



UNIVERSIDAD CÉSAR VALLEJO

FACULTAD DE INGENIERÍA Y ARQUITECTURA

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE
INGENIERÍA AMBIENTAL**

Consortio microbiano biodegradadores del plástico, aislados de suelos
agrícolas del distrito de Pimentel - 2016

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

Ingeniera Ambiental

AUTORA:

Bach. Chicoma Sánchez, Lizzet del Carmen (ORCID: 0000-0002-1193-3530)

ASESOR:

Dr. Rodas Cabanillas, José Luis (ORCID: 0000-0003-1372-4940)

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

Tratamiento y gestión de residuos sólidos

CHICLAYO – PERÚ

2020

Dedicatoria

A mis padres: Luis Alberto Chicoma Benites, Gloria violeta Sánchez Lozano y a mis hermanos, quienes comprendieron, invirtieron y compartieron su tiempo en mi formación profesional.

Lizzet del Carmen

Agradecimiento

Agradecer principalmente a Dios por siempre guiar nuestro camino y por habernos dado la fuerza y perseverancia para poder llegar a donde estamos; a mis padres por tanta comprensión para llegar hasta etapa final y también de manera muy importante a nuestros asesores el Mcarb. Jhon Wiston García López por el esfuerzo y dedicación que ha tenido con cada uno de nosotros, por sus orientaciones, su paciencia y motivación para la formación como investigador y a los estadísticos José Luis Rodas Cabanillas y José Ponce Ayala.

Lizzet del Carmen

Página del jurado

Declaratoria de autenticidad



Declaratoria de Originalidad de la Autora


Yo, Chicama Sanchez Lizzet Del Carmen, egresada de la Facultad de Ingeniería y Arquitectura de la Escuela Académico Profesional de Ingeniería Ambiental de la Universidad César Vallejo (Chiclayo), declaro bajo juramento que todos los datos e información que acompañan a mi Tesis titulada:

“Consortio microbiano biodegradadores del plástico, aislados de suelos agrícolas del distrito de Pimentel – 2016” es de mi autoría, por lo tanto, declaro que mi Tesis:

1. No ha sido plagiado ni total, ni parcialmente.
2. He mencionado todas las fuentes empleadas, identificando correctamente toda cita textual o de paráfrasis proveniente de otras fuentes.
3. No ha sido publicado ni presentado anteriormente para la obtención de otro grado académico o título profesional.
4. Los datos presentados en los resultados no han sido falseados, ni duplicados, ni copiados.

En tal sentido asumo la responsabilidad que corresponda ante cualquier falsedad, ocultamiento u omisión tanto de los documentos como de información aportada, por lo cual me someto a lo dispuesto en las normas académicas vigentes de la Universidad César Vallejo.

Chiclayo, 21 de octubre del 2020

Chicama Sanchez Lizzet Del Carmen	
DNI: 73018850	Firma 
ORCID: 0000-0002-1193-3530	



Índice

Dedicatoria.....	ii
Agradecimiento.....	iii
Página del jurado.....	iv
Declaratoria de autenticidad	v
Índice	vi
Índice de tablas.....	vii
Índice de figuras	viii
RESUMEN	ix
ABSTRACT.....	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. MARCO TEÓRICO	5
III. MÉTODO.....	10
3.1. Tipo y diseño de investigación	10
3.2. Variables y operacionalización.....	10
3.3. Población, muestra, muestreo, unidad de análisis	12
3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos.....	12
3.5. Procedimientos	13
3.6. Método de análisis de datos.....	16
3.7. Aspectos éticos	16
IV. RESULTADOS.....	17
V. DISCUSIÓN	20
VI. CONCLUSIONES	22
VII. RECOMENDACIONES	23
REFERENCIAS	24
ANEXOS.....	25
Acta de aprobación de originalidad de tesis	25
Reporte de turnitin	26
Autorización de publicación de tesis en repositorio institucional UCV	27
Autorización de la versión final del trabajo de investigación	28

Índice de tablas

Tabla 1. <i>Operacionalización de variables</i>	11
Tabla 2. <i>Ensayo 1</i>	17
Tabla 3. <i>Ensayo 2</i>	18
Tabla 4. <i>Ensayo 3</i>	19

Índice de figuras

<i>Figura 1. Ensayo 1</i>	17
<i>Figura 2. Ensayo 2</i>	18
<i>Figura 3. Ensayo 3 – Biorreactor</i>	19

Resumen

En el presente trabajo de investigación describimos el aislamiento y la actividad de biodegradación de microorganismos sobre polietileno de baja densidad comúnmente llamado plástico.

Los microorganismos fueron aislados de suelos agrícolas de Olmos. Las muestras fueron filtradas y preseleccionadas en medio de agar PDA y agar Nutritivo a pH 5,5 y 7, para hongos y bacterias respectivamente.

Se aislaron 3 géneros, identificadas como Pseudomonas, Bacillus y un hongo llamado Aspergillus. La acción degradativa del consorcio microbiano aislado fue evidenciada por variaciones de disminución de peso conforme iba pasando el tiempo señal de que los géneros microbianos estaban realizando la biodegradación respectiva.

Finalmente se llegó a determinar el porcentaje de peso perdido por el polietileno sometido a la evaluación física del peso del plástico de baja densidad, teniendo como resultado un claro déficit de este debido a la función enzimática que tienen estos hongos y bacterias.

Palabras claves: Biodegradación, baja densidad, consorcio microbiano, plástico.

Abstract

In the present research we describe the isolation and activity of biodegradation of microorganisms on low density polyethylene commonly called plastic.

The microorganisms were isolated from agricultural soils of Olmos. The samples were filtered and preselected in PDA agar and Nutritive agar at pH 5.5 and 7, for fungi and bacteria respectively.

Three genera, identified as *Pseudomonas*, *Bacillus* and a fungus called *Aspergillus* were isolated. The degradative action of the isolated microbial consortium was evidenced by variations of weight decrease as the signal time passed that the microbial genera were performing the respective biodegradation.

Finally, it was determined the percentage of weight lost by the polyethylene subjected to the physical evaluation of the weight of the low-density plastic, resulting in a clear deficit of this due to the enzymatic function of these fungi and bacteria.

Keywords: Biodegradation, low density, microbial consortium, plastic.

I. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la basura como mayormente se le denomina a los desechos domésticos y no domésticos se ha convertido en un problema que cada vez se acrecienta más, en especial por el uso descontrolado de los plásticos que se encuentra en las distintas presentaciones que existen, el mal manejo de estos para su disposición luego de haberlos utilizados ha generado que conforme transcurre el tiempo, la preocupación por este material que no es fácil ni rápido de degradarse preocupe a las autoridades de cada país.

En nuestro país se ha pronunciado según indagaciones realizadas la gran preocupación que se está generando debido a este material, se señala que el 55% de estos residuos plásticos son los principales contaminantes de nuestro mar, ya que no tienen una gestión adecuada para su reutilización, esto se debe a la pésima idea o hábito de las industrias el de producir sin analizar el punto de vista ambiental, no originando un desarrollo sostenible, quedando muy afectada nuestra biodiversidad y la salud humana de las personas.

En el ámbito local, un ejemplo claro es nuestro mar ubicado en el balneario de Pimentel ya que se encuentra cantidad de este material en diversas presentaciones por así decirlo, que afecta a nuestra diversidad costera además de patogenicidades en la humanidad. Es por ello que pensando en este problema que a largo plazo traerá consecuencias negativas hace aproximadamente unos años atrás se ha realizado estudios los cuales determinan que hay microorganismos que permiten que se acelere la descomposición de este material, estos microorganismos son bacterias y hongos e incluso algas que contienen una enzima que tienden a alimentarse del polietileno de baja densidad denominándolo a este mecanismo degradación de microorganismos.

Quinchía Figueroa A.; Maya Correa S. 2015. Universidad de Antioquia, en su tesis de investigación titulado Biodegradación del polietileno de baja densidad utilizando *Pycnopus sanguineus* UTCH 03.

En esta indagación se estudió el proceso en la biodegradación del polietileno de baja densidad LDPE y la reacción que afronta frente a la actividad del hongo *Pycnoporus sanguineus*.

Se llevó a cabo los siguientes análisis: temperatura, porcentaje de polímero y humedad.

Para llevar a cabo la verificación de la biodegradación del polietileno tomo realizarlo en un tiempo de 6 meses, a continuación, mediante pruebas de gravimetría, registro de cambios por Microscopia Electrónica de Barrido – SEM,

De acuerdo a los resultados se comprueba que el hongo utiliza el polímero como fuente de carbono evidenciando cambios en un cierto tiempo.

Mi apreciación con respecto a este tema los polímeros con el tiempo han ido evolucionando llegando a tomar un papel importante en la industria ya que ha llegado a satisfacer las necesidades de los consumidores, cuando hablamos de ellos podemos referirnos al plástico ya que es el que más demanda tiene en el mercado debido a su gran accesibilidad en distintas aplicaciones como botellas, bolsas, juguetes entre otras; debido a su composición tienen una alta resistencia a la degradación es por ello que genera diversas consecuencias en los distintos ecosistemas, por esta problema se a planteado propuestas como el *Pycnoporus sanguineus* UTCH03 tienen la capacidad para polimerizar compuesto de elevado masa molecular.

Martini Clavijo, K. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Carrera de Microbiología Industrial Bogotá, D.C. 2012 en su investigación Bioprospección de la degradación del Polietileno.

De acuerdo a las estadísticas extraídas según el presente trabajo de investigación anualmente encontramos más de 15 millones de Tn del polietileno originado del consumo excesivo en el uso industrial y cotidiano, el problema más grande que se tiene en la actualidad es que estos polímeros tardan hasta 500 para poder eliminarse por completo y a la vez generando un impacto ambiental grave.

De acuerdo a las distintas investigaciones obtenidas se encontró que los hongos filamentosos son aquellos microorganismos que nos permiten tener una rápida biodegradación del PE, esto se lleva a cabo debido a que las enzimas microbianas como la peroxidasa, oxidasas actúan de manera positiva si son cultivados en medios sólidos como el compost y cabe mencionar que las podemos encontrarlas en microorganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus circulans*.

Mi apreciación con respecto a este estudio se basa en el incremento descontrolado y la necesidad de seguir fabricando productos que tengan gran demanda económica ha generado una serie de consecuencias que no permite un crecimiento sostenible, este es el caso del polietileno es un producto el cual tarda mucho en degradarse ya que está formado por átomos muy difíciles de romper generando un índice elevado de impacto ambiental; es por ello que de acuerdo a los estudios que se ha realizado en esta investigación se llegó a concluir que existen distintos tipos de microorganismos como las *pseudomonas sp.*; *bacillus* que pueden degradar el polietileno de baja densidad debido a sus enzimas como las peroxidasa, oxidasas e hidrolasas; para que ello se lleve a cabo se tiene que unir ambos elementos, en lo que consistió principalmente fue de hacerle un hueco y exponerlo al sol para que de esa manera este material ingrese a la parte interior de la célula.

Mi formulación del Problema es ¿El consorcio microbiano aislados de suelos agrícolas pueden biodegradar el plástico?

Mi Justificación se divide en dos aspectos socioeconómica que implica el aislamiento del consorcio microbiano formado por bacterias y hongos biodegradar el plástico, y no solo trae consigo beneficios ambientales sino también desde el punto económico y social favorece mucho ya que estas bacterias son encontradas en el ecosistema de manera natural, es un tipo de biotecnología que no demanda mucho dinero sino al contrario, recalcando además beneficio a la población y a las especies que nos rodean ya que éstas también se ven afectadas por este material; y mi justificación ambiental El empleo de estos microorganismos se prevé para un futuro no muy lejano la disminución de la producción elevada del plástico ya que esta herramienta tarda más de 500 años para degradarse, y que mejor usar bacterias de nuestro medio para poder llevar a cabo nuestra investigación.

De esta manera se generó información importante para el tratamiento y gestión adecuada de los residuos sólidos municipales y no municipales que se generan a diario.

Mi hipótesis se basa en que el consorcio microbiano aislados de suelos agrícolas biodegrada el plástico.

Mi objetivo general es demostrar que el consorcio microbiano aislados de suelos agrícolas biodegradan el plástico.

Mis objetivos específicos son aislar el consorcio microbiano a partir de suelos agrícolas en el distrito de Pimentel, identificar los géneros bacterianos y fúngicos presentes en el consorcio microbiano aislados de suelos agrícolas en Pimentel.

Aplicar los géneros bacterianos y fúngicos presentes en el consorcio microbiano en la biodegradación del plástico.

II. MARCO TEÓRICO

Los plásticos están formados por átomos que tienen origen orgánico y de elevado peso molecular al ser formados estos son llamados polímeros también conocida como macromoléculas siendo estos formados por monómeros que forman diversas cadenas. (Ramos, 2011).

Un material considerado con mayor peso molecular es el plástico ya que está formado por largas cadenas de átomos de hidrógeno, carbono, azufre. (Ramos, 2011).

Los plásticos se clasifican en naturales que son obtenidos del látex, la celulosa y también tenemos a los sintéticos que son todos aquellos que derivan del petróleo; también tenemos la clasificación por su estructura interna, que son formados con cadenas lineales, siendo estas sensibles al calor, estas se pueden fundir y a la vez volver a fabricarse por sus polímeros, teniendo en cuenta que son reciclados.

También hablamos del polietileno, un polímero muy importante en el mundo comercial ya que es muy accesible al mercado por su bajo costo ya que su materia prima es económica, otro punto que permite tener una gran importancia es debido a la comodidad para su procesamiento por diversos métodos y su baja absorción de agua.

El polietileno cuenta con diversos tipos debido a sus condiciones físicas, químicas y eléctricas, como el polietileno de alta densidad por sus pesos de 0.94 a 0.97 g/cm³ y porque su marcador de cristalinidad oscila entre 85% a 95% puesto que sus cadenas no cuentan con las ramificaciones necesarias, cabe mencionar que este material es usado para cuerdas, tuberías, rodillos. (Ureta, 1989).

El polietileno lineal de baja densidad (LLDPE), este producto cuenta con ramificaciones por lo que desde ya se considera de baja densidad, además es elaborado con etileno y olefinas, es usado para bolsas de mercancía pesada. (Ureta, 1989).

El polietileno de baja densidad (LDPE), es considerado el primer tipo de polietileno fabricado, es trabajado a una presión elevada, su cristalinidad oscila entre 50 y 70%, su densidad es de 0.91 a 0.93 g/cm³, y su T° de fusión es entre 100 y 110° C, este tipo de polietileno es considerado el de mayor consumo en paralelo de los otros ya detallados, este material es usado en un 55% para bolsas y usos agrícolas, para túneles e invernaderos, también para depósitos y canales de agua.

Los termoestables están formados por series entrecruzadas, que son rebajadas con el calor, pueden fundirse y fabricarse una sola vez, no son recomendables para el proceso de reciclado ya que son frágiles. (Ureta, 1989).

Los elastómeros son formados por series ramificadas, debido a este punto presentan un elevado porcentaje de elasticidad, poca dureza motivos por los cuales se pueden fundir una sola vez, un ejemplo de este tipo es el caucho natural, sintético. (Ureta, 1989).

La biodegradación es aquel proceso biológico que se lleva a cabo por la intervención de microorganismos que resulta de la interacción estructural en metabolismos naturales. La biodegradación de los polímeros hace referencia al efecto que tendrán los microorganismos sobre los plásticos, estos provenientes del suelo producen las enzimas extracelulares que se necesitan para dar inicio al proceso, es ahí donde pasan los enlaces moleculares a romperse ya que si no se destruyen las enzimas no pudieran penetrar y no se llevaría a cabo la erosión de la superficie de estos materiales. (Viera, 2009).

La biodegradabilidad es un proceso donde interactúan las enzimas y el metabolismo de los microorganismos siendo alguno hongos y bacterias, los cuales estos secretan unas enzimas que su principal función es eliminar el enlace molecular del plástico. (Tokiwa, 2009).

Se le llama biodegradación enzimática al proceso en que intervienen enzimas microbianas que tiene como consecuencia la degradación del polímero. Existe una diversidad de microorganismos que nos permiten biodegradar los polímeros sintéticos, ya que las enzimas de las bacterias u hongos pueden atacar los segmentos más pequeños, teniendo como consecuencia la degradación, hasta la

producción de bióxido de carbono y agua en condiciones aeróbicas y bióxido de carbono. Los factores que intervienen en el proceso de biodegradación son físicos y químicos como la humedad, Ph, T°, oxígeno, nutrientes y el agua ya que su rol en este mecanismo es muy importante.

En su mayoría el estudio de la biodegradación de polímeros se realiza por pruebas de crecimiento de agar sólido, cabe recalcar que los polímeros en su mayoría también son resistentes al ataque microbiano, la mayoría de plásticos contienen aditivos por lo que los de bajo peso molecular son biodegradables mientras que la matriz de este es poca. (Potts, 1984).

En su totalidad los plásticos no se degradan ya que son hidrofóbicos, para subir esta reacción microbiana, se tienen que modificar, Los aditivos y plastificantes contribuyen a que se biodegraden, y esto se debe por los ataques de los microorganismos por el mínimo peso molecular o aceleración de que se oxiden los plásticos, obteniendo como consecuencia que este sea más asequible a los microorganismos. (Scott, 1990).

Dentro del consorcio microbiano tenemos bacterias como bacilos, espiroquetas, cocos anaerobios o aerobios; que se pueden encontrar aisladas. Se encargan de producir enzimas, están presentes en el suelo importantes para la degradación de la materia.

Algunas de estas bacterias encargadas de biodegradar el plástico son: (Bartram J. 2003):

Pseudomona aureginosa, es una bacteria bacilo gram negativo y está considerada dentro de la familia *Pseudomonadaceae*, aerobio con un flagelo polar, se puede aislar de muestras de suelos, aguas cristalinas y contaminadas, así como de plantas y animales. Producen catalasa, exotoxinas A y S y oxidasas, así como enzimas hidrolíticas que degradan diversos tejidos, así como el del polietileno.

Pseudoma putida, esta bacteria consta de bacilos Gram negativos de formas rectas o curvadas, el tamaño de estas bacterias oscila entre 0.5 a 1.0 µm, su gran eficacia y alto rendimiento de este microorganismo se han extendido para participar en el

desarrollo de la biodegradación y bioremediación, pudiendo demostrar que es un gran resultado que beneficia el aspecto ambiental, económico y social para la eliminación de los residuos. (Luo y col., 2003; Guobin y col., 2006): este tipo de microorganismo su fuente de carbono es heterótrofa, además degrada todo tipo de hidrocarburos, pero no elimina la glucosa; es una bacteria estrictamente aerobia.

Bacillus cereus, esta bacteria se encuentra en hábitats naturales como el suelo y plantas, polvos y aguas minerales, estos microorganismos pueden ser aerobios o anaerobios; los cultivos jóvenes son Gram positivo y con el paso del tiempo a medida cuando envejece cambia a Gram negativo; las temperaturas de crecimiento mínima esta entre 20 °C y la máxima entre 45 °C con un óptimo de 37°C. Las toxinas que producen son enterotoxinas, la citotoxina y la cereulide que es la toxina emética.

Bacillus sp, esta bacteria crece en Agar nutritivo, es totalmente aerobio, no consume azúcares para su desarrollo, algunas de estos microorganismos producen colonias rosas. Se encuentra mayormente en suelos agrícolas, plantas y el tracto gastrointestinal de los animales.

Estos hongos están presentes en todas partes: son importantes como sus agentes degenerativos ya que es el resultado de la producción de enzimas los cuales los cuales rompen en los sustratos inertes a fin de proveerse nutrientes presentes en la composición de polímeros. (Bergey's, 1984). Los hongos que se encargan de biodegradar el plástico son:

Penicillium funiculosum, este tipo de hongos crecen de manera rápida con un diámetro de 3-4 cm en menos de 7 días a una temperatura de 25°C en Agar Czapeck, con sus enzimas ayudan a la biodegradación del plástico.

Aspergillus niger, tiene variedades por su tasa de crecimiento, tamaño y textura ya sea por ser aterciopelado, granular y algodonosa, cabe recalcar que este microorganismo es uno de los principales productores de micotoxinas, siendo estos metabolitos secundarios producidos por el desarrollo de la biodegradación.

Aspergillus flavus colonias sobre agar Czapek alcanzan un diámetro de 3,5 cm dentro de 7 días, a 25°C. Usualmente consisten de micelio verde-amarillo, verde claro y oscuro de textura pulverulenta. Margen de la colonia de color blanco, textura algodonosa. Reverso verde-crema oscuro. No presenta exudación. (Bergey's, 1984).

III. MÉTODO

3.1. Tipo y diseño de investigación

No Experimental – Descriptivo Longitudinal

Denominado este diseño de investigación porque las variables que estamos estudiando no serán manipuladas, sino serán observadas y de ahí serán descritas las reacciones que tendrán en el proceso que se llevara a cabo durante el desarrollo de la investigación.

3.2. Variables y operacionalización

3.2.1. Variable independiente:

Tipos de Consorcio microbiano

3.2.2. Variable dependiente:

Tiempo de biodegradación del plástico

3.2.3. Operacionalización de variables

Tabla 1. Operacionalización de variables

Variables	Definición conceptual	Definición operacional	Dimensiones	Indicadores	Escala
Variable independiente: Tipos de Consorcio microbiano.	Es una asociación natural de dos o más poblaciones microbianas de diferentes géneros que actúan conjuntamente como una comunidad.	Aislar el consorcio microbiano mediante la Utilización de Agar PDA para hongos y Agar Nutritivo Para bacterias.	No aplica.	Cantidad de microorganismos. Tipos de microorganismos.	Razon Nominal
Variable dependiente: Tiempo de Biodegradación Del Plástico.	La biodegradación del plástico consiste en la descomposición natural y no contaminante de una sustancia o producto por agentes biológicos.	Mediante un sistema aerobio y anaerobio se ingresará el medio de cultivo con el consorcio microbiano para empezar el proceso de biodegradación.	No aplica.	Peso final en Gr. Tiempo de degradación.	Razón Razón

Fuente: Elaboración propia.

3.3. Población, muestra, muestreo, unidad de análisis

3.3.1. Población.

Infinita:

La población es considerada infinita ya que el consorcio microbiano ya sean bacterias y hongos que será extraído de los suelos agrícolas, Son poblaciones infinitas porque hipotéticamente no existe límite en cuanto al número de observaciones que cada uno de ellos puede generar.

3.3.2. Muestra.

La muestra es de 50 Kg extraída de suelos agrícolas.

3.3.3. Tipo de muestra

No probabilístico:

El tipo de muestra de esta investigación es no probabilística por conveniencia ya que se seleccionará de manera intencional y según el acceso de la muestra.

3.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos

3.4.1. Técnicas de recolección de datos.

La técnica que se empleara para la recolección de datos en esta investigación es la siguiente:

Para la extracción de la muestra se aplicarán diferentes técnicas en el laboratorio, ya que para ellos se analizarán factores ambientales y para eso tenemos:

Escogemos: el lugar donde vamos a muestrear

Observaciones: Se utilizará esta técnica para poder conocer el equipo de una manera física, reconociendo la ubicación exacta de los componentes para poder obtener un listado de criticidad.

Recolección y traslado de muestras: para la toma de muestras se utilizarán bolsas de 5 Kg cada muestra será transportada inmediatamente al laboratorio de la universidad para realizar el análisis indicado.

3.4.2. Instrumentos de recolección de datos:

- Bolsas de capacidad de 5 Kg.
- Guantes
- GPS
- Cuaderno de apuntes.
- Palana
- Balanza

3.5. Procedimientos

3.5.1. Etapa microbiológica.

a) Recolección de muestra de suelo:

En esta primera fase se llevó a cabo la recolección de suelo agrícola, ya que de este medio es de donde se encontró los distintos géneros microbianos.

b) Aislamiento de bacterias y hongos:

En esta segunda fase se va a llevar a cabo el aislamiento de hongos y bacterias de la siguiente forma:

- Primero se diluye la muestra de suelos.
- Luego se lleva a cabo la siembra en placas para el crecimiento microbiano con Agar PDA, Agar Cetrímide y Agar TSA.

c) Identificación de bacterias y hongos.

En esta etapa se lleva a cabo la identificación de géneros microbianos mediante Tinción Gram una técnica microbiológica.

Procedimiento:

- Hacer el extendido con un palillo de madera.
- Dejar secar a temperatura ambiente o fijarlas utilizando un mechero.
- Fijar la muestra con metanol durante un minuto o al calor (flameado tres veces aproximadamente).

- Agregar azul violeta (cristal violeta o violeta de genciana) y esperar un minuto.
- Enjuagar con agua no directamente sobre la muestra.
- Agregar lugol y esperar un minuto aproximadamente.
- Agregar alcohol acetona y esperar entre 5 y 30 segundos según la concentración del reactivo (parte crítica de la coloración). (Las gram - se decoloran, las gram + no)
- Enjuagar con agua.
- Tinción de contraste agregando safranina o fucsina básica y esperar un minuto. Este tinte dejará de color rosado-rojizo las bacterias Gram negativas.
- Lavar levemente con agua.
- Para observar al microscopio óptico es conveniente hacerlo a 100x con aceite de inmersión.

d) Siembra de cultivo puro:

En este paso una vez identificados los géneros microbianos (bacterias y hongos) se sembrará cada colonia pura en viales para el crecimiento puro de géneros. Cabe recalcar que para bacterias se utilizó dos tipos de medios Agar Cetrimide para *Pseudomonas* y para *Bacillus* Agar TSA, para hongos se utilizó el Agar PDA.

e) Sersioramiento de crecimientos microbianos con Tinción Gram:

Mediante el procedimiento de Tinción Gram se llevó a cabo el sersioramiento de las especies ya identificadas del crecimiento de cultivo puro.

3.5.2. Etapa mecánica.

Una vez ya identificados los distintos géneros microbianos se lleva a cabo la segunda etapa que consiste en la biodegradación del plástico mediante los siguientes pasos

3.5.2.1 Sistema anaerobio.

Se armó dos sistemas empleando una botella de vidrio de 4 L completamente esterilizada mediante la técnica de vapor y un matraz de 500 ml.

Se utilizó Caldo nutritivo para que se mantengan en crecimiento los géneros microbianos identificados en la primera etapa.

Mediante la técnica de turbidez llamada Método de McFarland en el cual hace referencia a suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0.5 a 10, obteniendo como resultados para bacterias 10^{-8} y para hongos 10^{-9} .

Luego se ingresó ambas partes a la botella y se pasó a la moliciones de los dos tipos de plástico de baja densidad que se emplearon en ambos sistemas en uno se empleó parafina y en el otro una bolsa plástica.

Finalmente se agregó el plástico a cada sistema para empezar el proceso de biodegradación.

3.5.2.2 Sistema Aerobio.

Para este sistema aerobio se utilizó un bioreactor el cual fue una botella de vidrio de 4 l completamente estéril por el vapor.

Se utilizó Caldo nutritivo para que se mantengan en crecimiento los géneros microbianos identificados en la primera etapa.

Mediante la técnica de turbidez llamada Método de McFarland en el cual hace referencia a suspensiones bacteriológicas para saber que el número de bacterias por mililitro, o más bien en UFC según una escala que va de 0.5 a 10, obteniendo como resultados para bacterias 10^{-8} y para hongos 10^{-9} .

Luego se ingresó ambas partes a la botella y se pasó a la moliciones de plástico de baja densidad que se empleó.

Finalmente se agregó el plástico a cada sistema para empezar el proceso de biodegradación conectando a la botella a un motor pequeño el cual transmitía oxígeno al sistema.

3.6. Método de análisis de datos.

Método: Excel Para comparar los promedios de los ensayos con el fin de determinar las diferencias significativas y contrastación de hipótesis se usará medidas y gráficos de estadísticas inferencial y su procesamiento se realizará en el programa SPSS.

3.7. Aspectos éticos

- Confidencialidad.
- Transparencia
- Respeto
- Autonomía

IV. RESULTADOS

A partir de los análisis ya realizados y mencionados se obtuvieron los siguientes resultados:

a) Sistemas anaerobios:

a.1. Ensayo 1:

Tabla 2. Ensayo 1

Ensayo 1	Detalle
Material	Botella
Tipo de Plástico	Parafina
Densidad	Baja
Peso Inicial	5 gr
Tiempo	7 días
Peso final	1.7 gr

Fuente: Elaboración propia.

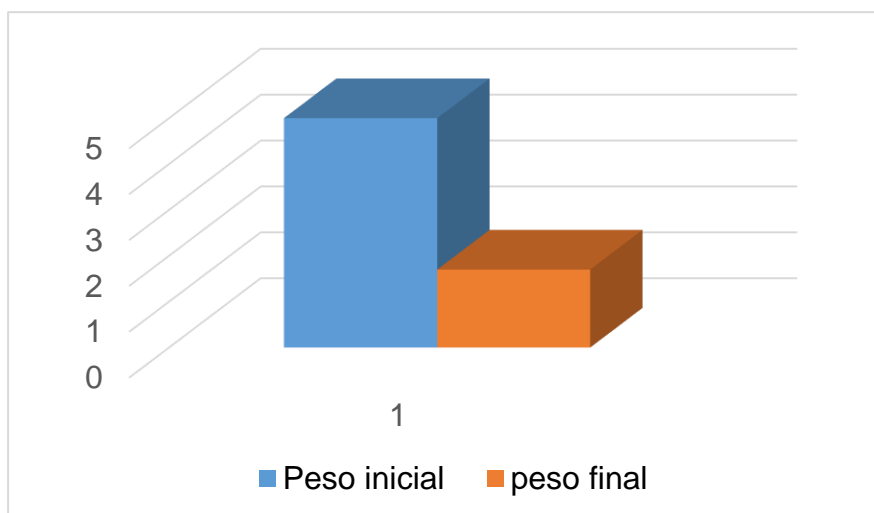


Figura 1. Ensayo 1

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación: En la tabla número uno se puede observar que en el transcurso de una semana se logró perder más del 50% del peso del plástico de baja densidad.

a.2. Ensayo 2:

Tabla 3. Ensayo 2

Ensayo 2	Detalle
Material	Matraz
Tipo de Plástico	Bolsa de plástico
Densidad	Baja
Peso Inicial	8 gr
Tiempo	30 días
Peso final	2.3 gr

Fuente: Elaboración propia.

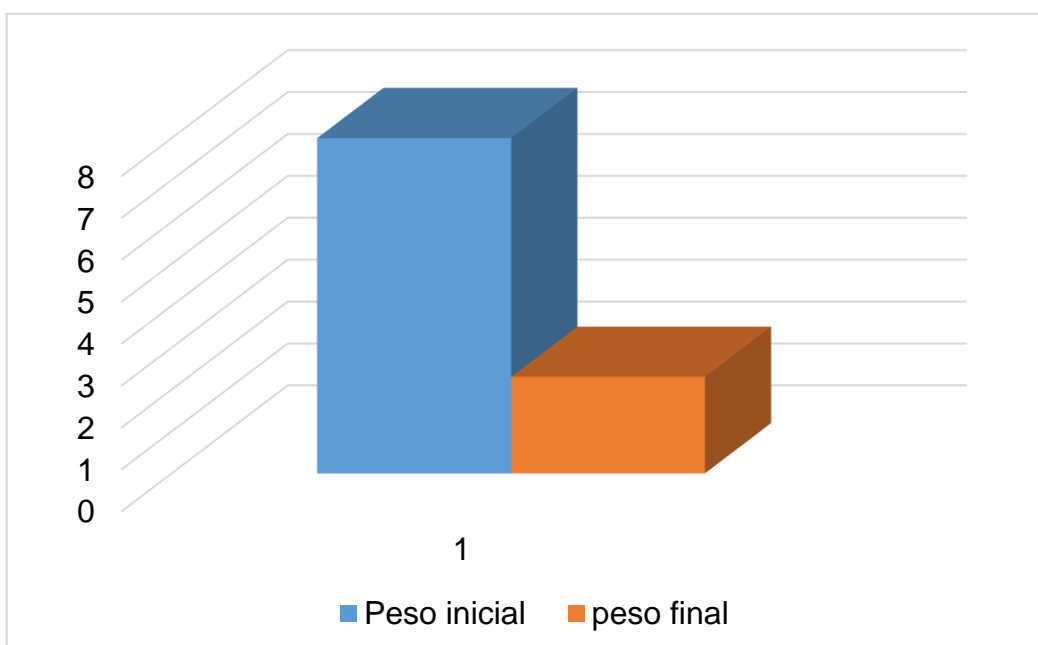


Figura 2. Ensayo 2

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación: En la tabla número 2 se puede observar que mediante el sistema anaerobio se logró más de la mitad de la biodegradación del plástico en un plazo de 30 días.

b. Sistemas aerobios:

Tabla 4. Ensayo 3

Ensayo 3	Detalle
Material	Bioreactor
Tipo de Plástico	Bolsa de plástico
Densidad	Baja
Peso Inicial	10 gr
Tiempo	7 días
Peso final	5.6 gr

Fuente: Elaboración propia.

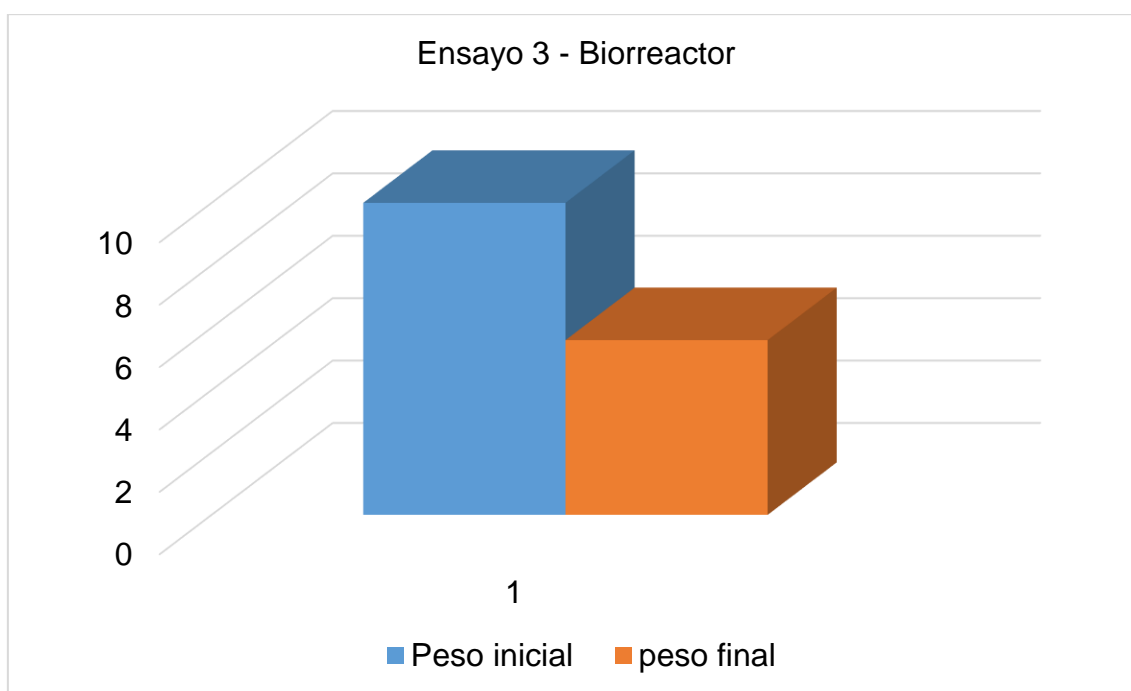


Figura 3. Ensayo 3 – Biorreactor

Fuente: Elaboración propia.

Interpretación: En la tabla número 3 se llega a analizar un gran avance en cuanto a la pérdida física de la bolsa de plástico en un plazo cronológico de 7 días debido al sistema aerobio que se elaboró.

V. DISCUSIÓN

En la tesis de investigación titulado Biodegradación del polietileno de baja densidad utilizando *Pycnopus sanguineus* UTCH 03.

En esta indagación se estudió el proceso en la biodegradación del polietileno de baja densidad LDPE y la reacción que afronta frente a la actividad del hongo *Pycnopus sanguineus*.

Se llevó a cabo los siguientes análisis: temperatura, porcentaje de polímero y humedad.

Para llevar a cabo la verificación de la biodegradación del polietileno tomo realizarlo en un tiempo de 6 meses, a continuación, mediante pruebas de gravimetría, registro de cambios por Microscopia Electrónica de Barrido – SEM,

De acuerdo a los resultados se comprueba que el hongo utiliza el polímero como fuente de carbono evidenciando cambios en un cierto tiempo.

Mi apreciación con respecto a este tema los polímeros con el tiempo han ido evolucionando llegando a tomar un papel importante en la industria ya que ha llegado a satisfacer las necesidades de los consumidores, cuando hablamos de ellos podemos referirnos al plástico ya que es el que más demanda tiene en el mercado debido a su gran accesibilidad en distintas aplicaciones como botellas, bolsas, juguetes entre otras; debido a su composición tienen una alta resistencia a la degradación es por ello que genera diversas consecuencias en los distintos ecosistemas, por esta problema se a planteado propuestas como el *Pycnopus sanguineus* UTCH03 tienen la capacidad para polimerizar compuesto de elevado masa molecular.

Martini Clavijo, K. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Ciencias Básicas Carrera de Microbiología Industrial Bogotá, D.C. 2012 en su investigación Bioprospección de la degradación del Polietileno.

De acuerdo a las estadísticas extraídas según el presente trabajo de investigación anualmente encontramos más de 15 millones de Tn del polietileno originado del consumo excesivo en el uso industrial y cotidiano, el problema más grande que se

tiene en la actualidad es que estos polímeros tardan hasta 500 para poder eliminarse por completo y a la vez generando un impacto ambiental grave.

De acuerdo a las distintas investigaciones obtenidas se encontró que los hongos filamentosos son aquellos microorganismos que nos permiten tener una rápida biodegradación del PE, esto se lleva a cabo debido a que las enzimas microbianas como la peroxidasa, oxidasas actúan de manera positiva si son cultivados en medios sólidos como el compost y cabe mencionar que las podemos encontrar en microorganismos como *Pseudomonas*, *Bacillus circulans*.

Mi apreciación con respecto a este estudio se basa en el incremento descontrolado y la necesidad de seguir fabricando productos que tengan gran demanda económica ha generado una serie de consecuencias que no permite un crecimiento sostenible, este es el caso del polietileno es un producto el cual tarda mucho en degradarse ya que está formado por átomos muy difíciles de romper generando un índice elevado de impacto ambiental; es por ello que de acuerdo a los estudios que se ha realizado en esta investigación se llegó a concluir que existen distintos tipos de microorganismos como las *pseudomonas sp.*; *bacillus* que pueden degradar el polietileno de baja densidad debido a sus enzimas como las peroxidasa, oxidasas e hidrolasas; para que ello se lleve a cabo se tiene que unir ambos elementos, en lo que consistió principalmente fue de hacerle un hueco y exponerlo al sol para que de esa manera este material ingrese a la parte interior de la célula.

VI. CONCLUSIONES

Del presente trabajo de investigación se llegó a concluir:

- 1.** Se demostró que el consorcio microbiano identificados en los análisis microbiológicos llegó a biodegradar el plástico de baja densidad en un lapso promedio de 30 días.
- 2.** El mecanismo empleado por los microorganismos para degradar el polietileno es una acción sinérgica con la degradación abiótica y la biológica conducida por enzimas como las peroxidadas, oxidasas e hidrolasas.
- 3.** Los microorganismos más relevantes capaces de degradar el plástico fueron Bacillus, Pseudomonas y Aspergillus.
- 4.** Con esta investigación se planteó una metodología para la biodegradación del polietileno teniendo como primer paso pulverizar el polietileno y agujerearlo para disminuir el tiempo de degradación y mejorar la acción enzimática de microorganismos como Bacillus, Pseudomonas y Aspergillus., para postularlo como una alternativa viable

VII. RECOMENDACIONES

- 1.** Con la finalidad de reducir costos y evitar estar invirtiendo en tecnología es recomendable tener en cuenta este tipo de biodegradación enzimática ya que no solo los medios son extraídos del ambiente, sino que también es viable económicamente para lograr un completo desarrollo sustentable.
- 2.** Para poder tener un proceso de biodegradación más óptimo se recomienda que el tiempo se prolongue para conseguir la eliminación de este material por completo.

REFERENCIAS

GREGORIO BÁRBARA S. ALBA LIVAN BRON A. FERNÁNDEZ MENA M. (2007). ESTUDIO BIBLIOGRÁFICO DE SU SÍNTESIS Y APLICACIONES DE LOS POLIURETANOS BIODEGRADABLES, INSTITUTO CUBANO DE INVESTIGACIONES

MARTINI CLAVIJO, K. (2012). BIOPROSPECCIÓN DE LA DEGRADACIÓN DEL POLIETILENO, PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA FACULTAD DE CIENCIAS BÁSICAS CARRERA DE MICROBIOLOGÍA INDUSTRIAL BOGOTÁ, D.C.

URIBE D., GIRALDO D., GUTIÉRREZ S., MERINO F. (2013). BIODEGRADACIÓN DE POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD POR ACCIÓN DE UN CONSORCIO MICROBIANO AISLADO DE UN RELLENO SANITARIO, LIMA, PERÚ, REV. PERÚ. BIOL. FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS UNMSM

QUINCHÍA FIGUEROA A.; MAYA CORREA S. (2015). BIODEGRADACIÓN DEL POLIETILENO DE BAJA DENSIDAD UTILIZANDO PYCNOPORUS SANGUINEUS UTCH- TESIS DE LA UNIVERSIDAD DE ANTIOQUIA.