

## PLAN DE TRABAJO

# **Biodegradación de plásticos biodegradables en ambientes naturales y condiciones de relleno sanitario**

## OBJETIVOS GENERALES

### Objetivos Generales e impacto:

Actualmente se generan a nivel mundial 34 millones de toneladas de residuos plásticos por año, de los cuales aproximadamente el 93% son descartados en rellenos sanitarios y cursos de agua generando un serio problema ambiental. Con vistas a la mitigación de este problema, existe una clara tendencia hacia prácticas relacionadas con el reciclaje de este tipo de residuos. Pero debe considerarse que el proceso de reciclaje puede realizarse solo un número limitado de veces sobre el mismo sustrato, y es aplicable sólo en determinados casos. Esto condujo a un crecimiento de los plásticos y compuestos denominados biodegradables y/o compostables en Europa y Asia, en particular para objetos descartables ó de pocos usos (bolsas, cubiertos, vasos, etc.).

Las definiciones biodegradables y/o compostables de estos materiales se aplican en base al resultado de ensayos protocolizados, de duración fija, que en algunos casos no contemplan las características morfológicas del material ni las condiciones ambientales presentes en los sitios de disposición final de este tipo de materiales. Además, cabe destacar que en muchos casos los residuos plásticos tienen como destino final una disposición no ordenada ni programada, terminando dispersos en diferentes ambientes como ríos, mares, suelos, caminos, etc., impactando negativamente sobre la fauna, el paisaje y la población del entorno.

En algunos ámbitos (civiles, privados e incluso en el Estado), existe cierta confusión sobre los términos biodegradabilidad y compostabilidad. Hay un gran esfuerzo en conocer si un material es compostable (proceso aeróbico, a temperaturas superiores a los 50°C y con alta cantidad de materia orgánica) ya que los estándares internacionales más desarrollados tecnológicamente evalúan la degradación mediante dicho proceso. Sin embargo, en nuestro país existen muy pocas plantas de tratamiento a escala industrial de residuos sólidos urbanos por compostaje, y la mayoría de los residuos se depositan en rellenos sanitarios, donde los procesos son principalmente anaeróbicos. A su vez, son muy pocos los estudios en la literatura que evalúan los procesos de degradación de plásticos biodegradables en rellenos sanitarios.

Existe muy poca información sobre la influencia del ambiente en los procesos de degradación de polímeros biodegradables (presencia de oxígeno, ambientes salados, flora microbiana, acidez, etc.), en particular en nuestra región. Por todo lo expuesto, en nuestro país es crítico evaluar la biodegradabilidad de materiales poliméricos denominados biodegradables y/o compostables en diferentes ambientes y evaluar posibles estrategias para acelerar los procesos de biodegradación en condiciones controladas.

El objetivo general del presente plan es estudiar la biodegradabilidad de polímeros biodegradables y/o compostables bajo diferentes condiciones ambientales (ambiente marino, sedimentos de cursos de agua, agua de río y suelos) y en condiciones anaeróbicas, como las presentes en rellenos sanitarios. Asimismo, se pretende evaluar distintas tecnologías para acelerar y mejorar la biodegradabilidad de este tipo de materiales en suelos, en digestión anaeróbica y en compostaje, particularmente mediante procesos de bioaugmentación y bioestimulación.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Evaluar la biodegradabilidad de materiales poliméricos considerados biodegradables y/o compostables en diferentes condiciones ambientales, en particular en suelos, agua de río, sedimentos y agua de mar.
2. Evaluar la biodegradabilidad de materiales poliméricos considerados biodegradables y/o compostables en condiciones anaeróbicas, similares a las presentes en rellenos sanitarios.
3. Estudio de posibles modificaciones de las condiciones de biodegradación para acelerar el proceso, en particular, evaluar tratamientos de bioaumentación y bioestimulación en suelos, rellenos sanitarios y compostaje.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

1. La resistencia a la biodegradación por compostaje o en suspensión acuosa se ve afectada, para las características de un dado polímero de base (características químicas, cristalinidad, mezcla con otros polímeros afines, hidrofiliidad).
2. Las condiciones ambientales (temperatura, humedad, pH del medio, presencia y/o ausencia de micronutrientes, relación C/N, presencia o ausencia de oxígeno) afectan la velocidad y eficiencia de biodegradación de dichos polímeros.
3. El agregado de nutrientes inorgánicos, como por ejemplo fosfatos, nitratos y/u otros micronutrientes, y/o de co-sustratos fácilmente metabolizables, como carbohidratos y/o desechos orgánicos, favorece el crecimiento de microorganismos en suelos y aguas.
4. El aumento de microorganismos favorecería la degradación de materiales biodegradables.

A mediano y largo plazo se espera determinar si el grado de contaminación debido a compuestos orgánicos recalcitrantes y la presencia de microorganismos especializados con diversas actividades enzimáticas tienen algún efecto sobre la degradación de polímeros biodegradables en aguas, suelos y compostaje. En particular, se propone examinar cinéticamente los procesos de biodegradación y biodesintegración, evaluando la influencia de las condiciones del medio y la existencia de efectos sinérgicos y/o inhibitorios.

## RELEVANCIA DEL PROBLEMA

La biodegradabilidad de un material se define como la capacidad que presenta para ser mineralizado bioquímicamente por parte de microorganismos [1]. La biodegradación de polímeros orgánicos genera  $\text{CO}_2$  y agua en condiciones aeróbicas, y mayoritariamente  $\text{CH}_4$  y  $\text{CO}_2$  en condiciones anaeróbicas. Las características químicas del polímero determinan que microorganismos o consorcios microbianos son capaces de degradarlos, ya que los mismos deben poseer enzimas y rutas metabólicas específicas [2]. La velocidad y capacidad de biodegradación de un material polimérico dependen de las características intrínsecas del material y de las condiciones en las que se lleva a cabo el proceso de biodegradación [3].

Dentro de las características del material, el peso molecular, temperatura de transición vítrea, cristalinidad, grupos funcionales presentes, solubilidad, capacidad de adsorción de

agua, cantidad y composición de plastificantes y/o aditivos son algunos de los principales factores que influyen sobre la biodegradabilidad [4]. Otro factor que afecta la velocidad de biodegradación es el tamaño y forma del material. La biodegradación es generalmente un proceso de erosión superficial, por lo tanto, si el material se encuentra molido en forma de polvo se degrada más fácilmente que si se encuentra en forma de film [5,6].

Existen ensayos estandarizados que reflejan distintas condiciones de disposición final del material. Los ensayos más comúnmente utilizados para evaluar la biodegradación de materiales poliméricos son: los ensayos de enterramiento en suelo, mediante compostaje, utilizando cepas puras en medio líquido o utilizando lodos activados [1]. Sin embargo, no todos los plásticos biodegradables son degradados en diferentes ambientes. Por ejemplo, en la literatura se ha estudiado extensamente la biodegradación de bioplásticos en condiciones de compost o suelo [7,8], sin embargo, la biodegradación en ambientes marinos, cuerpos de agua o rellenos sanitarios se encuentra menos estudiada [4,9,10].

En los últimos años la presencia de microplásticos en ambientes marinos aumentó exponencialmente [11]. En consecuencia, los últimos artículos publicados en la literatura sobre biodegradabilidad de polímeros compostables en medio líquido hacen referencia casi exclusivamente a este tipo de ambientes [3,9,12]. Los polímeros más estudiados en la literatura en estos ambientes son los polihidroxialcanoatos (PHA) [13, 14, 15], mientras que otros polímeros biodegradables fueron menos estudiados [16, 17]. La temperatura del agua [13] o la forma que poseen los materiales descartados [14] son algunos de los factores que afectan la cinética de biodegradabilidad. Independientemente de las características intrínsecas del material, el origen del agua de mar juega un papel preponderante en la biodegradación, debido a la presencia de diferentes comunidades microbianas capaces de degradar bioplásticos. Por ejemplo, Sekiguchi y col [16] evaluaron la biodegradabilidad de tres polímeros distintos, policaprolactona (PCL), polibutileno succinato (PBS) y polihidroxibutirato (PHB), en aguas de tres regiones distintas de Japón. Los autores demuestran que el porcentaje de biodegradación depende de la región de la cual se tomó el agua de mar. Por otro lado, otros autores sugieren que es necesario investigar la biodegradación en la interface agua-sedimentos, ya que en dicha interface podrían hallarse otras comunidades microbianas capaces de biodegradar polímeros biodegradables [15, 18]. Estos resultados demuestran que es fundamental evaluar la biodegradabilidad en cada región donde se implementen este tipo de materiales. Cabe destacar que el descarte de materiales biodegradables en ambientes acuáticos podría aumentar la actividad microbiana en dichos cuerpos de agua, lo que podría agotar el oxígeno disuelto, generando un ambiente anóxico que afectaría la biodiversidad del ecosistema.

La degradación de polímeros biodegradables y/o biobasados en suelos ha sido más estudiada que en medios acuáticos [7]. En la literatura, la mayoría de los estudios en suelos se enfocan en la biodegradabilidad de PHA y PLA [3]. Los suelos poseen una gran diversidad de microorganismos, lo que permite que la biodegradación de plásticos sea más eficiente que en otros ambientes, como por ejemplo aguas o aire. Sin embargo, dependiendo de las condiciones del suelo, la biodegradación de estos materiales puede diferir. Por ejemplo, el 98% de films de PHA fueron degradados en un suelo de la región de Hoa Lac, Vietnam, mientras que el mismo material perdió solo el 47% de su peso en un suelo de la región de Dam Bai del mismo país. La disminución de la degradación en dicha región podría estar relacionada con el bajo pH del suelo, el cual probablemente disminuyó la actividad microbiana [19]. Por lo tanto, es necesario evaluar la biodegradabilidad en suelos locales, en particular en zonas con acumulación de residuos por disposición no ordenada o donde se disponen y acumulan los materiales biodegradables descartables.

Existen muy pocos estudios sobre la biodegradabilidad de polímeros en condiciones anaeróbicas [10]. Además, cada relleno sanitario posee su propia comunidad microbiana, por lo que es necesario evaluar dicho proceso utilizando inóculos de plantas de relleno

sanitario locales. Por otra parte, si bien este tipo de plásticos podrían ser tratados en compostaje aeróbico, el enterramiento en condiciones anaeróbicas podría llegar a generar biogás, valorizando energéticamente este tipo de residuos [20, 21].

Los parámetros del suelo, compost o lodo activado son importantes a la hora de evaluar la biodegradabilidad. Es sabido que cada suelo y/o compost posee sus propias características fisicoquímicas y comunidad microbiana [22, 23], las cuales podrían ser optimizadas para acelerar la biodegradación de materiales poliméricos.

Varios estudios han identificado especies microbianas en compost, suelos y aguas responsables de la biodegradación de biopolímeros [3], sin embargo, estas especies no necesariamente se encuentran presentes en todos los suelos o compost. A su vez, en el compostaje industrial los microorganismos predominantes son mesófilos y termófilos, dependiendo del estadio del compostaje. En condiciones de laboratorio, la temperatura juega un papel fundamental ya que solo podrán desarrollarse aquellos microorganismos que sean capaces de tolerar la temperatura establecida, mientras que aquellos que crezcan a mayor o menor temperatura se encontrarán inhibidos [24, 25]. Una posibilidad para acelerar los procesos de biodegradación es el agregado de bacterias u hongos que contengan vías enzimáticas específicas para la degradación de polímeros. La aceleración de la biodegradación de este tipo de materiales durante el proceso de compostaje es de importancia económica, ya que la permanencia de residuos poliméricos (en particular, microplásticos debido a la incompleta biodegradación de dichos materiales) finalizado el proceso disminuye la calidad del compost final y podría conducir a la acumulación de residuos en los sitios donde se aplica el compost [26, 27]. Por ejemplo, la inoculación con una cepa aislada de *Bordetella petrii* aceleró la biodegradación de films de PLA en compostaje [28]. Existen pocos ejemplos en la literatura de una mejora en el compostaje de materiales poliméricos con la inoculación de especies microbianas específicas, pero se ha demostrado en el compostaje de celulosa inoculado con especies de Actinobacterias [29], de residuos vegetales inoculados con cepas de *Bacillus subtilis* y *Chaetomium thermophilum* [30] y de residuos sólidos urbanos inoculando con consorcios de hongos [36]. Este tipo de estrategias también pueden ser utilizadas en suelos naturales para mitigar los efectos de la acumulación de polímeros biodegradables por disposición no ordenada de materiales descartables. Por ejemplo, Satti y col [31] inocularon suelos con *Sphingobacterium* sp. y *Pseudomonas aeruginosa*, especies degradadoras de ácido poliláctico (PLA), y aumentaron el porcentaje de biodegradación de dicho polímero en condiciones ambientales, sin efectos ecotóxicos sobre la población microbiana natural del suelo.

Otra alternativa posible es el agregado de suplementos que mejoren las propiedades fisicoquímicas del medio (pH, relación C/N, conductividad, nitrógeno y fósforo disuelto, entre otras) ó estimulen el crecimiento de microorganismos naturales, incrementando la velocidad del proceso de biodegradación [32]. Por ejemplo, el agregado de una enmienda alcalina aceleró la velocidad de compostaje de polímeros de PLA [33]. Quecholac-Piña y col. [34] adicionaron levadura y azúcar negra como enmienda orgánica en el compostaje de un polímero biodegradable basado en PLA y Ecoflex y observaron un aumento en la biodegradabilidad del material en el proceso suplementado. Castro-Aguirre y col. [35] suplementaron el compostaje de PLA con vermiculita para mejorar la aereación en el proceso y observaron un aumento en la velocidad del proceso. Satti y col [31] agregaron lactato de sodio (precursor del PLA) a suelos para estimular el crecimiento de microorganismos naturales presentes en dichos suelos capaces de fermentar ácido láctico, y observaron un mayor porcentaje de biodegradación en muestras de PLA.

Este tipo de estrategias de enmiendas a suelos son conocidas como bioaumentación (en el caso del agregado de cepas microbianas específicas) ó bioestimulación (en el caso del agregado de micronutrientes orgánicos e inorgánicos). El empleo de estas técnicas ha sido

propuesto para la remediación de suelos contaminados con compuestos recalcitrantes [36], pero ha sido poco estudiado para acelerar la biodegradación de polímeros biodegradables. En síntesis, el agregado de enmiendas, tanto orgánicas como inorgánicas, podrían acelerar el proceso de degradación de materiales biodegradables, disminuyendo los tiempos y en última instancia los efectos adversos sobre el ambiente.

## RESULTADOS PRELIMINARES Y APORTES DEL GRUPO AL ESTUDIO DEL PROBLEMA EN CUESTIÓN

Para la realización de este plan es necesario un enfoque interdisciplinario. Como investigador responsable, soy Licenciado en Biotecnología y Doctor en Ciencia y Tecnología – Mención Química de la Universidad Nacional de San Martín. Durante mi tesina de licenciatura y en mi tesis de doctorado he aislado y trabajado con bacterias provenientes de cursos de agua contaminados de la cuenca del río Reconquista capaces de degradar compuestos orgánicos recalcitrantes en medio líquido y compostaje con el grupo de trabajo de análisis ambiental del 3iA-IIA UNSAM-CONICET [37, 38, 39]. A su vez, poseo experiencia en caracterización de arcillas y su interacción con diferentes moléculas orgánicas [40, 41], las cuales son un constituyente principal de muchos tipos de suelos y sedimentos de ríos.

En mi postdoctorado he trabajado en el desarrollo de compuestos en base almidón, estudiando el efecto de las micro y nanocargas sobre las propiedades finales, en particular su biodegradabilidad en medio líquido y en suelo. Con el grupo de polímeros y materiales compuestos (LP&MC) del IFIBA, hemos publicado el efecto de cargas con efecto bactericida [42] y el de cargas naturales, pero sin poder bactericida [43]. A su vez, he contribuido en el desarrollo de materiales biodegradables por extrusión [44, 45] y electroestirado [46].

En particular, he puesto a punto una técnica para la determinación de la biodegradabilidad de films en base a almidón de mandioca en medio líquido en presencia de *E.coli*, utilizando un respirómetro automático Micro-Oxymax de Columbus Instruments (Figura 1A). Esta técnica se ha utilizado para evaluar el efecto de la adición de nanocargas con efecto bactericida en la biodegradabilidad de dichos materiales [42].

A su vez, el equipo de trabajo del LP&MC ha desarrollado una metodología para la determinación cualitativa de la biodegradación en suelos de films poliméricos (Figura 1B). En el grupo de trabajo se han evaluado el efecto de distintos aditivos (agentes reticulantes, extractos con actividad antioxidantes y nanopartículas) en la biodegradabilidad en suelo de films de almidón [42, 47, 48].



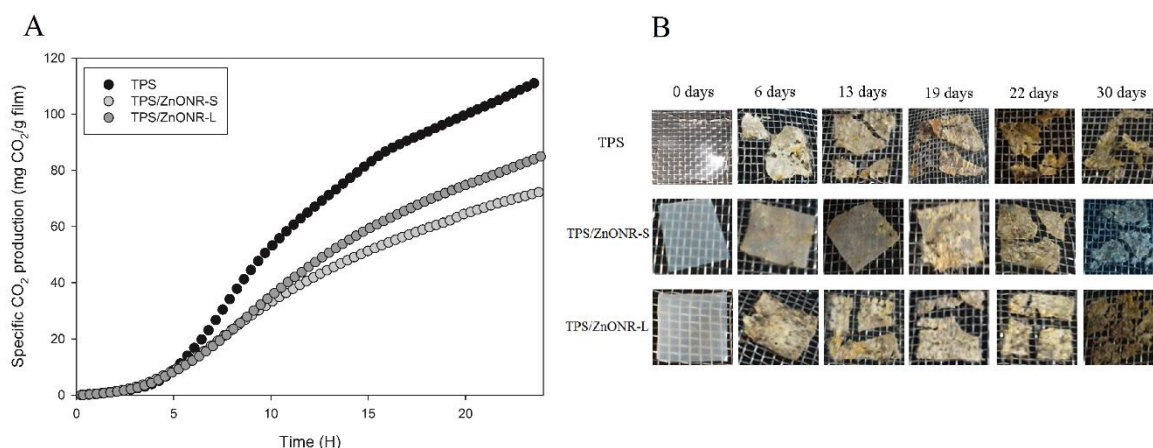


Figura 1: Biodegradabilidad de films de almidón en medio líquido (A) y suelo (B).

Mi formación en química del medio ambiente me permite evaluar las modificaciones en los suelos, compost y aguas producidos durante los procesos de biodegradación, y mi formación como biotecnólogo me permite caracterizar y aislar los microorganismos responsables de dichos procesos.

Recientemente se ha diseñado, fabricado y puesto en funcionamiento en la UNSAM un equipo para evaluar la biodegradabilidad de polímeros en condiciones de compostaje industrial según normas internacionales (ISO 14855-1:2005 y/o ASTM D5338-98) (Figura 2). Este equipo posee la ventaja de poder controlar la temperatura, humedad y flujo de entrada de aire, por lo que se podría adaptar para evaluar la biodegradabilidad de polímeros en medios líquidos, suelos o condiciones anaeróbicas. Ya se han realizado ensayos preliminares de biodegradabilidad en condiciones de compostaje industrial de materiales biodegradables comerciales (Mater-Bi, Novamont).

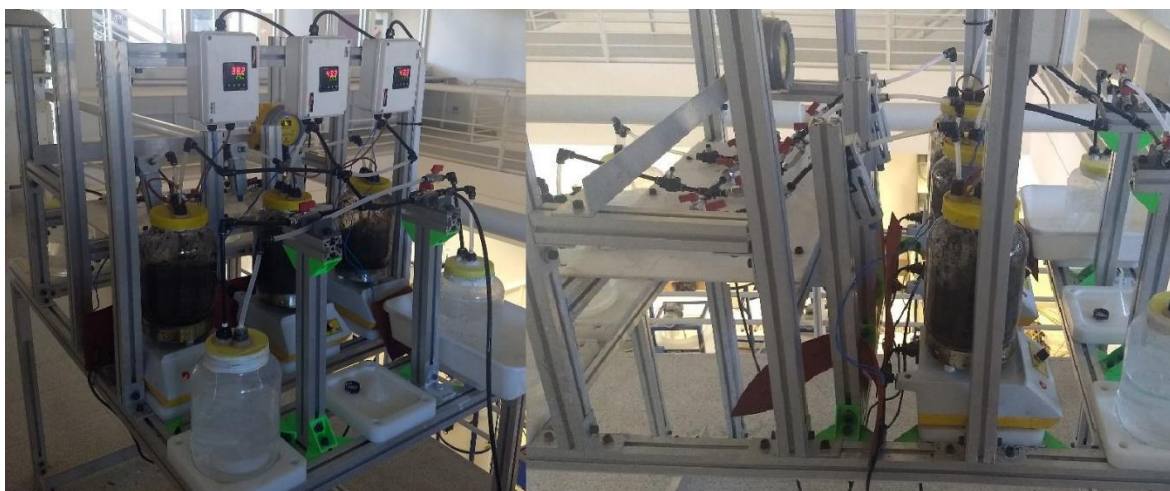


Figura 2: Equipo de biodegradabilidad diseñado y construido en la UNSAM.

El Grupo Colaborador consta de una Investigadora Superior CONICET (Dra. Silvia Goyanes), 2 Investigadores Principales CONICET (Dr. Roberto Candal y Dr. Gustavo Curutchet), una Investigadora Independiente CONICET (Dra. Lucía Famá) y 1 becario de Doctorado (Lic. Santiago Estévez Areco).

La Dra. Goyanes (Investigadora Superior CONICET y profesora Adjunta de la UBA) es especialista en el desarrollo de materiales nanoestructurados y películas de base polimérica

biodegradable para aplicación en alimentos. Presenta *expertise* en la física de materiales desde hace más de 20 años y ha realizado transferencias a la industria a lo largo de su carrera. Posee más de 100 publicaciones en revistas internacionales en el desarrollo de materiales poliméricos. En particular, en el tema de películas biodegradables de base almidón su grupo viene trabajando desde hace varios años. Los resultados dieron origen a publicaciones, patentes y premios, además de un importante número de trabajos publicados como proceeding de congresos nacionales e internacionales.

El Dr. Candal (Investigador Principal CONICET y profesor asociado UNSAM) es especialista en química, contaminación de aguas y suelos, contaminación hídrica y materiales poliméricos biodegradables en base a almidón y caseinato de sodio. Su grupo de trabajo se especializa en la remediación de aguas y suelos contaminados utilizando técnicas avanzadas de oxidación y la fabricación y caracterización de películas biodegradables. Es autor de más de 90 publicaciones en revistas internacionales con reconocimiento de pares, 8 capítulos de libros y un libro. Dirigió 8 tesis doctorales.

El Dr. Curutchet (Investigador Principal CONICET y profesor titular UNSAM) es especialista en biorremediación y tratamiento de residuos y efluentes especiales con experiencia en transferencia tecnológica. Actualmente dirige un equipo que estudia procesos redox biocatalizados en entornos contaminados dentro de la cuenca del río Reconquista y su aplicación a biorremediación a través de biopilas y en medios líquidos. Además, dirige o participa en numerosos proyectos acreditados por el CONICET y la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica en conjunto con investigadores de la UNSAM y de otras instituciones.

La Dra. Famá (Investigadora Independiente CONICET y docente UBA) ha trabajado desde hace 15 años en el desarrollo e investigación de materiales de base polimérica como almidón, almidón entrecruzado por fosfatación y con ácido cítrico, alcohol de polivinilo (PVA), y ácido poliláctico (PLA). Ha desarrollado metodologías para poder dispersar diferentes clases de aditivos en estas matrices como cargas nanométricas y micrométricas, componentes vegetales (salvado de trigo y ajo en polvo), agentes antimicrobianos (KS) y antioxidantes (yerba mate), etc., bajo la técnica de casting y extrusión. Posee más de 30 publicaciones en revistas científicas indexadas y capítulos de libros, 4 premios de carácter internacional, más de 50 participaciones en congresos y la transferencia de un producto de almidón para su utilización como envase de productos alimenticios mediante la publicación de una patente.

El Lic. Estévez-Areco ha trabajado y puesto a punto la obtención de extracto de romero para ser utilizado en películas biodegradables obtenidas por extrusión y electrospinning. Recientemente ha desarrollado una metodología para fabricar materiales biodegradables multicapa conteniendo extractos con capacidad antioxidante [49]. Posee 3 trabajos publicados en revistas internacionales y 1 capítulo de libro.

### CONSTRUCCION DE LA HIPOTESIS y JUSTIFICACION GENERAL DE LA METODOLOGIA DE TRABAJO

La acumulación de residuos plásticos, en particular debido al descarte de materiales de un solo uso, como por ejemplo restos de packaging de alimentos o bolsas descartables, es un problema que debe ser abordado desde distintos enfoques. En nuestro país, la principal estrategia es la separación en origen de los residuos orgánicos y los reciclables, y el reciclaje de los materiales poliméricos. Sin embargo, este enfoque presenta problemas.

Por una parte, solo es posible reciclar y reutilizar los materiales poliméricos una determinada cantidad de veces, ya que en la reprocesamiento se produce la degradación parcial y la pérdida de propiedades fisicoquímicas y mecánicas de los polímeros. Esto conlleva a el eventual descarte de los materiales que ya no pueden ser reciclados, ya sea

de manera ordenada en rellenos sanitarios o de manera desordenada como por ejemplo en basurales. Además, no todos los residuos entran en el flujo de reciclaje, y muchos son descartados con la basura orgánica o de manera no ordenada, acumulándose en suelos, ríos o cuerpos de agua.

A nivel global, una de las soluciones tecnológicas complementarias que ha ganado auge en los últimos años es el desarrollo y reemplazo de polímeros convencionales basados en petróleo por polímeros biodegradables obtenidos a través de recursos renovables. Distintas empresas han desarrollado sus propias formulaciones comerciales de polímeros certificados como compostables (como por ejemplo Ecovio® de BASF o Mater-Bi® de Novamont).

Sin embargo, si bien estos materiales son certificados como compostables, en Argentina los residuos no se disponen en plantas de tratamiento industrial, sino que son enterrados en rellenos sanitarios. Existe poca información bibliográfica sobre la cinética y eficiencia de biodegradación de dichos polímeros en condiciones anaeróbicas, como las presentes en rellenos sanitarios. Con la reciente introducción e implementación de polímeros biodegradables en el mercado argentino, resulta necesario evaluar la degradación de estos materiales utilizando inóculos microbianos anaeróbicos locales, como los presentes en digestores anaeróbicos de residuos.

En paralelo, los materiales que no son descartados de manera ordenada terminan acumulándose en ambientes naturales. Los consorcios microbianos presentes en dichos ambientes, como por ejemplo en suelos, aguas de ríos, sedimentos y aguas de mar, dependen de las condiciones específicas de la región, como por ejemplo temperatura, pH del agua o suelo, humedad, etc. Es necesario evaluar la cinética de degradación de dichos polímeros en condiciones locales, en particular en regiones ambientalmente degradadas donde es sabido que se acumulan residuos.

Por último, este plan propone evaluar diferentes estrategias para acelerar y mejorar la biodegradabilidad de estos materiales, utilizando procesos que ya son empleados para mejorar la biodegradabilidad de otro tipo de contaminantes recalcitrantes en suelos o aguas, como por ejemplo la bioestimulación en aguas o suelos para degradar derrames de petróleo o la bioaumentación con cepas específicas para la remoción de tintas en aguas.

En el grupo de trabajo ya se posee el equipamiento necesario para determinar la biodegradabilidad de polímeros siguiendo normas internacionales (Respirómetro Mycrooximax y equipo diseñado y fabricado en la UNSAM). Además, se propone diseñar y fabricar nuevos equipos de bajo costo (similares a los de la Figura 1) para aumentar las muestras que pueden ser evaluadas en paralelo y ensayar otras condiciones ambientales.

## TIPO DE DISEÑO DE INVESTIGACION Y MÉTODOS

Este plan de trabajo se llevará a cabo en el Instituto de Investigación e Ingeniería Ambiental de la Universidad Nacional de San Martín (3ia-IIIA UNSAM-CONICET) con la colaboración del Laboratorio de Polímeros y Materiales Compuestos del Instituto de Física de Buenos Aires (IFIBA-CONICET-FECyN-UBA). La obtención y caracterización de los materiales se llevarán a cabo en el Laboratorio de Polímeros y Materiales Compuestos (LP&MC) del IFIBA. Los ensayos de biodegradabilidad se llevarán a cabo en el 3iA-IIIA UNSAM-CONICET.

### ***Materiales biodegradables a estudiar y su procesamiento y preparación:***

Los plásticos biodegradables que se estudiarán serán preparados bajo condiciones muy controladas en el LP&MC. Se utilizarán materiales comerciales (Ecovio® de BASF y Mater-Bi® de Novamont) y materiales desarrollados por el grupo de LP&MC basados en almidón



de mandioca, almidones de mandioca modificados, PLA y PBAT. Se estudiarán un conjunto amplio de plásticos biodegradables con diferente estructura química y propiedades físicas, que presentarán diferente comportamiento frente a la biodegradación microbiana.

Se emplearán diferentes morfologías de los materiales, pellets y films, con el fin de simular la forma en que son utilizados los productos que luego son descartados. Los films presentan elevada relación superficie/volumen, por lo que podrían ser más fácilmente atacados por los microorganismos, y son utilizados comercialmente como bolsas, películas separadoras y packaging. Los pellets presentan un espesor mayor y son más difíciles de atacar por los microorganismos, y simulan los espesores de ciertos materiales biodegradables descartables, como cubiertos o bandejas.

Los materiales biodegradables comerciales se adquieren en la forma de pellets, por lo que es necesario su procesamiento para obtener films. Además, muchos de dichos materiales sufren cambios físicos durante su procesamiento para obtener materiales comerciales. Con este fin, se procesarán las muestras de polímeros por extrusión utilizando una extrusora de doble tornillo co-rotante (Nanjing Kerke Extrusion equipment Co., Ltd.) de 16 mm de diámetro y una relación Longitud:Diámetro de 40:1, adquirida por el Laboratorio de Polímeros y Materiales Compuestos (FCEyN – UBA). Los films se obtendrán mediante la técnica de soplado acoplada a la extrusora o por compresión con temperatura de los hilos obtenidos por extrusión.

Por otra parte, para obtener los materiales a base de almidón es necesario la desturcción del grano y su posterior gelatinización. Es posible obtener almidón termoplástico mediante la técnica de extrusión, y ya se han realizado los primeros materiales enteramente de almidón de mandioca mediante esta técnica en el LP&MC [44, 45, 50].

### ***Metodología relativa al objetivo específico 1:***

Para determinar biodegradabilidad en los diferentes ambientes se emplearán técnicas respirométricas empleando el equipo desarrollado en el 3iA-IIIa (Figura 2) y equipos similares al equipo ya fabricado que serán diseñados y fabricados durante el desarrollo del presente plan.

El equipo diseñado en el 3iA-IIIa permite determinar el consumo de  $O_2$  y la producción de  $CO_2$  utilizando trampas químicas (NaOH para capturar el  $CO_2$  producido), y posee reguladores de temperatura y humedad, por lo que puede adaptarse para evaluar la biodegradabilidad bajo diferentes condiciones ambientales. Este equipo se empleará para las determinaciones en condiciones de compostaje y en suelos.

Equipos similares al que ya funciona en el 3iA-IIIa serán diseñados y fabricados para el desarrollo del presente plan. Los equipos contarán con una fuente de aire (aireadores de pecera o compresores de aire), recipiente para captura del  $CO_2$  en la entrada (con el fin de removerlo del aire que ingrese al reactor), recipiente hermético utilizado como biorreactor (estilo Schott) y recipiente hermético con trampa de NaOH para poder determinar el  $CO_2$  producido por la actividad biológica en el reactor. Todos los recipientes estarán conectados por tubos plásticos de polietileno y selladas todas las uniones con resina epóxica de dos componentes y sellador de silicona. Estos equipos permitirán la determinación en medios acuosos y suelos, aumentando la cantidad de muestras que pueden ser evaluadas en simultáneo.

Se complementará con técnicas gravimétricas para determinar la pérdida de peso del material y microscópicas para determinar el tamaño de residuo final, las diferencias superficiales debido al ataque microbiológico y la morfología de los microorganismos que degradan superficialmente los materiales.

Los ensayos se basarán en normas internacionales, evaluando la degradación en compostaje (ISO 14855-1:2005 y/o ASTM D5338-98), en suelo en condiciones aeróbicas

(ISO 17556:2012 y/o ASTM D5988-03), en medio líquido (ISO 14851:2005 y/o ASTM D5271-02) y en medio marino simulado (ASTM D6691-01). Todos los ensayos se realizarán en los recipientes termostatzados y sellados. Se incorporará aire libre de CO<sub>2</sub> a los recipientes y se recogerá a la salida el CO<sub>2</sub> producido. Los experimentos tendrán una duración máxima de 180 días. En paralelo se realizarán controles con los componentes individuales de cada material previo al procesamiento (plastificantes, aditivos, etc.) y blancos periódicos sin muestra. Por último, se evaluará la toxicidad del medio empleado en la biodegradación (compost, suelo o medio líquido) evaluando la capacidad de crecimiento de dos especies de plantas, según lo recomendado por las normas internacionales.

Se tomarán muestras de tres sitios estratégicos que contemplan distintos ambientes con potencial presencia de desechos plásticos (tanto de plásticos convencionales como de polímeros biodegradables).

- 1) Se tomarán muestras de suelos, aguas y sedimentos de la zona de la cuenca del río Reconquista en zonas cercanas a urbanizaciones, en el partido de Gral. San Martín. Este sitio se tomará como muestra de ambientes urbanos contaminados, ya que actualmente son desechados materiales descartables convencionales basados en polímeros derivados del petróleo, y podría ser un posible destino de polímeros biodegradables desechados en un futuro. Los microorganismos presentes en estos ambientes contaminados poseen resistencia a compuestos orgánicos recalcitrantes y son capaces de degradarlos debido a las múltiples actividades enzimáticas de los consorcios [37, 38, 39].
- 2) Se tomarán muestras de aguas de Mar del Plata. Este sitio se tomará como muestra de zona de gran urbanización cercana al mar. Es un posible sitio donde se acumularían en un futuro polímeros biodegradables, ya que, al ser una ciudad de veraneo, se generan muchos residuos plásticos debido a materiales de packaging descartables.
- 3) Se tomarán muestras de aguas de Bahía Blanca, en las cercanías al polo petroquímico. Las aguas de Bahía Blanca podrían poseer microorganismos capaces de resistir y/o degradar compuestos hidrofóbicos, debido a la presencia de la planta petroquímica.

### **Metodología relativa al objetivo específico 2:**

Para los ensayos de biodegradabilidad en condiciones anaeróbicas se empleará el respirómetro Micro-Oxymax (único en su tipo en el país). Cuenta con detectores de CO<sub>2</sub>, O<sub>2</sub>, CH<sub>4</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>S, por lo que puede utilizarse tanto en condiciones de degradación aeróbica como anaeróbica. Se ha utilizado con éxito para estudiar la biodegradación de materiales poliméricos en ambientes acuosos en presencia de *E.coli* [42]. Se empleará este equipo ya que posee los sensores necesarios y permite cuantificar la generación de múltiples gases en simultáneo.

Los ensayos en condiciones anaeróbicas se realizarán siguiendo normas internacionales (ISO 14985:2004 y/o ASTM D5511-02). Se circulará en el sistema N<sub>2</sub> para evitar el ingreso de O<sub>2</sub> y poder arrastrar el CO<sub>2</sub> y el CH<sub>4</sub> producido por la actividad microbiana. El equipo posee un sistema de venteo para evitar el aumento de la presión y sensores de temperatura. Todos los ensayos se realizarán en los recipientes termostatzados y sellados. Los experimentos tendrán una duración máxima de 180 días.

Cómo inóculo en los ensayos anaeróbicos se emplearán lodos provenientes de la digestión anaeróbica de desechos industriales [51]. A su vez se intentará ponerse en contacto con CEAMSE para poder obtener lodos o inóculos provenientes de rellenos sanitarios reales.

**Metodología relativa al objetivo específico 3:**

Se investigará el efecto de distintos parámetros del suelo, compost y relleno sanitario como por ejemplo pH, relación C/N, contenido de fósforo y/o temperatura en la velocidad de biodegradación. Se utilizarán distintas enmiendas orgánicas (hojas, levadura comercial, residuos de la industria azucarera o de producción de vino, cáscara de huevo) e inorgánicas (solución de micronutrientes inorgánicos) para optimizar la velocidad de los procesos. Además, se pretende estimular los suelos y lodos anaeróbicos con precursores de materiales comerciales, como almidón y ácido láctico, para favorecer el desarrollo de microorganismos que sean capaces metabolizar estos componentes, presentes en las mezclas comerciales.

Se pretende aislar y seleccionar aquellos microorganismos que presenten capacidad de degradar luego del proceso de compostaje o que estén presentes en muestras de suelos y sedimentos y utilizarlos como inóculo para mejorar la biodegradación de este polímero en los mismos suelos o en sucesivos procesos de compostaje. Para ello, se tomarán muestras de suelos y muestras de compost luego del proceso de compostaje de polímeros biodegradables. Se aumentará la biomasa presente en medio líquido utilizando agitadores termosatizados. Como fuentes de carbono se utilizará almidón (precursor del Mater-Bi), ácido láctico (monómero del PLA) o ácido adípico (componente del PBAT). Una vez aumentada su biomasa, se inocularán nuevos suelos o compost con la nueva biomasa obtenida y se realizarán nuevos ensayos de biodegradabilidad empleando los reactores y condiciones previamente descriptas.

En el largo plazo, se pretende aislar e identificar las especies microbianas bioaumentadas utilizando técnicas de secuenciación genética.

**CRONOGRAMA DE TRABAJO:**

A continuación, se listan las tareas a realizar durante el periodo de estudio.

<b>Cuatrimestre</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>
Actualización bibliográfica						
Compra de insumos						
Desarrollo de equipos para determinar biodegradabilidad						
Ensayos de biodegradabilidad en suelos						
Ensayos de biodegradabilidad en aguas con sedimentos						
Ensayos de biodegradabilidad en aguas de mar						
Ensayos de biodegradabilidad en condiciones anaeróbicas						
Ensayos de bioestimulación y bioaumentación						
Evaluación y publicación de resultados						

## REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Singh, B., Sharma, N., *Mechanistic implications of plastic degradation*. Polymer Degradation and Stability, 2008. 93 (3): 561-584.
2. Leejarkpai, T., Suwanmanee, U., Rudeekit, Y., Mungcharoen, T., *Biodegradable kinetics of plastics under controlled composting conditions*. Waste management, 2011. 31 (6): 1153-1161.
3. Emadian, S.M., Onay, T.T., Demirel, B., *Biodegradation of bioplastics in natural environments*. Waste management, 2017. 59: 526-536.
4. Shah, A.A., Hasan, F., Hameed, A., Ahmed, S., *Biological degradation of plastics: A comprehensive review*. Biotechnology Advances, 2008. 26 (3): 246-265.
5. Kijchavengkul, T., Auras, R., *Compostability of polymers*. Polymer International, 2008. 57 (6): 793-804.
6. Grima, S., Bellon-Maurel, V., Feuilloley, P., Silvestre, F., *Aerobic biodegradation of polymers in solid-state conditions: a review of environmental and physicochemical parameter settings in laboratory simulations*. Journal of Polymers and the Environment, 2000. 8 (4): 183-195.
7. Bandopadhyay, S., Martin-Closas, L., Pelacho, A. M., & DeBruyn, J. M., *Biodegradable plastic mulch films: Impacts on soil microbial communities and ecosystem functions*. Frontiers in microbiology, 2018. 9: 819.
8. Rudnik, E., *Compostable polymer materials*. 2019: Newnes publisher.
9. Dilkes-Hoffman, L. S., Lant, P. A., Laycock, B., & Pratt, S., *The rate of biodegradation of PHA bioplastics in the marine environment: A meta-study*. Marine pollution bulletin, 2019. 142: 15-24.
10. Bátori, V., Åkesson, D., Zamani, A., Taherzadeh, M. J., & Horvath, I. S., *Anaerobic degradation of bioplastics: A review*. Waste management, 2018. 80: 406-413.
11. Isobe, A., Iwasaki, S., Uchida, K., & Tokai, T., *Abundance of non-conservative microplastics in the upper ocean from 1957 to 2066*. Nature communications, 2019. 10 (1): 417.
12. Janik, H., Sienkiewicz, M., Przybytek, A., Guzman, A., Kucinska-Lipka, J., & Kosakowska, A., *Novel Biodegradable Potato Starch-based Compositions as Candidates in Packaging Industry, Safe for Marine Environment*. Fibers and Polymers, 2018. 19 (6), 1166-1174.
13. Volova, T. G., Gladyshev, M. I., Trusova, M. Y., & Zhila, N. O., *Degradation of polyhydroxyalkanoates in eutrophic reservoir*. Polymer Degradation and Stability, 2007. 92 (4): 580-586.
14. Volova, T. G., Boyandin, A. N., Vasiliev, A. D., Karpov, V. A., Prudnikova, S. V., Mishukova, O. V., Boyarskikh, U. A., Filipenko, M. L., Rudnev, V. P., Xuân, B. B., Dũng V. V., Gitelson, I. I., *Biodegradation of polyhydroxyalkanoates (PHAs) in tropical coastal waters and identification of PHA-degrading bacteria*. Polymer Degradation and Stability, 2010. 95 (12): 2350-2359.
15. Thellen, C., Coyne, M., Froio, D., Auerbach, M., Wirsén, C., & Ratto, J. A., *A processing, characterization and marine biodegradation study of melt-extruded polyhydroxyalkanoate (PHA) films*. Journal of Polymers and the Environment, 2008. 16 (1): 1-11.
16. Sekiguchi, T., Saika, A., Nomura, K., Watanabe, T., Watanabe, T., Fujimoto, Y., Enoki, M., Sato, T., Kato, C., Kanehiro, H., *Biodegradation of aliphatic polyesters soaked in deep seawaters and isolation of poly ( $\epsilon$ -caprolactone)-degrading bacteria*. Polymer Degradation and Stability, 2011. 96 (7): 1397-1403.
17. O'Brine, T., & Thompson, R. C., *Degradation of plastic carrier bags in the marine environment*. Marine pollution bulletin, 2010. 60 (12): 2279-2283.

18. Tosin, M., Weber, M., Siotto, M., Lott, C., & Degli-Innocenti, F., *Laboratory test methods to determine the degradation of plastics in marine environmental conditions*. *Frontiers in microbiology* 2012. 3; 225.
19. Boyandin, A. N., Prudnikova, S. V., Karpov, V. A., Ivonin, V. N., Đỗ, N. L., Nguyễn, T. H., Hiệp Lê, T. M., Filichev, N. L., Levin, A. L., Filipenko, M. L., Volova, T. G., Gitelson, I. I., *Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates in tropical soils*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 2013. 83: 77-84.
20. Stagner, J., *Methane generation from anaerobic digestion of biodegradable plastics—a review*. *International Journal of Environmental Studies*, 2016. 73 (3): 462-468.
21. Šmejkalová, P., Kužníková, V., Merna, J., Hermanová, S., *Anaerobic digestion of aliphatic polyesters*. *Water Science and Technology*, 2016. 73 (10): 2386-2393.
22. Strickland, M.S., Lauber, C., Fierer, N., Bradford, M.A., *Testing the functional significance of microbial community composition*. *Ecology*, 2009. 90 (2): 441-451.
23. Ong, S.Y., Sudesh, K., *Effects of polyhydroxyalkanoate degradation on soil microbial community*. *Polymer Degradation and Stability*, 2016. 131: 9-19.
24. Raza, S., Ahmad, J., *Composting process: a review*. *International Journal of Biological Research*, 2016. 4 (2): p. 102-104.
25. Antunes, L.P., Martins, L.F., Pereira, R.V., Thomas, A.M., Barbosa, D., Lemos, L.N., Silva, G.M.M., Moura, L.M.S., Epamino, G.W.C., Digiampietri, L.A., *Microbial community structure and dynamics in thermophilic composting viewed through metagenomics and metatranscriptomics*. *Scientific Reports*, 2016. 6.
26. Markowicz, F., & Szymańska-Pulikowska, A. *Analysis of the Possibility of Environmental Pollution by Composted Biodegradable and Oxo-Biodegradable Plastics*. *Geosciences*, 2019. 9 (11): 460.
27. Shruti, V. C., & Kutralam-Muniasamy, G., *Bioplastics: Missing link in the era of Microplastics*. *Science of The Total Environment*, 2019. 697; 134139.
28. Kim, M.N., Park, S.T., *Degradation of poly(L-lactide) by a mesophilic bacterium*. *Journal of Applied Polymer Science*, 2010. 117 (1): 67-74.
29. Zhao, Y., Lu, Q., Wei, Y., Cui, H., Zhang, X., Wang, X., Shan, S., Wei, Z., *Effect of actinobacteria agent inoculation methods on cellulose degradation during composting based on redundancy analysis*. *Bioresource Technology*, 2016. 219: 196-203.
30. Wang, H.B., Han, L.R., Feng, J.T., Zhang, X., *Evaluation of microbially enhanced composting of sophora flavescens residues*. *Journal of Environmental Science and Health, Part B*, 2016. 51 (2): 63-70.
31. Satti, S. M., Shah, A. A., Marsh, T. L., & Auras, R., *Biodegradation of Poly (lactic acid) in Soil Microcosms at Ambient Temperature: Evaluation of Natural Attenuation, Bio-augmentation and Bio-stimulation*. *Journal of Polymers and the Environment*, 2018. 26(9): 3848-3857.
32. Himanen, M., Hänninen, K., *Effect of commercial mineral-based additives on composting and compost quality*. *Waste management*, 2009. 29 (8): 2265-2273.
33. Hottle, T.A., Agüero, M.L., Bilec, M.M., Landis, A.E., *Alkaline Amendment for the Enhancement of Compost Degradation for Polylactic Acid Biopolymer Products*. *Compost Science & Utilization*, 2016. 24 (3): 159-173.
34. Quecholac-Piña, X., García-Rivera, M.A., Espinosa-Valdemar, R.M., Vázquez-Morillas, A., Beltrán-Villavicencio, M., de la Luz Cisneros-Ramos, A., *Biodegradation of compostable and oxodegradable plastic films by backyard composting and bioaugmentation*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2016: 1-6.
35. Castro-Aguirre, E., Auras, R., Selke, S., Rubino, M., Marsh, T., *Insights on the aerobic biodegradation of polymers by analysis of evolved carbon dioxide in simulated composting conditions*. *Polymer Degradation and Stability*, 2017. 137: 251-271.

36. Goswami, M., Chakraborty, P., & Mukherjee, K., *Bioaugmentation and biostimulation: a potential strategy for environmental remediation*. Journal of Microbiology & Experimentation, 2018. 6 (5): 223-231.
37. Candal, R., Senn, A., Loveira, E.L., Curutchet, G., Guz, L., Litter, M., *Alternative treatment of recalcitrant organic contaminants by a combination of biosorption, biological oxidation and advanced oxidation technologies*. 2012: INTECH Open Access Publisher.
38. Guz, L., Candal R., Curutchet G., *Biosorción de colorantes sobre bacterias presentes en el Río Reconquista*. Congreso de Ciencias Ambientales -COPIME 2011- Ciudad de Buenos Aires, Argentina, 2011
39. Guz, L., Olivelli, M., Candal, R., Torres Sánchez, R., Curutchet, G., *BIODEGRADACIÓN DE UN COLORANTE MODELO ADSORBIDO SOBRE COMPLEJOS DE BIOMASA-ARCILLA*. 4° International Symposium on Environmental Biotechnology and Engineering – ISEBE. Méjico D.F., 2014.
40. Guz, L., Curutchet, G., Sánchez, R.T., Candal, R., *Adsorption of crystal violet on montmorillonite (or iron modified montmorillonite) followed by degradation through Fenton or photo-Fenton type reactions*. Journal of Environmental Chemical Engineering, 2014. 2 (4): 2344-2351.
41. Marco-Brown, J. L., Guz, L., Olivelli, M. S., Schampera, B., Sánchez, R. T., Curutchet, G., & Candal, R., *New insights on crystal violet dye adsorption on montmorillonite: kinetics and surface complexes studies*. Chemical Engineering Journal, 2018. 333; 495-504.
42. Guz, L., Famá, L., Candal, R., Goyanes, S., *Size effect of ZnO nanorods on physicochemical properties of plasticized starch composites*. Carbohydrate Polymers, 2017. 157: 1611-1619.
43. Ochoa-Yepes, O., Medina-Jaramillo, C., Guz, L., & Famá, L., *Biodegradable and Edible Starch Composites with Fiber-Rich Lentil Flour to Use as Food Packaging*. Starch-Stärke, 2018. 70 (7-8); 1700222.
44. González-Seligra, P., Guz, L., Ochoa-Yepes, O., Goyanes, S., & Famá, L., *Influence of extrusion process conditions on starch film morphology*. LWT, 2017. 84: 520-528.
45. Estevez-Areco, S., Guz, L., Famá, L., Candal, R., & Goyanes, S., *Bioactive starch nanocomposite films with antioxidant activity and enhanced mechanical properties obtained by extrusion followed by thermo-compression*. Food Hydrocolloids, 2019. 96: 5218-528.
46. Estevez-Areco, S., Guz, L., Candal, R., & Goyanes, S., *Release kinetics of rosemary (Rosmarinus officinalis) polyphenols from polyvinyl alcohol (PVA) electrospun nanofibers in several food simulants*. Food Packaging and Shelf Life, 2018. 18: 42-50.
47. Seligra, P. G., Jaramillo, C. M., Famá, L., & Goyanes, S., *Biodegradable and non-retrogradable eco-films based on starch–glycerol with citric acid as crosslinking agent*. Carbohydrate polymers, 2016. 138: 66-74.
48. Jaramillo, C. M., Gutiérrez, T. J., Goyanes, S., Bernal, C., & Famá, L., *Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films*. Carbohydrate Polymers, 2016. 151: 150-159.
49. López-Córdoba, A., Estevez-Areco, S., & Goyanes, S., *Potato starch-based biocomposites with enhanced thermal, mechanical and barrier properties comprising water-resistant electrospun poly (vinyl alcohol) fibers and yerba mate extract*. Carbohydrate polymers, 2019. 215: 377-387.
50. Ochoa-Yepes, O., Di Gogio, L., Goyanes, S., Mauri, A., & Famá, L., *Influence of process (extrusion/thermo-compression, casting) and lentil protein content on physicochemical properties of starch films*. Carbohydrate polymers, 2019. 208: 221-231.
51. Bres, P., Beily, M. E., Young, B. J., Gasulla, J., Butti, M., Crespo, D., Candal, R. & Komilis, D., *Performance of semi-continuous anaerobic co-digestion of poultry manure with fruit and vegetable waste and analysis of digestate quality: A bench scale study*. Waste management, 2018. 82; 276-284.



