

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA
FACULTAD DE INGENIERÍA
ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERÍA AMBIENTAL



INFORME DE TESIS

**“BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD
UTILIZANDO HONGOS, BACTERIAS Y CONSORCIOS MICROBIANOS
AISLADOS DEL BOTADERO MUNICIPAL DE TACNA”**

PARA OPTAR:

TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO AMBIENTAL

PRESENTADO POR:

Bach. ANA IVANA GUTIÉRREZ ALVAREZ

TACNA – PERÚ

2019

UNIVERSIDAD PRIVADA DE TACNA

FACULTAD DE INGENIERÍA

ESCUELA PROFESIONAL DE INGENIERIA AMBIENTAL

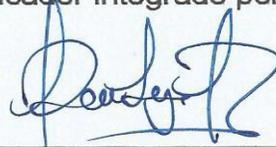
TESIS:

“BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD UTILIZANDO HONGOS, BACTERIAS Y CONSORCIOS MICROBIANOS AISLADOS DEL BOTADERO MUNICIPAL DE TACNA”

Tesis sustentada y aprobada el 07 de diciembre del 2019; estando el

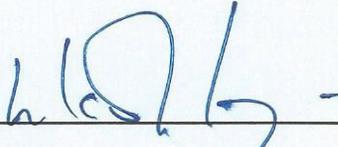
jurado calificador integrado por:

PRESIDENTE:



Dr. Richard Sabino Lazo Ramos

SECRETARIO:



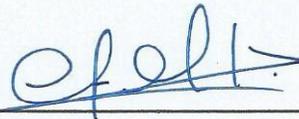
Mtro. César Huanacuni Lupaca

VOCAL:



Ing. Carmen Rosa Román Arce

ASESOR:



Biol. Claudia Vanessa Clavijo Koc

DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD

Yo Ana Ivana Gutiérrez Alvarez en calidad de Bachiller de la Escuela Profesional de Ingeniería Ambiental de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Privada de Tacna, identificado (a) con DNI 70011372.

Declaro bajo juramento que:

1. Soy autor (a) de la tesis titulada:

"BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD UTILIZANDO HONGOS, BACTERIAS Y CONSORCIOS MICROBIANOS AISLADOS DEL BOTADERO MUNICIPAL DE TACNA"

La misma que presento para optar:

"Título Profesional de Ingeniero Ambiental"

2. La tesis no ha sido plagiada ni total ni parcialmente, para la cual se han respetado las normas internacionales de citas y referencias para las fuentes consultadas.

3. La tesis presentada no atenta contra derechos de terceros.

4. La tesis no ha sido publicada ni presentada anteriormente para obtener algún grado académico previo o título profesional.

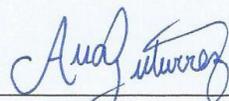
5. Los datos presentados en los resultados son reales, no han sido falsificados, ni duplicados, ni copiados.

Por lo expuesto, mediante la presente asumo frente a LA UNIVERSIDAD cualquier responsabilidad que pudiera derivarse por la autoría, originalidad y veracidad del contenido de la tesis, así como por los derechos sobre la obra y/o invención presentada.

En consecuencia, me hago responsable frente a LA UNIVERSIDAD y a terceros, de cualquier daño que pudiera ocasionar, por el incumplimiento de lo declarado o que pudiera encontrar como causa del trabajo presentado, asumiendo todas las cargas pecuniarias que pudieran derivarse de ello en favor de terceros con motivo de acciones, reclamaciones o conflictos derivados del incumplimiento de lo declarado o las que encontrasen causa en el contenido de la tesis, libro y/o invento.

De identificarse fraude, piratería, plagio, falsificación o que el trabajo de investigación haya sido publicado anteriormente; asumo las consecuencias y sanciones que de mi acción se deriven, sometiéndome a la normatividad vigente de la Universidad Privada de Tacna.

Tacna, 07 de diciembre Del 2019



Ana Ivana Gutiérrez Alvarez
70011372

DEDICATORIA

A Dios, por su ayuda y permitirme seguir adelante en busca de poder conquistar mis sueños.

A mí madre Marleni, quien sigue viva muy dentro de mi corazón, que allá en el cielo debes estar súper feliz por esta etapa en mi vida, por observar que poco a poco voy logrando mis metas y agradecerte porque sé que tomaste la mejor decisión para mí porvenir. Mi esperanza más grande es que algún día nos volvamos a encontrar.

A mí bisabuelo Cipriano, que toda su vida soñó con que sea una gran profesional y verme realizada, y hoy en el cielo debes estar orgulloso y contento por saber que alcance logro más en mi vida.

A mis abuelos Víctor Hugo y María, quienes a lo largo de mi vida han velado por mi bienestar y educación siendo mi apoyo en todo momento, y que han depositado en mí toda su confianza sin dudar en mi capacidad e inteligencia; es por ellos que soy lo que soy ahora, les amo con toda mi vida y siempre estaré agradecida por lo que han hecho y hacen por mí.

A José Carlos, Víctor Fabián, María José y María Fernanda, esto también es para ustedes porque siempre quiero ser su mayor ejemplo y su mejor amiga. Puede que los hermanos crezcan juntos o que el tiempo les separe... pero si son hermanos de verdad, siempre estarán ahí el uno para el otro.

A mi familia.

AGRADECIMIENTOS

A mis abuelos Víctor Hugo y María por darme todo su apoyo, motivación y ayuda para cumplir con mis metas y objetivos, valiéndose para ellos de mucho sacrificio.

Agradezco mucho la ayuda de mi asesora Mblga.Blga Claudia Vanesa Clavijo Koc por compartir sus conocimientos, su enseñanza brindada, por tenerme paciencia y comprensión.

A mis nuevos amigos de la carrera de Agroindustrial en especial a Daniela y a Christhel que estuvieron para mí en cualquier momento ayudándome y brindándome sus conocimientos.

Al Ingeniero Alejandro Monroy por ser siempre servicial con mi persona cuando necesitaba materiales del laboratorio de química para poder desarrollar mi tesis y darme aliento para poder seguir adelante.

A mis amigas estuvieron presentes en la realización y desarrollo de esta tesis y a mi persona favorita que nunca dudó en apoyarme desde el principio y que siempre estuvo conmigo día a día.

Contenido

PAGINA DE JURADOS	II
DECLARACIÓN JURADA DE ORIGINALIDAD	II
DEDICATORIA	IV
AGRADECIMIENTOS.....	V
ABSTRACT	XV
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	2
1.1. Descripción Del Problema	2
1.2. Formulación Del Problema	3
1.2.1. Formulación general del problema.	3
1.2.2. Formulación específica del problema.	3
1.3. Justificación e Importancia de la Investigación	3
1.4. Objetivos	4
1.4.1. Objetivo General.	4
1.4.2. Objetivos Específicos.	4
1.5. Hipótesis	5
1.5.1. Hipótesis General.....	5
1.5.2. Hipótesis Específica.	5
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO	6
2.1. Antecedentes Del Estudio	6
2.1.1. Estudios a Nivel Internacional.	6
2.1.2. Estudios a Nivel Nacional.	8
2.1.3. Estudios a Nivel Local.....	10
2.2. Bases Teóricas	10
2.2.1. Polímero.	10
2.2.2. Polietileno.	11

2.2.2.1. Polietileno de baja densidad.	12
2.2.3. Degradación de polímeros.	12
2.2.4. Consorcio microbiano.	13
2.2.5. Microorganismos reportados que degradan el polietileno.	14
2.3. Definición De Términos	21
2.3.1. Biodegradación	21
2.3.2. <i>Aspergillus sp.</i>	21
2.3.3. Biopelícula.	21
2.3.4. <i>Cladosporium sp.</i>	22
2.3.5. <i>Penicillium sp.</i>	22
2.3.6. <i>Pseudomonas sp.</i>	23
2.3.7. Bolsas Plásticas.....	23
CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO	25
3.1. Tipo y diseño de la investigación.....	25
3.2. Muestra de estudio.....	25
3.3. Operacionalización de variables.....	26
3.3.1. Variable Independiente.	26
3.3.2. Variables Dependientes.	26
3.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos.....	26
3.4.1. Recolección de Muestra.....	26
3.4.2. Preparación del medio salino e inoculación.	26
3.4.3. Preparación del medio de sales minerales.	26
3.4.4. Pesado del PEBD.	27
3.4.5. Aislamiento de Microorganismos	28
3.4.5.1. Aislamiento de Microorganismos en Agar Nutritivo.	28
3.4.5.2. Aislamiento de Microorganismos en Agar papa dextrosa.	29

3.4.6. Observación al microscopio y prueba de catalasa	29
3.4.6.1 Observación al microscopio.....	29
3.4.6.1.1. Coloración Gram.....	29
3.4.6.1.2 Técnica de la cinta pegante.	30
3.4.6.2. Prueba de catalasa.....	30
3.4.7. Purificación De Cepas.....	31
3.4.8. Fermentación de Carbohidratos.....	31
3.4.9 Pesado Final Del PEBD.....	32
3.4.10. Microscopía electrónica de barrido.....	33
3.5. Procesamiento y análisis de datos	33
CAPÍTULO IV: RESULTADOS	34
4.1. Prueba de hipótesis.....	34
4.2. Aislamiento de microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad.....	37
CAPÍTULO V: DISCUSIÓN.....	46
CONCLUSIONES.....	49
RECOMENDACIONES.....	50
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	51
ANEXOS	55
MATRIZ DE CONSISTENCIA.....	83

Anexo de Tabla

Tabla 1 Microorganismos capaces de degradar el PEBD reportados en la literatura	14
Tabla 2 Cantidades de medio de sales minerales para 1 litro	27
Tabla 3 Grupos de muestras experimentales.....	28
Tabla 4 Homogeneidad de la varianza de datos	34
Tabla 5 Prueba de normalidad de datos	35
Tabla 6 Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar hipótesis	36
Tabla 7 Cepas aisladas y morfología microscópica de los consorcios microbianos del botadero municipal de Tacna	37
Tabla 8 Fermentación de carbohidratos de las cepas aisladas del botadero municipal de Tacna.....	37
Tabla 9 Descripción de colonias de las cepas aisladas del botadero municipal de Tacna	388
Tabla 10 Hongos aislados y morfología microscópica de los consorcios microbianos del botadero municipal de Tacna	388
Tabla 11 Fermentación de carbohidratos de hongos aislados del botadero municipal de Tacna.....	39
Tabla 12 Descripción de colonias de hongos aislados del botadero municipal de Tacna	39
Tabla 13 Promedio y porcentaje del peso inicial y final del polietileno de baja densidad.....	41
Tabla 14 Consorcios microbianos aislados.....	44

Anexo de Figuras

Figura 1 Ubicación del punto de recolección de muestra de PEBD	25
Figura 2 Diagrama de flujo del procedimiento	33
Figura 3 Porcentaje de tipos de microorganismos según la tinción gram	400
Figura 4 Número de microorganismos aislados por consorcio	411
Figura 5 Porcentaje de peso perdido del polietileno de baja densidad por los consorcios microbianos	42
Figura 6 Peso perdido de polietileno de baja densidad en gramos	42
Figura 7 Porcentaje de hongos y bacterias aisladas de los consorcios microbianos del botadero municipal de Tacna	43
Figura 8 Comparación del peso final y el peso inicial de las perlas de polietileno de baja densidad con el tratamiento de consorcios microbianos y el control (agua destilada)	43
Figura 9 Microfotografía SEM de PEBD, de control de perlas de polietileno de baja densidad a 500x	44
Figura 10 Microfotografía SEM de PEBD, de perlas de polietileno de baja densidad colonizado por bacterias y recubierto de biofilm bacteriano a 500x.....	45
Figura 11 Microfotografía SEM de PEBD, de perlas de polietileno de baja densidad sin biofilm microbiano a 500x.....	45
Figura 12 Recolección de muestra en estado de degradación.....	55
Figura 13 Sales minerales utilizadas para el medio mineral salino	55
Figura 14 Perlas de polietileno de baja densidad.....	56
Figura 15 Pesado de perlas de polietileno de baja densidad	56
Figura 16 Perlas en medio salino mineral y el inóculo de microorganismos.....	57
Figura 17 Agar nutritivo.....	57

Figura 18 Agar papa dextrosa.....	58
Figura 19 Calentamiento de medio de cultivo agar papa dextrosa para su disolución	58
Figura 20 Reactivos usados para la coloración gram.....	59
Figura 21 Observación en el microscopio.....	59
Figura 22 Muestra N° M1 – AN por técnica de coloración gram.....	600
Figura 23 Muestra N° M1– AN1 por técnica de coloración gram.....	60
Figura 24 Muestra N° M2 – AN por técnica de coloración gram.....	61
Figura 25 Muestra N° M2 –BN por técnica de coloración gram.....	61
Figura 26 Muestra N° M3 –AN por técnica de coloración gran.....	62
Figura 27 Muestra N° M3 – BN por técnica de coloración gram.....	62
Figura 28 Muestra N° M6 –AN (1) por técnica de la coloración gram.....	63
Figura 29 Muestra N° M6 –AN (2) por técnica de coloración gram.....	63
Figura 30 Muestra N° M6 – BN por técnica de coloración gram.....	64
Figura 31 Muestra N° M3 – AP por técnica de la cinta pegante	64
Figura 32 Muestra N° M4 –AP por técnica de la cinta pegante	65
Figura 33 Muestra N° M5 –BP por técnica de la cinta pegante	65
Figura 34 Muestra N° M5 – AP por técnica de la cinta pegante	66
Figura 35 Purificación de cepas.....	66
Figura 36 Muestra N° M1 – AN cepa purificada	67
Figura 37 Muestra N° M2 – AN cepa purificada	67
Figura 38 Muestra N° M3 – AN cepa purificada	68
Figura 39 Muestra N° M3 –BN cepa purificada	68
Figura 40 Muestra N° M4 – AN cepa purificada	69
Figura 41 Muestra N° M5 – BN cepa purificada	69

Figura 42 Muestra N° M6 – AN (1) cepa purificada	70
Figura 43 Muestra N° M6 – AN (2) cepa purificada	70
Figura 44 Muestra N° M6 – BN cepa purificada	71
Figura 45 Muestra N° M3 – BP cepa purificada	71
Figura 46 Muestra N° M4 – AP cepa purificada	72
Figura 47 Muestra N° M4 – BP cepa purificada	72
Figura 48 Muestra N° M5 –AP cepa purificada	73
Figura 49 Tipos de carbohidratos usados para la fermentación	73
Figura 50 Tubos con carbohidratos autoclavados.....	74
Figura 51 Perfil de fermentación de la muestra M1-AN.....	74
Figura 52 Perfil de fermentación de la muestra M1-AN1.....	75
Figura 53 Perfil de fermentación de la muestra M2-AN.....	75
Figura 54 Perfil de fermentación de la muestra M2-BN3.....	76
Figura 55 Perfil de fermentación de la muestra M3A-N.....	76
Figura 56 Perfil de fermentación de la muestra M4-BN.....	77
Figura 57 Perfil de fermentación de la muestra M1-AN3	77
Figura 58 Perfil de fermentación de la muestra M1-AN2.....	78
Figura 59 Perfil de fermentación de la muestra M1-BN.....	78
Figura 60 Perfil de fermentación de la muestra M2-AP	79
Figura 61 Perfil de fermentación de la muestra M3-AP	79
Figura 62 Perfil de fermentación de la muestra M4-BP	80
Figura 63 Perfil de fermentación de la muestra M4-AP	80
Figura 64 Lavado de perlas de polietileno de baja densidad.....	81
Figura 65 Secado de perlas de polietileno de baja densidad	81
Figura 66 Peso final de perlas de polietileno de baja densidad	82

Figura 67 Toma de microfotografías con la ayuda de un microscopio electrónico
Tescan VEGA TS 5136XM 82

RESUMEN

En la presente investigación describimos el aislamiento y la actividad de biodegradación de microorganismos sobre polietileno de baja densidad. Los microorganismos fueron aislados de materiales plásticos con evidencias de deterioro procedentes del botadero municipal de Tacna. Las muestras fueron filtradas y preseleccionadas en medio de sales minerales. Se aislaron cepas, identificadas como *Bacillos sp*, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Flavobacterium sp*, *Micrococcus sp*, *Rhodotorula sp*, *Penicillium vanoranjei*, *Aspergillus sp*, *Saccharomyces cereviceae* y dos no identificadas.

La acción degradativa del consorcio microbiano aislado fue evidenciada por la variabilidad en la microfotografía de SEM con respecto al polietileno de baja densidad sin control, observándose un promedio de peso perdido de 172,975 mg de polietileno de baja densidad, lo que correspondió un porcentaje de 2,88 % en un período de 70 días de incubación. El consorcio que obtuvo mayor porcentaje de biodegradación fue el consorcio 3 y con un porcentaje de 6,54 %.

También hubo presencia de bacterias con un 69 % y hongos y levaduras con 31%.

Palabras claves: *Biodegradación, bacterias, hongos, polietileno*

ABSTRACT

In the present investigation we describe the isolation and biodegradation activity of microorganisms on low density polyethylene. The microorganisms were isolated from plastic materials with evidence of deterioration from the municipal dump of Tacna. The samples were filtered and preselected in the middle of mineral salts. Strains, identified as *Bacillus sp*, *Acinetobacter sp*, *Pseudomonas sp*, *Flavobacterium sp*, *Micrococcus sp*, *Rhodotorula sp*, *Penicillium vanoranjei*, *Aspergillus sp*, *Saccharomyces cereviceae* and two unidentified were isolated.

The degradative action of the isolated microbial consortium was evidenced by the variability in the SEM photomicrograph with respect to uncontrolled low density polyethylene, with an average weight loss of 172,975 mg of low density polyethylene being observed, corresponding to a percentage of 2, 88% in a 70-day incubation period. The consortium that obtained the highest percentage of biodegradation was consortium 3 and with a percentage of 6.54%.

There was also the presence of bacteria with 69% and fungi and yeasts with 31%.

Keywords: *Biodegradation, bacteria, fungi, polietilen*

INTRODUCCIÓN

Uno de los principales problemas es el aumento de residuos plásticos en los tiraderos a cielo abierto y “botaderos municipales”, desechados por los seres humanos, el comercio en general y por la industria. Por sus propiedades físicas, como la resistencia mecánica, estos materiales pueden permanecer inalterados y ocupando el mismo volumen, por períodos que pueden oscilar de 20 a 500 años, dependiendo de la presencia de residuos orgánicos y de su exposición al sol. Además, su baja densidad origina que su manejo sea costoso y difícil (Cain, 1992)

Los productos fabricados con polietileno presentan dos tipos de desventajas: (1) el deterioro cuando, después de ser utilizados, se convierten en basura y (2) la contaminación ambiental física y visual posterior a su uso. En este último caso, debido a sus características de resistencia, son muy difícilmente degradados por los microorganismos del suelo, permaneciendo visibles en el ambiente por tiempo indefinido. (Mangiarotti, Caretta, Nelli, & Piotelli, 1994).

En los últimos años, la degradación microbiana de los plásticos, se ha considerado como una alternativa para solucionar el problema de la disposición final de estos residuos que, a diferencia de la incineración, presenta condiciones de operación que no serían drásticas ni costosas. Algunos científicos han señalado que la biodegradación del polietileno por microorganismos, podría ser una solución para disminuir la contaminación por plásticos (Méndez C. , Vergaray, Béjar, & Cárdenas, 2007)

Por otra parte, se han descubierto ciertas bacterias del género *Pseudomonas* y *Micrococcus sp*, capaces de degradar polietileno de baja densidad en un período de tres meses, además de hongos como *Penicillium vanoranjei* y *Aspergillus sp* también aptos para degradar polietileno.

CAPÍTULO I: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

1.1. Descripción Del Problema

En los últimos 50 años, la fabricación de polímeros se ha acelerado, en la actualidad la raza humana se ha vuelto plástico dependiente, necesitamos de policarbonato, acrílico, polipropileno, tereftalato de polietileno, poliestireno, polietileno de alta densidad y polietileno de baja densidad, materiales utilizados en el desarrollo de nuestras actividades diarias, dándole uso en envases de alimentos, textiles, materiales de construcción y diversos artículos de plástico. Niklas Hagelberg, coordinador de las Naciones Unidas en el Subprograma de Investigación para el Cambio Climático, y profesor investigador en la Universidad de Hawái, estima que se han producido más de 8 mil millones de toneladas de plástico virgen desde 1950. Se espera que los niveles actuales de producción anual se dupliquen en los próximos 20 años.

"Dado el crecimiento esperado en la producción de plástico en todo el mundo, es importante para los fabricantes de plásticos, así como para los gobiernos que luchan contra el cambio climático, comprender el alcance de las emisiones de metano y etileno del plástico y su impacto en los ecosistemas", dice Niklas Hagelberg, en la investigación sobre los gases invernadero que emiten los plásticos en el medio ambiente (2014).

Bajo esta premisa, considerando que los plásticos son empleados para el desarrollo de la vida diaria, es necesario considerar el impacto que generan en el medio ambiente local, donde no existen empresas debidamente capacitadas para manejo del reciclaje y reutilización de polímeros producidos en nuestra ciudad. Asimismo, es preciso indicar que no existen estudios desarrollados en la ciudad de Tacna sobre el manejo, reutilización, reciclaje o destrucción de plásticos; por lo que es necesario buscar soluciones prácticas, que puedan reducir los niveles de contaminación producidos por plásticos.

1.2. Formulación Del Problema

A continuación, se presenta la formulación del problema general y específicos de la investigación.

1.2.1. Formulación general del problema.

- ¿Es posible biodegradar polietileno de baja densidad (PEBD) utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna?

1.2.2. Formulación específica del problema.

- ¿Es posible aislar cepas de bacterias, hongos y consorcios microbianos de plástico que se encuentran en el botadero municipal de Tacna?
- ¿Cuál es el porcentaje de degradación de cada tipo de microorganismo (hongos, bacterias y consorcios microbianos)?
- ¿Se puede evidenciar el daño que produce los microorganismos en el polietileno de baja densidad (PEBD), mediante microscopía electrónica?

1.3. Justificación e Importancia de la Investigación

Es un llamado a la conciencia el grado de contaminación emitido por el hombre, considerando el impacto negativo que se repercute en el medio ambiente; y en ciudades donde no se le da la importancia debida, y no se tiene implementado un sistema de reciclaje efectivo, y una cultura de reducción de consumo de plásticos como aqueja la ciudad de Tacna, son algunos motivos que impulsan a realizar la presente investigación con la finalidad de encontrar soluciones idóneas a la reducción de la contaminación ambiental, mediante el uso de la biodegradación del polietileno de baja densidad,

aplicando elementos orgánicos naturales que pueden ser empleados para reducir la cantidad de desechos plásticos.

Para lo cual se desarrollarán pruebas de campo empleando bacterias, hongos y consorcios microbianos para lograr los objetivos materia de la presente investigación. Es preponderante definir cuál sería la mejor bacteria, hongo o consorcio microbiano para la biodegradación de polietileno, a fin de enfocarse en la reproducción de la misma, y ensayar diferentes técnicas de aplicación de un proceso de reducción de estos polímeros.

Asimismo, para efectos de la investigación a fin de definir cuál es el microorganismo que tiene mayor efectividad en la biodegradación es necesario conocer el grado de impacto que sufre el polímero de baja densidad, para poder arribar a un resultado medible y comprobable a través del método científico.

1.4. Objetivos

1.4.1. Objetivo General.

- Biodegradar polietileno de baja densidad (PEBD) mediante el uso de bacterias, hongos y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de la ciudad de Tacna.

1.4.2. Objetivos Específicos.

- Aislar microorganismos de bolsas y botellas de polietileno de baja densidad (PEBD) que se encuentran en el botadero municipal de la ciudad de Tacna.
- Calcular el porcentaje de pérdida de peso del polietileno de baja densidad (PEBD) en el período de incubación.

- Observar en el microscopio electrónico el daño causado por los microorganismos en el polietileno de baja densidad (PEBD).

1.5. Hipótesis

1.5.1. Hipótesis General.

- Es posible biodegradar polietileno de baja densidad (PEBD) utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna.

1.5.2. Hipótesis Específica.

- Es posible aislar los microorganismos presentes en bolsas y botellas de polietileno de baja densidad (PEBD) que se encuentran en el botadero municipal de Tacna.
- Es posible calcular los porcentajes de pérdida de peso de polietileno de baja densidad (PEBD) en los periodos de incubación de microorganismos.
- A través del microscopio electrónico es posible observar el daño causado por los microorganismos en el polietileno de baja densidad (PEBD)

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.1. Antecedentes Del Estudio

2.1.1. Estudios a Nivel Internacional.

Volke (1997) en su informe “Efecto De Tratamientos Fisicoquímicos Y Cometabolismo En La Degradación De Polietileno De Baja Densidad Por Hongos Filamentosos” estudiaron los efectos de los tratamientos fisicoquímicos (TFQ) y metabolismo en la degradación de PEBD por hongos filamentosos, las muestras de PEBD tratadas con temperatura y radiación gamma y pulverizadas fueron incubados a 30° C durante 31 meses con cultivos puros de *Aspergillus niger* o *Penicillium pinophilum*, y con cultivo mixto (*Penicillium pinophilum*, *Aspergillus niger*, *Penicillium. chrysosporium*). En el transcurso de 27 meses. En cultivos axénicos, la cepa de *P. pinophilum* en presencia y ausencia de etanol como sustrato, mostraron mayor eficiencia en la biodegradación del PEBD, que la cepa de *A. niger*. Demostraron que el micelio de algunos hongos presentes en el consorcio microbiano tuvo la capacidad de colonizar y penetrar en la estructura de PEBD.

Bonhomme (2003) en su artículo “Biodegradación Ambiental Del Polietileno” se investigó en dos etapas. Primero por oxidación abiótica en un horno de aire para aparentar el efecto del ambiente y segundo en presencia de microorganismos seleccionados. La formación inicial del biofilm fue seguida por microscopía de fluorescencia y el crecimiento posterior de bacterias en la superficie del plástico se visualizó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM). Se examinó que el crecimiento microbiano se produjo en presencia de muestras de PEBD que habían

sido moldeadas por compresión en secciones gruesas pero que no habían sido previamente oxidadas deliberadamente. El crecimiento molecular y la ampliación de la distribución del peso molecular se produjeron después del precalentamiento en el aire a 60° C, pero no a temperatura ambiente, pero se generó la colonización de microorganismos en todos los ejemplares.

Limón (2011) investigó “La Biodegradación De Polietileno De Baja Densidad Por Hongos Filamentosos” donde se realizaron dos pruebas TFQ (envejecimiento acelerado y temperatura). Para dicho tratamiento biológico incubaron el PEBD con un consorcio de cuatro hongos filamentosos (*Penicillium. pinophilum*, *Gleocladium. virens*, *Penicillium chrysosporium* y *Aspergillus niger*,) en circunstancia aeróbica durante 9 meses a 30°C. Las dos pruebas de TFQ promovieron cambios químicos y morfológicos en el PEBD, el tratamiento térmico apoyo más la biodegradabilidad del PEBD. Se visualizaron crecimiento superficial de microorganismos en todas las muestras con TFQ y penetración de hifas en las muestras más oxidadas.

Clutario y Cuevas (2011) en su indagación “ Colonization Of Plastics by *Xylaria sp.*” Se practicaron estudios para evidenciar cambios físicos de la colonización de las tiras de plástico de polietileno mediante microscopía electrónica de barrido. En condiciones ambientales excelentes para el crecimiento del hongo, como la concentración de iones de hidrógeno y temperatura determinaron por cultivar el organismo en diferentes medios de comunicación mineral con diferentes sustratos como el papel de filtro de celulosa, ácido gálico y el ácido tánico. Luego lo sembraron en condiciones óptimas donde el crecimiento fue eficaz en medio mineral con tiras de plástico como fuente carbono a 25°C a pH 5 y con 0,5 % de glucosa, los daños visibles en la estructura de la superficie de las

tiras de plástico por *Xylaria sp.* fueron observados con la microscopía electrónica de barrido (SEM).

Gonzalez y Camarena (2013) determinaron la "Biodegradación De Plástico Por *Rhizopus sp.*" indicaron que las bolsas de plástico fueron obtenidas de un basurero y llevados al laboratorio donde apartaron una comunidad de hongos pegados a las bolsas, posteriormente se aislaron hongos del género *Rhizopus sp.* La actividad biodegradadora la determinaron con la técnica de Kavelman y Kendrick, a temperaturas entre 28 y 30 °C y a pH 5 - 7. Se procedió a sembrar el género *Rhizopus sp.* en la superficie de las tiras de PEBD junto con agar Czapeck y luego se observó en el microscopio que el hongo se desarrollaba sobre el plástico generando cambios en la corrosión de la superficie, formación de grietas en el plástico, cambio en el color. El estudio evidenció que los hongos del género *Rhizopus sp.* forman parte de una comunidad multicelular que puede ser eficiente en la degradación del PEBD.

2.1.2. Estudios a Nivel Nacional.

Méndez, Vergaray, Béjar, Cárdenas (2017) en su estudio "Aislamiento Y Caracterización De Micromicetos Biodegradadores De Polietileno" aislaron y caracterizaron micromicetos biodegradadores de polietileno. La actividad biodegradadora lo determinaron con la técnica de Kavelman y Kendrick, a temperaturas entre 30 y 20°C y a pH 4,5 - 8,0. Se estableció veinte cepas de micromicetos de los cuales 5 (25%) evidenciaron capacidad biodegradadora de polietileno a 20°C, siendo el pH 6,5 el óptimo, la cepa de mayor rendimiento

pertenece a la especie de *Aspergillus flavus* a temperatura de 30 °C, 6 (30%) cepas evidenciaron actividad degradadora, siendo pH 6,5 el óptimo.

Uribe, Giraldo, Gutiérrez y Merino (2010) , con su artículo “Biodegradación De Polietileno De Baja Densidad Por Acción De Un Consorcio Microbiano Aislado De Un Relleno Sanitario, Lima, Perú” aislaron y determinaron la actividad degradativa del PEBD por acción de un consorcio microbiano. Los microorganismos que aislaron de materiales plásticos con evidencias de desgaste procedieron de un relleno sanitario. Los ejemplares fueron filtrados y preseleccionadas en medio de sales minerales a pH 7 y 5,5 para bacterias y hongos. Aislaron 6 cepas identificadas como (*Penicillium sp.*, *Rhodotorula sp.*, *Pseudomonas sp.*, *MP3a* y *MP3b*, *Hyalodendron sp.* y una levadura no identificada) a 20°C en el tiempo de 45 días. La acción degradativa del consorcio microbiano aislado lo verificaron por variaciones en el espectro infrarrojo del PEBD. En resumen, determinaron el porcentaje de peso perdido de PEBD en un tiempo de incubación de dos meses sometido a las cepas aisladas, observándose una reducción de 4,8% a pH 5,5. del peso total del polietileno y un 5,4% a pH 7.

Iparraguirre y Vivanco (2015) en su investigación “Aislamiento Y Caracterización De Hongos Filamentosos Biodegradadores De Polietileno De Tereftalato Y Polietileno De Baja Densidad · Ica” nos explica que los hongos filamentosos tienen la condición de degradar polímeros, mediante la secreción de enzimas extracelulares que debilitan los polímeros en compuestos simples. Se tuvo como meta de caracterizar y aislar hongos filamentosos degradadores de polietileno de baja densidad (PEBD) y polietileno de tereftalato (PET). Las muestras plásticas con evidencias de desgaste fueron recolectadas de un antiguo botadero en Ica. Para poder realizar la separación de hongos se empleó el uso del

agar Sabourad, las cepas separadas fueron distinguidas de acuerdo a claves taxonómicas. Para verificar la biodegradación de las cepas se utilizó la técnica de Kendrick y Kavelman a temperatura 30 y 25°C y a pH 5-7 durante dos meses. Se aislaron ocho cepas de PET de las cuales cinco cepas fueron biodegradadoras y once cepas del PEBD siendo ocho degradadoras. La cepa de mayor actividad biodegradadora en PET y PEBD pertenece al género *Mucor* desgastando 1.3% de peso en PET a 25°C - pH 5 y 20% PEBD a temperatura 25°C y pH 5-7. Se finalizó que los hongos filamentosos pueden ser aptos en la degradación de polietileno.

2.1.3. Estudios a Nivel Local.

A nivel local no existen estudios relacionados sobre comparación de bacterias, hongos y consorcios microbianos en la biodegradación de PEBD.

2.2. Bases Teóricas

2.2.1. Polímero.

Polímero es un compuesto químico con moléculas juntas en largas cadenas con repetición debido a su estructura, los polímeros poseen propiedades únicas que pueden acoplarse para distintos usos.

Los polímeros son tanto artificiales como naturales. El polímero natural más común en la tierra es la celulosa, un compuesto orgánico que se encuentra en las paredes celulares de las plantas. Se utiliza para elaborar productos como textiles y papel; los polímeros artificiales incluyen materiales como el polietileno (que es uno de los plásticos más comunes y con fácil acceso como bolsas de compras hasta contenedores de almacenamiento) y poliestireno (utilizado para producir vasos desechables). Algunos polímeros sintéticos son flexibles conocidos como termoplásticos, mientras que otros son permanentemente rígidos (termoestables).

Sin embargo, otros tienen propiedades similares al caucho como los elastómeros. (Johnson, 2019)

Dependiendo del uso, los polímeros pueden adaptarse para obtener ciertas propiedades ventajosas:

- Fragilidad: algunas formas de poliestireno son frágiles, y dichos materiales son fáciles de deformarse con el calor.
- Elasticidad: los cauchos sintéticos y naturales poseen propiedades elásticas que los hacen adecuados como para neumáticos de automóviles.
- Reflexividad: la mayoría de los polímeros se utilizan para producir películas reflectantes, que se utilizan en una variedad de tecnologías relacionadas con la luz.
- Resistencia al impacto: los plásticos resistentes que pueden soportar un manejo rudo son perfectos para fundas protectoras, parachoques de carros.

2.2.2. Polietileno.

Polietileno (PE), resina sintética versátil y ligera hecha de la polimerización de etileno. El polietileno es un integrante de la familia de resinas de poliolefina. Es el plástico más empleado en el mundo, y su transformación se convierte en productos desde bolsas de compras, envolturas de alimentos transparentes y hasta botellas de detergente; también puede cortarse o hilarse en fibras sintéticas o varias para obtener las propiedades elásticas de un caucho. (Augustyn, Hosch, & Lotha, 2019)

2.2.2.1. Polietileno de baja densidad.

El PEBD (por sus siglas en inglés Low Density Polyethylene) o como PEBD, en español. se obtiene a partir de etileno gaseoso altas temperaturas hasta aproximadamente 350° C, con la presencia de óxido y a presiones muy elevadas (aproximadamente 50,000 lbf/pg² - libras por pulgada cuadrada o 350 MPa.) estos procesos forman una estructura polimérica con ramas largas y cortas. Debido a que las ramas obvian que las moléculas de polietileno se mezclen. Su punto de fusión es de aproximadamente 110° C, a todo esto, le debemos añadir que el PEBD es un material muy flexible. Los usos primordiales son bolsas de basura y comestibles, juguetes, aislamiento de cables y alambres, mantillo agrícola, botellas exprimibles, y artículos para el hogar. Contiene un código de reciclaje de plástico de PEBD es # 4. (Augustyn, Hosch, & Lotha, 2019)

2.2.3. Degradación de polímeros.

La degradación del polímero es la alteración en las propiedades del polímero, como el color, el peso molecular, la forma, la resistencia a la tracción. La degradación con frecuencia se debe a una alteración en la estructura física y / o química de la cadena del polímero, que al mismo tiempo conduce a una minimización en el peso molecular del polímero. Estas variaciones pueden ser indeseables, como los cambios durante el uso, o deseables, como en la biodegradación los cambios se producen principalmente debido al efecto de estos factores en la composición química del polímero. La degradación del polietileno se origina por escisión aleatoria, una separación aleatoria de los enlaces dentro del polímero. Cuando se calienta por encima de 450° C, el polietileno se degrada para

formar una mezcla de hidrocarburos; si bien el proceso de degradación representa una falla del polímero en su desempeño en servicio, el proceso puede ser útil desde el punto de vista de comprender la estructura de un polímero o reutilizar / reciclar los desechos del polímero para prevenir o reducir la contaminación ambiental. La clasificación de los desechos de polímeros para fines de reciclaje puede facilitarse al conocer el desarrollo de degradación y ayudar en el reciclaje. (Speight, 2011)

2.2.4. Consorcio microbiano.

Consorcio Microbiano es la alianza natural de dos o más poblaciones microbianas, de especies distintas, que actúan simultáneamente como una comunidad en un sistema complejo, donde todos se favorecen de las actividades de los demás. Un consorcio microbiano puede ejecutar funciones complejas que poblaciones individuales no podrían; además, la vida en asociación puede originar mucha más resistencia a las fluctuaciones del ambiente y fomentar la estabilidad de los miembros, en el tiempo. Estos rasgos distintivos dependen de dos características. Primero la división del trabajo, la producción total de un consorcio depende de la combinación de deberes desempeñadas por los constituyentes individuales, es decir, por las poblaciones microbianas involucradas. Segundo, los miembros de un consorcio se comunican el uno con el otro, ya sea por el intercambio de sustancias o por señales moleculares, cada población detecta y responde a la presencia de otras dentro del consorcio, ejecutando sobre ellas un control positivo o negativo en su desarrollo.

Los consorcios microbianos pueden tolerar mejor las etapas de limitación de nutrientes debido a la diversidad metabólica disponible por la diversidad de especies, mezclada con la habilidad de compartir metabolitos dentro de la

comunidad. Muchas especies, comúnmente, se encuentran mezcladas porque tienen los mismos requerimientos ambientales y comparten elementos de su nicho, o porque necesitan de la presencia de un elemento común para su estrategia de vida. Habitualmente el lugar donde se ubica el consorcio encaja con espacios en donde las condiciones ambientales son las correctas, es decir, donde los microorganismos tienen el mayor crecimiento y reproducción. (Montoya & Ochoa, 2010)

2.2.5. Microorganismos reportados que degradan el polietileno.

Muchos microorganismos degradan el PEBD cuando las condiciones ambientales favorecen esta acción. Se han publicado muchos estudios sobre biodegradación del polietileno, a continuación, se presenta una recopilación de todos los microorganismos reportados y/o utilizados en los estudios de biodegradación del PEBD. (Tabla1)

Tabla 1

Microorganismos capaces de degradar el PEBD reportados en la literatura

DOMINIO	GÉNERO	ESPECIE
Bacteria	<i>Acinetobacter</i>	<i>baumanni</i>
		<i>ursingi</i>
		<i>sp</i>
Bacteria	<i>Acanthopleurobacter</i>	<i>pedis</i>
Bacteria	<i>Achromobacter</i>	<i>denitrificans</i>

Bacteria	<i>Arthrobacter</i>	<i>sp</i> <i>paraffineus</i> <i>defluvi</i> <i>vicosus</i> <i>Koreensis</i>
----------	---------------------	---

DOMINIO	GÉNERO	ESPECIE
Bacteria	<i>Bacillus</i>	<i>sp</i> <i>aerius</i> <i>pumilus</i> <i>brevies</i> <i>cereus</i> <i>circulans</i> <i>halodenitrific</i> <i>amylolyticus</i> <i>megaterium</i> <i>mycoides</i> <i>shaericus</i> <i>licheniformis</i> <i>subtilis</i> <i>thuringiensis</i>
Bacteria	<i>Brevibacillus</i>	<i>borstelensis</i> <i>parabrevis</i>

		<i>sp</i>
Bacteria	<i>Burkholderia</i>	<i>cepacia</i>
	<i>Delftia</i>	<i>acidovorans</i>
	<i>Desulfotomaculum</i>	<i>nigrificans</i>
	<i>diplococcus</i>	<i>sp</i>
	<i>Escherichia</i>	<i>coli BL21</i>
	<i>Enterobacter</i>	<i>asburiae</i>
	<i>Flavobacterium</i>	<i>sp</i>
Bacteria	<i>Listeria</i>	<i>sp</i>
Bacteria	<i>Lysinibacillus</i>	<i>sp</i>
Bacteria	<i>Microbacterium</i>	<i>paraoxydans</i>
		<i>sp</i>
Bacteria	<i>Micrococcus</i>	<i>luteus</i>
		<i>sp</i>
Bacteria	<i>Paenibacillus</i>	<i>macerans</i>
Bacteria	<i>Proteus</i>	<i>vulgaris</i>

DIVISIÓN	GÉNERO	ESPECIE
Bacteria	<i>Pseudomonas</i>	<i>aeruginosa</i> <i>citronellois</i> <i>chlororaphis</i> <i>sp</i> <i>stutzeri</i> <i>flourescens</i> <i>alcaligenes</i> <i>otitidis</i> <i>redolens</i>
Bacteria	<i>Rahnella</i>	<i>aquatilis</i>
Bacteria	<i>Ralstonia</i>	<i>sp</i>
Bacteria	<i>Rhodococcus</i>	<i>ruber</i> <i>rhodochrous</i> <i>erythropolis</i> <i>sp</i>
Bacteria	<i>Serratia</i>	<i>marscence</i>
Bacteria	<i>Shewanella</i>	<i>putrefaciens</i>

Bacteria	<i>Staphylococcus</i>	<i>aereus</i> <i>epidermidis</i> <i>xylosus</i> <i>sp</i> <i>piogens</i> <i>cohnii</i>
Bacteria	<i>Stenotrophomonas</i>	<i>sp</i>
Bacteria	<i>Streptococcus</i>	<i>lactis</i> <i>sp</i> <i>aereus B-324</i>
Bacteria	<i>Streptomyces</i>	<i>viridosporus T74</i> <i>setoni 75Vi2</i> <i>sp</i> <i>coelicoflavus</i> <i>Badius</i>

DIVISIÓN	GÉNERO	ESPECIE
Bacteria	<i>Vibrio</i>	<i>sp</i>
Funji	<i>Acremonium</i>	<i>kiliense</i>
Funji	<i>Alternaria</i>	<i>alternata</i>
Funji	<i>Aureobasidium</i>	<i>pullulans</i>

	<i>Candida</i>	<i>sp</i>
Funji	<i>Cephalosporium</i>	<i>sp</i>
Funji	<i>Chaetomium</i>	<i>sp</i>
Funji	<i>Cladosporium</i>	<i>cladosporioides</i>
Funji	<i>Curvularia</i>	<i>sp</i>
		<i>senegalensis</i>
		<i>lunata</i>
Funji	<i>Fusarium</i>	<i>sp</i>
		<i>solani</i>
Funji	<i>Geotrichum</i>	<i>sp</i>
Funji	<i>Glioclodium</i>	<i>virens</i>
	<i>Helminthosporium</i>	<i>sp</i>
	<i>Humicola</i>	<i>sp</i>
Funji	<i>Hyalodendron</i>	<i>sp</i>
Funji	<i>Moraxella</i>	<i>sp</i>
Funji	<i>Mortierella</i>	<i>alpina</i>
		<i>subtilissima</i>
Funji	<i>Mucor</i>	<i>ruxi</i>
		<i>sp</i>
		<i>ciminelloides</i>
Funji	<i>Nigrospora</i>	<i>sp</i>
Funji	<i>Nocardia</i>	<i>sp</i>

Funji	<i>Paecilomyces</i>	<i>variotti</i>
Funji	<i>Penicillium</i>	<i>sp</i> <i>simplicimus</i> <i>frequentans</i>

DIVISIÓN	GÉNERO	ESPECIE
Funji	<i>Phanerochaete</i>	<i>chryso sporium</i>
Funji	<i>Pleurotus</i>	<i>ostretus</i>
Funji	<i>Pullularia</i>	<i>pullulans</i>
Funji	<i>Pycnoporus</i>	<i>sanguineus</i>
Funji	<i>Rhodotorula</i>	<i>sp</i>
Funji	<i>Scopulariopsis</i>	<i>brevicaulis</i>
Funji	<i>Sporotricum</i>	<i>pullverulentum</i>
Funji	<i>Trametes</i>	<i>versicolor IFO7043</i> <i>versicolor ISU15413</i>

Funji	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i>
		<i>hamatum</i>
Funji	<i>Verticilium</i>	<i>lecani</i>

Fuente: Acuña, N (2017)

2.3. Definición De Términos

2.3.1. Biodegradación

La biodegradación es la característica de algunas sustancias químicas de poder ser utilizadas como sustrato por microorganismos, que las emplean para producir energía y crear otras sustancias como aminoácidos, nuevos tejidos y nuevos organismos. (Barajas, 2011)

2.3.2. *Aspergillus sp.*

El género *Aspergillus* comprende alrededor de 180 especies, son hongos filamentosos, hialinos y ubicuos. En estos hongos se ha descubierto su fase de reproducción sexual y se ubican dentro de la división Ascomycota. Los hongos de este género tienen gran potencial biótico y son degradadores activos del material orgánico y en consecuencia muy útiles en la ecología del planeta. (Mendez, 2015)

2.3.3. Biopelícula.

Una biopelícula es un sistema microbiano organizado, formado por uno o varios microorganismos asociados a una superficie viva o inerte, con características funcionales y estructuras complicadas.

En muchos ambientes, representa una táctica de supervivencia, pues proporciona una seguridad contra las defensas y mecanismos de erradicación microbiana y cuenta con un sistema de canales, que le permite constituir un vínculo

con el medio externo para hacer cambio de nutrientes y descartar metabolitos de desecho (Betancourth, Botero, & Rivera, 2004)

2.3.4. *Cladosporium sp.*

Cladosporium es un hongo filamentoso, perteneciente al filo Ascomycota y al grupo de los dematiáceos, caracterizados por presentar una coloración oscura. Microscópicamente presenta hifas finas, septadas, ramificadas de color hialino a marrón. Las hifas sostienen cadenas ramificadas de conidios unicelulares, elipsoides o cilíndricos, algunos con forma de escudo debido a las cicatrices de unión entre ellos. Macroscópicamente forma colonias aterciopeladas, pulverulentas o vellosas, con pliegues radiales, de color blanco o crema que tienden a oscurecerse en tonos gris verdoso, marrones, verde oliva. (Databio, 2016)

2.3.5. *Penicillium sp.*

Los integrantes del género *Penicillium* son hongos filamentosos estas especies de *Penicillium* están ampliamente distribuidas en la naturaleza y se hallan en el suelo, la vegetación caída, el aire y el suelo, además de su potencial patogenicidad, *Penicillium* produce micotoxinas.

La identificación a nivel de especie se basa en las características morfológicas, tanto macro como microscópicas. Poseen una característica al principio son de color blanco y luego se convierten en verde azuladas, gris verdosas, gris oliva, amarillentas o rosadas con el tiempo. El reverso de la colonia es pálido o amarillento. (Databio, 2016)

2.3.6. *Pseudomonas* sp.

Las *Pseudomonas* son bacilos Gram negativos, aerobios, oxidasa positivos, con una cierta facilidad de adaptación que les permite adecuar el hábitat donde se encuentren para utilizar diferentes fuentes como el carbono o el nitrógeno para su nutrición.

Debido a esta adaptación al medio ambiente las *Pseudomonas* se han convertido en un problema para la salud pública ya que estos microorganismos son capaces de colonizar un amplio rango de nichos. (Estupiñán, Avila de Nava, & Lopez, 2016)

2.3.7. Bolsas Plásticas

Las bolsas plásticas son elaboradas comúnmente de polietileno que es un material hecho a base de gas natural o petróleo, existiendo desde 1961 y utilizadas por todas las personas desde entonces. Se promedia que al año suelen fabricarse cerca de 500 billones a un trillón de materiales plásticos en todo el mundo.

Las bolsas de polietileno se obtienen gracias a la polimerización del etileno, que es un derivado del petróleo. El etileno es un compuesto químico orgánico, un hidrocarburo (enlaces de hidrógeno y carbono) formado por 2 átomos de carbono y 4 de hidrógeno $(C_2H_4)_n$ o $(CH_2=CH_2)_n$.

Se trata de los plásticos más comunes y usados en el mundo, principalmente por el bajo costo que presenta. (Cádiz, 2014)

CAPÍTULO III: MARCO METODOLÓGICO

3.1. Tipo y diseño de la investigación

El tipo de investigación a realizar es cuantitativa.

El nivel de la investigación experimental.

3.2. Muestra de estudio

Se trabajó con 30 muestras de bolsas y botellas (PEBD) recolectadas del botadero municipal de la ciudad de Tacna. El muestreo fue dirigido debido a que se tiene que buscar daño específico en las bolsas y botellas lo que indicaría que se está generando una actividad microbiana visible.

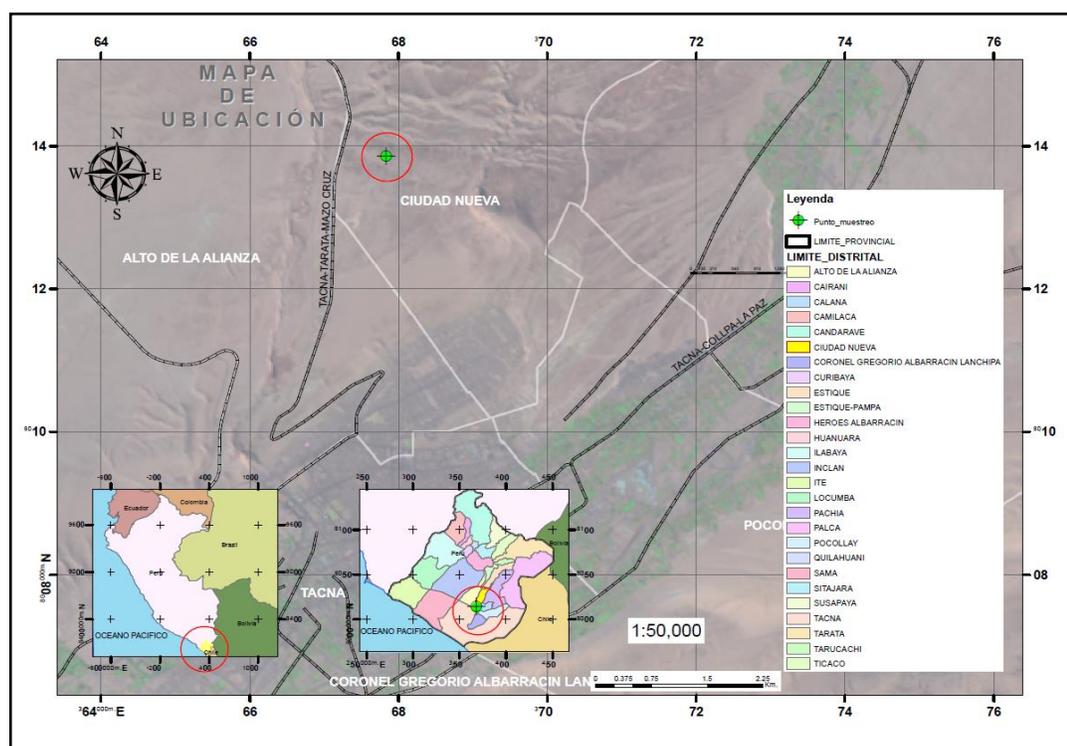


Figura 1 Ubicación del punto de recolección de muestra de PEBD

3.3. Operacionalización de variables

3.3.1. Variable Independiente.

- Consorcio microbiano (bacterias y hongos)

3.3.2. Variables Dependientes.

- Biodegradación de polietileno de baja densidad
- Microorganismos cultivables

3.4. Técnicas e instrumentos para la recolección de datos

3.4.1. Recolección de Muestra.

El área de disposición final de los residuos sólidos llamado “botadero municipal” que está ubicado a 7 kilómetros de la carretera a Tarata, en el cerro Intiorko, ya que es el lugar en donde los camiones de nuestra ciudad depositan los residuos sólidos que se generan diariamente en nuestra ciudad, donde se realizó el muestreo dirigido, eligiendo un lugar en el cual se encuentran depositadas muestras de polietileno de baja densidad con signos de deterioro y almacenados por varios años. (Figura 12)

3.4.2. Preparación del medio salino e inoculación.

Las muestras recolectadas fueron sumergidas en solución salina (0,85% NaCl) sacudiendo fuertemente el contenido para poder resuspender los microorganismos pegados al plástico; posteriormente se filtraron con papel Whatman; el cual sirvió de inóculo para los medios de enriquecimiento.

3.4.3. Preparación del medio de sales minerales.

El inóculo se sembró en el medio de sales minerales (MSM) que está compuesto por una solución principal, Tabla 2. (Figura 13)

Tabla 2**Cantidades de medio de sales minerales para 1litro**

ESPECIE	CANTIDAD
$\text{Na}_2\text{HPO}_4(12\text{H}_2\text{O})$	2,52 g
CaCl_2	0,002 g
KH_2PO_4	0,5 g
$\text{FeSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	0,001 g
NH_4Cl	1 g
$\text{MgSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	0,5 g
$\text{MnSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	0,007 g
$\text{ZnSO}_4(7\text{H}_2\text{O})$	0,007 g

3.4.4. Pesado del PEBD.

Se colocaron 6 g. aproximadamente de perlas de polietileno de baja densidad (Figura 14), pesadas en una balanza analítica (Figura 15), para obtener el peso exacto. Se colocaron estas perlas en 4 matraces (Tabla 3) con el medio salino mineral y el inóculo de microorganismos. (Figura 16)

Luego se pesó 6 g de perlas de polietileno de baja densidad y se colocaron con agua destilada como control.

Tabla 3 Grupos de muestras experimentales**Grupos de muestras experimentales**

BALANZA	MATRACES
Balanza analítica	Matraz N° 1 Control N° 1 Matraz N° 2 Control N° 2 Matraz N° 3 Control N° 3 Matraz N° 4 Control N° 4

3.4.5. Aislamiento de Microorganismos**3.4.5.1. Aislamiento de Microorganismos en Agar Nutritivo.**

Se calculó la cantidad de Agar nutritivo deshidratado (Figura 17) necesario para el volumen de medio requerido. Se pesó y se añadió a un matraz de 500 ml con un volumen de 300 ml de agua destilada.

Posteriormente se disolvió el medio en una cocinilla eléctrica hasta el punto de ebullición agitando constantemente, seguidamente se introdujo en la autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Acabado el proceso de esterilización, se extrajo el matraz del equipo y se la enfrió hasta una temperatura aproximada de 45°C posteriormente se procedió a plaquear y fueron rotuladas con la fecha, tipo de medio y número de muestra.

La siembra se realizó por la técnica de agotamiento y por la técnica de diseminación, y se incubó a 27°C por 72 horas.

3.4.5.2. Aislamiento de Microorganismos en Agar papa dextrosa.

Se calculó la cantidad de agar nutritivo deshidratado (Figura 18) necesario para el volumen de medio requerido. Se pesó y se añadió a un matraz de 500 ml con un volumen de 300 ml de agua destilada.

Posteriormente se disolvió el medio en una cocinilla eléctrica (Figura 19) hasta el punto de ebullición agitando constantemente, seguidamente se introdujo en la autoclave durante 15 minutos a 121°C.

Acabado el proceso de esterilización, se extrajo el matraz del equipo y se la enfrió hasta una temperatura aproximada de 45°C y se añadió cloranfenicol a una concentración final de 0,02 %, posteriormente se procedió a plaquear y fueron rotuladas con la fecha, tipo de medio y número de muestra.

La siembra se realizó por la técnica de agotamiento y por la técnica de diseminación, y se incubó a 27°C por 72 horas.

Luego de la incubación se procedió a seleccionar las colonias con características diferentes para ser purificadas en el agar correspondiente.

3.4.6. Observación al microscopio y prueba de catalasa

3.4.6.1 Observación al microscopio.

3.4.6.1.1. Coloración Gram.

La observación al microscopio se realizó mediante la tinción gram, consiste en añadir una gota de agua destilada en un portaobjeto y con la ayuda del asa de kolle en argolla cuidadosamente sacamos una muestra

pequeña y la diluimos en la gota de agua destilada, luego se fija la muestra por calor con ayuda de un mechero, ya que el calor fijará las bacterias al portaobjeto para que no se enjuaguen tan fácilmente durante la tinción.

Se procedió a añadir cristal violeta (Figura 20) al portaobjeto durante 2 minutos, pasado el tiempo se enjuagó el portaobjeto con agua destilada, seguidamente se repitió el proceso con lugol por 1 minuto y se enjuagó con agua destilada, después se le añadió alcohol acetona por 20 segundos y se enjuagó; finalmente se le añadió safranina por 1 minuto, se enjuagó el portaobjeto y se procedió a rotularla con el número de muestra; por último se puso a secar los portaobjetos, se añadió aceite de inmersión y se observó al microscopio a un aumento de 1000 X (Figura 21), se identificó tanto morfológicamente y su característica Gram, denominando gram negativas si las células tiñen de color fucsia, y gram positivas si tiñen de color violeta azulado. (Figura 22 al 30)

3.4.6.1.2 Técnica de la cinta pegante.

Se procedió a cortar cinta adhesiva de aproximadamente 5 cm para ser colocada sobre la colonia de los hongos, adicionalmente se procedió a agregar una gota de azul de metileno diluida con agua destilada en un portaobjeto. Se observó al microscopio a un aumento de 10X y de 40X para observar la morfología de las hifas y los conidios. Se realizó la identificación hasta género. (Figura 31 al 34)

3.4.6.2. Prueba de catalasa.

En un portaobjeto se añadió una gota de peróxido de hidrógeno y con la ayuda del asa de kolle en argolla se sacó una muestra bacteriana y se

incorporó en el peróxido de hidrogeno diluyéndola suavemente, la presencia de burbujas indica la actividad de la enzima catalasa y está degradando el peróxido de hidrógeno en agua y oxígeno de ser catalasa negativa la bacteria no tiene la capacidad de degradar el peróxido.

3.4.7. Purificación De Cepas.

La purificación de cepas se realizó en este caso dos veces, tanto como para bacterias y hongos.

- Bacterias: con la ayuda de un asa de kolle en argolla se tomó una colonia aislada, y se sembró por diseminación en una placa petri que contenía agar nutritivo (Figura 35), se rotuló y se envolvieron con papel kraft y, fueron colocadas en la incubadora a 27° C, durante 3 días.
- Hongos: con la ayuda de un asa de kolle en L se tomó una colonia aislada, y se sembró cuidadosamente en el medio de la placa petri que contenía agar papa dextrosa, se rotuló y se envolvieron con papel kraft y, fueron colocadas en la incubadora a 27°C, durante 3 días. (Figura 36 al 48)

3.4.8. Fermentación de Carbohidratos.

Se prepararon matraces que contenían caldo con 10 g por litro de peptona, 5 g de cloruro de sodio y se añadió diferentes tipos de carbohidratos (manitol, xilosa, sacarosa, fructosa y glucosa) (Figura 49) se mezcló uniformemente cada matraz y se procedió añadir gotas de rojo de fenol moviéndolo con la varilla de vidrio hasta que la muestra tomó un color rojo oscuro (pH 7,5).

Luego se añadió 10 ml de caldo a cada tubo de vidrio previamente rotulado con el nombre del azúcar y la cepa, en el tubo que contenía glucosa se le colocó una campana Durham para determinar la producción de CO₂.

Se procedió a autoclavar los tubos por 15 minutos a 116° C (Figura 50) se incorporó con la ayuda de un asa de kolle de argolla una cepa a cada tubo con carbohidrato se dejó incubar a 27° C por 72 horas. Se consideró producción de ácido si el tubo viró de color rojo a amarillo, y se procedió a observar la producción de gas en la campana Durham en el tubo que contenía glucosa. (Figura 51 al 63)

3.4.9 Pesado Final Del PEBD.

Luego de 70 días de incubación de las perlas de polietileno de baja densidad se procedió extraer las perlas de los matraces de forma aséptica y se lavaron con alcohol de 96° para su desinfección (Figura 64) y posteriormente se lavó con detergente neutro para eliminar el de bioflim formado en la capa de las perlas de polietileno, se procedió a secar 55° C por una noche (Figura 65) y se procedió a pesar con la ayuda de una balanza analítica. (Figura 66)

3.4.10. Microscopía electrónica de barrido

Se procedió a observar al microscopio Tescan VEGA TS 5136XM a un aumento de 500X y se tomaron fotografías de barrido electrónico de perlas sin tratamiento, perlas lavadas y sin lavar. (Figura 67)

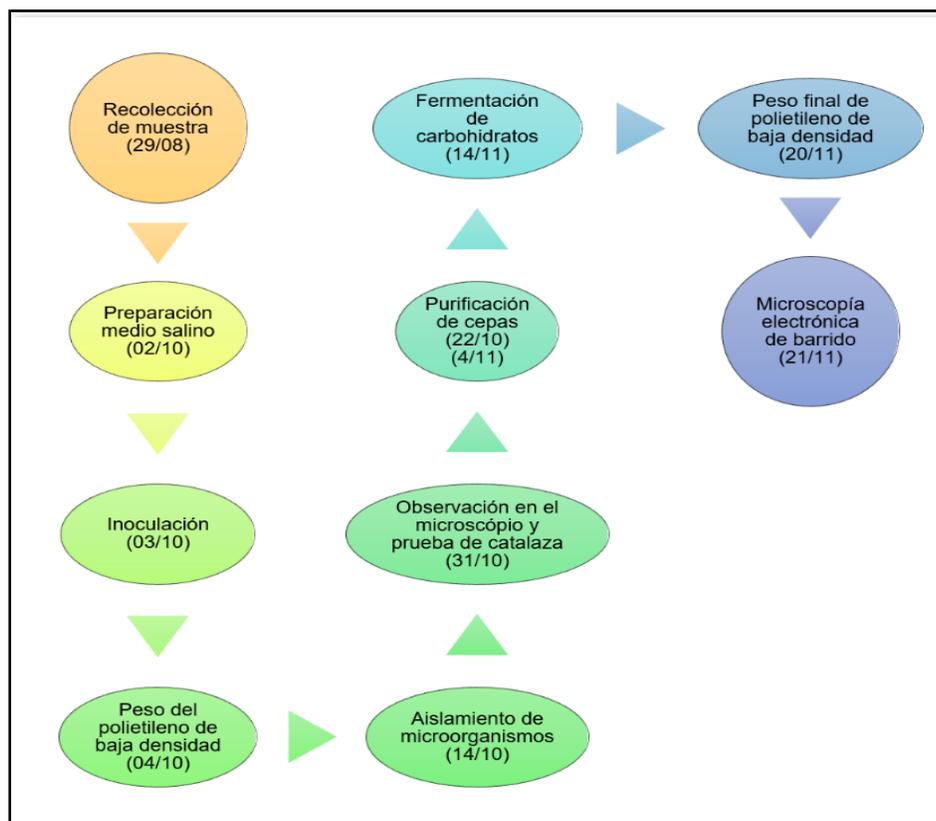


Figura 2 Diagrama de flujo del procedimiento

3.5. Procesamiento y análisis de datos

El análisis de datos se lleva a cabo mediante la recolección de datos procesados en el programa Microsoft Excel para evaluar las estadísticas descriptivas de las muestras, para determinar diferencias de medias, se utilizó el software SPSS, utilizando la prueba de hipótesis Kruskal- Wallis y una comparación de medias mediante un análisis de Duncan .

CAPÍTULO IV: RESULTADOS

4.1. Prueba de hipótesis

Es posible biodegradar polietileno de baja densidad (PEBD) utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna.

H_0 : No existe diferencias significativas entre el peso del control de perlas de polietileno de baja densidad en agua destilada con perlas de polietileno de baja densidad incubadas con los consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna.

H_1 : Existe diferencias significativas entre el peso del control de perlas de polietileno de baja densidad en agua destilada con perlas de polietileno de baja densidad incubadas con los consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna.

Se utilizó la Prueba de Kruskal-Wallis porque los datos no cumplieron con la condición de normalidad y homogeneidad (análisis estadístico no paramétrico) (Tabla 4) (Tabla 5)

Tabla 4

Homogeneidad de la varianza de los datos

PRUEBA DE HOMOGENEIDAD DE VARIANZA					
		ESTADÍSTICO	GL1	GL2	SIG.
		DE LEVENE			
PESO_PP	Se basa en la media	8.551	1	6	0.026

Se basa en la mediana	6.202	1	6	0.047
Se basa en la mediana	6.202	1	3.000	0.088
y con gl. ajustado				
Se basa en la media recortada	8.512	1	6	0.027

Tabla 5

Prueba de normalidad de los datos

PRUEBAS DE NORMALIDAD				
TRATAMIENTO		SHAPIRO-WILK		
		ESTADÍSTICO	GL	SIG.
PESO_PP	TRATAMIENTO	0.890	4	0.384
	CONTROL	0.708	4	0.014
A. CORRECCIÓN DE SIGNIFICACIÓN DE LILLIEFORS				

Prueba de Kruskal-Wallis (Tabla 6)

Hipótesis nula: $\mu_1 = \mu_2$

Hipótesis alternativa: $\mu_1 \neq \mu_2$

Valor-P = 0.0244248

Rechazar la hipótesis nula para alfa = 0.05

Tabla 6

Prueba de Kruskal-Wallis para evaluar la hipótesis

PRUEBA DE KRUSKAL-WALLIS		
	TAMAÑO	RANGO
	DE MUESTRA	PROMEDIO
CONTROL FINAL	4	10.625
CONTROL INICIAL	4	10.625
PESO FINAL	4	2.5
PESO INICIAL	4	10.25
ESTADÍSTICO = 9,39943		
VALOR-P = 0.0244248		

Puesto que el valor-P para la prueba es menor que 0,05 puede rechazarse la hipótesis nula con un 95,0% de nivel de confianza. Lo que indica que, si existe diferencia significativa entre el peso del control de perlas de polietileno de baja densidad y el peso de las perlas de polietileno de baja densidad con el tratamiento de los consorcios microbianos, también se puso a evaluar la diferencia entre el peso final y el peso inicial de las perlas de polietileno de baja densidad tratadas con el consorcio microbiano por 70 días.

4.2. Aislamiento de microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad

Tabla 7

Cepas aisladas y morfología microscópica de los consorcios microbianos del botadero municipal de Tacna

CEPA	GRAM	FORMA	CATALASA
M1-AN	Gram positivo	Bacilo esporulado	Positivo
M1-AN1	Gram negativo	Diplococos	Positivo
M2-AN	Gram negativo	Bacilos cortos	Positivo
M2-BN	Gram negativo	Bacilos cortos y diplococos	Positivo
M3AN	Gram negativo	Diplococos	Positivo
M4-BN	Gram negativo	Bacilos cortos	Positivo
M1-AN3	Gram positivo	Cocos	Positivo
M1-AN2	Gram positivo	Cocobacilo	Positivo
M1BN	Gram negativo	Diplococos	Positivo

Tabla 8

Fermentación de carbohidratos de las cepas aisladas del botadero municipal de Tacna

CEPA	GLUCOSA	XILOSA	MANITOL	FRUCTUOSA	SACAROSA	GAS
M1-AN	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
M1-AN1	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
M2-AN	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
M2-BN	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
M3-AN	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

M4-BN	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
M1-AN3	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
M1-AN2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M1BN	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Tabla 9

Descripción de colonias de las cepas aisladas del botadero municipal de Tacna

CEPA	DESCRIPCIÓN DE COLONIA EN AGAR NUTRITIVO
M1-AN	Colonias de bordes irregulares de color crema
M1-AN1	Colonias pequeñas puntiformes de color crema
M2-AN	Colonias pequeñas puntiformes color crema
M2-BN	Colonias pequeñas de color blanco puntiformes
M3-AN	Colonias pequeñas de color crema amarillo
M4-BN	Colonias pequeñas de color anaranjado
M1-AN3	Colonias anaranjadas pequeñas mucoides
M1-AN2	Colonias blanco lechoso colonias mucoides
M1BN	Colonias blanco lechoso pequeñas mucoides

Tabla 10

Hongos aislados y morfología microscópica de los consorcios microbianos del botadero municipal de Tacna

CEPA	FORMA MICROSCÓPICA
M2-AP	Levaduras redondas pequeñas

M3AP	Hifas con fialides y conidios
M4-BP	Hifas con conidios alrededor
M4-AP	Levaduras redondas pequeñas en gemación

Tabla 11

Fermentación de carbohidratos de hongos aislados del botadero municipal de Tacna

CEPA	GLUCOSA	XILOSA	MANITOL	FRUCTUOSA	SACAROSA	GAS
M2-AP	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
M3AP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M4-BP	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
M4-AP	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo

Tabla 12

Descripción de colonias de hongos aislados del botadero municipal de Tacna

CEPA	DESCRIPCIÓN DE COLONIA EN GÉNERO
	APD
M2-AP	Colonia mucoide de color salmón invade la placa de polietileno. <i>Rhodotorula sp</i>
M4-AP	Colonia anaranjada con borde blanco regular de aspecto aterciopelado con incrustaciones anaranjado intenso <i>Penicillium vanoranjei</i>

M4-BP	Colonias de color verde paca con un centro blanco abultado borde irregular y textura terrosa	<i>Aspergillus sp</i>
M4-AP1	Colonias blancas cremosas de 3 mm de diámetro	<i>Saccharomyces sp</i>

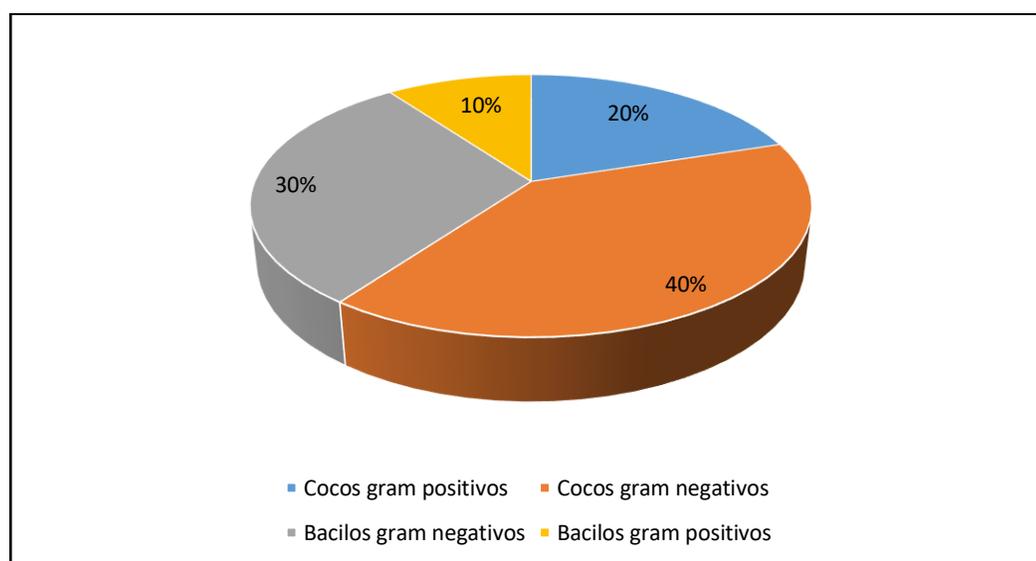


Figura 3 Porcentaje de tipos de microorganismos según la tinción Gram

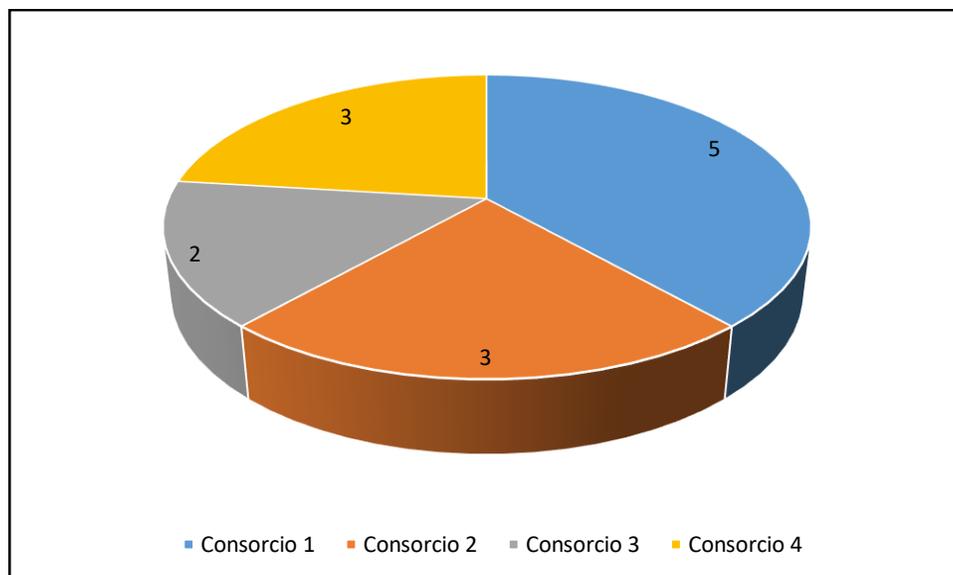


Figura 4 Número de microorganismos aislados por consorcio

Tabla 13

Promedio y porcentaje del peso inicial y final del polietileno de baja densidad

	PESO INICIAL	PESO FINAL	DIFERENCIA DE PESO MG	PORCENTAJE
CONSORCIO 1	6.0059	5.9293	76.6	1.28
CONSORCIO 2	6.0277	5.9738	53.9	0.89
CONSORCIO 3	6.0000	5.6390	361	6.01
CONSORCIO 4	6.0000	5.7996	200.4	3.34
PROMEDIO	6.0084	5.8354	172.975	2.88

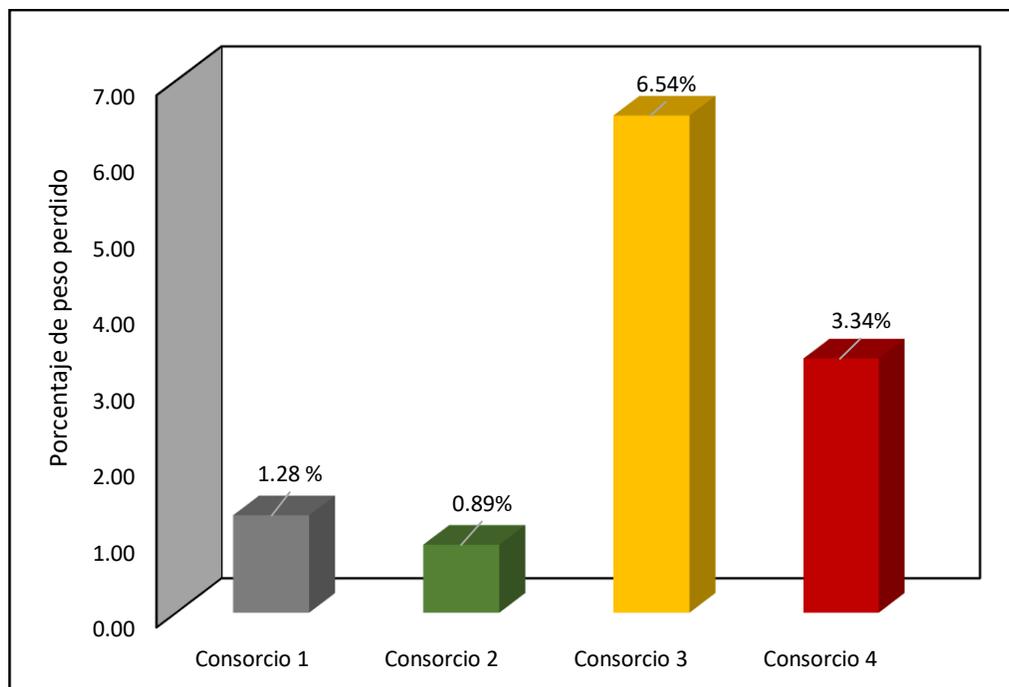


Figura 5 Porcentaje de peso perdido del polietileno de baja densidad por los consorcios microbianos

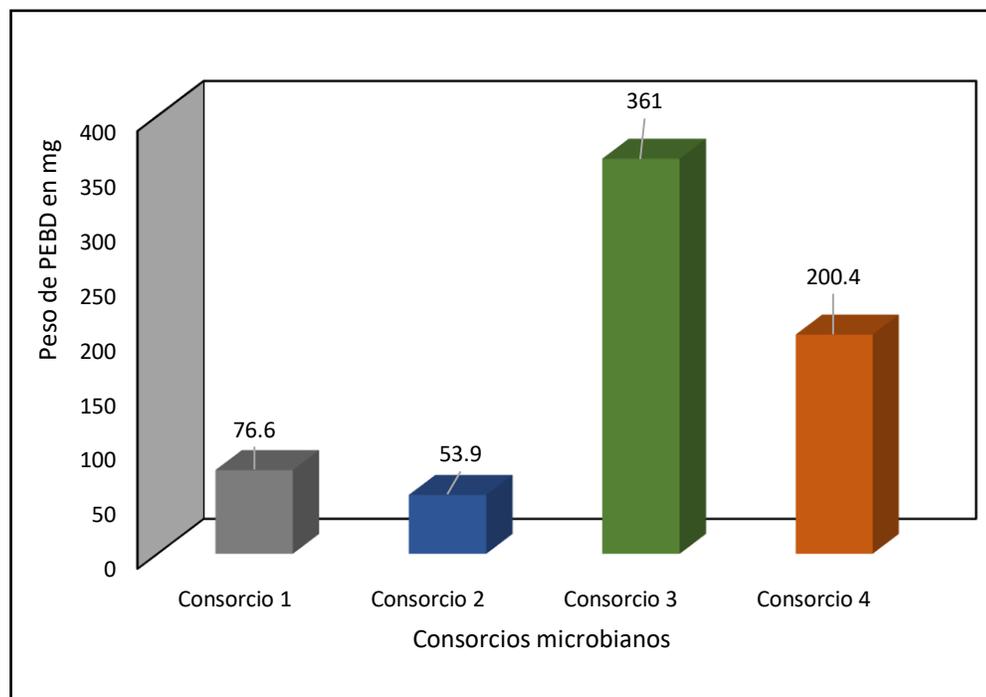


Figura 6 Peso perdido de polietileno de baja densidad en miligramos

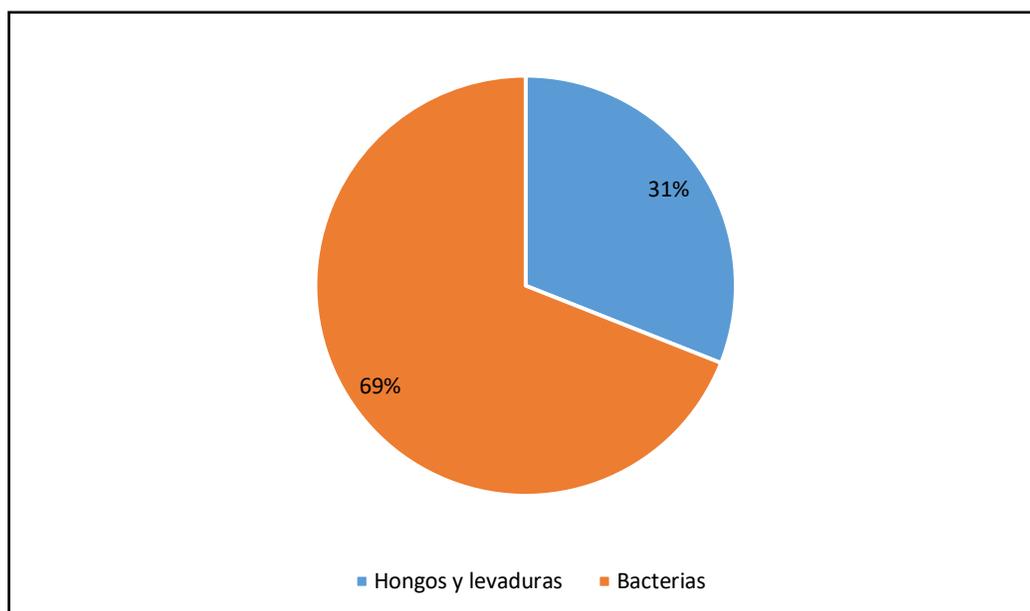


Figura 7 Porcentaje de hongos y bacterias aisladas de los consorcios microbianos del botadero municipal de Tacna

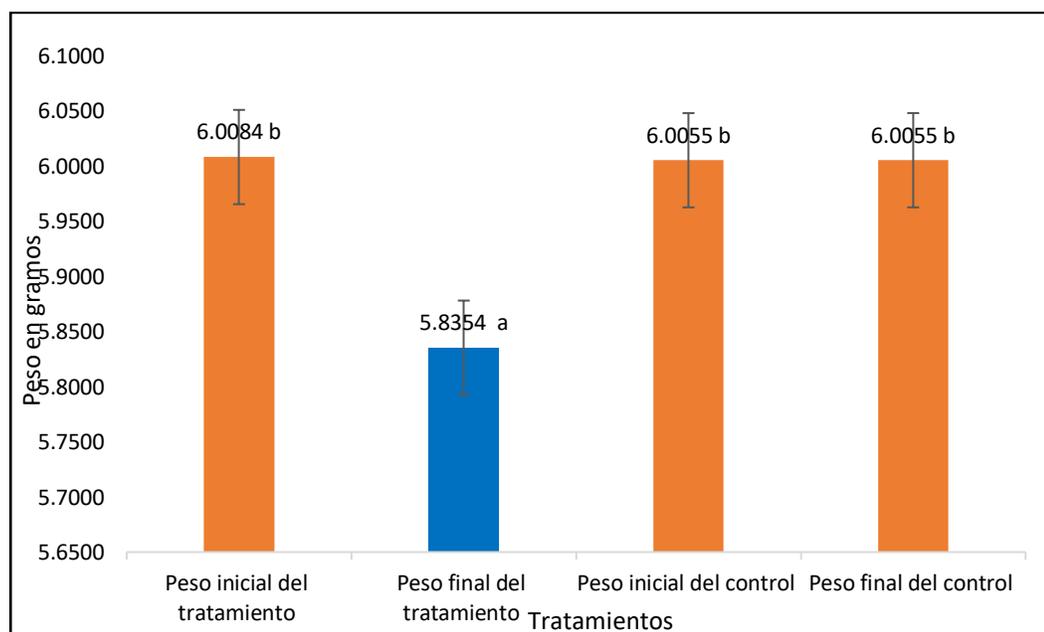


Figura 8 Comparación del peso final y el peso inicial de las perlas de polietileno de baja densidad con el tratamiento de consorcios microbianos y el control (agua destilada)

Tabla 14**Conorcios microbianos aislados**

CONSORCIO	CONSORCIO	CONSORCIO	CONSORCIO
1	2	3	4
M1AN	M2AN	M3AN	M4BN
M1AN1	M2BN	M3AP	M4BP
M1AN3	M2AP		M4AP
M1AN2			
M1BN			

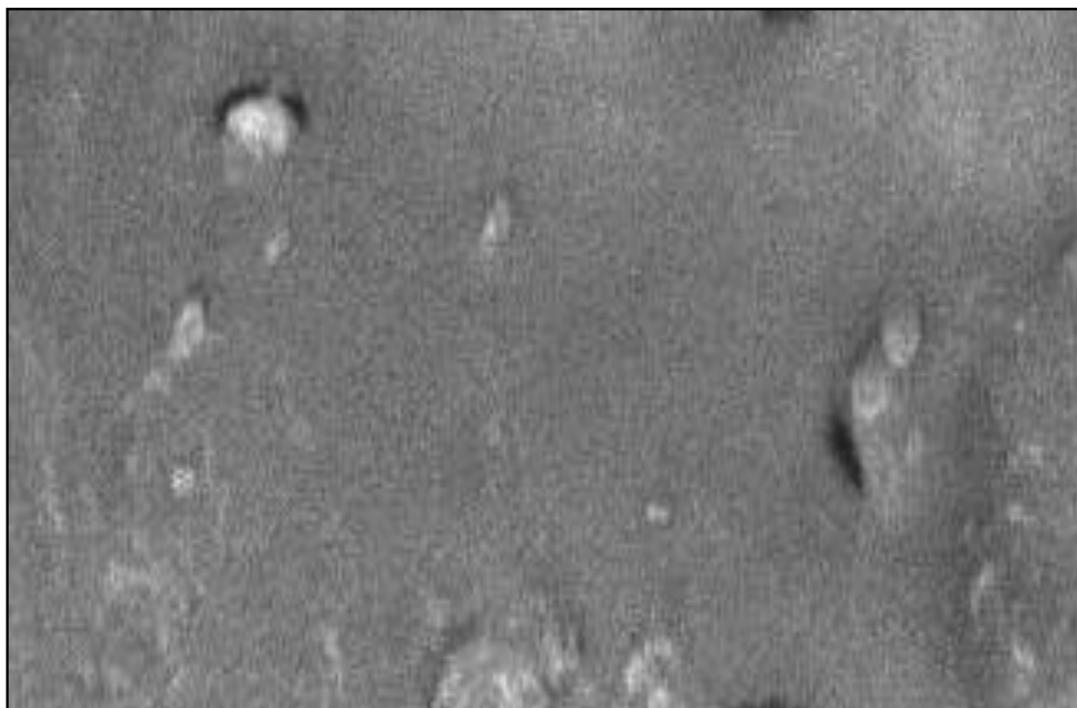


Figura 9 Microfotografía SEM de PEBD, de control de perlas de polietileno de baja densidad a 500x .



Figura 10 Microfotografía SEM de PEBD, de perlas de polietileno de baja densidad colonizado por bacterias y recubierto de biofilm bacteriano a 500x.

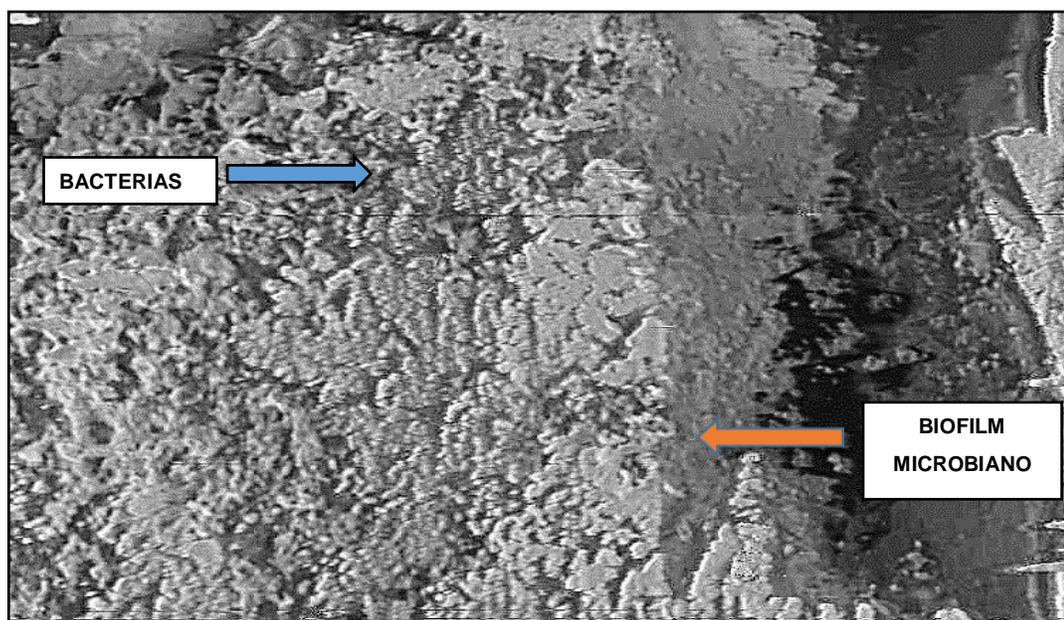


Figura 11 Microfotografía SEM de PEBD, de perlas de polietileno de baja densidad sin biofilm microbiano a 500x .

CAPÍTULO V: DISCUSIÓN

En el botadero de la Ciudad de Tacna se almacena gran cantidad de residuos sólidos sin un tratamiento adecuado, el polietileno es uno de los contaminantes que causa mayor impacto en el ambiente.

Los materiales de polímeros son resistentes a la oxidación, a los efectos de la luz solar y las propiedades térmicas, es rígido y resistente a la atracción y su uso es principalmente para la fabricación de bolsas y botellas. (Perdomo, 2002).

Se han aislado 9 especies bacterianas (Tabla 4) y 4 especies de hongos (Tabla 9) del polietileno de baja densidad, el porcentaje aisladas de bacterias represento un 69% y hongos un 31%, el tipo de bacterias que se aislaron y predominó la morfología cocoide gram negativa (*Figura 3*), se han reportado en aislamientos de botaderos de otras ciudades, la presencia de *Diplococos* y *Rhodococcus* siendo este último un biodegradador de polietileno con una tasa de 0,86% de biodegradación por semana. (Acuña, 2017).

Especies de *Rhodococcus sp* y *Bacillus sp*, han reportado un porcentaje de biodegradación de 6,4 % y 4 % respectivamente (Auta, Emenike, Jayanthi, & Fauziah, 2018). En el consorcio 1 se han aislado bacterias con características del género *Bacillus sp* y *Rhodococcus sp*.

En otros trabajos se han aislado bacterias degradadora de polietileno de bajo peso molecular aislada del mar contaminado con derrame de petróleo, esta bacteria fue identificada como *Pseudomonas aeruginosa*. Se realizaron estudios genéticos identificando genes que codificantes para enzimas hidroxilasa, monooxigenasa, rubredoxina y rubredoxina reductasa. Estos genes se clonaron y

se logró la biodegradación por bacterias recombinantes. (Jeon & Kim, 2015), los bacilos cortos pueden ser especies de *Pseudomonas sp.*

Las especies de hongos que predominaron en la muestra fueron *Rhodotorula sp*, *Penicillium vanoranjei*, *Aspergillus sp* y *Saccharomyces sp*, estas especies han sido reportadas como biodegradadoras de polietileno de baja densidad los géneros de *Rhodotorula sp*, *Penicillium sp* por Uribe (2010) y *Aspergillus sp* y *Saccharomyces sp* por Méndez (2007).

El perfil fermentativo de carbohidratos nos indica que la mayoría de las bacterias son anaerobias facultativas y no producen gas por lo que se descarta la presencia de coliformes se observa un metabolismo bastante activo para degradar azúcares como el manitol (cepas M1-AN, M2-BN, M4-BN) y la xilosa (cepas M1-AN, M1-AN1, M2-BN, M3-AN, M4-BN). Ninguna bacteria tuvo la capacidad de degradar la fructuosa. (Tabla 8)

Los hongos tuvieron un metabolismo oxidativo con respecto a la mayoría de los carbohidratos y las levaduras un metabolismo fermentativo. La levadura M4-AP fermenta todos los carbohidratos a diferencia del manitol, y es el único microorganismo capaz de degradar la fructuosa (Tabla 11).

Se obtuvo un promedio de peso perdido de 172,98 mg de polietileno de baja densidad, lo que correspondió un porcentaje de 2,88 % en un período de 70 días de incubación (Tabla 10). Se pudo observar que hubo una diferencia significativa en la pérdida de peso en el polietileno de baja densidad aplicando un consorcio microbiano, con respecto al peso inicial de las perlas de polietileno de baja densidad y el control. (Figura 8) El consorcio que obtuvo mayor porcentaje de biodegradación fue el consorcio 3 y con un porcentaje de 6,54 %. (Grafico 5) y se

aisló el hongo *Penicillium vanorangei* y bacterias cocoides gram negativas (Tabla 11), trabajos han reportado el trabajo de perlas de PEBD inoculadas con *Paecilomyces lilacinus*, *Aspergillus sp*, *Lasodiplodia theobromae* incubadas durante 90 días, mostraron pérdida de peso durante el curso del período de incubación con un porcentaje de 4% y 0,4 mg de pérdida de peso de polietileno, siendo el más eficiente el hongo *Aspergillus sp*. (Sheik, Chandrashekar, Swaroop, & Somashekarappa, 2015)

Se observó la colonización de las bacterias en las perlas de polietileno de baja densidad, produciendo gran cantidad de exopolisacáridos (biofilm) (*Figura 10*) en las perlas lavadas (*Figura 11*) se evidencia el desgaste del polietileno de baja densidad comparado con el control (*Figura 9*) en el cual la superficie es lisa y no se observan microorganismos adheridos.

Según Gutiérrez (2013) reporta el desarrollo de la flora microbiana en el biofilm del polietileno de baja densidad indicando que a pH 7 predominan las bacterias y pH 5 predominan los hongos evidenciando una erosión en el polietileno.

CONCLUSIONES

1. Se aislaron 9 cepas bacterianas y 4 cepas de hongos de los distintos consorcios microbianos utilizando como única fuente de carbono el polietileno de baja densidad en medio mineral salino.
2. Se obtuvo un porcentaje de 2,08 % en promedio de degradación del polietileno de baja densidad con los diferentes consorcios microbianos siendo el consorcio 3 el que reportó un porcentaje de degradación de 6,4 %, donde se aislaron el hongo *Rhodotorula sp* y diplococos gram negativos y bacilos gram negativos.
3. Se evidencia mediante microscopia electrónica el daño causado en el polietileno de baja densidad por las bacterias, utilizando un microscopio de barrido (SEM) con aumento de 500X.

RECOMENDACIONES

1. Se recomienda hacer un análisis metagenómico de las muestras para identificar todos los microorganismos presentes en las muestras y su abundancia.
2. Realizar un análisis de FTIR para evaluar la degradación molecular del polietileno de baja densidad.
3. Estudiar enzimas bacterianas relacionadas a la biodegradación del polietileno de baja densidad para que sean clonadas en bacterias como la *Escherichia coli* u otra similar para la producción industrial de microorganismos transformantes.
4. Aplicar cada cepa por separado para evaluar la capacidad individual de biodegradación de polietileno de baja densidad por cada microorganismo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acuña, N. (2017). *Revisión bibliográfica sobre los microorganismos biodegradadores de polietileno de baja densidad y sus efectos en el material*. Bogotá.
- Al-mansour, W., Hmoody, & Abdulhanmed. (2017). New Record of *Penicillium vanoranjei* in Iraq. *Journal of Biotechnology Research Center*, 11 .
- Augustyn, A., Hosch, W., & Lotha, G. (04 de abril de 2019). *Encyclopedia Britannica*. Obtenido de <https://www.britannica.com/science/polyethylene>
- Barajas. (2011). *Biodegradación del plástico*. México. Obtenido de <http://search.proquest.com/docview/1707881136/A41A5F99F7CD4DFAPQ/1?account>
- Betancourth, M., Botero, J., & Rivera, S. (2004). *Biopelículas: una comunidad microscópica en desarrollo*.
- Bhatia, M., Girdhar, A., Tiwari, A., & Nayariseri, A. (2014). *Implications of a novel Pseudomonas species on low density polyethylene biodegradation: An in vitro to in silico approach*. 3. doi:<https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-497>
- Bonhomme, S. (2003). *Environmental biodegradation of polyethylene*. 12.
- Cádiz. (2 de 07 de 2014). *Ecologistas en acción*. Obtenido de <https://www.ecologistasenaccion.org/28277/las-bolsas-de-plastico-contaminan-y-no-son-necesarias/>
- Cain, R. (1992). *Microbial degradation of synthetic polymers, Microbial Control of Pollution*. Cambridge University Press.

- Clutario, T., & Cuevas, V. (2011). Colonización de plástico por *Xylaria* sp . *Philippine Journal of Science*, 7.
- Databio. (2016). *Cladosporium* sp. *Fichas de agentes biológicos*, 5. Obtenido de <http://insht.es/RiesgosBiologicos/Contenidos/Fichas%20de%20agentes%20biologicos/Fichas/Hongos/Cladosporium%20spp.pdf>
- Databio. (2016). *Penicillium* sp. *Fichas de agentes biológicos*, 5. Obtenido de <https://www.insst.es/documents/94886/353749/Penicillum+spp+2017.pdf/57121544-9157-4bbe-a6eb-b394c83bf9e1>
- Estupiñán, S., Avila de Nava, S., & Lopez, Y. (2016). *Aislamiento e identificación de Pseudomonas sp. y Aeromonas sp. en aguas de piscinas publicas de Bogota*. 5.
- Gonzales, M., & Camarena, G. (2013). *Degradación de plástico por Rhizopus sp.* Mexico. Obtenido de <https://es.scribd.com/document/63595936/Biodegradacion-de-Plastico-Por-Rhyzopus-Sp>
- Gutiérrez, G. (2013). *Biodegradación de polietileno de baja densidad por consorcios microbianos* . México.
- IGP. (s.f.). met.igp.gob.pe/clima/HTML/tacna.html.
- Iparragirre, K., & Vivanco, M. (2015). *Aislamiento y caracterización de hongos filamentosos biodegradadores de polietileno de tereftalato y polietileno de baja densidad* .ica. Ica.
- Jeon, H., & Kim, M. (2015). *Functional analysis of alkane hydroxylase system derived from Pseudomonas aeruginosa E7 for low molecular weight polyethylene biodegradation*<https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.04.024>. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 141-146.

- Johnson, T. (18 de enero de 2019). *ThoughtCo*. Obtenido de <https://www.thoughtco.com/what-is-a-polymer-820536>
- Limon, M. (2011). *Biodegradación de polietileno de baja densidad*. Mexico.
- Mangiarotti, A., Caretta, G., Nelli, E., & Pioletti, E. (1994). *Biodeterioro de materiales plásticos por Microhongos*. Boletín Micológico, 39-47.
- Méndez, C. (2007). *Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno*.
- Méndez, C., Vergaray, G., Béjar, V., & Cárdenas, K. (2007). *Aislamiento caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno*. *Revista peruana de biología*, 203 – 205.
- Méndez, C., Vergaray, G., Béjar, V., & Cárdenas, K. (2017). *Aislamiento y caracterización de micromicetos biodegradadores de polietileno*.
- Mendez, L. (19 de Octubre de 2015). *Laboratorio de Investigación Médica, Hospital de Especialidades C.M.N.* Obtenido de <http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/micologia/aspergilosis.html>
- Montoya, A., & Ochoa, D. (2010). *Conorcios Microbianos: una metáfora biológica aplicada a la asociatividad empresarial en cadenas productivas agropecuarias*.
- Perdomo, G. (Abril de 2002). *Plásticos y medio ambiente*. *Revista Iberoamerica de polímeros*, 3(2).
- Sheik, S., Chandrashekar, K., Swaroop, K., & Somashekarappa, H. (2015). *Biodegradation of gamma irradiated low density polyethylene and polypropylene by endophytic fungi*. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 21-29.
- Speight, J. (2011). *Handbook of Industrial Hydrocarbon Processes*.

- Uribe, D. (2010). *Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú*. 4.
- Uribe, D., Giraldo, D., Gutiérrez, S., & Merino, F. (2010). *Biodegradación de polietileno de baja densidad por acción de un consorcio microbiano aislado de un relleno sanitario, Lima, Perú*. 4.
- Visagie, C., Houbaken, J., & Samson, R. (2013). *Cinco nuevas especies de Penicillium en la sección Sclerotiora: un homenaje a la familia real holandesa*. Semantic Scholar. doi:10.3767 / 003158513X667410
- Volke, T. (1997). *Efecto de tratamientos fisicoquímicos y cometabolismo en la degradación de polietileno de baja densidad por hongos filamentosos*. Tesis, Mexico.

ANEXOS



Figura 12 Recolección de muestra en estado de degradación



Figura 13 Sales minerales utilizadas para el medio mineral salino



Figura 14 Perlas de polietileno de baja densidad

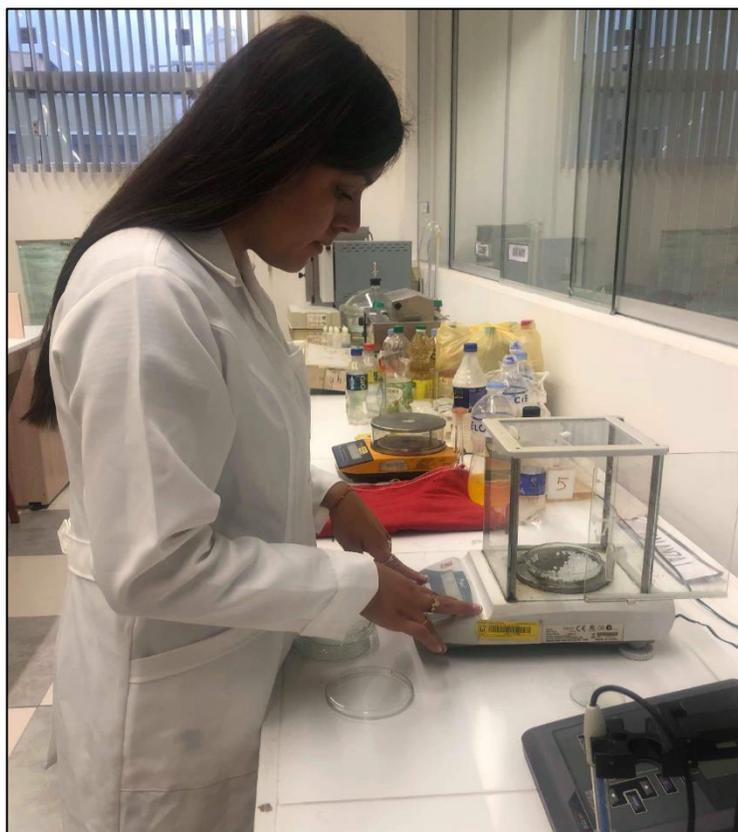


Figura 15 Pesado de perlas de polietileno de baja densidad

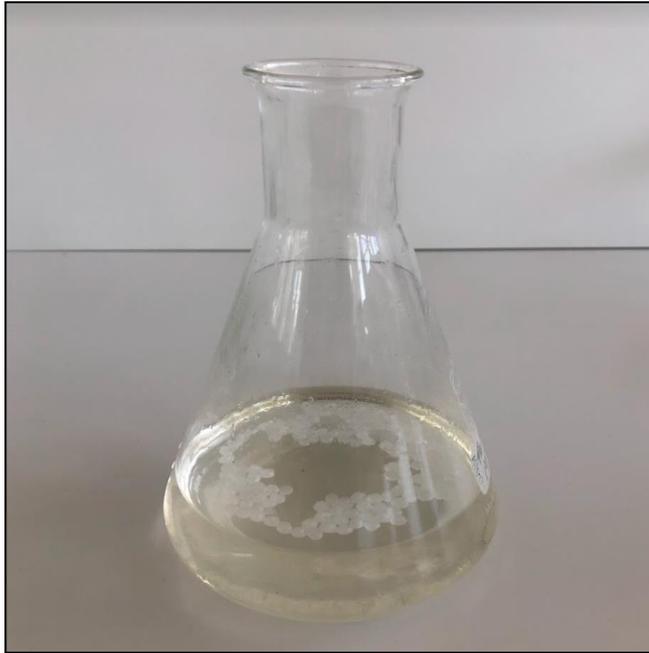


Figura 16 Perlas en medio salino mineral y el inóculo de microorganismos

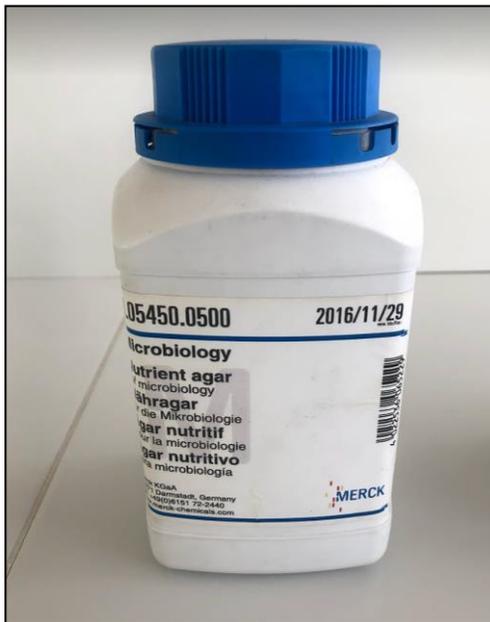


Figura 17 Agar nutritivo

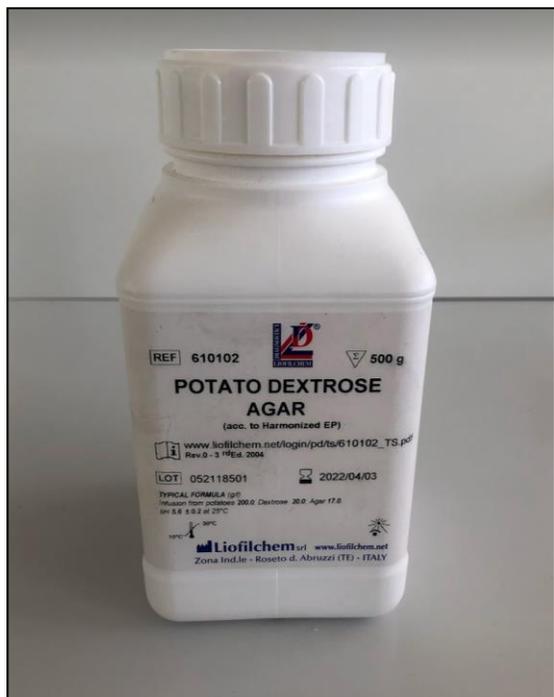


Figura 18 Agar papa dextrosa



Figura 19 Calentamiento de medio de cultivo agar papa dextrosa para su disolución



Figura 20 Reactivos usados para la coloración gram



Figura 21 Observación en el microscopio

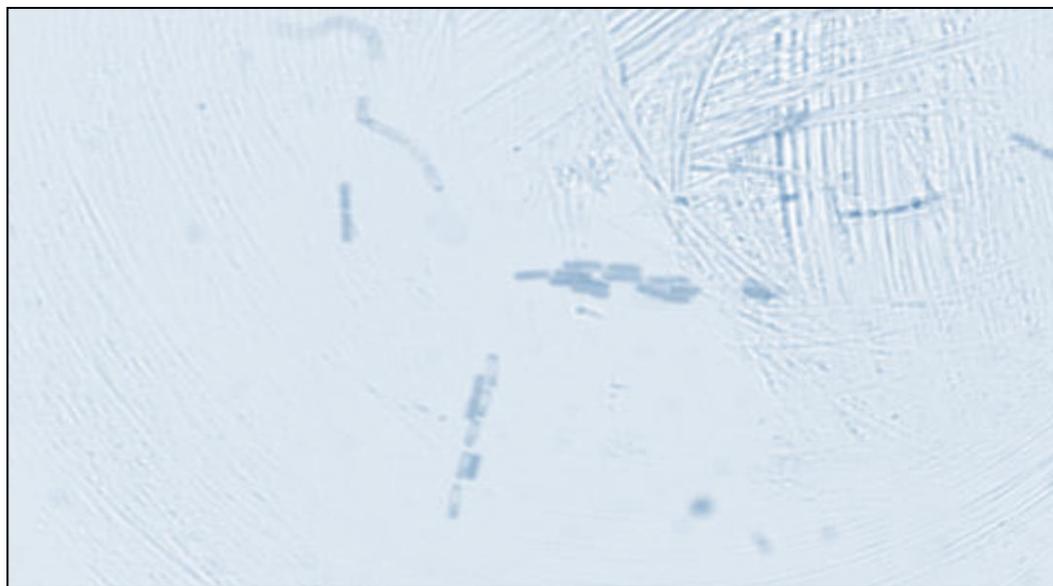


Figura 22 Cepa M1-AN bacilos gram positivos

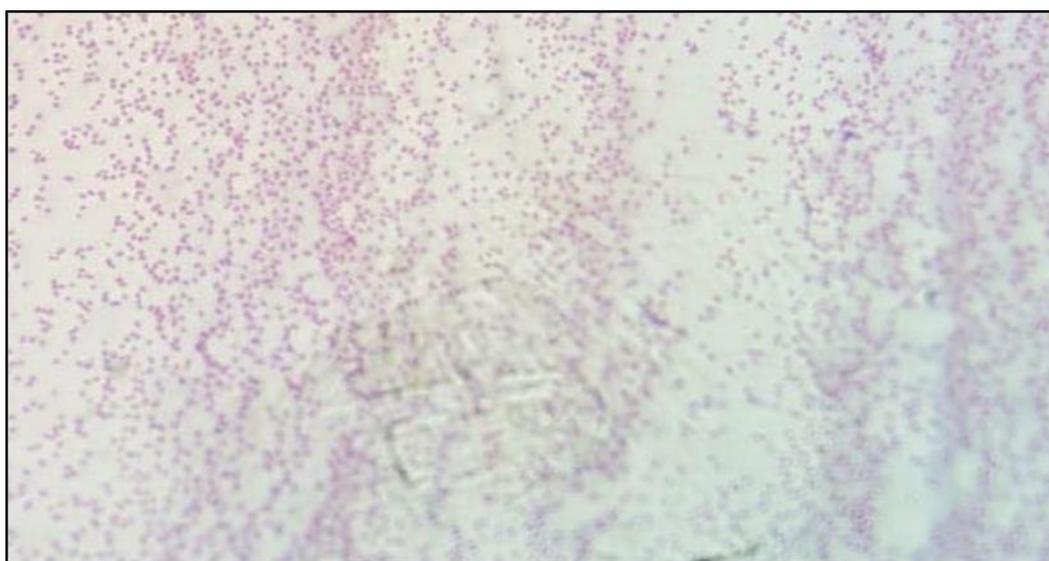


Figura 23 Cepa M1-AN1 cocos gram negativos

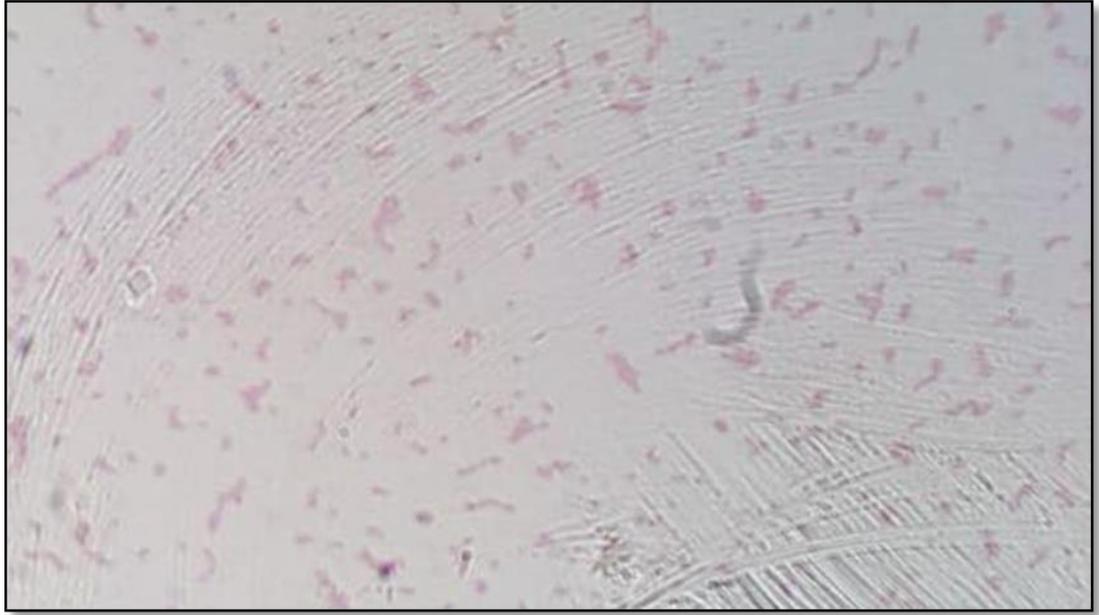


Figura 24 Ceba M2-AN bacilos cortos gram negativos

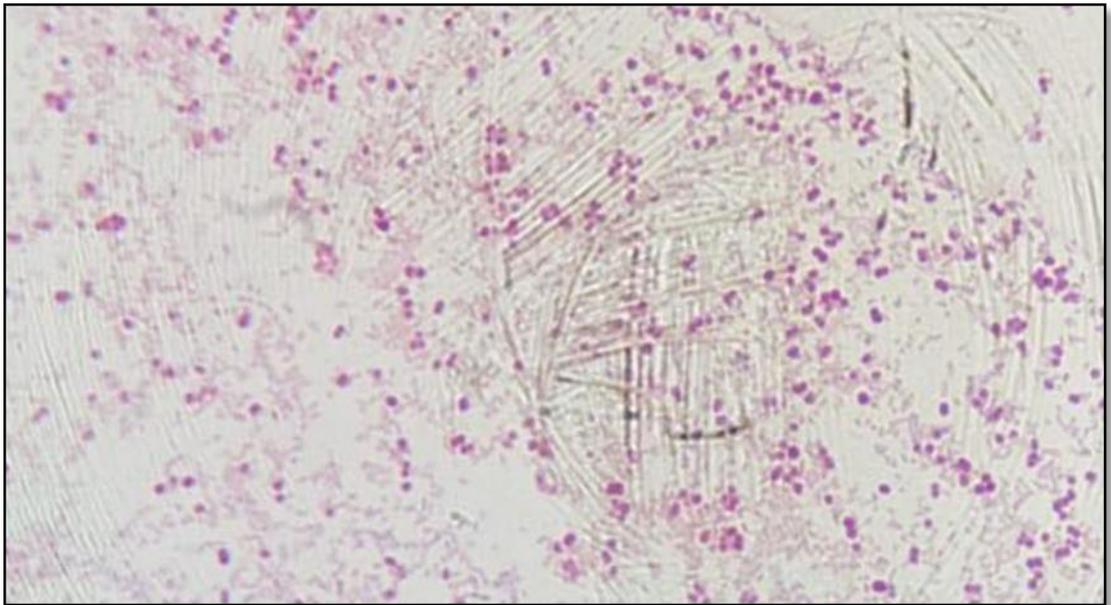


Figura 25 Consorcio M2-BN diplococos y bacilos gram negativos

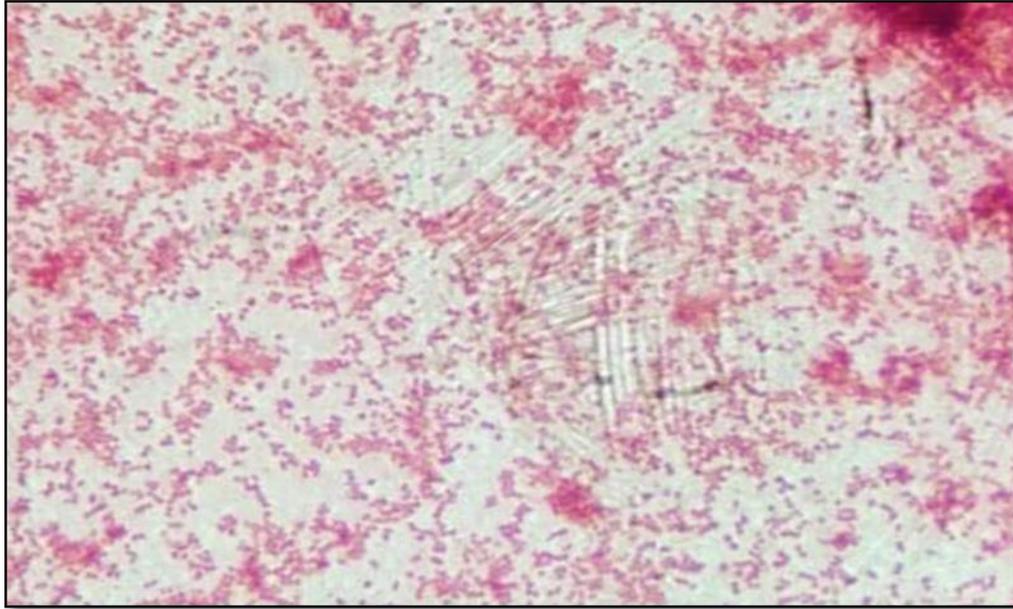


Figura 26 Cepa M3-AN diplococos gram negativos

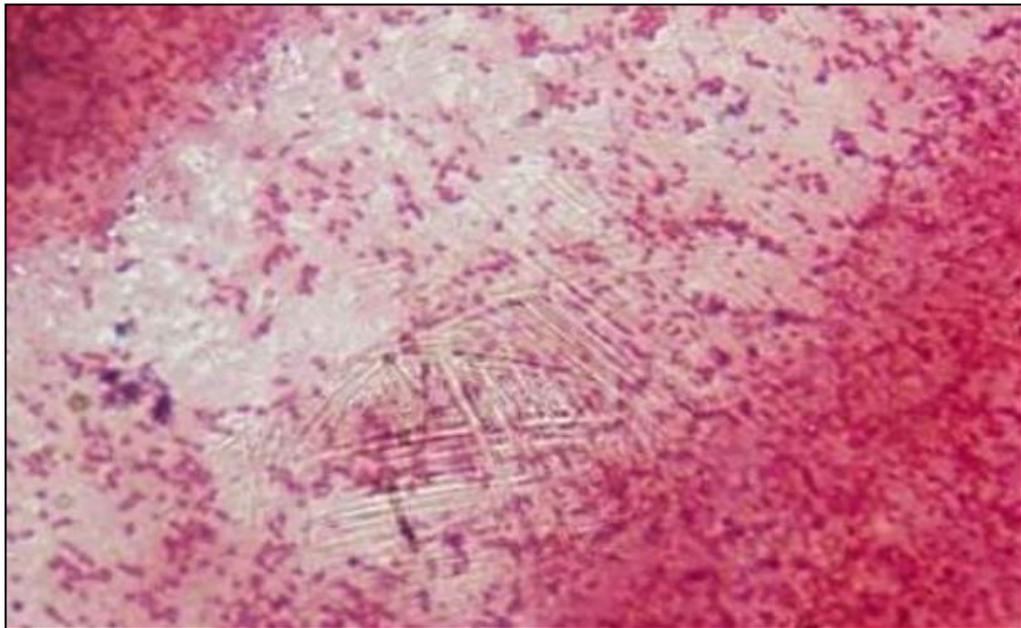


Figura 27 Cepa M4-BN Bacterias bacilos cortos gram negativos

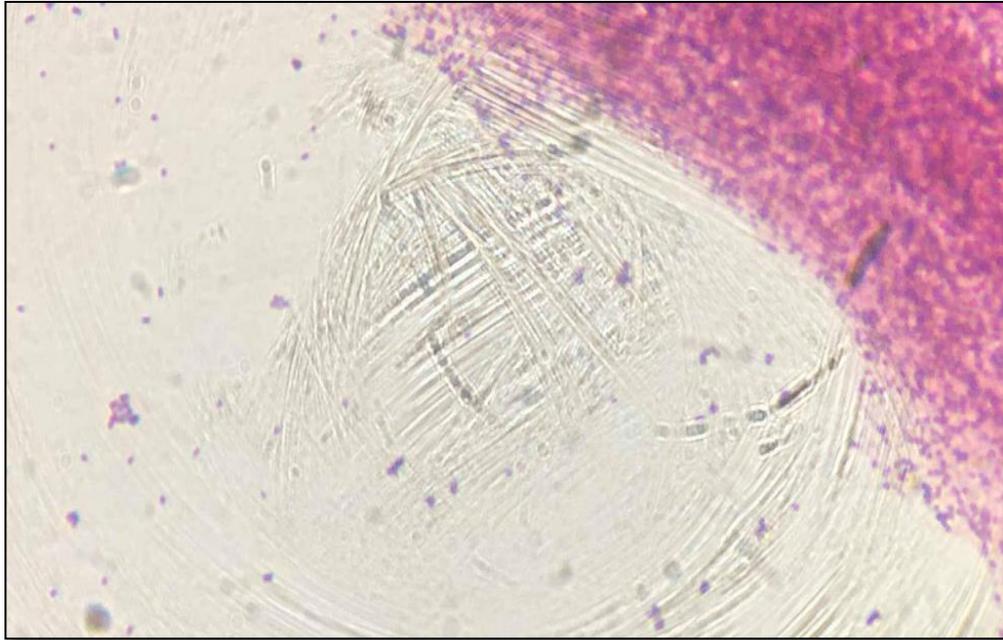


Figura 28 Cepa N° M1-AN3 cocos gram positivos

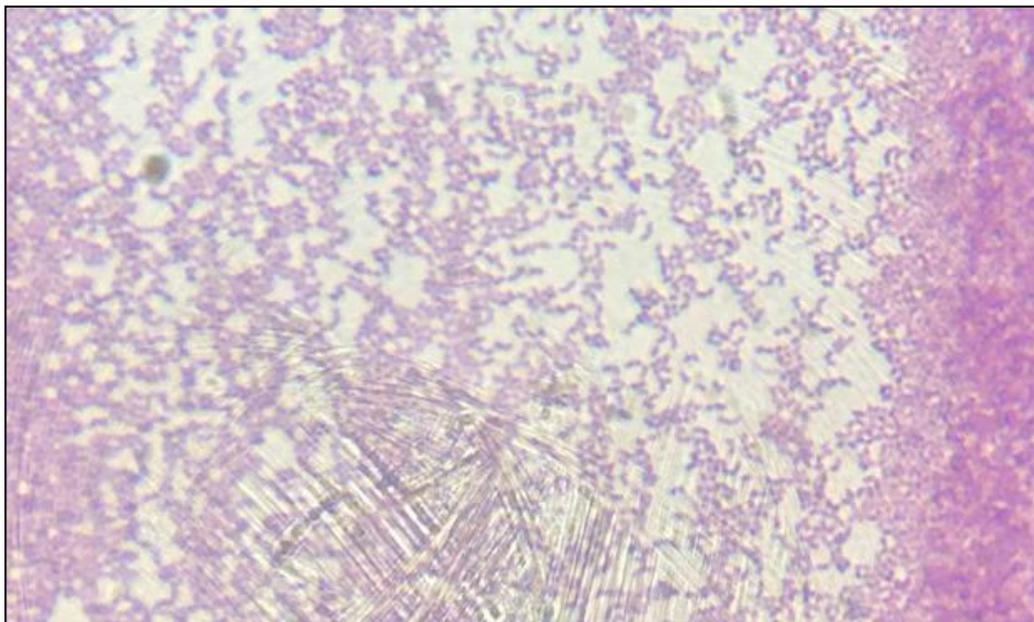


Figura 29 Cepa M1-AN2 cocobacilo gram negativo

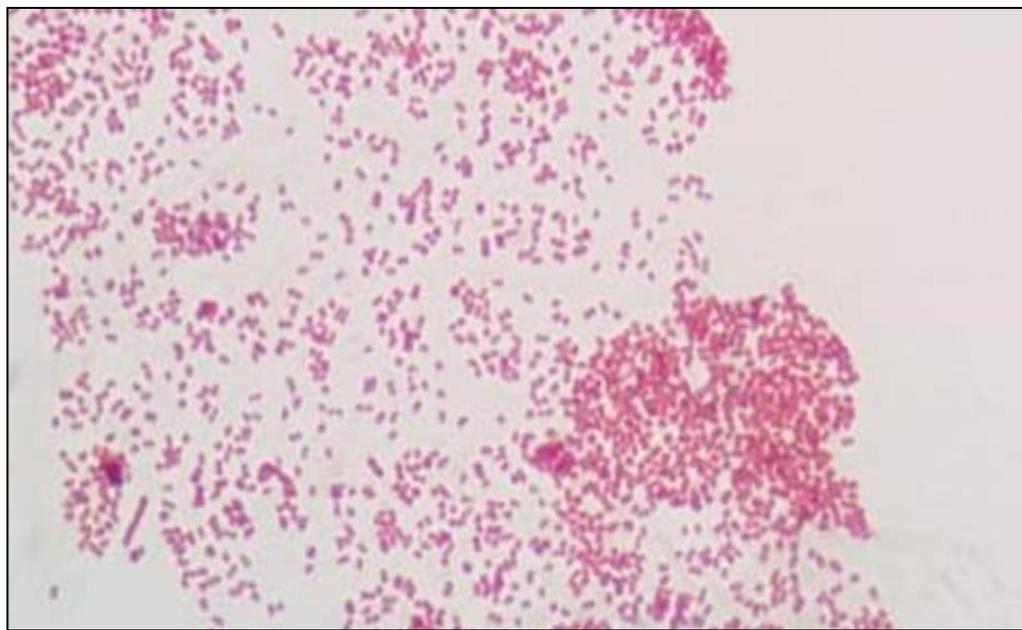


Figura 30 Cepa M1-BN diplococo gram negativo

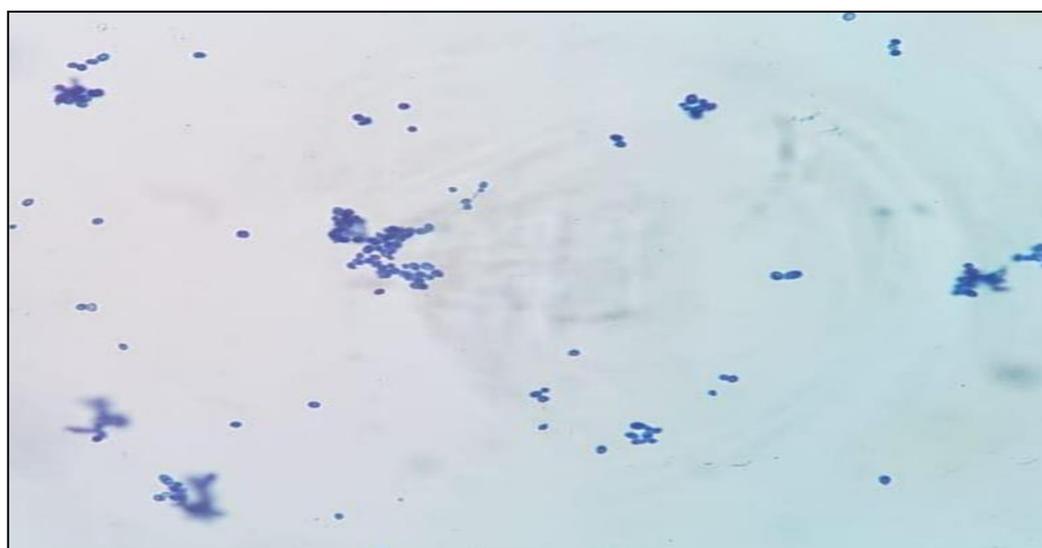


Figura 31 Cepa M2-AP levaduras *Rhodotorula* sp

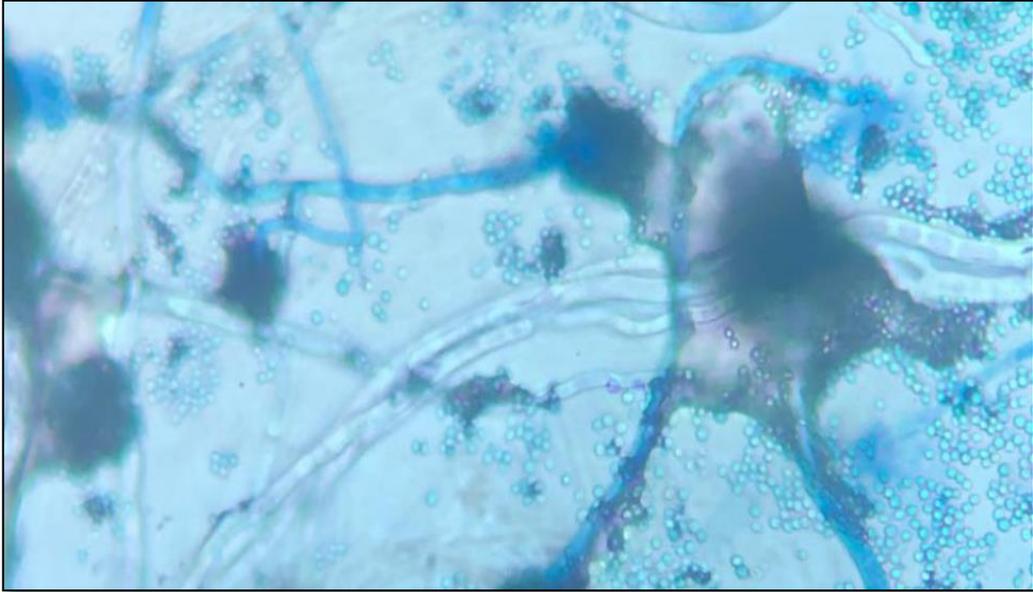


Figura 32 Cepa M4–AP *Aspergillus* sp

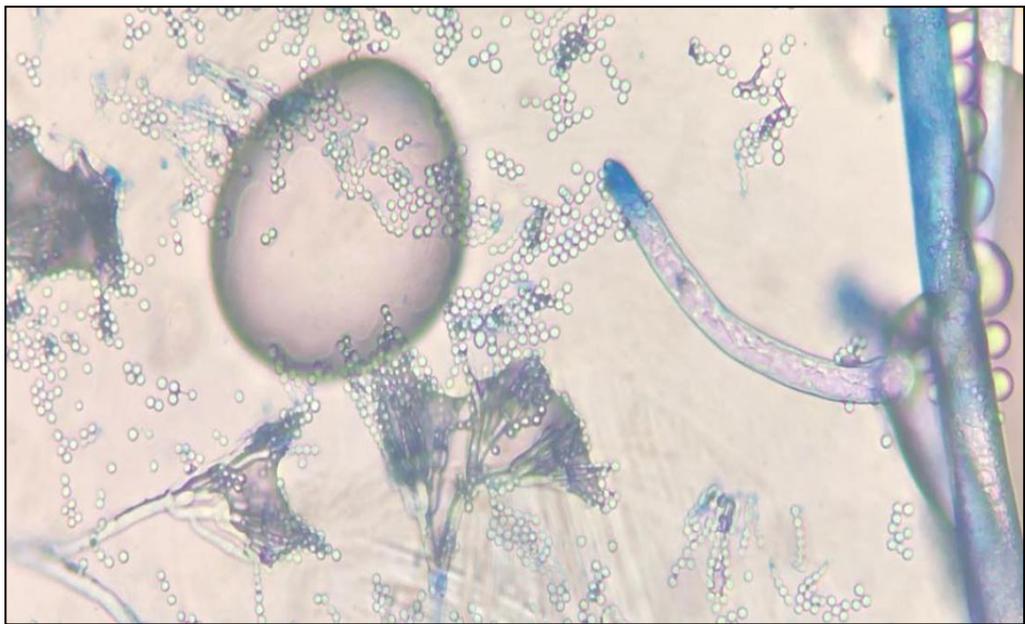


Figura 33 Cepa M3–AP *Penicillium vanoranjei*

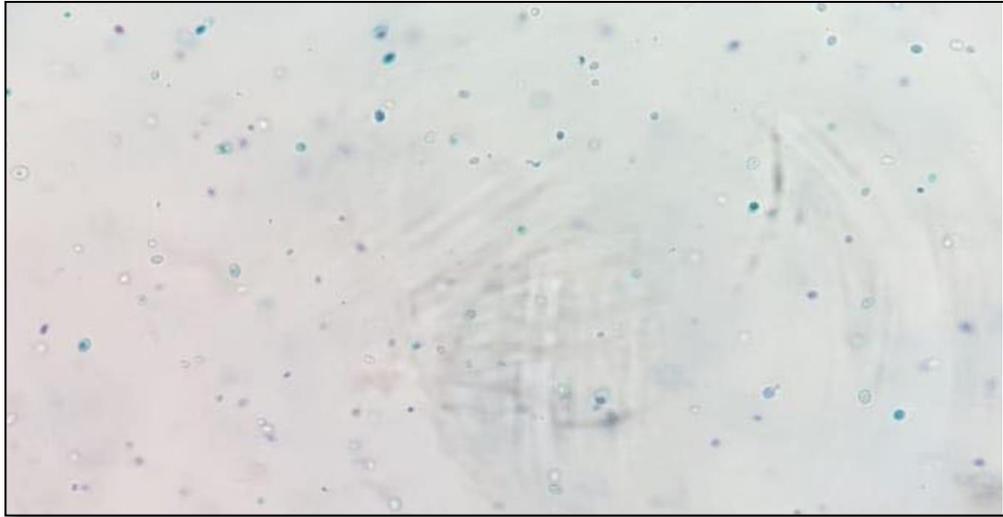


Figura 34 Cepa M4-AP *Sacharomyces* sp



Figura 35 Purificación de cepas



Figura 36 M1-AN cepa purificada



Figura 37 M1-AN1 cepa purificada



Figura 38 M2-AN cepa purificada



Figura 15 M2-BN cepa purificada



Figura 40 M3–AN cepa purificada



Figura 41 M4–BN cepa purificada



Figura 42 M1-AN3 cepa purificada



Figura 43 M1-AN2 cepa purificada



Figura 44 M1-BN cepa purificada



Figura 45 M2 – AP cepa purificada *Rhodotorula sp*



Figura 46 M3-AP cepa purificada *Penicillium vanoranjei*



Figura 16 Muestra M4-BP *Aspergillus sp*



Figura 17 M4-AP *Sacharomyces sp*



Figura 49 Tipos de carbohidratos utilizados para la fermentación



Figura 50 Tubos con carbohidratos auto clavados



Figura 51 Perfil de fermentación de la muestra M1-AN

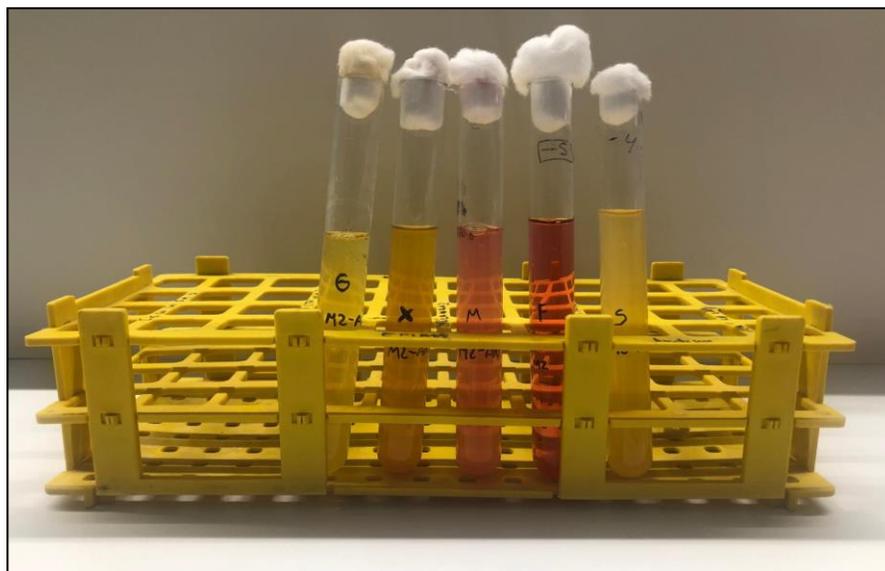


Figura 52 Perfil de fermentación de la muestra M1-AN1



Figura 53 Perfil de fermentación de la muestra M2-AN

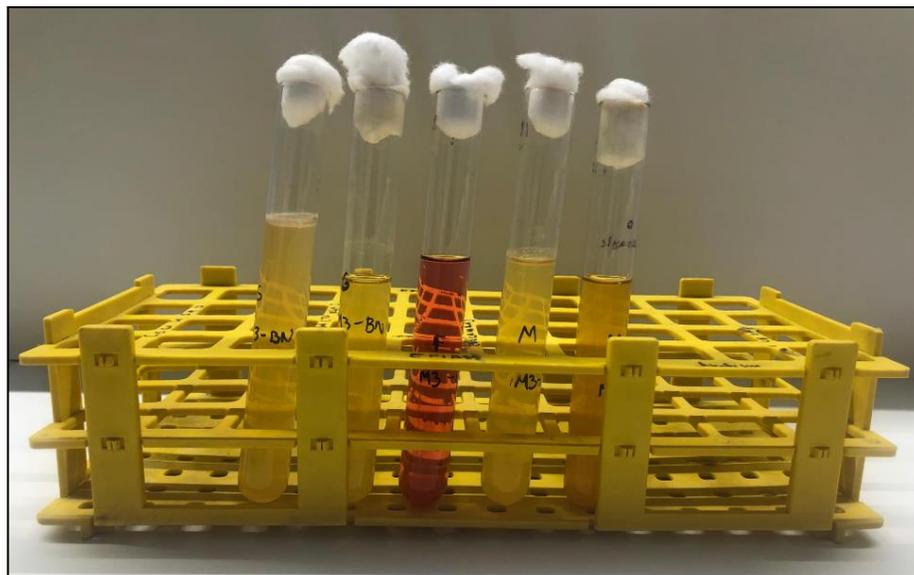


Figura 54 Perfil de fermentación de la muestra M2-BN

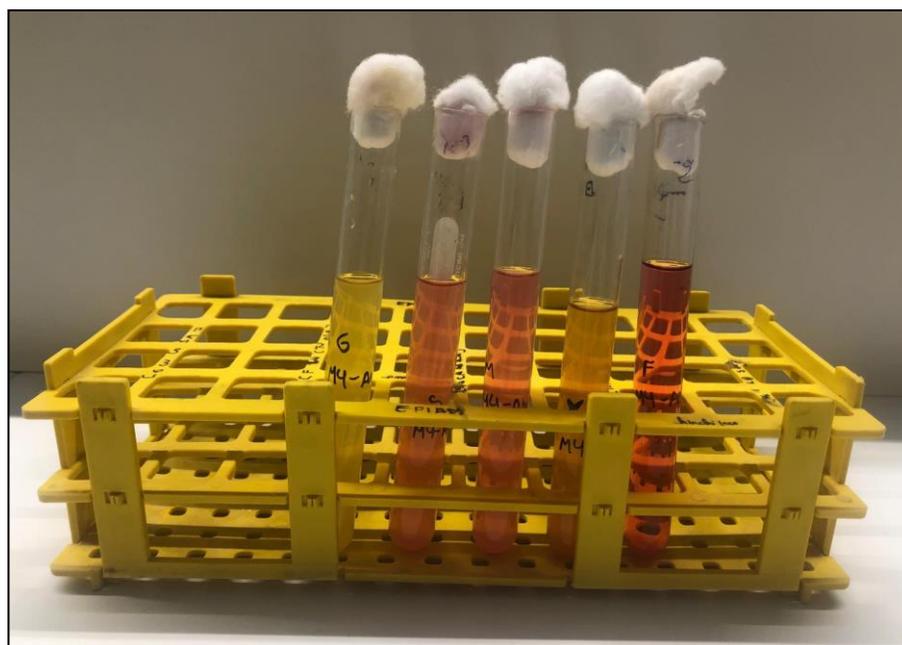


Figura 55 Perfil de fermentación de la muestra M3-N1



Figura 56 Perfil de fermentación de la muestra M5-BN

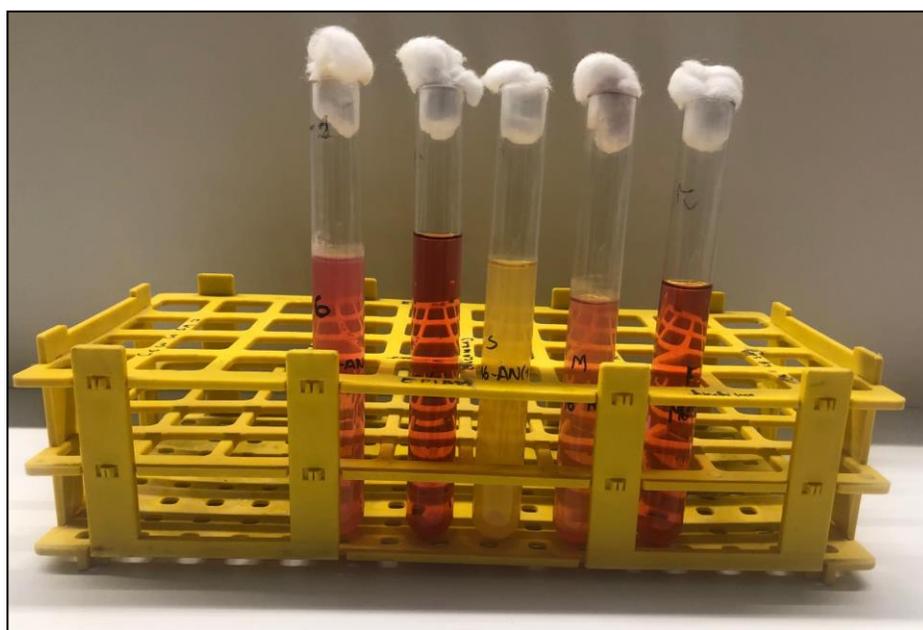


Figura 57 Perfil de fermentación de la cepa M1-AN1



Figura 58 Perfil de fermentación de la cepa M1-AN2

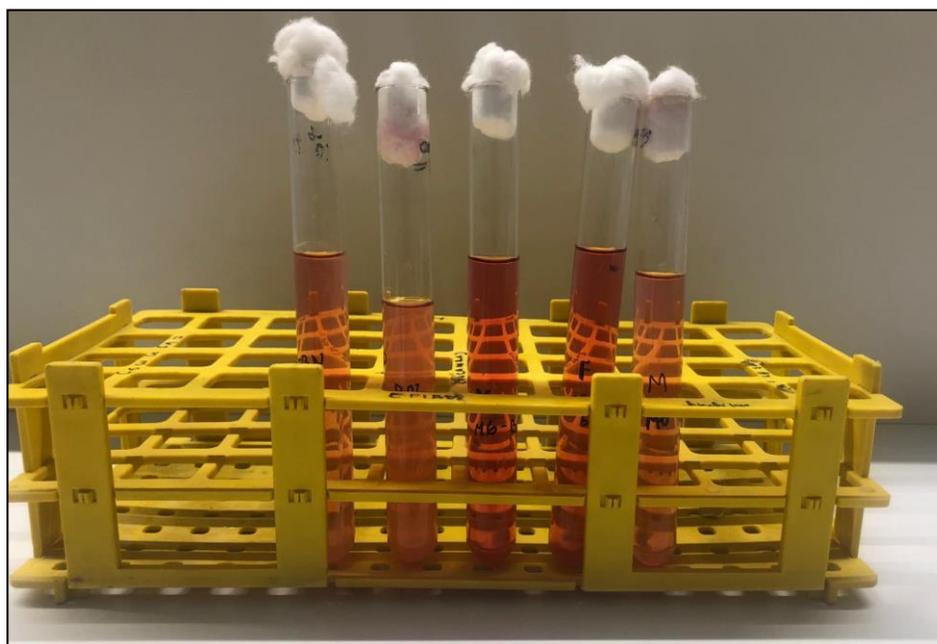


Figura 59 Perfil de fermentación de la cepa M2-BN

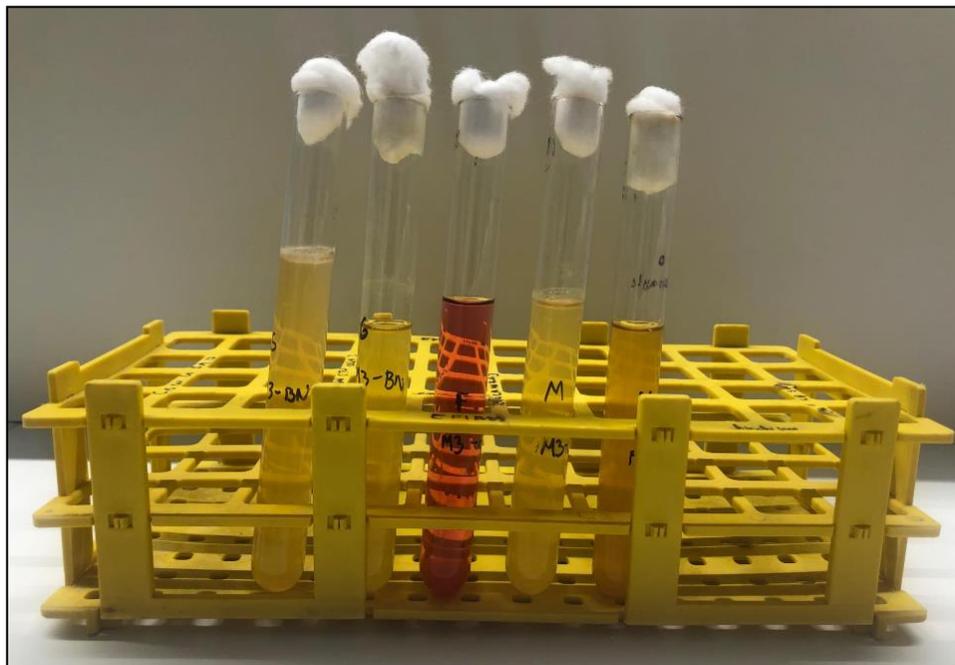


Figura 60 Perfil de fermentación de la cepa M2-AP

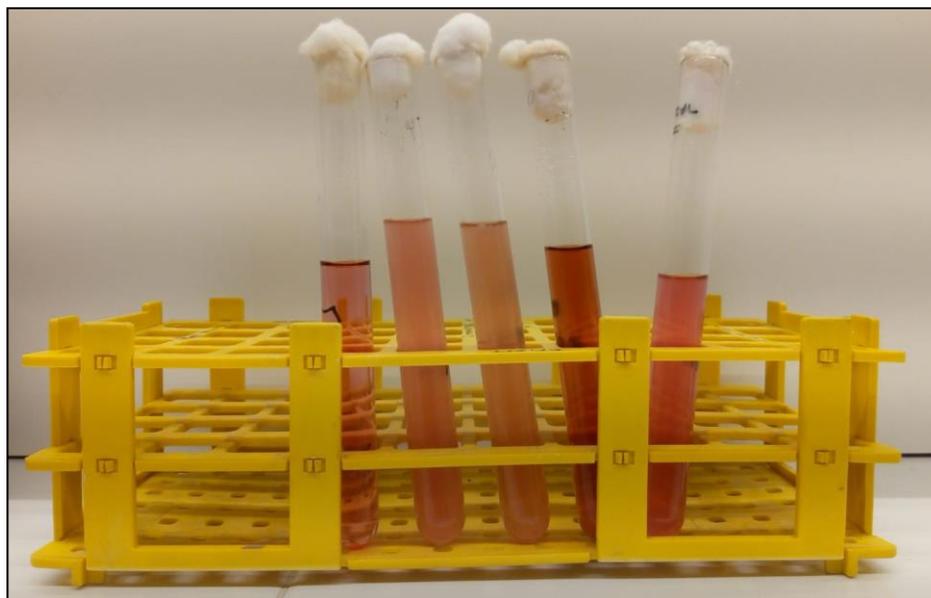


Figura 61 Perfil de fermentación de la muestra M4-AP

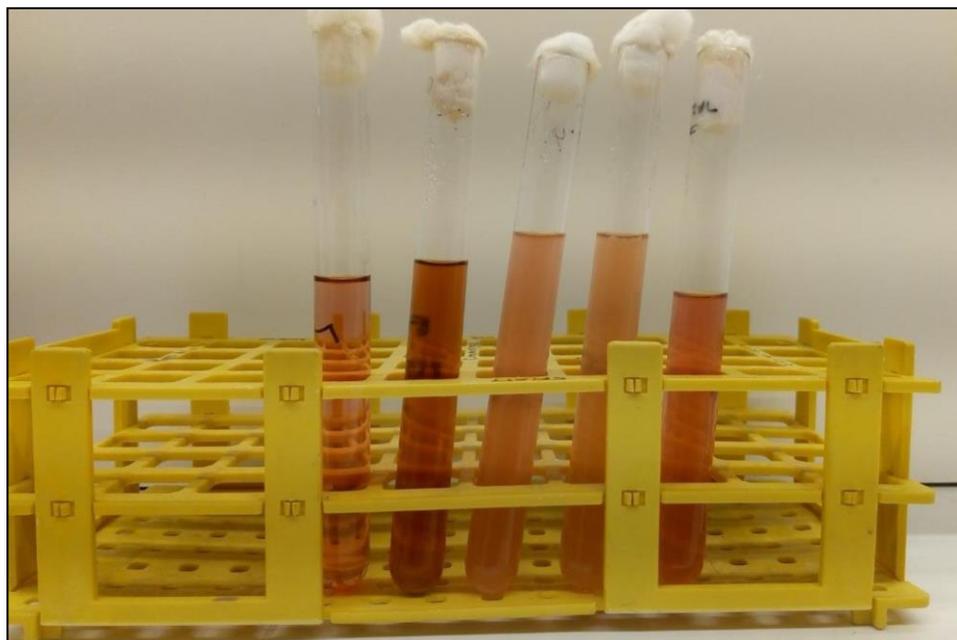


Figura 62 Perfil de fermentación de la cepa M4-BP

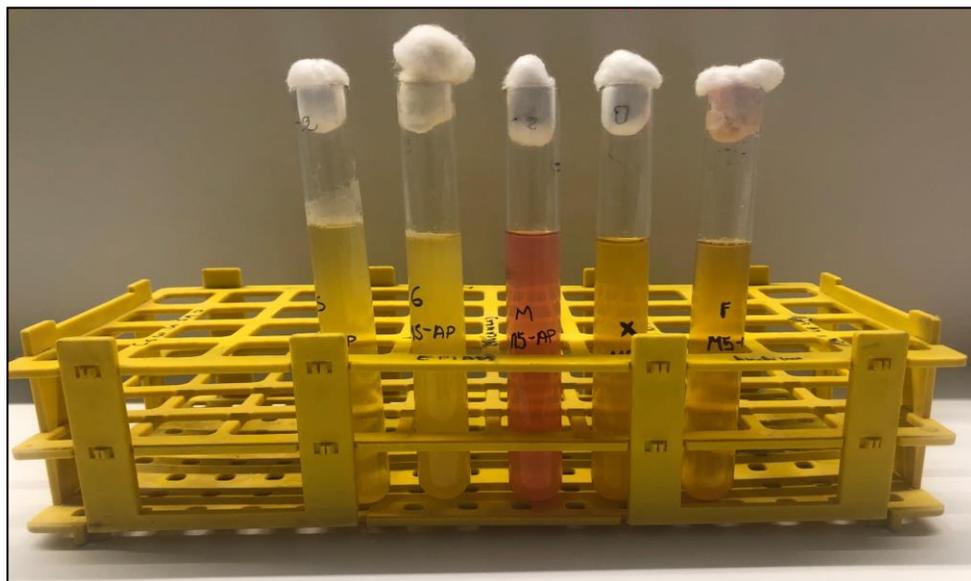


Figura 63 Perfil de fermentación de la muestra M5-AP

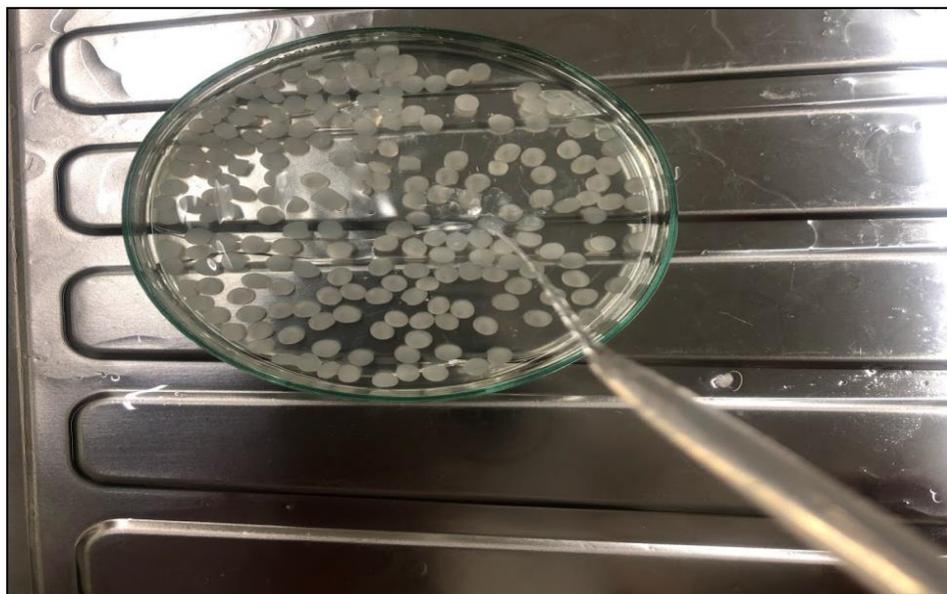


Figura 64 Lavado de perlas de polietileno de baja densidad



Figura 65 Secado de perlas de polietileno de baja densidad en incubadora

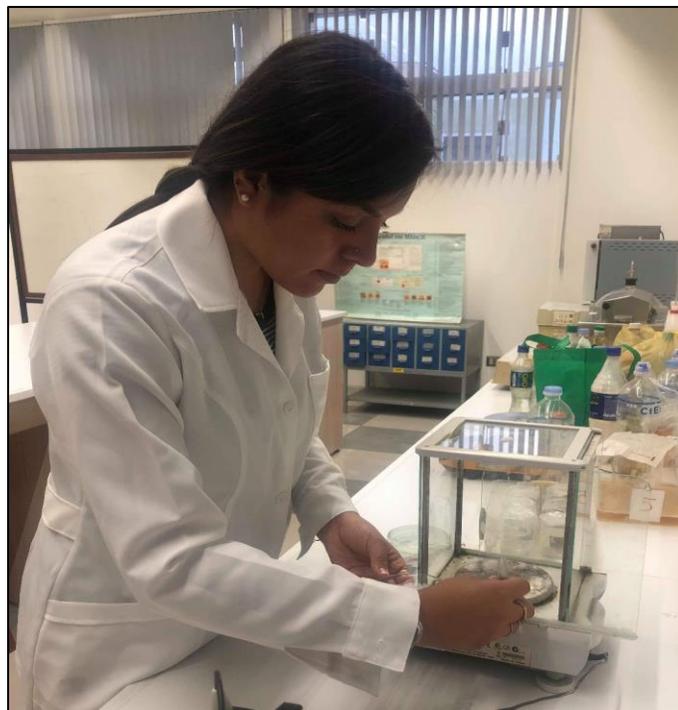


Figura 66 Peso final de las perlas de polietileno de baja densidad



Figura 67 Toma de microfotografías con la ayuda de un microscopio electrónico *Tescan VEGA TS 5136XM*

MATRIZ DE CONSISTENCIA

PROBLEMA	HIPÓTESIS	OBJETIVO	VARIABLE	INDICADOR	MÉTODO	ESTADÍSTICA
<p>PROBLEMA GENERAL:</p> <p>¿Es posible biodegradar polietileno de baja densidad (PEBD) utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna?</p>	<p>HIPÓTESIS GENERAL:</p> <p>Es posible biodegradar polietileno de baja densidad (PEBD) utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna.</p>	<p>OBJETIVO GENERAL:</p> <p>Biodegradar polietileno de baja densidad (PEBD) utilizando hongos, bacterias y consorcios microbianos aislados del botadero municipal de Tacna.</p>				
<p>PROBLEMA ESPECÍFICO 1:</p> <p>¿Es posible aislar cepas de bacterias, hongos y consorcios microbianos de plástico que se encuentran en el botadero municipal de Tacna?</p>	<p>HIPÓTESIS ESPECÍFICA 1:</p> <p>Es posible aislar los microorganismos presentes en bolsas y botellas de polietileno de baja densidad (PEBD) que se encuentran en el botadero municipal de Tacna.</p>	<p>OBJETIVO ESPECÍFICO 1:</p> <p>Aislar microorganismos de bolsas y botellas de polietileno de baja densidad (PEBD) que se encuentran en el botadero municipal de la ciudad de Tacna.</p>	<p>VARIABLE DEPENDIENTE:</p> <p>Biodegradación de polietileno de baja densidad (PEBD).</p>	<p>Miligramos de PEBD</p> <p>Cantidad de daño en el PEBD</p>	<p>Peso en balanza analítica</p> <p>Microscopía electrónica</p>	<p>Prueba en SPSS</p> <p>Porcentaje</p>
<p>PROBLEMA ESPECÍFICO 2:</p> <p>¿Cuál es el porcentaje de degradación de cada tipo de microorganismo (hongos, bacterias y consorcios microbianos)?</p>	<p>HIPÓTESIS ESPECÍFICA 2:</p> <p>Es posible calcular los porcentajes de pérdida de peso de polietileno de baja densidad (PEBD) en los periodos de incubación de microorganismos.</p>	<p>OBJETIVO ESPECÍFICO 2:</p> <p>Calcular el porcentaje de pérdida de peso de polietileno de baja densidad (PEBD) en el periodo de incubación.</p>	<p>VARIABLE INDEPENDIENTE:</p> <p>-Consortio microbiano (Hongos y Bacterias)</p>	<p>Unidades formadoras de colonias (UFC)</p>	<p>Recuento en placa</p>	<p>Porcentaje</p>
<p>PROBLEMA ESPECÍFICO 3:</p> <p>¿Cuánto es el daño microscópico que produce los microorganismos en el polietileno de baja densidad (PEBD)?</p>	<p>HIPÓTESIS ESPECÍFICA 3:</p> <p>A través del microscopio electrónico es posible observar el daño causado por los microorganismos en el polietileno de baja densidad (PEBD).</p>	<p>OBJETIVO ESPECÍFICO 3:</p> <p>Observar en el microscopio electrónico el daño causado por los microorganismos en el polietileno de baja densidad (PEBD).</p>				