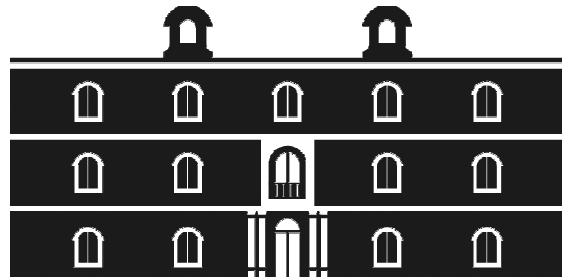




Universidad
Politécnica
de Cartagena



industriales

etsii UPCT

Proyecto Fin de Carrera

DETERMINACIÓN DE LA BIODEGRADABILIDAD Y TOXICIDAD DE MATERIALES PLÁSTICOS

APLICACIÓN DE LAS NORMAS UNE-EN ISO 14852 Y 11348-3.

Titulación:	Ingeniero Técnico Industrial, esp. Química Industrial
Intensificación:	Ingeniería Medioambiental
Alumno/a:	Lydia Escudero Castejón
Director/a/s:	José María Moreno Grau

Cartagena, 21 de Septiembre de 2011

“El destino baraja y nosotros jugamos” (A. Schopenhauer)

AGRADECIMIENTOS

Quisiera dar las gracias, en primer lugar, a mis padres, por su cariño, su apoyo y su confianza en mí; y a mi hermana, por alegrar esas tardes de estudio. Os lo debo todo a vosotros.

Gracias al director del proyecto, José María Moreno Grau, por su guía y orientación durante la realización de este proyecto, pero sobre todo, por darme la oportunidad de colaborar con él y abrirme las puertas del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental.

A Paula, por su compañía durante estos meses de trabajo en el laboratorio y por estar a mi lado en todo momento; y a Loli, por su apoyo incondicional, por su paciencia, por los buenos momentos, y en definitiva, por su amistad.

Gracias en general, al personal que integra el Área de Tecnología del Medio Ambiente del Departamento de Ingeniería Química y Ambiental de la UPCT. En particular, mi más sincero agradecimiento a Stella Moreno Grau y Belén Elvira Rendueles, por la ayuda prestada; a Lorenzo Vergara Pagán, por su compañía y sus impagables consejos; y a Lorenzo Vergara Juárez y Antonio José Martínez García por su atención y colaboración. Gracias por haberme hecho sentir como en casa.

Gracias a todos

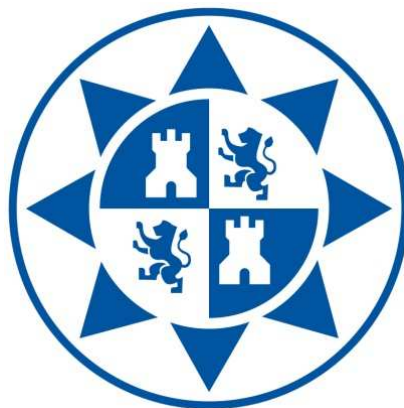
RESUMEN

En este proyecto final de carrera se ha llevado a cabo la determinación de la biodegradabilidad y toxicidad de un determinado polímero comercial. Para ello se ha realizado, por una parte, un ensayo respirométrico con el que se mide la biodegradabilidad del polímero en medio acuoso siguiendo las directrices marcadas por la Norma UNE-EN ISO 14852. Por otro lado, se ha determinado la toxicidad del polímero mediante ensayo con Microtox®, utilizando bacterias liofilizadas (ensayo basado en la Norma UNE-EN ISO 11348-3).

Título: *Determinación de la Biodegradabilidad y Toxicidad de materiales plásticos. Aplicación de las Normas UNE-EN ISO 14852 y 11348-3*

Autor: *Lydia Escudero Castejón*

Director: *José María Moreno Grau*



ÍNDICE PRINCIPAL

AGRADECIMIENTOS.....	5
ÍNDICE DE FIGURAS	13
ÍNDICE DE TABLAS	15
BLOQUE I: INTRODUCCIÓN	17
CAPÍTULO 1. ALCANCE Y ESTRUCTURA DEL PROYECTO	17
1.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	18
1.2. ESTRUCTURA DEL PROYECTO	19
CAPÍTULO 2. INTRODUCCIÓN TEÓRICA A LOS POLÍMEROS	21
2.1. DESARROLLO HISTÓRICO DE LOS POLÍMEROS	22
2.2. DEFINICIÓN DE POLÍMERO	26
2.2.1. <i>Polymerización</i>	26
2.3. LA ESTRUCTURA MOLECULAR	27
2.4. LA ESTRUCTURA SUPRAMOLECULAR.....	28
2.4.1. <i>El estado amorfo</i>	28
2.4.2. <i>El estado cristalino</i>	28
2.4.3. <i>La estructura de fibra</i>	30
2.5. CLASIFICACIÓN DE LOS POLÍMEROS	30
2.5.1. <i>Según el origen</i>	30
2.5.2. <i>Según la estructura molecular</i>	30
2.5.3. <i>Según las reacciones de formación</i>	31
2.5.4. <i>Según la composición química de la cadena principal</i>	31
2.5.5. <i>Según sus propiedades físicas</i>	32
2.5.6. <i>Según su uso</i>	32
BLOQUE II: ESTUDIO DE BIODEGRADABILIDAD	33
CAPÍTULO 3. TEORÍA DE BIODEGRADABILIDAD DE POLÍMEROS	33
3.1. INTRODUCCIÓN	34
3.2. POLÍMEROS BIODEGRADABLES.....	34
3.2.1. <i>Degradación de polímeros</i>	35
3.2.1.1. <i>Fotodegradación</i>	39

3.2.1.2.	Degradación térmica	40
3.2.1.3.	Degradación química.....	41
3.2.1.4.	Biodegradación.....	42
3.2.2.	Biodegradabilidad	43
3.2.2.1.	Tipos de biodegradabilidad	43
3.2.2.2.	Mecanismos de biodegradabilidad.....	44
3.2.2.3.	Factores que influyen en la biodegradabilidad	44
3.2.2.4.	Características que influyen en la degradación enzimática.....	45
3.2.3.	Aspectos a tener en cuenta en el diseño de materiales biodegradables ...	46
3.2.4.	Clasificación de polímeros biodegradables	46
3.2.5.	Polímeros biodegradables de uso comercial	47
3.3.	ENVASES DE PLÁSTICO DEGRADABLES.....	52
3.3.1.	Envases de plásticos biodegradables	53
3.3.2.	Envases de plástico compostables.....	55
3.3.3.	Envases de plástico oxo-degradables.....	55
3.3.4.	Envases de plástico foto-degradables	56
3.3.5.	Envases de plástico hidrosolubles.....	56
3.3.6.	Envases de plástico biodesintegrables	57

CAPÍTULO 4. PARTE EXPERIMENTAL I. ENSAYO RESPIROMÉTRICO EN MEDIO ACUOSO

4.1.	INTRODUCCIÓN	60
4.2.	FUNDAMENTO DEL MÉTODO	61
4.3.	REACTIVOS Y SOLUCIONES UTILIZADAS.....	61
4.3.1.	Preparación del medio de ensayo.....	61
4.3.2.	Solución de hidróxido de bario	62
4.3.3.	Solución de ácido clorhídrico	63
4.3.4.	Solución de hidróxido de sodio	63
4.4.	PROCEDIMIENTO OPERATIVO	63
4.4.1.	Montaje del sistema experimental.....	63
4.4.2.	Puesta en marcha	66
4.4.3.	Operación del ensayo y toma de datos	69

CAPÍTULO 5. CÁLCULOS Y RESULTADOS I

5.1.	CÁLCULOS.....	74
5.1.1.	Fórmulas utilizadas.....	74
5.1.1.1.	Cantidad teórica de CO ₂ generado por el material de ensayo	74
5.1.1.2.	Porcentaje de biodegradación a partir de la evolución del CO ₂	74
5.1.2.	Resultados obtenidos.....	75
5.2.	INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES	81
5.2.1.	Generación de CO ₂ en los reactores	81

5.2.2.	<i>Evolución de la producción de CO₂</i>	82
5.2.3.	<i>Porcentaje de biodegradación</i>	83
BLOQUE III: ESTUDIO DE TOXICIDAD.....		85
CAPÍTULO 6. ENSAYOS ANALÍTICOS DE ECOTOXICIDAD.....		85
6.1.	INTRODUCCIÓN	86
6.2.	ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD. TIPOS DE ENSAYOS.....	86
6.2.1.	<i>Ensayos bacterianos</i>	89
6.2.1.1.	Métodos de crecimiento	89
6.2.1.2.	Métodos metabólicos.....	90
6.2.1.3.	Ensayo de toxicidad aguda	91
6.2.1.4.	Ensayo de toxicidad subcrónicos o crónicos.....	92
6.2.2.	<i>Ensayos de algas</i>	94
6.2.3.	<i>Ensayos de peces</i>	95
6.2.4.	<i>Métodos alternativos</i>	95
6.3.	MÉTODOS BACTERIANOS. ENSAYO DE LUMINISCENCIA	96
6.3.1.	<i>Selección de los métodos bacterianos</i>	96
6.3.2.	<i>Características del ensayo de bioluminiscencia</i>	97
6.3.2.1.	Precisión.....	97
6.3.2.2.	Simplicidad	97
6.3.2.3.	Rapidez.....	98
6.3.2.4.	Equivalencia	98
6.3.2.5.	Mezcla de contaminantes	98
6.4.	BIODISPONIBILIDAD Y TOXICIDAD	100
CAPÍTULO 7. PARTE EXPERIMENTAL II. BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA		
MICROTOX®		103
7.1.	INTRODUCCIÓN	104
7.2.	FUNDAMENTO DEL MÉTODO MICROTOX®	105
7.3.	INTERFERENCIAS.....	108
7.4.	APLICACIONES DEL MÉTODO	108
7.5.	DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS EVALUADAS	109
7.5.1.	<i>Preparación de las muestras</i>	109
7.6.	MATERIAL UTILIZADO	110
7.6.1.	<i>Analizador Microtox® 500</i>	110
7.6.2.	<i>Viales de ensayo y micropipetas</i>	112
7.7.	REACTIVOS Y SOLUCIONES UTILIZADAS.....	113
7.7.1.	<i>Bacterias de ensayo</i>	113
7.7.2.	<i>Solución diluyente</i>	113
7.7.3.	<i>Solución de ajuste osmótico</i>	113

7.7.4. Solución reconstituyente	114
7.8. PROCEDIMIENTO OPERATIVO	114
7.8.1. Preparación de la suspensión madre. Reconstitución de las bacterias....	114
7.8.2. Preparación de la muestra	115
7.8.3. Medidas a realizar	115
7.8.4. Ensayos de estabilidad.....	116
CAPÍTULO 8. CÁLCULOS Y RESULTADOS II.....	119
8.1. EXPRESIÓN DE LA TOXICIDAD DE UN CONTAMINANTE: EC ₅₀	120
8.2. RESULTADOS OBTENIDOS Y CONCLUSIONES	121
REFERENCIAS.....	123
ANEXOS.....	125

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. MODELOS MÁS CARACTERÍSTICOS DEL ESTADO AMORFO	28
FIGURA 2. MODELO DEL ESTADO CRISTALINO SEGÚN FLORY	28
FIGURA 3. CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN EN FUNCIÓN DEL ORIGEN DEL PLÁSTICO.....	35
FIGURA 4. ESQUEMA DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN	36
FIGURA 5. DIAGRAMA DE LOS FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA DEGRADACIÓN DE UN POLÍMERO	45
FIGURA 6. LA AMILOSA A) Y LA AMILOPECTINA B), CONSTITUYENTES DEL ALMIDÓN	48
FIGURA 7. UNIDADES BÁSICAS DE LOS POLÍMEROS BIODEGRADABLES DE MAYOR USO COMERCIAL	49
FIGURA 8. FAMILIA DE LOS POLIÉSTERES BIODEGRADABLES.....	54
FIGURA 9. ESQUEMA DEL MONTAJE EXPERIMENTAL PARA ENSAYO RESPIROMÉTRICO	64
FIGURA 10. COMPARACIÓN DEL CO ₂ TOTAL ACUMULADO EN AMBOS REACTORES	81
FIGURA 11. EVOLUCIÓN DEL CO ₂ ACUMULADO/HORA.....	82
FIGURA 12. %BIODEGRADACIÓN DE LA MUESTRA (ENSAYO 2).....	83
FIGURA 13. REACCIÓN DE LUMINISCENCIA BACTERIANA.....	106
FIGURA 14. ESQUEMA DE REACCIÓN DE FLAVIN REDUCTASA BAJO CONDICIONES AEROBIAS.....	107
FIGURA 15.A) MUESTRAS DE POLÍMERO CONSERVADAS A T ^º AMBIENTE, B) MUESTRAS EN ESTUFA....	110

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA 1. DESARROLLO CRONOLÓGICO DE LOS POLÍMEROS	25
TABLA 2. MECANISMOS DE DEGRADACIÓN.....	38
TABLA 3. PRINCIPALES PROPIEDADES DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES DE USO COMERCIAL	50
TABLA 4. POLÍMEROS BIODEGRADABLES DE USO COMERCIAL	51
TABLA 5. POLÍMEROS BIODEGRADABLES Y MEJOR SISTEMA DE GESTIÓN SEGÚN SU FABRICANTE.....	58
TABLA 6. CANTIDAD DE CO ₂ PRUEBA 1 – REACTOR MUESTRA.....	76
TABLA 7. CANTIDAD DE CO ₂ PRUEBA 1 – REACTOR BLANCO	77
TABLA 8. CANTIDAD DE CO ₂ PRUEBA 2 – REACTOR MUESTRA.....	78
TABLA 9. CANTIDAD DE CO ₂ PRUEBA 2 – REACTOR BLANCO	79
TABLA 10. VALORES DE BIODEGRADACIÓN PRUEBA 2.....	80
TABLA 11. INTERACCIONES DE DIFERENTES MEZCLAS DE METALES.....	100
TABLA 12. RESULTADOS MUESTRAS A TEMPERATURA AMBIENTE/LUZ.....	121
TABLA 13. RESULTADOS MUESTRAS ESTUFA	122

BLOQUE I: INTRODUCCIÓN

Capítulo 1

ALCANCE Y ESTRUCTURA DEL PROYECTO

Este capítulo expone la justificación y los objetivos que han motivado la realización de este Proyecto Final de Carrera. En segundo lugar, se presenta la estructura del documento describiendo contenido.

1.1. JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

Los polímeros sintéticos constituyen un nuevo grupo de materiales que ha revolucionado la historia de la humanidad en el siglo XX, hasta el punto de que la vida en la actualidad sería difícilmente concebible sin ellos. Por otro lado, los materiales plásticos son, posiblemente, los que en mayor grado se transforman en productos manufacturados con una aplicación muy temporal (como por ejemplo el embalaje). Como consecuencia, cada día es mayor la cantidad de residuos de estos materiales, creando problemas ambientales y un despilfarro irracional de recursos. Estas razones son motivo suficiente para recuperar y reciclar los residuos plásticos.

La envergadura del problema está haciendo que proliferen iniciativas para reducir el consumo de materiales plásticos y facilitar su reciclaje una vez se convierten en residuo. Es en este punto donde surgen los estudios encaminados a la búsqueda de materiales plásticos de fácil biodegradación. Sin embargo, no resulta ser un problema de fácil solución, ya que se busca que el material sea fácilmente biodegradable sin perder las características y propiedades que se requieren en la fase de aplicación del mismo. Además, si lo que se pretende es conseguir un material que sea fácilmente asimilable por el medio, se presenta la necesidad de estudiar los posibles efectos tóxicos del mismo.

El objetivo de este proyecto fin de carrera es realizar la determinación de la toxicidad y la biodegradabilidad de un material polimérico comercial. Dicho material se pretende aplicar en el campo del embalaje y los materiales plásticos de uso alimentario. Para ello se realiza un ensayo de determinación de la biodegradabilidad del material en medio acuoso basado en la Norma UNE-EN ISO 14852, y un ensayo de toxicidad aguda utilizando el sistema Microtox® (descrito en la Norma UNE-EN ISO 11348-3).

1.2. ESTRUCTURA DEL PROYECTO

El proyecto se divide en tres bloques que se describen a continuación:

Bloque I.

Se trata de un bloque introductorio que cuenta con dos capítulos diferenciados: en el primero de ellos se expone la justificación del proyecto realizado y los objetivos que se pretenden conseguir, y en el segundo se realiza una breve introducción teórica en la que se recogen los aspectos básicos generales comunes a cualquier polímero.

Bloque II.

Es el bloque correspondiente al estudio de biodegradabilidad del material plástico. Recoge una primera parte teórica acerca de polímeros biodegradables y sus características, continúa con la descripción del ensayo de biodegradabilidad realizado y finaliza con la presentación de los resultados obtenidos en el ensayo.

Bloque III.

Este bloque final describe el estudio de toxicidad realizado, siguiendo la misma estructura del bloque anterior: marco teórico en el que se explica el fundamento de los ensayos analíticos de ecotoxicidad y se recogen los principales tipos de ensayos; descripción del ensayo realizado, así como del material y equipos utilizados; y por último expresión de los resultados obtenidos y conclusiones.

Capítulo 2

INTRODUCCIÓN TEÓRICA A LOS POLÍMEROS

El vocablo polímero deriva del término griego πολυμερής, que significa « compuesto de varias partes ».

Con el desarrollo de la tecnología y la industria química el hombre ha aprendido a imitar a la naturaleza, e incluso mejorarla, sintetizando nuevos polímeros artificiales inexistentes en ella. En la actualidad la síntesis y el procesado de materiales poliméricos es uno de los sectores más importantes de la industria química.

2.1. DESARROLLO HISTÓRICO DE LOS POLÍMEROS

Desde la antigüedad, el hombre ha utilizado **polímeros naturales** como la madera, el cáñamo, las resinas, etc. en multitud de aplicaciones. Los primeros seres humanos aprendieron a procesar, tejer y teñir fibras naturales como la lana, la seda, el lino y el algodón. Las civilizaciones azteca utilizaba caucho (extraído del árbol *Hevea brasiliensis*) para fabricar artículos elásticos o impermeabilizar tejidos.

Con el paso del tiempo se aprendió gradualmente a mejorar las propiedades de dichas sustancias mediante distintas técnicas, como la purificación y la modificación con otras sustancias. El desarrollo de los primeros polímeros se inició en los laboratorios industriales debido a la necesidad de obtener nuevos tipos de materiales como cauchos, adhesivos, plásticos, fibras y pinturas. Al contrario de muchos otros productos, cuya estructura y reacciones eran bien conocidas antes de su aplicación, algunos polímeros se fabricaron a escala industrial sin que sus características químicas y físicas hubieran sido estudiadas.

De esta forma, los científicos dedicados a los polímeros realizaron numerosos descubrimientos empíricos antes que se desarrollase la ciencia de los polímeros. Por ejemplo, mucho antes de que Kekulé desarrollara su técnica para escribir las fórmulas de los compuestos orgánicos, Charles y Nelson Goodyear transformaron el caucho, un material termoplástico pegajoso, en un elastómero de utilidad (*caucho vulcanizado*) o en un plástico duro (*ebonita*) al formarse, respectivamente, pocos o muchos enlaces cruzados de azufre cuando se le añadía determinadas cantidades de este elemento y se calentaba.

Inicialmente, las propiedades de los polímeros parecían anómalas respecto a las de los materiales conocidos. Por ejemplo, utilizando las leyes de Raoult y Van't Hoff para la determinación de pesos moleculares, varios químicos obtuvieron elevados pesos moleculares para algunos polímeros lineales; pero concluyeron que sus resultados no eran correctos porque no eran conscientes de la existencia de las macromoléculas.

Uno de los primeros investigadores en el campo de los polímeros fue el químico británico Alexander Parkes, el cual patentó en 1862 un material (*parkesina*) de aspecto similar al marfil. Dicho producto se obtuvo a partir de nitrocelulosa, sustancia inflamable empleada en la manufactura de explosivos, que fue desarrollada por Schönbein en 1846 combinando celulosa y ácido nítrico. El producto obtenido era duro y frágil, por lo que Parkes le añadió alcanfor, descubriendo así el **primer plastificante**. El norteamericano John Wesley Hyatt, tras realizar el mismo descubrimiento en 1869, comercializó el producto con el nombre de *celuloide*. En 1867, químicos alemanes obtienen un nuevo material (*galatita*) mediante la precipitación de caseína (proteína presente en la leche).

El **primer polímero totalmente sintético** fue la *bakelita*, sintetizada por Leo Hendrick Baekeland en 1909. Aunque no existen muchas pruebas de que Baekeland conociera la existencia de macromoléculas, sí entendía el concepto de funcionalidad y, utilizando cantidades controladas de fenol y formaldehído, obtuvo resinas termoplásticas que podían convertirse en plásticos termoestables; el producto obtenido tenía la propiedad, desconocida entonces, de termoendurecerse.

Cerca de 50 años fueron necesarios para desarrollar el *plexiglás*; en 1880 se sabía que el ácido acrílico solidificaba a altas temperaturas bajo presión, pero fue necesario esperar hasta la década de 1920 para que tuviera interés su producción industrial (efectiva en 1930). El plexiglás, o polimetilmetacrilato, permitió la sustitución del vidrio en ciertas aplicaciones que requerían cristales resistentes a impactos.

La Primera Guerra Mundial condujo al uso extensivo del acetato de celulosa como recubrimiento de las alas de los aeroplanos. Tras la guerra se buscaron usos alternativos para dar salida a la producción de este material. Su facilidad de hilado y laminado hizo que se empleara en la producción de fibras textiles y películas de celulosa no inflamables.

En 1953, Hermann Staudinger recibe el premio Nobel de química por una teoría ya avanzada el 1922: la **teoría de los polímeros**. Es en esta última fecha cuando publica un artículo donde sugiere que los cauchos están constituidos por largas cadenas formadas por una unidad básica (monómero) que se repite. Staudinger conjetura que la elasticidad de los cauchos está relacionada con la existencia de dichas cadenas.

En 1928, Meyer y Mark utilizaron técnicas de rayos X para determinar las dimensiones de las cristalitas de la celulosa y el caucho natural. En 1927 se obtiene el **primer caucho sintético**, la *buna*, a partir de butadieno. Poco después, Wallace Carothers y su equipo desarrollan el *neopreno* (1931) y el *nylon 66* (1935), entre otros polímeros. Durante el mismo periodo se descubre el *politetrafluoroetileno*, de extraordinaria resistencia química. Partiendo del trabajo de Carothers, los químicos ingleses Whinfield y Dickson desarrollaron en 1941 una excelente fibra textil sintética de poliéster, obtenida por policondensación de ácido tereftálico y etilenglicol, que recibió el nombre de *tergal*.

El *polietileno*, muy importante en los campos del transporte de información y generación de energía, fue descrito en 1933 por científicos ingleses que investigaban la termodinámica del gas etileno a muy altas presiones (2000 bar). El experimento es peligroso porque la reacción es explosiva; los investigadores de la empresa ICI tardaron 2 años en controlar la reacción, si bien la producción industrial no se inició hasta 1939 con la proximidad de la guerra (industria militar).

El desarrollo por Ziegler del primer catalizador basado en aluminio permitió el desarrollo de procesos de síntesis a baja presión a partir de 1953; este trabajo fue ampliado por Giulio Natta, quién obtendría el premio Nobel junto a Ziegler en 1963. En 1942 Standley Kipping logró la primera síntesis de polisilicios o *siliconas*, su producción se incrementó rápidamente durante la guerra, tanto en su forma líquida (aceites de alta temperatura) como en forma sólida (piezas de motor). El descubrimiento de nuevos plastificantes permitió en 1943 el inicio de la producción industrial de PVC (*poli-cloruro de vinilo*), descubierto ya en 1835 por Henri Regnault, pero inservible debido a su dureza y fragilidad.

El desarrollo de la tecnología de los polímeros a partir de la década de 1940 ha sido extremadamente rápido y, en pocas décadas han sustituido en un gran número de aplicaciones a otros materiales de naturaleza metálica y cerámica tradicionalmente utilizados. Por otro lado, los polímeros sintéticos, han ido substituyendo a polímeros naturales, como el caucho, el algodón y la celulosa, debido a la facilidad de transformación, a sus mejores propiedades mecánicas y a la resistencia frente a la acción de sustancias químicas agresivas.

El rápido crecimiento de los materiales poliméricos fue debido a factores como:

- a) Los materiales de partida (el petróleo, el gas natural y el carbón) que existían en gran cantidad y tenían un precio bajo.
- b) El elevado número de monómeros disponibles ha facilitado generar un gran número de polímeros y copolímeros diferentes, lo que ha permitido obtener un amplio espectro de composiciones, estructuras y propiedades en estas macromoléculas orgánicas.
- c) La exploración sistemática del comportamiento mecánico, óptico, eléctrico y térmico ha suministrado una gran cantidad de información sobre propiedades y características prácticas.
- d) Desde hace algunas décadas, se han desarrollado nuevos procesos de transformación de los polímeros que permiten obtener productos en multitud de formas distintas, como fibras, placas, filmes, tubos, recipientes, etc.
- e) Las muchas aplicaciones que presentan estos materiales han estimulado la síntesis y el desarrollo de nuevos miembros de la familia de los polímeros.

A continuación, se presenta una tabla resumen de la evolución de los polímeros a lo largo de la historia:

FECHA	MATERIAL	FECHA	MATERIAL
Antes de 1.800	Algodón, lino, lana seda, vidrio y cementos hidráulicos, celulosa en láminas (papel); caucho natural, y laca	1.839	Vulcanización del caucho (Charles Goodyear)
1.846	Nitración de la celulosa (Schönbein)	1.851	Ebonita (caucho duro; Nelson Goodyear)
1.860	Moldeado de la laca	1.868	Celuloide (nitrato de celulosa plastificada; Hyatt)
1.889	Películas fotográficas de nitrato de celulosa (Reichenbach)	1.890	Fibras de rayón cupramonio (Despeisses)
1.892	Fibras de rayón viscosa (Cros, Bevan y Beadle)	1.907	Resinas de fenol-formaldehído (baquelita; Baekeland)
1.907	Soluciones de acetato de celulosa	1.908	Películas fotográficas de acetato de celulosa
1.912	Láminas de celulosa regenerada (celofán)	1.920	Presentación hipótesis macromolecular (Staudinger)
1.924	Fibras de acetato de celulosa	1.926	Poliéster alquídico (Kienle)
1.927	Recubrimientos de cloruro de polivinilo para paredes	1.927	Barras y láminas de acetato de celulosa
1.929	Elastómero sintético de polisulfuro	1.929	Resinas de urea-formaldehído
1.931	Elastómeros de policloropreno	1.931	Plásticos de polimetacrilato de metilo
1.935	Etilcelulosa	1.936	Acetato de polivinilo
1.937	Poliestireno	1.937	Elastómeros copolímeros de estireno-butadieno y estireno-acrilonitrilo
1.938	Fibras de nylon-6,6 (Carothers)	1.939	Resinas melamina-formaldehído
1.940	Elastómeros de isobutileno-isopreno	1.941	Poliétileno de baja densidad (LDPE)
1.942	Poliésteres insaturados (Ellis y Rust)	1.943	Resinas fluorocarbonadas (Teflón; Plunkett)
1.943	Siliconas	1.943	Poliuretanos (Bayer)
1.947	Resinas Epoxi	1.948	Copolímeros de acrilonitrilo, butadieno y estireno (ABS)
1.950	Fibras de poliacrilonitrilo	1.950	Fibras de poliéster (Whinfield y Dickson)
1.956	Polioximetileno	1.957	Poliétileno (lineal) de alta densidad (HDPE)
1.957	Polipropileno	1.959	Elastómeros de polibutadieno-cis y poliisopropeno-cis
1.960	Elastómeros de copolímeros de etileno-propileno	1.964	Poli (óxido de fenileno)
1.965	Polisulfona	1.965	Copolímeros de bloques estireno-butadieno
1.970	Politereftalato de butileno	1.971	Sulfuro de polifenileno
1.972	Aramidas, poliésteres moldeables	1.973	Poliimidas segunda generación
1.974	Bismaleimidias, poliamidas aromáticas	1.976	Polifenilsulfona (RADEL)

TABLA 1. DESARROLLO CRONOLÓGICO DE LOS POLÍMEROS

2.2. DEFINICIÓN DE POLÍMERO

Un **polímero** puede definirse como un material constituido por moléculas formadas por unidades constitucionales que se repiten de una manera más o menos ordenada. Dado el gran tamaño de las moléculas con la estructura indicada, reciben el nombre de macromoléculas. De hecho el nombre de estos compuestos ya sugiere su constitución interna, puesto que la palabra polímero deriva de los términos griegos *poli* y *meros*, que significan *mucho* y *partes*, respectivamente. Cuando la molécula está formada por pocas unidades, se habla de un oligómero, derivado etimológicamente del término griego *oligo* que significa *poco*.

En los polímeros, las unidades que se repiten a lo largo de la estructura reciben el nombre de *unidad constitucional repetitiva* (UCR), también denominado residuo.

El proceso químico mediante el cual se obtiene un polímero se conoce con el nombre de **polimerización**. En este proceso, el polímero se forma a partir de la unión entre sí de pequeñas moléculas, llamadas **monómeros**. Para que una molécula pueda generar el polímero, es necesario que presente dos o más grupos funcionales que puedan reaccionar, es decir, debe tener una funcionalidad igual o superior a dos.

2.2.1. POLIMERIZACIÓN

A partir de los monómeros se obtienen los polímeros mediante el proceso de polimerización. Básicamente existen dos tipos de reacciones de polimerización: de adición y de condensación. Las polimerizaciones de condensación proceden a través de reacciones por etapas de los grupos funcionales mientras que las polimerizaciones de adición son reacciones en cadena que implican centros activos de tipo radical o iónico.

En los **polímeros de adición**, la fórmula de la unidad estructural es la misma que la del monómero, exceptuando los dobles enlaces que han desaparecido. En tales polímeros no aparecen grupos funcionales en las cadenas, sino que están formados por la sucesión de átomos de carbono, aunque ciertos grupos funcionales pueden estar presentes como sustituyentes laterales. Al desarrollarse el polímero a partir de un centro activo, se obtienen polímeros de peso molecular elevado. El avance de la reacción transcurre mediante un mecanismo en cadena.

Un ejemplo de polimerización de adición es la polimerización radicalaria del estireno. Este tipo de reacción tiene lugar después de la formación de radicales libres por la descomposición de un iniciador. Cada uno de los radicales libres formados reacciona con un doble enlace del estireno monómero, formándose un nuevo radical que reacciona con otro monómero y da lugar a un nuevo radical.

En los **polímeros de condensación**, la fórmula de la unidad estructural tiene normalmente algunos átomos menos que la del monómero, ya que casi siempre se desprende una partícula pequeña en la polimerización. Por otra parte, en estos polímeros los grupos funcionales generalmente forman parte del esqueleto de la cadena. El mecanismo de la reacción por etapas consiste en la reacción sucesiva de dos monómeros que tienen funciones complementarias o un monómero con dos funciones complementarias. Los polímeros resultantes se caracterizan por tener pesos moleculares inferiores a los obtenidos mediante mecanismos en cadena.

Un ejemplo típico de polimerización de condensación es la poliamida 6,6 que se obtiene a partir de la reacción entre la hexametildiamina y el ácido adípico. A medida que transcurre la policondensación, por cada grupo amida que se forma, se forma también una molécula de agua. Al reaccionar los monómeros entre sí, dan lugar a dímeros que posteriormente reaccionan entre ellos produciendo cadenas cada vez mayores.

2.3. LA ESTRUCTURA MOLECULAR

Cada polímero tiene una estructura química determinada. Esta estructura incluye la composición, la constitución molecular y el tamaño molecular. La composición viene definida por la composición atómica y se expresa mediante el análisis elemental. Los polímeros orgánicos se caracterizan por la presencia inevitable de los átomos de carbono e hidrógeno. Otros átomos frecuentes, denominados heteroátomos, son el oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, silicio y ciertos halógenos.

La **constitución molecular** determina de forma inequívoca la identidad de un polímero y comprende la constitución química, la arquitectura de la molécula y la configuración.

El **tamaño molecular** se define mediante valores promedios, dado el carácter polidisperso que inevitablemente tienen los polímeros. Los pesos moleculares pueden oscilar entre unos cuantos miles y varios millones, y en el caso de los polímeros fuertemente entrecruzados, se puede considerar que el peso molecular es infinito.

Asimismo, una molécula de polímero puede adoptar diversas formas espaciales o **conformaciones**. La conformación puede modificarse por rotación de los enlaces simples. La conformación particular que adopta una cadena de polímero, es decir aquella más estable, viene determinada por su constitución y por su tamaño, pero también por las condiciones del entorno en que se encuentra.

2.4. LA ESTRUCTURA SUPRAMOLECULAR

2.4.1. EL ESTADO AMORFO

El estado amorfo se caracteriza por una ausencia tanto de orden axial como de orden ecuatorial, no conociéndose con precisión su estructura detallada, ya que dada la ausencia de orden, las técnicas estructurales habituales suministran una información escasa. Los estudios realizados, de carácter preferentemente teórico, suministran modelos conceptuales más o menos capaces de explicar el comportamiento físico de este estado.

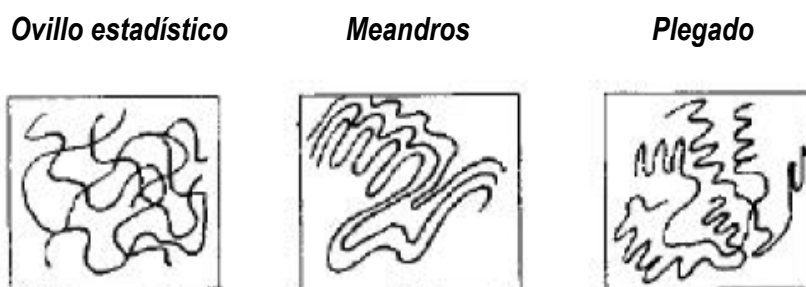


FIGURA 1. MODELOS MÁS CARACTERÍSTICOS DEL ESTADO AMORFO

Entre los modelos propuestos, el *ovillo estadístico* (Ver Figura 1) es el más aceptado porque permite un tratamiento estadístico capaz de explicar de manera cuantitativa un buen número de propiedades.

2.4.2. EL ESTADO CRISTALINO

El estado cristalino en polímeros es en realidad bifásico, coexistiendo la fase cristalina junto con la amorfa, por lo que estos materiales deberían ser denominados como semicristalinos (Figura 2). La relación cuantitativa entre estas dos fases viene expresada por la cristalinidad.

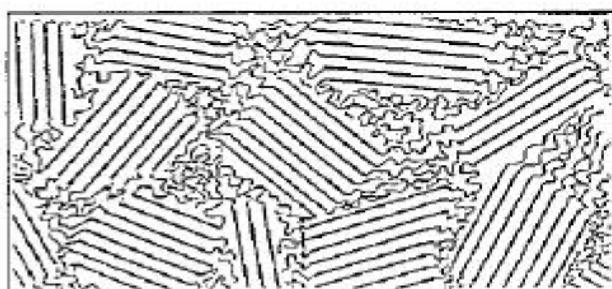


FIGURA 2. MODELO DEL ESTADO CRISTALINO SEGÚN FLORY

➤ **Cristalinidad**

La cristalinidad se define como la fracción en peso de fase cristalina presente:

$$\omega_c = \frac{W_c}{W}$$

W_c = peso de fase cristalina

W = peso total de muestra

ω_c = índice de cristalinidad cuyo valor oscila entre 0.4 para polímeros poco cristalinos y 0.95 para muestras muy bien cristalizadas de polímeros de constitución muy regular.

El índice de cristalinidad es una magnitud relativa cuya medida puede efectuarse por densitometría, calorimetría o espectroscopía. El método densitométrico resulta el más simple y asequible si se conocen las densidades amorfas y cristalinas del polímero:

$$\omega_c = \frac{\rho_c}{\rho_a} \frac{\rho - \rho_a}{\rho_a - \rho_a}$$

ρ = densidad de la muestra problema

ρ_c = densidad de una muestra 100% cristalina

ρ_a = densidad de una muestra 100% amorfa

➔ **Factores determinantes de la cristalinidad**

En las condiciones óptimas de cristalización, el grado de cristalinidad de un polímero viene determinado por la constitución de su cadena molecular. En general puede decirse que todo defecto que reduzca la regularidad constitucional de la cadena afecta negativamente a la cristalinidad.

- **Comonomeros:** la cristalinidad disminuye con la copolimerización, siendo este efecto mayor cuanto más diferentes sean las estructuras de los comonomeros.

- **Tamaño:** la cristalinidad disminuye con el peso molecular.

- **Configuración:** la cristalinidad está estrechamente vinculada a la estereoregularidad, hasta el punto de que la ausencia de tacticidad suele ser sinónimo de carácter amorfo.

- **Ramificaciones:** la presencia de ramas disminuye la cristalinidad, siendo el efecto más pronunciado cuanto más irregulares sean éstas.

2.4.3. LA ESTRUCTURA DE FIBRA

A escala macroscópica una fibra se define como un objeto flexible y homogéneo que presenta una relación longitud/diámetro de cómo mínimo 100. Sin embargo lo que caracteriza la estructura de fibra es la existencia de un orden monoaxial a escala molecular con dirección paralela al eje del filamento. Aunque es posible obtener fibras en fase amorfa, la mayor parte de ellas (naturales o sintéticas), poseen un elevado grado de cristalinidad.

Los parámetros estructurales definitorios de la estructura de fibra son la cristalinidad y el grado de orientación. La medida de este último se lleva a cabo mediante diferentes técnicas como la difracción de rayos X o la microscopía óptica de polarización.

2.5. CLASIFICACIÓN DE LOS POLÍMEROS

2.5.1. SEGÚN EL ORIGEN

- Polímeros Naturales. Son los que se pueden presentar en la naturaleza (reino vegetal y animal), por ejemplo: la celulosa, el caucho natural, las resinas, etc.
- Polímeros semisintéticos. Son los obtenidos por la transformación química de los polímeros naturales, sin que se destruya de modo apreciable su naturaleza macromolecular. Ej. : la seda artificial obtenida a partir de la celulosa.
- Polímeros Sintéticos. Son los que se obtienen por vía puramente sintética a partir de sustancias de bajo peso molecular. Ej.: el Nylon.

2.5.2. SEGÚN LA ESTRUCTURA MOLECULAR

- Polímeros lineales. La molécula está constituida por una cadena de la que sólo cuelgan los grupos laterales, los cuales ya estaban presentes en el monómero.

- Polímeros ramificados. Existen cadenas más o menos largas, en mayor o menor frecuencia, que emergen de manera aleatoria de la cadena principal. La constitución química de la rama es idéntica a la de la cadena principal.
- Polímeros peine. Constituyen un caso intermedio entre polímeros lineales y ramificados. Contienen ramas de similar longitud, dispuestas con alta frecuencia y regularidad a lo largo de la cadena principal. Por lo general cuelga una rama de cada UCR. La constitución química de la rama es por lo general diferente a la de la cadena principal. En los polímeros estrella, las diferentes ramas irradian desde un origen común.
- Polímeros entrecruzados. Son polímeros ramificados en los que las ramas entrelazan las cadenas unas con otras, de manera que todo el conjunto puede concebirse como una sola macromolécula de tamaño limitado. Los polímeros escalera son unos polímeros entrecruzados constituidos por una sucesión regular de ciclos. Los polímeros semiescalera son un caso particular en el que las unidades cíclicas alternan con segmentos lineales.

2.5.3. SEGÚN LAS REACCIONES DE FORMACIÓN

- Polímeros de adición. Son polímeros cuyas macromoléculas se han formado por unión de moléculas monómeras no saturadas. Ej.: el polietileno.
- Polímeros de condensación. Son polímeros cuyo enlace entre las macromoléculas son multifuncionales, con separación de algún producto de bajo peso molecular. Ej.: Nylon, las proteínas.
- Polímeros poliaductos. Son aquellos cuyo enlace entre las macromoléculas son multifuncionales, sin separación de moléculas sencillas. Ej.: poliuretanos y resinas.

2.5.4. SEGÚN LA COMPOSICIÓN QUÍMICA DE LA CADENA PRINCIPAL

- Polímeros homocadena. Son aquellos en los que la cadena principal no contiene heteroátomos. Dentro de este grupo de polímeros, se distinguen cinco familias principales: las poliolefinas, los poliestirénicos, los insaturados (polienos), los polivinilos y los poliacrílicos.

- Polímeros heterocadena: En esta clase de polímeros (que contienen heteroátomos en la cadena principal) hay tantas familias como funciones químicas distinguiéndose en cada caso los tipos A·B y A-A·B-B según que las funciones complementarias de los monómeros estén sobre la misma molécula o no.

2.5.5. SEGÚN SUS PROPIEDADES FÍSICAS

- Termoestables: Son polímeros que no se pueden fundir a través de un proceso de calentamiento simple, puesto que su masa es tan dura que necesita temperaturas muy elevadas para sufrir algún tipo de destrucción.
- Elastómeros: Son polímeros que aunque pueden ser deformados, una vez que desaparece el agente que causó la pérdida de su forma pueden retornar a ella.
- Termoplásticos: Este es un tipo de polímeros que tienen facilidad para ser fundidos, y por lo tanto pueden ser moldeados. Si tienen una estructura regular y organizada, pertenecen a la subdivisión de los cristalinos, pero si su estructura es desorganizada e irregular, se consideran amorfos.

2.5.6. SEGÚN SU USO

- Plásticos “commodities”: Son plásticos de uso cotidiano, que se caracterizan por ser económicos y de consumo masivo.
- Plásticos “specialities”: Son plásticos destinados a aplicaciones más específicas y con un valor añadido considerable.

BLOQUE II: ESTUDIO DE BIODEGRADABILIDAD

Capítulo 3

TEORÍA DE BIODEGRADABILIDAD DE POLÍMEROS

El presente capítulo trata de definir los conceptos relacionados con la degradación, y más en concreto, con la biodegradación de materiales plásticos, basándose en definiciones genéricas sobre cualquier tipo de material. Definiendo los conceptos básicos y aplicándolos a los envases plásticos degradables, se pretende establecer una base teórica sobre la que se apoya el estudio de biodegradabilidad realizado.

3.1. INTRODUCCIÓN

La principal propiedad que permite que los polímeros puedan competir con otros materiales como el vidrio y los metales es su resistencia química, física y mecánica. Por este motivo las investigaciones en este campo siempre han ido encaminadas a aumentar la vida de ciertos polímeros. No obstante, la longevidad puede derivar en problemas.

En los últimos años, los residuos poliméricos sintéticos han aumentado su porcentaje dentro de los residuos sólidos totales. Como resultado, las investigaciones han cambiado de dirección, orientándose hacia la síntesis de polímeros degradables, ya sea por efecto de la temperatura (degradación térmica), debido al contacto con el agua (degradación hidrolítica), o por efectos medioambientales como la luz solar (fotodegradación) o los microorganismos (biodegradación).

Habitualmente, en artículos de prensa, revistas técnicas o sectoriales, e incluso en el lenguaje común, se utilizan términos relacionados con la degradación de los materiales. En el campo de la degradación de los envases de plástico, se están empleando en la actualidad la terminología confusa de un plástico degradable, frente a un plástico biodegradable, sin olvidar que hay otros conceptos que también les son de aplicación.

A continuación se expone el concepto de degradación y los distintos mecanismos posibles de actuación sobre la estructura de un polímero; haciendo hincapié en el concepto de biodegradabilidad. Además se incluye una clasificación de los polímeros biodegradables y se citan los principales polímeros biodegradables de uso comercial.

3.2. POLÍMEROS BIODEGRADABLES

Los polímeros biodegradables son aquellos capaces de ser degradados medioambientalmente. Representan una nueva generación de materiales capaces de reducir significativamente el impacto ambiental en términos de consumo de energía y generación de residuos después de su utilización. En principio, deben comportarse como los materiales plásticos tradicionales, si bien, todavía presentan algunas limitaciones.

La biodegradabilidad de los plásticos depende de la estructura química del material y de la composición del producto final, no sólo de la materia prima empleada para su fabricación.

Por esta razón, podemos encontrarnos con materiales biodegradables obtenidos a partir de resinas naturales o sintéticas. Los plásticos biodegradables naturales se obtienen principalmente a partir de recursos renovables, tales como el almidón, y pueden ser producidos de forma natural o sintética. Las resinas sintéticas proceden principalmente de derivados del petróleo y de otros productos e incluyen polímeros de poliéster y polietileno. Un ejemplo de polímero sintético biodegradable es la policaprolactona, una resina de poliéster termoplástica.

Como cualquier otro plástico comercial, los materiales biodegradables deben cumplir una serie de requerimientos orientados a la función a que van destinados. Por esta razón, a menudo los plásticos biodegradables naturales se mezclan con polímeros sintéticos para obtener un producto final cuyas propiedades funcionales sean adecuadas para el mercado.

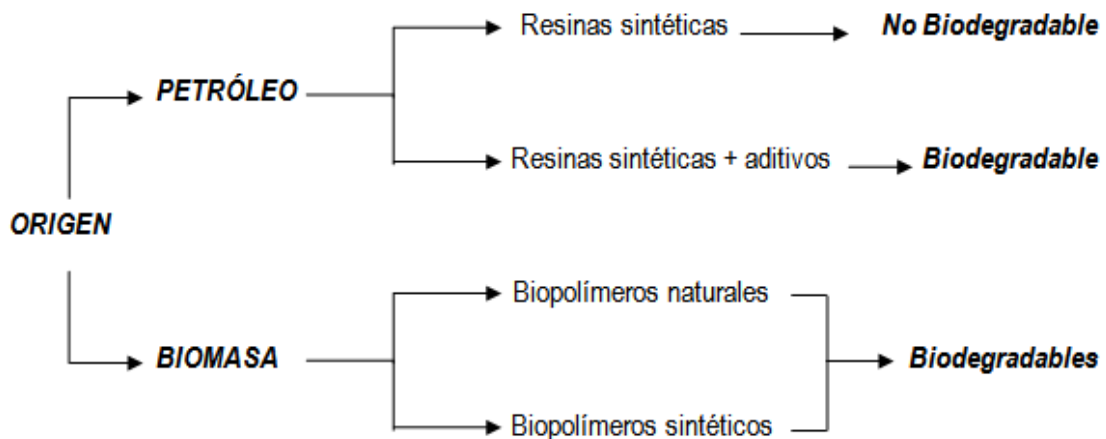


FIGURA 3. CAPACIDAD DE BIODEGRADACIÓN EN FUNCIÓN DEL ORIGEN DEL PLÁSTICO

3.2.1. DEGRADACIÓN DE POLÍMEROS

Cualquier material, en concreto el plástico, se dice que es degradable cuando su estructura química puede sufrir cambios significativos que resultan en la pérdida de algunas propiedades que pueden variar según la prueba que se aplique y la unidad de tiempo en que se aplique dicha prueba. Sus resultados determinarán la clasificación del plástico estudiado partiendo de sus características fundamentales (básicamente su composición química). *(Definición de la American Society for Testing & Materials - ASTM.)*

El concepto degradable se presenta, por tanto, como un efecto y no una causa, pero sin embargo, es una característica potencial del material, en este caso un plástico.

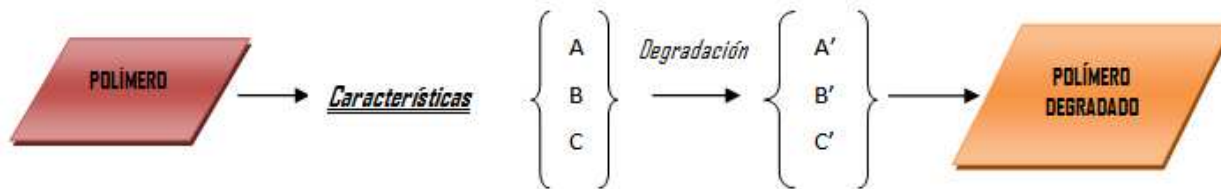


FIGURA 4. ESQUEMA DEL PROCESO DE DEGRADACIÓN

Siempre que se cumpla que $A' < A$ y/o $B' < B$ y/o $C' < C$.

Un requisito indispensable para que los materiales poliméricos sean considerados degradables es que contengan grupos en la cadena principal que se puedan romper fácilmente por la acción de agentes externos de naturaleza física o química. Lo que se pretende conseguir es el mantenimiento de las propiedades durante el periodo de utilización del polímero y posterior cambio de estructura química para descomponerse en componentes compatibles con el medio ambiente. Las reacciones que tienen lugar pueden ser de oxidación o de hidrólisis y generalmente comportan una disminución del grado de polimerización del material.

Como consecuencia de la degradación, en un polímero pueden ocurrir cambios físicos o químicos. Los cambios físicos pueden consistir en la decoloración, pérdida del brillo superficial, formación de grietas, superficie pegajosa, erosión superficial y pérdida de propiedades como la resistencia a la tracción y el alargamiento. Los cambios químicos consisten en la rotura de cadenas, cambios en los sustituyentes laterales, aparición de reacciones de entrecruzamiento, etc.

Por otra parte, es importante recalcar que cuanto más bajo sea el peso molecular de un polímero la degradación será más rápida y para los polímeros con mayor peso molecular, la combinación de grupos funcionales fotosensibles e hidrolizables hace más efectiva la degradación medioambiental.

La degradación corresponde a un proceso de tipo químico y por lo tanto para los compuestos orgánicos la bibliografía define como degradación a la pérdida de átomos de carbonos. Por ejemplo la degradación de hidratos de carbono se concreta en una pérdida de dióxido de carbono pasando a un hidrato de carbono inferior en su longitud de cadena.

Los mecanismos causantes de la degradación son:

- Causa de la temperatura → **Termodegradación**
- Causa de la luz (radiación UV) → **Fotodegradación**
- Causa química → **Degradación química**
 - Oxidación: *oxo-degradación*
 - Hidrólisis: *hidrodegradación*
- Causa biológica → **Biodegradación**

Cualquiera de estos tipos de degradación requiere de tres componentes esenciales para que se verifique el fenómeno degradativo. En ausencia de alguno de ellos la degradación no se produce. Estos componentes fundamentales para que ocurra la degradación son:

- tiene que haber un sustrato (sustancia química o materia orgánica).
- tiene que haber un agente que efectúe la degradación.
- tiene que haber un ambiente de características específicas: humedad, oxígeno (O₂) en estado molecular si se considera aportado por el aire, o dentro de los procesos anaerobios el aportado por las sales (por ejemplo los sulfatos), con su correspondiente generación de gas metano, agua, temperatura adecuada, pH y cantidad básica de nutrientes limitantes.

Finalmente, se forman tres fracciones de productos como consecuencia de la degradación de un plástico:

- Sustancias volátiles a temperatura ambiente y de tamaño molecular análogo o menor al del monómero original. Se pueden recoger en forma de gases y vapores y analizar detalladamente.
- Sustancias volátiles a la temperatura de degradación térmica, pero no volátiles a temperatura ambiente. Entre ellos aparecen polímeros fraccionados, de estructura desconocida, semejantes a los oligómeros y que pueden ser dímeros, trímeros o tetrámeros del monómero original.

- Residuo no volátil sólido duro a temperatura ambiente, de consistencia resinosa o en forma de polvo, frecuentemente no soluble en agua, ácidos, bases y disolventes orgánicos y de gran estabilidad térmica. Es, por lo tanto, un producto siempre presente y difícil de eliminar.

En la siguiente tabla se resumen el agente, efecto y restos en el medio que participan en cada uno de los tipos de degradación.

	AGENTE	EFECTO	RESTOS EN EL MEDIO	ALCANCE
Termodegradación	Temperatura	Pérdida de color y propiedades físicas	Compuestos fenólicos tras la degradación	Todos los plásticos
Fotodegradación	Luz UV	Cambios en las propiedades físicas	Óxidos de Zn, Fe, Mg, Ti, de los aditivos	PVC, PS, ésteres de celulosa, poliolefinas
Degradación química	Todos	Toxicidad en el medio no controlable	Compuestos químicos de toxicidad variable	Polímeros oxodegradables
Biodegradación	Hongos, algas, bacterias	CO ₂ + H ₂ O + humus	Residuo asimilable por las plantas	Biopolímeros preferiblemente

TABLA 2. MECANISMOS DE DEGRADACIÓN

Se abordan a continuación estos conceptos, y se amplía la descripción del proceso de biodegradación.

3.2.1.1. FOTODEGRADACIÓN

En el caso de la fotodegradación el agente es la luz, que produce modificaciones en las estructuras del material que permiten la posterior degradación a otros compuestos más pequeños. Se dice que un plástico es fotodegradable cuando la degradación se produce, por tanto, como resultado de la acción de la luz natural.

La acción continuada y directa de la radiación solar, superior en energía a la de muchos de los enlaces presentes en polímeros, conduce a reacciones fotoquímicas de ruptura y degradación, cuyos resultados son también alteraciones y cambios en propiedades ópticas y mecánicas.

Son particularmente sensibles a la fotodegradación plásticos tipo PVC, poliolefinas, ésteres de celulosa, PS y poliamidas.

Existen dos maneras de obtener polímeros fotodegradables:

- Introduciendo en el polímero grupos funcionales sensibles a la radiación ultravioleta, como los grupos carbonilo, mediante la modificación del polímero y copolimerización con monómeros portadores del grupo carbonilo, tales como cetonas vinílicas.
- Introduciendo aditivos fotosensibles, catalizadores y peroxidantes que aceleren el proceso de degradación.

La fotodegradación empieza con la producción del macro-radical (P') en las regiones amorfas del substrato polimérico. Este radical reacciona rápidamente con el oxígeno para dar el radical peróxido (POO'), que extrae un átomo de hidrógeno de la cadena principal del polímero para producir un grupo hidroperóxido ($POOH$). Este grupo está fuertemente adherido de manera que se producen los radicales altamente reactivos que permiten continuar el ciclo de degradación de la cadena en el polímero. El ciclo termina cuando se combinan dos radicales.

La variedad de estabilizantes fotoquímicos (absorbentes o disipadores de luz), disponibles en el mercado, frecuentemente facilita que su acción se confunda con la que corresponde a aditivos de otro tipo. Por ejemplo, muchos pigmentos utilizados como tales en otros sectores industriales (negro de humo, óxido de cinc, óxido de magnesio, carbonato de calcio, sulfato de bario, óxido de hierro, óxido de titanio y otros) son estabilizantes absorbentes de luz frente a la fotodegradación y se suelen incluir en las formulaciones de los plásticos. También son utilizados como estabilizantes, esta vez disipadores, las hidroxibenzofenonas, salicilatos y benzoatos, benzotriazoles, aminas terciarias y níquel-quelatos.

3.2.1.2. DEGRADACIÓN TÉRMICA

En el procesado de polímeros interviene de forma muy directa el calor, y por este motivo la degradación térmica es de gran importancia. El proceso está acompañado por la ruptura hemolítica de los enlaces covalentes de la cadena o de los grupos laterales como consecuencia del aumento de la temperatura.

Dependiendo de la reactividad de cada radical se producirán unas reacciones u otras. Tanto si hablamos de fotodegradación como de degradación térmica, los mecanismos fundamentales de degradación de los polímeros están basados en los mismos principios. La única excepción es que la fotodegradación tiene lugar a una velocidad más rápida que la degradación térmica y que los hidroperóxidos están térmicamente adheridos a los radicales reactivos en la degradación térmica.

Una de las líneas de investigación más importante de la ciencia de los polímeros se encuentra dirigida al desarrollo de los polímeros termoestables, en los cuales el calor no produce pérdida de propiedades. Para conseguir este objetivo se puede actuar de dos formas: aumentando la rigidez del polímero o aumentando la cristalinidad. Esto se consigue con la inclusión de grupos rígidos (anillos) en la cadena polimérica y también con polímeros estereoregulares. Estos dos hechos hacen aumentar la temperatura de reblandecimiento, con lo que la resistencia térmica se acentúa.

Aquellas constantes físicas, parámetros y determinaciones relacionados con la degradación térmica de los plásticos, que son de utilidad preventiva, se detallan a continuación:

a. *Valor de temperatura a la que un plástico se descompone*, lo cual se hace notorio al observar un cambio de color o señales en su superficie. Un parámetro técnico tabulado de manufactura de un plástico es el intervalo de estabilidad térmica en el que se garantizan sus prestaciones. Sin embargo, la mayoría de las veces y debido a los diversos factores que se aúnan en el procesamiento de los plásticos, éstos se degradan a temperaturas inferiores a lo que cabría esperar, o bien el calor desarrollado en el interior de máquinas y equipos es suficiente para alcanzar los límites de confianza comercialmente garantizados. Este valor de temperatura es el correspondiente a una degradación comprobada, con evidencia de una emisión importante de contaminantes, según se desprende de pruebas experimentales y referencias bibliográficas. Para muchos plásticos temperaturas que rondan este valor son alcanzadas, habitualmente, en prensas, extrusoras e inyectoras, durante los procesos de transformación.

b. *Los estabilizantes térmicos contenidos en la composición de un plástico*, que son compuestos orgánicos como los fenoles y derivados (monofenoles, dihidroxi y trihidroxi-bencenos, bisfenoles, éteres fenólicos y aminofenoles), o bien, aminas y mezclas de aminas (naftilamina, difenilamina, fenilendiamina y alquildifenilamina). La mayor parte de estas sustancias son también antioxidantes.

3.2.1.3. DEGRADACIÓN QUÍMICA

Existen dos principales formas de la degradación química: *Oxidación e Hidrólisis*. En el caso de la degradación química, son ciertos agentes químicos los que actúan sobre el plástico. A continuación se explica cada uno de ellos:

a. **Oxodegradación.** El sistema de oxidación o de oxodegradación consiste en emplear aditivos para facilitar la degradación de un plástico convencional. La primera etapa de degradación puede ser iniciada por la luz ultravioleta (UV) de la radiación solar, calor y/o tensión mecánica que inician el proceso de degradación por oxidación. De ésta manera se reduce el peso molecular del polímero debido a la rotura de las cadenas moleculares quedando un remanente con suficientemente bajo peso molecular que sería susceptible de desarrollar un proceso de biodegradación con el tiempo.

Aunque esta tecnología y sus productos no son nuevos, desde su aparición en el mercado en los años 80 han surgido muchas dudas con respecto a si son verdaderamente biodegradables según las normas internacionales de biodegradación. Asimismo existen dudas de que los residuos que quedan tras la degradación tengan efectos tóxicos para el medio ambiente provocados por residuos metálicos con potencial toxicidad. Otra desventaja adicional de los polímeros oxo-biodegradables es que si se reciclan mezclados con polímeros comunes éstos se tornan degradables con lo que se impide su reciclado a usos de larga duración como tubos, cables, postes, etc.

b. **Degradación hidrolítica.** La degradación hidrolítica de un polímero se produce como consecuencia del contacto del material con un medio acuoso. La penetración del agua dentro de la matriz provoca el inflamamiento, ruptura de puentes de hidrógeno intermoleculares, hidratación de las moléculas y finalmente la hidrólisis de los enlaces inestables. La rotura de los grupos funcionales por hidrólisis, puede suceder tanto en los grupos situados en la cadena principal como en los sustituyentes laterales.

El concepto de degradación de un polímero se asocia con el decrecimiento del peso molecular, por este motivo, es necesario que la cadena principal se rompa en diferentes puntos. Por tanto, la degradación implica la hidrólisis de los grupos funcionales que estén situados en la cadena principal.

3.2.1.4. BIODEGRADACIÓN

El término biodegradación hace referencia a la transformación y deterioro que se producen en el polímero debido a la acción de enzimas y/o microorganismos como bacterias, hongos y algas. La biodegradación puede ser parcial o total.

Se podría definir también el término biodegradación como el resultado de los procesos de digestión, asimilación y metabolización de un compuesto orgánico llevado a cabo por bacterias, hongos, protozoos y otros organismos. En principio, todo compuesto sintetizado biológicamente puede ser descompuesto biológicamente. Sin embargo, muchos compuestos biológicos (lignina, celulosa, etc.) son difícilmente degradados por los microorganismos debido a sus características químicas.

La biodegradación es un proceso natural, ventajoso no sólo por permitir la eliminación de compuestos nocivos impidiendo su concentración, sino que además es indispensable para el reciclaje de los elementos en la biosfera, permitiendo la restitución de elementos esenciales en la formación y crecimiento de los organismos (carbohidratos, lípidos, proteínas). La descomposición puede llevarse a cabo en presencia de oxígeno (aeróbica) o en su ausencia (anaeróbica). La primera es más completa y libera energía, dióxido de carbono y agua, es la de mayor rendimiento energético. Los procesos anaeróbicos son oxidaciones incompletas y liberan menor energía.

En el caso de la biodegradación, el agente está dado por los microorganismos como las bacterias y hongos, que degradan la materia a fragmentos más pequeños, de menor peso molecular. Estos organismos requieren de ciertos factores ambientales para metabolizar sustratos: humedad, oxígeno, pH, temperatura adecuada. Las enzimas son las ejecutoras de la degradación. Una enzima no es más que una proteína con una función específica sobre un sustrato.

3.2.2. BIODEGRADABILIDAD

En este apartado, se complementa lo ya explicado en el punto anterior acerca de biodegradación de materiales poliméricos.

Es muy complicado definir de forma consensuada el término biodegradación, sobre todo debido a las fuertes interacciones entre un método de degradación y otro. El término **biodegradación**, como ya se explicó en el apartado anterior, indica un proceso de degradación química llevado a cabo por agentes biológicos (enzimas, bacterias o microorganismos).

En concreto, la biodegradación producto de la exposición ambiental implica la acción de microorganismos y tiene como consecuencia una reducción del grado de polimerización, así como la degradación del polímero en fragmentos orgánicos simples.

La definición de biodegradación requiere un sistema biológico y excluye cualquier acción de enzimas sintetizados en el laboratorio sobre los polímeros (incluso en aquellos casos en los que se dispone de un enzima idéntico al de una especie natural). Esta limitación tiene un impacto pequeño en la mayoría de los procesos de biodegradación interesantes

3.2.2.1. TIPOS DE BIODEGRADABILIDAD

Puede distinguirse entre:

a) **biodegradabilidad parcial**: alteración en la estructura química y pérdida de propiedades específicas.

b) **biodegradabilidad total**: se asocia generalmente a una mineralización completa con producción de CO₂ (en condiciones aerobias), metano (en condiciones anaerobias), agua, sales minerales y biomasa; en algunos casos pueden quedar fragmentos (oligómeros) resistentes a la degradación.

Los polímeros biodegradables pueden ser hidrolizados tanto pasiva como activamente por vía hidrólisis enzimática. Ambos mecanismos compiten uno contra otro, y el más rápido es el que controla el mecanismo de degradación global. Teniendo en cuenta el tipo de ataque producido por los enzimas, existen dos clases de biodegradabilidad, que se encuentran esquematizados en la (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**).

a) ataque al azar en la cadena principal realizado por **endoenzimas**: produce una pérdida significativa de peso molecular debido a la rotura al azar de las cadenas.

b) ataque específico a los extremos de las cadenas realizado por **exoenzimas**: no produce una pérdida significativa del peso molecular, ya que sólo se desprenden monómeros, dímeros o trímeros.

3.2.2.2. MECANISMOS DE BIODEGRADABILIDAD

La mayor parte de sistemas poliméricos conocidos son susceptibles de degradación en condiciones más o menos severas, que pueden variar sustancialmente de unos sistemas a otros. De forma general, se pueden considerar dos tipos de procesos:

I. Aquellos que se inician mediante la absorción de algún tipo de energía, lo que origina el desarrollo y propagación de la degradación molecular mediante reacciones secundarias. Las condiciones ambientales necesarias para que se produzcan estos procesos incluyen temperaturas elevadas especialmente en presencia de oxígeno para dar lugar a procesos termooxidativos, radiaciones electromagnéticas, tensiones mecánicas a elevadas temperaturas y vibraciones ultrasónicas.

II. Mecanismos puramente hidrolíticos que dan lugar a la fragmentación de las cadenas macromoleculares, lo que normalmente ocurre con polímeros que contienen heteroátomos en la cadena principal. Para ello, el polímero debe poseer enlaces hidrolíticamente inestables y debe ser hidrofílico para que el proceso biodegradativo se produzca en un tiempo razonable.

3.2.2.3. FACTORES QUE INFLUYEN EN LA BIODEGRADABILIDAD

Los factores que influyen en la velocidad de degradación son:

- Condiciones del medio: temperatura, humedad, pH...
- Características del polímero: presencia de enlaces químicos susceptibles a la hidrólisis, estereoquímica, peso molecular, superficie específica, temperatura de transición vítrea y de fusión, presencia de monómero residual o aditivos, distribución de la secuencia, etc.
- Características de los microorganismos: cantidad, variedad, fuente, actividad, etc.

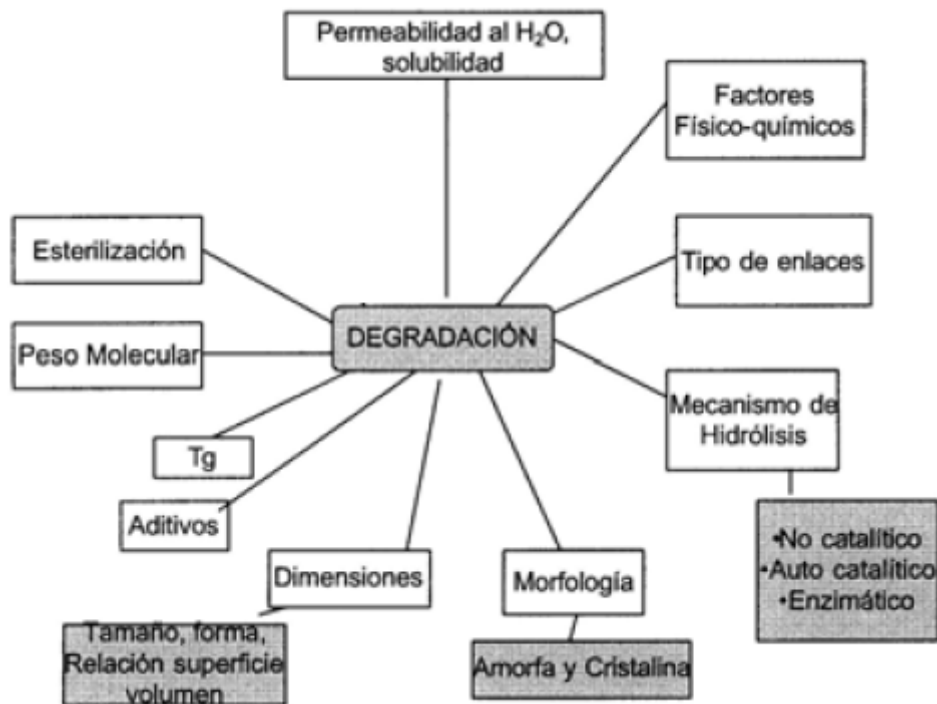


FIGURA 5. DIAGRAMA DE LOS FACTORES QUE INTERVIENEN EN LA DEGRADACIÓN DE UN POLÍMERO

3.2.2.4. CARACTERÍSTICAS QUE INFLUYEN EN LA DEGRADACIÓN ENZIMÁTICA

- **Características físicas que influyen en la degradación enzimática**

La degradación enzimática tiene lugar preferentemente en las regiones amorfas y, una vez se han consumido, se inicia la degradación de la zona cristalina. Esta selectividad observada se atribuye a una disposición menos ordenada de las moléculas en las zonas amorfas que permite la penetración de los enzimas en el polímero.

También se tienen datos de la influencia del grado de **reticulación** en muestras de policaprolactona, observándose que al aumentar el grado de entrecruzamiento radicalario se reduce la degradabilidad. Esto es debido a que se limita la movilidad de las cadenas poliméricas y, por tanto, la accesibilidad de los enzimas.

- **Características químicas que influyen en la degradación enzimática**

En general, los factores relacionados con la estructura del estado sólido (factores físicos) influyen en la velocidad en que tienen lugar los procesos de biodegradación, mientras que la estructura química determina la capacidad de degradación.

Los principales factores relacionados con la constitución química del polímero que afectan a la biodegradabilidad son:

a) Presencia de **enlaces hidrolizables**: polímeros que contengan grupos amida, urea, uretano o éster a lo largo de la cadena.

b) **Flexibilidad** de la cadena: los polímeros más flexibles pueden adaptarse mejor al centro activo del enzima.

c) Presencia de **grupos laterales**: polímeros que contengan grupos benzílicos, fenílicos, hidroxílicos o carboximetílicos en los grupos laterales, ya que muchos enzimas proteolíticos catalizan específicamente la hidrólisis de los enlaces peptídicos adyacentes a grupos sustituyentes.

d) Carácter **hidrófilo/hidrófobo** del polímero: deben poseer segmentos de los dos tipos debido a que las reacciones catalizadas por enzimas tienen lugar en medios acuosos.

3.2.3. ASPECTOS A TENER EN CUENTA EN EL DISEÑO DE MATERIALES BIODEGRADABLES

El conocimiento de los factores mencionados anteriormente permite saber el tipo de modificaciones químicas que deben efectuarse en un polímero para facilitar su biodegradación y también para aumentar su velocidad. Además es necesario seguir los dos siguientes criterios: asegurar la **estabilidad** estructural y funcional del material durante el procesado, almacenaje y uso, y garantizar la **no toxicidad** de los productos de degradación generados.

Por otra parte, es importante recalcar que cuanto más bajo sea el peso molecular de un polímero, la degradación será más rápida. Para los polímeros con mayor peso molecular, la combinación de grupos funcionales fotosensibles e hidrolizables hace más efectiva la degradación medioambiental.

3.2.4. CLASIFICACIÓN DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES

Atendiendo a su origen los polímeros biodegradables pueden clasificarse en distintas categorías:

- Polímeros naturales

- Polisacáridos: Unidades básicas de azúcar unidas mediante enlaces glucosídicos. Hidrolizables abióticamente y por enzimas. Ejemplos: almidón, celulosa...

- Proteínas: Poliamidas naturales formadas por la unión de aminoácidos.
Ejemplos: lana, seda, colágeno...

- Polímeros naturales modificados: Preparados mediante la modificación biológica y/o química, como el acetato de celulosa o los polialcanoatos, de los cuales destaca el copolímero polihidroxibutirato/valerato (PHBHV).

- Materiales compuestos: Combinan partículas biodegradables (por ejemplo, el almidón) con polímeros sintéticos biodegradables (por ejemplo, el copolímero de almidón y alcohol vinílico).

- Polímeros sintéticos.

3.2.5. POLÍMEROS BIODEGRADABLES DE USO COMERCIAL

Los polímeros biodegradables son un nuevo campo emergente. Recientemente se han sintetizado un número considerable de polímeros biodegradables, al mismo tiempo que se han identificado varios microorganismos y enzimas capaces de degradarlos. Atendiendo a la constitución química, los polímeros biodegradables de mayor uso comercial pueden clasificarse en tres categorías.

- La primera categoría corresponde a **polímeros naturales derivados de carbohidratos**.

El *almidón* es un termoplástico natural de carácter fuertemente hidrófilo, de bajo coste y alta disponibilidad; el principal inconveniente que presenta es que se hincha y deforma con mucha facilidad en ambientes medianamente húmedos, por lo que no puede utilizarse sólo aunque sí en mezclas con polietileno (Ecostar), con polietileno y otros poliésteres (Ecolan), con derivados del petróleo de bajo peso molecular (Novon), con policaprolactona (Greenpol), etc.

Otro de los polímeros naturales empleado gracias a su gran abundancia es la *celulosa*, ya que su principal inconveniente (no puede ser digerida por los tejidos) puede subsanarse mediante alteraciones químicas que modifiquen su estructura altamente ordenada; se puede citar como ejemplo el acetato de celulosa (elevada resistencia a la tensión) y la celulosa oxidada (contiene una porción sustancial de funciones carboxílicas y se utiliza para gasas estériles).

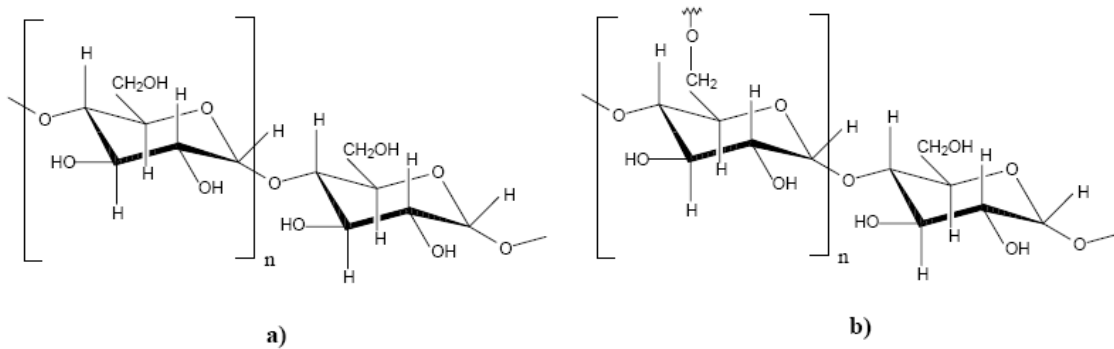


FIGURA 6. LA AMILOSA A) Y LA AMILOPECTINA B), CONSTITUYENTES DEL ALMIDÓN

La celulosa es el polímero más abundante en la naturaleza, de forma que tanto ella como sus derivados han sido ampliamente estudiados sobre todo para usos biomédicos. Se pueden citar como ejemplo el acetato de celulosa (AC), que se caracteriza por su elevada resistencia a la tensión, y la celulosa oxidada (Oxycel Surgical), aplicada en gasas estériles.

- Los **poliésteres** constituyen el segundo grupo en importancia.

Su interés como biomateriales radica en que los enlaces éster son degradables hidrolíticamente. Se encuentran dentro de este grupo los *polihidroxicanoatos*, la *policaprolactona* y los *ácidos poliglicólico y poliláctico*. Los poliésteres biodegradables tienen aplicación en el campo de la medicina (básicamente como **suturas quirúrgicas**), en agricultura, en envasado y en la fabricación de bolsas en las que se recoge el material que debe ser comportado.
- En el último grupo puede mencionarse el **alcohol polivinílico (PVOH)** y su copolímero con etileno (PEVOH).

A continuación (Figura 7) se muestran las estructuras químicas de algunos de los polímeros biodegradables de mayor uso comercial:

En la siguiente tabla se muestran las principales propiedades de algunos de los polímeros biodegradables que se acaban de mencionar:

	Almidón	AC	PHA	PVOH	PEVOH
Tg (°C)	230	190	-50 ± 5	58 – 85	72
Tm (°C)	220 – 240	230 – 250	54 – 175	180 – 240	191
Td (°C)	220	-	-	-	240
Resistencia a la tensión (MPa)	-	17 – 50	40	40 – 50	72
Elongación (%)	Sin ensayar	10 – 30	-	300 – 400	200
Difusión de O₂ (cm³/m² día)	Sin ensayar	-	45	0.1 – 2	0.2
Factores influyentes	Relación de amilasa y amilopeptina	Grado de sustitución	Longitud de la cadena lateral y composición de copolímero	Peso molecular y porcentaje de hidrólisis	Porcentaje de etileno
Ventajas	Bajo coste y biodegradación rápida	Resistencia a la tensión	Biodegradación rápida y estabilidad al agua	Biodegradación rápida y baja permeabilidad	Dureza y baja permeabilidad
Inconvenientes	Hidrofilicidad	Grado de sustitución	Elevado coste	Solubilidad en agua	Lenta biodegradación
Aplicaciones potenciales	Espumas para empaquetar, bolsas de abono vegetal	Moldeado por inyección	Laminados de papel	Pesticidas, fertilizantes, dispersadores de detergentes	Empaquetado de alimentos

TABLA 3. PRINCIPALES PROPIEDADES DE POLÍMEROS BIODEGRADABLES DE USO COMERCIAL

En la tabla siguiente, (Tabla 4), se recogen los nombres comerciales de algunos polímeros biodegradables presentes en el mercado.

PRODUCTO	COMPAÑÍA	CONSTITUYENTES
1. Basado en productos naturales		
AMIPOL [®]	Japan Cornstarch	Almidón (100%)
BIOFIL [®]	Samyang Genex Co.	Almidón, poliestireno
GREENPOL [®]	Yukong Ltd.	Almidón, policaprolactona
MATER-BI [®]	Novamont	Almidón (60%), alcohol polivinílico
NOVON [®]	Chisso Warner Lambert	Almidón (90-95%), aditivos
2. Producido por microorganismos		
BIOPOL [®]	Monsanto Co.	Poli(hidroxibutirato), poli(hidroxivalerato)
3. De naturaleza sintética		
BAK1095 [®] BAK2195 [®]	Bayer Bayer	Ácido adípico, ϵ -caprolactama, butanodiol Ácido adípico, hexametildiamina, butanodiol, etilenglicol
BIONOLLE [®]	Showa Highpolymer Co.	Ácido adípico, ácido succínico, etilenglicol, butanodiol
DEXON [®]	Davis & Geck, Inc.	Poliglicólico
MONOCRYL [®]	Ethicon, Inc.	Policaprolactona/poliglicólico
PDS [®]	Ethicon, Inc.	Poli(<i>p</i> -dioxanona)
PLA	Cargill Shimadzu	Poliláctico
ELVANOL [®]	DuPont	Alcohol polivinílico
VICRYL [®]	Ethicon, Inc.	Poliláctico/poliglicólico

TABLA 4. POLÍMEROS BIODEGRADABLES DE USO COMERCIAL

3.3. ENVASES DE PLÁSTICO DEGRADABLES

Se define un envase plástico degradable como aquel que está constituido por un material plástico tal que permite mantener completamente la integridad física durante su manufactura, posterior almacenamiento, envasado, vida en estantería y uso por parte del consumidor, pero que, al final de su vida útil es desechado y comienza a cambiar químicamente por influencia de agentes ambientales, que lo transforman en sustancias simples ó en componentes menores que eventualmente se asimilan al medio ambiente.

Si esos agentes son de tipo biológico (hongos, algas, bacterias, fundamentalmente) el envase pasa a denominarse, *envase plástico biodegradable*.

Como cualquier material degradable en la naturaleza, la biodegradación podrá verificarse en medio aerobio y en medio anaerobio.

- Reacción tipo en medio aerobio

Polímero + O₂ + microorganismos → CO₂ + H₂O + SO₂ + NO₂ + biomasa + calor

- Reacción en medio anaerobio

Polímero + bacterias anaerobias → CO₂ + CH₄ + SH₂ + NH₃ + residuo + calor

De lo descrito hasta aquí, de los distintos mecanismos de degradación, así como de la propia procedencia del polímero, los envases de plásticos degradables, por tanto, pueden clasificarse de la siguiente forma predominante en que actúa el medio. Téngase en cuenta, además, la fina línea que separan unos de otros, aunque el resultado final sea el mismo, fruto de combinaciones de todos los factores ambientales:

- Envases biodegradables
- Envases compostables
- Envases oxo-degradables
- Envases fotodegradables
- Envases solubles en agua
- Envases biodesintegrables

3.3.1. ENVASES DE PLÁSTICOS BIODEGRADABLES

Son envases capaces de desarrollar una descomposición aeróbica ó anaeróbica por acción de microorganismos tales como bacterias, hongos y algas bajo condiciones que naturalmente ocurren en la biosfera. Son degradados por acción enzimática de los microorganismos bajo condiciones normales del medio ambiente.

Se corresponden a envases fabricados con polímeros procedentes de:

a) Fuentes naturales. Son polímeros naturales, fácilmente disponibles, extraídos de animales marinos o vegetales. Algunos ejemplos son los polisacáridos (almidón, celulosa) y las proteínas (caseína, gluten).

b) Síntesis química clásica a partir de monómeros biológicos renovables. El mejor ejemplo es el ácido poliláctico (PLA), un biopoliéster obtenido a partir de monómeros de ácido láctico.

c) De microorganismos o bacterias modificadas genéticamente. Los principales polímeros de este grupo son los polihidroxicanoatos (PHAs). Son bioplásticos producidos directamente por las bacterias que desarrollan gránulos de un plástico llamado Polihidroxicanoato (PHA) dentro de la célula misma. La bacteria se desarrolla y reproduce en un cultivo y el material plástico luego se separa y purifica.



FOTOGRAFÍA 1. MUESTRAS DE PHB EXTRAÍDO DE CULTIVOS BACTERIANOS (Almeida et al., 2004)

d) Provenientes del petróleo, pero biodegradables. Como por ejemplo, la policaprolactona (PCL) que es un poliéster alifático que es verdaderamente biodegradable sin el requerimiento previo de la fotodegradación.

En ambiente de compost la policaprolactona es asimilada totalmente por los microorganismos y la velocidad de degradación depende de varios factores tales como espesor de la muestra, humedad, temperatura, oxígeno, etc.

Otras mezclas de poliésteres biodegradables son:

- Almidón + PET modificado
- Almidón + PCL (policaprolactona)
- Almidón+PBS (polibutileno succinato)/PBSA (polibutileno succinato adipato)
- Almidón + PVOH (polivinil alcohol)
- PLA (ácido poliláctico) + PHA (polihidroxi alcianoato)

Los poliésteres juegan un papel predominante como plásticos biodegradables debido a su potencialmente hidrolizable grupo éster. Como se muestra en la siguiente figura (Figura 8), la familia de los poliésteres está formada por dos grupos principales: poliésteres alifáticos (lineales) y poliésteres aromáticos (anillos). Los poliésteres biodegradables que han sido desarrollados comercialmente son:

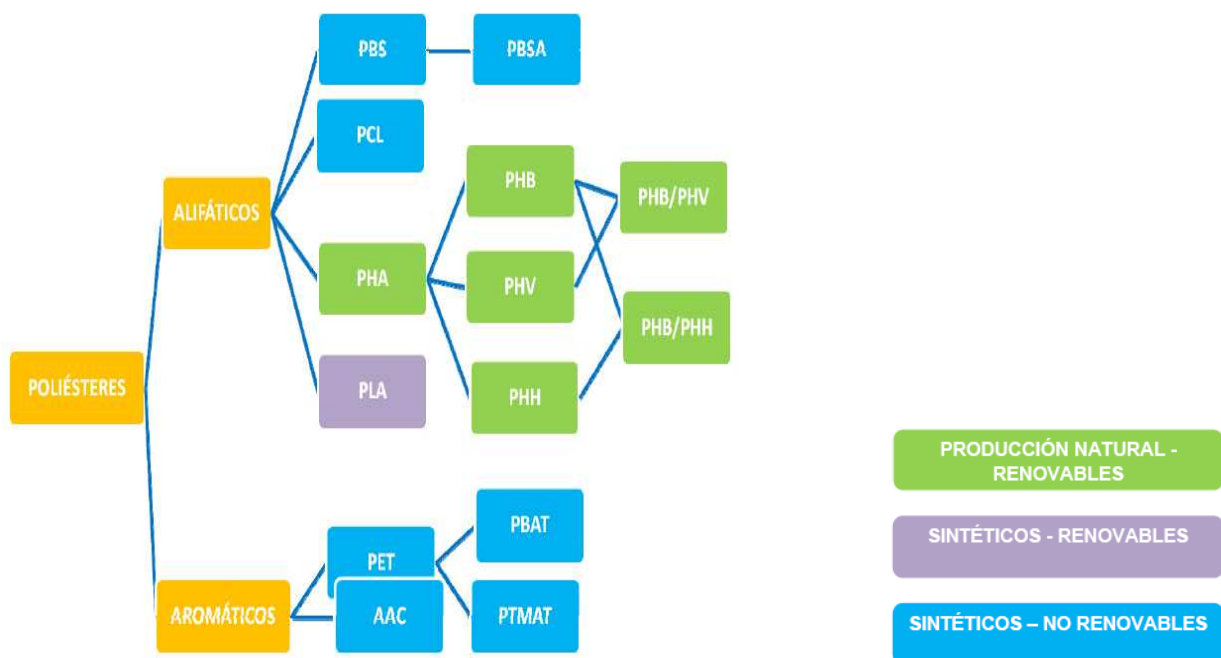


FIGURA 8. FAMILIA DE LOS POLIÉSTERES BIODEGRADABLES.

Mientras los poliésteres aromáticos como el PET muestran excelentes propiedades como material, han demostrado ser casi totalmente resistentes al ataque microbiano, los poliésteres alifáticos son fácilmente biodegradables, pero carecen de las propiedades mecánicas que son críticas para la mayor parte de usos. Todos los poliésteres se degradan tarde o temprano mediante hidrólisis (la degradación inducida por agua) que es el mecanismo dominante.

Los poliésteres alifáticos sintéticos son sintetizados a partir de dioles y ácidos dicarboxílicos vía reacción de polimerización-condensación, y se sabe que son completamente biodegradables en el suelo y el agua. Estos poliésteres alifáticos son, sin embargo, mucho más caros y carecen de la fuerza mecánica comparada con plásticos convencionales como el polietileno. Muchos de estos poliésteres se mezclan con polímeros de almidón, como se ha comentado anteriormente, para hacer plásticos biodegradables con un coste más competitivo. Los poliésteres alifáticos tienen mejor resistencia a la humedad que los almidones, que tienen muchos grupos hidroxilos.

3.3.2. ENVASES DE PLÁSTICO COMPOSTABLES

Se define como “envase compostable” a aquel que es biodegradable, generando básicamente dióxido de carbono, agua, y humus, a una velocidad similar a la de los materiales orgánicos sencillos (por ejemplo la celulosa) y que no deja residuos tóxicos ni visibles.

Existe normativa en la Unión Europea, como la Norma EN 13432 en vigencia desde enero de 2005, entre otras, que permite certificar los plásticos compostables y los envases fabricados a partir de éstos, de forma tal que el consumidor pueda distinguirlos fácilmente. La certificación y el etiquetado de los bioplásticos como biodegradables / compostables, permitiría tratar estos materiales post-consumo junto con la fracción orgánica (restos de comida, poda, papeles) de los residuos sólidos urbanos en plantas de compostaje.

3.3.3. ENVASES DE PLÁSTICO OXO-DEGRADABLES

Se definen como aquellos envases degradables fabricados con polímeros que desarrollan la descomposición mediante un proceso de etapas múltiples usando aditivos químicos para iniciar la degradación. La primera etapa de degradación puede ser iniciada por la luz ultravioleta (UV) de la radiación solar, calor y/o tensión mecánica que inician el proceso de degradación por oxidación. De esta manera se reduce el peso molecular del polímero debido a la ruptura de las cadenas moleculares quedando un remanente con suficientemente bajo peso molecular que sería susceptible de desarrollar un proceso de biodegradación con el tiempo.

Aunque esta tecnología y sus productos no son nuevos, desde su aparición en el mercado en los años 80 han surgido muchas dudas con respecto a si son verdaderamente biodegradables según las normas internacionales de biodegradación. Asimismo existen dudas de que los residuos que quedan tras la degradación tengan efectos tóxicos para el medio ambiente provocado por residuos metálicos con potencial toxicidad. Otra desventaja adicional de los polímeros oxobiodegradables es que si se reciclan mezclados con polímeros comunes éstos se tornan degradables con lo que se impide su reciclado a usos de larga duración como tubos, cables, postes, y otros productos.

3.3.4. ENVASES DE PLÁSTICO FOTO-DEGRADABLES

Son envases que comienzan a degradarse por la acción de los rayos ultravioleta de la radiación solar de tal manera que pierden resistencia y se fragmentan en partículas diminutas. La fotodegradación (desintegración) no implica biodegradación, pero sí es un paso previo para el conjunto de los polímeros degradables.

Todos los plásticos de uso comercial en envasado son fotodegradables por naturaleza misma del polímero, en mayor o menor grado. Este proceso se basa en que la energía de la luz ultravioleta procedente de la luz solar es mayor que la energía de unión de los enlaces moleculares C-C y C-H y por lo tanto rompen las cadenas moleculares reduciendo su peso molecular y propiedades mecánicas. Como ejemplo práctico tenemos que una película de polietileno común con un espesor medio se degrada completamente (se desintegra) al estar sometida continuamente a la luz solar durante los meses máxima radiación, primavera, verano y otoño. Cabe señalar que desde la década del 70 existen patentes de aditivos que agregados al polietileno aceleran la foto degradación considerablemente, reduciendo el período de degradación a solo semanas de exposición al sol.

3.3.5. ENVASES DE PLÁSTICO HIDROSOLUBLES

Son materiales que se solubilizan en presencia de agua, usualmente dentro de un rango específico de temperatura y luego se biodegradan mediante la acción de los microorganismos. Pueden ser de origen natural como los polisacáridos por ejemplo el almidón y la celulosa ó de origen sintético ó petroquímico como el alcohol polivinílico ó copolímeros de acrilamida con derivados del ácido acrílico.

3.3.6. ENVASES DE PLÁSTICO BIODESINTEGRABLES

Son materiales compuestos que están constituidos por una mezcla de una parte orgánica biodegradable con poliolefinas por ejemplo mezclas de almidón con polietileno, polipropileno y sus copolímeros, etc. Los microorganismos metabolizan y biodegradan la fracción orgánica (almidón) mientras que la fracción polimérica queda sin atacar con lo cual la fracción de poliolefina no sufre cambios importantes.

Estos materiales no son plásticos biodegradables propiamente dicho y a pesar que se conocen desde la década del 70 no son usados comercialmente. Se han producido bolsas de comercio con mezclas de polietileno con almidón que no han tenido éxito comercial debido a que el agregado del almidón reduce significativamente todas las propiedades físico-mecánicas con lo cual se debe aumentar mucho el espesor de la bolsa con el consecuente aumento del costo. Existen empresas que venden concentrado (Masterbatch) de polímero con almidón que se agregan durante la extrusión de la película ó inyección de artículos diversos para transformarlos en biodesintegrables. Una desventaja adicional de esta técnica es la gran sensibilidad del almidón a la humedad (higroscópico) lo que hace que deban tomarse precauciones especiales durante la transformación para evitar defectos provocados por la humedad del polímero. Desde el punto de vista de la "contaminación", se percibe que no son una mejora al problema, por dejar ese residuo sintético sin degradar.

Como resumen, se incluye a continuación una tabla esquema que recoge las principales propiedades y aplicaciones de los polímeros biodegradables más destacados (*Tabla 5*).

	PROPIEDADES	APLICACIONES	PROCESADO	ELIMINACIÓN	PROVEEDORES
ALMIDÓN	Propiedades mecánicas similares a plásticos convencionales. Resistente a grasas y alcoholes	Menaje, envasado de alimentos, cuidado personal, bolsas de basura, etc.	Inyección y extrusión-soplado, termoformado	Compostable	Novamont, Bistec GmbH, Nacional Starch & Chemical
CELULOSA	Posibilidad de transparente, translucido y opaco. Frágil en congelación. Buen aislante.	Asas de cubiertos, bolígrafos, recubrimientos, etc.	Inyección	Biodegradable	Mazzuccheli 1849
PROTEINAS	Resistente. No tóxico.	Botones, cajas, asas.	Inyección	Reciclado	Universal Textile Technologies, Biopolymer
PHAs	Posibilidad de combinar hasta 100 monómeros diferentes.	Menaje, cuchilla de afeitar (PHA), botella de champú (PHBV).	Soplado, inyección y extrusión.	Compostaje, degradación en agua.	Metabolix (Biopol), P & G.
PLA	Claridad, buena estética (brillo). Frágil, requiere aditivos.	Films y materiales de envase. Fibras.	Inyección, soplado, extrusión.	Reciclaje, compostaje o incineración.	Cargill Dow LLC, Nestle Corp.
PCL	Buena resistencia al agua, aceite y disolventes; bajo punto de fusión, baja viscosidad.	Resinas para recubrimientos adhesivos, bolsas, fibras.		Compostaje	Solvay, Union Carbide.
COPOLÍMEROS ALIFÁTICOS-AROMÁTICOS	Combina las propiedades del PET con la biodegradabilidad de los poliésteres alifáticos.	Bolsas, menaje y recipientes.	Inyección, soplado, extrusión.	Degradación por hidrólisis, reciclaje, compostaje o incineración.	DuPont

TABLA 5. POLÍMEROS BIODEGRADABLES Y MEJOR SISTEMA DE GESTIÓN SEGÚN SU FABRICANTE

Capítulo 4

PARTE EXPERIMENTAL I.

ENSAYO RESPIROMÉTRICO EN MEDIO ACUOSO

En este capítulo se describe la metodología utilizada para realizar la determinación de la biodegradabilidad de la muestra polimérica a ensayar. El ensayo realizado se basa en el método establecido por la Norma UNE-EN ISO 14852 para la determinación de la biodegradabilidad de materiales plásticos en medio acuoso (ensayo respirométrico).

4.1. INTRODUCCIÓN

Con este método de ensayo se realiza la determinación de la biodegradabilidad de un material plástico. Está basado en la Norma UNE-EN ISO 14852, *Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final de materiales plásticos en medio acuoso*.

Siguiendo la norma antes citada, se especifica un método basado en la medición de la cantidad de dióxido de carbono generado, para la determinación del grado de biodegradación aeróbica de los materiales plásticos, incluyendo aquellos que contienen aditivos en su formulación. El material de ensayo se expone en un medio sintético bajo condiciones de laboratorio a un inóculo procedente de compost de RSU. El método permite la evaluación de la biodegradabilidad y se puede complementar mediante el cálculo del balance de carbono del sistema.

El método se puede aplicar a los siguientes materiales: polímeros naturales y/o sintéticos, copolímeros o mezclas de ellos; materiales plásticos que contienen aditivos como plastificantes, colorantes u otros compuestos; polímeros solubles en agua y materiales que, bajo condiciones de ensayo, no inhiben la presencia de microorganismos en el inóculo.

Se ha aplicado el método para la determinación de la biodegradabilidad sobre dos muestras diferentes:

→ **ENSAYO 1.** El polímero ensayado es una muestra de polietileno de alta densidad que contiene aditivos para facilitar su biodegradación. El ensayo tiene como objetivo el comprobar si el funcionamiento del sistema experimental es correcto. Se trata, por tanto, de una prueba previa al ensayo a realizar.

→ **ENSAYO 2.** La muestra ensayada se compone de una mezcla homogénea de distintos tipos de polietileno de alta densidad con contenido en aditivos, al igual que la muestra utilizada en el ensayo 1. La particularidad de esta muestra es que ha sido degradada previamente mediante radiación ultravioleta, lo que en teoría facilita su biodegradación durante el ensayo. El objetivo de esta parte experimental es calcular la biodegradabilidad de esta muestra.

4.2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO

La biodegradabilidad del material plástico se determina utilizando microorganismos aeróbicos en un sistema acuoso. La mezcla de ensayo contiene un medio inorgánico, el material de ensayo orgánico (única fuente de carbono y energía) con una concentración entre 100 mg/l y 2000 mg/l de carbono orgánico, y un lodo activado o, como en este caso, una suspensión de tierra activa o compost como inóculo. La mezcla se agita en los frascos de ensayo y se airea con aire libre de dióxido de carbono durante un periodo de tiempo que depende de las cinéticas de biodegradación y que no debe ser superior a seis meses. En este caso, el tiempo de ensayo para la muestra estudiada ha sido de aproximadamente 5 semanas.

El dióxido de carbono generado durante la degradación microbiana se determina mediante un método analítico adecuado, que en este caso ha sido una volumetría. El nivel de biodegradación se determina por comparación de la cantidad generada de dióxido de carbono con la cantidad teórica ($ThCO_2$) y se expresa en porcentaje. El resultado del ensayo debe ser el nivel de biodegradación máximo, determinado a partir de la fase de estancamiento de la curva de biodegradación.

Opcionalmente, se puede realizar un balance de carbono para dar información adicional de la biodegradación.

4.3. REACTIVOS Y SOLUCIONES UTILIZADAS

4.3.1. PREPARACIÓN DEL MEDIO DE ENSAYO

La Norma ISO 14852 propone dos medios de ensayo de composición diferente según el propósito del ensayo. Si se pretende simular un medio natural se emplea un medio de ensayo normalizado, mientras que si se analiza un material con concentraciones altas, se emplea un medio de ensayo optimizado. El medio de ensayo optimizado tiene una mayor capacidad de tamponamiento y es más rico en nutrientes inorgánicos.

En este caso se utiliza el medio de ensayo normalizado ya que se pretende simular un medio natural para determinar el grado de biodegradación del material plástico objeto de ensayo.

La preparación del medio de ensayo se realizará mezclando:

- 10 ml de solución A
- 1 ml de las soluciones B, C y D

y enrasando a 1 L con agua destilada.

Solución A.

- Dihidrógeno fosfato de potasio anhidro (KH_2PO_4) = 4.25 g
- Hidrógeno fosfato de potasio anhidro (K_2HPO_4) = 10.875 g
- Hidrógeno fosfato de sodio dihidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) = 16.7 g
- Cloruro de amonio (NH_4Cl) = 0.25 g

en agua destilada y enrasando hasta completar un volumen de 500 ml.

Solución B.

Se disuelven 2.25 g de sulfato de magnesio heptahidratado ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada y se enrasa hasta completar un volumen de 100 ml.

Solución C.

Se disuelven 3.64 g de cloruro de calcio dihidratado ($\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada y se enrasa hasta completar un volumen de 100 ml.

Solución D.

Se disuelven 0.025 g de cloruro de hierro (III) hexahidratado ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) en agua destilada y se enrasa hasta completar un volumen de 100 ml.

4.3.2. SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE BARIO

La solución de hidróxido de bario utilizada para recoger el CO_2 generado en los reactores tendrá una concentración de 0.0125 mol/l. Para su preparación, se toman 3.94 gramos de $\text{Ba}(\text{OH})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ y se disuelven en 1 L de agua destilada.

La solución presenta un aspecto turbio y es fácil la precipitación del hidróxido de bario disuelto en ella. Se utiliza tanto en la serie de frascos que recogen el dióxido de carbono generado en los reactores como en los frascos indicadores colocados tras las trampas de hidróxido de sodio.

4.3.3. SOLUCIÓN DE ÁCIDO CLORHÍDRICO

Esta solución es la utilizada en la valoración de los frascos que recogen el CO₂. El ácido clorhídrico debe tener una concentración de 0.05 mol/l. Para su preparación se parte de ácido clorhídrico 0.6 N. Se toman 83 ml de este ácido y se llevan a un volumen de 1 L añadiendo agua destilada.

4.3.4. SOLUCIÓN DE HIDRÓXIDO DE SODIO

Se utiliza para absorber el CO₂ del aire que entra al sistema. Para asegurar que todo el CO₂ queda atrapado en ella, la solución alcalina es muy concentrada. Se utilizará una solución de NaOH de concentración 1 M. Para su preparación se toman 40g de hidróxido y se diluyen en 1 litro de agua destilada.

4.4. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

4.4.1. MONTAJE DEL SISTEMA EXPERIMENTAL

El material necesario para realizar el montaje del sistema utilizado en el ensayo es:

- 2 borboteadores de aproximadamente 200 mm de altura.
- 9 borboteadores: 2 indicadores en la trampa de CO₂, 6 como borboteadores de recogida del CO₂ generado y el restante como botella de referencia.
- 2 recipientes. Utilizados como reactores.
- tubo impermeable al gas.
- 2 grifos reguladores de caudal.
- 2 difusores de gas. Utilizados en la trampa de CO₂.
- Caudalímetro
- Material necesario para realizar valoraciones.

Los recipientes necesarios se sitúan en serie como se muestra en la figura, divididos en dos líneas: una correspondiente a la muestra a estudiar y otra para el recipiente utilizado como blanco. Todo está conectado a través de tubos impermeables al gas. Se hace pasar un caudal de aproximadamente 250 ml/min de aire libre de CO_2 a través de cada línea. Este caudal se regula mediante un controlador de caudal adecuado.

En la siguiente figura, se representa el esquema para una de las líneas (se repite de la misma forma para la otra).

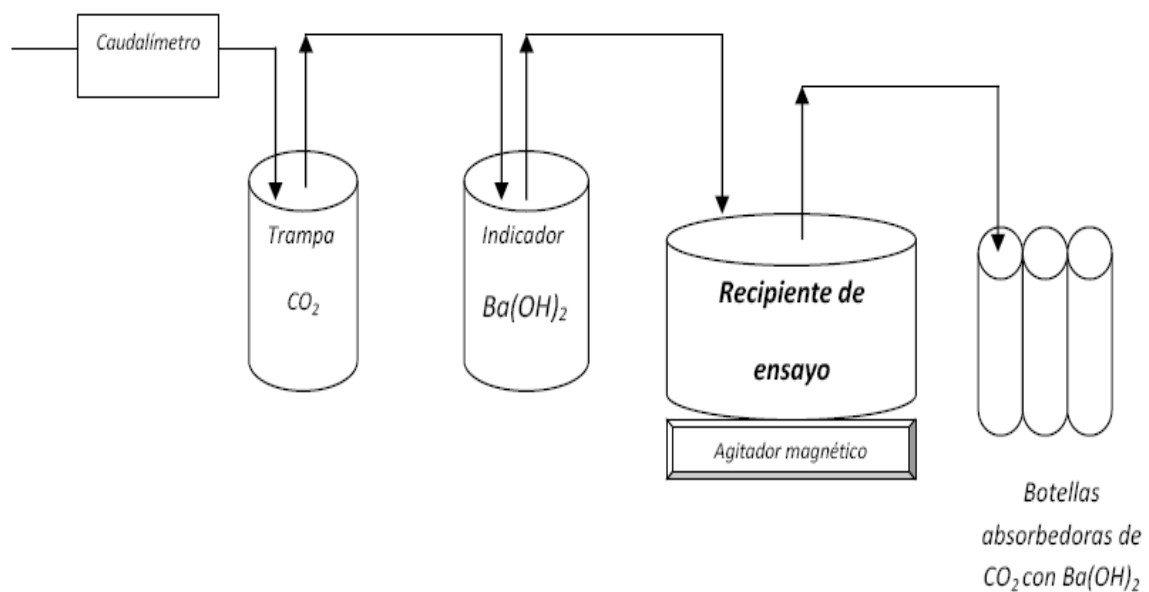


FIGURA 9. ESQUEMA DEL MONTAJE EXPERIMENTAL PARA ENSAYO RESPIROMÉTRICO

El sistema se divide en varias partes las cuales se describen a continuación:

.- Parte I. Distribución y regulación del caudal.

El montaje experimental estará dividido en dos líneas: una primera para la muestra a ensayar y otra utilizada como blanco.

Distribución del caudal de entrada al sistema → La línea de suministro de aire se divide en tres antes de entrar al sistema:

- Una de las líneas cumple la función de escape, lo que nos permite que el sistema esté presurizado y además se evitan sobrepresiones que se puedan producir debido a obstrucciones o contratiempos en las líneas.

- Las dos líneas restantes suministran caudal a los biorreactores. En cada una de ellas, y antes de las trampas de CO₂, se coloca un grifo regulador que nos permite ajustar el caudal de borboteo.

Debido a la configuración del montaje experimental del ensayo, resulta difícil una regulación precisa del caudal que entra al sistema debido a las pérdidas de carga que se producen en los distintos componentes. Aún así se ha intentado mantener un caudal constante e igual en ambos reactores.

.- Parte II. Trampa de CO₂.

El aire que entra al sistema debe ser libre de CO₂. Para eliminar el gas, se coloca al inicio de cada línea una trampa de CO₂ que utiliza una solución de NaOH de concentración 1 N para absorber el dióxido de carbono. Se hace pasar el aire a través de un borboteador que contiene aproximadamente 450 ml de la solución anterior en la que quedará atrapado el CO₂ del aire.

Para mejorar la distribución del gas en el líquido se colocan difusores de gas en el borboteador. De esta forma se consigue un tamaño de burbuja mucho menor lo que hace que el contacto entre el líquido y el gas sea más eficiente y por tanto se favorece la absorción. También influye en la absorción del gas las dimensiones del borboteador: a mayor altura, aumenta el tiempo de contacto gas-líquido y se mejora la difusión.

A continuación se coloca una botella con solución de Ba(OH)₂ que actúa como indicador de la posible presencia de dióxido de carbono en el aire a la salida de la trampa de CO₂. El dióxido de carbono que escapa a la trampa de CO₂ queda absorbido en el hidróxido de bario, asegurándonos de esta forma su total eliminación del aire que será introducido en los biorreactores.

.- Parte III. Recipientes de ensayo (Biorreactores).

Tras la trampa de CO₂, son colocados los recipientes de ensayo. En ellos se borbotea aire libre de CO₂ para proporcionar el oxígeno necesario para el desarrollo de los microorganismos aerobios responsables de la biodegradación de la muestra.

Como consecuencia de la degradación del polímero de ensayo, se genera CO₂ que será necesario recoger y cuantificar para determinar el porcentaje de biodegradación.

.- Parte IV. Recogida del CO₂ generado.

Se colocan, por cada línea, tres borboteadores en serie que actúan como botellas absorbedoras del CO₂ que se haya generado consecuencia de la biodegradación del material polimérico. En cada botella se colocan aproximadamente 80 ml de la solución de hidróxido de bario 0.0125 M.

Se realizará una valoración periódica de las soluciones absorbedoras para determinar el CO₂ generado por el sistema.

En la siguiente fotografía se muestra el sistema experimental utilizado.



FOTOGRAFÍA 2. MONTAJE EXPERIMENTAL UTILIZADO EN EL ENSAYO DE BIODEGRADABILIDAD

4.4.2. PUESTA EN MARCHA

Una vez realizado el montaje del sistema experimental, se realiza la puesta en marcha del ensayo siguiendo las siguientes indicaciones.

- 1) Se colocan las trampas de CO₂ iniciales. Para ello se añaden 450 ml de solución de hidróxido de sodio 1 N a los borboteadores descritos anteriormente. Se conecta cada borboteador a una de las líneas de aire.
- 2) Se coloca una botella absorbidora por línea con 80 ml de Ba(OH)₂ de concentración 0.0125M en cada una. Actuarán como indicador de

la presencia o no de CO₂ en el aire que se suministra a los reactores y, junto con los borboteadores, formarán las trampas de CO₂.

- 3) Se realiza la preparación del inóculo, tal y como se describe más adelante, y se añade a los reactores. El volumen total en cada uno de ellos será de 3 L.
- 4) Se realiza la preparación del polímero, tal y como se describe a continuación, y se añade a los reactores. Se conectan los indicadores de la trampa de CO₂ directamente a los reactores.
- 5) Con el objetivo de purgar el CO₂ que haya en este momento en el sistema, se pone en marcha el sistema haciendo pasar aire por él (sin conectar las botellas absorbedoras finales) y dejando escapar a la atmosfera el aire a la salida de los biorreactores. Se consigue así purgar el sistema de CO₂ y disminuir los errores que se puedan cometer al comenzar la toma de datos.
- 6) Tras los reactores, se disponen, por cada línea, tres botellas absorbedoras colocadas en serie con 80 ml de solución de hidróxido de bario 0.0125 M en cada una. Se conectan a los reactores haciendo borbotear en ellas el aire procedente de ellos, de tal forma que el CO₂ que se genere quede absorbido en la solución alcalina que contienen.
- 7) Por último, se conecta el sistema al suministro de aire a presión y se regula el caudal hasta conseguir un borboteo que debe ser constante e igual en ambas líneas. En este caso, el caudal de aire es, aproximadamente de 250 ml/min.

A continuación, se explica cómo realizar la preparación, tanto del inóculo como de la muestra de polímero a analizar.

➤ **Preparación del inóculo**

El inóculo necesario para este ensayo se puede preparar a tanto a partir de lodo activado procedente de una planta de tratamiento de aguas residuales domésticas como a partir de tierra y suspensiones de compost. Si se fuera a determinar la biodegradación en un sistema de tratamiento de aguas específico, se recogería el inóculo procedente de ese medio ambiente. En este ensayo en concreto se utilizó una suspensión de compost maduro procedente del tratamiento de RSU.

Por tanto, el inóculo estará formado por una mezcla de medio de ensayo y una solución preparada a partir de compost. El volumen de inóculo en cada reactor es de 3L.

- *Solución a partir de compost de RSU.* Se toman 10 g de compost procedente de RSU y se suspenden en 100 ml de medio de ensayo. Se deja sedimentar durante unos 30 minutos. Posteriormente se decanta y filtra el líquido sobrenadante a través de un filtro de poros gruesos.

Se añaden a cada reactor 150 ml de extracto y se completa hasta un volumen de 3 L con medio de ensayo, formando así el inóculo encargado de la biodegradación del polímero. De esta forma se obtiene una concentración del 5% (v/v) de extracto de compost en medio de ensayo.

➤ **Preparación de la muestra de ensayo**

Según la norma que regula el ensayo, se debe utilizar una concentración del material de ensayo de forma que el contenido en TOC sea al menos de 100 mg/l. Considerando tal concentración, y sabiendo que el volumen de inóculo en cada reactor es de 3L y que el polímero tiene una fracción molar de carbono del 85%, la cantidad de muestra a ensayar es:

$$100 \text{ mg/l} \cdot 3\text{L} \cdot 100/85 \approx 356 \text{ mg de muestra}$$

Para asegurar que el TOC no es inferior a 100 mg/l, la cantidad de muestra en cada ensayo es de 0.5 g.

La norma establece que el material de ensayo debe ser utilizado preferiblemente en forma de polvo, pero puede también introducirse en forma de películas, piezas, fragmentos o artículos de diferentes formas. El estilo y la forma del material de ensayo pueden influir en su biodegradabilidad. En este caso se llevó a cabo la preparación de las muestras cortando el plástico a ensayar en fragmentos muy pequeños, con tamaño lo más homogéneo posible.

En la siguiente fotografía se puede ver la muestra utilizada en el ensayo 2.



FOTOGRAFÍA 3. MUESTRA UTILIZADA EN EL ENSAYO 2

4.4.3. OPERACIÓN DEL ENSAYO Y TOMA DE DATOS

La duración de los ensayos 1 y 2 fue de 12 y 32 días respectivamente. Durante este tiempo se realizó diariamente la determinación del dióxido de carbono generado por los dos reactores. A partir de estas mediciones se obtienen los datos de CO₂ generado con los que se realiza el cálculo de la biodegradabilidad de la muestra.

➤ *Operación*

Como ya se dijo anteriormente, se realiza la determinación periódica de dióxido de carbono generado por el sistema. Para ello, se siguen los siguientes pasos:

1.- Se interrumpe el suministro de aire al sistema mediante los grifos situados en cabeza de cada una de las líneas.

2.- Para una de las líneas, se toman cuatro muestras de 20 ml: una de cada botella absorbadora y una del indicador de la trampa de CO₂.

3.- Se realiza la valoración con ácido clorhídrico (el método se describe más detenidamente a continuación) de cada muestra tomada. Se determina así el CO₂ absorbido en cada botella. Se realiza la misma operación para la otra línea.

4.- Se reponen las botellas absorbadoras y la botella indicador de ambas líneas con 80 ml de solución de hidróxido de bario.

La solución de hidróxido de bario se preparará cada día asegurando así una mínima absorción de CO₂ de la atmósfera.

5.- Se realiza la valoración de una alícuota del hidróxido de bario preparado ese día y utilizado para reponer las botellas absorbadoras.

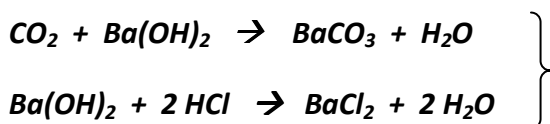
Se coloca una botella con 80 ml de esta solución (la cual no está conectada a la línea de aire) que se valora al día siguiente. Esto nos sirve para cuantificar si la solución de hidróxido de bario absorbe CO₂ de la atmosfera por sí sola. Si fuera así, habría que tenerlo en cuenta en la determinación del CO₂ generado por el sistema.

6.- Periódicamente, se desecha la solución de NaOH de las trampas de CO₂ y se reponen con solución nueva. Es importante evitar que la solución se sature en CO₂. En este caso se reponían cada 2 días.

➤ **Método valorimétrico para la determinación de CO₂ utilizando Ba(OH)₂**

El dióxido de carbono producido se determina mediante un método valorimétrico utilizando hidróxido de bario.

El CO₂ producido es arrastrado por el caudal de aire hacia las botellas absorbedoras y reacciona con el hidróxido de bario (Ba(OH)₂), precipitando como carbonato de bario. La cantidad de CO₂ generado se determina por valoración del Ba(OH)₂ sobrante con HCl.



Solución de Ba(OH)₂ -- En primer lugar se prepara la solución de hidróxido de bario: se disuelven 3.94 gramos de Ba(OH)₂ · 8H₂O en agua desionizada o destilada y se enrasa a 1000 ml para obtener una solución de 0.0125 mol/l. A continuación, se filtra de materiales sólidos y se determina la concentración exacta mediante valoración con una solución de HCl patrón, utilizando fenolftaleína como indicador. Se almacena la solución en un frasco sellado para evitar la absorción de CO₂ del aire.

Solución de HCl -- Se diluyen 50 ml de solución 1 mol/l de HCl (36.5 g/l) en 1 litro de agua destilada obteniendo una solución de 0.05 mol/l.

Al inicio del ensayo se colocan 80 ml de solución de Ba(OH)₂ en cada una de las tres botellas absorbedoras (se puede modificar este volumen en función de la cantidad de dióxido de carbono generada).

Periódicamente se extrae el contenido de las botellas para la valoración de una alícuota de cada una. Cuanto mayor sea la cantidad de carbonato formado mayor será la turbidez de la solución básica.

Después de retirar cada botella se sella con un tapón hasta su valoración para evitar que la solución pueda absorber CO_2 de la atmosfera. Se realiza la valoración de 2 o 3 alícuotas de solución de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ con la solución de HCl preparada y se anotará el volumen de ácido consumido.

En función del volumen de ácido consumido, la siguiente ecuación nos permitirá calcular el CO_2 absorbido en la botella:

$$\text{masa } \text{CO}_2 = \left(\frac{2 \cdot c_B}{c_A} - V_A \cdot \frac{V_{Bt}}{V_{BZ}} \right) \cdot c_A \cdot 22$$

donde:

m = masa de CO_2 atrapada en la botella (mg)

c_A = concentración del HCl (mol/l) c_B = concentración del $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (mol/l)

V_{B0} = volumen inicial de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ en la botella (ml)

V_{Bt} = volumen final de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ en la botella (ml)

V_{BZ} = volumen de $\text{Ba}(\text{OH})_2$ valorado (ml)

V_A = volumen de HCl utilizado en la valoración (ml)

Capítulo 5

CÁLCULOS Y RESULTADOS I

En este capítulo se recogen los resultados obtenidos en el ensayo de biodegradabilidad descrito en el capítulo número 4.

5.1. CÁLCULOS

5.1.1. FÓRMULAS UTILIZADAS

5.1.1.1. CANTIDAD TEÓRICA DE CO₂ GENERADO POR EL MATERIAL DE ENSAYO

Se calcula la cantidad teórica de dióxido de carbono (ThCO₂) generado, expresada en miligramos, utilizando la siguiente ecuación:

$$ThCO_2 = m \cdot X_c \cdot \frac{44}{12} = 500 \cdot 0.85 \cdot \frac{44}{12} = 1558.3 \text{ mg} \quad (A)$$

donde:

- *m*: masa del material de ensayo introducido en el sistema de ensayo, en mg.
- *X_c*: es el contenido en carbono del material de ensayo, determinado mediante la fórmula química o calculado a partir de un análisis elemental y expresado como una fracción másica.
- 44 y 12 son las masas moleculares de dióxido de carbono y carbono.

5.1.1.2. PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN A PARTIR DE LA EVOLUCIÓN DEL CO₂

A partir de la cantidad acumulada de dióxido de carbono generada en ambos reactores, se calcula el porcentaje de biodegradación (*D_t*) para los frascos de ensayo para cada intervalo de medición utilizando la ecuación (B). Los resultados se presentan en el siguiente punto de forma tabulada.

$$D_t = \frac{(CO_2)_T - (CO_2)_B}{ThCO_2} \cdot 100 \quad (B)$$

donde:

- (*CO₂*)_T: cantidad de CO₂ generado en el reactor de ensayo.
- (*CO₂*)_B: es la cantidad de CO₂ generado en el frasco que actúa como blanco.
- *ThCO₂* : cantidad teórica de CO₂ generado por el material de ensayo, expresada en miligramos.

5.1.2. RESULTADOS OBTENIDOS

A continuación, se presentan los valores obtenidos a partir de las medidas experimentales realizadas a lo largo del ensayo. Las tablas siguientes, contienen los datos de CO₂ determinado en cada botella absorbadora, el CO₂ total generado en ese intervalo y el CO₂ total acumulado durante el ensayo.

Medida	Fecha	Hora	T _{BORBOT} (h)	Σ T _{BORBOT} (h)	CO ₂ Trampa (mg)	CO ₂ A (mg)	CO ₂ B (mg)	CO ₂ C (mg)	CO ₂ botella referencia (mg)	CO ₂ TOTAL (mg)	mg CO ₂ / hora (intervalo)	Σ CO ₂ generado (mg)	mg (CO ₂)/hora (acumulado)
Inicio	15.06.2011	12:00 h	--	0	--	--	--	--	--	--	0	--	0
1	16.06.2011	18:00 h	30	30	2,2	7,92	4,4	5,72	--	18,04	18,04	0,601	0,601
2	17.6.2011	12:00 h	18	48	0	4,4	2,2	4,4	--	11	29,04	0,611	0,605
3	20.6.2011	10:00 h	70	118	4,84	5,72	3,96	3,96	--	13,64	42,68	0,195	0,362
4	21.6.2011	17.00	31	149	2,64	3,96	1,32	3,08	0,88	8,36	51,04	0,270	0,343
5	22.6.2011	10.00	17	166	2,2	4,84	3,52	2,64	0,88	11	62,04	0,647	0,374
6	23.6.2011	18.00 h	32	198	0	3,96	2,2	2,2	0,88	8,36	70,4	0,261	0,356
7	27.6.2011	12:00 h	90	288	0,88	6,6	3,52	3,96	0	14,08	84,48	0,156	0,293

TABLA 6. CANTIDAD DE CO₂ PRUEBA 1 – REACTOR MUESTRA

Medida	Fecha	Hora	T_{BORBOT} (h)	ΣT_{BORBOT} (h)	CO_2 Trampa (mg)	$CO_2 A$ (mg)	$CO_2 B$ (mg)	$CO_2 C$ (mg)	CO_2 botella referencia (mg)	CO_2 TOTAL (mg)	$mg CO_2 / hora$ (intervalo)	ΣCO_2 generado (mg)	$mg (CO_2) / hora$ (acumulado)
Inicio	15.06.2011	12:00 h	--	0	--	--	--	--	--	--	0	0,000	0,000
1	16.06.2011	18:00 h	30	30	2,2	4,4	3,96	5,72	--	14,08	14,08	0,469	0,469
2	17.6.2011	12:00 h	18	48	2,2	4,4	2,2	3,08	--	9,68	23,76	0,538	0,495
3	20.6.2011	10:00 h	70	118	8,36	5,72	4,4	3,96	--	14,08	37,84	0,201	0,321
4	21.6.2011	17:00 h	31	149	1,32	5,72	3,52	3,52	0,88	12,76	50,6	0,412	0,340
5	22.6.2011	10:00 h	17	166	3,08	4,84	3,08	4,84	0,88	12,76	63,36	0,751	0,382
6	23.6.2011	18:00 h	32	198	0	3,52	0,88	1,32	0,88	5,72	69,08	0,179	0,349
7	27.6.2011	12:00 h	90	288	3,52	7,92	4,84	4,84	0	17,6	86,68	0,196	0,301

TABLA 7. CANTIDAD DE CO_2 PRUEBA 1 – REACTOR BLANCO

Medida	Fecha	Hora	T _{BORBOT} (h)	Σ T _{BORBOT} (h)	CO ₂ Trampa (mg)	CO ₂ A (mg)	CO ₂ B (mg)	CO ₂ C (mg)	CO ₂ botella referencia (mg)	CO ₂ TOTAL (mg)	mg CO ₂ /hora (intervalo)	Σ CO ₂ generado (mg)	mg (CO ₂)/hora (acumulado)
Inicio	27.06.2011	20:00 h	--	0	--	--	--	--	--	--	0	0	0
1	28.06.2011	17:00 h	21	21	1,76	5,72	3,52	4,84	1,76	14,08	0,6705	14,08	0,67047619
2	29.06.2011	18:00 h	25	46	0,88	6,6	4,84	4,84	0,44	16,28	0,6512	30,36	0,66
3	30.06.2011	18:00 h	24	70	0,88	5,72	3,96	3,96	0,44	13,64	0,5683	44	0,628571429
4	1.07.2011	11:00 h	17	87	1,32	6,6	5,28	5,72	1,32	17,6	1,0353	61,6	0,708045977
5	4.07.2011	18:00 h	79	166	2,2	5,72	4,4	4,84	3,52	14,96	0,1894	76,56	0,461204819
6	5.07.2011	18:00 h	24	190	2,64	7,92	3,52	4,4	3,08	15,84	0,6600	92,4	0,486315789
7	6.07.2011	18:00 h	24	214	3,96	2,2	4,84	3,96	2,64	11	0,4583	103,4	0,48317757
8	7.07.2011	19:00 h	25	239	0	5,72	3,96	4,4	1,32	14,08	0,5632	117,48	0,491548117
9	8.07.2011	18:00 h	23	262	0	4,4	2,2	1,32	3,52	7,92	0,3443	125,4	0,478625954
10	11.07.2011	12:00 h	64	326	0	0	0	0	0	0	0,0000	125,4	0,384662577
11	12.07.2011	18:00 h	30	356	2,64	7,04	2,64	5,72	3,96	15,4	0,5133	140,8	0,395505618
12	13.07.2011	18:00 h	24	380	0,88	7,04	7,04	6,16	3,08	20,24	0,8433	161,04	0,423789474
13	14.07.2011	18:00 h	24	404	0,88	7,92	4,84	5,72	3,96	18,48	0,7700	179,52	0,444356436
14	15.07.2011	13:00 h	19	423	0,44	5,28	2,64	4,84	4,4	12,76	0,6716	192,28	0,454562648
15	18.07.2011	18:00 h	77	500	2,64	6,16	6,16	5,28	1,76	17,6	0,2286	209,88	0,41976
16	19.07.2011	17:00 h	23	523	2,64	5,28	3,96	5,72	2,2	14,96	0,6504	224,84	0,429904398
17	20.07.2011	17:00 h	24	547	0,88	14,08	9,68	8,8	6,6	32,56	1,3567	257,4	0,470566728
18	21.07.2011	17:00 h	24	571	3,08	13,2	9,24	8,36	6,6	30,8	1,2833	288,2	0,504728546
19	22.07.2011	11:00 h	18	589	2,2	11,88	10,12	6,16	6,6	28,16	1,5644	316,36	0,537113752
20	25.07.2011	17:00 h	78	667	2,2	14,08	9,24	6,6	2,2	29,92	0,3836	346,28	0,51916042
21	26.07.2011	17:00 h	24	691	0,88	7,04	3,08	2,64	0,44	12,76	0,5317	359,04	0,51959479
22	27.07.2011	18:00 h	25	716	3,52	7,48	5,28	7,48	5,72	20,24	0,8096	379,28	0,52972067
23	28.07.2011	18:00 h	24	740	7,48	11	10,56	9,68	2,2	31,24	1,3017	410,52	0,554756757

TABLA 8. CANTIDAD DE CO₂ PRUEBA 2 – REACTOR MUESTRA

Medida	Fecha	Hora	T _{BORROT} (h)	Σ T _{BORROT} (h)	CO ₂ Trampa (mg)	CO ₂ A (mg)	CO ₂ B (mg)	CO ₂ C (mg)	CO ₂ botella referencia (mg)	CO ₂ TOTAL (mg)	mg CO ₂ /hora (intervalo)	Σ CO ₂ generado (mg)	mg (CO ₂)/hora (acumulado)
Inicio	27.6.2011	20:00 h	--	0	--	--	--	--	--	0	0,0000	0	0
1	28.6.2011	17:00 h	21	21	0,88	5,28	3,08	3,96	1,76	12,32	0,5867	12,32	0,586666667
2	29.6.2011	18:00 h	25	46	1,76	4,84	4,4	4,84	0,44	14,08	0,5632	26,4	0,573913043
3	30.6.2011	18:00 h	24	70	0,44	5,28	3,96	4,84	0,44	14,08	0,5867	40,48	0,578285714
4	1.7.2011	11:00 h	17	87	1,76	4,84	3,96	3,96	1,32	12,76	0,7506	53,24	0,611954023
5	4.07.2011	18:00 h	79	166	0	7,04	4,84	6,16	3,52	18,04	0,2284	71,28	0,42939759
6	5.07.2011	18:00 h	24	190	2,2	7,92	5,72	6,16	3,08	19,8	0,8250	91,08	0,479368421
7	6.07.2011	18:00 h	24	214	0	2,64	2,64	3,08	2,64	8,36	0,3483	99,44	0,464672897
8	7.07.2011	19:00 h	25	239	0,44	4,84	3,52	3,52	1,32	11,88	0,4752	111,32	0,465774059
9	8.07.2011	18:00 h	23	262	0	2,2	0,88	2,2	3,52	5,28	0,2296	116,6	0,445038168
10	11.07.2011	12:00 h	64	326	0	0	0	0	0	0	0,0000	116,6	0,357668712
11	12.07.2011	18:00 h	30	356	2,64	6,6	3,08	3,52	3,96	13,2	0,4400	129,8	0,364606742
12	13.07.2011	18:00 h	24	380	4,4	7,48	5,72	6,16	3,08	19,36	0,8067	149,16	0,392526316
13	14.07.2011	18:00 h	24	404	3,08	7,92	5,72	6,16	3,96	19,8	0,8250	168,96	0,418217822
14	15.07.2011	13:00 h	19	423	3,08	6,16	7,04	7,92	4,4	21,12	1,1116	190,08	0,449361702
15	18.07.2011	18:00 h	77	500	4,4	6,16	5,72	6,6	1,76	18,48	0,2400	208,56	0,41712
16	19.07.2011	17:00 h	23	523	0,88	4,4	3,08	5,28	2,2	12,76	0,5548	221,32	0,423173996
17	20.07.2011	17:00 h	24	547	0,88	9,68	7,04	3,96	6,6	20,68	0,8617	242	0,442413163
18	21.07.2011	17:00 h	24	571	0,88	15,84	11	8,8	6,6	35,64	1,4850	277,64	0,486234676
19	22.07.2011	11:00 h	18	589	4,4	10,12	7,48	7,92	6,6	25,52	1,4178	303,16	0,514702886
20	25.07.2011	17:00 h	78	667	1,76	11,88	9,24	8,8	2,2	29,92	0,3836	333,08	0,499370315
21	26.07.2011	17:00 h	24	691	0,44	4,4	3,52	3,08	0,44	11	0,4583	344,08	0,497945007
22	27.07.2011	18:00 h	25	716	4,4	8,36	7,04	7,92	5,72	23,32	0,9328	367,4	0,513128492
23	28.07.2011	18:00 h	24	740	7,04	10,12	9,24	9,24	2,2	28,6	1,1917	396	0,535135135

TABLA 9. CANTIDAD DE CO₂ PRUEBA 2 – REACTOR BLANCO

Con los datos recogidos en las tablas anteriores y utilizando las ecuaciones (A) y (B) se obtiene el grado de biodegradación del polímero. Los resultados obtenidos para el ensayo número 2 son los siguientes:

ENSAYO 2

Medida	Fecha	Dt (%)	Σ Dt (%)
Inicio	27.06.2011	0,000	0,000
1	28.06.2011	0,113	0,113
2	29.06.2011	0,141	0,254
3	30.06.2011	0,000	0,254
4	1.07.2011	0,311	0,565
5	4.07.2011	0,000	0,565
6	5.07.2011	0,000	0,565
7	6.07.2011	0,169	0,734
8	7.07.2011	0,141	0,875
9	8.07.2011	0,169	1,045
10	11.07.2011	0,000	1,045
11	12.07.2011	0,141	1,186
12	13.07.2011	0,056	1,242
13	14.07.2011	0,000	1,242
14	15.07.2011	0,000	1,242
15	18.07.2011	0,000	1,242
16	19.07.2011	0,141	1,384
17	20.07.2011	0,762	2,146
18	21.07.2011	0,000	2,146
19	22.07.2011	0,169	2,315
20	25.07.2011	0,000	2,315
21	26.07.2011	0,113	2,428
22	27.07.2011	0,000	2,428
23	28.07.2011	0,169	2,598

TABLA 10. VALORES DE BIODEGRADACIÓN PRUEBA 2

5.2. INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS Y CONCLUSIONES

A continuación se muestran los resultados y conclusiones obtenidos a partir del ensayo de biodegradabilidad número 2.

5.2.1. GENERACIÓN DE CO₂ EN LOS REACTORES

Con el fin de comparar el CO₂ generado en el reactor de ensayo con el generado en el reactor blanco, se representa la cantidad de CO₂ acumulado durante el ensayo 2 frente al tiempo.

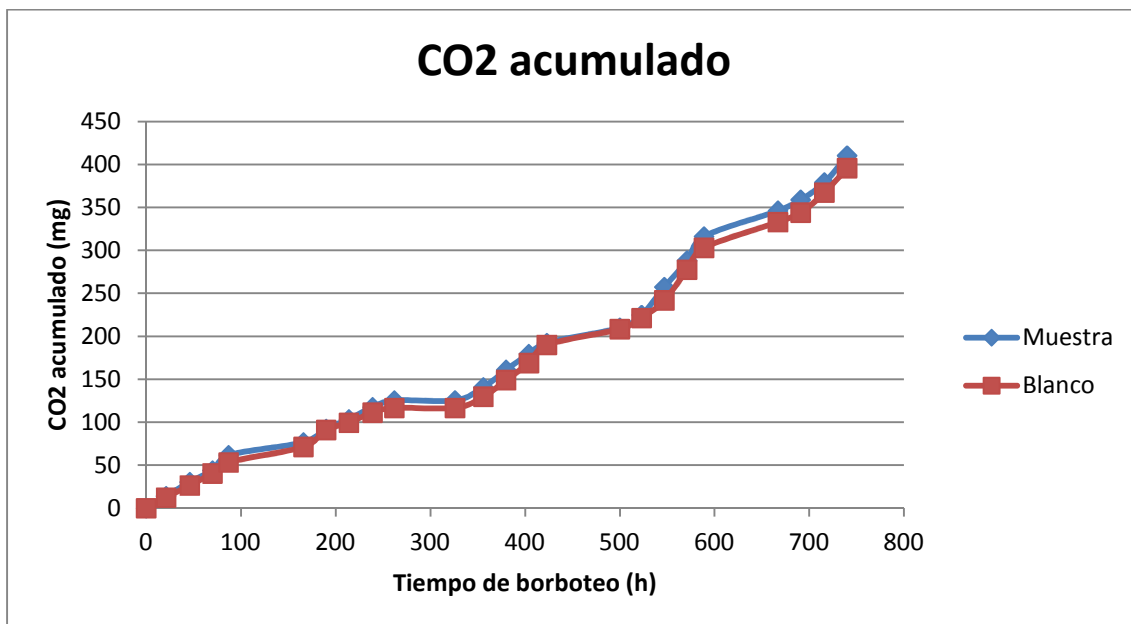


FIGURA 10. COMPARACIÓN DEL CO₂ TOTAL ACUMULADO EN AMBOS REACTORES

- El CO₂ total acumulado a lo largo del ensayo es de 396 mg en el reactor blanco y 410.5 mg en el reactor de ensayo.

- Observamos claramente en la gráfica cómo la cantidad de CO₂ producido es aproximadamente igual en ambos reactores. Esto indica que la biodegradación del polímero en las condiciones de ensayo ha sido baja, y por tanto, la cantidad de dióxido de carbono aportada por éste no es significativa respecto a la cantidad que produce el inóculo por sí mismo.

5.2.2. EVOLUCIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE CO₂

La (Figura 11) se muestra la evolución del CO₂ que se genera en los reactores por hora. Se representa el CO₂/hora generado frente al tiempo de ensayo.

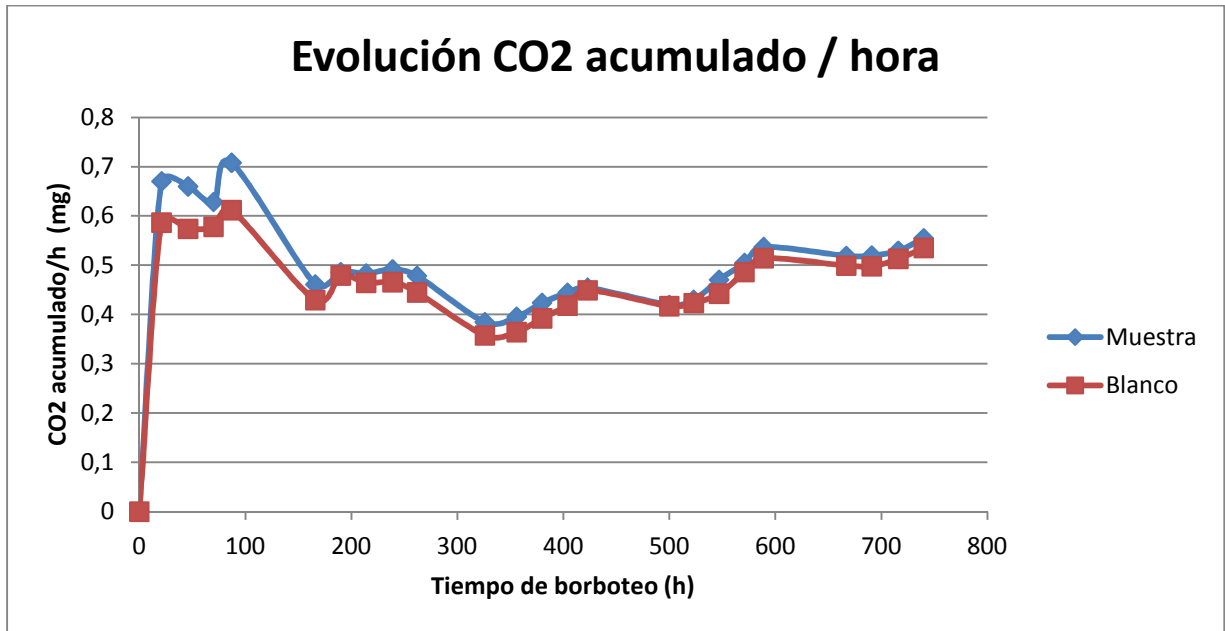


FIGURA 11. EVOLUCIÓN DEL CO₂ ACUMULADO/HORA

En cuanto a la producción de CO₂/h en los reactores podemos afirmar que:

- La evolución que experimenta este parámetro es muy parecida en ambos reactores, en concordancia con lo visto en la *Figura 10*. Se confirma por tanto, que el porcentaje de biodegradación que se espera en el polímero es bajo.

- La producción de CO₂/hora se mantiene aproximadamente estable en torno al rango de valores 0.4-0.5 mg/h. Al final del ensayo se observa una pequeña tendencia al alza.

5.2.3. PORCENTAJE DE BIODEGRADACIÓN

El porcentaje de biodegradación total se ha calculado mediante el sumatorio de los porcentajes de biodegradación parcial para cada intervalo de tiempo. La siguiente gráfica (Figura 12) muestra la evolución de $D_t(\%)$ a lo largo del ensayo 2:

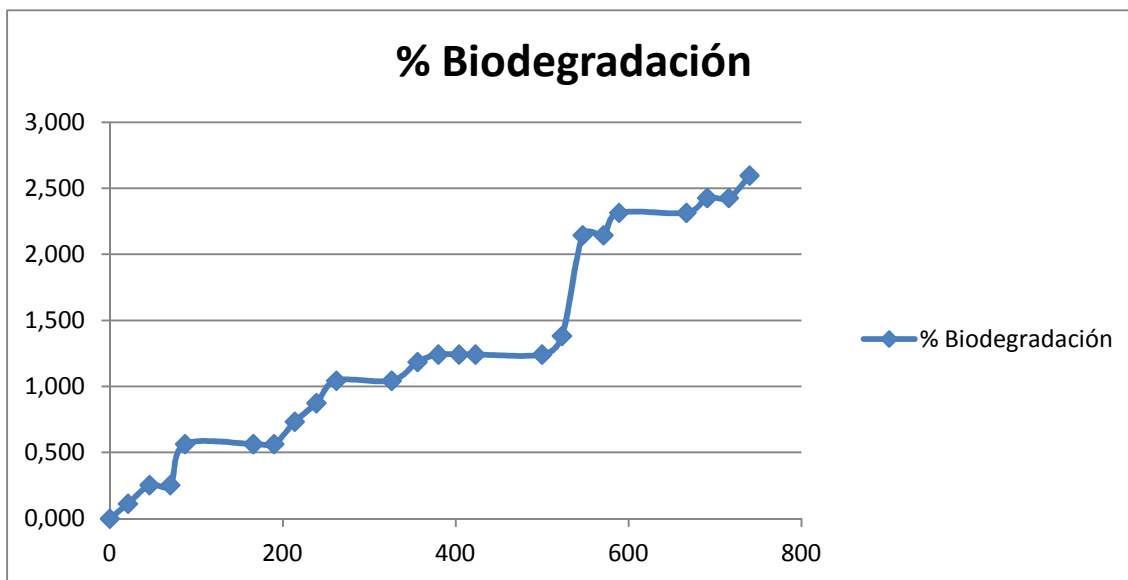


FIGURA 12. %BIODEGRADACIÓN DE LA MUESTRA (ENSAYO 2)

Tras un tiempo de ensayo de aproximadamente 740 horas se obtiene un **porcentaje de biodegradación del 2.598%**, en las condiciones de ensayo establecidas. Se trata de un valor muy bajo, teniendo en cuenta que la muestra utilizada en el ensayo había sido degradada previamente mediante radiación ultravioleta (lo que debería haber facilitado su degradación).

BLOQUE III: ESTUDIO DE TOXICIDAD

Capítulo 6

ENSAYOS ANALÍTICOS DE ECOTOXICIDAD

*Este capítulo presenta un estudio de los diferentes bioensayos utilizados en el campo de la ecotoxicidad, y en particular del ensayo de bioluminiscencia con *Photobacterium phosphoreum*, debido a sus características de simplicidad, rapidez, sensibilidad y buena correlación con los demás ensayos*

6.1. INTRODUCCIÓN

La ecotoxicidad es una ciencia que nace como unión de otras dos, una reconducionista como la toxicología y otra de gran capacidad predictiva como la ecología.

Se considera un residuo ecotóxico a aquellas sustancias o desechos que si se liberan, tienen o pueden tener efectos adversos inmediatos o retardados en el medio ambiente, debido a la acumulación o a los efectos tóxicos sobre los sistemas bióticos. La ecotoxicidad se define como el estudio de los efectos tóxicos producidos por agentes físicos y químicos en los organismos vivos, especialmente en poblaciones y comunidades dentro de los ecosistemas. Combina la vía de transferencia de las sustancias y su interacción con el medio. Esta definición incluye tanto el destino de los agentes contaminantes en el medio como la exposición a ellos. Los estudios de ecotoxicidad incluyen efectos en las poblaciones de los ecosistemas, sin restringirlos a la toxicidad individual de los organismos.

Los sedimentos son un componente muy importante de los ecosistemas acuáticos. Por un lado, la mayoría de los componentes químicos están asociados a los sedimentos y por otro lado, muchas especies de consumo humano y una gran mayoría de los organismos de la cadena trófica desarrollan la mayor parte de su ciclo de vida viviendo dentro de sobre los sedimentos marinos. Esto da lugar a una vía de transferencia entre el sedimento y los consumidores de especies relacionadas con éste, e incluso puede extenderse a especies de aves y humanos, relacionados de forma indirecta con los sedimentos mediante la ingestión de especies directamente relacionados con él. La transferencia directa de sustancias químicas de los sedimentos a los organismos se considera como una de las mayores rutas de exposición para muchas especies que tienen contacto directo con el sedimento o incluso que forma parte de sus nichos, como es el caso de las especies bentónicas.

6.2. ENSAYOS DE ECOTOXICIDAD. TIPOS DE ENSAYOS

Debido a la gran contaminación que soportan los ambientes acuáticos, se ha hecho necesaria la realización de ensayos que permitan la evaluación del riesgo existente para el ecosistema.

Los ensayos de ecotoxicidad son muy útiles en evaluaciones de impacto ambiental y de peligro químico, debido a que son más económicos y más rápidos que los análisis químicos que se precisarían y su interpretación es más sencilla.

El ensayo de ecotoxicidad más utilizado hasta el presente el “test” de letalidad de peces. La necesidad de pesquerías y de sus posibles limitaciones por la toxicidad existente, condujeron a que fueran los peces los primeros organismos elegidos para llevar a cabo el ensayo de toxicidad en los ríos. Según la Directiva 79/831/CEE, toda la industria química de nueva instalación deberá someterse al ensayo de toxicidad con peces así como al de *Daphnia magna*.

En la búsqueda de nuevos ensayos se han llevado a cabo gran variedad de bioensayo “in vitro” que han sido desarrollados para determinar el riesgo potencial de diversos contaminantes para los ecosistemas acuáticos. Sin embargo, continúa existiendo una gran problemática a la hora de realizar extrapolaciones con los datos experimentales llevados a cabo con determinadas especies, de ahí que se continúe investigando y realizando nuevos modelos que permitan aproximar lo máximo posibles los datos de laboratorio a los datos de campo, es decir, poder llegar a conocer los efectos reales en los ecosistemas en estudio gracias a la utilización de otras especies que permitan de una u otra forma esta extrapolación con el mínimo error.

La mayoría de los estudios de ecotoxicidad van dirigidos a la obtención de información para evaluar el riesgo ecológico. El aumento notable de estos estudios se ha debido al gran número de contaminantes que potencialmente pueden dañar el funcionamiento de los ecosistemas. La experiencia muestra que es mejor y más barato prevenir la posible contaminación de un ecosistema que su posterior recuperación. El objeto de la llamada “calidad ambiental” consiste en ofrecer protección al 95% de las especies del ecosistema en estudio. Debido al pequeño número de especies que son estudiadas y al gran número de ellas que no pueden ser cultivadas o estudiadas en el laboratorio, el porcentaje de especies no protegidas es mayor del deseado.

El riesgo que existe en una comunidad acuática es función de la distribución de las concentraciones medioambientales, de las sustancias a ser evaluadas y del tanto por ciento de especies afectadas por exposición a esas sustancias. No hay que olvidar que la susceptibilidad relativa de las especies depende del tipo de contaminación química estudiado. Así mismo, la toxicidad de los compuestos depende de la especie, de su ciclo de vida, de las condiciones de alimentación, de diversos factores que puedan dar lugar a estrés, así como de la presencia de otros compuestos.

Para obtener buenos resultados se deben conocer previamente las relaciones dosis/respuesta para las diferentes especies afectadas.

Esto implica una gran complejidad, no sólo debido a la variación de los recursos utilizados por las diferentes especies tanto espacial como temporal, sino porque no se pueden reflejar todas las interacciones que se producen en la naturaleza. A nivel biológico, la respuesta va a depender de la sensibilidad del tejido diana y de la dosis que va a desencadenar la respuesta.

Si a esto le añadimos la extrapolación necesaria una vez obtenidos los datos del laboratorio, se pueden apreciar la dimensión del problema al que nos enfrentamos. Se sugiere a menudo que los estudios de campo deben de dar la última respuesta para conocer los efectos adversos en los individuos, poblaciones o ecosistemas, pero dichos estudios dan solo respuestas a preguntas muy concretas y sin embargo, resultan imprescindibles cuando se quiere conocer el comportamiento de los ecosistemas, pero siempre teniendo en cuenta que un estudio de campo en un ecosistema concreto no es representativo de todos los demás.

En la actualidad las medidas de toxicidad más utilizadas se aplican en la evolución de la toxicidad crónica como “ensayo de supervivencia y efectos producidos en el crecimiento y reproducción de los organismo objetos de ensayo”, generalmente macroinvertebrados. Se mide normalmente la tasa de crecimiento y de reproducción en ensayos de periodos de 7 días. El parámetro utilizado es el NOEC o Concentración de Efecto No Observable, es decir el NOEC es la mayor concentración a la que el crecimiento y la reproducción del organismo no se ve afectada por alguno de los compuestos presentes. Las especies utilizadas para estos ensayos son especies de peces sensibles, algas como *Selenastrum sp*, invertebrados como *Neresis vivens*, *Mysidopsis bahía*, *Daphnia magna*; e incluso algún vertebrado bentónico como es caso de anfípodos del genero *Gammarus*, aunque el uso de especies bentónicas para toxicidad crónica no es lo más habitual.

Estos estudios reflejan los efectos reales de las sustancias en estudio sobre las poblaciones implicadas o en los organismos que se utilizan como sustitutos para los ensayos. Sin embargo, tienen un gran coste tanto económico como de tiempo empleado. Existen estudios recientes, donde utilizan estos bioensayos in situ para evaluar la calidad del agua de una zona agrícola. Estos bioensayos suministran información adicional, de apoyo a otras técnicas utilizadas.

Otra forma de medir la toxicidad en los ecosistemas es mediante el ensayo de toxicidad aguada, que conduce a la muerte del 50% de los organismos al final del periodo de tiempo especificados. Para este tipo de estudios se utilizan los bioensayos que se caracterizan por ser realizados en el laboratorio o “in situ” y determinan el efecto que produce la exposición del organismo prueba de la muestra en estudio. El parámetro que se mide es EC_{50} O Concentración Efectiva Media, concentración de la sustancia que se estima causa su efecto específico en el 50% de los individuos expuestos a esa concentración.

Los organismos utilizados son bacterias, invertebrados, crustáceos, o si son ensayos de toxicidad de sedimentos se utilizan invertebrados bentónicos como anélidos, anfípodos o rotíferos.

6.2.1. ENSAYOS BACTERIANOS

Existen diferentes test bacterianos que se describen brevemente a continuación. Son métodos de determinación de la tasa de crecimiento celular o de la actividad metabólica.

6.2.1.1. MÉTODOS DE CRECIMIENTO

Estos métodos determinan la tasa de crecimiento específica. Un pequeño inóculo es introducido en un medio óptimo (control) y la concentración celular se determina entre las 6 y las 16 horas. Se preparan cultivos similares con diferente grado del contaminante en estudio al igual que se hizo con el nutriente en la muestra control. El logaritmo de la concentración celular se toma frente al tiempo.

El porcentaje de inhibición para concentración de la sustancia química se calcula según la siguiente ecuación:

$$I = \left(1 - \frac{\mu_{ql}}{\mu_c}\right) * 100$$

Donde:

μ_c : tasa de crecimiento específico del cultivo control

μ_{ql} : tasa de crecimiento específico del cultivo que contiene la sustancia química a concentración *l*.

El valor de EC₅₀ se obtiene de la interpolación de la curva del logaritmo de la concentración de la sustancia química en estudio frente al porcentaje de inhibición, utilizando normalmente series de 5 concentraciones. Se puede obtener hasta unos límites de confianza del 95%. La concentración celular se mide por peso seco, o más usualmente por turbidez o densidad óptica.

➤ **Ensayo de inhibición de multiplicación celular con *Pseudomona pútrida***

Se ha estandarizado un método en el que un inóculo en su fase logarítmica de crecimiento es inoculado en un medio control. La biomasa producida después de una incubación de 16+1 hora a una temperatura fijadas entre 25-30°C, es medida por turbidez/densidad óptica.

Se incuban al menos 5 concentraciones de la sustancia química prueba en series logarítmicas a la vez que los controles, que no contienen ninguna sustancia química a ser estudiada.

6.2.1.2. MÉTODOS METABÓLICOS

Consisten en ver los efectos a corto plazo de las actividades metabólicas al añadir gradientes de cantidades de la sustancia química en estudio a la mezcla preformada, o cultivos densos con sustrato disponible donde se determinan la tasa de respiración, que es la tasa de eliminación del sustrato, o la fase de formación de productos metabólicos, en un periodo que puede ir desde unos pocos minutos a unas horas.

La tasa de inhibición se mide por comparación de las tasas de respiración o de las actividades enzimáticas obtenidas a varias concentraciones de la sustancia en estudio con respecto al control.

➤ *Ensayo de inhibición de la respiración con lodos activados*

El ensayo consiste en la simulación de lodos activados en presencia de efluentes contaminados. Se lleva a cabo a una temperatura de 20°C. Se utilizan lodos sintéticos junto con las sustancias químicas en estudio que dan lugar a una inhibición entre 0 y 90%, los lodos se colocan en un respirómetro de electrodo de oxígeno midiendo la tasa de disminución del oxígeno disuelto. El grado de inhibición se calcula de las tasas de respiración del control y de las mezclas de las sustancias en estudio. Los valores de EC₅₀ se obtienen a partir de estos datos tal y como se ha descrito anteriormente.

Este método tiene algunas limitaciones pues el lodo es bastante resistente a los compuestos tóxicos teniendo el método por ello, menos sensibilidad que otros. Por otro lado existe una gran variedad de la composición bacteriana dependiendo del lodo, por lo que los resultados no son comparables con otros ensayos de toxicidad.

➤ *Ensayo de la inhibición de la bioluminiscencia con *Photobacterium phosphoreum**

El proceso denominado bioluminiscencia es el fenómeno por el que se produce la emisión de luz por átomos o moléculas que se encuentran en estado de excitación electrónica y que son producidas por un organismo vivo.

La luz en este caso va asociada a la respiración metabólica de la bacteria. Una disminución de la bioluminiscencia indicará una disminución de la respiración celular.

En términos generales, la toxicidad de una muestra se expresa como la concentración de muestra que produce un determinado efecto biológico en el organismo prueba. El caso del ensayo de luminiscencia, el parámetro biológico que se determina es la disminución de la luz emitida por las bacterias. La disminución de la luz emitida por las bacterias en presencia de la muestra en estudio, indica un efecto adverso a la muestra problema.

Photobacterium phosphoreum se caracteriza por poseer una intensa emisión de luz, estabilidad de emisión y alta sensibilidad a un amplio espectro de compuestos diferentes. El control de la temperatura y salinidad es muy crítico pues afecta a la bioluminiscencia, igualmente se pueden producir interferencias debidas a la turbidez causada por la partículas en suspensión.

6.2.1.3. ENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA

➤ *Ensayo de Mytilus edules (mejillón)/Crasotrea gigas (ostra)*

Los ensayos de toxicidad aguda utilizan normalmente moluscos bivalvos (ostra o mejillón) en un estado embrionario determinado denominado "D". Se emplean generalmente para ensayos de toxicidad aguda a pequeña escala. La medida realizada es la proporción de óculos fecundados que se desarrollan en el estado embrionario "D" en presencia del material en estudio en un rango de concentraciones dadas. Los datos obtenidos se expresan como PNR (porcentaje de respuesta neta) según la siguiente ecuación:

$$PNR = \frac{(\%anomalía\ test - \%anomalía\ control) * 100}{100 - \%anomalía\ en\ el\ control}$$

Se obtiene un 50% de respuesta por análisis estadísticos del rango de concentraciones ensayado. A partir de ahí se obtiene EC₅₀ para 24 horas. El nivel de aceptación depende de la autoridad reguladora.

➤ *Ensayo de Daphnia magna*

Para obtener medidas de ecotoxicidad se deben de incluir valores de EC₅₀ obtenidos con ensayos del crustáceo *D. magna* como especie representativa de los invertebrados.

Este valor se basa en la inmovilización del organismo problema calculado después de la exposición al residuo bajo condiciones de laboratorio por un período máximo de 48 horas. Se evalúan los efectos potenciales de esa sustancia química en el crecimiento y reproducción de *D. magna*.

Debido a los diferentes estudios realizados anteriormente se vio que *D. magna* era una especie caracterizada por ser sensible a un amplio rango de estructuras químicas, y los resultados estaban muy cercanos a los obtenidos con los ensayos de letalidad en peces. El cultivo de *D. magna*, así como su transporte, es fácil al contrario que su mantenimiento que precisa cuidados importantes.

6.2.1.4. ENSAYO DE TOXICIDAD SUBCRÓNICOS O CRÓNICOS

Los ensayos de toxicidad subcrónicos o crónicos se caracterizan por ser de mayor duración, utilizándose animales macroscópicos. Hasta ahora, la elección de las especies dependía de las preferencias nacionales, pero cada vez más se buscan procedimientos únicos unificados. Los ensayos de toxicidad crónica son importantes cuando evalúan el impacto ambiental de los efluentes, dado que las descargas de determinados residuos tienden a ser continuas durante periodos prolongados de tiempo.

Se realizaron ensayos con sustancias tóxicas con la dioxina TCDD (2,3,7,8-tetraclorodibenceno-p-dioxina) considerada uno de los contaminantes conocidos más peligrosos, debido a que esta dioxina no es soluble en agua y que se absorbe en partículas orgánicas; por ello se eligió una especie filtradora sedentaria como el mejillón para realizar los ensayos. De esta forma la materia insoluble puede ser tomada por ingestión a partir de la columna de agua.

Cuando se evalúa la toxicidad de sedimentos marinos se utilizan especies típicas como *Nereis vivens*, *Mysidopsis bahia*, o *Echinocardium cordatum* (erizo de mar).

➤ Ensayo de *Artemia salina*

Artemia salina es un crustáceo caracterizado por habitar zonas muy salinas por razones ecológicas. En determinadas condiciones ambientales pueden estar en forma de huevos en reposo que bajo condiciones secas mantienen su viabilidad. Esto es aprovechado para la distribución del organismo en esta forma, de manera que no es necesario su cultivo en el laboratorio. En el bioensayo, el parámetro utilizado es la mortalidad de las larvas (considerando como muertas si no presentan ningún movimiento ni interno ni externo en 10 segundos de observación).

Debido a que no se encuentra en el mar o en estuarios, muchos investigadores se oponen a que sea considerado un organismo “marino” e incluido como posible representante del medio marino. Su uso potencial no es descartado y se utiliza en baterías de toxicidad.

➤ **Ensayo de *Brachionus calyflorus***

En este bioensayo el parámetro a medir es la variación de la reproducción y supervivencia del rotífero de la especie *B. calyflorus* en contacto con el compuesto en estudio. Los organismos se presentan en forma de huevos dormidos, que en 24 horas pueden estar las larvas preparadas para ser utilizadas. Esto evita tener un criadero de laboratorio.

Se utilizan en toxicidad acuática aunque no excesivamente. Su uso es debido a que en medios acuáticos, los rotíferos intervienen en procesos ecológicos importantes. Forman parte del zooplancton, son filtrados y se alimentan del fitoplancton y de bacterias. Ejercen por ello una gran presión sobre aquellos organismos de los que se alimentan y a su vez son una fuente de alimento importante para las larvas y muchos peces, entre otros, que se alimentan de zooplancton.

➤ **Ensayo de *Mysidopsis bahia***

Los camarones juveniles son expuestos al efluente durante un periodo de siete días. Se controla su supervivencia, la ganancia de peso (crecimiento) y su fertilidad (%de hembras con huevos). Los resultados se expresan como NOEC (Concentración de Efecto No Observable). Las especies pertenecientes al género *Mysidopsis* tienen un tamaño menor que otras, por lo que suponen un ahorro tanto de espacio como de material empleado en los ensayos.

➤ **Ensayo de *Nereis vivens***

Nereis vivens es un anélido usado en la evaluación de la toxicidad de sedimentos. Las formas juveniles de los gusanos son expuestas al fango contaminado durante diez días, mientras son alimentados con una dieta estándar. El incremento de peso y el tanto por ciento de supervivencia se compara con el control. Según la disponibilidad o no de esa especie pueden ser utilizadas otras que habitan igualmente en los sedimentos marinos como *Echinocardium cordatum*.

6.2.2. ENSAYOS DE ALGAS

Las algas microscópicas son el primer eslabón en la cadena trófica de los sistemas acuáticos. Cualquier posible toxicidad puede alterar la composición de las diferentes especies de algas presentes, dando lugar a cambios en los productores secundarios. Las algas microscópicas tienen características que son de gran utilidad para determinar la calidad de las aguas debido a su facilidad para poder crecer, lo cual permite poder tener cultivos en el laboratorio y realizar estudios, modificando las condiciones necesarias, sobre cambios o variaciones de sus rangos de sensibilidad a diferentes compuestos.

Los ensayos se basan en una inoculación durante un periodo de tiempo de exposición determinado, 4 horas, 4 días, 8 días, etc. Y con un medio de crecimiento, una fuente de luz y una temperatura de incubación ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$) será suficiente para su crecimiento y su división celular.

Las especies empleadas normalmente son algas verdes pertenecientes a los géneros *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Scenedesmus* y *Selenastrum*, siendo una de las más utilizadas, la especie *Selenastrum capricornotum* debido a que permite ser cultivada sin apenas problemas en el laboratorio. El efecto que produce un efluente sobre estas algas unicelulares se determina a las 96 horas mediante un test estativo. Se busca un valor EC_{50} que mida la inhibición del crecimiento expresada en valores de densidad celular, absorbancia o contenido de clorofila. Estos parámetros tienen valor mayor cuando las células están vivas que cuando están muertas.

Los parámetros a estudiar dependen del tipo de toxicidad buscada, pues si es toxicidad letal se mide la viabilidad celular, potencial de regeneración, supervivencia de esporas y germinación. Si se busca una toxicidad subcrónica o crónica, se utiliza la tasa de crecimiento de germinales, reproducción, movilidad de gametos, actividades fisiológica, respiración, etc. Algunas veces también pueden utilizarse los ensayos con algas para conocer las interacciones que aparecen ante la presencia de un tóxico y evaluar los impactos a corto y largo plazo como resultado de una exposición aguda.

Cabe citar como ejemplo los estudios del impacto producido por herbicidas en determinadas condiciones acuáticas. También las algas marinas pueden utilizarse para conocer los efectos de la capa de metales disueltos en el agua de mar, sin embargo no son los ensayos más frecuentes.

Se puede decir que aún no hay muchos protocolos establecidos para el uso de ensayos con algas. Existen algunos problemas asociados al uso de algas como pueden ser, por un lado, la variación genética entre diferentes poblaciones de las mismas especies, de forma que pueden tener tolerancias distintas aún siendo las mismas especies, y por otro lado, la existencia de una gran variación entre los datos estadísticos obtenidos.

6.2.3. ENSAYOS DE PECES

La mayoría de los estudios ecotoxicológicos no poseen la información necesaria para evaluar el riesgo ecológico que se produce. Normalmente se lleva a cabo la elección de las sustancias químicas, número de individuos y de especies, dependiendo del uso y niveles de producción de esos productos.

Los ensayos de toxicidad con peces se aplican según la Directiva 79/831/CEE para obtención de un LC₅₀ (concentración letal) determinado en un período máximo de 96 horas, para la clasificación de las sustancias peligrosas. Cuando la producción de esas sustancias excede de 100 toneladas al año se precisa un estudio de toxicidad más prolongado con peces, durante un período de al menos 14 días. Para los estudios de bioacumulación se recomienda la utilización de peces para los ensayos. En el caso de que el nivel de producción exceda las 1000 toneladas al año, el estudio de toxicidad con peces será de una duración aún mayor, pues deben estudiarse los efectos que causan esas sustancias químicas en la reproducción. Las especies de peces más utilizadas son *Salmo gairdneri*, *Leuciscus idus*, *Pimephales promelas*, *Ciprinodon variedatus*.

La elección de los peces de debió a que se les consideró como especies ecológicamente representativas. Los peces están expuestos continuamente a las sustancias químicas de su entorno. Los lípidos de sus membranas atraen a los compuestos lipofílicos. Debido a la acumulación de cantidades importantes de contaminantes en sus tejidos, se han utilizados muy a menudo para conocer la contaminación existente. Los datos obtenidos en los estudios sirven posteriormente para evaluar el riesgo ecológico que existe en el medio.

Sin embargo no hay ninguna necesidad de utilizar estos organismos para obtener los valores de LC₅₀, factores de seguridad que luego serán aplicados a los datos de evaluación de riesgo. Los Niveles de Efecto No Observados (NOELs) tienen mayor relevancia que los LC₅₀ obtenidos de los ensayos con peces, por lo que éstos pueden ser sustituidos por otros procedimientos donde los organismos utilizados sean diferentes.

6.2.4. MÉTODOS ALTERNATIVOS

Se busca cada vez más nuevas alternativas que reemplacen totalmente la experimentación animal. Está establecido el uso de alternativas frente a métodos que utilizan animales siempre que sea posible. Para ello deben de usarse técnicas físicas y químicas basadas en predicciones y propiedades fisicoquímicas: aplicar modelizaciones por computador, y utilizar organismos pertenecientes a los niveles bajos como son bacterias, hongos, plantas o invertebrados.

Asimismo se utilizarán métodos “in vitro” como ensayos de cultivos celulares que permiten estudiar el efecto de sustancias químicas en la viabilidad celular. Los ensayos con peces quedarían relegados por lo tanto para aquellos compuestos de baja toxicidad, para aquellos ensayos cuyo LC_{50} sea mayor de 100 mg/l, valor por debajo del cual una sustancia se le considera “ecotóxica”.

6.3. MÉTODOS BACTERIANOS. ENSAYO DE LUMINISCENCIA

6.3.1. SELECCIÓN DE LOS MÉTODOS BACTERIANOS

Los microorganismos son especies muy utilizadas para los estudios de toxicidad aguda. Los ensayos microbiológicos han sido elegidos por su rapidez, simplicidad, sensibilidad y reproductividad. La elección de bacterias como una alternativa a los bioensayos con otros organismos como peces ha sido debido a las siguientes razones:

- Presentan rutas metabólicas presentes en organismos superiores.
- Tienen un significativo grado de organización en la estructura de la membrana.
- La respuesta tóxica a muchas sustancias químicas se produce a través de mecanismos similares a los organismos superiores.
- Representa el eslabón más bajo en la cadena trófica ecológica.
- Fácil manipulación.
- Su tasa de crecimiento es elevada.
- Su ciclo de vida es corto, por lo que los ensayos con bacterias tienen una duración menor y se requieren pequeños volúmenes de muestra.
- Su mantenimiento y crecimiento es más barato.
- El gran número de individuos utilizados en cada test da ventajas estadísticas sobre otros ensayos donde el número de individuos utilizado es menor.

En particular *Photobacterium phosphoreum* posee una intensa emisión de luz, estabilidad de emisión y alta sensibilidad a un amplio espectro de compuestos diferentes.

En la actualidad se está trabajando en la realización de bases de datos utilizando bioensayos de luminiscencia para diferentes tipos de residuos. De esta manera no sólo se conocerá la toxicidad de los vertidos residuales de las diferentes industrias, sino también se podrá estimar la eficiencia de los tratamientos aplicados para la detoxificación, la correlación de los diferentes parámetros y los resultados del bioensayo así como evaluar los efectos de las interacciones que se producen ante las mezclas de contaminantes.

6.3.2. CARACTERÍSTICAS DEL ENSAYO DE BIOLUMINISCENCIA

Todo lo referente al bioensayo con *Photobacterium phosphoreum* se refiere al ensayo comercializado como test Microtox®. A continuación se comentan algunas características de dicho ensayo.

6.3.2.1. PRECISIÓN

Es una de las características más importantes del ensayo. Cuando se utilizan metodologías en las que intervienen ensayos con organismos vivos se está sujeto a una varianza de los datos que no es controlable, pero que de alguna manera se puede intentar minimizar para conseguir que su influencia sobre el método sea despreciable. Una de las formas en que se minimiza este componente es mediante la utilización de bacterias, ya que en cada cubeta utilizada para realizar las medidas hay más de un millón de microorganismos con respuesta individual ante la sustancia problema. Al medir un único parámetro, las desviaciones individuales entre los microorganismos no son estadísticamente significativas.

6.3.2.2. SIMPLICIDAD

El sistema posee gran simplicidad de manejo, lo que mejora la precisión, la repetitividad y la exactitud, teniendo menor subjetividad, ya que no depende del operador la toma de datos sino del fotómetro analizador de que consta el equipo, así como menor error experimental.

6.3.2.3. RAPIDEZ

La rapidez suele ser un factor clave en los ensayos de toxicidad. Se valora mucho un tiempo de respuesta corto. El bioensayo de luminiscencia es uno de los ensayos calificados como más rápidos en la actualidad, pudiendo saber si una muestra es tóxica en 15 minutos.

6.3.2.4. EQUIVALENCIA

En general los datos obtenidos por los bioensayos de luminiscencia han sido comparados con los datos de otros ensayos donde el organismo test era diferente. Se obtuvieron buenas correlaciones con hongos, protozoos, algas, plantas superiores, moluscos, crustáceos, insectos y peces.

En un estudio de 267 compuestos, Kaiser y Esterby [International joint Commission (IJC),(1998). *Procedures for the assessment of contaminated sediment problems in the great Lakes. IJC. Sediment subcommittee. Windsor, Ontario, Canadá*] encontraron buenas relaciones entre el sistema de bioluminiscencia y otras especies de agua dulce. Blum y Spence [Richardson M.L. (1993): *Ecotoxicology Monitoring. Ed. por Mervyn Richardson WCH (Federal Republic of Germany)*] consideraban para sus estudios una buena correlación cuando la desviación estándar de los métodos experimentales estaba comprendida entre 0.4 y 0.5, aceptable entre 0.5 y 0.7, no siendo aceptada por encima de este valor. Entre el ensayo de bioluminiscencia y el de peces se ha encontrado una correlación de 0.46. Aunque existen mejores correlaciones entre otros grupos de especies prueba, este sistema tiene ventajas añadidas como las de ser el más rápido, fácil y sobre todo el más reproducible de todos ellos.

Diferentes autores han encontrado unos valores medios del coeficiente de variación del ensayo con *Photobacterium phosphoreum* (10-20%) muy por debajo de los valores medios con peces (38.8%), es decir, su reproductividad es mayor, siendo el valor obtenido aceptable en cualquier tipo de método biológico. Esto apoya la elección del bioensayo de luminiscencia de la *Photobacterium phosphoreum* como posible ensayo para sustituir a los costosos ensayos de letalidad de peces.

6.3.2.5. MEZCLA DE CONTAMINANTES

En general, unos de los problemas de los ensayos de toxicidad es que la mayoría de las muestras contienen mezclas de contaminantes, mientras que en los estudios de calibrado en el laboratorio se utilizan compuestos simples.

La metodología existente para detectar sustancias químicas en muestras, requiere el uso de unos equipos sofisticados y, en general, caros.

Los análisis pueden detectar cantidades mínimas de microcontaminantes pero no dan información de los posibles efectos tóxicos. Sin embargo los bioensayos muestran los efectos tóxicos de una mezcla química pero no identifican al compuesto responsable. Los análisis químicos y biológicos deben de ser por lo tanto considerados complementarios. En estudios realizados con residuos procedentes de distintos tipos de actividades industriales se puede ver la complementariedad de ambos tipos de ensayos, en los que los análisis químicos apoyan la catalogación de los residuos obtenida mediante los datos de los bioensayos.

Los ensayos de una mezcla compleja en un ecosistema conllevan una dificultad añadida y es que el mismo tiempo de exposición dependiendo del organismo diana, del estado de desarrollo, etc., da lugar a un efecto toxico que puede ser diferente (un mismo individuo dependiendo de su fase de desarrollo puede tener una mayor o menor sensibilidad frente a un tóxico). El uso de microorganismos como *Photobacterium phosphoreum* permite que estas variaciones no intervengan debido a la simplicidad del organismo utilizado y a la elevada población que se utiliza.

Las diferentes interacciones que se producen ante la presencia de varios contaminantes pueden ser de tipo antagónico, cuando la toxicidad resultante es menor que la que se esperaría sumando la toxicidad individual de los contaminantes que interaccionan; sinérgico, cuando la toxicidad final es mayor que la esperada por la adición de las toxicidades individuales de los contaminantes; y por último, se puede dar el caso de un tipo de interacción aditiva, en la que la presencia de ambos contaminantes da como resultado una toxicidad equivalente a la suma de las toxicidades individuales.

Los resultados de los estudios realizados por A. Andrés [Andrés, A.; Irabien, A. (1990): "*Evaluación de toxicidad en disolución con plomo, cromo y cadmio mediante el ensayo de fotobacterias.*" Actas y Congreso Internacional de Químicas. "*Residuos Sólidos y Líquidos: su mejor destino*". Puerto de la Cruz, Tenerife.] muestran una relación de antagonismo entre el cromo y el cadmio con respecto al plomo. Cuando el plomo se encuentra en presencia del cromo y cadmio, se produce un incremento de la concentración de plomo admisible.

Otras investigaciones han dado lugar a las relaciones indicadas en la siguiente tabla (*Tabla 11*).

MEZCLA	INTERACCIÓN
Cadmio – Zinc	Sinergia
Cadmio – Níquel	Antagonismo
Cobalto – Níquel	Aditivo
Arsénico - Plomo	Aditivo

TABLA 11. INTERACCIONES DE DIFERENTES MEZCLAS DE METALES

Los efectos derivados de la presencia de una o más sustancias químicas en peces han sido estudiados desde hace muchos años, siendo Bliss (1939) uno de los pioneros. En la actualidad existe gran número de investigaciones que están siendo llevadas a cabo en este campo. Esto es debido a que en los ecosistemas acuáticos, el estudio del efecto tóxico de dos o más metales traza en los microorganismos se combina con la presencia de otros muchos contaminantes en el medio.

Los diferentes tipos de interacciones que aparecen no sólo dependen de aquéllos en estudio, sino también de la composición y proporción de los diferentes contaminantes presentes, así como del organismo sobre el que actúan.

Es conveniente determinar previamente las diferencias de sensibilidad de los organismos frente a los diversos contaminantes ya que los resultados de un análisis de toxicidad pueden estar alterados por el exceso de sensibilidad de los organismos test a un compuesto particular.

6.4. BIODISPONIBILIDAD Y TOXICIDAD

A la hora de realizar ensayos de toxicidad se debe tener en consideración el hecho de que los sedimentos poseen un determinado potencial tóxico que puede no ser equivalente a la carga de contaminantes que contiene. Es decir, existe un desfase entre el contenido total de sustancias tóxicas y la porción de éstas que, efectivamente, puede tener efectos nocivos en el ecosistema. Esta porción de alto riesgo ecológico se conoce con el nombre de fracción biodisponible y es aquella a la que los organismos tienen acceso.

La biodisponibilidad de las sustancias químicas está afectada por la interacción entre las propiedades químicas y las condiciones del medio, las cuales incluyen tanto aspectos intrínsecos del ecosistema (físicos, químicos, biológicos) como antropogénicos. Dicha interacción se manifiesta en procesos químicos básicos tales como especiación, solubilidad o partición de las sustancias químicas, así como en procesos metabólicos.

Uno de los contaminantes que se encuentran en mayor proporción en los sedimentos y cuya disponibilidad ha sido objeto de estudio, son los metales traza. En lo que se refiere a los metales traza presentes en los sedimentos, es materia de discusión y de estudio que porciones de dichos elementos son biodisponibles y, por consiguiente, con un mayor potencial de efectos biológicos. La biodisponibilidad es una cuestión fundamental para evaluar la toxicidad de los metales pesados en los sedimentos.

Las concentraciones totales de metales en los sedimentos no dan una idea fiable de la fracción "libre" y biodisponible del total de la sustancia química presente. Diferentes sedimentos pueden diferir en cuanto a toxicidad en un factor de 10 o más para la misma concentración total del metal. A la hora de realizar estimaciones aproximadas del riesgo potencial de los metales en sedimentos y/o desarrollar criterios de calidad de sedimentos para metales, es esencial identificar aquella fracción del metal total que es biodisponible. Algunas estimaciones incluyen la normalización con arreglo al contenido en carbono orgánico, óxidos de hierro y manganeso y sulfuros, todos ellos componentes que reducen la biodisponibilidad de metales pesados en los sedimentos

Capítulo 7

PARTE EXPERIMENTAL II.

BIOENSAYO DE TOXICIDAD AGUDA MICROTOX®

*Este capítulo describe la técnica utilizada para evaluar la toxicidad aguda de muestras ambientales como pueden ser efluentes industriales, aguas naturales superficiales o subterráneas, lixiviados de residuos sólidos industriales, etc. mediante el sistema Microtox®. Se trata de un bioensayo normalizado que emplea como organismo indicador una cepa liofilizada de la bacteria marina luminiscente *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*).*

El ensayo se ha realizado siguiendo las directrices marcadas.

7.1. INTRODUCCIÓN

Los bioensayos permiten obtener datos reproducibles y representativos referentes a la presencia de sustancias tóxicas en muestras ambientales, preferentemente vertidos líquidos industriales, residuos peligrosos, aguas naturales, sedimentos, etc. En general, en un bioensayo se utilizan seres vivos como indicadores de la toxicidad estudiando y determinando algunos efectos como son: mortalidad, inhibición enzimática, inmovilización, inhibición de la luminiscencia, alteraciones del crecimiento, reproducción, alteraciones del comportamiento o inducción enzimática.

La política medioambiental actual va encaminada a prevenir situaciones desastrosas y antepone una acción preventiva, fijando límites máximos autorizados por encima de los cuales el vertido no será autorizado, o bien se clasificará el residuo como tóxico y peligroso y por tanto deberá someterse a un tratamiento adecuado o bien ser almacenado precautoriamente en un depósito de seguridad. Las investigaciones apuntan la necesidad de disponer de ensayos eficaces y representativos para determinar el efecto tóxico potencial de los residuos sólidos y vertidos líquidos sobre el medio receptor. Es también necesario que el ensayo sea rápido y sencillo.

Durante los últimos quince años se ha utilizado el bioensayo de toxicidad, distribuido comercialmente como Microtox[®], para evaluar la toxicidad de muestras medioambientales. El sistema Microtox[®] es un bioensayo que examina la toxicidad aguda de muestras medioambientales y compuestos puros basándose en la reducción de la bioluminiscencia natural de la bacteria marina *Vibrio fischeri* en presencia de agentes contaminantes. La toxicidad se expresa como la concentración de agente que produce la reducción del 50% de la luminiscencia inicial (EC₅₀).

El ensayo Microtox[®] es ampliamente utilizado por sus características en cuanto a sensibilidad, poder discriminante, reproducibilidad y fácil aplicación para contaminantes orgánicos e inorgánicos. Además resulta más rápido y barato que otros ensayos biológicos. Aunque Microtox[®] se aplicó inicialmente para medir la toxicidad aguda de aguas naturales y residuales también es aplicable tanto a muestras sólidas (sedimentos y suelos) como a sus extractos acuosos.

Los ensayos de toxicidad aguda utilizando bacterias han adquirido esta gran importancia en los últimos años no sólo por las características mencionadas anteriormente, sino también debido a la correlación existente entre los resultados obtenidos a través de estos ensayos y los bioensayos convencionales de amplia utilización. Así, para muchos compuestos y muestras, los datos de toxicidad obtenidos con el ensayo Microtox[®] se corresponden bien con las toxicidades agudas obtenidas con los ensayos de toxicidad estándar; por tanto, la toxicidad en *Vibrio fischeri* puede aplicarse para predecir toxicidad para otros organismos acuáticos.

De hecho, Microtox® es el ensayo que ha mostrado mayor sensibilidad y correlación con los resultados obtenidos en peces y en *Daphnia*, siendo desde 1984 una de las pruebas recomendadas por la EPA (Environmental Protection Agency), junto con pruebas en dáfnidos, en la evaluación de la toxicidad aguda de muestras de agua.

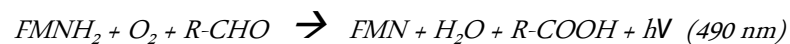
Las normas europeas AFNOR T 90-320 y DIN 38412, la norma española UNE-EN ISO 11348 y la norma americana ASTM D 5660-95 definen el ensayo y describen el método de análisis, los reactivos y productos usados, la especie bacteriana, el equipo analítico necesario, la preparación de las muestras y la interpretación, validez y expresión de los resultados del ensayo.

7.2. FUNDAMENTO DEL MÉTODO MICROTOX®

El bioensayo bacteriano Microtox®, diseñado por Strategic Diagnostic Inc. (Azur Environmental) se basa en monitorizar los cambios en las emisiones de luz natural de una bacteria luminiscente, *Vibrio fischeri* (*Photobacterium phosphoreum*).

Vibrio fischeri es una bacteria gran negativa, anaerobia facultativa, de la familia *Vibrionaceae* cuya característica más representativa es la bioluminiscencia (producción de luz por parte de ciertos organismos vivos). Es importante destacar la estabilidad en la emisión de luz así como la gran sensibilidad que presenta a una amplia variedad de sustancias tóxicas.

Las reacciones de emisión de luz en la mayoría de las bacterias involucran la oxidación de riboflavin fosfato reducido (FMNH₂) en una larga cadena de un aldehído con emisión de luz verde-azulada, λ_{max} = 490-505 nm. La reacción en conjunto se muestra a continuación:



Dicha reacción está catalizada por la enzima luciferasa bacteriana, una heterodimérica (αβ) flavin monooxigenasa.

En la siguiente figura (*Figura 13*) se esquematiza la reacción de luminiscencia bacteriana.

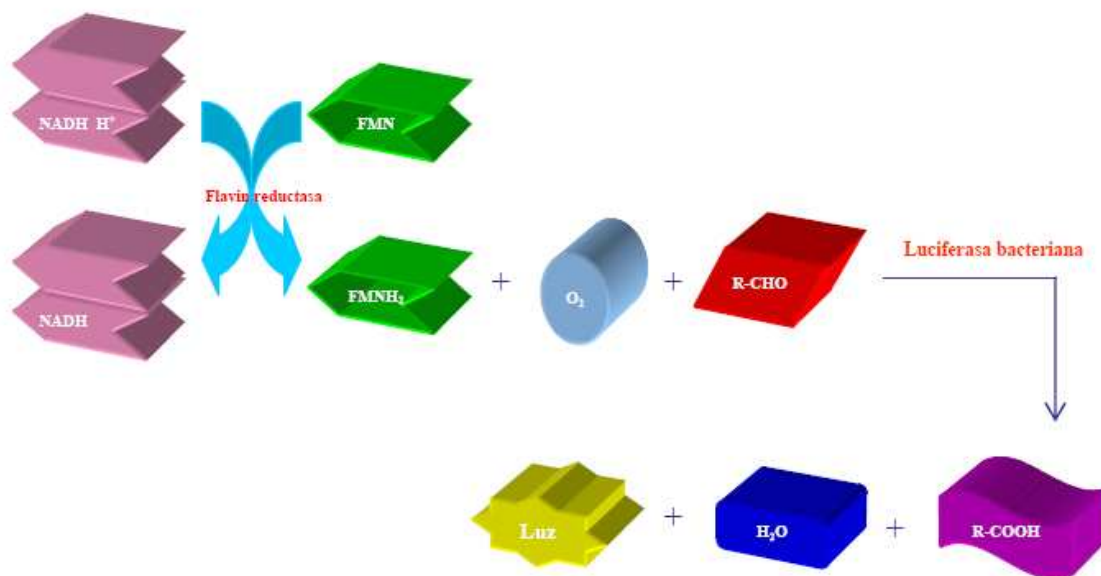
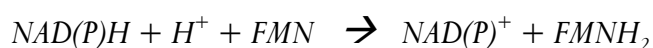


FIGURA 13. REACCIÓN DE LUMINISCENCIA BACTERIANA

Flavin mononucleótido, FMN, junto con flavin adenin dinucleótido, FAD, son los dos coenzimas que se derivan de la riboflavina (vitamina B₂). De la reacción anterior queda puesto de manifiesto que, en una bacteria luminosa, la forma reducida de FMN (FMNH₂) es un componente esencial de la reacción de luminiscencia y FMNH₂ puede ser suministrada in vivo por NAD (P)H y FMN mediante la siguiente reacción enzimática, catalizada por flavin reductasa.



FMNH₂ es oxidado rápidamente por el oxígeno molecular para dar peróxido de hidrogeno y FMN, según el siguiente esquema: flavin reductasa es una flavoproteína que contiene un mol de FMN como grupo prostético por mol de enzima. Cuando NADH se une a flavin reductasa, dos hidrógenos (electrones) son transferidos por una reacción enzimática a FMN para dar FMNH₂, que se disocia inmediatamente de la enzima. Bajo condiciones aeróbicas, FMNH₂ es rápidamente oxidado no enzimáticamente por oxígeno molecular para dar peróxido de hidrogeno y FMN, que se une al apoenzima (Figura 14).

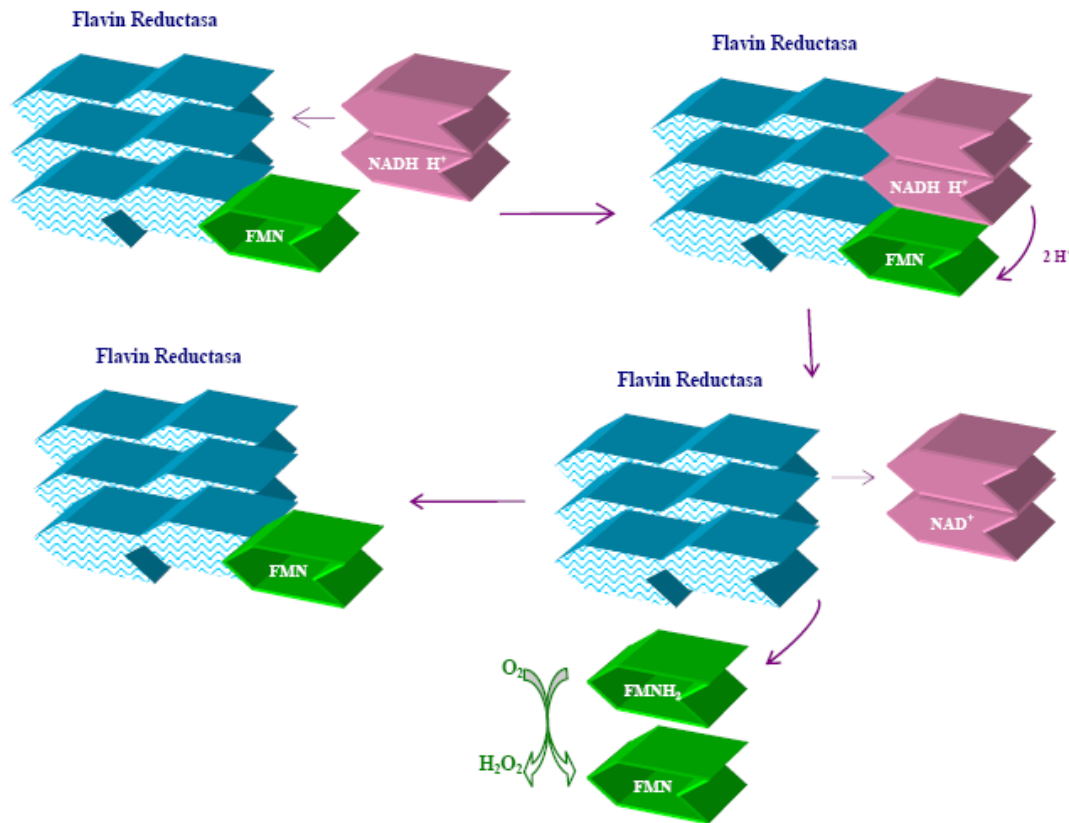


FIGURA 14. ESQUEMA DE REACCIÓN DE FLAVIN REDUCTASA BAJO CONDICIONES AEROBIAS

Sin embargo, en bacterias luminosas, el FMNH₂ libre es utilizado para la reacción de luminiscencia. Luciferasa bacteriana cataliza la reacción de producción de la luz utilizando el citado FMNH₂, oxígeno molecular y un aldehído alifático.

En esta reacción, FMNH₂ libre se une a luciferasa, que es proporcionada por flavin reductasa.

La reacción de bioluminiscencia bacteriana está ligada al sistema de transporte de electrones en la respiración celular y es indicativa del estado metabólico de la célula, de modo que una disminución de la bioluminiscencia indica la disminución de la respiración celular. Los contaminantes físicos, químicos y biológicos afectan a la respiración celular alterando el porcentaje de síntesis de proteínas y lípidos y modificando por tanto el nivel de emisión de luminiscencia.

En presencia de agentes contaminantes, la bioluminiscencia natural de *Vibrio fischeri* disminuye y la toxicidad se expresa como concentración efectiva 50 (CE₅₀): concentración del agente contaminante que produce una reducción del 50% en la emisión de luz inicial.

7.3. INTERFERENCIAS

- Turbidez. En caso de aguas con gran turbidez, se debe centrifugar la muestra a 4000 rpm durante 30 minutos., transferir el sobrenadante a un nuevo recipiente limpio y etiquetado, y realizar el test con dicha fracción de la muestra.

- pH. Las bacterias son sensibles al pH, pero el efecto es mínimo dentro del rango 6 – 8.5. Siempre se debe el pH de la muestra, así como la temperatura, conductividad y salinidad.

- Oxígeno disuelto. No se requiere aireación de la muestra. Bajos niveles de oxígeno en agua no afecta a los resultados del test. La manipulación normal de las muestras, y las diluciones al 50 % con soluciones aireadas, se considera suficiente para proveer de oxígeno adecuado para el test, a pesar de la deficiencia de oxígeno en la muestra. Sin embargo la aireación de la muestra puede ser una opción si y solo si, el oxígeno disuelto en la muestra es < al 40 % o > al 100 % de la saturación en aire.

- Color. Si la muestra posee color, se realiza el test básico y se determina la IC₅₀ de la misma. Se debe comprobar si a esta concentración la muestra tiene color visible.

- Muestras cloradas. Las bacterias, al igual que la mayoría de los microorganismos, son sensibles al cloro. Para neutralizar el cloro residual en una muestra de agua, se agrega una parte de la solución stock de tiosulfato de sodio (Na₂S₂O₃) a 100 partes de la muestra. De esta forma la concentración final de tiosulfato de sodio en la muestra es de 100 mg/l. Solución stock de tiosulfato de sodio: se pesan 1 g de Na₂S₂O₃ y agregar a 100 ml de diluyente.

7.4. APLICACIONES DEL MÉTODO

El bioensayo Microtox® tiene aplicabilidad en muchos campos entre los que se pueden citar:

- Efluentes de plantas de tratamiento de aguas.
- Evaluaciones de reducción de la toxicidad y evaluaciones de identificación de toxicidad.
- Monitoreo de aguas superficiales para la identificación de fuentes contaminantes.

- Monitoreo de aguas de bebida para detectar contaminación.
- Ensayos en sedimentos.
- Monitoreo y seguimiento de suelos contaminados en procesos de remediación.
- Monitoreo de biocidas en aguas industriales.

7.5. DESCRIPCIÓN DE LAS MUESTRAS EVALUADAS

El ensayo tiene como finalidad determinar la toxicidad aguda de muestras de distintos materiales plásticos. Se pretende comprobar si se produce o no migración de posibles tóxicos desde el material hacia el líquido en contacto con él, lo cual se determina midiendo la toxicidad del lixiviado mediante ensayo con Microtox®.

En concreto, se realizó el ensayo para 6 plásticos distintos, obtenidos todos ellos mediante modificación de polietileno de alta densidad por acción de aditivos en distinta proporción.

7.5.1. PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS

La preparación de las muestras se realiza de la siguiente forma:

- 1) Se pesan 0.5 g de material plástico cortado a tiras y se introducen en frascos de vidrio limpios y químicamente inertes.
- 2) Se añaden 15 ml de agua destilada.
- 3) Se sella el **recipiente** herméticamente

De esta forma se preparan cuatro viales con cada tipo de plástico: uno de ellos se almacena a temperatura ambiente y en contacto con la luz, el segundo se conserva a temperatura ambiente sin contacto con la luz, el tercero se conserva en una nevera a 8°C aproximadamente y el cuarto en una estufa a 100°C. El tener muestras de un mismo plástico en cuatro ambientes diferentes nos permitirá comprobar si la temperatura afecta al proceso de degradación del plástico y por tanto, afecta también a la toxicidad del fluido en contacto con él. Se almacenaron las muestras durante un periodo de aproximadamente 2 meses.



FIGURA 15.A) MUESTRAS DE POLÍMERO CONSERVADAS A Tª AMBIENTE, B) MUESTRAS EN ESTUFA

7.6. MATERIAL UTILIZADO

7.6.1. ANALIZADOR MICROTOX® 500

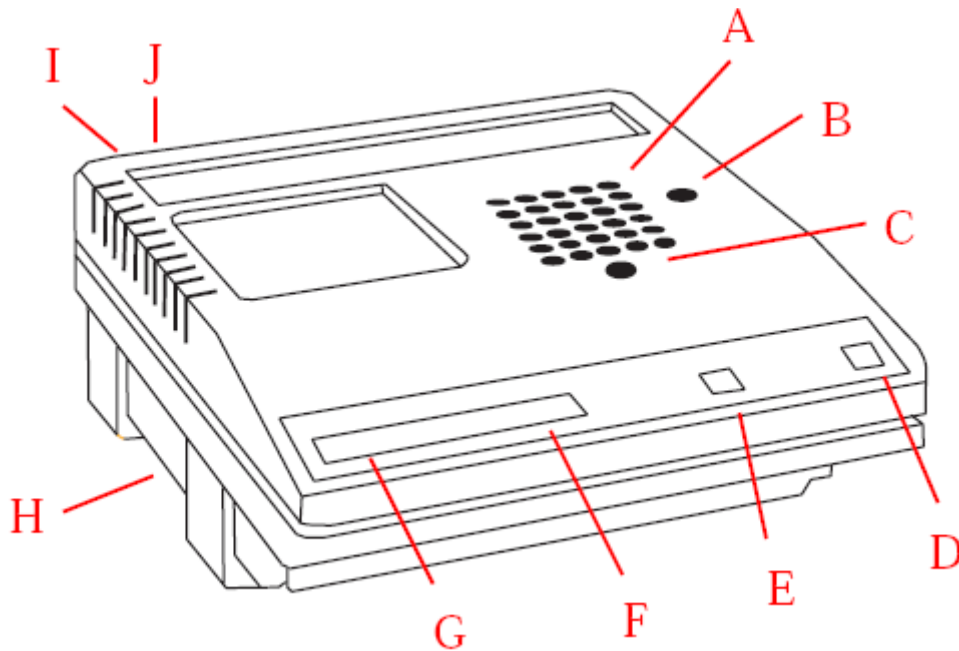
El Analizador Microtox® modelo 500 es un fotómetro de laboratorio con control de temperatura (15 o 27°C) el cual mantiene el reactivo luminiscente bacteriano y las muestras de ensayo a la temperatura adecuada para realizar el test.

Este instrumento mide la producción de luz del reactivo bacteriano y cuenta con la posibilidad de conectarlo a un ordenador para recoger, analizar y almacenar los datos obtenidos.



FOTOGRAFÍA 4. SISTEMA MICROTOX®

A continuación se describen detalladamente las partes del aparato:



A. INCUBATOR BLOCK. Se trata de 30 pocillos destinados a la incubación, donde la temperatura está controlada. En ellos se colocan los viales en los cuales se ponen en contacto las bacterias y el tóxico.

B. REAGENT WELL. Pocillo con control de temperatura destinado a almacenar la solución bacteriana una vez reconstituida.

C. READ WELL. Pocillo de lectura. En él se introduce la cubeta de la que se quiere conocer el dato de luminiscencia.

D. SET BUTTON. Sirve para la calibración del aparato. El analizador se calibra automáticamente en base a la luminiscencia emitida por las bacterias reconstituidas que se encuentran en ese momento en el pocillo de lectura (C).

E. READ BUTTON. Es el botón de lectura. Cuando una cubeta que contiene solución bacteriana se coloca en el pocillo de lectura y se pulsa este botón, el analizador mide la luz que emite la solución.

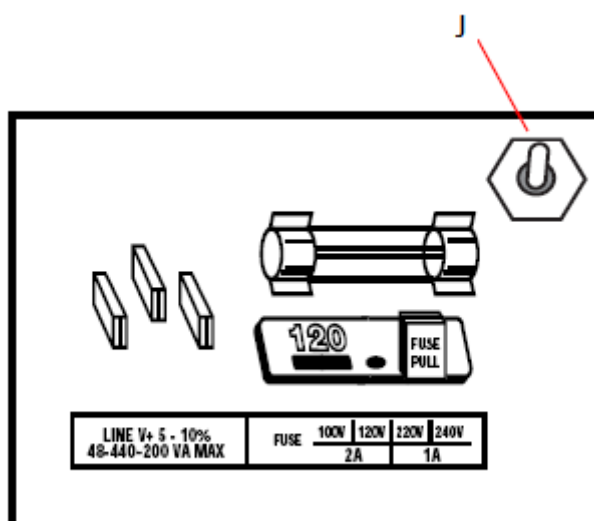
F. WARNING AND INDICATIONS LIGHTS. Pantalla de avisos en la cual se indicará situaciones como cuándo está listo el aparato o si la calibración se ha realizado o no correctamente.

G. DIGITAL DISPLAY. Es la pantalla de lectura donde se leen los datos proporcionados por el aparato cuando se introduce una cubeta en el pocillo de lectura y se pulsa READ.

H. Sistema de refrigeración encargado de mantener los pocillos a la temperatura adecuada.

I. Botón de encendido/apagado, toma eléctrica a la red, selector de voltaje y salida que permite conectar el equipo al ordenador.

J. Selector del modo de funcionamiento del aparato. Pueden configurarse tres modos diferentes mediante este selector, en función del fin del ensayo a realizar:



- **Mutatox® Genotoxicity Test** (pulsador hacia arriba)
- **Mutatox® Acute Toxicity Test** (pulsador situado en el centro)
- **Mutatox® Chronic Toxicity Test & ATP Test** (pulsador hacia abajo)

7.6.2. VIALES DE ENSAYO Y MICROPIPETAS

Se utilizan tubos de ensayo (viales), fabricados con un material químicamente inerte, adecuados para el aparato utilizado y con una capacidad que facilite la lectura sobre una superficie lo más amplia posible y de un tamaño apropiado para su colocación en el bloque térmico.

Se utilizan micropipetas con capacidad nominal de 10, 2500 y 50000 µl, además de jeringas de plástico para extraer la muestra del vial donde se almacena.

7.7. REACTIVOS Y SOLUCIONES UTILIZADAS

Los reactivos y soluciones utilizados en el ensayo son los comercializados por AZUR Environmental para el ensayo de toxicidad con Microtox®. Se incluye una descripción de cada uno de ellos.

7.7.1. BACTERIAS DE ENSAYO

Se utiliza una cepa de bacterias luminiscentes perteneciente a la especie *Vibrio fischeri* NRRL B-11177. Las suspensiones de bacterias utilizadas para las medidas de toxicidad se preparan a partir de reactivos liofilizados disponibles comercialmente, que se conservan en un congelador entre -18 °C y -20 °C. Las bacterias comienzan a emitir luz inmediatamente después de su reconstitución y están listas para su utilización en el ensayo. (Ver ANEXO A. *VIBRIO FISCHERI*)

El reactivo se debe utilizar antes de una o dos horas después de haber sido reconstituidas, ya que transcurrido ese tiempo la sensibilidad del reactivo es invariante.

7.7.2. SOLUCIÓN DILUYENTE

Es una disolución no tóxica al 2% de NaCl utilizada para diluir la muestra y el reactivo. Se puede mantener durante un año a temperatura ambiente. Las bacterias marinas que se utilizan en el ensayo necesitan una cierta presión osmótica, que es proporcionada con el 2% de la sal.

7.7.3. SOLUCIÓN DE AJUSTE OSMÓTICO

La solución de ajuste osmótico (OAS) es una solución de cloruro de sodio al 22% de concentración especialmente preparada.

Se utiliza para dar a las muestras una salinidad del 2% aproximadamente, necesaria debido al origen marino de las bacterias utilizadas. La cantidad de OAS que se debe añadir a la muestra es:

$$X \text{ ml de muestra} \cdot 0.1 = Y \text{ ml de OAS}$$

Se asegura así que la presión osmótica sea la adecuada para que la bacteria se mantenga viva. Un requisito fundamental para el test es la utilización de una solución de ajuste osmótico que no cause ningún efecto tóxico sobre la muestra.

7.7.4. SOLUCIÓN RECONSTITUYENTE

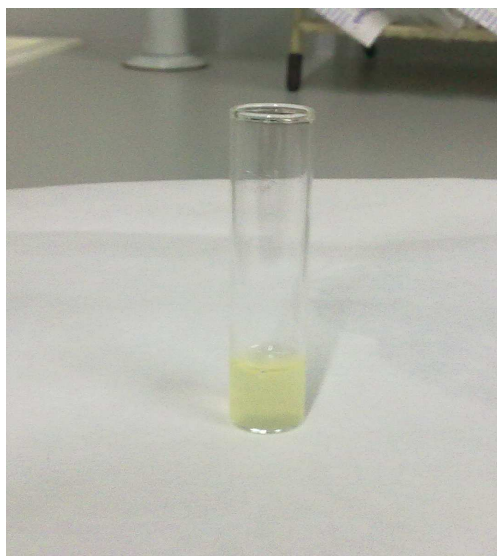
Se utiliza para realizar la reconstitución de las bacterias que se encuentran liofilizadas. Se utiliza como solución reconstituyente agua ultrapura.

7.8. PROCEDIMIENTO OPERATIVO

7.8.1. PREPARACIÓN DE LA SUSPENSIÓN MADRE. RECONSTITUCIÓN DE LAS BACTERIAS

En primer lugar, se lleva a cabo la reconstitución de las bacterias liofilizadas. Se realiza su reconstitución mediante la adición de 1 ml de solución reconstituyente que se mantiene fría. Se vierte el volumen de reconstituyente sobre las bacterias liofilizadas en su propio vial, reduciendo de esta forma el daño celular durante el proceso de rehidratación. Es importante que el agua se añada de forma rápida, a fin de permitir que las bacterias entren en contacto con el agua simultáneamente y evitar así que formen aglomerados y pierdan actividad.

La suspensión de bacterias luminiscentes reconstituidas sirve de solución madre, que se traslada a un vial de ensayo y se sitúa en el pocillo correspondiente a bacterias reconstituidas del equipo. No es recomendable utilizar la solución bacteriana una vez transcurridas 1 ó 2 horas tras su reconstitución ya que se pierde la sensibilidad del reactivo y por tanto no se obtienen datos fiables.



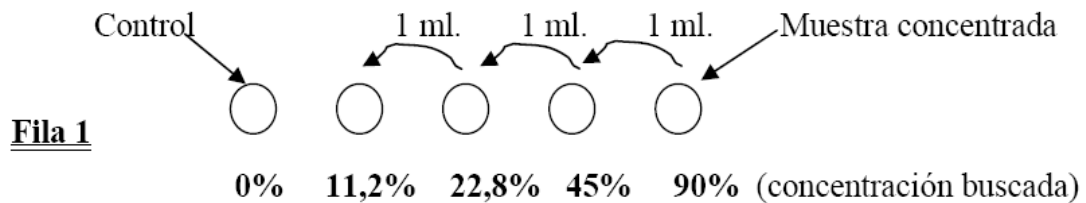
FOTOGRAFÍA 5. SOLUCIÓN MADRE BACTERIANA

7.8.2. PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Para realizar la preparación de la muestra, se toman 2.5 ml de la muestra extrayéndola con la ayuda de una jeringuilla graduada.

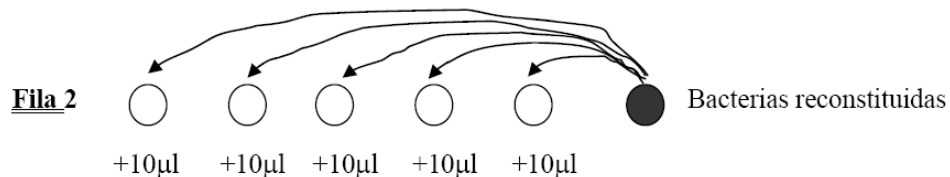
Se coloca la muestra en una cubeta de ensayo a la que se añaden posteriormente 0.25 ml de solución osmótica de ajuste, debido a que la bacteria es marina y necesita la presión osmótica adecuada para mantenerse viva. Se coloca el vial en el último hueco de la primera fila (A5).

En los demás pocillos de la primera fila se colocan viales con 1 ml de solución diluyente y se realizan las diluciones de la muestra: se toma 1 ml de muestra concentrada y se lleva al vial que está justo a su izquierda y se va repitiendo esta misma operación en todos los viales menos en el último, que se dejará como blanco. Por tanto, la concentración de muestra en cada uno será, de derecha a izquierda: 90%, 45%, 22.5%, 11.25% y 0%.



7.8.3. MEDIDAS A REALIZAR

En la segunda fila de pocillos se colocarán viales de ensayo con 0.5 ml de solución diluyente en cada uno. A continuación se añadirán 10 µL de solución madre bacteriana a cada vial.



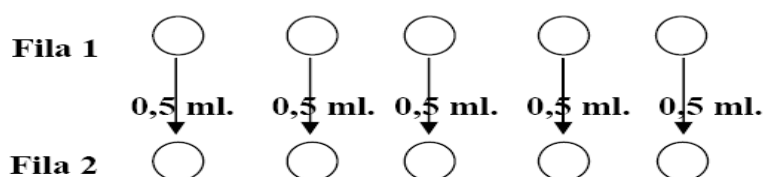
Una vez transcurridos 15 minutos, se realizará la medida de la luminiscencia de estos cinco viales obteniendo un valor de I_0 para cada uno de ellos. Debemos comprobar que estos valores son próximos entre ellos.

Para realizar cada lectura, en primer lugar debemos calibrar el equipo. Para ello, tomamos el primer vial al cual queremos medir su luminiscencia y lo introducimos en el pocillo de lectura. Se pulsa el botón SET, y el equipo realizará la calibración automática.

Si la calibración se ha llevado a cabo correctamente, aparecerá el icono verde de READ en la parte derecha del display del equipo, que indica que se puede comenzar a realizar las medidas. La calibración se realiza sólo una vez al principio del ensayo.

Manteniendo el vial anterior en el pocillo de lectura, se pulsa el botón de READ, y aparecerá en la pantalla el valor medido. De la misma forma, se introducen sucesivamente los demás viales en el pocillo de lectura y se realizan las lecturas.

Una vez se tiene el valor de I_0 para los 5 viales de la fila 2, se trasvasan 0.5 ml de las diluciones de la muestra de la fila primera al vial de la fila segunda situado justo debajo.



Así, pondremos en contacto la solución bacteriana con la muestra y, teniendo como referencia I_0 podremos determinar su efecto tóxico. Se realiza la medida de estos viales a los 5, 15 y 30 minutos después de añadir la muestra (I_5 , I_{15} y I_{30}) y se anota el valor obtenido en cada caso.

7.8.4. ENSAYOS DE ESTABILIDAD

Se han realizado 4 ensayos de estabilidad que, como ya se explicó anteriormente, tienen como finalidad ver cómo evoluciona la emisión de luz de la solución bacteriana con el tiempo, sin que se vea afectada por la acción de ningún tóxico.

Para realizar estos ensayos, se ha procedido de la siguiente forma:

- 1) Se preparan 5 viales de ensayo con 0.5 ml de solución diluyente en cada uno de ellos, y se colocan en una de las filas del equipo.
- 2) Se añaden a cada vial 10 µl de solución bacteriana.
- 3) Transcurridos 15 minutos, se mide la emisión de luz de cada vial. Se anotan los resultados.
- 4) De la misma forma, se realizan medidas de los 5 viales a intervalos periódicos de tiempo (entre 5 y 10 minutos) y se van anotando los resultados en función del tiempo.

Capítulo 8

CÁLCULOS Y RESULTADOS II

En este capítulo se recogen los resultados obtenidos en el ensayo de toxicidad aguda realizado por Microtox®.

8.1. EXPRESIÓN DE LA TOXICIDAD DE UN CONTAMINANTE: EC₅₀

Un parámetro tabulado en la literatura para expresar la toxicidad de distintos contaminantes es la EC₅₀. Se define como la concentración nominal efectiva de contaminante que reduce la intensidad de la emisión de luz de las bacterias un 50 % tras 15 minutos en contacto con el contaminante.

Para el tratamiento de los datos y expresión de los resultados se utiliza el programa ***MicrotoxOmni*** mediante el cual se obtienen dos valores de EC₅₀ (a los 15 y a los 30 minutos). La media de ambos es el resultado final EC₅₀ para el tóxico analizado

Según la regulación española [BOE, *Orden de 13 de octubre de 1989*], un residuo se caracteriza como ecotóxico, y por tanto peligroso, cuando el valor del parámetro **EC₅₀ ≤ 3000 mg/L.**

Los resultados del ensayo de inhibición de la bioluminiscencia se pueden también expresar como unidades de toxicidad (UT), también llamadas *Equitox*. La definición de *Equitox* desarrollada en las disposiciones particulares de la evaluación de la contaminación, en la norma AENOR T90-320, indica la necesidad de expresar los resultados en esta unidad. Considerando que el número de *Equitox* contenidos por metro cúbico de agua es igual a la inversa de la EC₅₀ expresada en %”

$$Equitox / m^3 = \frac{1}{EC_{50}} \times 100$$

La expresión de la ecotoxicidad en forma de *Equitox*/m³ evita la confusión que se crea por la relación inversa existente entre un valor de EC₅₀ bajo y su significado de elevada toxicidad.

En los documentos adjuntos al proyecto, se recogen los informes generados por el software *MicrotoxOmni* a partir de los datos obtenidos en los ensayos.

8.2. RESULTADOS OBTENIDOS Y CONCLUSIONES

Se realizó la determinación de la toxicidad de las siguientes muestras:

- 6 muestras conservadas a temperatura ambiente en contacto con la luz.
- 1 de las muestras conservadas en la nevera.
- 1 muestra almacenada a temperatura ambiente y oscuridad.
- 6 muestras conservadas en la estufa a 100°C.

.-Observaciones

- No se midió la toxicidad a todas las muestras preparadas (muestras conservadas en la nevera y muestras a temperatura ambiente sin contacto con la luz) ya que se observó que, tanto los resultados obtenidos para una de las muestras de cada grupo anterior, como los resultados de las 6 muestras a temperatura ambiente en contacto con la luz, mostraban una baja toxicidad.

- Se esperaba una mayor toxicidad de las muestras conservadas en la estufa debido a la posible degradación del material polimérico por acción de la temperatura (aspecto que presentan las muestras tras 2 meses almacenadas a una temperatura de 100°C). Es por esto por lo que se decidió realizar la medida de la toxicidad de todas ellas.

Se recogen a continuación, de forma tabulada, los resultados de EC₅₀, a los 15 y 30 minutos, obtenidos para cada muestra analizada.

Muestra	Material	Conservación	EC ₅₀ (15min)	EC ₅₀ (30min)
1	Plástico nº 1	TªAmbiente/Luz	60%	--
5	Plástico nº 2	TªAmbiente/Luz	--	--
9	Plástico nº 3	TªAmbiente/Luz	55%	46%
13	Plástico nº 4	TªAmbiente/Luz	--	--
17	Plástico nº 5	TªAmbiente/Luz	--	--
21	Plástico nº 6	TªAmbiente/Luz	--	--

TABLA 12. RESULTADOS MUESTRAS A TEMPERATURA AMBIENTE/LUZ

Muestra	Material	Conservación	EC ₅₀ (15min)	EC ₅₀ (30min)
4	Plástico nº 1	Estufa 100°C	45%	37%
8	Plástico nº 2	Estufa 100°C	23%	19%
12	Plástico nº 3	Estufa 100°C	36%	33%
16	Plástico nº 4	Estufa 100°C	66%	55%
20	Plástico nº 5	Estufa 100°C	28%	33%
24	Plástico nº 6	Estufa 100°C	63%	51%

TABLA 13. RESULTADOS MUESTRAS ESTUFA

.- Conclusiones

- La mayoría de los valores obtenidos para las muestras a **temperatura ambiente/luz** no son válidos: el programa muestra que no se puede realizar el cálculo de la EC₅₀ con los valores introducidos (*ver documentos adjuntos al proyecto*) Los datos de luminiscencia tomados para el control durante el ensayo son muy próximos a los que se obtienen en los viales que contienen muestra, por lo tanto, no podemos considerar las muestras como tóxicas. Se aplica esto de igual forma a las muestras conservadas en la nevera y las muestras a temperatura ambiente/sin luz es muy similar.

- Las muestras conservadas en la estufa, tal y como se observa en la tabla anterior, sí presentan una mayor toxicidad. Teniendo en cuenta que un residuo se caracteriza como peligroso cuando el valor del parámetro $EC_{50} \leq 3000$ mg/L, podemos concluir que las muestras almacenadas a 100°C no se pueden considerar como ecotóxicas o peligrosas.

- Se aprecia que la toxicidad de las muestras conservadas a alta temperatura es mayor que la de las demás muestras. Esto confirma que la temperatura a la que han sido almacenadas ha provocado cierta degradación del plástico y por tanto ha aumentado su toxicidad (aunque sin llegar a considerarse peligrosas).

REFERENCIAS

- Norma UNE-EN ISO 14852:2005. *Determinación de la biodegradabilidad aeróbica final de materiales plásticos en medio acuoso. Método según el análisis de dióxido de carbono generado.*
- Norma UNE-EN ISO 11348-3:2009. *Calidad del agua. Determinación del efecto inhibidor de muestras de agua sobre la luminiscencia de Vibrio fischeri (Ensayo de bacterias luminiscentes).*
- Informe UNE-CEN/TR 15351 IN. *Guía terminológica en el campo de los plásticos y polímeros degradables y biodegradables.*
- *Determining biodegradability of plastic materials under controlled and natural composting environments.* R. Mohee 1, G. Unmar. Department of Chemical and Sugar Engineering, Faculty of Engineering, University of Mauritius, Reduit, Mauritius.
- *Degradación de residuos de materiales plásticos.* D. Aradilla Zapata, F. Estrany Coda y R. Oliver Pujol. Escuela Universitaria de Ingeniería Técnica Industrial de Barcelona.
- *Microtox® SOLO Manual.* Azur Environmental.
- *MicrotoxOmni™ Software for Windows®95/98/NT. User Manual.* Azur Environmental.
- *Ensayos analíticos de ecotoxicidad. Control de metales traza en agua y sedimentos.* Coya Fernández, B.; Marañón Maison, E; Arribas Rojo, P.
- *Toxicología Ambiental y contaminación.* E. Laborda y P. Laborda.
- *Proyecto de análisis de bioplásticos. Informe sobre biodegradabilidad teórica de envases plásticos.* Abril 2008. Cátedra Ecoembes de Medio Ambiente, Universidad politécnica de Madrid.
- *Determination of the aerobic biodegradability of polymeric material in aquatic batch tests.* Udo Pagga, Anja Sch afer, Rolf-Joachim Muller, Michael Pantke.
- *Effect of the inoculation level in aerobic biodegradability tests of polymeric materials.* Gabriela A. Vázquez-Rodríguez, Anne Calmon, Francoise Silvestre, Gérard Goma, Jean-Luc Rols.
- *Aerobic and anaerobic biodegradability of polymer films and physico-chemical characterization.* V. Massardier-Nageotte, C. Pestre, T. Cruard-Pradet, R. Bayard.
- Almeida A.; Ruiz A. J.; López I. N.; Pettinari M. J.(2004). *Bioplásticos: una alternativa ecológica.* QuímicaViva.

- *Assessment of the aquatic and terrestrial toxicity of five biodegradable polymers.* Darryl P. Arfsten, Dennis T. Burton, Daniel J. Fisher, John Callahan, Cody L. Wilson, Kenneth R. Still, and Barry J. Spargo.
- *The rapid evaluation of material biodegradability using an improved ISO 14852 method with a microbial community.* Wenbin Gu, Jian Tao, Chao Yang, Qiang Zhao, Cunjiang Song, Shufang Wang.
- *Use and recovery of biodegradable polymer packaging.* Matthias Klauss and Werner Bidlingmaier. Bauhaus-Universität Wiemar, Faculty of Civil Engineering, Dept. of Waste Management. Germany.
- *The anaerobic degradability of thermoplastic starch: Polyvinyl alcohol blends: Potential biodegradable food packaging materials.* Melissa A.L. Russo, Cathryn O'Sullivan, Beth Rounsefell c, Peter J. Halley, Rowan Truss, William P. Clarke.
- *Manual de procedimientos analíticos para muestras ambientales. Evaluacion de la Toxicidad Aguda de muestras ambientales como efluentes industriales, aguas naturales superficiales o subterráneas, lixiviados de residuos sólidos industriales, etc., mediante el Sistema Microtox®.* Gabriela Pistone.
- *Guía de buenas prácticas para diseñadores de productos fabricados con materiales plásticos.* AIMPLAS, Instituto tecnológico del plástico.
- *Guía de ecodiseño para el sector del plástico.* AIMPLAS, Instituto tecnológico del plástico.
- *Degradacion química de plásticos reforzados en medios básicos.* C. Sanz Boix, M. D. Salvador Moya, F. Segovia López, V. Amigó Borrás, A. T. Pérez Rodríguez.
- *Biodegradability of bio-flour filled biodegradable poly(butylene succinate) bio-composites in natural and compost soil.* Hee-Soo Kim, Hyun-Joong Kim, Jae-Won Lee, In-Gyu Choi.
- *Testing biodegradability with standardized methods.* Udo Pagga. BASF Aktiengesellschaft, Germany.
- *El sector de los plásticos. Estadísticas, situación, perspectivas.* Centro Español de Plásticos, Edición 2006.
- *Standard Test Method for Assesing the Microbial Detoxification of Chemically Contaminated Water and Soil Using a Toxicity Test with a Luminiscent Marine Bacterium.* American Society for Testing and Materials.

ANEXOS

ANEXO A. VIBRIO FISCHERI

Vibrio fischeri is a gram-negative rod-shaped bacterium found globally in marine environments. *V. fischeri* has bioluminescent properties, and is found predominantly in symbiosis with various marine animals, such as the bobtail squid. It is heterotrophic and moves by means of flagella. Free living *V. fischeri* survive on decaying organic matter (see saprotroph). The bacterium is a key research organism for examination of microbial bioluminescence, quorum sensing, and bacterial-animal symbiosis.^[2] It is named in honor of Bernhard Fischer, a German microbiologist.

A.1. SCIENTIFIC CLASSIFICATION

Scientific classification	
Kingdom:	Bacteria
Phylum:	Proteobacteria
Class:	Gamma Proteobacteria
Order:	Vibrionales
Family:	Vibrionaceae
Genus:	Vibrio
Species:	<i>V. fischeri</i>
Binomial name	
<i>Vibrio fischeri</i> (Beijerinck 1889) Lehmann & Neumann 1896	

A.2. CELL STRUCTURE AND METABOLISM

Vibrio fischeri is an oxidase-positive, Gram-negative bacteria, composed of a cell wall that consists of an outer membrane containing lipopolysaccharides, a periplasmic space with a peptidoglycan layer, and an inner, cytoplasmic membrane (Hoi Ho, et al.).

One of its most distinguishing characteristics, bioluminescence, is controlled by a small set of genes known as the *lux* operon.

Luminescence is a chemical reaction in which the enzyme, luciferase, oxidizes organic compounds, such as long chain aldehyde and reduced flavin mononucleotide, so as to release free energy in the form of blue-green light at 490nm. The reaction that occurs in *Vibrio fischeri* is as follows: $\text{FMNH}_2 + \text{RCHO} + \text{O}_2 \rightarrow \text{FMN} + \text{RCOOH} + \text{H}_2\text{O} + \text{hv}(490\text{nm})$ (Davis, Aubrey).

A.3. ECOLOGY



The Hawaiian bobtailed squid, *Euprymna scolopes*, is a host for a population of *Vibrio fischeri* cells that symbiotically colonize its internal light-emitting organ (image courtesy of MJ McFall-Ngai).

Luminescent bacteria are found in free-living, symbiotic, saprophytic or parasitic relationships. The symbiotic relationship between *Euprymna scolopes*, a small Hawaiian squid, and *Vibrio fischeri* provides an example of specific cooperativity during the development and growth of both organisms (Geszvain, K., and K. L. Visick). For instance, once *Vibrio fischeri* cells utilize type IV pili to interact with the squid host, maturation of the light organs begin. *Vibrio fischeri* are helpful to the squid, a nocturnal forager, by erasing the shadow that would normally be seen as the moon's rays strike the squid, protecting the squid from its predators. The squid, in turn, provide the bacteria with shelter and a stable source of nutrients.

Quorum sensing bacterias help the regulation of the gene expression of *Vibrio Fischeri* in response to changes in cell density. Quorum sensing bacteria produce and release autoinducers. Autoinducers modify gene expression after a sudden change in the cell population density. Quorum sensing bacteria relies upon the synthesis of a signal molecule (N-acylhomoserine lactone or AHL). The protein LuxI synthesizes AHL. Then, the AHL diffuses out the bacterial cells. Since, more bacteria are present, the cell density increases. After stimulation, The LuxR AHL complex bind to the lux box causing the activation of luminescence genes. *V.fischeri* exists at low cell densities when they are free-living. On the contrary, *V.fischeri* has high cell densities when they are colonising the light organ.

A.4. PATHOLOGY

Among the *Vibrio* species that are capable of causing human disease, there are two main groups: *Vibrio cholerae* infection and noncholera *Vibrio* infections. *Vibrio* infections are often characterized as a foodborne disease due to consumption of contaminated seafood, exposure of wounds to contaminated seawater, or injury caused by shark and/or alligator bites (Finkelstein RA).

Infections associated with noncholera *Vibrio* species are gastroenteritis, wound infection and septicemia, which is blood poisoning. *Vibrio vulnificus* is responsible for causing septicemia. Several mechanisms contribute to the virulence of *Vibrio vulnificus*. For instance, iron is a key growth factor. However, because it is not present in humans, *Vibrio vulnificus* constructs siderophores that get their iron from transferrin or lactoferrin and transport it to the bacteria. The inability to make siderophores decreases the virulence of *Vibrio vulnificus*. Among all foodborne diseases, *Vibrio vulnificus* infection is linked with the highest fatality rate.

Patient symptoms associated with gastroenteritis include diarrhea, abdominal cramps, nausea, vomiting, headaches, bloody stools, etc. Symptoms associated with noncholera wound infection include swelling, pain, erythema, bullae, and necrosis. And symptoms associated with septicemia include fever, hypothermia, hypotension, acute respiratory distress syndrome, and multiple organ dysfunction (Hoi Ho, et al.).

A.5. APPLICATION TO BIOTECHNOLOGY

The ability of *Vibrio fischeri* cells to produce bioluminescence results from the expression of the *lux* operon.

The *lux* operon is a 9 kb fragment that consists of genes that code for the subunits of luciferase (*luxAB*) and for enzymes (*luxCDE*) that convert compounds to oxidizable substrates. This 9 kb fragment includes all that is necessary to carry out the functions of luminescence in other organisms such as *E. coli*. It has been found that expression of luminescence is dependent on cell density and thus light is not seen unless the bacteria are in high concentration, like in light emitting organs of fish and squid. This phenomenon is known as quorum sensing.

The rationale behind quorum sensing has to do with the proteins encoded on the *lux* operon. The *lux* operon is actually set up like two differently transcribed operons. As mentioned before, *luxA* and *luxB* code for the subunits of the enzyme luciferase. *LuxCDE* codes for enzymes that convert fatty acids into aldehydes which are needed for the reaction to proceed.

These genes, in addition to *luxI* and *luxG*, make up one operon. *LuxI* is at the head of this first operon and is responsible for the production of the autoinducer protein, homoserine lactone. This is the molecule that is involved in sensing the concentration of bacterium in a space. This protein can easily diffuse out of the cell, and if *Vibrio fischeri* were found floating freely in the ocean, as is sometimes seen, this auto inducer would diffuse out of the cell and float away. However, when in a restricted space, it is forced to react with the protein produced from the second operon, the regulator, *luxR*. This results in increasing the affinity of RNA polymerase to the promoter region of the first operon and eventually producing luminescence (Stevens AM, Greenberg EP). Luminescence is then used to measure the level of gene expression in an organism.

A.6. CURRENT RESEARCH

In order for researchers to understand how *Vibrio fischeri* and its host, *Euprymna scolopes*, communicate, they began to look for bacterial genes that were involved in the colonization of the symbiotic light organ. They expected that *Vibrio fischeri* mutants that were unable to reach high cell densities in the light organs would also reveal deficiencies in their symbiotic luminescence levels. They were indeed correct. They identified two mutants, KV712 and KV733, that had significant colonization defects by screening a library of mutant *Vibrio fischeri* cells (Miyamoto, M.C., Lin,H.Y., Meighen,A.E.). The similarity of the sequences between the gene defective in KV712, also known as RscS (regulator of symbiotic colonization), and sensory kinases allowed them to predict the role of RscS in the symbiosis. Researchers believed that the periplasmic loop of RscS recognized the signal sent by the squid. The signal was then transmitted to a response regulator protein(RscR), which in turn functioned to increase the transcription of genes required for the symbiotic phase of the *Vibrio fischeri* life cycle (Yip, E.S., et al.).

Currently, researchers are trying to find the critical time points during which bacterial signaling occurs. In order to facilitate the process, they have constructed cDNA libraries at these time points of both aposymbiotic and symbiont juveniles (Visick, KL and MJ McFall-Ngai). They are now subtracting these libraries to determine the gene expression brought about by interaction with *Vibrio fischeri*. Once potential genes have been identified, they will then conduct further research concerning the timing and location of gene expression in colonized host tissues.

Discoveries have been made that *Vibrio fischeri* de-regulates the expression of the peroxidase gene in tissues where it acts as a beneficial symbiont and conversely up-regulates the expression of the peroxidase gene in tissues where it is viewed as a pathogen (Small, AL and MJ McFall-Ngai).

This illustrates the fact that some of the same genes are involved in the control of beneficial and pathogenic associations. Therefore, it is the modulation of the genes that describes the outcome of the relationship.

TOMA DE DATOS VALORACIONES. PRUEBA n°1

Fecha → 16.6.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día y 6 horas

Muestra → Plástico n° 6 (1%)

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,2	80	80	0,05	0,0125	7,92
B	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
C	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
Trampa inicial	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
B	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
C	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
Trampa inicial	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2

Fecha → 17.6.2011 // Hora → 12:00 h // Tiempo de borboteo → 18 horas

Muestra → Plástico n° 6 (1%)

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
B	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
C	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
Trampa inicial	20	10	80	80	0,05	0,0125	0

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
B	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
C	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
Trampa inicial	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2

Ensayo de Biodegradabilidad

Fecha → 20.6.2011 // Hora → 10:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día y 22 horas

Muestra → Plástico nº 6 (1%)

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
B	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
C	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
Trampa inicial	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
Botella blanco	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
B	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
C	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
Trampa inicial	20	8,1	80	80	0,05	0,0125	8,36
Botella blanco	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4

Fecha → 21.6.2011 // Hora → 17:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día y 7 horas

Muestra → Plástico nº 6 (1%)

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
B	20	9,7	80	80	0,05	0,0125	1,32
C	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
Trampa inicial	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
Botella blanco	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
B	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
C	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
Trampa inicial	20	9,7	80	80	0,05	0,0125	1,32
Botella blanco	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88

Ensayo de Biodegradabilidad

Fecha → 22.6.2011 // Hora → 10:00 h // Tiempo de borboteo → 17 horas

Muestra → Plástico nº 6 (1%)

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO2 atrapada (mg)
A	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
B	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
C	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
Trampa inicial	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
Botella blanco	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO2 atrapada (mg)
A	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
B	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
C	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
Trampa inicial	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
Botella blanco	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88

Fecha → 23.6.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día y 8 horas

Muestra → Plástico nº 6 (1%)

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO2 atrapada (mg)
A	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
B	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
C	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
Trampa inicial	20	10,2	80	80	0,05	0,0125	-0,88
Botella blanco	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO2 atrapada (mg)
A	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
B	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
C	20	9,7	80	80	0,05	0,0125	1,32
Trampa inicial	20	10	80	80	0,05	0,0125	0
Botella blanco	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88

Ensayo de Biodegradabilidad

Fecha → 27.6.2011 // Hora → 12:00 h // Tiempo de borboteo → 3 días y 18 horas

Muestra → Plástico nº 6 (1%)

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6
B	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
C	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	10	80	80	0,05	0,0125	0

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,2	80	80	0,05	0,0125	7,92
B	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
C	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
Trampa inicial	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
Botella blanco	20	10	80	80	0,05	0,0125	0

TOMA DE DATOS VALORACIONES. PRUEBA n° 2

1 // Fecha → 28.06.2011 // Hora → 17:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día y 5 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
B	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
C	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
Trampa inicial	20	9,6	80	80	0,05	0,0125	1,76
Botella blanco	20	9,6	80	80	0,05	0,0125	1,76

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,8	80	80	0,05	0,0125	5,28
B	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
C	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	9,6	80	80	0,05	0,0125	1,76

2 // Fecha → 29.06.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día y 1 hora

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6
B	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
C	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	9,9	80	80	0,05	0,0125	0,44

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
B	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
C	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
Trampa inicial	20	9,6	80	80	0,05	0,0125	1,76
Botella blanco	20	9,9	80	80	0,05	0,0125	0,44

3 // Fecha → 30.06.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
B	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
C	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	9,9	80	80	0,05	0,0125	0,44

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,8	80	80	0,05	0,0125	5,28
B	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
C	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
Trampa inicial	20	9,9	80	80	0,05	0,0125	0,44
Botella blanco	20	9,9	80	80	0,05	0,0125	0,44

4 // Fecha → 1.07.2011 // Hora → 11:00 h // Tiempo de borboteo → 17 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6
B	20	8,8	80	80	0,05	0,0125	5,28
C	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
Trampa inicial	20	9,7	80	80	0,05	0,0125	1,32
Botella blanco	20	9,7	80	80	0,05	0,0125	1,32

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
B	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
C	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
Trampa inicial	20	9,6	80	80	0,05	0,0125	1,76
Botella blanco	20	9,7	80	80	0,05	0,0125	1,32

5 // Fecha → 4.07.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 3 días y 7 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
B	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
C	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
Trampa inicial	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
Botella blanco	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,4	80	80	0,05	0,0125	7,04
B	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
C	20	8,6	80	80	0,05	0,0125	6,16
Trampa inicial	20	10,1	80	80	0,05	0,0125	-0,44
Botella blanco	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52

6 // Fecha → 5.07.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,2	80	80	0,05	0,0125	7,92
B	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
C	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
Trampa inicial	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
Botella blanco	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,2	80	80	0,05	0,0125	7,92
B	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
C	20	8,6	80	80	0,05	0,0125	6,16
Trampa inicial	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
Botella blanco	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08

7 // Fecha → 6.07.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
B	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
C	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
Trampa inicial	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
Botella blanco	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
B	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
C	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
Trampa inicial	20	10,2	80	80	0,05	0,0125	-0,88
Botella blanco	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64

8 // Fecha → 7.07.2011 // Hora → 19:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día y 1 hora

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
B	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
C	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
Trampa inicial	20	10	80	80	0,05	0,0125	0
Botella blanco	20	9,7	80	80	0,05	0,0125	1,32

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
B	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
C	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
Trampa inicial	20	9,9	80	80	0,05	0,0125	0,44
Botella blanco	20	9,7	80	80	0,05	0,0125	1,32

9 // Fecha → 8.07.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 23 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
B	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
C	20	9,7	80	80	0,05	0,0125	1,32
Trampa inicial	20	10	80	80	0,05	0,0125	0
Botella blanco	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
B	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
C	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
Trampa inicial	20	10,5	80	80	0,05	0,0125	-2,2
Botella blanco	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52

10 // Fecha → 11.07.2011 // Hora → 12:00 h // Tiempo de borboteo → 2 días y 16 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	10,5	80	80	0,05	0,0125	-2,2
B	20	10,5	80	80	0,05	0,0125	-2,2
C	20	10,8	80	80	0,05	0,0125	-3,52
Trampa inicial	20	11,1	80	80	0,05	0,0125	-4,84
Botella blanco	20	11,2	80	80	0,05	0,0125	-5,28

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	10,4	80	80	0,05	0,0125	-1,76
B	20	10,6	80	80	0,05	0,0125	-2,64
C	20	11	80	80	0,05	0,0125	-4,4
Trampa inicial	20	11,2	80	80	0,05	0,0125	-5,28
Botella blanco	20	11,2	80	80	0,05	0,0125	-5,28

11 // Fecha → 12.07.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día y 6 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,4	80	80	0,05	0,0125	7,04
B	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
C	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
Trampa inicial	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
Botella blanco	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6
B	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
C	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
Trampa inicial	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
Botella blanco	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96

12 // Fecha → 13.07.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,4	80	80	0,05	0,0125	7,04
B	20	8,4	80	80	0,05	0,0125	7,04
C	20	8,6	80	80	0,05	0,0125	6,16
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,3	80	80	0,05	0,0125	7,48
B	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
C	20	8,6	80	80	0,05	0,0125	6,16
Trampa inicial	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
Botella blanco	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08

13 // Fecha → 14.07.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 1 día

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,2	80	80	0,05	0,0125	7,92
B	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
C	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,2	80	80	0,05	0,0125	7,92
B	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
C	20	8,6	80	80	0,05	0,0125	6,16
Trampa inicial	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
Botella blanco	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96

14 // Fecha → 15.07.2011 // Hora → 13:00 h // Tiempo de borboteo → 19 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,8	80	80	0,05	0,0125	5,28
B	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
C	20	8,9	80	80	0,05	0,0125	4,84
Trampa inicial	20	9,9	80	80	0,05	0,0125	0,44
Botella blanco	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,6	80	80	0,05	0,0125	6,16
B	20	8,4	80	80	0,05	0,0125	7,04
C	20	8,2	80	80	0,05	0,0125	7,92
Trampa inicial	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
Botella blanco	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4

15 // Fecha → 18.07.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 3 días y 5 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,6	80	80	0,05	0,0125	6,16
B	20	8,6	80	80	0,05	0,0125	6,16
C	20	8,8	80	80	0,05	0,0125	5,28
Trampa inicial	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
Botella blanco	20	9,6	80	80	0,05	0,0125	1,76

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,6	80	80	0,05	0,0125	6,16
B	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
C	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6
Trampa inicial	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
Botella blanco	20	9,6	80	80	0,05	0,0125	1,76

16 // Fecha → 19.07.2011 // Hora → 17:00 h // Tiempo de borboteo → 23 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,8	80	80	0,05	0,0125	5,28
B	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
C	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72
Trampa inicial	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
Botella blanco	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
B	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
C	20	8,8	80	80	0,05	0,0125	5,28
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2

*** ADICIÓN DEL AGAR**

17 // Fecha → 20.07.2011 // Hora → 17:00 h // Tiempo de borboteo → 24 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	6,8	80	80	0,05	0,0125	14,08
B	20	7,8	80	80	0,05	0,0125	9,68
C	20	8	80	80	0,05	0,0125	8,8
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	7,8	80	80	0,05	0,0125	9,68
B	20	8,4	80	80	0,05	0,0125	7,04
C	20	9,1	80	80	0,05	0,0125	3,96
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6

18 // Fecha → 21.07.2011 // Hora → 17:00 h // Tiempo de borboteo → 24 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	7	80	80	0,05	0,0125	13,2
B	20	7,9	80	80	0,05	0,0125	9,24
C	20	8,1	80	80	0,05	0,0125	8,36
Trampa inicial	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
Botella blanco	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	6,4	80	80	0,05	0,0125	15,84
B	20	7,5	80	80	0,05	0,0125	11
C	20	8	80	80	0,05	0,0125	8,8
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6

19 // Fecha → 22.07.2011 // Hora → 11:00 h // Tiempo de borboteo → 18 horas

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	7,3	80	80	0,05	0,0125	11,88
B	20	7,7	80	80	0,05	0,0125	10,12
C	20	8,6	80	80	0,05	0,0125	6,16
Trampa inicial	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
Botella blanco	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	7,7	80	80	0,05	0,0125	10,12
B	20	8,3	80	80	0,05	0,0125	7,48
C	20	8,2	80	80	0,05	0,0125	7,92
Trampa inicial	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
Botella blanco	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6

20 // Fecha → 25.07.2011 // Hora → 17:00 h // Tiempo de borboteo → 78 h

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	6,8	80	80	0,05	0,0125	14,08
B	20	7,9	80	80	0,05	0,0125	9,24
C	20	8,5	80	80	0,05	0,0125	6,6
Trampa inicial	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2
Botella blanco	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	7,3	80	80	0,05	0,0125	11,88
B	20	7,9	80	80	0,05	0,0125	9,24
C	20	8	80	80	0,05	0,0125	8,8
Trampa inicial	20	9,6	80	80	0,05	0,0125	1,76
Botella blanco	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2

21 // Fecha → 26.07.2011 // Hora → 17:00 h // Tiempo de borboteo → 24 h

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,4	80	80	0,05	0,0125	7,04
B	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
C	20	9,4	80	80	0,05	0,0125	2,64
Trampa inicial	20	9,8	80	80	0,05	0,0125	0,88
Botella blanco	20	9,9	80	80	0,05	0,0125	0,44

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
B	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
C	20	9,3	80	80	0,05	0,0125	3,08
Trampa inicial	20	9,9	80	80	0,05	0,0125	0,44
Botella blanco	20	9,9	80	80	0,05	0,0125	0,44

22 // Fecha → 27.07.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 25 h

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,3	80	80	0,05	0,0125	7,48
B	20	8,8	80	80	0,05	0,0125	5,28
C	20	8,3	80	80	0,05	0,0125	7,48
Trampa inicial	20	9,2	80	80	0,05	0,0125	3,52
Botella blanco	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72

Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	8,1	80	80	0,05	0,0125	8,36
B	20	8,4	80	80	0,05	0,0125	7,04
C	20	8,2	80	80	0,05	0,0125	7,92
Trampa inicial	20	9	80	80	0,05	0,0125	4,4
Botella blanco	20	8,7	80	80	0,05	0,0125	5,72

23 // Fecha → 28.07.2011 // Hora → 18:00 h // Tiempo de borboteo → 24 h

Muestra → Muestra degradada

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	7,5	80	80	0,05	0,0125	11
B	20	7,6	80	80	0,05	0,0125	10,56
C	20	7,8	80	80	0,05	0,0125	9,68
Trampa inicial	20	8,3	80	80	0,05	0,0125	7,48
Botella blanco	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2

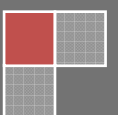
Muestra → Blanco

Matraz	V _{BZ}	V _A	V _{B0}	V _{Bt}	C _A	C _B	Masa CO ₂ atrapada (mg)
A	20	7,7	80	80	0,05	0,0125	10,12
B	20	7,9	80	80	0,05	0,0125	9,24
C	20	7,9	80	80	0,05	0,0125	9,24
Trampa inicial	20	8,4	80	80	0,05	0,0125	7,04
Botella blanco	20	9,5	80	80	0,05	0,0125	2,2

2011

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

TOMA DE DATOS



TOMA DE DATOS

- OBSERVACIONES GENERALES

1. Tener en cuenta que en la plantilla de toma de datos los pocillos están representados al revés: comenzando desde el pocillo 5 hasta el 1, de derecha a izquierda (de la solución con mayor concentración de muestra hasta el blanco).

2. Tener en cuenta los ensayos de estabilidad realizados a las bacterias.

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**1****Fecha Ensayo: 28.02.2011**

Número (nº)	1	HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	12:00 h
Peso	0.48 g		
Conservación	Tº Ambiente/Luz		
Observaciones muestra			

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	68	87	75	82	75	(12:22 h)
LÍNEA 2	69	74	80	69	72	(12:27 h)
LÍNEA 3	74	71	72	75	73	(12:32 h)

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	27	28	44	40	44	(13:07 h)
LÍNEA 2	33	39	41	34	44	(13:12 h)
LÍNEA 3	33	37	41	42	43	(13:17 h)

Medida I₃₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	34	36	41	35	41	(13:25 h)
LÍNEA 2	36	37	44*	33	43	(13:30 h)
LÍNEA 3	37	46	47	39	42	(13:35 h)

OBSERVACIONES

* Se ha derramado una gota del vial al agitar.

1- El paso de la columna 2 a la 3 (en la medida de I₁₅ y I₃₀) debería aumentar la luz emitida.

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**5****Fecha Ensayo: 01.03.2011**

Número (nº)	2	HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	10:45 h
Peso			
Conservación	Tº Ambiente/Luz		
Observaciones muestra			

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	84	75	85	73	76	(11:10 h)
LÍNEA 2	75	72	76	71	69	(11:15 h)
LÍNEA 3	72	68	67	76	69	(11:20 h)

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	41	44	48	53	56	(11:48 h)
LÍNEA 2	36	49	54	49	43	(11:53 h)
LÍNEA 3	39	41	42	44	43	(11:58 h)

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I₃₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	41	42	40	43	41	(12:03 h)
LÍNEA 2	35	40	43	41	39	(12:08 h)
LÍNEA 3	40	38	39	42	38	(12:13 h)

OBSERVACIONES

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**9****Fecha Ensayo: 03.03.2011**

Número (nº)	3	HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	17:50 h
Peso	0.44 g		
Conservación	Tº Ambiente/Luz		
Observaciones muestra			

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	88	79	<u>104</u>	90	98	(18:05 h)
LÍNEA 2	94	95	84	99	90	(18:10 h)
LÍNEA 3	83	93	96	93	89	(18:15 h)

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	39	40	62	56	62	(18:35 h)
LÍNEA 2	---	58	<u>42</u>	58	59	(18:40 h)
LÍNEA 3	40	52	58	61	59	(18:45 h)

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I₃₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	41	40	60	52	59	(18:50 h)
LÍNEA 2	---	54	35	56	54	(18:55 h)
LÍNEA 3	42	51	56	58	55	(19:00 h)

OBSERVACIONES

--- Lectura no válida: he trasvasado 1 ml del vial de la fila 1 al vial de la fila 2 (en realidad hay que trasvasar 0.5 ml).

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**13****Fecha Ensayo: 03.03.2011**

Número (nº)	4	HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	17:50 h
Peso	0.44 g		
Conservación	Tº Ambiente/Luz		
Observaciones muestra			

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	66	61	61	64	68	(19:30 h)
LÍNEA 2	63	61	71	58	60	(19:35 h)
LÍNEA 3	55	58	61	53	58	(19:40 h)

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	44	45	47	49	51	(19:50 h)
LÍNEA 2	44	47	58	48	49	(19:55 h)
LÍNEA 3	38	45	52	44	50	(20:00 h)

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I_{30}

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	45	45	46	49	51	(20:05 h)
LÍNEA 2	45	46	55	47	48	(20:10 h)
LÍNEA 3	40	46	50	43	49	(20:15 h)

OBSERVACIONES

- 1- Vemos como la emisión de luz no disminuye claramente al añadir el lixiviado.
- 2- El blanco experimenta prácticamente la misma disminución.
- 3- No hay diferencia clara entre I_{15} y I_{30} , por lo que la disminución de luz se produce en los primeros 15-20 min tras añadir el lixiviado.

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**17****Fecha Ensayo: 04.03.2011**

Número (nº)	5	HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	11:00 h
Peso			
Conservación	Tº Ambiente/Luz	Observaciones muestra	
Observaciones muestra			

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	88	83	85	83	80	(11:35 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	56	63	63	63	60	(11:57 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I_{30}

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	50	60	60	61	57	(12:12 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

OBSERVACIONES

1- En este ensayo sólo he realizado una línea porque se espera que la muestra no aporte datos significativos como para afirmar que es tóxica (las demás muestras estudiadas anteriormente no parecen afectar de manera clara a la emisión de luz).

2- Los datos obtenidos no son, como se esperaba, nada significativos, siendo la disminución de luz para las distintas concentraciones parecida a la que se produce en el blanco.

3- En la lectura de I_{30} se obtiene un valor de emisión de luz del blanco menor que el obtenido en alguno de los viales a los que se les ha añadido la muestra diluida (no tiene sentido).

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**21****Fecha Ensayo: 04.03.2011**

Número (nº)	6	HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	11:00 h
Peso			
Conservación	Tº Ambiente/Luz		
Observaciones muestra			

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	79	73	85	87	82	(11:40 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	54	50	59	65	63	(12:02 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I₃₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	55	49 -	57	60	57	(12:17 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

OBSERVACIONES

- 1- El ensayo de esta muestra se ha realizado a la vez que el ensayo de la muestra 17.
- 2- Observación 1 (muestra 17).

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**6****Fecha Ensayo: 04.03.2011**

Número (nº)	2	HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	11:00 h
Peso	0.45 g		
Conservación	Nevera/ Tª =		
Observaciones muestra			

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	68	63	69	61	57	(12:38 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	49	48	49	48	48	(13:05 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I₃₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	48	47	46	42	40	(13:20 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

OBSERVACIONES

- 1- Los viales utilizados son reutilizados (lavados del ensayo anterior).
- 2- Observación 1 (muestra 17).

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**7****Fecha Ensayo: 04.03.2011**

Número (nº)	2	HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	11:00 h
Peso			
Conservación	Tº Ambiente/Sin luz		
Observaciones muestra			

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	55	64	62	60	61	(12:45 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	49	51	52	49	48	(13:15 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I₃₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	45	47	48	46	47	(13:30 h)
LÍNEA 2						
LÍNEA 3						

OBSERVACIONES

- 1- Ensayo realizado en paralelo con el de la muestra anterior.
- 2- No hay prácticamente diferencia entre la disminución de luz del blanco y la de las diferentes concentraciones de muestra.
- 3- Observación 1 (muestra 17).

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**4****Fecha Ensayo: 17.03.2011**

Número (nº)	1
Peso	0.46 g
Conservación	Estufa/ Tª = 100 °C
Observaciones muestra	- Algunas partes de la muestra (sobre todo los bordes) tienen color marrón. - Dejo enfriar el vial unos 20 min antes de extraer la muestra. - Hay más presión en el interior del vial (Tª): tapón curvado hacia arriba.

HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	14:00 h
-------------------------------	---------

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	93	75	95	91	99	(14:50 h)
LÍNEA 2	99	99	100	99	104	(14:55 h)
LÍNEA 3	76	74	69	81	74	(*)

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	23	28	48	54	72	(15:15 h)
LÍNEA 2	27	38	48	58	80	(15:20 h)
LÍNEA 3	27	32	39	55	59	(*)

Medida I₃₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	21	26	45	49	73	(15:30 h)
LÍNEA 2	23	33	43	54	75	(15:35 h)
LÍNEA 3	24	29	36	50	59	(*)

OBSERVACIONES

(*) La línea 3 no la he realizado en paralelo a la 1 y 2, como suelo hacer normalmente. Olvidé apuntar la hora a la que medí esta línea, pero se ven claramente unos valores menores: con el tiempo las bacterias van perdiendo luz por sí mismas.

- Obtengo valores más cercanos a lo esperado.

Para esta muestra y sólo con la línea número 3, he realizado la medida I₅.

	5	4	3	2	1
LÍNEA 3	30	34	42	58	60

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**8****Fecha Ensayo: 17.03.2011**

Número (nº)	2
Peso	0.44 g
Conservación	Estufa/ Tª = 100 °C
Observaciones muestra	- Algunas partes de la muestra (sobre todo los bordes) tienen color marrón. - Dejo enfriar el vial unos 20 min antes de extraer la muestra. - Hay más presión en el interior del vial (Tª): tapón curvado hacia arriba.

HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	14:00 h
-------------------------------	---------

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	62	60	61	66	62	(16:50 h)
LÍNEA 2	58	59	61	64	64	(16:55 h)
LÍNEA 3						

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	14	17	28	40	<u>36</u>	(17:15 h)
LÍNEA 2	14	22	31	41	60	(17:20 h)
LÍNEA 3						

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I₃₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	12	13	24	37	<u>15</u>	(17:30 h)
LÍNEA 2	13	19	28	38	62	(17:35 h)
LÍNEA 3						

OBSERVACIONES

1- == Estas lecturas las voy a considerar no válidas porque es imposible que haya una disminución del nivel de luz tan grande en el vial correspondiente al blanco. Creo que no he cometido ningún error al hacer las disoluciones, aunque supongo que en algo he fallado durante el proceso.

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**12****Fecha Ensayo: 18.03.2011**

Número (nº)	3
Peso	0.44 g
Conservación	Estufa/ Tª = 100 °C
Observaciones muestra	- Algunas partes de la muestra (sobre todo los bordes) tienen color marrón. - Dejo enfriar el vial unos 20 min antes de extraer la muestra. - Hay más presión en el interior del vial (Tª): tapón curvado hacia arriba.

HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	10:50 h
-------------------------------	---------

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	82	76	78	73	80	(11:23 h)
LÍNEA 2	82	77	77	61	78	(11:28 h)
LÍNEA 3						

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	24	31	48	57	83	(11:46 h)
LÍNEA 2	27	37	45	38	71	(11:46 h)
LÍNEA 3						

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I_{30}

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	21	28	43	50	73	(12:01 h)
LÍNEA 2	23	34	44	32	69	(12:01 h)
LÍNEA 3						

OBSERVACIONES

1- Los valores en la columna 2 son menores de lo esperado. Creo que es debido a que he puesto menos de 10 μl de bacterias ya que la medida de I_0 es también más baja de lo normal.

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**16****Fecha Ensayo: 18.03.2011**

Número (nº)	4
Peso	0.44 g
Conservación	Estufa/ Tª = 100 °C
Observaciones muestra	- Algunas partes de la muestra (sobre todo los bordes) tienen color marrón. - Dejo enfriar el vial unos 20 min antes de extraer la muestra. - Hay más presión en el interior del vial (Tª): tapón curvado hacia arriba.

HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	10:50 h
-------------------------------	---------

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	68	66	73	65	62	(12:35 h)
LÍNEA 2	68	64	62	65	70	(12:40 h)
LÍNEA 3						

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	40	53	66	72	83	(12:55 h)
LÍNEA 2	41	51	60	72	96	(12:55 h)
LÍNEA 3						

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I_{30}

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	35	51	64	72	81	(13:10 h)
LÍNEA 2	36	48	61	73	97	(13:10 h)
LÍNEA 3						

OBSERVACIONES

1- Se observa un AUMENTO de la luz emitida por el blanco. No sé a qué puede ser debido. (¿mala lectura de I_0 ?)

2- Además, en las columnas 3 y 4, la luz no disminuye al añadir la disolución de la muestra, sino que se mantiene o incluso aumenta un poco.

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**20****Fecha Ensayo: 21.03.2011**

Número (nº)	5
Peso	0.44 g
Conservación	Estufa/ Tª = 100 °C
Observaciones muestra	- Algunas partes de la muestra (sobre todo los bordes) tienen color marrón. - Dejo enfriar el vial unos 20 min antes de extraer la muestra. - Hay más presión en el interior del vial (Tª): tapón curvado hacia arriba.

HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	17:30 h
-------------------------------	---------

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	92	80	80	82	79	(18:00 h)
LÍNEA 2	81	88	68	79	72	(18:05 h)
LÍNEA 3						

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	20	22	30	37	54	(18:30 h)
LÍNEA 2	20	23	26	38	52	(18:30 h)
LÍNEA 3						

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I₃₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	16	18	25	34	43	(18:45 h)
LÍNEA 2	17	20	22	33	42	(18:45 h)
LÍNEA 3						

OBSERVACIONES

--	--

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Muestra**24****Fecha Ensayo: 21.03.2011**

Número (nº)	6
Peso	g
Conservación	Estufa/ Tª = 100 °C
Observaciones muestra	- Algunas partes de la muestra (sobre todo los bordes) tienen color marrón. - Dejo enfriar el vial unos 20 min antes de extraer la muestra. - Hay más presión en el interior del vial (Tª): tapón curvado hacia arriba.

HORA RECONSTITUCIÓN BACTERIAS	17:30 h
----------------------------------	---------

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	42	43	42	38	40	(19:10 h)
LÍNEA 2	42	42	43	40	43	(19:15 h)
LÍNEA 3						

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	14	22	25	27	33	(19:35 h)
LÍNEA 2	14	21	26	29	35	(19:35 h)
LÍNEA 3						

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I₃₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	13	20	25	26	35	(19:50 h)
LÍNEA 2	13	20	28	29	37	(19:50 h)
LÍNEA 3						

OBSERVACIONES

--	--

TOMA DE DATOS DEL ESTÁNDAR

Ensayo con estándar (nº 1) // Fecha Ensayo: 14.02.2011

Estándar de $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ }
 Concentración = 10 mg/l }

	5	4	3	2	1
<u>Medida I₀</u>	72	77	64	66	79
<u>Medida I₁₅</u>	0	0	0	0	65
<u>Medida I₃₀</u>					

OBSERVACIONES

- Estándar demasiado concentrado: altamente tóxico para las bacterias.
- Estándar tomado directamente de la disolución inicial de sulfato de cinc heptahidratado.

Ensayo con estándar (nº 2) // Fecha Ensayo: 14.02.2011

Estándar de $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ }
 Concentración = 1 mg/l }

	5	4	3	2	1
<u>Medida I₀</u>	82	84	81	84	90
<u>Medida I₁₅</u>	0	0	0	0	76
<u>Medida I₃₀</u>					

OBSERVACIONES

- Estándar demasiado concentrado: altamente tóxico.
- Estándar preparado tomando 1 ml de la disolución inicial de sulfato de cinc de concentración 10 mg/l y añadiendo 9 ml de diluyente.

Ensayo con estándar (nº 3) // Fecha Ensayo: 22.02.2011

Estándar de $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$ }
 Concentración = 0.2 mg/l }

	5	4	3	2	1
<u>Medida I_0</u>	55	57	56	64	66
<u>Medida I_{15}</u>	0	0	0	2	49
<u>Medida I_{30}</u>					

OBSERVACIONES

- Las bacterias utilizadas para realizar el ensayo llevaban reconstituidas aproximadamente 1 hora y 15 min. De ahí que los valores de I_0 no sean muy elevados.
- La disolución de estándar se ha preparado tomando 0.2 ml del estándar inicial (10 mg/l) y completando hasta 10 ml con solución diluyente. Por lo tanto obtengo una disolución de concentración 0.2 mg/l.
- El blanco ha disminuido considerablemente en el tiempo transcurrido entre la medida de I_0 y I_{15} (aproximadamente unos 30 minutos).

Ensayo con estándar (nº 4) // Fecha Ensayo: 22.02.2011

Estándar de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ }
 Concentración = 0.1 mg/l }

	5	4	3	2	1
<u>Medida I₀</u>	54	51	42	49	61
<u>Medida I₁₅</u>	0	1	1	2	62
<u>Medida I₃₀</u>					

OBSERVACIONES

- Muestra preparado tomando 0.1 ml de la disolución estándar inicial (10 mg/l) y completando hasta 10 ml con solución diluyente.
- Las bacterias utilizadas en el ensayo han sido reconstituidas aproximadamente 1 hora y 45 minutos antes de realizarlo.
- En este caso, a diferencia que en el ensayo con estándar nº3, la medida del blanco podemos considerarla estable a lo largo del tiempo. Creo que puede ser debido a que las bacterias llevan reconstituidas entre casi dos horas.

Ensayo con estándar (nº 5) // Fecha Ensayo: 25.02.2011Estándar de $ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$

Concentración = 0.01 mg/l

-- Reconstitución bacterias -- 11:15 h

Medida I₀

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	78	79	72	76	72	(12:22 h)
LÍNEA 2	62	56	54	56	60	(12:27 h)
LÍNEA 3	52	46	47	56	58	(12:32 h)

Medida I₁₅

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	13	14	21	28	50	(00:00 h)
LÍNEA 2	14	8	11	17	44	(00:00 h)
LÍNEA 3	10	10	13	21	43	(00:00 h)

Ensayo Microtox: Determinación de la toxicidad de materiales plásticos

Medida I_{30}

	5	4	3	2	1	
LÍNEA 1	4	4	6	9	46	(00:00 h)
LÍNEA 2	7	2	3	5	42	(00:00 h)
LÍNEA 3	3	3	4	7	44	(00:00 h)

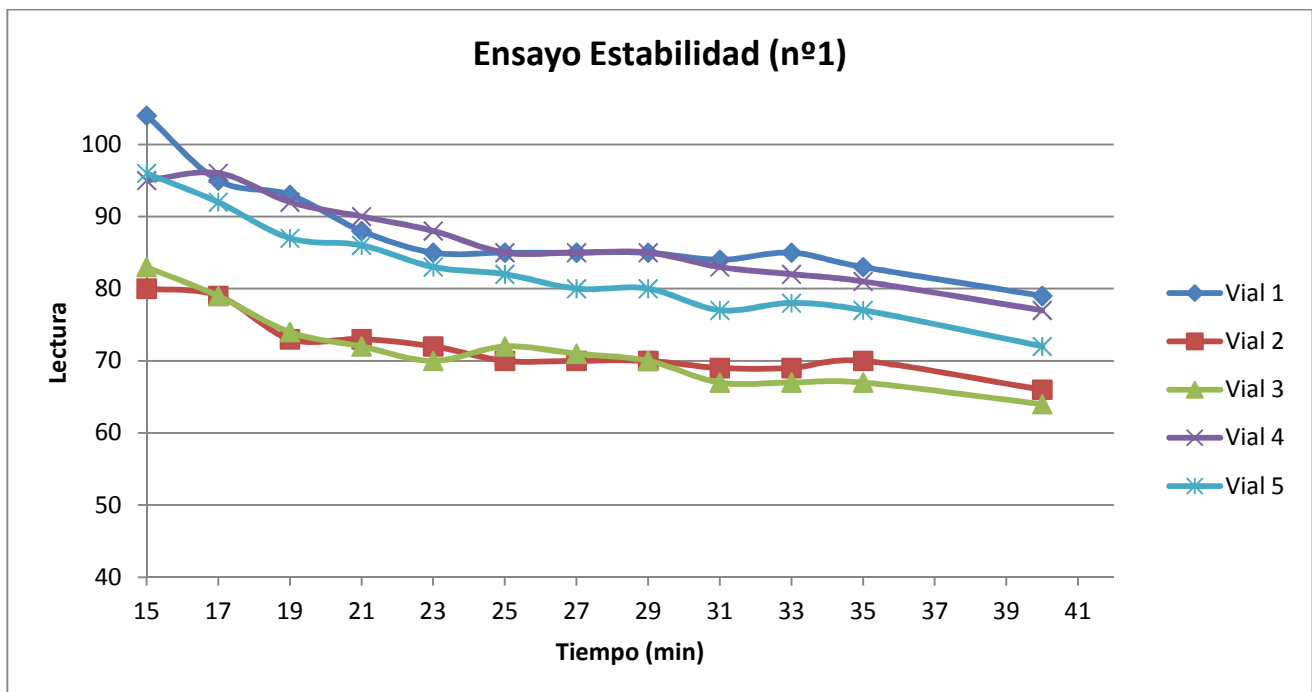
OBSERVACIONES

- Cuando se ha hecho la medida de I_0 las bacterias llevaban reconstituidas unos 20-25 min.
 → En este caso las bacterias no llevaban mucho tiempo reconstituidas pero he obtenido valores no muy altos y bastante próximos entre sí, comparados con los obtenidos en otros ensayos.
- La muestra la he preparado tomando 0.01 ml del estándar inicial (10 mg/l) y completando hasta 10 ml con la disolución diluyente.
- Otra vez se observa una gran caída de luz en el blanco.
- Este ensayo lo he realizado por triplicado porque se observa mejor la acción del estándar.

ENSAYOS DE ESTABILIDAD EN LA EMISIÓN DE LUZ

Ensayo de estabilidad (nº 1) // Fecha Ensayo: 14.02.2011

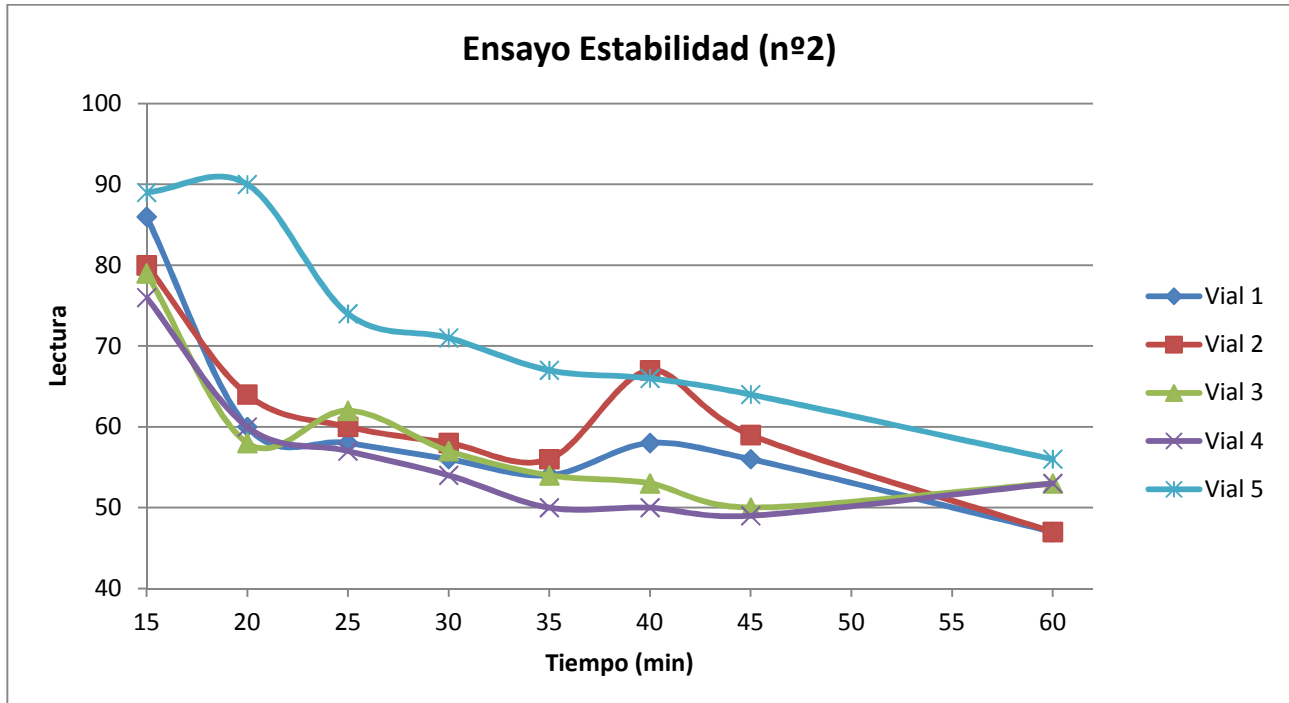
Vial \ Tiempo	5	4	3	2	1
15 min	96	95	83	80	104
17 min	92	96	79	79	95
19 min	87	92	74	73	93
21 min	86	90	72	73	88
23 min	83	88	70	72	85
25 min	82	85	72	70	85
27 min	80	85	71	70	85
29 min	80	85	70	70	85
31 min	77	83	67	69	84
33 min	78	82	67	69	85
35 min	77	81	67	70	83
40 min	72	77	64	66	79



* Bacterias reconstituidas aproximadamente 20 minutos antes de realizar el ensayo.

Ensayo de estabilidad (nº 2) // Fecha Ensayo: 22.02.2011

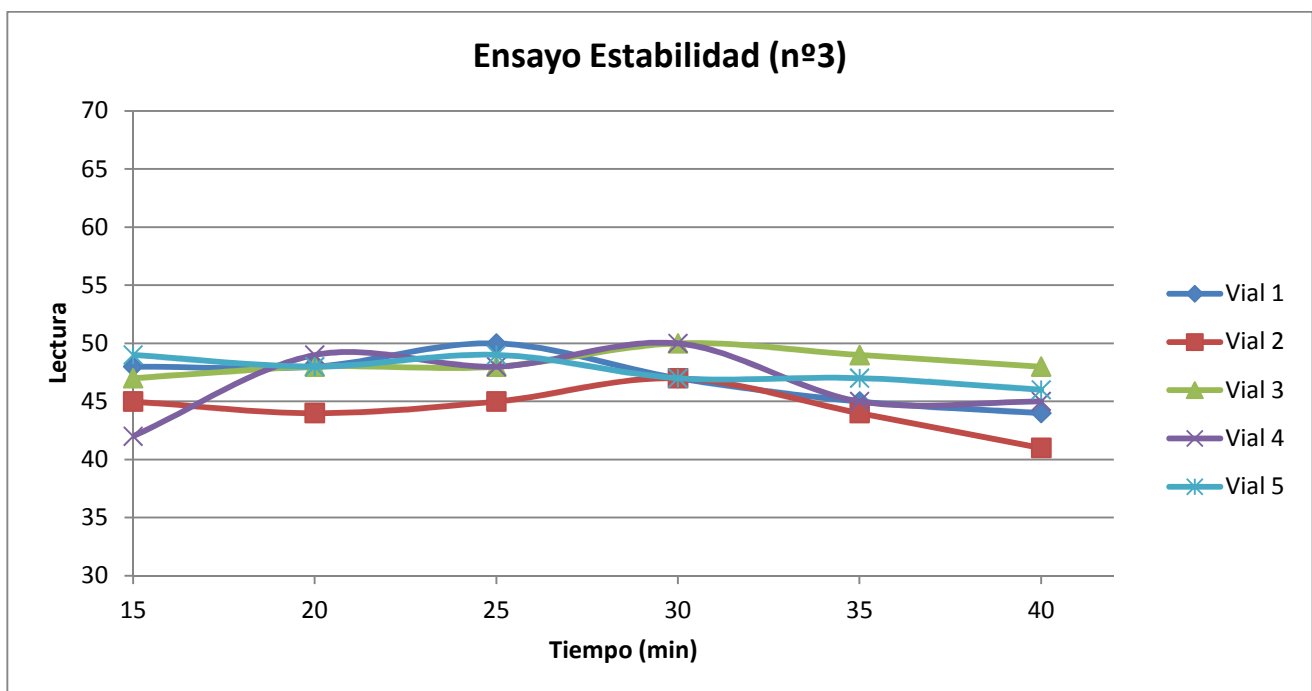
Vial \ Tiempo	5	4	3	2	1
15 min	89	76	79	80	86
20 min	90	60	58	64	60
25 min	74	57	62	60	58
30 min	71	54	57	58	56
35 min	67	50	54	56	54
40 min	66	50	53	67	58
45 min	64	49	50	59	56
60 min	56	53	53	47	47



* Bacterias reconstituidas aproximadamente 20 minutos antes de realizar el ensayo.

Ensayo de estabilidad (nº 3) // Fecha Ensayo: 28.02.2011

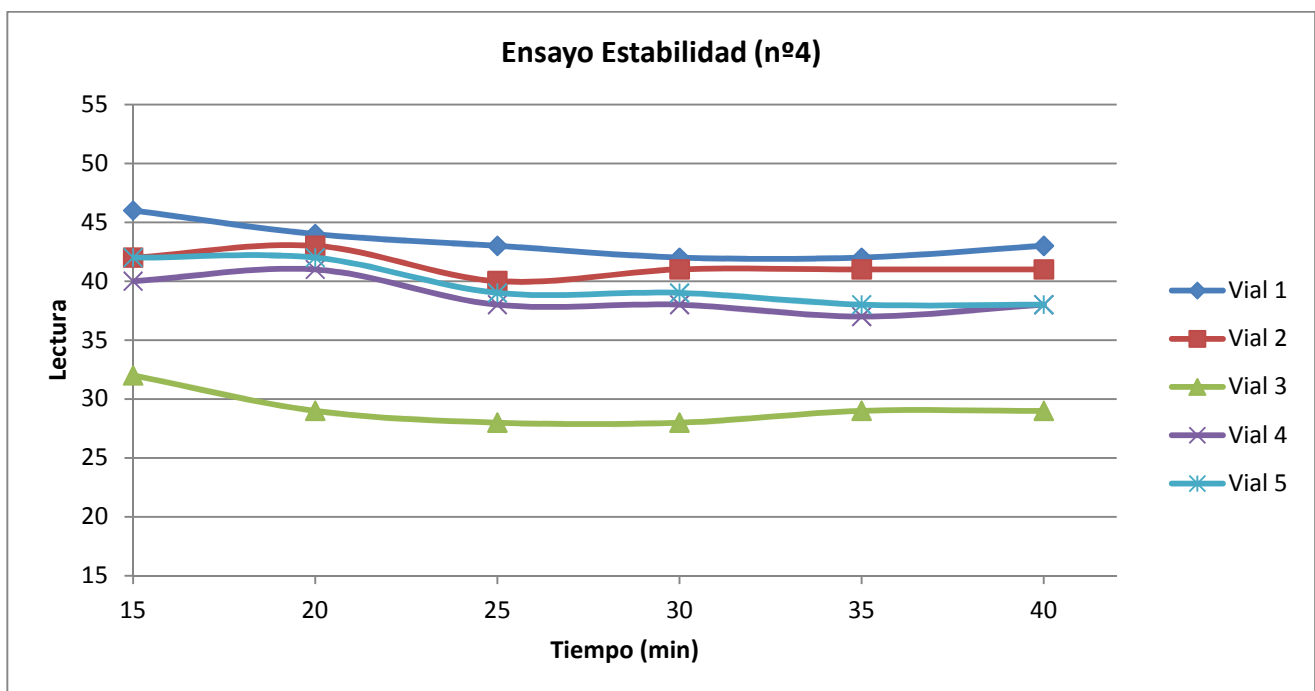
Vial \ Tiempo	5	4	3	2	1
15 min	49	42	47	45	48
20 min	48	49	48	44	48
25 min	49	48	48	45	50
30 min	47	50	50	47	47
35 min	47	45	49	44	45
40 min	46	45	48	41	44



* Bacterias reconstituidas aproximadamente 1 hora y 30 minutos antes realizar el ensayo.

Ensayo de estabilidad (nº 4) // Fecha Ensayo: 01.03.2011

Vial \ Tiempo	5	4	3	2	1
15 min	42	40	32	42	46
20 min	42	41	29	43	44
25 min	39	38	28	40	43
30 min	39	38	28	41	42
35 min	38	37	29	41	42
40 min	38	38	29	41	43

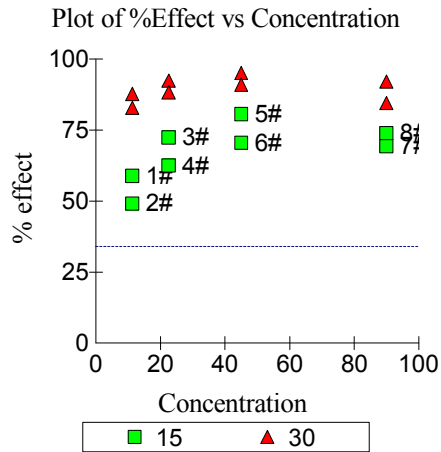
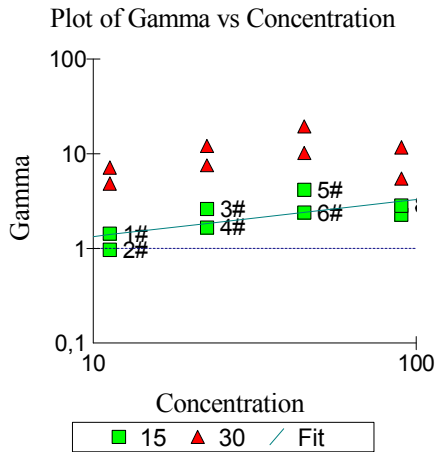


* Bacterias reconstituidas aproximadamente 1 hora y media antes de realizar el ensayo.

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 07:09

Test Protocol: Basic Test
 Sample: Sample standar 0.01
 Toxicant: -
 Reagent Lot no.: -
 Test description: Standar 0.01 mg/l
 Test name: Standar 0.01 mg/l
 Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	15 Mins Data:			30 Mins Data:				
		Io	It	Gamma	% effect	It	Gamma	% effect	
Control	0.000	60,00	44,00	0.0000	#	42,00	0.0000	#	
Control	0.000	58,00	43,00	0.0000	#	44,00	0.0000	#	
1	11.00	56,00	17,00	1.000	#	58.00%	5,00	7.000	87.00%
2	11.00	56,00	21,00	0.0000	#	49.00%	7,00	4.000	82.00%
3	22.00	54,00	11,00	2.000	#	72.00%	3,00	12.00	92.00%
4	22.00	47,00	13,00	1.000	#	62.00%	4,00	7.000	88.00%
5	45.00	56,00	8,00	4.000	#	80.00%	2,00	19.00	95.00%
6	45.00	46,00	10,00	2.000	#	70.00%	3,00	10.00	91.00%
7	90.00	62,00	14,00	2.000	#	69.00%	7,00	5.000	84.00%
8	90.00	52,00	10,00	2.000	#	73.00%	3,00	11.00	92.00%

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Calculations on 15 Mins data:
 EC50 Concentration: 11.00% (95% confidence range: 4.000 to 35.00)
 95% Confidence Factor: 2.000
 Estimating Equation: LOG C = 1.000 x LOG G + 1.000
 Coeff. of Determination (R²): 0.0000
 Slope: 0.0000
 Correction Factor: 0.0000

Satistical calculations could not be performed on the 30 Mins data.
 Highest % effect: 95.00%

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:27

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:05

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 1

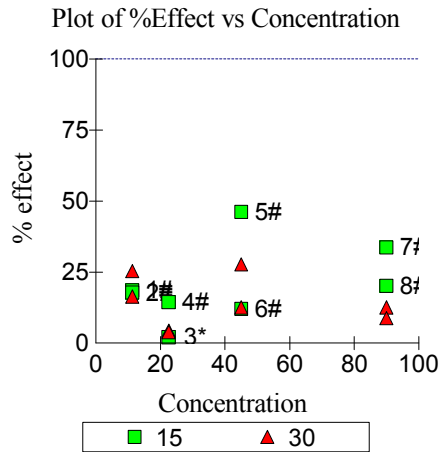
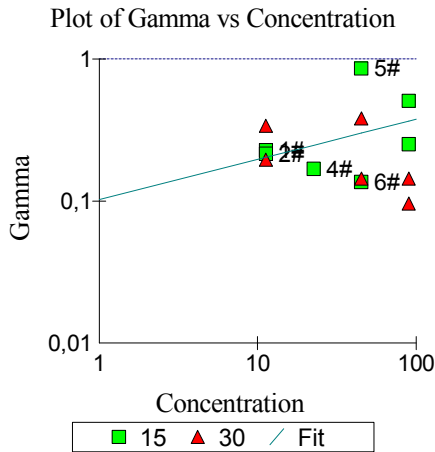
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: -

Test name: Sample 1

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	15 Mins Data:			30 Mins Data:		
		Io	It	Gamma % effect	It	Gamma % effect	
Control	0.000	75,00	44,00	0.0000 #	41,00	0.0000 #	
Control	0.000	72,00	44,00	0.0000 #	43,00	0.0000 #	
1	11.00	82,00	40,00	0.0000 # 18.00%	35,00	0.0000 # 25.00%	
2	11.00	69,00	34,00	0.0000 # 17.00%	33,00	0.0000 # 16.00%	
3	22.00	75,00	44,00	2.000 * 2.000%	41,00	4.000 * 4.000%	
4	22.00	80,00	41,00	0.0000 # 14.00%	44,00	3.000 * 3.000%	
5	45.00	87,00	28,00	0.0000 # 46.00%	36,00	0.0000 # 27.00%	
6	45.00	74,00	39,00	0.0000 # 11.00%	37,00	0.0000 # 12.00%	
7	90.00	68,00	27,00	0.0000 # 33.00%	34,00	0.0000 # 12.00%	
8	90.00	69,00	33,00	0.0000 # 20.00%	36,00	9.000 # 8.000%	

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Calculations on 15 Mins data:

EC50 Concentration:65.00% (95% confidence range: 8.000 to 509.0)

95% Confidence Factor: 7.000

Estimating Equation:LOG C =0.0000 x LOG G +1.000

Coeff. of Determination (R²):0.0000

Slope: 0.0000

Correction Factor: 0.0000

Calculations on 30 Mins data:

EC50 Concentration:6.000% (95% confidence range: 0.0000 to 194.0)

95% Confidence Factor: 30.00

EC50 value was calculated from extrapolated data.

Estimating Equation: $\text{LOG C} = -1.000 \times \text{LOG G} + 0.0000$

Coeff. of Determination (R^2): 0.0000

Slope: 0.0000

Correction Factor: 0.0000

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:45

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:32

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 4

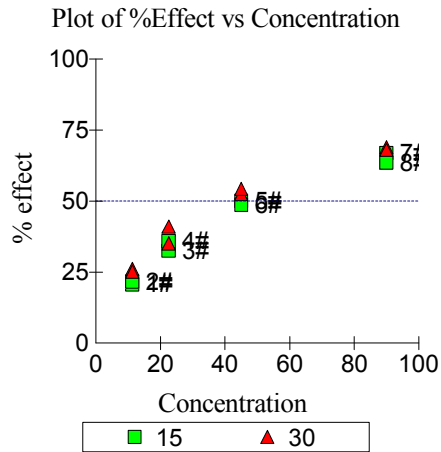
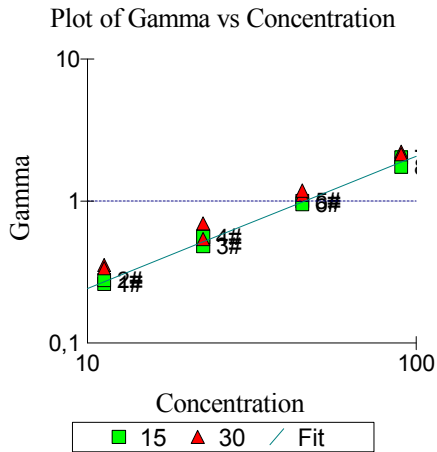
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: Sample 4

Test name: Sample 4

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	15 Mins Data:				30 Mins Data:		
		Io	It	Gamma	% effect	It	Gamma	% effect
Control	0.000	99,00	72,00	0.0000 #		73,00	0.0000 #	
Control	0.000	104,00	80,00	0.0000 #		75,00	0.0000 #	
1	11.00	91,00	54,00	0.0000 #	20.00%	49,00	0.0000 #	26.00%
2	11.00	99,00	58,00	0.0000 #	21.00%	54,00	0.0000 #	25.00%
3	22.00	95,00	48,00	0.0000 #	32.00%	45,00	0.0000 #	35.00%
4	22.00	100,00	48,00	0.0000 #	35.00%	43,00	0.0000 #	41.00%
5	45.00	75,00	28,00	1.000 #	50.00%	26,00	1.000 #	52.00%
6	45.00	99,00	38,00	0.0000 #	48.00%	33,00	1.000 #	54.00%
7	90.00	93,00	23,00	2.000 #	66.00%	21,00	2.000 #	69.00%
8	90.00	99,00	27,00	1.000 #	63.00%	23,00	2.000 #	68.00%

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Calculations on 15 Mins data:

EC50 Concentration:45.00% (95% confidence range: 42.00 to 48.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation:LOG C =1.000 x LOG G +1.000

Coeff. of Determination (R²):0.0000

Slope: 0.0000

Correction Factor: 0.0000

Calculations on 30 Mins data:

EC50 Concentration:37.00% (95% confidence range: 35.00 to 41.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation:LOG C =1.000 x LOG G +1.000

Coeff. of Determination (R^2):0.0000
Slope: 0.0000
Correction Factor: 0.0000

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:36

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:12

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 5

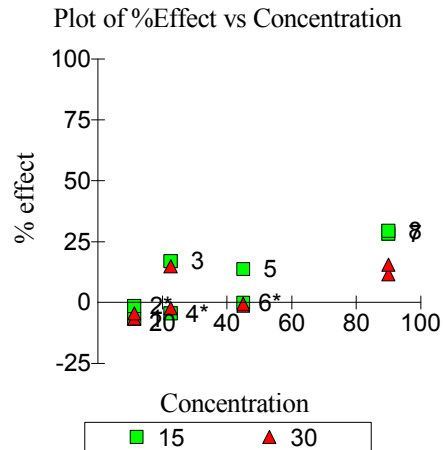
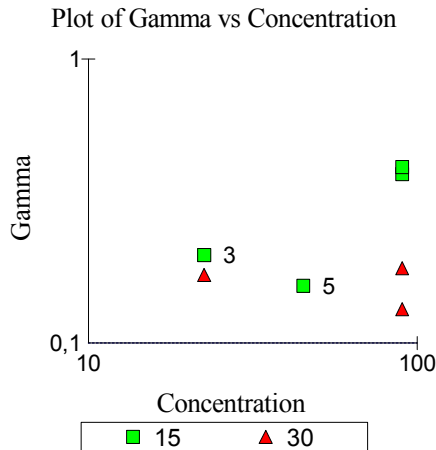
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: Sample 5

Test name: Sample 5

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	15 Mins Data:			30 Mins Data:		
		Io	It	Gamma % effect	It	Gamma % effect	
Control	0.000	76,00	56,00	0.0000 #	41,00	0.0000 #	
Control	0.000	69,00	43,00	0.0000 #	39,00	0.0000 #	
1	11.00	73,00	53,00	-6.000 *	43,00	-6.000 *	
2	11.00	71,00	49,00	-1.000 *	41,00	-4.000 *	
3	22.00	85,00	48,00	0.0000	40,00	0.0000	
4	22.00	76,00	54,00	-4.000 *	43,00	-2.000 *	
5	45.00	75,00	44,00	0.0000	42,00	-1.000 *	
6	45.00	72,00	49,00	-7.000 *	40,00	-5.000 *	
7	90.00	84,00	41,00	0.0000	41,00	0.0000	
8	90.00	75,00	36,00	0.0000	35,00	0.0000	

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Statistical calculations could not be performed on the 15 Mins data.

Highest % effect: 29.00%

Statistical calculations could not be performed on the 30 Mins data.

Highest % effect: 15.00%

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:35

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 8

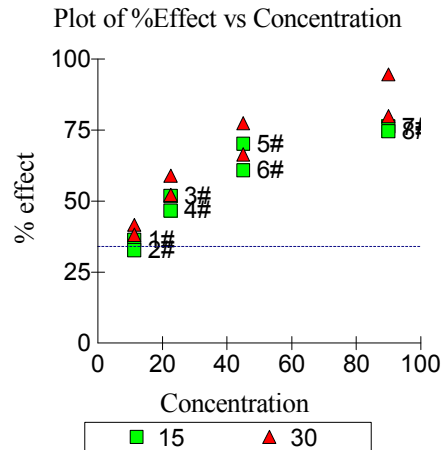
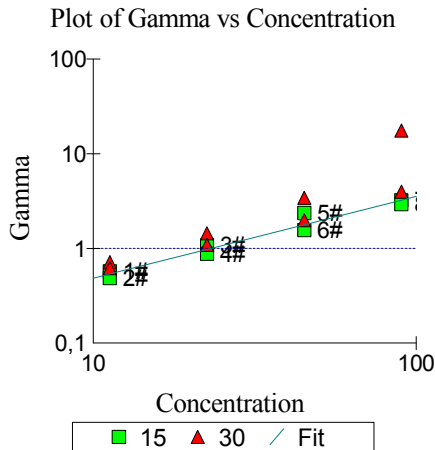
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: Sample 8

Test name: Sample 8

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	Io	15 Mins Data:			30 Mins Data:		
			It	Gamma	% effect	It	Gamma	% effect
Control	0.000	62,00	60,00	0.0000	#	59,00	0.0000	#
Control	0.000	64,00	60,00	0.0000	#	62,00	0.0000	#
1	11.00	66,00	40,00	0.0000	#	37,00	0.0000	#
2	11.00	64,00	41,00	0.0000	#	38,00	0.0000	#
3	22.00	61,00	28,00	1.000	#	24,00	1.000	#
4	22.00	61,00	31,00	0.0000	#	28,00	1.000	#
5	45.00	60,00	17,00	2.000	#	13,00	3.000	#
6	45.00	59,00	22,00	1.000	#	19,00	1.000	#
7	90.00	62,00	14,00	3.000	#	12,00	3.000	#
8	90.00	58,00	14,00	2.000	#	3,00	17.00	#

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Calculations on 15 Mins data:

EC50 Concentration: 23.00% (95% confidence range: 19.00 to 27.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation: $\text{LOG C} = 1.000 \times \text{LOG G} + 1.000$

Coeff. of Determination (R^2): 0.0000

Slope: 0.0000

Correction Factor: 0.0000

Calculations on 30 Mins data:

EC50 Concentration: 19.00% (95% confidence range: 13.00 to 28.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation: $\text{LOG C} = 0.0000 \times \text{LOG G} + 1.000$

Coeff. of Determination (R^2):0.0000
Slope: 1.000
Correction Factor: 0.0000

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:35

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:16

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 9

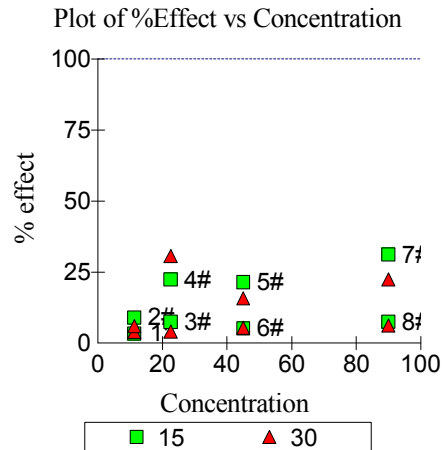
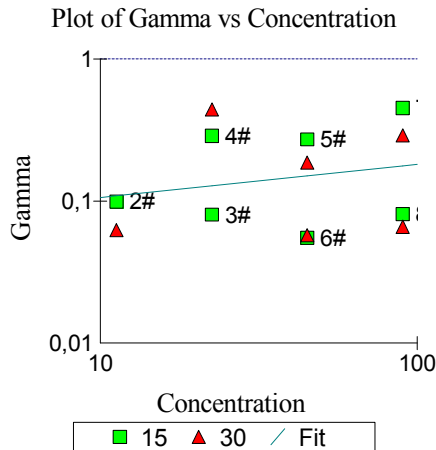
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: -

Test name: Sample 9

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	15 Mins Data:			30 Mins Data:		
		Io	It	Gamma	It	Gamma	% effect
Control	0.000	98,00	62,00	0.0000 #	59,00	0.0000 #	
Control	0.000	90,00	59,00	0.0000 #	54,00	0.0000 #	
1	11.00	90,00	56,00	3.000 *	52,00	4.000 *	3.000%
2	11.00	99,00	58,00	9.000 #	56,00	6.000 #	5.000%
3	22.00	104,00	62,00	8.000 #	60,00	4.000 *	4.000%
4	22.00	84,00	42,00	0.0000 #	35,00	0.0000 #	30.00%
5	45.00	79,00	40,00	0.0000 #	40,00	0.0000 #	15.00%
6	45.00	95,00	58,00	5.000 #	54,00	0.0000 #	5.000%
7	90.00	88,00	39,00	0.0000 #	41,00	0.0000 #	22.00%
8	90.00	94,00	56,00	8.000 #	53,00	6.000 #	6.000%

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Calculations on 15 Mins data:

EC50 Concentration:55.00% (95% confidence range: 6.000 to 512.0)

95% Confidence Factor: 9.000

Estimating Equation:LOG C =0.0000 x LOG G +1.000

Coeff. of Determination (R²):4.000

Slope: 0.0000

Correction Factor: 0.0000

Calculations on 30 Mins data:

EC50 Concentration:46.00% (95% confidence range: 2.000 to 714.0)

95% Confidence Factor: 15.00

Estimating Equation:LOG C =0.0000 x LOG G +1.000

Coeff. of Determination (R^2):5.000
Slope: 8.000
Correction Factor: 0.0000

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:43

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:39

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 12

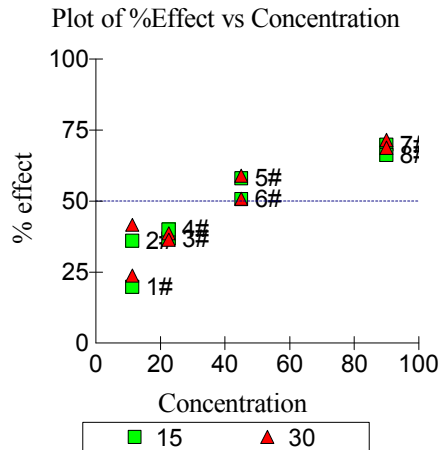
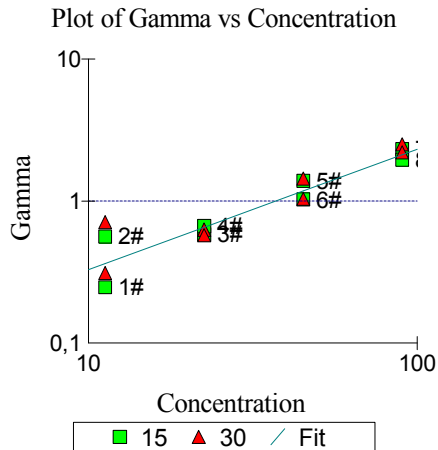
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: Sample 12

Test name: Sample 12

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	15 Mins Data:			30 Mins Data:		
		Io	It	Gamma	It	Gamma	% effect
Control	0.000	80,00	83,00	1.000 #	73,00	0.0000 #	
Control	0.000	78,00	71,00	0.0000 #	69,00	0.0000 #	
1	11.00	73,00	57,00	0.0000 #	50,00	0.0000 #	23.00%
2	11.00	61,00	38,00	0.0000 #	32,00	0.0000 #	41.00%
3	22.00	78,00	48,00	0.0000 #	43,00	0.0000 #	38.00%
4	22.00	77,00	45,00	0.0000 #	44,00	0.0000 #	36.00%
5	45.00	76,00	31,00	1.000 #	28,00	1.000 #	58.00%
6	45.00	77,00	37,00	1.000 #	34,00	1.000 #	50.00%
7	90.00	82,00	24,00	2.000 #	21,00	2.000 #	71.00%
8	90.00	82,00	27,00	1.000 #	23,00	2.000 #	68.00%

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Calculations on 15 Mins data:

EC50 Concentration:36.00% (95% confidence range: 28.00 to 47.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation:LOG C =1.000 x LOG G +1.000

Coeff. of Determination (R²):0.0000

Slope: 0.0000

Correction Factor: 0.0000

Calculations on 30 Mins data:

EC50 Concentration:33.00% (95% confidence range: 25.00 to 45.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation:LOG C =1.000 x LOG G +1.000

Coeff. of Determination (R^2):0.0000
Slope: 0.0000
Correction Factor: 0.0000

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:32

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:21

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 13

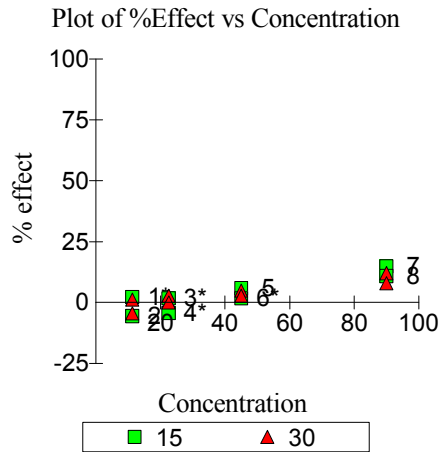
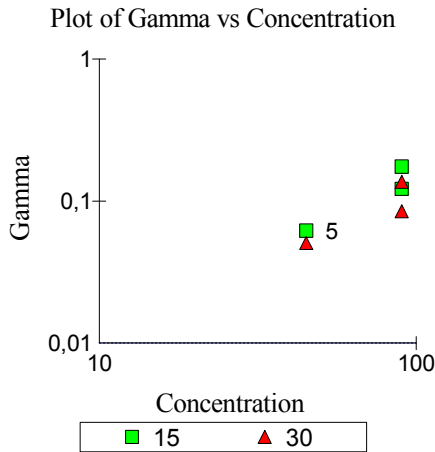
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: -

Test name: Sample 13

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	Io	15 Mins Data:			30 Mins Data:		
			It	Gamma	% effect	It	Gamma	% effect
Control	0.000	68,00	51,00	0.0000	#	51,00	0.0000	#
Control	0.000	60,00	49,00	0.0000	#	48,00	0.0000	#
1	11.00	64,00	49,00	2.000 *	2.000%	49,00	1.000 *	1.000%
2	11.00	58,00	48,00	-5.000 *	-5.000%	47,00	-4.000 *	-4.000%
3	22.00	61,00	47,00	1.000 *	1.000%	46,00	2.000 *	2.000%
4	22.00	71,00	58,00	-4.000 *	-4.000%	55,00	4.000 *	4.000%
5	45.00	61,00	45,00	6.000	5.000%	45,00	5.000	4.000%
6	45.00	61,00	47,00	1.000 *	1.000%	46,00	2.000 *	2.000%
7	90.00	66,00	44,00	0.0000	14.00%	45,00	0.0000	12.00%
8	90.00	63,00	44,00	0.0000	10.00%	45,00	8.000	7.000%

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Satistical calculations could not be performed on the 15 Mins data.

Highest % effect: 14.00%

Satistical calculations could not be performed on the 30 Mins data.

Highest % effect: 12.00%

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:44

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 16

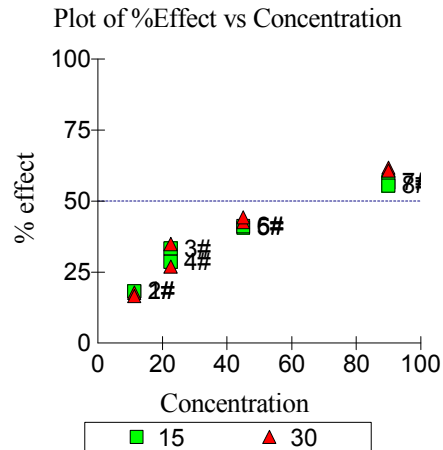
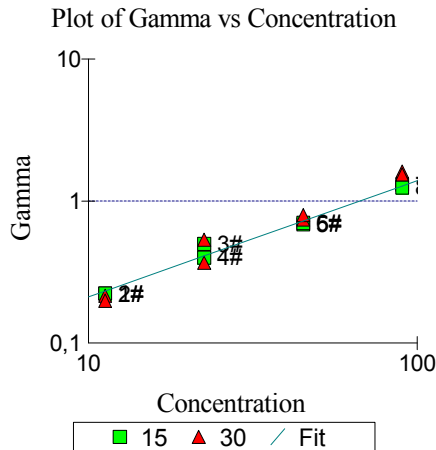
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: Sample 16

Test name: Sample 16

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	15 Mins Data:			30 Mins Data:			
		Io	It	Gamma	% effect	It	Gamma	% effect
Control	0.000	62,00	83,00	1.000	#	81,00	1.000	#
Control	0.000	70,00	96,00	1.000	#	97,00	1.000	#
1	11.00	65,00	72,00	0.0000	#	72,00	0.0000	#
2	11.00	65,00	72,00	0.0000	#	73,00	0.0000	#
3	22.00	73,00	66,00	0.0000	#	64,00	0.0000	#
4	22.00	62,00	60,00	0.0000	#	61,00	0.0000	#
5	45.00	66,00	53,00	0.0000	#	51,00	0.0000	#
6	45.00	64,00	51,00	0.0000	#	48,00	0.0000	#
7	90.00	68,00	40,00	1.000	#	35,00	1.000	#
8	90.00	68,00	41,00	1.000	#	36,00	1.000	#

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Calculations on 15 Mins data:

EC50 Concentration:66.00% (95% confidence range: 58.00 to 75.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation:LOG C =1.000 x LOG G +1.000

Coeff. of Determination (R²):0.0000

Slope: 0.0000

Correction Factor: 1.000

Calculations on 30 Mins data:

EC50 Concentration:55.00% (95% confidence range: 48.00 to 63.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation:LOG C =1.000 x LOG G +1.000

Coeff. of Determination (R^2):0.0000
Slope: 0.0000
Correction Factor: 1.000

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:30

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:23

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 17

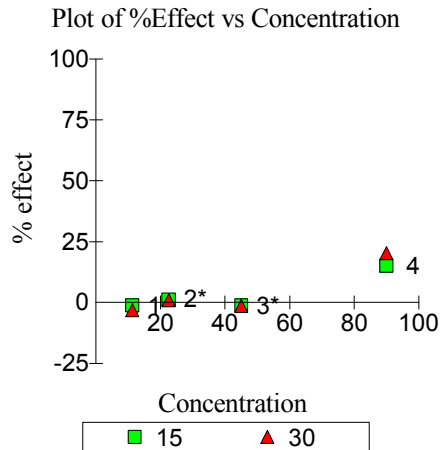
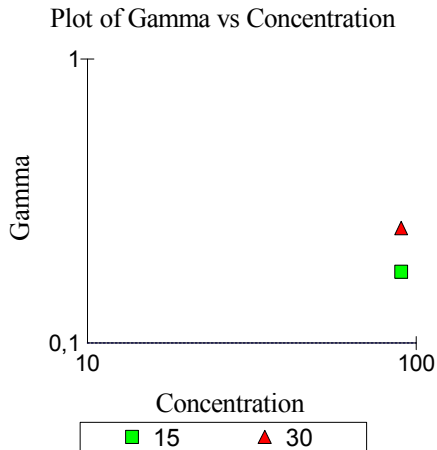
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: Sample 17

Test name: Sample 17

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	Io	15 Mins Data:			30 Mins Data:			
			It	Gamma	% effect	It	Gamma	% effect	
Control	0.000	80,00	60,00	0.0000	#	57,00	0.0000	#	
1	11.00	83,00	63,00	-1.000	*	-1.000%	61,00	-3.000	*
2	22.00	85,00	63,00	1.000	*	1.000%	60,00	9.000	*
3	45.00	83,00	63,00	-1.000	*	-1.000%	60,00	-1.000	*
4	90.00	88,00	56,00	0.0000		15.00%	50,00	0.0000	

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Statistical calculations could not be performed on the 15 Mins data.

Highest % effect: 15.00%

Statistical calculations could not be performed on the 30 Mins data.

Highest % effect: 20.00%

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:40

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:58

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 20

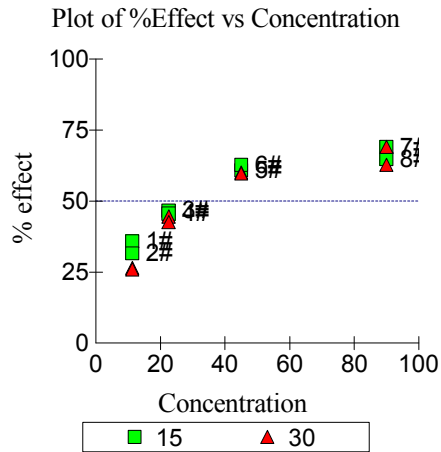
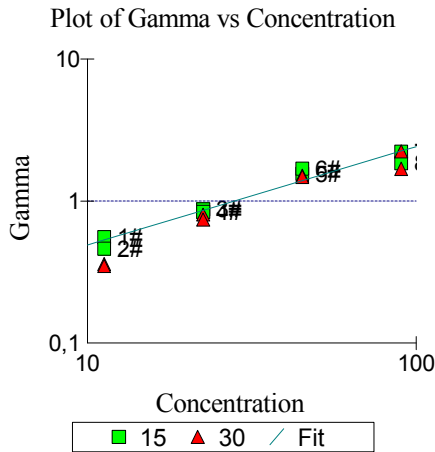
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: Sample 20

Test name: Sample 20

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	Io	15 Mins Data:			30 Mins Data:		
			It	Gamma	% effect	It	Gamma	% effect
Control	0.000	79,00	54,00	0.0000 #		43,00	0.0000 #	
Control	0.000	72,00	52,00	0.0000 #		42,00	0.0000 #	
1	11.00	82,00	37,00	0.0000 #	35.00%	34,00	0.0000 #	26.00%
2	11.00	79,00	38,00	0.0000 #	31.00%	33,00	0.0000 #	25.00%
3	22.00	80,00	30,00	0.0000 #	46.00%	25,00	0.0000 #	44.00%
4	22.00	68,00	26,00	0.0000 #	45.00%	22,00	0.0000 #	42.00%
5	45.00	80,00	22,00	1.000 #	60.00%	18,00	1.000 #	60.00%
6	45.00	88,00	23,00	1.000 #	62.00%	20,00	1.000 #	59.00%
7	90.00	92,00	20,00	2.000 #	69.00%	16,00	2.000 #	69.00%
8	90.00	81,00	20,00	1.000 #	64.00%	17,00	1.000 #	62.00%

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Calculations on 15 Mins data:

EC50 Concentration: 28.00% (95% confidence range: 23.00 to 33.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation: $\text{LOG C} = 1.000 \times \text{LOG G} + 1.000$

Coeff. of Determination (R^2): 0.0000

Slope: 0.0000

Correction Factor: 0.0000

Calculations on 30 Mins data:

EC50 Concentration: 33.00% (95% confidence range: 28.00 to 40.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation: $\text{LOG C} = 1.000 \times \text{LOG G} + 1.000$

Coeff. of Determination (R^2):0.0000
Slope: 0.0000
Correction Factor: 0.0000

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:29

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 06:25

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 21

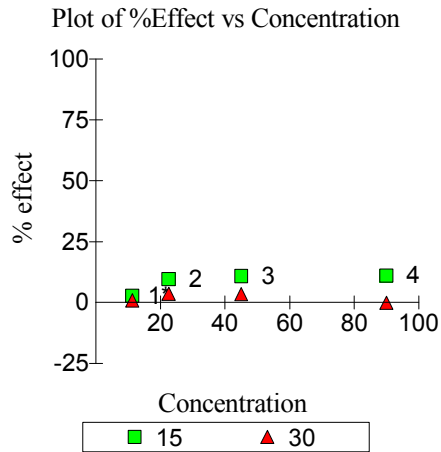
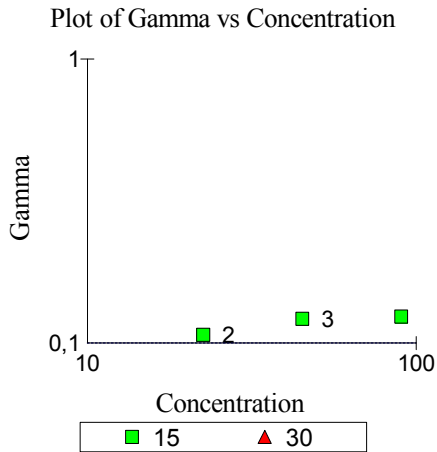
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: Sample 21

Test name: Sample 21

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	Io	It	15 Mins Data:		30 Mins Data:		
				Gamma	% effect	Gamma	% effect	
Control	0.000	82,00	63,00	0.0000	#	57,00	0.0000	#
1	11.00	87,00	65,00	2.000 *	2.000%	60,00	7.000 *	0.0000%
2	22.00	85,00	59,00	0.0000	9.000%	57,00	3.000 *	3.000%
3	45.00	73,00	50,00	0.0000	10.00%	49,00	3.000 *	3.000%
4	90.00	79,00	54,00	0.0000	11.00%	55,00	-1.000 *	0.0000%

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Statistical calculations could not be performed on the 15 Mins data.

Highest % effect: 11.00%

Statistical calculations could not be performed on the 30 Mins data.

Hormesis detected.

Lowest % effect: 0.0000%

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:38

MicrotoxOmni Test Report

Date: 17/09/2011 07:01

Test Protocol: Basic Test

Sample: Sample 24

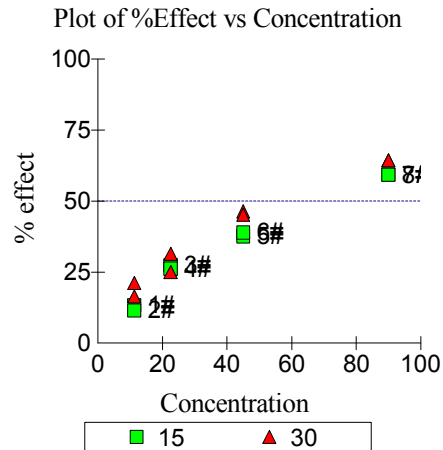
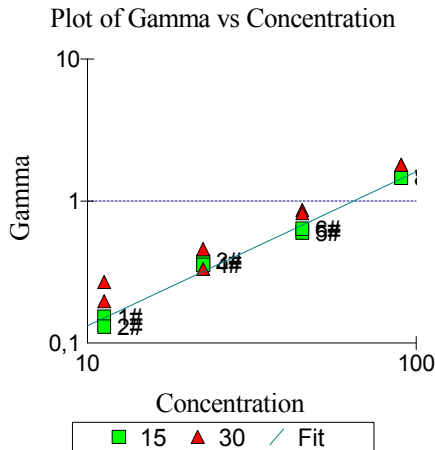
Toxicant: -

Reagent Lot no.: -

Test description: Sample 24

Test name: Sample 24

Database file: C:\Program Files\MicrotoxOmni\db1.mdb



Sample	Conc	15 Mins Data:			30 Mins Data:				
		Io	It	Gamma	% effect	It	Gamma	% effect	
Control	0.000	40,00	33,00	0.0000	#	35,00	0.0000	#	
Control	0.000	43,00	35,00	0.0000	#	37,00	0.0000	#	
1	11.00	38,00	27,00	0.0000	#	26,00	0.0000	#	21.00%
2	11.00	40,00	29,00	0.0000	#	29,00	0.0000	#	16.00%
3	22.00	42,00	25,00	0.0000	#	25,00	0.0000	#	31.00%
4	22.00	43,00	26,00	0.0000	#	28,00	0.0000	#	24.00%
5	45.00	43,00	22,00	0.0000	#	20,00	0.0000	#	46.00%
6	45.00	42,00	21,00	0.0000	#	20,00	0.0000	#	45.00%
7	90.00	42,00	14,00	1.000	#	13,00	1.000	#	64.00%
8	90.00	42,00	14,00	1.000	#	13,00	1.000	#	64.00%

- used in calculation; * - invalid data; D - deleted from calcs.

Calculations on 15 Mins data:

EC50 Concentration: 63.00% (95% confidence range: 56.00 to 72.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation: $\text{LOG C} = 0.0000 \times \text{LOG G} + 1.000$

Coeff. of Determination (R^2): 0.0000

Slope: 1.000

Correction Factor: 0.0000

Calculations on 30 Mins data:

EC50 Concentration: 51.00% (95% confidence range: 44.00 to 59.00)

95% Confidence Factor: 1.000

Estimating Equation: $\text{LOG C} = 0.0000 \times \text{LOG G} + 1.000$

Coeff. of Determination (R^2):0.0000
Slope: 1.000
Correction Factor: 0.0000

There is no QA data available for this test.

Signature: _____

Printed: 17/09/2011 07:18