica de las condiciones de operación para la efectividad del proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida, se evidenció una mayor investigación de esta variable entre los años 2019 al 2021, identificando que las condiciones que propician el crecimiento son: medio de cultivo con el suministro de dextrosa como fuente de carbono y peptona como fuente de energía, temperatura entre 20 a 35°C, pH entre 5 y 6 y transferencia de oxígeno con el suministro de flujo de aire.

El efecto de *Aspergillus brasiliensis* resulta eficaz para el proceso de biodegradación ex situ del polietileno de baja densidad efectuado en fermentación líquida sumergida, determinando que el microorganismo agota la fuente de carbono suministrada por el medio de cultivo, teniendo la necesidad de usar el polímero para seguir con su crecimiento. Se realizó la medición del grado de biodegradación de las láminas de LDPE siendo este alrededor de +/- 1,89% al cabo de 30 días. Se identifica adicionalmente a partir de análisis de caracterización como lo son el análisis de microscopia de barrido (SEM) y espectroscopia infrarroja por transformada de Fourier (FTIR) la aparición de grietas y ruptura de la estructura del material, ocasionando la formación de biopelículas por la adhesión de las hifas a la superficie, evidenciando la viabilidad y efectividad del proceso de biodegradación y colonización del microorganismo mediador para tal fin.

BIBLIOGRAFÍA

- [1] Expansión. (2019). 10 cifras de la ONU para mostrar el daño que los plásticos le hacen al planeta [en línea]. Disponible en: <https://expansion.mx/vida-arte/2019/07/03/10-cifras-de-la-onu-para-mostrar-el-dano-que-los-plasticos-le-hacen-al-planeta>
- [2] Cámara de Comercio de Bogotá. (2019). Colombia entierra anualmente 2 billones de pesos en plástico que se puede reciclar [en línea]. Disponible en: <https://www.ccb.org.co/Clusters/Cluster-deComunicacion-Grafica/Noticias/2019/Julio-2019/Colombia-entierra-anualmente-2-billones-de-pesos-en-plasticos-que-se-pueden-recicla>
- [3] H, Mogollón y L, Sarmiento. "Utilización de inóculos microbianos para la biodegradación de películas de ácido poliláctico" INVESTIGACIÓN FORMATIVA EN INGENIERÍA. En: Colombia ISBN: 978-958-52333-5-5 ed: Editorial Instituto Antioqueño de Investigación , v. , p.616 - 623 ,2020
- [4] Revista PD. (1979). Industria de productos de plástico [en línea]. Disponible en: https://colaboracion.dnp.gov.co/CDT/RevistaPD/1979/pd_vXI_n2_1979_art.4.pdf
- [5] Escuela Colombiana de Ingeniería, "Identificación de plástico curso de materiales", ed. 2008-1, pp 1-30, 200
- [6] La República. (2021). La industria del plástico creció 22,2% frente a 2020 en el primer semestre [en línea]. Disponible en: <https://www.larepublica.co/especiales/la-revolucion-del-plastico/la-industria-del-plastico-crecio-222-frente-a-2020-en-el-primer-semester-3233461>
- [7] F. W. Billmeyer. Ciencia de los polímeros. 2nd. Ed. New York: Reverté, S.A. 1975.
- [8] E. Hermida. Polímeros. Capítulo 9. 2011. [en línea]. Disponible en: http://www.inet.edu.ar/wp-content/uploads/2012/11/09_Polimeros.pdf
- [9] A, Lendlein. Polymers in biomedicine, Macromol Biosci. 10 (2010) 993-997

- [10] J, Luna. Polímeros en medicina: aplicaciones actuales y tendencias futuras. 2018
- [11] J, Sanchís. “*Propiedades y aplicaciones de los polímeros sintéticos en la construcción*”. Escuela Técnica Superior de Arquitectura. 2018. [en línea]. Disponible en: https://riunet.upv.es/bitstream/handle/10251/116197/memoria_21013004.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [12] V. L. Ramos Rivero. Evolución del uso de los materiales plásticos en la industria automotriz. 2018.
- [13] M. Beltrán y A. Marcilla. Tecnología de Polímeros. Estructura y propiedades de los polímeros. [en línea]. Disponible en: https://rua.ua.es/dspace/bitstream/10045/16883/1/Tema_1._Estructura_y_propiedades_de_los_polimeros.pdf
- [14] A, Salas. (2005). Tecnología de las películas multicapa. Capítulo 3 [en línea]. Disponible en: <https://docplayer.es/76053087-Capitulo-3-3-tecnologia-de-las-peliculas-multicapa-debido-a-que-el-presente-estudio-radica-en-peliculas-multicapa-de.html>
- [15] C, Ararat y E, Murillo. Polietileno de baja densidad funcionalizado con un poliéster polirol altamente ramificado maleinizado, *Ingeniería y ciencia*, vol. 12, no. 23, pp. 127-144, January 2016. Disponible en: <http://www.scielo.org.co/pdf/ince/v12n23/v12n23a08.pdf>
- [16] INVIMA, “Plan nacional subsectorial de vigilancia y control de migración específica de sustancias químicas en envases que están en contacto con alimentos y bebidas de consumo humano”. INVIMA, [En Línea]. Disponible en: <https://www.invima.gov.co/documents/20143/441038/Documento-tecnico-Programa-MOESa%C3%B1o-2016-publicari.pdf/11d9b56f-68ef-587d-7cc0-8b4f54a39c0d> [Acceso: nov. 11, 2021]
- [17] M. Gilbert. (2017). Brydson’s Plastics Materials. (8va ed.) [En línea]. Disponible en: https://app.knovel.com/web/toc.v/cid:kpBPME0001/viewerType:toc//root_slug:brydson_splastics-materials/url_slug:relation-structure-electrical?issue_id=kpBPME000

- [18] D.C., Múnera Parra. “*Degradación del polietileno de baja densidad por Aspergillus Niger*”, tesis pre. Facultad de ingeniería”, Universidad de los Andes, Bogotá, Colombia, 2014. [en línea]. Disponible en: <https://repositorio.uniandes.edu.co/flexpaper/handle/1992/16469/u686780.pdf?sequence=1&isAllowed=y#page=1>
- [19] Norma ASTM D6954-04, Standard guide for exposing and testing plastics that degrade in the environment by a combination of oxidation and biodegradation, 2013
- [20] Norma ASTM D5988-03, Standard test method for determining aerobic biodegradation in soil of plastic materials or residual plastic materials after composting, 2012
- [21] Norma ASTM D5338-15, Standard test method for determining aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions, incorporating thermophilic temperatures, 2021
- [22] AA, Shah, F, Hasan, A Hameed, S, Ahmed. “Degradación biológica de los plásticos: una revisión completa”. *Avances en biotecnología*, vol 26, pp. 246-265, 2018.
- [23] N, Ojha, N, Pradhan, S, Singh, A, Barla, A, Shrivastava, P, Khatua, & S, Bose. “Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization”. *Scientific Reports*, vol 7, no 1, pp. 1-13, January 2017.
- [24] L. M., Yepes Aguirre. “*Degradación de polietileno de baja densidad utilizando hongos. Revisión sistemática de la literatura*”, tesis pre. Facultad de ciencias. Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia, 2014. [en línea]. Disponible en: <https://repository.javeriana.edu.co/bitstream/handle/10554/16184/YepesAguirreLauraMaria2014.pdf?sequence=1&isAllowed=y>
- [25] S, Sheik, K. R, Chandrashekar, K, Swaroop, & H. M, Somashekarappa. “Biodegradation of gamma irradiated low density polyethylene and polypropylene by endophytic fungi”. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol 105, pp. 21-29, November 2015.

- [26] J, Peixoto, LP, Silva y RH, Kruger. “El suelo del Cerrado brasileño revela un microbiano sin explotar potencial de biodegradación del polietileno no tratado previamente”. *Revista de materiales peligrosos*, pp. 634– 644, 2017
- [27] J, Restrepo-Flórez, A, Bassi y M, Thompson. “Degradación microbiana y deterioro de poli etileno: una revisión”. *Biodeterioro y biodegradación internacional*, vol 88, pp. 83–90, 2014
- [28] S, Parte, VL, Sirisha y JS, D'Souza. “Aplicaciones biotecnológicas de enzimas marinas de algas, bacterias, hongos y esponjas”. *Investigación avanzada en alimentación y nutrición*, vol 80, pp. 75-106, 2017
- [29] HI, Abdel-Shafy y MSM, Mansour. “Degradación microbiana de hidrocarburos en el medio ambiente ment: Una descripción general”. *En V. Kumar, M. Kumar y R. Prasad (Eds.), Acción microbiana sobre hidrocarburos*, pp. 353–386, 2018 Singapur: Springer
- [30] L, Espinoza. “Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos”, tesis pre. Universidad San Francisco de Quito USFQ, Quito, 2018. [en línea]. Disponible en: <https://repositorio.usfq.edu.ec/handle/23000/7410>
- [31] L, Calcetero. Biodegradación de láminas de polietileno de baja densidad LDPE pretratadas por radiación UV, en humus de lombriz y *Aspergillus brasiliensis*. *Desarrollo e innovación en ingeniería*. Vol 1, ed 6, pp. 425-433. 2021.
- [32] EO, Esan, L, Abbey, S, Yurgel. “Explorando el efecto a largo plazo del plástico en el microbioma del compost”. *PLoS ONE*, vol 14, 2019. Disponible en: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214376>
- [33] L, Calcetero y J, Mancera. “Evaluación del proceso de colonización y degradación de polietileno de baja densidad por inóculo de *Aspergillus niger* en humus y compostaje doméstico”, tesis pre. Facultad de ingenierías. Fundación Universidad de América, Bogotá, Colombia, 2021. [en línea]. Disponible en: <https://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/8303/1/6161802-2021-1-IQ.pdf>

- [34] A, Esmaeili, A.A, Pourbabae, H.A, Alikhani, F, Shabani, & Esmaeili, E. “Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by mixed culture of *Lysinibacillus xylanilyticus* and *Aspergillus niger* in soil”. *Plos one*, vol 8, no 9, September 2013.
- [35] M. T, El-Sayed, G. H, Rabie, & E. A, Hamed. “Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) using the mixed culture of *Aspergillus carbonarius* and *A. fumigates*”. *Environment, Development and Sustainability*, pp. 1-29, january 2021.
- [36] F, Ameen, M, Moslem, S, Hadi, & A. E, Al-Sabri. “Biodegradation of Low Density Polyethylene (LDPE) by Mangrove fungi from the red sea coast”. *Progress in Rubber Plastics and Recycling Technology*, vol 31, no 2, pp. 125-143, march 2015.
- [37] J. P.C., Guerrero Cabrera. “Aplicación de microorganismos fúngicos para la degradación “in vitro”, de polímeros sintéticos a nivel laboratorio, Lima-2020”, tesis pre. Facultad de ingeniería y arquitectura, Universidad Cesar Vallejo, Lima, Perú, 2020. [en línea]. Disponible en: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/54839>
- [38] C. F, Mandenius. (2016). *Biorreactores - Diseño, Operación y Nuevas Aplicaciones - 1.1 Introducción*. John Wiley & Sons. Obtenido de <https://app.knovel.com/hotlink/pdf/id:kt011HYNQ8/bioreactors-design-operation/introduction>
- [39] A. A., Torres Herrera. “Efectividad del hongo *Aspergillus niger* en la biodegradación de polietileno de baja densidad”, tesis pre. Facultad de ingeniería y arquitectura. Universidad Cesar Vallejo, Lima, Perú, 2020. [en línea]. Disponible en: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/50246?locale-attribute=es>
- [40] A. M., Hermoza Rojas. “Biodegradación microbiana de polietileno de baja densidad, bajo condiciones térmicas controladas en biorreactor air lift, en Santa Clara-Lima 2019”, tesis pre. Facultad de ingeniería y arquitectura. Universidad Cesar Vallejo, Lima, Perú, 2019. [en línea]. Disponible en: <https://repositorio.ucv.edu.pe/handle/20.500.12692/51943?locale-attribute=es>

- [41] K, Malachová, Č Novotný, G, Adamus, N, Lotti, Z, Rybková, M, Soccio, ... & Fava, F. “Ability of *Trichoderma hamatum* Isolated from Plastics-Polluted Environments to Attack Petroleum-Based, Synthetic Polymer Films”. *Processes*, vol 8, no 4, 467, april 2020.
- [42] M. P, Das, S, Kumar, J, & Das. “Fungal-mediated deterioration and biodegradation study of low-density polyethylene (LDPE) isolated from municipal dump yard in Chennai, India”. *Energy, Ecology and Environment*, vol 3, no 4, pp. 229-236, 2018.
- [43] J, Abraham, E, Ghosh, P, Mukherjee, & A, Gajendiran. “Microbial degradation of low density polyethylene”. *Environmental Progress & Sustainable Energy*, vol 36, no 1, pp. 147-154, 2017
- [44] A. K, Chaudhary, K, Chaitanya, R, Dalmia, & R.P, Vijayakumar. “Synergistic effect of UV, thermal, and chemical treatment on biological degradation of low-density polyethylene (LDPE) by *Thermomyces lanuginosus*”. *Environmental Monitoring and Assessment*, vol 193, no 8, pp. 1-11, july 2021.
- [45] C, Muhonja, H, Makonde, G, Magoma, & M, Imbuga. “Biodegradability of polyethylene by bacteria and fungi from Dandora dumpsite Nairobi-Kenya”. *PloS one*, vol 13, no 7, January 2018.
- [46] D, Uribe, D, Giraldo, S, Gutiérrez y F, Merino. “Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú”, vol. 17, pp. 133-136, 2010.
- [47] S. K, Ghosh, & S, Pal. “De-polymerization of LDPE plastic by *Penicillium simplicissimum* isolated from municipality garbage plastic and identified by ITSs locus of Rdna”. *Vegetos*, vol 34, no 1, pp. 57-67, January 2021.
- [48] I. O, Kunlere, O. E, Fagade, & B. I, Nwadike. “Biodegradation of low density polyethylene (LDPE) by certain indigenous bacteria and fungi”. *International Journal of Environmental Studies*, vol 76, no 3, pp. 428-440, march 2019.

- [49] S. P, Santacoloma-Londoño, M. E, Buitrago-González, V, Lamus-Molina, S, Asprilla-Asprilla, J. E, Ruíz-Terán, L. C, & Villegas-Méndez. “Evaluation of the biodegradation of polyethylene, polystyrene and polypropylene, through controlled tests in solid suspension with the fungus *Aspergillus flavus*”. *Scientia et Technica*, vol 24, no 3, pp. 532-540, September 2019.
- [50] G. C, DSouza, R. S, Sheriff, V, Ullanat, A, Shrikrishna, A. V, Joshi, L, Hiremath, & K, Entoori. “Fungal biodegradation of low-density polyethylene using consortium of *Aspergillus* species under controlled conditions”. *Heliyon*, vol 7, no 5, 2021.
- [51] S, Khruengsai, T, Sripahco, & P, Pripdeevech. “Low-Density Polyethylene Film Biodegradation Potential by Fungal Species from Thailand”. *Journal of Fungi*, vol 7, no 8, 594, July 2021.
- [52] E, Munir, R. S. M, Harefa, N, Priyani, & D, Suryanto. “Plastic degrading fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* isolated from local landfill soil in Medan”. In *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*, vol 126, no 1, p.p 012145, March 2018.
- [53] M, Hikmah, R, Setyaningsih, & A, Pangastuti. “The Potential of Lignolytic *Trichoderma* Isolates in LDPE (Low Density Polyethylene) Plastic Biodegradation”. In *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, vol. 333, no 1, pp. 012076, March 2018.
- [54] L. D, Gómez-Méndez, D. A, Moreno-Bayona, R. A, Poutou-Piñales, J. C, Salcedo-Reyes, A. M, Pedroza-Rodríguez, A, Vargas, & J. M, Bogoya. “Biodeterioration of plasma pretreated LDPE sheets by *Pleurotus ostreatus*”. *PloS one*, vol 13, no 9, September 2018.
- [55] V, Jayaprakash, & U. M. D, Palempalli. “Effect of Palmitic Acid in the Acceleration of Polyethylene Biodegradation by *Aspergillus oryzae*”. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol 12, no 4, pp. 2259-2269, December 2018.

- [56] E, Sanniyasi, R. K, Gopal, D. K, Gunasekar, & P. P, Raj. “Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) sheet by microalga, *Uronema africanum* Borge”. *Scientific Reports*, vol 11, no 1, pp. 1-33, 2021.
- [57] S, Awasthi, N, Srivastava, T, Singh, D, Tiwary, & P. K, Mishra. “Biodegradation of thermally treated low density polyethylene by fungus *Rhizopus oryzae* NS 5”. *Biotech*, vol 7, no 1, 73, march 2017.
- [58] P, Ávila. E, Morán. “*Estudio comparativo de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos como es Aspergillus y Penicillium*”, tesis pre. Facultad de ciencias químicas. Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador, 2020-2021. (PDF)
- [59] R. R, Ali, A. W. A, Rahman, R. M, Kasmani, N, Ibrahim, H, Hasbullah, A. N, Sadikin, & E, Abouzari. “Pineapple peel fibre biocomposite: Characterization and biodegradation studies”. *Chemical engineering transactions*, vol 56, pp. 1333-1338, 2017.
- [60] C, Ndahebwa Muhonja, G, Magoma, M, Imbuga, & H. M, Makonde. “Molecular characterization of low-density polyethene (LDPE) degrading bacteria and fungi from Dandora dumpsite, Nairobi, Kenya”. *International journal of microbiology*, 2018.
- [61] J, Cuevas. “Los hongos: Héroes y villanos de la prosperidad humana”, *revista digital universitaria*, vol. 17, no. 9, pp. 1-12, september 2016. Available: <http://www.revista.unam.mx/vol.17/num9/art69/art69.pdf>
- [62] R, Arenas. (2014). *Micología Médica Ilustrada*. (5ta. ed.). México D.F.: Mc. graw-Hill Interamericana Editores, S.A. de C.V.
- [63] M, García y R, Sánchez. “Estudio de la concentración fúngica aérea de los depósitos del archivo municipal de Cárdenas, Cuba”, *revista de la sociedad venezolana de microbiología*, vol. 32, pp. 37-43, march 2012. Available: <http://ve.scielo.org/pdf/rsvm/v32n1/art08.pdf>
- [64] R, Anselmo y R, Flores. “*Actividad antimicótica del extracto etanólico de las hojas de *lomanthus truxillensis* cabrera en cepas de *candida albicans* atcc 10231 y *aspergillus**”

- braziliensis atcc 16404, in vitro*”, tesis pre. Facultad de ciencias farmacéuticas y bioquímica. Universidad Inca Garcilaso de la Vega, Lima, Perú, 2018. [en línea]. Disponible en: http://intra.uigv.edu.pe/bitstream/handle/20.500.11818/2628/TESIS_Anselmo%20Ram%20os%20-%20Flores%20%20Huertas.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [65] Wickham. (2017). *Aspergillus braziliensis* [en línea]. Disponible en: <https://wickhamlabs.co.uk/wpcontent/uploads/2017/09/FACT-SHEET-Aspergillus-braziliensis-25.08.17.pdf>
- [66] S. Shukla, D.-H. Kim, S.H. Chung, M. Kim, *Chapter 28 - Occurrence of Aflatoxins in Fermented Food Products*, *Fermented Foods in Health and Disease Prevention*, Academic Press, 2017, pp. 653-674. [en línea]. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802309-9.00028-5>.
- [67] J, Muñoz y D, Zapata. “*Evaluación de la obtención de celulosa partiendo del buchón de agua (eichhornia crassipes) mediante la hidrolisisbásica y el proceso enzimático del hongo pleurotus ostreatus*”, tesis pre. Facultad de Ingenierías. Universidad de América, Bogotá, Colombia, 2019. [en línea]. Disponible en: <http://repository.uamerica.edu.co/bitstream/20.500.11839/7605/1/6132185-2019-2-IQ.pdf>
- [68] D.A, Johnnie, R, Issac, & M. L, Prabha. “Bio Efficacy Assay of Laccase isolated and Characterized from *Trichoderma viride* in Biodegradation of Low Density Polyethylene (LDPE) and Textile Industrial Effluent Dyes”. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, vol 15, no 1, pp. 410-421, march 2021.
- [69] Universidad Nacional Autónoma de México. Análisis térmico. [en línea]. Disponible en: <https://quimica.unam.mx/investigacion/servicios-para-la-investigacion/usaii/analisis-termico/>
- [70] Universidad de Burgos. (2020). Microscopia de fuerza atómica (AFM). [en línea]. Disponible en: <https://www.ubu.es/parque-cientifico-tecnologico/servicios-cientifico-tecnicos/microscopia/microscopia-de-fuerza-atmica-afm>

- [71] A, Bonifaz. (2014). *Micología Médica Básica*. (4ta ed.). México: Mac Graw - Hill. Interamericana Editores, S. A .de C.V.
- [72] V. C., González Alcos. “Capacidad biodegradativa de hongos filamentosos frente al polietileno”, tesis doc. Doctorado en ciencias de la salud. Universidad Nacional del Altiplano, Puano, Perú, 2019. [en línea]. Disponible en: http://repositorio.unap.edu.pe/bitstream/handle/UNAP/12254/Vicky_Cristina_Gonzales_Alcos.pdf?sequence=1&isAllowed=y
- [73] Becton Dickinson, “BBL Sabouraud Dextrose Agar BBL Sabouraud Dextrose Agar with Chloramphenicol”, Becton Dickinson company BD, Maryland L007492 Rev. 08, Marzo 2007, pp.1 - 4. [En línea] Disponible en: [https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007492\(08\)\(0307\)_ES.pdf](https://legacy.bd.com/europe/regulatory/Assets/IFU/US/L007492(08)(0307)_ES.pdf)
- [74] Condalab. (2019, mayo 13). Caldo Sabouraud Dextrosa EP/USP. [en línea]. Disponible en: https://www.condalab.com/int/en/index.php?controller=attachment&id_attachment=8466#:~:text=Caldo%20Dextrosa%20Sabouraud%20es%20un,muestras%20cl%C3%A9nicas%20y%20otros%20materiales.
- [75] Tecnal. (2019). Azúcares reductores en alimentos y bebidas [en línea]. Disponible en: https://tecnal.com.br/es/blog/266_azucares_reductores_en_alimentos_y_bebidas
- [76] M. M, Moreano Pilatasig. “Determinación de azúcares reductores y su relación con carbohidratos no absorbidos en niños (a) del centro de educación inicial “María Montessori” del Cantón Latacunga en el periodo 2014-2015”. Tesis pre. Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad Técnica de Ambato, Ecuador. 2015.
- [77] Cerveza artesana. (2019). Los azúcares del vino [en línea]. Disponible en: <https://catatu.es/blog/el-azucar-en-el-vino/>
- [78] R, Hortsch, A, Stratmann, & D, Weuster-Botz. “New milliliter-scale stirred tank bioreactors for the cultivation of mycelium forming microorganisms”. *Biotechnology and bioengineering*, vol 106, no 3, pp. 443-451, February 2010.

- [79] J. Ren, Z. Wang, L. Deng, D. Niu, Z. Li, L. Dong, ... & C. Li. "Degradation of Erythromycin by a Novel Fungus, *Penicillium oxalicum* RJJ-2, and the Degradation Pathway". *Waste and Biomass Valorization*, vol 12, no 8, pp. 4513-4523. 2021
- [80] J. G. Zhang, T.T. Fang, Q. L. Li, & Z. J. Wei. "Production of cordycepin by *Cordyceps militaris* using submerged liquid culture: Optimization of the culture medium and repeated batch fermentation". *J Food Agric Environ*, vol 11, pp. 534-538, January 2013.
- [81] L. D. Lario, O. S. Pillaca-Pullo, L. D. Sette, A. Converti, P. Casati, C. Spampinato, & A. Pessoa. "Optimization of protease production and sequence analysis of the purified enzyme from the cold adapted yeast *Rhodotorula mucilaginosa* CBMAI 1528". *Biotechnology Reports*, vol 28, october 2020.
- [82] Z. Zhang, A. M. Shah, H. Mohamed, N. Tsiklauri, & Y. Song, Y. "Isolation and Screening of Microorganisms for the Effective Pretreatment of Lignocellulosic Agricultural Wastes". *BioMed Research International*. 2021.
- [83] G. Olivieri, A. Marzocchella, P. Salatino, P. Giardina, G. Cennamo, & G. Sannia. "Olive mill wastewater remediation by means of *Pleurotus ostreatus*". *Biochemical Engineering Journal*, vol 31, no 3, pp. 180-187, july 2006.
- [84] J. Ramsay, M. Shin, S. Wong, & C. Goode. "Amaranth decoloration by *Trametes versicolor* in a rotating biological contacting reactor". *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, vol 33, no 9, pp. 791-795, april 2006.
- [85] O. F. von Meien, L. F. Luz, J. R. Pérez-Correa, & D. A. Mitchell. "Design of the Air Preparation System for SSF Bioreactors. In *Solid-State Fermentation Bioreactors*". Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 403-412., 2006.
- [86] J. Varga, S. Kocsube, B. Toth, J. C. Frisvad, G. Perrone, A. Susca, ... & R. A. Samson. "Aspergillus *braziliensis* sp. nov., a biseriata black *Aspergillus* species with world-wide distribution". *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, vol 57, no 8, pp. 1925-1932. 2007.

- [87] A, Suresh, R. A, Alex, & J, Abraham. “Fungal Mediated Conversion of Food Waste to Compost”. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, vol 15, no 6, pp. 4-9. 2021
- [88] R, Sánchez-Herrera, L. L, Flores-Villavicencio, I, Padilla-Guerrero, G, Barbosa-Sabanero & M, Sabanero-López. Formación de biopelículas en el hongo patógeno *Sporothrix schenckii*: desarrollo, arquitectura y características bioquímicas. *Acta Universitaria*, vol 24, no 2, pp. 11-15. 2014
- [89] J, Velandia. Identificación de polímeros por espectroscopia infrarroja. *ONTARE*, vol 5, p.p 115-140, 2017
- [90] Cámara de Comercio de Bogotá. (2019). Colombia entierra anualmente 2 billones de pesos en plásticos que se pueden reciclar [en línea]. Disponible en: <https://www.ccb.org.co/Clusters/Cluster-de-Comunicacion-Grafica/Noticias/2019/Julio-2019/Colombia-entierra-anualmente-2-billones-de-pesos-en-plasticos-que-se-pueden-reciclar>

ANEXOS

ANEXO 1.

ACONDICIONAMIENTO DEL MICROORGANISMO

En la Figura 1 se evidencia la preparación final de la homogenización del medio de cultivo sólido (Agar Sabouraud Dextrosa) o líquido (Caldo Sabouraud Dextrosa).

Figura 1.

Preparación final medio de cultivo.



Nota. Esta figura representa la mezcla homogenizada del medio de cultivo sólido o líquido con agua destilada luego de agitación continua.

En cuanto a la producción de biomasa del microorganismo en la Figura 2 se evidencia el banco elaborado para el proceso junto con la producción de biomasa producida al cabo de 8 días en agitación continua de 120 rpm en *shaker* evidenciado en la Figura 3.

Figura 2.

Banco de trabajo.



Nota. Esta figura representa el resultado final de la elaboración del banco de trabajo.

Figura 3.

Producción de biomasa.

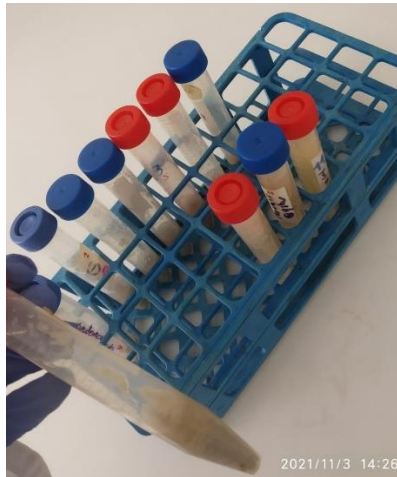


Nota. Esta figura representa la producción de biomasa con la presencia de pellets en el medio de cultivo.

De igual manera se lleva a cabo la evaluación de peso seco dando como resultado la separación del producto de interés después del proceso de centrifuga a 6000 rpm y de secado a 90°C por 3 días como se muestra en las Figuras 4 y 5 respectivamente.

Figura 4.

Distribución de biomasa después de proceso de centrifuga.



Nota. Esta figura representa la distribución de la biomasa después de centrifugar la muestra homogenizada.

Figura 5.

Resultado de biomasa después de proceso de secado.



Nota. Esta figura representa el resultado de biomasa seca después de proceso de secado.

ANEXO 2.

DETERMINACIÓN DE PESO SECO

A continuación, en la Tabla 1 y 2 se evidencian los cálculos para la determinación de peso seco para el inóculo inicial y el peso seco final del proceso de biodegradación respectivamente.

Tabla 1.

Evaluación de biomasa producida por la evaluación de peso seco al inicio del proceso.

Peso Seco Para la Corrida del Biorreactor (Réplica 1)																
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12	Tubo 13	Tubo 14	Tubo 15	Tubo 16
Pi (g)	5,7457	5,4665	5,6679	5,5065	5,2138	5,9288	5,2258	5,8350	5,5156	5,9214	5,5529	5,8527	5,5812	5,7372	5,4916	5,2437
Pf (g)	5,8232	5,5591	5,7531	5,5892	5,2900	6,0018	5,2965	5,9342	5,5913	6,0252	5,6650	5,9515	5,6812	5,832	5,5842	5,2704
Peso seco (g)	0,7749	0,0926	0,0852	0,0827	0,0762	0,0730	0,0707	0,0992	0,0757	0,1038	0,1121	0,0988	0,0999	0,0948	0,0926	0,0267

Peso Seco Para la Corrida del Biorreactor (Réplica 2)																
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12	Tubo 13	Tubo 14	Tubo 15	Tubo 16
Pi (g)	4,8002	4,8404	4,8470	4,8982	4,8778	4,8658	4,8659	4,8645	4,8356	4,9089	4,8642	4,8367	4,8662	4,8004	4,9331	4,8646
Pf (g)	4,8710	4,9258	4,9384	5,0039	4,9650	5,0287	4,8857	4,8754	4,9823	4,9382	4,9080	4,9380	4,9204	4,8497	5,0586	4,9290
Peso seco (g)	0,0708	0,0854	0,0914	0,1057	0,0872	0,1629	0,0198	0,0109	0,1467	0,0293	0,0438	0,1013	0,0542	0,0493	0,1255	0,0644

Peso Seco Para la Corrida del Biorreactor (Réplica 3)																
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10	Tubo 11	Tubo 12	Tubo 13	Tubo 14	Tubo 15	Tubo 16
Pi (g)	4,8643	4,8584	4,8349	4,9336	4,8585	4,8599	4,8587	4,8454	4,8741	4,8292	4,8926	4,9314	4,8705	4,8333	4,7933	4,8306
Pf (g)	4,9371	4,9331	4,9237	4,9890	4,9488	4,9502	4,9518	4,8893	4,9364	4,9002	4,9737	5,0001	4,9614	4,9057	4,8925	4,9110
Peso seco (g)	0,0728	0,0747	0,0888	0,0554	0,0903	0,0903	0,0931	0,0439	0,0623	0,0709	0,0811	0,0687	0,0909	0,0724	0,0992	0,0804

Media (g)	
Réplica 1	0,0851
Réplica 2	0,0780
Réplica 3	0,0772

Nota. Las tablas representan la evaluación de biomasa producida por la evaluación de peso seco al inicio del proceso de los 16 tubos falcón con 13 ml de biomasa para las tres réplicas realizadas.

Tabla 2.*Evaluación de biomasa producida por la técnica de peso seco al final del proceso.*

Peso Seco final para la Corrida del Biorreactor (Réplica 2)										
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
Pi (g)	10,0325	10,5782	10,0145	10,0467	10,9645	11,1443	10,9125	11,0713	11,1217	11,1733
Pf (g)	10,225	10,7754	10,2603	10,2393	11,1002	11,2771	11,0298	11,3145	11,2567	11,5156
Peso seco (g)	0,19245	0,1972	0,2458	0,1926	0,1357	0,1328	0,1173	0,2432	0,1350	0,3423
	Tubo 11	Tubo 12	Tubo 13	Tubo 14	Tubo 15	Tubo 16	Tubo 17	Tubo 18	Tubo 19	Tubo 20
Pi (g)	10,6704	10,5454	9,9221	9,8724	10,1397	9,7972	9,9213	9,8016	9,9022	10,0519
Pf (g)	10,8330	10,6820	10,1002	9,9473	10,2383	9,9706	10,0811	10,1121	10,0204	10,2011
Peso seco (g)	0,1626	0,1366	0,1781	0,0749	0,0986	0,1734	0,1598	0,3105	0,1182	0,1492
	Tubo 21	Tubo 22	Tubo 23	Tubo 24	Tubo 25	Tubo 26	Tubo 27	Tubo 28	Tubo 29	Tubo 30
Pi (g)	10,4296	11,0087	10,0359	9,7613	9,8577	9,8723	10,0197	10,5717	10,0540	10,0370
Pf (g)	10,7291	11,3495	10,2323	9,8753	9,9343	10,028	10,0935	10,6418	10,0873	10,1118
Peso seco (g)	0,2995	0,3408	0,1964	0,1139	0,0766	0,1557	0,0738	0,0701	0,0333	0,0748
	Tubo 31	Tubo 32	Tubo 33	Tubo 34	Tubo 35	Tubo 36	Tubo 37	Tubo 38	Tubo 39	Tubo 40
Pi (g)	10,9612	11,1348	10,9058	11,0747	11,1878	11,1822	10,7463	10,6119	9,9124	9,8605
Pf (g)	11,0369	11,2115	11,0176	11,1691	11,2334	11,2575	10,6606	10,7261	9,9202	9,8678
Peso seco (g)	0,0757	0,0767	0,1118	0,0944	0,0456	0,0753	0,0857	0,1142	0,0078	0,0073
Peso Seco final para la Corrida del Biorreactor (Réplica 3)										
	Tubo 1	Tubo 2	Tubo 3	Tubo 4	Tubo 5	Tubo 6	Tubo 7	Tubo 8	Tubo 9	Tubo 10
Pi (g)	10,0164	10,5673	10,0144	10,0363	10,9604	11,1362	10,9052	11,0605	11,1164	11,1671
Pf (g)	10,1766	10,7505	10,1583	10,1652	11,1096	11,2864	11,0617	11,1967	11,2661	11,3024
Peso seco (g)	0,1602	0,1832	0,1439	0,1289	0,1492	0,1502	0,1565	0,1362	0,1497	0,1353
	Tubo 11	Tubo 12	Tubo 13	Tubo 14	Tubo 15	Tubo 16	Tubo 17	Tubo 18	Tubo 19	Tubo 20
Pi (g)	10,6616	10,5244	9,9113	9,8636	9,8827	9,9198	10,0979	10,0360	9,7593	9,8992
Pf (g)	10,7916	10,6619	10,2140	10,1058	10,0306	10,0740	10,2285	10,1755	9,9067	10,0242
Peso seco (g)	0,1300	0,1375	0,3027	0,2422	0,1479	0,1542	0,1306	0,1395	0,1474	0,1250
	Tubo 21	Tubo 22	Tubo 23	Tubo 24	Tubo 25	Tubo 26	Tubo 27	Tubo 28	Tubo 29	Tubo 30
Pi (g)	10,0226	9,8582	10,4204	11,0063	9,8074	9,8124	9,9582	10,5042	9,9564	10,4807
Pf (g)	10,3198	10,1069	10,6609	11,2081	9,9577	9,9316	10,0835	10,6239	10,0837	10,5814
Peso seco (g)	0,2972	0,2487	0,2405	0,2018	0,1503	0,1192	0,1253	0,1197	0,1273	0,1007
	Tubo 31	Tubo 32	Tubo 33	Tubo 34	Tubo 35	Tubo 36	Tubo 37	Tubo 38	Tubo 39	Tubo 40
Pi (g)	10,0165	9,7975	9,8302	9,9834	10,0460	10,0179	9,9853	9,9813	10,4238	9,8316
Pf (g)	10,1225	9,9292	9,9603	10,1072	10,1354	10,0774	10,0253	10,0794	10,4966	9,9248
Peso seco (g)	0,106	0,1317	0,1301	0,1238	0,0894	0,0595	0,0399	0,0981	0,0728	0,0932

Media (g)**Réplica 2** 0,1363**Réplica 3** 0,1456

Nota. Las tablas representan la evaluación de biomasa producida por la técnica de peso seco recuperado al finalizar el proceso de los 40 tubos falcón con 50 ml de biomasa para las tres réplicas realizadas.

ANEXO 3.
AJUSTE DE pH

El valor del pH cumple un papel importante en el proceso, procurando que este se encuentre dentro de un rango entre 5 y 6, es por ello que al estar en un pH ácido o básico se requerirá de su ajuste. A continuación, se evidencian los cálculos realizados en cada uno de estos casos:

- **pH ácido:** Para su ajuste se utiliza una solución de hidróxido de sodio al 0.1 M en 50 ml.

$$M = \frac{n_{sto}}{L_{sln}}$$

$$0.1M = \frac{n_{sto}}{0.05L}$$

$$n_{sto} = 0.1M * 0.05L$$

$$n_{sto} = 0.005 \text{ moles}$$

$$n = \frac{g}{PM} ; \quad PM_{NaOH} = 40 \frac{g}{mol}$$

$$0.005 \text{ moles} = \frac{g}{40 \frac{g}{mol}}$$

$$g = 0.005 \text{ moles} * 40 \frac{g}{mol}$$

$$g = 0.2 \text{ g para } 50 \text{ ml}$$

- **pH básico:** Para su ajuste se utiliza una solución de ácido acético al 1 M en 40 ml.

$$PM_{CH_3COOH} = 60 \frac{g}{mol} ; \quad \rho_{CH_3COOH} = 1.05 \frac{g}{ml}$$

$$m = \rho * v ; \quad v = \frac{m}{\rho}$$

$$v = \frac{60 \text{ g}}{1.05 \frac{g}{ml}}$$

$$v = \frac{57.14 \text{ ml}}{1 \text{ L sln}}$$

$$v = \frac{57.14 \text{ ml} * 50 \text{ ml sln}}{1000 \text{ ml sln}}$$

$$v = 2.857 \text{ ml para } 50 \text{ ml}$$

ANEXO 4.

TABLA DE RESULTADOS pH Y TEMPERATURA DEL PROCESO

A continuación, se evidencia en la Tabla 3 los resultados de temperatura y pH obtenidos en cada una de las réplicas llevadas a cabo.

Tabla 3.

Tabla de resultados temperatura y pH del proceso.

Días	Réplica 1		Réplica 2		Réplica 3	
	pH.	T (°C)	pH.	T (°C)	pH.	T (°C)
1	5,40	20,00	5,61	20,00	5,57	20,00
3	5,35	22,00	5,67	19,00	5,33	19,00
5	5,12	20,00	5,59	20,00	5,54	19,00
7	5,11	18,00	5,60	20,00	5,52	19,00
9	5,38	20,00	5,62	19,00	5,59	18,00
11	5,40	21,00	5,64	18,00	5,60	18,00
13	5,49	22,00	5,57	19,00	5,58	18,00
15	5,21	21,00	5,51	19,00	5,62	18,00
17	5,01	22,00	5,61	18,00	5,56	18,00
19	5,09	21,00	5,56	18,00	5,61	19,00
21	5,13	20,00	5,57	18,00	5,60	19,00
23	5,47	21,00	5,68	18,00	5,50	18,00
25	5,40	20,00	5,6	18,00	5,54	18,00
27	5,42	21,00	5,54	18,00	5,57	19,00
29	5,46	21,00	5,61	19,00	5,60	18,00

Nota. La tabla representa los resultados obtenidos de temperatura y pH para cada una de las réplicas realizadas en el proceso de biodegradación al cabo de 30 días.

ANEXO 5.

CÁLCULOS GRADO DE BIODEGRADACIÓN

A continuación, se evidencian los cálculos realizados en cada una de las láminas de las réplicas llevadas a cabo en el proceso.

$$\%_{biodegradación} = \frac{P_{inicial} - P_{final}}{P_{inicial}} * 100$$

- **Porcentaje de biodegradación Réplica 1**

$$Lámina_1 = \frac{0,0271 \text{ g} - 0,0268 \text{ g}}{0,0271 \text{ g}} * 100 = 1,107\%$$

$$Lámina_2 = \frac{0,0272 \text{ g} - 0,0265 \text{ g}}{0,0272 \text{ g}} * 100 = 2,5735\%$$

$$Lámina_3 = \frac{0,0254 \text{ g} - 0,0249 \text{ g}}{0,0254 \text{ g}} * 100 = 1,9685\%$$

$$Lámina_4 = \frac{0,0274 \text{ g} - 0,0269 \text{ g}}{0,0274 \text{ g}} * 100 = 1,8248\%$$

$$Lámina_5 = \frac{0,0268 \text{ g} - 0,0261 \text{ g}}{0,0268 \text{ g}} * 100 = 2,6119\%$$

$$Lámina_6 = \frac{0,0253 \text{ g} - 0,0246 \text{ g}}{0,0253 \text{ g}} * 100 = 2,7668\%$$

$$Lámina_7 = \frac{0,0251 \text{ g} - 0,0249 \text{ g}}{0,0251 \text{ g}} * 100 = 0,7968\%$$

$$Lámina_8 = \frac{0,0256 \text{ g} - 0,0251 \text{ g}}{0,0256 \text{ g}} * 100 = 1,9531\%$$

$$Lámina_9 = \frac{0,0258 \text{ g} - 0,0254 \text{ g}}{0,0258 \text{ g}} * 100 = 1,5504\%$$

$$Lámina_{10} = \frac{0,0296 \text{ g} - 0,0291 \text{ g}}{0,0296 \text{ g}} * 100 = 1,6892\%$$

- **Porcentaje de biodegradación Réplica 2**

$$Lámina_1 = \frac{0,0231 \text{ g} - 0,0225 \text{ g}}{0,0231 \text{ g}} * 100 = 2,5974\%$$

$$Lámina_2 = \frac{0,0199 \text{ g} - 0,0195 \text{ g}}{0,0199 \text{ g}} * 100 = 2,0101\%$$

$$Lámina_3 = \frac{0,0195 \text{ g} - 0,019 \text{ g}}{0,0195 \text{ g}} * 100 = 2,5641\%$$

$$Lámina_4 = \frac{0,0212 \text{ g} - 0,0207 \text{ g}}{0,0212 \text{ g}} * 100 = 2,3585\%$$

$$Lámina_5 = \frac{0,0272 \text{ g} - 0,027 \text{ g}}{0,0272 \text{ g}} * 100 = 0,7353\%$$

$$Lámina_6 = \frac{0,02 \text{ g} - 0,0272 \text{ g}}{0,02 \text{ g}} * 100 = 2,1583\%$$

$$Lámina_7 = \frac{0,027 \text{ g} - 0,022 \text{ g}}{0,027 \text{ g}} * 100 = 1,3453\%$$

$$Lámina_8 = \frac{0,0218 \text{ g} - 0,0214 \text{ g}}{0,0218 \text{ g}} * 100 = 1,8349\%$$

$$Lámina_9 = \frac{0,0171 \text{ g} - 0,0168 \text{ g}}{0,0171 \text{ g}} * 100 = 1,7544\%$$

$$Lámina_{10} = \frac{0,0187 \text{ g} - 0,0184 \text{ g}}{0,0187 \text{ g}} * 100 = 1,6043\%$$

- **Porcentaje de biodegradación Réplica 3**

$$Lámina_1 = \frac{0,026 \text{ g} - 0,0255 \text{ g}}{0,026 \text{ g}} * 100 = 1,9231\%$$

$$Lámina_2 = \frac{0,0265 \text{ g} - 0,026 \text{ g}}{0,0265 \text{ g}} * 100 = 1,8868\%$$

$$Lámina_3 = \frac{0,0253 \text{ g} - 0,0247 \text{ g}}{0,0253 \text{ g}} * 100 = 2,3715\%$$

$$Lámina_4 = \frac{0,0229 \text{ g} - 0,0225 \text{ g}}{0,0229 \text{ g}} * 100 = 1,7467\%$$

$$Lámina_5 = \frac{0,0258 \text{ g} - 0,0254 \text{ g}}{0,0258 \text{ g}} * 100 = 1,5504\%$$

$$Lámina_6 = \frac{0,0267 \text{ g} - 0,026 \text{ g}}{0,0267 \text{ g}} * 100 = 2,6217\%$$

$$Lámina_7 = \frac{0,0297 \text{ g} - 0,0291 \text{ g}}{0,0297 \text{ g}} * 100 = 2,0202\%$$

$$Lámina_8 = \frac{0,0308 \text{ g} - 0,0305 \text{ g}}{0,0308 \text{ g}} * 100 = 0,9740\%$$

$$Lámina_9 = \frac{0,0259 \text{ g} - 0,0255 \text{ g}}{0,0259 \text{ g}} * 100 = 1,5444\%$$

$$Lámina_{10} = \frac{0,0225 \text{ g} - 0,022 \text{ g}}{0,0225 \text{ g}} * 100 = 2,2222\%$$

ANEXO 6.

RECOMENDACIONES

Se recomienda para próximas investigaciones el estudio de la cinética de crecimiento, conociendo con exactitud el momento en el microorganismo agota la fuente de carbono, nitrógeno y energía suministrado por el medio de cultivo para la producción de enzimas peroxidasa, lipasa y esterasa para llevar a cabo el proceso de degradación y colonización del material. Así como también, la evaluación de un blanco para analizar la degradación no biológica (mecánica) que pueda presentarse en el proceso, efectuando las réplicas de los biorreactores con las mismas condiciones y en el mismo periodo para evitar diferencias en los resultados.

De igual modo, al llevar a cabo este proceso a escala piloto, es recomendable llevar un monitoreo y control de las condiciones de operación (temperatura y pH) para que se encuentren en los rangos adecuados para que el microorganismo pueda desarrollarse eficazmente; esto se puede realizar con ayuda de control instrumental al requerir soluciones básicas o ácidas para que el pH se encuentre entre 5 a 6 y la presencia de una chaqueta en el biorreactor para que la temperatura sea la adecuada. Adicionalmente, se debe proporcionar un sistema de mezcla que permita la distribución homogénea del sustrato para que la colonización del material se realiza de manera efectiva.

Así mismo, es recomendable la aplicación de los cálculos respectivos para la transferencia y concentración de oxígeno dentro del biorreactor para no someter al microorganismo en un estrés metabólico. En cuanto a la toma de la muestra, se requiere de un campo especial para este con la esterilización necesaria, evitando contaminación cruzada en el proceso.

Es recomendable realizar el análisis económico del proceso de biodegradación en fermentación líquida sumergida al efectuarlo a escala piloto o industrial, teniendo en cuenta los materiales y dimensiones de los equipos de proceso, control instrumental con el uso de válvulas o sistemas de control para el monitoreo y verificación de las condiciones de operación, financiamiento del proyecto. Así como también estudios de caracterización y medio de cultivo mucho más rentable al utilizar residuos orgánicos que proporcionan las

fuentes de carbono y nitrógeno necesarias para el funcionamiento del proceso de biodegradación.