

UNIVERSIDAD DE ALMERIA

ESCUELA SUPERIOR DE INGENIERÍA

AISLAMIENTO Y EVALUACIÓN DE
HONGOS COMO AGENTES
DEGRADADORES DE PLÁSTICOS DE
INVERNADEROS

Mención: Grado en Hortofruticultura y Jardinería

Modalidad: Trabajo Técnico-Experimental

Curso 2019/2020

Alumno/a:

Marina del Carmen López Fernández

Director/es:

Milagrosa Santos Hernández
Brenda Sánchez Montesinos

ÍNDICE

1.	INTRODUCCIÓN	1
1.1.	Cómo llegaron y afectaron los invernaderos a España	1
1.2.	Impacto ambiental generado por los residuos de los plásticos	1
1.3.	Residuos generados por los diferentes tipos de plásticos	2
1.4.	La biodegradación de los plásticos	3
1.4.1.	Etapas en la biodegradación del polietileno	4
1.4.2.	El polietileno y sus tipos	5
1.4.3.	Microorganismo degradadores de polietileno	5
1.4.4.	Géneros: Bacterianos y fúngicos	7
2.	JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	11
3.	OBJETIVOS	11
3.1.	Objetivo general	11
3.2.	Objetivos específicos	11
4.	MATERIALES Y MÉTODOS	12
4.1.	Realización de muestras	12
4.2.	Preparación del medio de cultivo para hongos	14
4.3.	Siembra en placas por medio de diluciones	16
4.4.	Selección de los hongos	17
4.5.	Selección de hongos productores de lacasa	23
4.6.	Evaluación de la degradación de plásticos	24
5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	26
6.	CONCLUSIÓN	37
7.	BIBLIOGRAFÍA	38

INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Tipos de hongos y bacterias degradantes de polietileno.....	5
Tabla 2: Especies fúngicas con propiedades degradadoras de diferentes tipos de plásticos.....	7
Tabla 3. Especies bacterianas con propiedades degradadoras de diferentes tipos de plásticos.....	8
Tabla 4. Placas que presentan crecimiento en tela mosquitera.....	18
Tabla 5. Placas que presentan crecimiento en techo nuevo.....	18
Tabla 6. Placas que presentan crecimiento en techo viejo.....	19
Tabla 7. Placas que presentan crecimiento en rafia.....	19
Tabla 8. Placas que presentan crecimiento en techo 2.....	20
Tabla 9. Placas que presentan crecimiento en malla de sombreo.....	20
Tabla 10. Placas que presentan crecimiento en plástico de saco.....	21
Tabla 11. Placas que presentan crecimiento en acolchado negro.....	21
Tabla 12. Placas que presentan crecimiento en acolchado blanco nuevo.....	22
Tabla 13. Placas que presentan crecimiento en acolchado blanco viejo.....	22
Tabla 14. Tipos de hongos aislados de diferentes tipos de plásticos.....	33
Tabla 15. Porcentaje medio de degradación observado.....	36

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Consumo por aplicación en agricultura y residuo generado por aplicación de plástico en agricultura.....	2
Gráfica 2. Porcentaje de residuos generados por diferentes tipos de plásticos en Andalucía, 2016.....	3
Gráfica 3. Porcentaje de degradación del plástico de saco.....	26
Gráfica 4. Porcentaje de degradación de malla de sombreo.....	27
Gráfica 5. Porcentaje de degradación del acolchado blanco.....	28
Gráfica 6. Porcentaje de degradación de la tela mosquitera.....	29
Gráfica 7. Porcentaje de degradación del plástico de rafia.....	30
Gráfica 8. Porcentaje de degradación del acolchado negro.....	31
Gráfica 9. Porcentaje de degradación del plástico de techo.....	32
Gráfica 10. Porcentaje total de plásticos degradados.....	34

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

Resumen:

La agricultura almeriense es una de las principales fuentes de economía para la provincia, y supone un factor importante en el desarrollo de la misma. Pero al igual que la agricultura es importante, una parte de ella, como son los plásticos de los invernaderos, genera graves problemas para el medio ambiente. Los problemas son generados porque los plásticos no son reciclados por el alto coste que esto supone a los agricultores y por lo tanto se acumulan grandes toneladas de ellos.

Ante las pocas soluciones que hay en esta problemática, que influye en tantos aspectos de la vida diaria, se ha abierto esta investigación para intentar conseguir que, por medio de los hongos, los plásticos sean capaces de ser degradados sin necesidad de utilizar otros medios también contaminantes y reducir por lo tanto el impacto medio ambiental y la contaminación.

Resume:

Almeria agriculture is one of the main sources of economy for the province, and it is an important factor in its development. But just as agriculture is important, a part of it, such as plastics in greenhouses, creates serious problems for the environment. These problems are generated because plastics are not recycled due to the high cost that the farmers are expected to pay, therefore large tons of this material are accumulating everywhere.

Given the few solutions that exist regarding this problem, which influences so many aspects of daily life, this research has been opened to try to get that, by using fungi, plastics will be degraded without the need to use other polluting means and therefore reducing the environmental impact and pollution.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Cómo llegaron y afectaron los invernaderos a España

En España la agricultura por métodos clásicos ha sufrido una reducción significativa en las últimas décadas, pero ha conseguido expandir líneas de cultivo gracias al gran desarrollo de los *invernaderos de plástico*. Son estructuras permanentes, cubiertas por plásticos, que permiten modificar las condiciones climáticas en las que tiene lugar el desarrollo del cultivo. Dichos plásticos toleran la entrada de radiación solar y dificulta la salida de la radiación emitida por el suelo. Además, los invernaderos protegen a las plantas de las condiciones meteorológicas como viento, lluvia, granizo y heladas.

El empleo de esta tecnología y su continuo avance ha permitido elevar notablemente la productividad de los cultivos y la calidad de los productos, así como aumentar la eficiencia en los procesos y mejorar las condiciones de trabajo.

La utilización de dichos materiales como cubiertas de invernadero se inició en el año 1948 en EEUU por *Emmert* de la Universidad de Kentucky, quien tuvo la idea de sustituir el vidrio por papel celofán para cubrir una estructura de madera.

Desde entonces los invernaderos de plástico se han extendido por los cinco continentes y han desplazado a los invernaderos de cristal, debido a sus altos costes. En 1958, se instalaron en España los primeros invernaderos de plástico, concretamente en las Islas Canarias, pero no se extendieron al resto de la península hasta 1965. El crecimiento de la superficie invernada ha sido continuo desde entonces, dejando su máxima superficie en el sureste Andalucía, es decir, en Almería, permitiendo convertir tierras improductivas en explotaciones altamente rentables (*Fundación Cotec para la Innovación Tecnológica, 2009*).

Estas construcciones por medio de plásticos, han tenido desde entonces un impacto ambiental en nuestro entorno, sobretodo a la hora de generar residuos.

1.2. Impacto ambiental generado por los residuos de los plásticos

Los plásticos, una vez que han realizado su función, se convierten en residuos. Dichos residuos son precisos eliminarlos. Tradicionalmente, los agricultores los han eliminado:

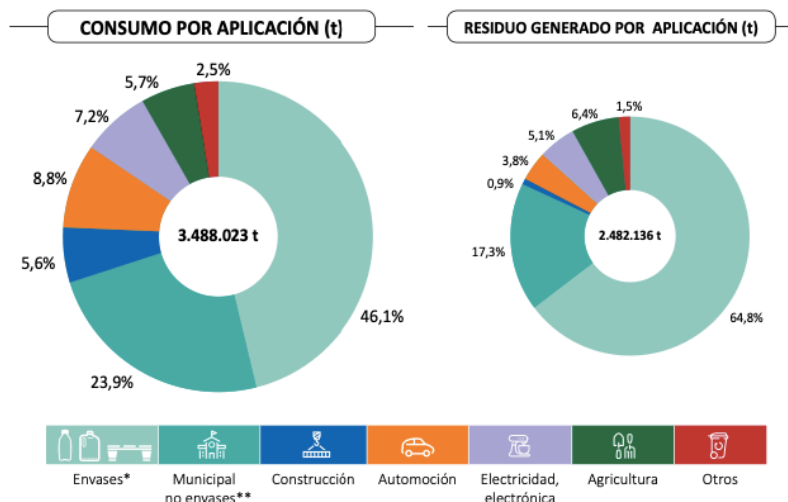
Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

- Mediante incineración incontrolada, lo que provoca una mayor contaminación debido a la emisión de altas cantidades de monóxido de carbono (CO) y a la liberación de elementos pesados.
- Destinándolos al abandono en solares y ramblas (es muy común ver montañas de plásticos cerca de los invernaderos). Todo esto suele tener como consecuencia un importante impacto ambiental puesto que supone un grave riesgo cuando tienen lugar altas precipitaciones, en formas de lluvias torrenciales, al suponer un obstáculo a la libre circulación del agua pudiendo dar lugar a obstrucción de los cursos de la misma, pudiendo provocar riadas con la posible destrucción de invernaderos y cosechas, además de constituirse en focos de contaminación por los lixiviados de productos plaguicidas, herbicidas y fungicidas, en las aguas subterráneas. (Blázquez, 2003)

1.3. Residuos generados por los diferentes tipos de plásticos

La cantidad de residuos no siempre depende de la cantidad de plástico que se utiliza. En los últimos años, en España se ha estudiado que la cantidad de residuos generada es mayor que la de plástico consumido.

En la gráfica 1, se puede observar como el consumo de plásticos por aplicación en 2017 fue de un 5,7% y, sin embargo, el porcentaje de residuo generado fue de un 6,4 %, es decir, un 0,7% más de residuos que de plásticos utilizados.



Gráfica 1: Consumo por aplicación de plástico en agricultura y residuo generado por aplicación de plástico en agricultura.

(Ambos en 2017, España.)

(Anarpla y Cicloplast, 2017)

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

Centrando especial atención en una de las comarcas con más invernaderos de Andalucía, en este caso Almería, por la que es popularmente llamada como 'Mar de plástico' cabe destacar que es una de las zonas de mayor concentración de plásticos, concretamente corresponde a un 61% de Andalucía. (*Diario de Almería, 2014*).

Entre todas las aplicaciones del plástico en la agricultura, se encuentran los elementos de protección de los cultivos, mediante acolchados e invernaderos.

Según los tipos de plásticos pueden generar más o menos residuos a la hora de reciclarlos. En la gráfica 2 se puede comprobar el porcentaje de cada uno de ellos.

- Los acolchados son una técnica que consiste en cubrir todo o parte del terreno con una lámina de plástico, cuyo objetivo es el de ahorro de agua, disminución de malas hierbas, mejorar las condiciones de los suelos, entre otros. Son más complejos de reciclar, pero generan un menor porcentaje de residuos (32%). (*Cicloplast, 2017*)
- En los invernaderos se suelen utilizar distintos tipos de plásticos, aunque el más común es polietileno debido a su bajo coste y simplicidad en su fabricación. Son muy reciclables, pero generan mayor cantidad de residuos (59%). (*Cicloplast, 2017*)



1.4. La biodegradación de los plásticos

Antes de hablar de la biodegradación, hay que saber qué es la degradación biológica de un plástico. Es un proceso en el que los microbios como las algas, bacterias, hongos, levaduras y sus sistemas enzimáticos consumen el polímero como fuente de energía que resulta en la degradación del polietileno.

Ahora bien, la biodegradación del plástico, es la causa de las actividades enzimáticas que conducen a una rotura en cadena del polímero en monómeros. Los microbios colonizan la superficie de las películas de polietileno formando una

biopelícula y la utilizan como única fuente de carbono que conduce a su degradación parcial.

Para la formación de biopelículas en la superficie del polietileno, la hidrofobicidad de la superficie celular de los microbios desempeña un papel muy importante en la biodegradación del polietileno, ya que hace que no se mezcle con el agua. Después de formar la biopelícula en la superficie del polietileno, comienzan a usar el polímero como única fuente de carbono. En las etapas preliminares de la degradación, la rotura de la cadena principal da como resultado la formación de oligómeros, dímeros o monómeros que son fragmentos de bajo peso molecular. Las enzimas extracelulares secretadas por los microbios catalizan el proceso de degradación

Todo este proceso se lleva a cabo mediante diferentes tipos de microorganismos que convierten la materia orgánica compleja y los polímeros sintéticos (polietileno y poliuretano) en unidades simples.

Cabe destacar que este proceso se puede ver influenciado por diferentes fenómenos tales como la cristalinidad, la hidrofobicidad y la topografía de la superficie ya que pueden dificultarlo. Pero a su vez, también existen factores que favorecen a la aceleración de este proceso que son los factores ambientales como la temperatura ambiente, la disponibilidad de nutrientes y agua. (Shiv Shankar, 2012)

1.4.1. Etapas en la biodegradación del polietileno

Existen cuatro etapas:

1. **Biodeterioro:** Implica pocas alteraciones en las propiedades físicas y mecánicas del plástico e inicia la formación de biopelículas microbianas en la superficie y dentro del polietileno.

La formación de la biopelícula depende de la estructura y composición del polietileno. Por su parte, los microbios secretan sustancias poliméricas extracelulares de alto peso molecular que controlan la formación de biopelículas que ayudan a su unión a la superficie del plástico. La integridad estructural de las biopelículas microbianas se mantiene mediante sustancias poliméricas extracelulares secretadas por los microbios.

2. **Bio-Fragmentación:** La fragmentación de los polímeros a pH bajo da como resultado la monomerización del polietileno. Los monómeros formados durante el proceso de fragmentación son ingeridos por células microbianas y sufren oxidación mediante reacciones catabólicas.

3. **Asimilación:** Implica la adición de átomos dentro de las células de los microorganismos. En este paso, no se completa el proceso de degradación del polietileno.
4. **Mineralización:** Las sustancias orgánicas se convierten en sustancias inorgánicas como el agua y el dióxido de carbono durante la mineralización. Se producen diferentes tipos de metabolitos secundarios durante el proceso de asimilación. (Shiv Shankar,2012)

1.4.2. El polietileno y sus tipos

El polietileno es el plástico más común del mundo y se obtiene a partir de polimerización del etileno y puede distinguirse fácilmente de otros plásticos. Antes de procesarlo tiene la apariencia de una resina, semicristalina y químicamente es el polímero más simple.

Además, es el más fácil de producir y también el más barato; de hecho, se producen alrededor de 80 millones de toneladas anualmente en todo el mundo.

- ***Polietileno de alta densidad (HDPE)***

Tiene una gran densidad y fuertes fuerzas intermoleculares, lo cual lo hace resistente a la tracción. Tiene resistencia al impacto, poca absorción de la humedad y peso ligero gracias a su densidad.

- ***Polietileno de media densidad (MDPE)***

Se llama así al tener una densidad que oscila entre la baja y alta. Gracias a esto tiene una gran resistencia a los golpes y caídas, resistencia a los químicos y es menos sensible a los cortes que el LDPE y mejor resistencia al agrietamiento por tensión que el HDPE.

- ***Polietileno de baja densidad (LDPE)***

Al tener una baja densidad, la atracción que existe en las moléculas es menor, de modo que no ofrece una gran resistencia a los golpes o caídas, pero es altamente resistente a la corrosión y baja permeabilidad.

Fuente: (ProlockerAdmin, 2016)

1.4.3. Microorganismo degradadores de polietileno

Por otra parte, podemos destacar algunas enzimas prominentes que degradan el polietileno como son la lacasas, lipasa, propaína y ureasa, proteasas y serina hidrolasa.

- **Lacasas:** Las lacasas (bencenodiol / oxidorreductasa de oxígeno,) son oxidorreductasas producidas por bacterias, hongos y actinomicetos.

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

- También se distribuyen en algunos insectos y plantas.
- Entre los hongos, los hongos de pudrición blanca son los productores dominantes de la Lacasa. Las Lacasas se consideran una enzima verde prometedora que cataliza la oxidación de diferentes compuestos aromáticos y no aromáticos en presencia de oxígeno.
- Durante la oxidación de diferentes sustratos, no dan como resultado la formación de ningún intermediario tóxico. (Shiv Shankar, 2012)

En la tabla 1 se puede observar diferentes tipos de hongos y bacterias que son capaces de degradar el polietileno a través de la lacasa, según los diferentes autores que se reflejan.

Tabla 1: Tipos de hongos y bacterias degradantes de polietileno.

Fuentes de Lacasa	Tipo de Polietileno	Referencia
<i>Trametes versicolor</i>	LDPE	Fujisawa et al, 2001
<i>Rhodococcus ruber</i>	LDPE	Santo et al, 2013
<i>Bacillus cereus</i>	LDPE	Sowmya et al, 2014
<i>Pleurotus ostreatus</i>	LDPE	Da Luz et al, 2015
<i>Cochliobolus sp.</i>	PVC	Sumathi et al, 2016
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Bacillus sp.</i> y <i>fungi Fusarium graminearum</i>	LDPE	Ganesh et al, 2016
<i>Pleurotus ostreatus</i>	LDPE	Gómez-Méndez et al, 2018

Fuente: (Shiv Shankar, 2012)

- **Lipasa:** Es la enzima producida a partir de *Rhizopus delemar* bajo condiciones de cultivo sumergidas y poliuretano esterada de *Comamonas acidovorans*. Se ha informado que degradan el ácido poliláctico de bajo peso molecular.
- **Papaína y ureasa:** Se ha descubierto que ambas degradan el poliéster poliuretano médico. La papaína cataliza la hidrólisis de los enlaces uretano y

urea, lo que da como resultado la formación de grupos hidroxilo y amina libres (Shiv Shankar, 2012).

Proteasas: es un enzima que se produce a partir de *Brevibacillus* spp. y *Bacilo* spp. y se ha demostrado que degrada el polietileno (Shiv Shankar, 2012).

- **Serina Hidrolasa:** esta enzima utiliza poliuretano como sustrato. En el mecanismo de degradación microbiana del polietileno hay dos enfoques:
 - En el primero, se destaca la degradación del polietileno utilizando cultivos puros de microbios identificados en condiciones ambientales definidas. El uso de este enfoque ayuda a comprender el impacto de los factores ambientales en la degradación microbiana del polietileno (Shiv Shankar, 2012).
 - Y en el segundo, se emplean comunidades microbianas complejas para la degradación del polietileno bajo muestras ambientales complejas y naturales como el suelo, el agua y el compost (Shiv Shankar, 2012).

1.4.4. Géneros: Bacterianos y fúngicos

Por último, cabe destacar que se ha investigado que existen 9 fúngicos y 13 bacterianos que degradan el polietileno. En las siguientes tablas, además de conocer el nombre de cada uno de ellos, podemos observar los diferentes tipos de polietileno que consiguen degradar.

Tabla 2. *Especies fúngicas con propiedades degradadoras de diferentes tipos de plásticos.*

Hongos	Tipo de Polietileno	Referencia
<i>Lasiodiplodia theobromae</i>	LDPE	Sheik et al, 2015
<i>Aspergillus</i> spp.	HDPE	Sangeetha et al, 2015
<i>Aspergillus clavatus</i> strain JASK1	PE	Gajendiran et al, 2016
<i>Zalerion maritimum</i>	PE	Paço et al, 2017
<i>Penicillium oxalicum</i> NS4 y <i>Penicillium chrysogenum</i> NS10	HDEP y LDEP	Ojha et al, 2017

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

<i>Trichoderma viride</i> y <i>Aspergillus nomius</i>	LDPE	Munir et al, 2018
<i>Aspergillus sp.</i> y <i>Penicillium sp.</i>	LDPE	Alshehrei, 2017
<i>Streptomyces species</i>	PET	Farzi et al, 2019

Fuente: (Shiv Shankar, 2012)

Tabla 3. *Especies bacterianas con propiedades degradadoras de diferentes tipos de plásticos.*

Bacterias	Tipo de Polietileno	Referencia
<i>Rhodococcus ruber</i>	PE	Sivan et al, 2006
<i>Pseudomons sp.</i> , <i>Alcanivorax sp.</i> , <i>Tenacibaculum</i>	PCL	Sekiguchi et al, 2011
<i>Arcobacter</i> y <i>Colwellia spp.</i>	LDPE	Harrison et al, 2011
<i>Pseudomonas sp. E4</i>	PE	Gyung Yoon et al, 2012
<i>Pseudomonas aeruginosa PAO1</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Pseudomonas putida</i> y <i>Pseudomonas syringae</i>	LDEP	Kyaw et al,2012
<i>Kocuria palustris M16</i>, <i>Bacillus pumilus M27</i>, y <i>Bacillus subtilis</i>	LDPE	Harshvardhan y Jha, 2013
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	LDPE	Das y Kumar, 2015
<i>Chelatococcus sp. E1</i>	LMWPE	Jeon y Kim, 2013
<i>Pseudomonas aeruginosa E7</i>	PE	Yang et al, 2014
<i>Stanieria</i> , <i>Pseudophormidium</i>	PET	Oberbeckmann et al, 2014
<i>Pseudomonas sp.</i>	LDPE	Tribedi et al, 2015
<i>Bacillus subtilis</i>	PE	Vimala y Mathew, 2016

<i>Pseudomonas sp. AKS2</i>	LDPE	Tribedi et al, 2015
-----------------------------	------	---------------------

Fuente: (Shiv Shankar, 2012)

Según algunas referencias de las tablas anteriores, se ha podido conocer qué porcentaje y tipo de polietileno, son capaces de degradar algunos fúngicos y bacterianos.

- **Fúngicos**

Penicillium oxalicum NS4 y Pecinicillium chrysogenum NS10 (Ojha et al, 2017)

Para cuantificar la eficiencia de degradación de HDPE y LDPE de los dos aislamientos fúngicos potenciales, se midió la pérdida de peso de las películas de polietileno después de 90 días de incubación.

La pérdida de peso de las láminas de HDPE y LDPE después de 30, 60 y 90 días de incubación fue del 17.06%, 48.00%, 58.598% y 19.32%, 33.33%, 34.35% por el aislado fúngico NS10, respectivamente.

Considerando que, en el porcentaje total se encontró que la pérdida de peso fue del 24.18%, 43.73%, 55.34% en HDPE y 16.72%, 26.70%, 36.60% en láminas de LDPE después 30, 60 y 90 días de incubación, por el aislado fúngico NS4.

Los resultados indican que ambos aislamientos son capaces de degradar HDPE de manera bastante eficiente.

Trichoderma viride y Aspergillus nonius (Munir et al, 2018)

Se usó plástico de polietileno de baja densidad (LDPE) como material probado. Los hongos candidatos se aislaron del suelo del vertedero local. Los hongos se cultivaron en caldo medio de sal mineral que contenía polvo de LDPE.

Dos de nueve aislamientos mostraron la mejor respuesta de crecimiento en medios de caldo que contienen LDPE.

Estos aislamientos (RH03 y RH06) se usaron en la prueba de degradación. Los resultados mostraron que los aislados RH03 y RH06 redujeron el peso de la película de LDPE en un 5,13% y 6,63%, respectivamente, después de 45 días de cultivo.

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

La resistencia a la tracción de la película tratada incluso se redujo significativamente en un 58% y un 40% de cada aislamiento.

En el análisis molecular a través de la reacción en cadena de la polimerasa y la secuenciación del ADN indicaron que RH03 es *Trichoderma viride* y RH06 es *Aspergillus nomius* con 97% y 96% de similitudes, respectivamente.

- **Bacterianos**

Bacillus subtilis (Vimala y Mathew, 2016)

Las especies bacterianas *Bacillus subtilis* fueron evaluadas por su potencial en la utilización del polietileno como su única fuente de carbono. La especie microbiana produjo compuestos tensioactivos (Biosurfactantes) que mejoran el proceso de degradación. El pretratamiento de películas de polímero con radiación ultravioleta ayuda a su accesibilidad como alimento para los microorganismos, lo que permite una tasa de biodegradación mucho más rápida.

La inoculación de películas de polietileno pretratadas de espesor 183 con *Bacillus subtilis* con la adición de su biosurfactante (surfactina) demostró ser más eficiente con un porcentaje de pérdida de peso de 9.26% en 30 días.

Rhodococcus ruber (Sivan et al, 2006)

Se aisló una cepa productora de biopelícula (C208) de *Rhodococcus ruber* que degradó el polietileno a una tasa de 0,86% por semana. La cepa C208 se adhiere al polietileno inmediatamente después de la exposición a la poliolefina.

Esta biopelícula inicial se diferencia en microcolonias que forman agregación celular. Una mayor organización produce estructuras tridimensionales "en forma de hongo" en la biopelícula madura.

La relación entre las densidades de población del biofilm y las células planctónicas C208 después de 10 días de incubación fue de aproximadamente 60:1, lo que indica una alta preferencia por el modo de crecimiento del biofilm.

El análisis de sustancias poliméricas extracelulares (EPS) en la biopelícula de C208 reveló que el nivel de polisacáridos era hasta 2,5 veces más alto que el de la proteína. El biofilm mostró una alta viabilidad incluso después de 60 días de incubación, aparentemente debido a la biodegradación del polietileno.

2. JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

Esta investigación nace como consecuencia de observar la acumulación de plásticos en el medio ambiental, y la problemática que todo ello conlleva no sólo en el impacto visual sino también a nivel de salud para la población.

En el caso de Almería, se han realizado diferentes estudios que han podido cuantificar 6,4 % toneladas de plásticos provenientes de invernaderos, ya que en la provincia existen un gran número de ellos y, por lo tanto, es importante que se tenga en cuenta el reciclaje de todos los plásticos que ya acaban su vida útil. Pero, desgraciadamente, la mayoría de ellos acaban, en la en ramblas, ríos, e incluso en el mar debido al alto coste que supone trasladarlos a una planta de reciclaje.

Es por todo esto, por lo que, desde hace ya bastantes años, se han experimentado diferentes estudios para su biodegradación y de este modo, resolver todos los problemas que el plástico ocasiona en el día a día.

A partir de diferentes microorganismos, se ha conseguido la degradación de una parte importante de diferentes tipos de polietileno, pero no en su totalidad. Actualmente, se sigue investigando para que este problema se reduzca de manera significativa.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

- ◇ El objetivo general del presente proyecto es la búsqueda de aislados fúngicos capaces de degradar los distintos plásticos que se usan habitualmente en Horticultura Intensiva.

3.2. Objetivos específicos

Los objetivos específicos del proyecto son:

- ◇ Aislar los hongos provenientes de plásticos desechados de invernadero.
- ◇ Seleccionar los hongos con actividad para degradar plásticos.
- ◇ Evaluar la degradación de los plásticos por medio de los hongos pre-seleccionados.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo llevado a cabo desde finales de septiembre de 2019 hasta mediados de febrero de 2020, tiene como objetivo principal el aislamiento de microorganismos fúngicos capaces de degradar distintos tipos de plásticos usados habitualmente en los invernaderos.

Este caso, los plásticos fueron recogidos de una finca ubicada en Berja, Almería.

4.1. REALIZACIÓN DE MUESTRAS

En primer lugar, se opta por recoger diferentes tipos de plástico en diferentes invernaderos de la localidad. Concretamente solo se limita a coger 10 tipos.

Estos plásticos tienen una denominación concreta con distintos códigos:

1. Tela mosquitera (1TM)
2. Plástico techo nuevo (2PTN)
3. Plástico techo viejo (3PTV)
4. Rafia (4R)
5. Plástico techo 2 (5PT2)
6. Malla sombreo (6MS)
7. Plástico saco (7PSA)
8. Acolchado negro (8AN)
9. Acolchado blanco nuevo (9ABN)
10. Acolchado blanco viejo (10ABV)



Imagen 1:
Malla de sombreo y plástico de saco.



Imagen 2:
Acolchado blanco y acolchado negro

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

Los pasos que se han seguido en este ensayo tras recoger los distintos tipos de plástico son los siguientes:

1º. Se cortan los plásticos con una medida de 2 x 2 cm.



Imagen 3:

Se cortan a medida los plásticos para después introducirlos en los botes.



Imagen 4:

Los diferentes tipos de plásticos que se han cortado, clasificados según su tipo.

2º. Seguidamente, se colocan en diferentes botes, con agua destilada a un volumen de 50 cm³. Con cada plástico se realizan 5 repeticiones.

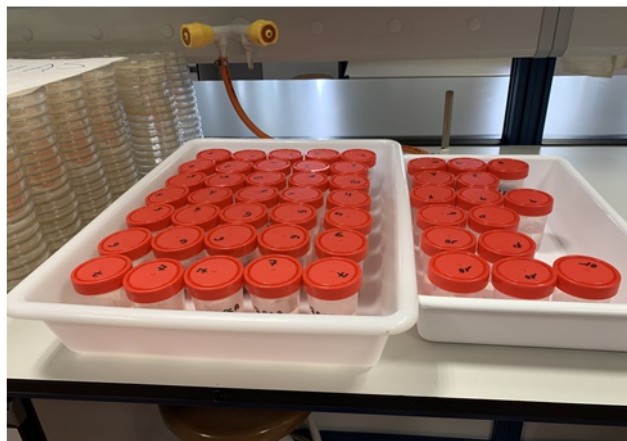


Imagen 5:

Los botes enumerados con los diferentes tipos de plástico.

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

3º. A continuación, los botes se colocan en un agitador a 110 rpm durante una hora y media.



Imagen 6:

Se procede a introducir los botes dentro del agitador.

4.2. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO PARA HONGOS

En el proceso de la preparación del medio se añade en una botella de 1 litro lo siguiente:

- ✓ 20 gramos de Potato dextrose broth.
- ✓ 20 gramos de Agar.
- ✓ 5 gramos de dextrosa chloramphenicol agar (BAC)



Imagen 7:

BAC y Potato Dextrose Broth



Imagen 8:

Agar Bacteriology Grade



Imagen 9:

Se pesa la cantidad de medio



Imagen 10:

Se introduce el medio en las botellas.

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

Una vez preparado el medio, se agrega agua destilada hasta cubrir el enrase y se agita para que se mezclen bien las sustancias.

Este proceso se repite 3 veces más, teniendo en total 4 litros de medio. Estas cuatro botellas se colocan en la autoclave a 120°C, 20 min aproximadamente.



Imagen 11:
Las botellas se introducen en el autoclave



Imagen 12:
Una vez en el autoclave, se ajusta la temperatura a 120°

El siguiente paso se realizará una vez pasados 20 min. Se deja enfriar la autoclave y se empieza a plaquear el medio.



Imagen 13:
Plaqueo del medio en la campana.



Imagen 14:
Medio realizado en distintas placas.

4.3. SIEMBRA EN PLACAS POR MEDIO DE DILUCIONES

En este punto del ensayo, se calcula la cantidad de dilución que va en cada placa.

En nuestro caso, se parte del número de muestras anteriores y se realiza 3 repeticiones por cada concentración, donde se utilizan cantidades de 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} dando como resultado un total de 450 placas.

Una vez sembradas, dichas placas se colocan dentro de la estufa a una temperatura de 26°C.

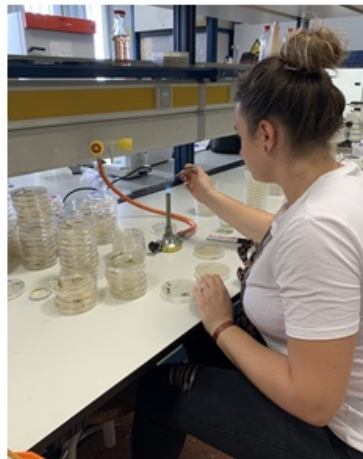


Imagen 15:

Se procede a añadir las diluciones en las placas.



Imagen 16:

Las placas sembradas se introducen en la estufa

Tras cinco días de sembrar los hongos, se realiza una evaluación de las placas para determinar el número de ellos para confirmar si mostraban crecimiento. Finalmente, se observaron 137 placas con crecimiento.

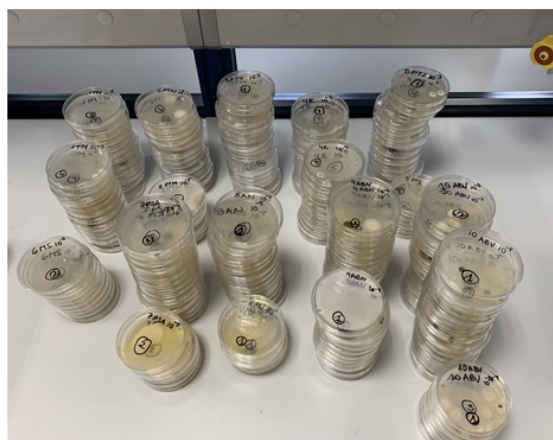


Imagen 17:

Las placas ya presentan crecimiento fúngico.

4.4. SELECCIÓN DE LOS HONGOS

En la selección de los hongos, se eligen los que han mostrado crecimiento para realizar la evaluación de producción de Lacasas por medio de guaiacol.

Primeramente, se realiza el medio de cultivo con esta sustancia. En este caso se prepara 1 L de medio, que contiene:

- ✓ 20 gramos de Potato dextrose broth
- ✓ 20 gramos de Agar
- ✓ 0,4 ml/L de guaiacol

Por último, se le añade agua destilada y se agita como en el medio anterior.

Para la obtención de Lacasas se necesita un pH de 5,5 y se observa que este medio tiene un pH de 7, con lo que se tiene que añadir ácido clorhídrico para bajar su pH.

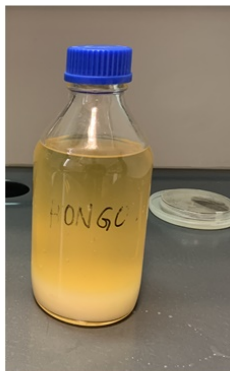


Imagen 18:
Medio con un pH 7

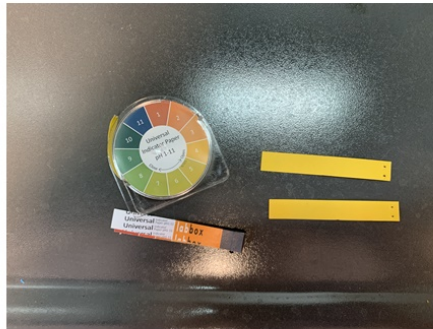


Imagen 19:
Medidor para comprobar el pH

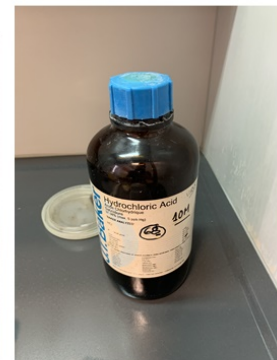


Imagen 20:
Ácido Clorhídrico para bajar el pH.



Imagen 21:
Se introduce el ácido clorhídrico reducido en agua.



Imagen 22:
Se comprueba que el pH del medio baja a un 5,5

Una vez conseguido el pH a 5,5, se coloca el litro de medio en la autoclave y se plaquea.

Tabla 4: Placas que presentan crecimiento en Tela Mosquitera

<u>Tipos de plástico</u>	<u>Nº de bote</u>	<u>Concentración de la disolución</u>	<u>Nº de Placas con crecimiento.</u>
Tela Mosquitera	1	10^{-3}	14
	1	10^{-3}	
	1	10^{-4}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-4}	
	2	10^{-3}	
	3	10^{-3}	
	3	10^{-4}	
	3	10^{-5}	
	4	10^{-3}	
	4	10^{-3}	
	4	10^{-5}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-4}	

Tabla 5: Placas que presentan crecimiento en Plástico de techo nuevo

<u>Tipos de plástico</u>	<u>Nº de bote</u>	<u>Concentración de la disolución</u>	<u>Nº de Placas con crecimiento.</u>
Plástico de techo nuevo	1	10^{-3}	13
	1	10^{-4}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-5}	
	3	10^{-3}	
	4	10^{-3}	
	4	10^{-4}	
	4	10^{-5}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-5}	

Tabla 6: Placas que presentan crecimiento en Plástico de techo viejo

<u>Tipos de plástico</u>	<u>Nº de bote</u>	<u>Concentración de la disolución</u>	<u>Nº de Placas con crecimiento.</u>
Plástico de techo viejo	1	10^{-3}	10
	1	10^{-3}	
	1	10^{-3}	
	1	10^{-5}	
	3	10^{-4}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-5}	
	5	10^{-5}	

Tabla 7: Placas que presentan crecimiento en Rafia

<u>Tipos de plástico</u>	<u>Nº de bote</u>	<u>Concentración de la disolución</u>	<u>Nº de Placas con crecimiento.</u>
Rafia	1	10^{-4}	14
	2	10^{-3}	
	3	10^{-3}	
	3	10^{-3}	
	3	10^{-3}	
	3	10^{-5}	
	4	10^{-3}	
	4	10^{-4}	
	4	10^{-5}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-5}	
	5	10^{-5}	

Tabla 8: Placas que presentan crecimiento en Plástico techo 2

<u>Tipos de plástico</u>	<u>Nº de bote</u>	<u>Concentración de la disolución</u>	<u>Nº de Placas con crecimiento.</u>
Plástico techo 2	1	10^{-3}	15
	1	10^{-3}	
	1	10^{-4}	
	1	10^{-4}	
	1	10^{-5}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-5}	
	2	10^{-5}	
	2	10^{-5}	
	3	10^{-3}	
	3	10^{-3}	
	4	10^{-3}	
	4	10^{-4}	
	5	10^{-4}	

Tabla 9: Placas que presentan crecimiento en Malla de sombreo

<u>Tipos de plástico</u>	<u>Nº de bote</u>	<u>Concentración de la disolución</u>	<u>Nº de Placas con crecimiento.</u>
Malla de sombreo	1	10^{-3}	7
	1	10^{-5}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-4}	
	3	10^{-3}	
	3	10^{-5}	
	4	10^{-5}	

Tabla 10: Placas que presentan crecimiento en Plástico de Saco

<u>Tipos de plástico</u>	<u>Nº de bote</u>	<u>Concentración de la disolución</u>	<u>Nº de Placas con crecimiento.</u>
Plástico de Saco	2	10^{-3}	14
	2	10^{-3}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-5}	
	2	10^{-5}	
	2	10^{-5}	
	3	10^{-3}	
	3	10^{-5}	
	3	10^{-5}	
	4	10^{-4}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-4}	

Tabla 11: Placas que presentan crecimiento en Acolchado Negro

<u>Tipos de plástico</u>	<u>Nº de bote</u>	<u>Concentración de la disolución</u>	<u>Nº de Placas con crecimiento.</u>
Acolchado Negro	1	10^{-3}	12
	1	10^{-4}	
	2	10^{-4}	
	3	10^{-3}	
	3	10^{-3}	
	4	10^{-3}	
	4	10^{-5}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-4}	
	5	10^{-5}	
	5	10^{-5}	

Tabla 12: Placas que presentan crecimiento en Acolchado Blanco nuevo

<u>Tipos de plástico</u>	<u>Nº de bote</u>	<u>Concentración de la disolución</u>	<u>Nº de Placas con crecimiento.</u>
Acolchado Blanco nuevo	1	10^{-4}	16
	1	10^{-4}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-4}	
	3	10^{-3}	
	3	10^{-4}	
	3	10^{-4}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-4}	
	5	10^{-4}	
	5	10^{-5}	

Tabla 13: Placas que presentan crecimiento en Acolchado Blanco viejo

<u>Tipos de plástico</u>	<u>Nº de bote</u>	<u>Concentración de la disolución</u>	<u>Nº de Placas con crecimiento.</u>
Acolchado Blanco viejo	1	10^{-3}	22
	1	10^{-4}	
	1	10^{-4}	
	2	10^{-3}	
	2	10^{-4}	
	2	10^{-5}	
	2	10^{-3}	
	3	10^{-3}	
	3	10^{-3}	
	4	10^{-3}	
	4	10^{-3}	
	4	10^{-4}	
	4	10^{-4}	

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

	4	10^{-4}	
	4	10^{-5}	
	4	10^{-5}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-3}	
	5	10^{-4}	
	5	10^{-4}	

Por otro lado, como se observa en las tablas desde la 4 a la 13, ambas incluidas, con el objetivo de observar los X productores de Lacasas, se parte de las 137 placas que presentan crecimiento y para el ahorro de material de laboratorio, en este caso, solo se trabaja con 69. En cada placa se colocan dos hongos y cada placa con su respectiva copia.

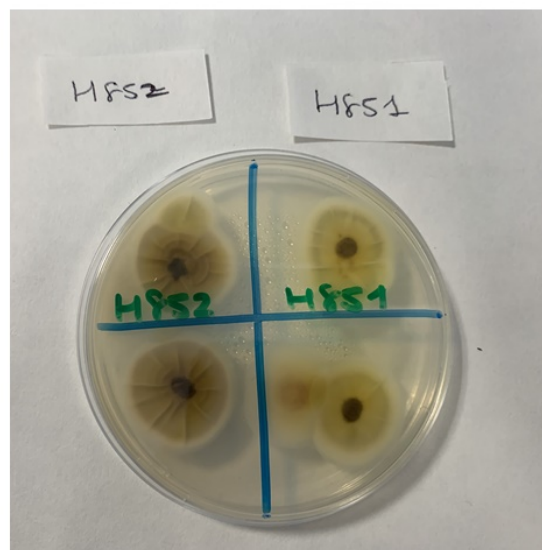


Imagen 23:

Crecimiento del hongo con su copia correspondiente.

4.5. SELECCIÓN DE HONGOS PRODUCTORES DE LACASA

Tras las 69 placas con guaiacol, solo 32 reaccionaron al producto, por lo que finalmente de esas 32, fueron 16 hongos productores de Lacasa los que se pudieron utilizar para continuar la investigación.

4.6. EVALUACIÓN DE LA DEGRADACIÓN DE PLÁSTICOS

Para poder evaluar la degradación de plásticos, primero se tiene que seleccionar que tipos de plásticos se van a utilizar y a continuación la desinfección.

En nuestro caso, se utilizan 7 tipos de plásticos diferentes, con medida de 2x2cm:

- ✓ Plástico 1: Saco
- ✓ Plástico 2: Malla sombreo
- ✓ Plástico 3: Acolchado Blanco
- ✓ Plástico 4: Tela Mosquitera
- ✓ Plástico 5: Rafia
- ✓ Plástico 6: Acolchado Negro
- ✓ Plástico 7: Techo

Para la desinfección, cada plástico: se lavará con jabón y luego con alcohol; se enjuagarán en agua destilada y posteriormente se dejarán secar en papel de filtro estéril.

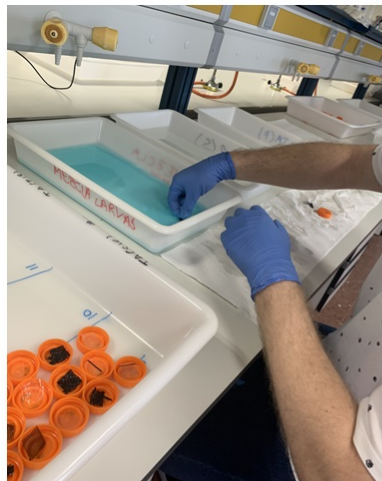


Imagen 24:

Lavado de los plásticos antes de volver a pesarlos



Imagen 25:

Secado de los plásticos y clasificación de los mismos para realizar el nuevo peso.

Seguidamente, una vez acabado con el secado de los plásticos, se tiene que realizar el medio de sales.

Dicho medio se prepara con:

- 0,7 g de KH_2PO_4
- 0,7 g de K_2HPO_4
- 0,7 g de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 1 g de NH_4NO_3
- 0,005 g de NaCl
- 0,002 g de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

- 0,002 g de $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
- 0,001 g de $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$.

Se le añade agua destilada hasta el enrase y se agita. Esta cantidad esta calculada para un litro de medio. En nuestro caso, se preparan 3 litros.

Una vez realizado el medio, se colocan en botes estériles a 10 ml cada bote y se procede a insertar un disco de 5mm de diámetro del hongo que le pertenece, extraído por un sacabocados en su bote y acompañado de su plástico correspondiente.

Se realizarán 3 repeticiones por cada plástico con cada hongo.



Imagen 26:

Plásticos introducidos en el medio salino



Imagen 27:

Todos los plasticos introducidos en los botes para posteriormente comprobar su degradación

Por último, los plásticos, antes de añadir el medio, se tienen que pesar para poder comprobar si se produce degradación o no.

Al mes y medio se realiza una evaluación visual del crecimiento del hongo en los botes.

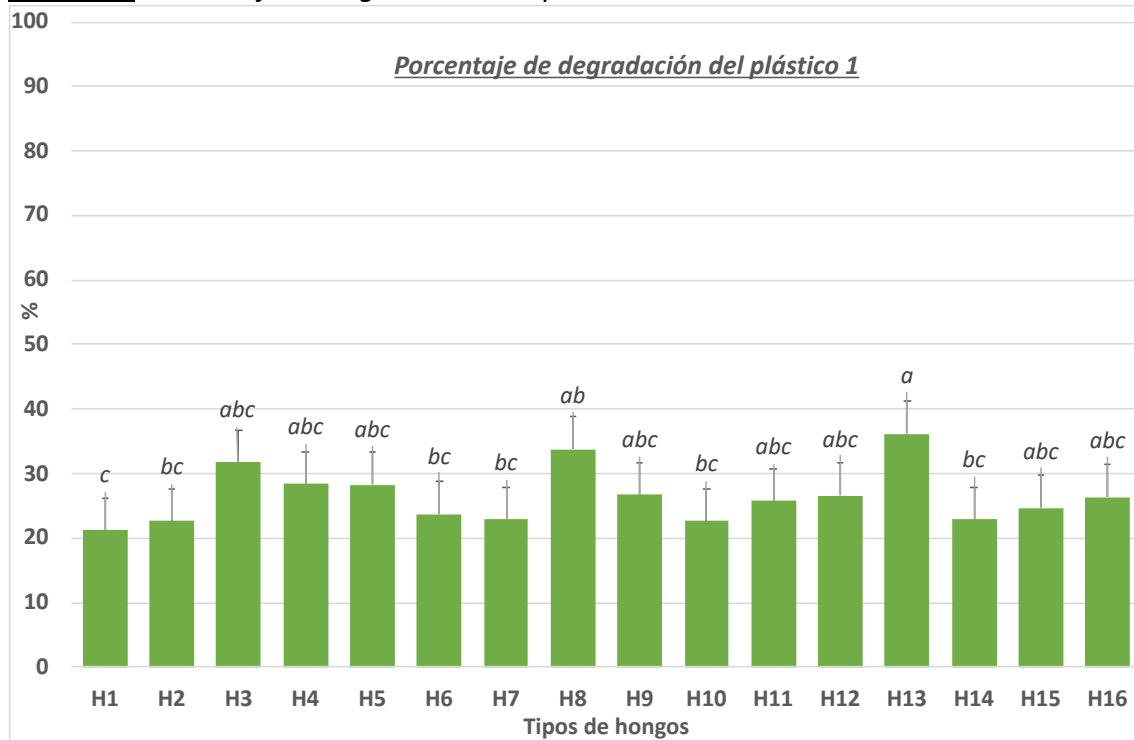
Una vez pasado los 2 meses y medio, se realiza nuevamente el pesado de los plásticos para la observación de la degradación.

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A continuación, se muestran los resultados de la degradación de cada tipo de plástico en función de los microorganismos fúngicos aislados de plásticos usados de invernadero.

PLÁSTICO 1 – SACO

Gráfica 3: Porcentaje de degradación del plástico de Saco.

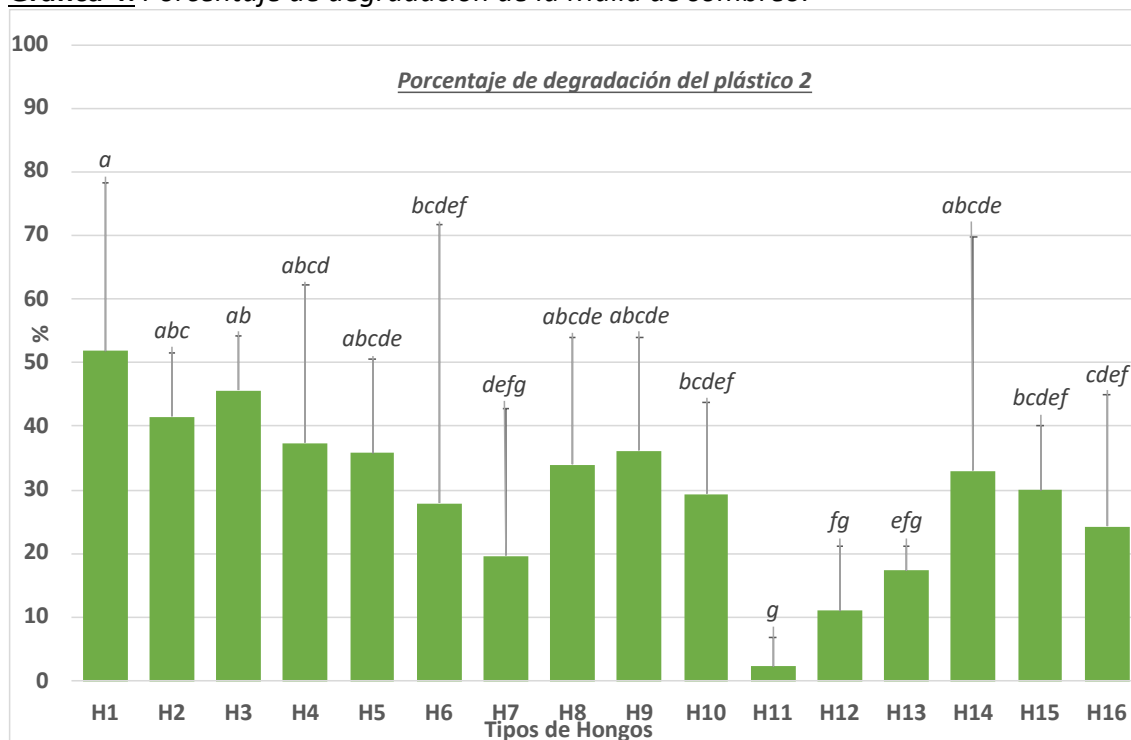


En la gráfica 3 se puede comprobar que el H13 es el hongo que más degrada en cuanto a su valor numérico, con un 36,2% del plástico. Entre estos hongos no se observa diferencia significativa en cuanto al grado de degradación del plástico.

En cambio, el H1 es el que menos porcentaje de plástico degrada en cuanto a su valor numérico con un 21,2%.

PLÁSTICO 2 – MALLA SOMBREO

Gráfica 4: Porcentaje de degradación de la Malla de sombreo.



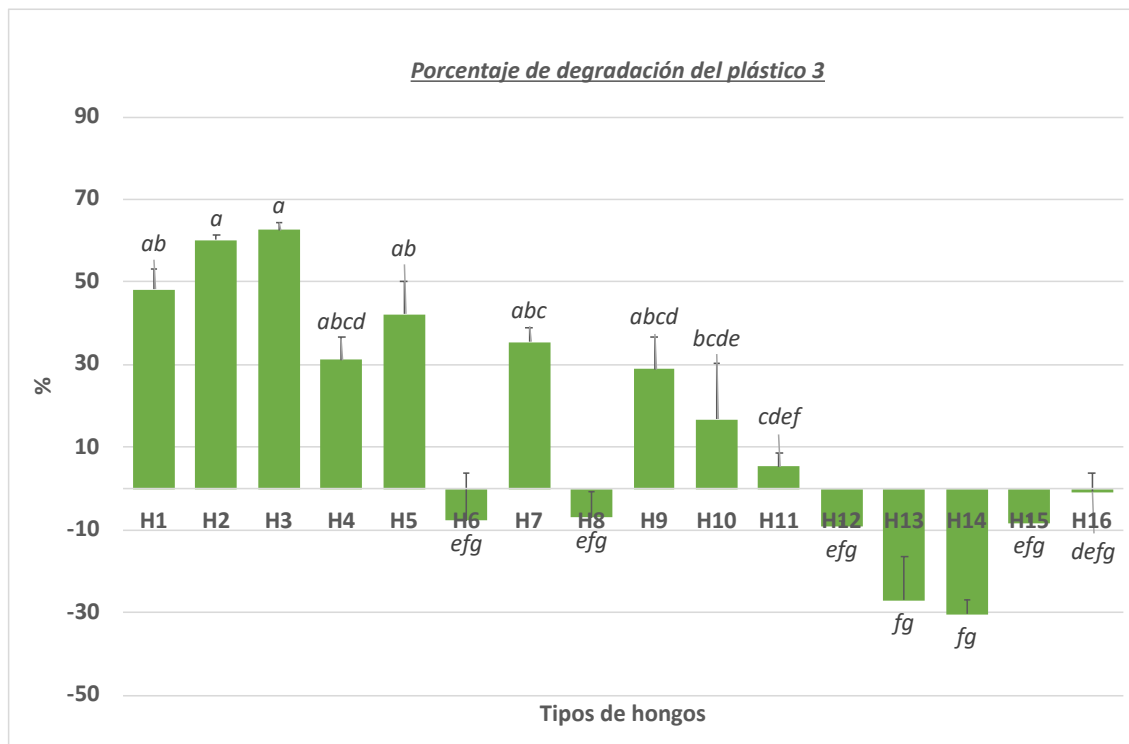
En la gráfica 4 se puede comprobar que el H1 es el hongo que más degrada en cuanto a su valor numérico, con un 51,9% del plástico.

Entre los hongos H3 y H12 hay una diferencia significativa de degradación del plástico con un valor de 34,6%.

En cambio, el H11 es el que menos porcentaje de plástico degrada en cuanto a su valor numérico con un 2,3%.

PLÁSTICO 3 – ACOLCHADO BLANCO

Gráfica 5: Porcentaje de degradación del Acolchado blanco.



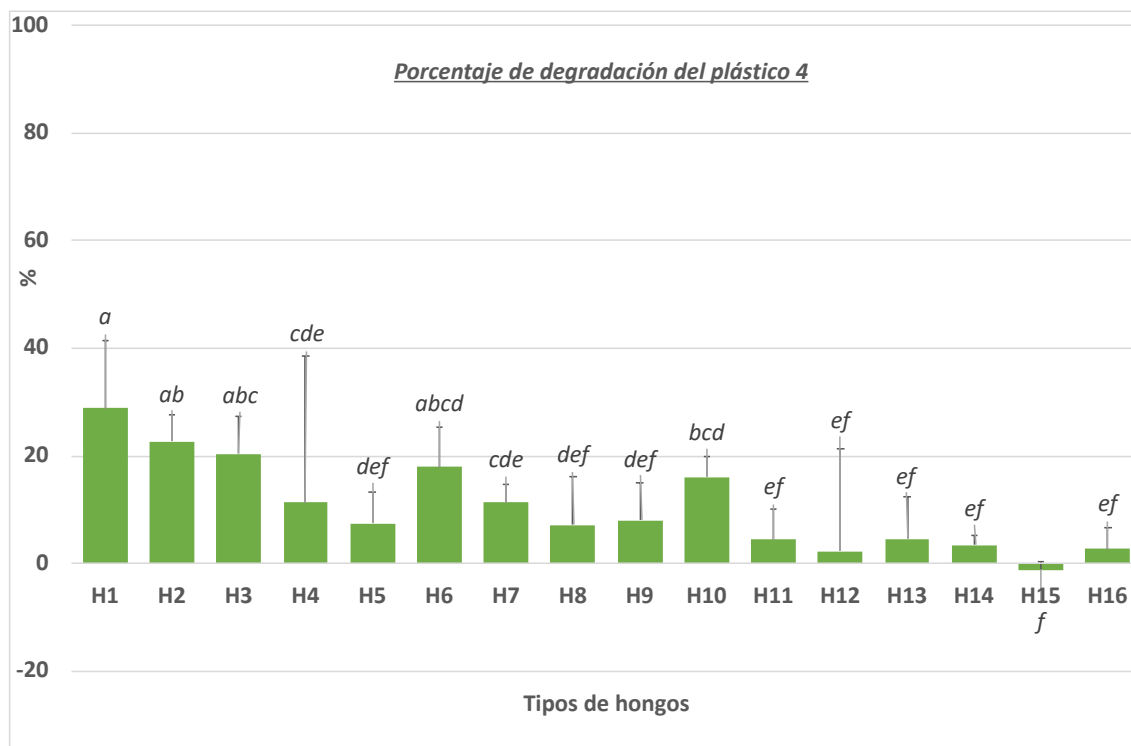
En la gráfica 5 se puede comprobar que el H3 es el hongo que más degrada en cuanto a su valor numérico, con un 62,6% de plástico.

Entre los hongos H2 y H11 existe una diferencia significativa del 54,8% de degradación de plástico.

En cambio, el H11 es el que menos porcentaje de plástico degrada en cuanto a su valor numérico con un 5,3%. Por otro lado, los hongos H6, H8, H12, H13, H14, H15, H16 presenta un valor negativo por lo que se supone que no existe degradación del plástico.

PLÁSTICO 4 -TELA MOSQUITERA

Gráfica 6: Porcentaje de degradación de la Tela Mosquitera.



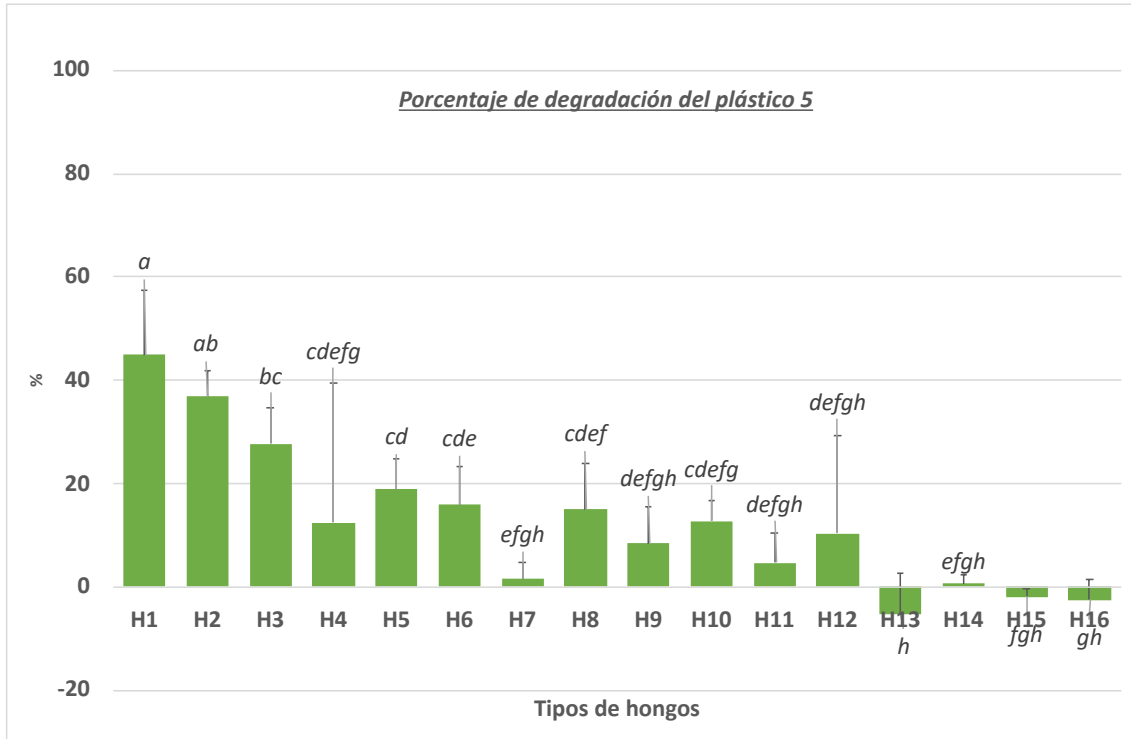
En la gráfica 6 se puede comprobar que el H1 es el hongo que más degrada en cuanto a su valor numérico, con un 28,9% de plástico.

Entre los hongos H2 y H12 existe una diferencia significativa de degradación del plástico de un 20,3%.

En cambio, el H12 es el que menos porcentaje de plástico degrada en cuanto a su valor numérico con un 2,31%, ya que el H15 presenta un valor numérico negativo y eso supone que no hay degradación.

PLÁSTICO 5 – RAFIA

Gráfica 7: Porcentaje de degradación de la Rafia.



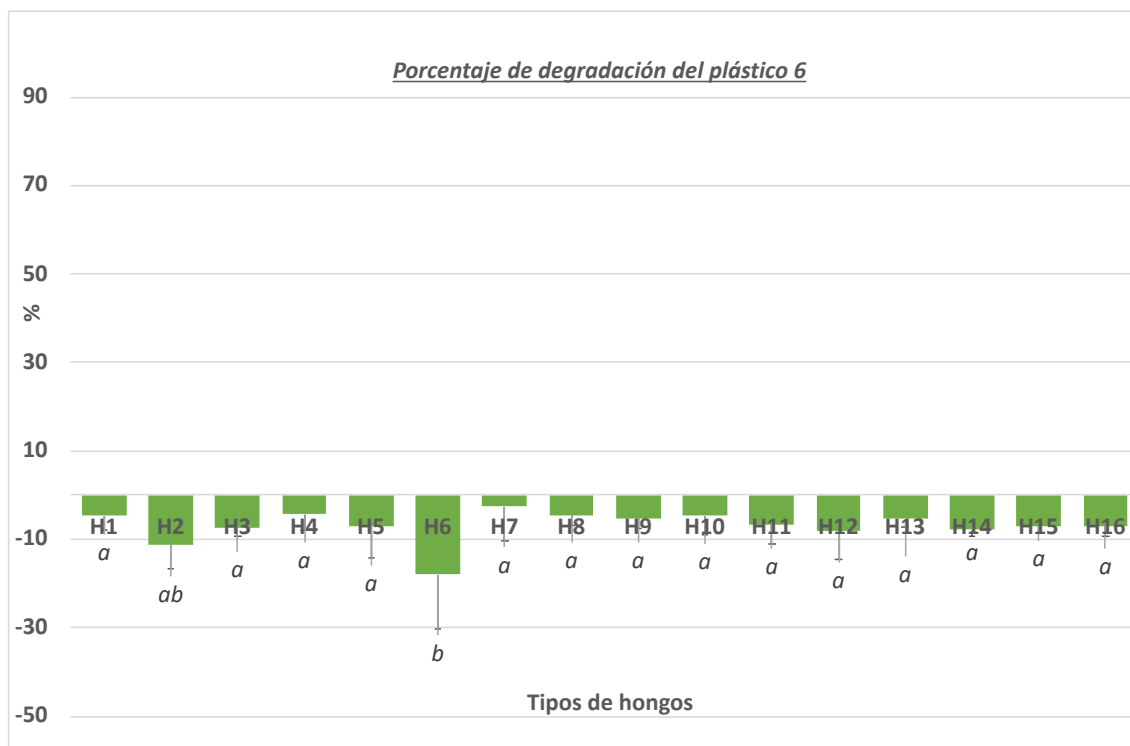
En la gráfica 7 se puede comprobar que el H1 es el hongo que más degrada en cuanto a su valor numérico, con un 44,9% de plástico.

Entre los hongos H2 y H14, hay una diferencia significativa del 36,2% de degradación del plástico.

En cambio, el H14 es el que menos porcentaje de plástico degrada en cuanto a su valor numérico, con un 0,7% ya que los hongos H13, H15 y H16 presentan un valor numérico negativo y por lo tanto no degradan nada.

PLÁSTICO 6 – ACOLCHADO NEGRO

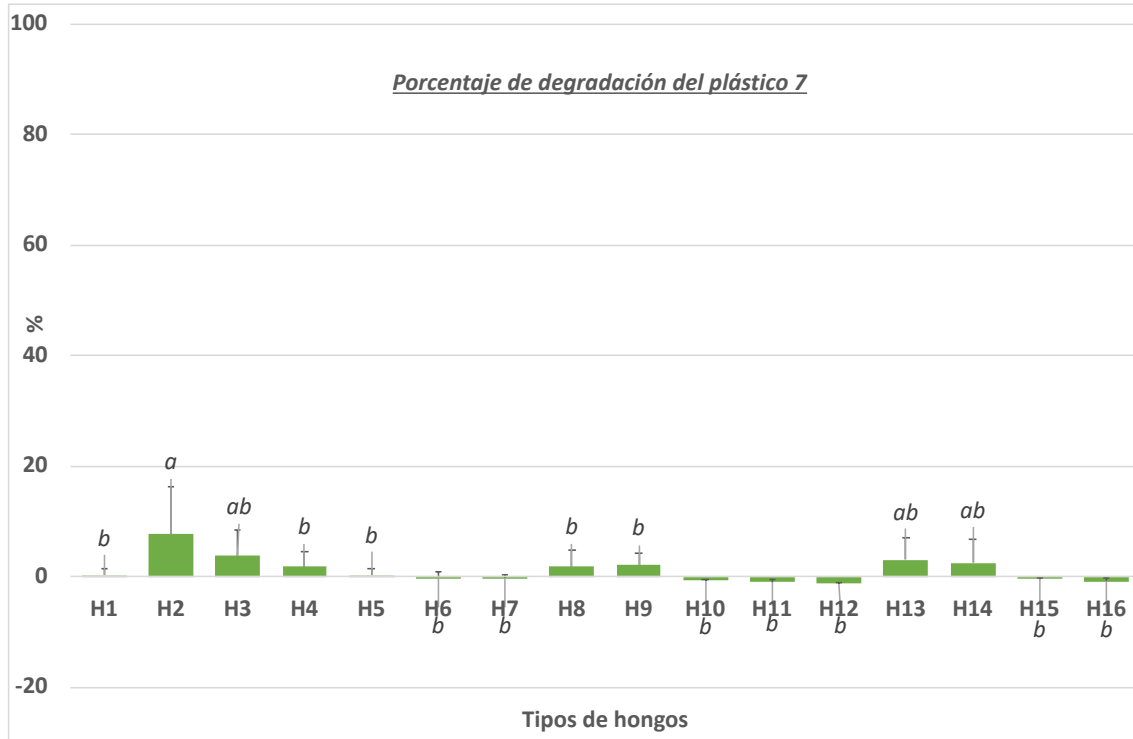
Gráfica 8: Porcentaje de degradación del Acolchado negro.



En la gráfica 8 se observan valores negativos lo que supone que no ha existido actividad del hongo, es decir, que no hay degradación del plástico.

PLÁSTICO 7 – PLÁSTICO TECHO

Gráfica 9: Porcentaje de degradación del plástico Techo.



En la gráfica 9 se puede comprobar que el H2 es el hongo que más degrada en cuanto a su valor numérico, con un 7,6% el plástico. Entre estos hongos no se observa diferencia significativa en cuanto al grado de degradación del plástico.

En esta investigación, habrá que tener en cuenta los resultados obtenidos en los procesos llevados a cabo con los distintos tipos de plástico y la cantidad de plástico que ha sido capaz cada hongo de degradar. Los hongos que se han utilizado para el ensayo han sido aislados de plásticos de invernaderos usados.

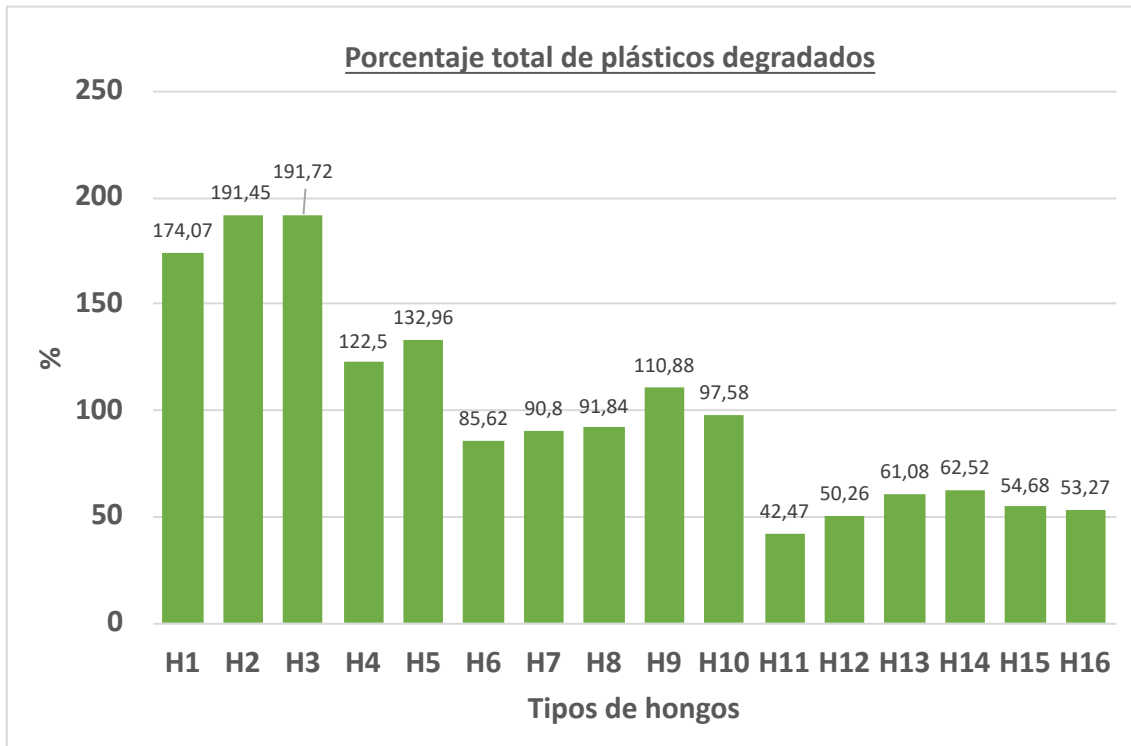
Al principio de la investigación, se obtuvieron 32 placas de hongos, pero se redujeron a 16 hongos por estar repetidos y a partir de esos se ha llevado a cabo el desarrollo de la degradación de los diferentes tipos de plásticos.

Tabla 14: *Tipos de hongos aislados de diferentes tipos de plásticos.*

		TIPOS DE PLÁSTICOS										
HONGOS		Tela mosquitera	Techo nuevo	Techo viejo	Rafia	Techo 2	Malla sombreo	Plástico saco	Acolchado negro	Acolchado blanco nuevo	Acolchado blanco viejo	
	H1	+					+		+		+	+
	H2						+					
	H3				+		+		+			
	H4			+						+	+	
	H5			+		+	+	+			+	
	H6				+		+					
	H7					+		+				
	H8		+	+			+					
	H9			+	+							
	H10								+			
	H11		+	+		+					+	
	H12											
	H13			+								+
	H14					+						
	H15					+	+					+
H16										+		

En la tabla 14, se encuentran 10 tipos de plásticos, de los cuales 3 fueron omitidos durante la investigación ya que presentaban muchas similitudes entre algunos de ellos, como era el caso del acolchado blanco viejo y el acolchado blanco nuevo. Ambos presentaban los mismos resultados por lo que solo se quedó entonces, el acolchado blanco en general. Al final, haciendo esas 3 omisiones de plásticos, se quedaron un total de 7, con los cuales se ha llevado a cabo todo el proyecto.

Como se puede ver, de los 16 diferentes tipos de hongos, un mismo tipo ha podido aislarse en varios plásticos a la vez.



Gráfica 10: Porcentaje total de plásticos degradados

En la gráfica 10, se puede comprobar que, de los 16 hongos, el que más cantidad de plásticos ha degradado ha sido el hongo 3 con un porcentaje del 191,72%. Y el que menos cantidad de plásticos ha sido el hongo 11 con un 42,47%.

Por lo tanto, para seguir estos estudios se van a tener en cuenta los hongos que presente una degradación de más del 20% de cada plástico. Por ejemplo, en el acolchado blanco, se van a seguir estudiando en función a los hongos que degraden más del 20% del plástico, es decir, el H1, H2, H3, H4, H5, H7 y H9.

Esto no es una investigación acabada con resultados definitivos, sino que hay que seguir realizando ensayos con diferentes plásticos y hongos a lo largo del tiempo porque no se puede olvidar que uno de los principales problemas de los plásticos es que su degradación es muy lenta. Es muy lenta debido a la composición polimérica que estos poseen.

Es por eso que muchos autores están en la búsqueda de diferentes formas que puedan acelerar la descomposición de los mismos para así reducir los impactos medioambientales que genera la industria agrícola. Además, se ha logrado demostrar que la actividad biodegradante de diferentes microorganismos tienen resultados muy prometedores (Malagamba, 2015).

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

En cuanto a investigaciones similares a este proyecto, hay que decir que la información encontrada fue escasa, ya que la mayoría de ellas son en torno a otros tipos de plásticos que no son los agrícolas.

Existen estudios que demuestran resultados positivos en la biodegradación del polietileno. Algunos de ellos son, por ejemplo, como los estudios realizados por Zahra y Raaman en los que se indican que algunas esporas de hongos se incubaron en medio PDA a 28 °C durante 32 h, y luego las hifas fueron cultivadas para inocular el medio AP. El cultivo se realizó a 30 °C en un agitador rotatorio a 180 rpm durante 2 días. Una muestra de 10 ml de la suspensión descrita anteriormente también se usó para inocular el medio "C", compuesto de sales y extracto de levadura. Otra muestra de 10 ml de esta suspensión se añadió al medio "D", compuesto de sales y PEBD irradiado y fragmentado. Se evaluó la degradación del PEBD, después de 3 meses, con etanol y calentando a 80 °C durante 24 h. Se evidenció en las fotomicrografías del SEM de las muestras antes del proceso de fermentación tenían una superficie lisa sin defectos. Sin embargo, después de un proceso con *Aspergillus terreus* y *Aspergillus fumigatus*, las muestras poseían superficies erosionadas. Las cavidades fueron observadas en la superficie, lo que sugiere que los hongos penetran en la matriz de PEBD durante la degradación (Zahra et al, 2010) (Raaman et al, 2012).

Otro estudio, que demuestra la degradación de plástico por hongos, en un medio diferente al anterior, es en el que se realizó un primer informe experimental de la degradación del PEBD en condiciones de laboratorio; mostrando la capacidad efectiva de *Aspergillus japonicus* que duplicó la actividad de *A. niger* (*A. japonicus* degradó 11,11% por mes, mientras que *A. niger* degradó 5,8% por mes) (Raaman et al, 2012). Su eficacia en la degradación de las bolsas comerciales de PEBD se estudió durante un período de 2 y 4 semanas. La biodegradación se midió en términos de pérdida de peso medio, que era casi el 8 al 12% después de un período de 4 semanas. Se evidenció que la superficie del material plástico pasó de ser suave a rugosa con grietas y con reducción de peso molecular con el aumento de grupos carbonilo. Aunque no se supo exactamente el mecanismo de la degradación (Raaman et al, 2012).

Según la metodología de Espinoza L, se buscó comparar diferentes clases de hongos para determinar cuál tenía mayor potencial de degradación en polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos. El resultado de esta búsqueda fue, en cuanto a las colonias, que el plástico mostró una tonalidad amarillenta dando positivo a la colonización y en cuanto al tratamiento de envejecimiento, se registró una pérdida leve de 0.088 +/- 0.576% del peso de las muestras tratadas. A su vez las únicas muestras que ciertamente registraron pérdida en peso fueron aquellas tratadas con *Fusarium*, obteniéndose en el período de cultivo más largo una pérdida de

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

0.99% +/- 0.11% y por último las otras muestras registraron un aumento de peso por las colonias adheridas al material (Espinoza, 2018).

Por lo tanto, con estos estudios, en los cuales se asemeja al que se está llevando a cabo en esta investigación, se puede deducir que existe multitud de hongos capaces de degradar con el paso del tiempo diferentes tipos de plásticos, con resultados favorables. En mi caso, comparando con los resultados del ensayo de Raaman, se obtuvo un porcentaje mayor de degradación de los plásticos en meno tiempo, puesto que se ha obtenido un 62,57% de degradación al cabo de dos meses y medio, y Raaman obtuvo un 11% de degradación en un mes.

La finalidad de este proyecto será encontrar un hongo capaz de degradar el mayor porcentaje de plástico en un corto periodo de tiempo.

Tabla 15: *Porcentaje medio de degradación observado*

Porcentaje medio de degradación observado							
Aislados	Tipos de Plástico						
	Saco	Malla sombreo	Acolchado blanco	Tela mosquitera	Rafia	Acolchado negro	Techo
H1	21,17 ± 3,00	51,87 ± 26,36	48,16 ± 4,99	28,91 ± 12,65	44,90 ± 12,65	-4,62 ± 3,18	0,24 ± 1,23
H2	22,69 ± 6,33	41,54 ± 9,94	60,08 ± 1,20	22,64 ± 5,05	36,92 ± 5,05	-11,08 ± 5,39	7,59 ± 8,77
H3	31,70 ± 6,25	45,62 ± 8,67	62,57 ± 1,95	20,36 ± 6,87	27,76 ± 6,87	-7,29 ± 1,88	3,72 ± 4,76
H4	28,39 ± 4,90	37,41 ± 24,93	31,15 ± 5,52	11,37 ± 27,19	12,40 ± 27,19	-4,34 ± 3,65	1,81 ± 2,73
H5	28,32 ± 4,70	35,78 ± 14,84	42,19 ± 7,93	7,45 ± 5,74	18,95 ± 5,74	-7,01 ± 7,11	0,26 ± 1,11
H6	23,73 ± 4,06	27,96 ± 43,74	-7,80 ± 11,48	17,97 ± 7,33	15,95 ± 7,33	-17,94 ± 12,40	-0,05 ± 0,85
H7	22,93 ± 4,39	19,61 ± 23,25	35,41 ± 3,37	11,35 ± 3,30	1,50 ± 3,30	-2,59 ± 7,65	-0,32 ± 0,67
H8	33,82 ± 10,59	34,02 ± 19,94	-7,05 ± 6,28	7,21 ± 8,90	15,05 ± 8,90	-4,53 ± 2,36	1,74 ± 3,04
H9	26,76 ± 17,15	36,17 ± 17,74	28,97 ± 7,67	7,99 ± 7,07	8,35 ± 7,07	-5,25 ± 2,15	2,05 ± 2,20
H10	22,61 ± 7,88	29,36 ± 14,34	16,74 ± 13,48	16,09 ± 3,83	12,78 ± 3,83	-4,66 ± 4,43	-0,68 ± 0,13
H11	25,80 ± 4,12	2,27 ± 4,62	5,28 ± 3,22	4,37 ± 5,64	4,74 ± 5,64	-6,53 ± 4,57	-0,98 ± 0,44
H12	26,61 ± 5,06	11,02 ± 10,07	-9,33 ± 1,52	2,31 ± 19,03	10,32 ± 19,03	-8,15 ± 6,22	-1,36 ± 0,37
H13	36,16 ± 4,78	17,30 ± 3,94	-26,94 ± 10,38	4,59 ± 7,93	-5,21 ± 7,93	-5,33 ± 1,95	3,03 ± 4,13
H14	22,90 ± 0,71	33,02 ± 36,72	-30,36 ± 3,26	3,45 ± 1,66	0,70 ± 1,66	-7,78 ± 1,65	2,44 ± 4,22
H15	24,69 ± 4,53	29,98 ± 10,14	-8,33 ± 1,78	-1,17 ± 1,60	-1,86 ± 1,60	-7,02 ± 1,71	-0,49 ± 0,25
H16	26,36 ± 5,96	24,24 ± 20,64	-0,75 ± 4,62	2,67 ± 3,90	-2,58 ± 3,90	-6,91 ± 2,42	-0,91 ± 0,70

En la tabla 15 se indica un resumen de los hongos y qué tipos de plástico a conseguido degradar mas. Con color verde, se indica todos aquellos hongos que sí han presentado degradación en los plásticos, y con color rojo los que no.

6. CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en el presente Trabajo Fin de Grado titulado, aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradantes de plásticos de invernaderos, se han llegado a las siguientes conclusiones:

Aislamiento:

1. A partir de un total de 7 plásticos utilizados mayoritariamente en Horticultura intensiva, se han obtenido un total de 32 aislados fúngicos.

Selección:

2. Del total, se han seleccionado 16 aislados que han sido positivos para la actividad lacasa *in vitro*.

Ensayo de degradación:

3. El plástico de saco y la malla de sombreo ha sido degradado por todos los aislados fúngicos, con porcentajes de degradación muy elevados que oscilan entre el 2 y 52%.
4. El aislado fúngico que más plásticos ha degradado ha sido el aislado 3, con porcentajes de degradación del 63%, 46% y 32% para los plásticos de acolchado blanco, saco y tela mosquitera, respectivamente.
5. El aislado que ha dado lugar al mayor porcentaje de degradación ha sido hongo 3, con un porcentaje de 62.57%, seguida del hongo 2 con un porcentaje del 60%, ambos para el plástico de acolchado blanco.
6. El acolchado negro no ha sido degradado por ningún aislado fúngico incrementándose su peso debido al desarrollo de biofilm favorecidas por las características del material.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Anarpla y Cicloplast. (2017). *CIFRAS Y DATOS CLAVE DE LOS PLÁSTICOS Y SU RECICLADO EN ESPAÑA*. Obtenido de Cicloplast.com: http://www.cicloplast.com/ftp/cifras_datos_clave_plasticos_y_su_reciclado_en_espana.pdf
- Blázquez, M. (2003). Los residuos plásticos agrícolas. En *Los residuos urbanos y asimilables*. Junta de Andalucía.
- Diario de Almería. (24 de Mayo de 2014). El sistema de gestión Cicloagro recicla más de 12.000 toneladas de plásticos en Almería en 2013. Obtenido de Diario de Almería: https://www.diariodealmeria.es/agriculturadealmeria/Cicloagro-recicla-toneladas-plasticos-Almeria_0_809919039.html
- Espinoza Arias, L. (2018). Evaluación de la degradación de polietileno de baja densidad mediada por diferentes especies de hongos (Bachelor's thesis, Quito).
- Fundación Cotec para la Innovación Tecnológica. (21 de Julio de 2009). *Canales Sectoriales Interempresas*. Obtenido de Canales Sectoriales Interempresas: <https://www.interempresas.net/Agricola/Articulos/32915-La-agricultura-bajo-plastico-en-Espana.html>
- Goyena, I. (2 de Octubre de 2017). *SITUACION ACTUAL DE LA GESTION DE PLASTICOS AGRICOLAS EN ESPAÑA Y EN EUROPA*. Obtenido de Cicloplast: https://www.miteco.gob.es/es/ceneam/grupos-de-trabajo-y-seminarios/Proteccion-del-medio-marino/5plasticos-agricolas-cicloagro_tcm30-429451.pdf
- Malagamba, P. (2015). Plásticos agrícolas. Sus usos y problemas. *Agriculturers Red de Especialistas en Agricultura*.
- Mathew, L. y Vimala, P. (2015). Biodegradation of Polyethylene using *Bacillus subtilis*. En *international conference on emerging trends in engineering science and technology* (pág. 232). Thiruvananthapuram.
- Munir, E., Harefa, R., Priyani, S. y Suryanto, D. (2018). Plastic degrading fungi *Trichoderma viride* and *Aspergillus nomius* isolated from local landfill soil in Medan. *IOPScience*, 1.

Aislamiento y evaluación de hongos como agentes degradadores de plásticos de invernaderos.

- Ojha, N., Pradhan, N., Singh, S., Barla, A., Shrivastava, A., Pradip Khatua, V. y Bose, S. (2017). Evaluation of HDPE and LDPE degradation by fungus, implemented by statistical optimization. *Scientific Reports*, 1.
- ProlockerAdmin. (22 de Agosto de 2016). *Prolocker*. Obtenido de Prolocker: <https://prolocker.mx/tipos-de-polietileno-y-prolocker/>
- Raaman, N., Rajitha, N., Jayshree, A. y Jegadeesh, R. (2012) Biodegradation of plastic by *Aspergillus* sp. isolated from polythene polluted sites around. *Journal of academia and industrial research* 1 (6).
- Shiv Shankar, S. (2012). Microbial Degradation of Polyethylene: Recent Progress and Challenges. En P. K. Arora, *Microbial Metabolism of Xenobiotic Compounds* (págs. 245-263). Lucknow: Springer.
- Sivan, A., Szanto, M. y Pavlov, V. (2006). Biofilm development of the polyethylene-degrading bacterium *Rhodococcus ruber*. En *Applied Microbiology - Microbiology & Biotechnology* (pág. 346). Negev: Springer.
- Zahra, S., Abbas, S., Mahsa, M. y Mohsen, N. (2010) Biodegradation of low-density polyethylene (LDPE) by isolated fungi in solid waste medium. *Waste management* 30: 396-401

La agricultura almeriense es una de las principales fuentes de economía para la provincia, y supone un factor importante en el desarrollo de la misma. Pero al igual que la agricultura es importante, una parte de ella, como son los plásticos de los invernaderos, genera graves problemas para el medio ambiente. Los problemas son generados porque los plásticos no son reciclados por el alto coste que esto supone a los agricultores y por lo tanto se acumulan grandes toneladas de ellos.

Ante las pocas soluciones que hay en esta problemática, que influye en tantos aspectos de la vida diaria, se ha abierto esta investigación para intentar conseguir que, por medio de los hongos, los plásticos sean capaces de ser degradados sin necesidad de utilizar otros medios también contaminantes y reducir por lo tanto el impacto medio ambiental y la contaminación.

Almeria agriculture is one of the main sources of economy for the province, and it is an important factor in its development. But just as agriculture is important, a part of it, such as plastics in greenhouses, creates serious problems for the environment. These problems are generated because plastics are not recycled due to the high cost that the farmers are expected to pay, therefore large tons of this material are accumulating everywhere.

Given the few solutions that exist regarding this problem, which influences so many aspects of daily life, this research has been opened to try to get that, by using fungi, plastics will be degraded without the need to use other polluting means and therefore reducing the environmental impact and pollution.

